

**Analyse der RyREF2-Bindungsstelle im Promotor
des porcinen *RyR1* Gens und
Charakterisierung des porcinen *FHL1*-Gens**

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

vorgelegt von
Andrea Krempler
aus Vöcklabruck/Österreich

Göttingen 2000

D7

Referent: Prof. Dr. H.-J. Fritz

Korreferent: Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2000

Wissenschaft ist nur eine Hälfte,
Glauben ist die andere
(Novalis)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1995 bis April 2000 unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig am Tierärztlichen Institut der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt. Die Arbeit wurde von Prof. Dr. H.-J. Fritz im Sinne der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten betreut und vor der Fakultät vertreten.

Herrn Prof. Dr. Dr. Bertram Brenig danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für die ausgezeichnete fachliche Anleitung, die ständige konstruktive Diskussion sowie das ausgezeichnete Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz möchte ich mich für die Übernahme des Referats und bei Herrn Prof. Dr. R. Hardeland für die Übernahme des Korreferats im Fachbereich Biologie bedanken.

Frau Sonja Kollers (Technische Universität, München) danke ich für die Durchführung der *in situ* Hybridisierungen.

Frau Alexandra Deppe danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei den Sequenzierarbeiten. Weiters bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekularbiologie, deren Hilfsbereitschaft, Unterstützung und auch privates Engagement die Arbeit am Institut stets zu einem Vergnügen machten. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Tierärztlichen Instituts, deren ständiger Einsatz viel zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn Dr. Gero Fabig möchte ich mich herzlich für die ständige Bereitschaft zur Sektion von Schweinen bedanken. Ohne seine Hilfe wären viele Experimente mit porcinem Gewebe und RNA nicht so einfach durchzuführen gewesen.

Herrn Dr. Bernhard Baumgartner danke ich für die Unterstützung in der Anfangsphase meiner Zeit in Göttingen sowie für die vielen Tips und Tricks im Laboralltag. Sein Engagement in methodischen oder fachlichen Fragestellungen haben mir viele Experimente erleichtert. Besonders werden mir auch die Partys und Feste in Erinnerung bleiben, die durch seine musikalischen Beiträge sicher zu den Höhepunkten in Göttingen zählen

Bei Herrn Prof. Dr. Tosso Leeb (Tierärztliche Hochschule, Hannover) bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen während seiner Zeit in Göttingen. Ein besonderes Vergnügen waren auch die vielen gemeinsamen Spiele-Abende und Badmintonspiele.

Frau Dr. Ina Pfeiffer danke ich für viele Stunden der Diskussion, für die Ratschläge, die Hilfsbereitschaft und ständige Unterstützung während der Arbeit sowie für viele vergnügliche Stunden bei den diversen Einkaufs-Touren.

Meinen herzlichen Dank an Dr. Jörg Rahnenführer, der mir durch sein Verständnis und seinen Zuspruch viel Motivation für die Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie. Durch die finanzielle Unterstützung meiner Mutter war es erst möglich, mein Studium in Salzburg durchzuführen.

Weiters danke ich auch allen Freunden und Bekannten außerhalb des Instituts, die meinen Aufenthalt in Deutschland zu einer schönen Erinnerung machen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Krempler A. und Brenig B. (1996) Muskelspezifische Genexpression in der Embryonalentwicklung. *DTW Dtsch Tierärztl Wochenschr* 103: 408-13.

Krempler A. und Brenig B. (1999) Zinc finger proteins: watchdogs in muscle development. *Mol Gen Genet* 261: 209-15.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Calcium freisetzende Kanäle	3
2.2	Ryanodin Rezeptoren	4
2.2.1	Die EC-Kopplung	4
2.2.2	Die Struktur der Ryanodinrezeptoren und ihre akzessorischen Proteine	6
2.2.3	Die Regulation der Rezeptorfunktion durch Liganden und assoziierte Proteine	7
2.2.4	Die <i>RyR</i> Gene	9
2.2.5	Die Regulation der <i>RyR</i> Expression	11
2.2.5.1	Regulatorische Elemente in <i>RyR</i> Promotoren	11
2.2.5.2	Die Regulation des porcinen <i>RyR1</i> Gens	12
2.3	Muskelspezifische Genexpression	12
2.3.1	Die myogenen Regulationsfaktoren (MRFs)	12
2.3.1.1	Die <i>MyoD</i> Genfamilie	12
2.3.1.2	Die Regulation der MRFs	14
2.3.2	Zinkfinger Proteine	15
2.3.2.1	Das klassische Zinkfingermotiv	15
2.3.2.2	Klassische Zinkfinger Proteine im Skelettmuskel	17
2.3.2.3	LIM Proteine in der Muskelentwicklung	18
2.4	Four and a half LIM Domain Proteine (FHLs)	19
2.4.1	Die FHL Isoformen	19
2.4.2	FHL1/SLIM1/KyoT1	20
2.4.3	Die Splice-Varianten von FHL1	21
3	Material	23
3.1	Genbanken, Bakterien, Phagen, Plasmide	23
3.1.1	Genbanken	23
3.1.2	Bakterien und Phagen	23
3.1.3	Plasmide	24
3.2	Enzyme, Nukleotide, Chemikalien und Kits	24
3.2.1	Enzyme	24

3.2.2	Nukleotide	24
3.2.3	Chemikalien	25
3.2.4	Kits	25
3.3	Verbrauchsartikel und Glaswaren	25
3.4	Laborgeräte	25
4	Methoden	27
4.1	Mikrobiologische Arbeiten	27
4.1.1	Bakterienvorkultur	27
4.1.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	27
4.1.3	Transformation von Plasmiden in Bakterien	28
4.2	DNA-Isolierung	29
4.2.1	Isolierung größerer Mengen von Plasmid DNA mit QIAGEN Plasmid Kits	29
4.2.2	Isolierung von PAC-DNA im großen Maßstab	30
4.2.3	Schnellaufschluß durch alkalische Lyse	31
4.2.3.1	Plasmide	31
4.2.3.2	PAC-DNA	31
4.2.4	Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut	32
4.3	Enzymatische Behandlung von DNA	32
4.3.1	Restriktionsspaltung	32
4.3.2	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden	33
4.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit den entsprechenden Plasmiden	33
4.4	Auftrennung und Gewinnung von DNA-Fragmenten	33
4.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	33
4.4.2	Elution von DNA aus Agarosegelen durch Zentrifugation	34
4.4.3	Elution von DNA aus Agarosegelen mit QIAEXII	34
4.5	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen	35
4.5.1	Alkalischer Transfer von DNA auf Nylonmembranen	35
4.5.2	Nichtradioaktive Hybridisierung mit dem ECL Direct Labelling System	35
4.6	Radioaktive Markierung von DNA	36
4.6.1	Radioaktive Markierung von DNA mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP und dem RadPrime DNA Labelling System	36
4.6.2	Radioaktive Markierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden durch Kinasierung mit $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP	36
4.7	Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide	37
4.7.1	Ligation von doppelsträngigen Oligonukleotiden zu Konkatemeren	37

4.7.2	Präparation von konkateren Oligonukleotiden mit Biotin-Markierung	38
4.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
4.8.1	PCR-Reaktionen	38
4.8.2	Klonierung von PCR-Produkten	38
4.9	Phagenisolierung	39
4.9.1	Herstellung phagenkompetenter Bakterien	39
4.9.2	Ausplattieren von Phagen auf Agarplatten	39
4.9.3	Titerbestimmung einer Phagenlösung	40
4.9.4	Anlegen von Plattenpools	40
4.9.5	Durchmustern einer Genbank durch Hybridisierung mit einer DNA Sonde	41
4.9.6	Isolierung eines Einzelphagen und Präparation von Phagen-DNA	42
4.9.7	Exzision von Phagen-Inserts mit Helferphagen	44
4.9.8	South-Western Screening	44
4.10	Konstruktion einer Expressions-cDNA-Bank in λ ZAP Express	45
4.10.1	Erststrangsynthese	45
4.10.2	Zweitstrangsynthese	46
4.10.3	Glätten der cDNA-Enden und Ligation der <i>EcoRI</i> Adaptoren	46
4.10.4	Kinasierung der <i>EcoRI</i> -Enden und <i>XhoI</i> -Spaltung	46
4.10.5	Größenfraktionierung der cDNA-Fragmente über eine Sephacryl S-500 Säule	47
4.10.6	Ligation der cDNA in die ZAP Express Vektor-Arme	47
4.10.7	Verpacken der ligierten cDNA-Vektor-Konstrukte mit Verpackungsextrakt	47
4.10.8	Amplifikation der primären cDNA-Bank	48
4.11	DNA-Doppelstrangsequenzierung nach Sanger	48
4.11.1	Radioaktive Sequenzierung mit $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP	48
4.11.1.1	Sequenzreaktionen	48
4.11.1.2	Polyacrylamid-Sequenzgel-Elektrophorese	49
4.11.2	Nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA	50
4.11.2.1	Sequenzreaktionen	50
4.11.2.2	Automatisiertes Sequenzieren	50
4.12	RNA Analyse	51
4.12.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	51
4.12.2	Isolierung von mRNA mit dem Oligotex mRNA Kit	52
4.12.3	Isolierung von mRNA mit dem Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit	52
4.12.4	RT-PCR	53
4.12.5	5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) mit dem Marathon cDNA Amplification Kit und dem Advantage 2 PCR Enzyme System	53
4.12.6	Nichtradioaktive Primer Extension Analyse	54

4.13	Protein Analyse	55
4.13.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Skelettmuskelgewebe	55
4.13.2	Herstellung eines rohen Kernextraktes für die Säulenchromatographie	56
4.13.3	Isolierung von Zellkernen aus Skelettmuskelhomogenat	57
4.13.4	Extraktion von Kernproteinen	58
4.13.5	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	58
4.13.6	Säulenchromatographie - Ionentauscher	58
4.13.6.1	Packen einer Chromatographiesäule	58
4.13.6.2	Probenauftrag und Entwickeln der Säule	59
4.13.7	Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Agarose und Biotin-markiertem Oligo A5	60
4.13.8	Gelretention	60
4.13.9	Dot-Blot Analyse von DNA-bindenden Proteinen	61
4.13.10	DNase Footprint Analyse auf einem automatischen Sequenziergerät	61
5	Ergebnisse	63
5.1	Charakterisierung der RyREF2-Bindungsstelle	63
5.1.1	South-Western Screening einer porcinen Hirn cDNA-Bank	63
5.1.2	Konstruktion und Screening einer porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank	65
5.1.3	PCR und RT-PCR auf porcinen DNA und RNA Proben	66
5.1.4	Screening einer porcinen genomischen Bank mit einer Sonde aus dem Zinkfingerprotein	67
5.1.5	Isolierung von RyREF2 Protein	67
5.1.5.1	Proteinisolierung und Retentionsanalyse	68
5.1.5.2	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	69
5.1.5.3	DNase Footprint Analyse	69
5.1.5.4	Retentionsanalyse mit Subfragmenten des Oligos A5	72
5.1.5.5	Retentionsanalyse der Proteinbindung unter Zugabe von <i>1,10-o</i> -Phenantrolin und EDTA	72
5.1.5.6	Präparation von rohen Kernextrakten und Dot-Blot Analyse	74
5.1.5.7	Aufreinigung von rohen Kernextrakten über PEI-Cellulose	76
5.1.5.8	Analyse der PEI-Elution im Dot-Blot und im Retentionsgel	77
5.1.5.9	Säulenchromatographie von rohem Kernextrakt mit TMAE	79
5.1.5.10	Rechromatographie der positiven Proben TG3 - 5	80
5.1.5.11	Reinigung der positiven TMAE-Proben über Heparin-Sepharose	83
5.1.5.12	Affinitätsreinigung der positiven Probe HS5	84
5.1.5.13	Retentionsanalyse mit reinen Kernextrakten	85
5.2	Isolierung von Zinkfinger-Motiven mittels PCR	87
5.2.1	Touch-Down PCR auf den Phagenpools der porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank	87
5.3	Isolierung und molekulare Charakterisierung des porcinen <i>FHL1</i> Gens	89
5.3.1	Isolierung der FHL1 cDNA	89

5.3.2	Das porcine FHL1 Protein	94
5.3.3	5'-RACE zur Identifizierung des 5'-UTR	95
5.3.4	In FHL1 cDNAs sind zwei Arten von 5'-UTRs zu finden	98
5.3.5	Isolierung genomischer Sequenzen des porcinen <i>FHL1</i> Gens	98
5.3.6	Isolierung eines PAC-Klons aus einer porcinen PAC-Genbank	100
5.3.7	Identifizierung von Restriktionsfragmenten aus dem PAC-Klon	103
5.3.8	Sequenzierung des ersten Introns und des ersten Exons von FHL1C	103
5.3.9	Primer Extension Analyse der FHL1C Genvariante	106
5.3.10	RT-PCR im 5'-Bereich	106
5.3.11	RT-PCR zum Nachweis von FHL1 und FHL1C in verschiedenen porcinen Geweben	109
5.3.12	Chromosomale Lokalisation des porcinen <i>FHL1</i> Gens	111
6	Diskussion	113
6.1	Charakterisierung der RyREF2 Bindungsstelle	113
6.1.1	Screening porciner DNA-Banken	113
6.1.1.1	South-Western Hybridisierung einer porcinen Gehirn cDNA-Bank	113
6.1.1.2	Screening einer Skelettmuskel cDNA-Bank	116
6.1.2	Homologe Bereiche aus dem Hefe-Fragment sind nicht im Schwein zu finden	117
6.1.3	Zell- und Kernextrakte aus porcinem Skelettmuskelgewebe zeigen Bindungsaktivität	118
6.1.4	Rohe Kernextrakte zeigen verstärkte Bindungsaktivität mit Oligo A5	121
6.1.5	Bei der Auftrennung von Proteinhomogenaten über Ionenaustauscher-Säulen sind einzelne Fraktionen bindungsaktiv	123
6.1.6	Affinitätschromatographie führt zu keiner Konzentrierung des bindungsaktiven Faktors	125
6.1.7	Reine Kernpräparationen zeigen Bindungsaktivität für Sp1, spezifische Aktivität für RyREF2 kann nicht nachgewiesen werden	126
6.2	Isolierung und Charakterisierung des porcinen <i>FHL1</i> Gens	127
6.2.1	Touch-Down PCR führt zur Isolierung porciner FHL1 cDNA	127
6.2.2	Vergleich der porcinen FHL1 cDNA mit der humanen und murinen cDNA	128
6.2.3	Der 5'-UTR der isolierten FHL1-cDNA aus porcinem Skelettmuskel unterscheidet sich von den publizierten Sequenzen aus Mensch und Maus	131
6.2.4	Die Sequenz der isolierten cDNA erstreckt sich über 14 kb genomischen Bereich	133
6.2.5	Die Expression der FHL1-Genvarianten wird möglicherweise von zwei verschiedenen Promotoren gesteuert	134
6.2.6	Die chromosomale Lokalisation im Schwein entspricht dem Genlocus für FHL1 im Menschen	135
6.2.7	FHL1 Proteine sind stark konserviert	137
6.2.8	Die Funktion der FHL1 Proteine	139

6.2.9	Die Splice-Varianten FHL1B/SLIMMER und KyoT2	141
7	Zusammenfassung	145
8	Literaturverzeichnis	147
9	Anhang	163

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Die Trias-Region in der Skelettmuskulatur	5
Abb. 2.2	Die Struktur myogener bHLH Proteine	14
Abb. 2.3	Das klassische Zinkfinger-Motiv	16
Abb. 5.1	Der porcine <i>RyR1</i> Promotor und das Oligo A5	64
Abb. 5.2	Der cDNA-Klon REF2p11.E1	65
Abb. 5.3	Die überlappenden Fragmente aus <i>S. cerevisiae</i>	66
Abb. 5.4	Gelretention mit Rohextrakt und Kernextrakt	68
Abb. 5.5	Gelretentionen der Ammoniumsulfatfällungen	70
Abb. 5.6	DNase Footprint Analyse	71
Abb. 5.7	Retentionsanalyse mit Subfragmenten	73
Abb. 5.8	<i>1,10 - o</i> - Phenantrolin und EDTA	74
Abb. 5.9	Dot-Blot und Retentionsanalyse von rohen Kernextrakten	75
Abb. 5.10	Elutionsprofil der PEI-Säule	77
Abb. 5.11	Dot-Blot und Retentionsgel der PEI-Elution	78
Abb. 5.12	Elutionsprofil, Dot-Blot und Retentionsgel der TMAE-Säule	80
Abb. 5.13	Rechromatographie über eine TMAE-Säule und Dot-Blot Analyse	81
Abb. 5.14	Die Wirkung von Detergenz	82
Abb. 5.15	Die Auftrennung positiver TMAE Fraktionen auf Heparin-Sepharose	83
Abb. 5.16	Retentionsgel der Affinitätssäule	84
Abb. 5.17	Retentionsgel der 420 mM Kernextrakte	85
Abb. 5.18	Retentionsanalyse mit Kernextrakten und Oligo Sp1 sowie Oligo A5	86
Abb. 5.19	Primer Design zur Isolierung von Zinkfinger Sequenzen	88
Abb. 5.20	Touch-Down PCR auf den Plattenpools der porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank	89
Abb. 5.21	PCR auf den positiven Phagen der Hybridisierung mit pZF-H17	90
Abb. 5.22	Alignment der Sequenzen aus pFHL/H600-3 mit dem 3'-UTR der humanen FHL1 cDNA	91

Abb. 5.23	PCR auf den Phageneluatens λ FHL/F1-4	92
Abb. 5.24	Alignment der Sequenzen aus FHL/F1200-5 mit dem 3'-UTR der humanen FHL1 cDNA	93
Abb. 5.25	Die cDNA des porcinen <i>FHL1</i> Gens	94
Abb. 5.26	Vergleich der vier LIM Domänen im porcinen FHL1 Protein	95
Abb. 5.27	RACE-PCR auf isolierter porciner Skelettmuskel-RNA	96
Abb. 5.28	Vergleich der FHL1 5'-UTRs	97
Abb. 5.29	Die Analyse von EST-Sequenzen	99
Abb. 5.30	Isolierung und Sequenzierung eines genomischen Phagen	101
Abb. 5.31	Identifizierung eines PAC Klon in einer 384er Mikrotiterplatte	102
Abb. 5.32	Isolierung von PAC Fragmenten	104
Abb. 5.33	Exon-Intron Grenzen des porcinen <i>FHL1</i> Gens	105
Abb. 5.34	Primer Extension Analyse	107
Abb. 5.35	Die Promotorregion von FHL1C	108
Abb. 5.36	RT-PCR im 5'-Bereich	109
Abb. 5.37	Isolation des 5'-UTRs über PCR auf den Plattenpools der Skelettmuskel cDNA-Bank	110
Abb. 5.38	RT-PCR zum Nachweis von FHL1 und FHL1C Genprodukten in verschiedenen porcinen Geweben	111
Abb. 5.39	Lokalisation von FHL1 im distalen Bereich von Chromosom Xq	112
Abb. 6.1	Vergleich der FHL1 cDNA-Sequenzen in Schwein, Mensch und Maus	129
Abb. 6.2	Vergleich der Polyadenylierungs-Stellen von FHL1 in Schwein und Maus	130
Abb. 6.3	Die cDNA-Sequenz von FHL1C	132
Abb. 6.4	Exon- und Intronlängen in Schwein und Mensch	133
Abb. 6.5	Die Splice-Produkte des <i>FHL1</i> Gens	136
Abb. 6.6	Aminosäuren-Vergleich der FHL1 Proteine aus Schwein, Mensch und Maus	138
Abb. 6.7	Focal Adhesion Plaques	140

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung	h	Stunde
APS	Ammoniumperoxodisulfat	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-
BAC	Bacterial artificial chromosome		piperazin-N´-(2- Ethansulfonsäure)
BLAST	Basic local alignment search tool	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalacto- pyranosid
BSA	Bovines Serumalbumin	MW	Molekulargewicht
bp	Basenpaare	kb	Kilo-Basen
ca.	circa	kDa	Kilo-Dalton
cDNA	komplementäre DNA	kg	Kilogramm
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol	KOAc	Kaliumacetat
cm	Zentimeter	M	molar
DEPC	Diethylpyrocarbonat	mA	Milliampere
DMSO	Dimethylsulfat	max.	maximal
DNA	Desoxiribonukleinsäure	min	Minuten
dNTP	2´-Desoxyribonukleosid-5´- triphosphat	ml	Milliliter
DTT	Dithiothreitol	mm	Millimeter
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	mM	millimolar
EST	Expressed sequenced Tag	MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	mRNA	messenger-RNA
fmol	femtomol	MOPS	3-(n-Morpholino)-Propan- sulfonsäure
FPLC	Fast Protein, Polypeptide and Polynucleotide Liquid Chromatography	μCi	Mikrocurie (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bequerel)
g	Gramm	μg	Mikrogramm
		μl	Mikroliter
		μm	Mikrometer

NaO-Ac	Natriumacetat	SINE	Short interspersed repetitive
NC	Nitrocellulose		Elements
ng	Nanogramm	SP	Superpool
nm	Nanometer	SSP	Super-Superpool
OD _{xnm}	optische Dichte bei x Nanometer	s. u. TEMED	siehe unten N, N, N', N'-Tetramethyl- ethylendiamin
ORF	offener Leserahmen		
PA	Polyadenylierung	TMAE	Trimethylaminoethan
PAA	Polyacrylamid	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- Aminomethan
PAC	P1-derived artificial chromosome	tRNA	transfer RNA
PCR	Polymerase Kettenreaktion	U	Units
PEI	Polyethylenimin	U/min	Umdrehungen pro Minute
pfu	Plaque-forming units	U/μl	Units pro Mikroliter
pI	isoelektrischer Punkt	UTR	untranslatierter Bereich
pmol	picomol	UV	ultraviolett
PMSF	Phenylmethylsulfonyl- fluorid	V v/v	Volt Volumen pro Volumen
PP	Plattenpool	W	Watt
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends	w/v Vol	Gewicht pro Volumen Volumen
rATP	Adenosin-5'-triphosphat	X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β-D-Galaktosid
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute	Ø	Durchmesser
RT	reverse Transkription		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
sec	Sekunden		

1 Einleitung

Skelettmuskelzellen sind auf die Verrichtung mechanischer Arbeit spezialisiert und bilden die Grundlage für die Bewegungsfähigkeit von Organismen. Die Funktion der Muskelfasern ist wie kaum eine andere Zelleistung bis in die molekularen Details aufgeklärt und die Entwicklung der Skelettmuskulatur von den teilungsfähigen Myoblasten in den Somiten des Embryos bis hin zur differenzierten Muskelzelle ist Gegenstand vieler Untersuchungen. In den letzten Jahren entwickelte sich Skelettmuskelgewebe auch immer mehr zu einem wichtigen Modell, um Mechanismen zu verstehen, welche die gewebsspezifische Expression steuern. Dabei ist von besonderer Bedeutung, daß der Differenzierungsprozeß der Muskelzellen *in vitro* sehr leicht nachvollzogen werden kann. Die Untersuchung dieser Differenzierung auf molekularer Ebene führte schließlich zur Entdeckung muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren, die seither wichtige Marker des Muskelzellenphänotyps darstellen.

Die transkriptionelle Kontrolle gewebsspezifischer Gene beruht zum großen Teil auf der Funktion zelltypenspezifischer Promotoren, die über Bindung einzigartiger Kombinationen von Transkriptionsfaktoren die Expression individuell steuern. Das Zusammenspiel sowohl spezifischer als auch ubiquitärer Faktoren führt dabei letztendlich zur Ausprägung eines bestimmten Zell-Phänotyps. Diese transkriptionelle Kontrolle in Muskelzellen sollte anhand eines Promotorfragments des Skelettmuskel-Ryanodinrezeptors 1 näher untersucht werden. Für dieses Promotorfragment konnte von Schmoelzl *et al.* (1996) Bindungsaktivität in Retentionsanalysen nachgewiesen werden. Diese Bindungsaktivität sollte über molekularbiologische und biochemische Methoden genauer analysiert werden und damit zur Aufklärung der gewebsspezifischen Expressionsregulation des *RyR 1* Gens beitragen.

Da die Expression vieler gewebsspezifischer Gene von Signalen abhängig ist, die von der Zelloberfläche in den Kern geleitet werden, ist die Analyse von Signaltransduktionswegen ein weiterer wichtiger Bestandteil von Untersuchungen zur Genexpression. In diesem Zusammenhang zeigte sich, daß Zinkfinger Proteine bedeutende Faktoren in diesen Prozessen darstellen. Neben den klassischen Transkriptionsfaktoren werden in zunehmendem Maße Zinkfinger Proteine isoliert, die sowohl Signaltransduktions- als auch Transkriptionsfaktorfunktionen übernehmen. In Skelettmuskelzellen konnten einige LIM Proteine beschrieben

werden deren duales Auftreten im Kern und im Cytoplasma auf eine solche kombinierte Funktion schließen läßt. Zudem dürften unterschiedliche Gen-Varianten dabei eine bedeutende Rolle spielen. Ein Beispiel für solche Proteine ist das im Skelettmuskel hoch exprimierte LIM Protein FHL1. Ursprünglich als Struktur-Komponente in Focal Adhesion Plaques beschrieben, zeigte sich, daß Splice-Varianten des Gens auch im Kern lokalisiert sein können und dort möglicherweise die Funktion von Transkriptionsfaktoren erfüllen. Die Isolierung und Charakterisierung des porcinen *FHL 1* Gens sollte durch Analyse der Genomstruktur und Untersuchungen von Promotorregionen und verschiedener cDNA-Produkte das Verständnis über die Bedeutung dieser Splice-Varianten erhöhen. Die Charakterisierung und die Lokalisation des Gens im porcinen Genom gibt zudem weitere Aufschlüsse über die Genomstruktur im Schwein und den sythänischen Beziehungen zwischen den Chromosomen in Mensch und Schwein

2 Literaturübersicht

2.1 Calcium freisetzende Kanäle

Die Evolution von intrazellulären, Ca^{2+} -freisetzenden Kanälen geht einher mit der Fähigkeit von intrazellulären Organellen Ca^{2+} zu speichern, und der Verwendung von Ca^{2+} als sekundärem Botenstoff. Intrazelluläres Calcium reguliert verschiedenste zelluläre Prozesse wie Muskelkontraktion, Oozytenfertilisation, Hormonsekretion und auch apoptotische Prozesse. Die Freisetzung erfolgt über spezielle Rezeptoren in den Membransystemen des endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulums. Bis jetzt kennt man zwei Gruppen von Kanälen, die intrazelluläres Ca^{2+} freisetzen: Inositol 1,4,5-Triphosphat Rezeptoren (IP3R) und Ryanodin Rezeptoren (RyR) (Ogawa, 1994).

IP3 Rezeptoren sind Liganden aktivierte Kanäle, die Inositol-3 Phosphat für ihre Funktion benötigen. Sie tauchen schon sehr früh in der eukaryotischen Entwicklungsgeschichte auf. Wahrscheinlich waren sie schon in den Vorläufern der Grünalgen und der Protozoen zu finden und die drei Isoformen des Rezeptors konnten bis jetzt in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. IP3 Rezeptoren spielen vor allem in der Embryonalentwicklung eine wesentliche Rolle bei Ca^{2+} -freisetzenden Prozessen. Erst in den fertig ausgebildeten Organen kommt es zu einer größeren Spezialisierung (Furuichi *et al.*, 1990; Sugiyama *et al.*, 1994; Rosembliet *et al.*, 1999).

RyR Proteine tauchen erst später in der Entwicklung auf. So sind in *S. cerevisiae* keine orthologen Sequenzen für RyR zu finden. In vielen Zellen treten IP3 und Ryanodin Rezeptoren gleichzeitig auf. Die physiologische Bedeutung dafür ist weitgehend unklar, die Rezeptoren werden aber über unterschiedliche Signalwege induziert. So findet man in den epithelialen Zellen des Pankreas RyR2 nur in den basolateralen Bereichen der Zellen, wohingegen die IP3 Rezeptoren ausschließlich in den apikalen exprimiert werden (Leite *et al.*, 1999). Im Herzmuskel könnten IP3 Rezeptoren in geringem Maße die Funktion von RyR2 übernehmen, wenn im Krankheitsfalle deren Funktion ausfällt.

2.2 Ryanodin Rezeptoren

Die drei Isoformen der Ryanodin Rezeptoren werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. RyR1 ist vor allem im Skelettmuskel, aber auch im Gehirn zu finden (Takeshima *et al.*, 1989; Zorzato *et al.*, 1990; Damiani *et al.*, 1991). Der Ryanodin Rezeptor Typ 2 (RyR2) ist die dominierende Form im Herzmuskel, kommt aber auch in glatter Muskulatur und im Gehirn vor (Nakai *et al.*, 1990; Herrmann-Frank *et al.*, 1991; McPherson *et al.*, 1991). Der Ryanodin Rezeptor 3 (RyR3) wird in verschiedenen Regionen des Gehirns, in der Skelettmuskulatur und in Zellen des Immunsystems exprimiert. In Skelettmuskeln beträgt der Gehalt an RYR3 allerdings weniger als 1 % des RYR1-Gehalts. Im Gehirn ist RYR2 insgesamt die häufigste Isoform, wobei in unterschiedlichen Regionen jeweils genau reguliert ist, in welchem Verhältnis die drei RyR Isoformen exprimiert werden. RYR3 ist zum Beispiel die dominierende Isoform im Hippocampus und im Corpus Striatum (Giannini *et al.*, 1992; Hakamata *et al.*, 1992).

2.2.1 Die EC-Kopplung

Die Ryanodin Rezeptoren im sarkoplasmatischen Reticulum (SR) der Skelettmuskulatur haben eine vorherrschende Rolle in der EC (Excitation-Contraction) – Kopplung. Dabei wird ein Aktionspotential über die Oberfläche der Membranen und ihrer Einstülpungen, den transversalen Tubuli, geleitet. In den Membranen der transversalen Tubuli sitzen Dihydropyridin Rezeptoren, welche als Spannungssensoren dienen und die elektrischen Signale der Nervenzellen an die Ryanodin Rezeptoren übertragen. Wie die Signalübertragung in der sogenannten Trias Region zwischen Dihydropyridin Rezeptor und Ryanodin-Rezeptor tatsächlich funktioniert, ist allerdings noch nicht geklärt. Das Signal löst eine Ca^{2+} - Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum aus. Die Calcium Ionen werden im Ruhezustand der Zellen in den terminalen Zisternen des SR gelagert, wo sie an Calsequestrin gebunden sind. Der Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration bewirkt, daß Troponin C Ca^{2+} -Ionen bindet, wodurch die Wechselwirkung zwischen Tropomyosin und

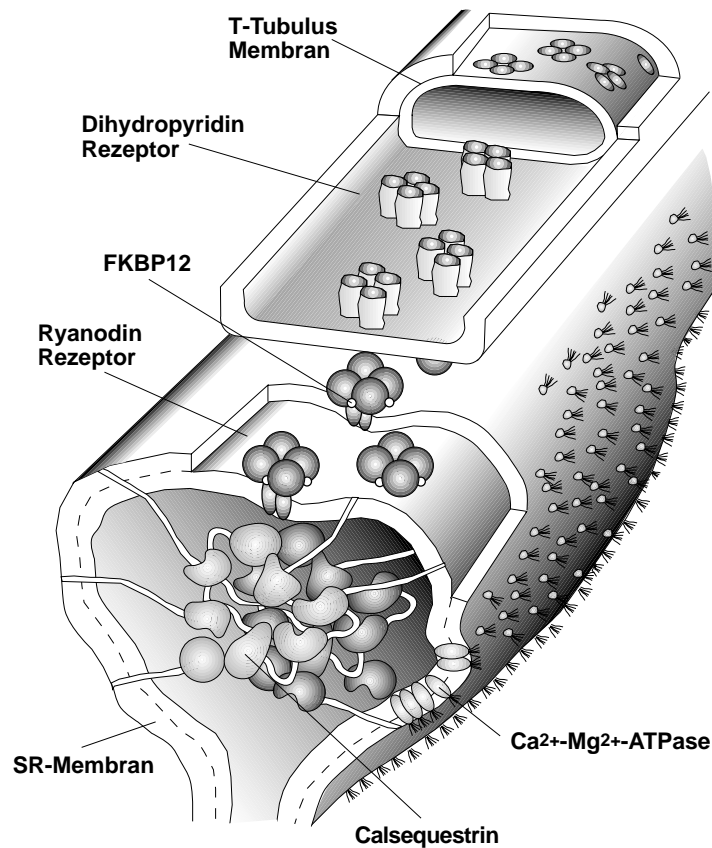


Abb. 2.1: Die Trias-Region in der Skelettmuskulatur

Schematische Darstellung der Trias in der Skelettmuskulatur. Jeweils einem Homotetramer des Ryanodinrezeptors in der Membran des sarkoplasmatischen Reticulums (SR) stehen vier Dihydropyridin Rezeptoren in der T-Tubulus Membran gegenüber. Der Spalt zwischen terminaler Zisterne und T-Tubulus wird von der Fuß-Region des Ryanodin Rezeptors durchspannt.

Aktin beeinflusst wird. Myosin bindet an Aktin und löst eine Kontraktion aus. Zurückgepumpt werden die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen anschließend durch die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (Abb. 2.1). Die Ca^{2+} Ausschüttung beruht in den Skelettmuskelzellen ausschließlich auf der Funktion des Ryanodin Rezeptors 1. RyR3 wird zwar zum selben Zeitpunkt früh in der Myotuben-Differenzierung exprimiert, scheint aber eine eher modulatorische Funktion zu besitzen (Tarroni *et al.*, 1997). Im Herzmuskel wird die Funktion vom RyR-Typ 2 wahrgenommen. Zusätzlich findet man auch IP3 Rezeptoren (Gorza *et al.*, 1993). Im Herzmuskel scheint auch keiner der RyRs mechanisch an DHP Rezeptoren gekoppelt zu sein. Vielmehr unterliegt die Kontrolle der EC-Kopplung einer Ca^{2+} abhängigen Aktivierung des Typ 2 RyR Rezeptors, wobei das Ca^{2+} in der verlängerten „Plateau“-Phase des kardialen Aktionspotentials wirkt. In der glatten Muskulatur findet man zwar RyR Rezeptoren, aber IP3 Rezeptoren sind in viel

größerer Zahl vorhanden und übernehmen dort wahrscheinlich die entsprechenden Funktionen.

2.2.2 Die Struktur der Ryanodin Rezeptoren und ihre akzessorischen Proteine

Die Struktur von Ryanodin Rezeptoren in den Membranen des sarko- und endoplasmatischen Reticulums wurde über morphologische Daten, aus Hydropathie-Profilen der Aminosäuresequenzen, proteolytischen Spaltungen, Antikörperstudien und Cross-Linking Experimenten abgeleitet. Etwa 80 % des Proteins liegt im Cytoplasma und bilden die Fußstruktur aus, die man schon lange aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen kennt (Ferguson *et al.*, 1984). Die restlichen 20 % bilden die transmembranen Domänen und einen kleinen luminalen Teil. Trotzdem die cDNA-Sequenzen und damit auch die Aminosäuresequenzen schon länger bekannt sind, weiß man sehr wenig über die Beziehungen zwischen Struktur und Funktion der RyR Proteine. Aus der Aminosäuresequenz lassen sich zwei Proteinmodelle ableiten, die entweder 4 oder 10 Transmembrandomänen ausbilden (Takeshima *et al.*, 1989; Zorzato *et al.*, 1990). Ergebnisse aus Kristallstrukturdaten lassen 10 Transmembrandomänen vermuten (Samso und Wagenknecht, 1998), aber Antikörper-Bindungsstudien favorisieren das Modell mit 4 Domänen (Grunwald und Meissner, 1995). Zudem wurden Leucin-Zipper Motive in den Sequenzen von RyR Rezeptoren gefunden. Dieses Motiv besteht aus einer periodischen Wiederholung von Leucin-Resten an jeder siebten Position über eine Distanz von acht helikalen Windungen. Strukturell könnte sich dabei eine α -Helix ausbilden, die mit einer anderen α -Helix gleicher Konformation in Interaktion tritt. Obwohl das Motiv ursprünglich bei DNA-bindenden Proteinen identifiziert wurde, zeigt es auch wichtige strukturelle Funktionen in der Ausbildung von Tetrameren (Harbury *et al.*, 1993).

Der EC-Kopplungs Mechanismus im Skelettmuskel entwickelt sich in den ersten Wochen nach der Geburt und im Zuge der postnatalen Entwicklung werden Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des Ca^{2+} -Regulationssystems immer komplexer und die Bildung von Oligomeren scheint eine wichtige Voraussetzung für die physiologische Funktion dieser

Proteine zu sein. Auf jeden Fall sind für die Funktion der Trias Region noch weitere akzessorische Proteine nötig. So wurde ein 12 kDa Protein (FKBP12) isoliert, das eng mit RyR1 assoziiert ist (Brillantes *et al.*, 1994). Weitere Kandidaten sind Triadin, Junctin oder Mitsugumin-29 (Guo *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Takeshima *et al.*, 1998). Vor der Ausbildung des EC-Kopplungsmechanismus könnte die Muskelkontraktion unter einem mehr Herzmuskel ähnlichen Konzept ablaufen, basierend auf Ca-induzierter Ca^{2+} -Ausschüttung (Froemming und Ohlendieck, 1998). Ein Modell für die Ausbildung der Trias-Region besagt, daß erst der Kontakt eines Bereichs des SR mit einem anderen Bereich der Membran der T-Tubuli die Akkumulation und Organisation von RyR Rezeptoren bewirkt und dann die Interaktion mit den DHPRs eintritt (Flucher und Franzini-Armstrong, 1996).

2.2.3 Die Regulation der Rezeptorfunktion durch Liganden und assoziierte Proteine

Ryanodin Rezeptoren wurden ursprünglich aufgrund ihrer Interaktion mit dem Pflanzenalkaloid Ryanodin gefunden und erforscht. Ryanodin ist ein insektizides Pflanzenalkaloid, das aus den Wurzeln und dem Stamm des südafrikanischen Strauchgewächses *Ryania speciosa* gewonnen wird. Es hat zwei aktive Hauptkomponenten: Ryanodin und 9,21-Didehydroryanodin. Das Alkaloid hält den Rezeptor in permanent offenem Zustand. Im Skelettmuskel von Wirbeltieren induziert es langsame, irreversible Kontraktionen und im Herzmuskel senkt Ryanodin die Kontraktionskraft (Waterhouse *et al.*, 1987). Es wurden mehrere Bindungsstellen im Ryanodin-Rezeptor identifiziert, wobei das Alkaloid in Ca^{2+} -abhängiger Weise bindet. Allerdings existiert nur eine einzige hochaffine Bindungsstelle für Ryanodin pro RyR Tetramer. Die anderen drei potentiellen Bindungsstellen müssen demnach eine Umwandlung von hochaffiner zu niedrigaffiner Bindungsstelle durchlaufen, was eine Konformationsänderung dieser Untereinheiten nahe legt (Pessah und Zimanyi, 1991). Die exakte Bindungsstelle für Ryanodin ist allerdings unbekannt, man vermutet sie aber am C Terminus, nahe oder sogar in der Membrandomäne von RyR (Callaway *et al.*, 1994). Liganden, von denen man weiß, daß sie den Ca^{2+} -Kanal öffnen und den Ca^{2+} -Ausstoß regulieren, stimulieren auch die Ryanodin-Bindung an dessen

hochaffine Bindungsstelle. Liganden mit antagonistischer Wirkung verhindern die Bindung von Ryanodin (Coronado *et al.*, 1994).

Einer der wichtigsten Liganden im Zusammenhang mit der Rezeptorfunktion ist Ca^{2+} selbst. Ca^{2+} hat, abhängig von der vorhandenen Konzentration, sowohl aktivierende als auch inaktivierende Wirkung auf die Funktion des Rezeptors (Ebashi, 1991). Keine der Ca^{2+} -Bindungsstellen konnte bis jetzt mit Sicherheit festgelegt werden. Anhand der Aminosäuresequenz kann man aber drei Regionen festlegen, die Eigenschaften von Ca^{2+} -bindenden EF-Fingern besitzen (Takeshima *et al.*, 1989).

Mg^{2+} wirkt in millimolaren Konzentrationen inhibierend auf die Ca^{2+} -Ausschüttung von RyR1, aber nur in geringem Maße auf RyR2. Obwohl Mg^{2+} ein bedeutender Regulator der Rezeptoraktivität zu sein scheint, sind die genauen Mechanismen welche die Interaktion mit dem Kanal bewerkstelligen noch nicht bekannt (Michalak *et al.*, 1988).

Neben Ca^{2+} und Mg^{2+} wurden eine Reihe weiterer Agonisten und Antagonisten der RyR Funktion beschrieben. Zu den Aktivatoren zählen Adenin-Nukleotide, Koffein und in geringen Mengen auch Calmodulin. Zu den Inhibitoren zählen Dantrolen und in besonderem Maße Ruthenium-Rot (Leeb und Brenig, 1998b). Ryanodin Rezeptoren interagieren auch mit vielen hydrophoben Drogen, einschließlich einiger Lokalanesthetika und anderer Betäubungsmittel (Shoshan-Barmatz und Ashley, 1998).

Für die Ryanodin Rezeptoren im Skelettmuskel von Kaninchen und im Herzmuskel vom Hund wurde gezeigt, daß sie von Proteinkinasen phosphoryliert werden können. In beiden Fällen wird ein Serin-Rest, der an vergleichbarer Stelle in der RyR1 und RyR2 Aminosäuresequenz liegt, phosphoryliert (Hohenegger und Suko, 1993; Suko *et al.*, 1993). Die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung ist weiters nicht bekannt. SR Membranen enthalten zudem ein endogenes Phosphorylierungssystem, das exklusiv zwei Proteine phosphoryliert: Histidine-Rich Ca^{2+} -Binding Protein (HCP) und das Glycoprotein Sarcalumenin. Der Phosphorylierungsgrad dieser Proteine scheint die Funktion der Rezeptoren zu beeinflussen (Shoshan-Barmatz und Ashley, 1998).

FK-506, ein Immunsuppressivum, bindet an eine Familie von verwandten intrazellulären Rezeptoren, den FK 506 Binding Proteins (FKBPs). Dabei ist FKBP12 das am häufigsten auftretende. Es wurde gezeigt, daß FKBP12 mit den Ryanodin Rezeptoren im Skelettmuskel und im Herzmuskel assoziiert ist (Collins, 1991; Timerman *et al.*, 1994) und auch die

Funktion von IP₃ Rezeptoren beeinflusst (Cameron *et al.*, 1995). Entfernt man FKBP12 vom Ryanodin Rezeptor, wird der Ca²⁺-Kanal durchlässig. Mögliche Funktionen liegen in der Koordinierung des RyR Tetramers, Stabilisierung des geschlossenen Zustandes des Kanals (Mayrleitner *et al.*, 1994) und eine Funktion beim Übergang zum vollständig geöffneten Zustand (Brillantes *et al.*, 1994).

Ein weiteres RyR assoziiertes Protein, Triadin, könnte das Verbindungsmolekül zwischen RyR und DHPR darstellen, da es in Protein-Overlays und auf Affinitätsäulen sowohl mit RyR als auch mit der α -Untereinheit des DHPR assoziiert ist (Kim *et al.*, 1990). Allerdings gibt es auch Ergebnisse wonach Triadin für die Verankerung von Calsequestrin verantwortlich ist (Guo *et al.*, 1996). Triadin, von dem man mehrere Isoformen kennt, ist ein intrinsisches Membran-Glycoprotein mit wahrscheinlich nur einer Transmembrandomäne (Knudson *et al.*, 1993).

2.2.4 Die RyR Gene

Die drei Isoformen der Ryanodin Rezeptoren in Säugern werden von drei unterschiedlichen Genen kodiert, die möglicherweise aus Verdopplungsereignissen stammen. RyR1 cDNA aus Säugern wurden vom Kaninchen, vom Menschen und vom Schwein isoliert und sequenziert (Takeshima *et al.*, 1989; Zorzato *et al.*, 1990; Harbitz *et al.*, 1992). Die humane RyR1 cDNA erstreckt sich über etwa 16 kb mit einem offenen Leserahmen von 15117 bp, der für 5038 Aminosäuren kodiert. Der 5'- und der 3'- Bereich umfassen 130 bp und 146 bp. RyR1 ist auch das einzige Protein der RyR Familie von dem die Genomstruktur aufgeklärt wurde. Das humane *RyR1* Gen erstreckt sich über 160 kb und ist in 106 Exons aufgeteilt. Damit zählt das *RyR1* Gen zu den größten bekannten Genen (Phillips *et al.*, 1996). Auch vom Schwein wurden größere Bereiche des Gens analysiert und es zeigte sich, daß die Struktur zwischen Mensch und Schwein in diesen Abschnitten vollständig konserviert ist (Leeb und Brenig, 1996; Wen *et al.*, 1996). Beim Menschen liegt das *RyR1* Gen auf Chromosom 19q12-q13.2 (McCarthy *et al.*, 1990), beim Schwein wurde es auf Chromosom 6p11-q21 lokalisiert (Chowdhary *et al.*, 1994).

RyR2 und RyR3 cDNAs wurden aus Kaninchen und Mensch kloniert (Nakai *et al.*, 1990; Hakamata *et al.*, 1992; Tunwell *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1997; Leeb und Brenig, 1998a), RyR3 kennt man auch vom Nerz (Marziali *et al.*, 1996). Die beiden cDNAs haben mit 4967 Aminosäuren (RyR2) und 4870 Aminosäuren (RyR3) einen etwas kürzeren offenen Leserahmen als RyR1. Im humanen Genom wurde RyR2 auf Chromosom 1q42.1-q43 lokalisiert, das porcine *RyR2* Gen befindet sich auf Chromosom 14q22-q23. RyR3 liegt auf Chromosom 15q14-q15 (Otsu *et al.*, 1993; Sorrentino *et al.*, 1993; Leeb *et al.*, 1995). Die drei Isoformen der Ryanodin Rezeptoren weisen eine gegenseitige Homologie von 66-70% auf. Dagegen sind die Skelettmuskel-Isoformen innerhalb der Säugetiere zu etwa 95 % konserviert.

Von allen drei *RyR* Gene kennt man alternativ gespleißte Produkte. So wurden RyR1 Transkripte gefunden, denen Exon 70 oder Exon 83 fehlt (Ledbetter *et al.*, 1994). Diese und drei weitere alternative Splice-Stellen wurden auch in RyR3 Produkten beobachtet (Marziali *et al.*, 1996; Miyatake *et al.*, 1996; Leeb und Brenig, 1998a). Ebenso kennt man zwei alternative Splice-Stellen im humanen *RyR2* Gen (Tunwell *et al.*, 1996). Obwohl man nicht weiß, ob diese Splice-Varianten unterschiedliche physiologische Funktionen besitzen, scheinen die Transkripte doch gewebsspezifisch gebildet zu werden (Futatsugi *et al.*, 1995; Marziali *et al.*, 1996; Miyatake *et al.*, 1996). So zeigt eine RyR3-Variante, die im Myometrium exprimiert wird, keine Reaktion (keine Kontraktion der Muskulatur) auf Koffein, das als allgemeiner Aktivator von Ryanodin-sensitiven Ca²⁺-Kanälen gilt (Savineau und Mironneau, 1990). Neben diesen Splice-Varianten, deren Länge ungefähr dem Volllängefragment entspricht, gibt es auch viel kürzere RyR Fragmente, die wahrscheinlich durch proteolytische Prozesse entstehen und keine physiologische Funktion besitzen.

In Nicht-Säugetieren wie Vögel, Fische und Frösche findet man zwei Isoformen von RyR (α - und β -RyR) (Airey *et al.*, 1990; Olivares *et al.*, 1991). Beide Formen bilden Homotetramere aus und zeigen stadiumspezifische Expression in der Embryonalentwicklung von Hühner-Skelettmuskeln (Sutko *et al.*, 1991). Die Aminosäuresequenz von β -RyR hat die höchste Identität zur Aminosäuresequenz von RyR3 aus Kaninchengehirn, wohingegen α -RyR das Gegenstück zur Skelettmuskelform RyR1 zu sein scheint (Oyamada *et al.*, 1994). In *Drosophila* kennt man ebenfalls ein Gen, das der RyR-Sequenz entspricht. Das *dry* Gen weist aber weniger als 60 % Identität zur Kaninchen RyR1 und RyR2 Sequenz auf (Takeshima *et al.*, 1994b)

RyR1 Knock-out Mäuse sterben perinatal mit bedeutenden Abnormitäten der Skelettmuskulatur. Sie können nicht atmen, haben ungewöhnliche Krümmungen der Wirbelsäule und dünne Extremitäten mit sehr fragilen Muskeln. Histologisch zeigt die Muskulatur degenerative Veränderungen. Die normale EC-Kopplung ist nicht nachzuweisen, jedoch können schwache Muskelkontraktionen bei externer elektrischer Anregung beobachtet werden (Takeshima *et al.*, 1994a). Ebenso wurden Knock-out Mäuse für funktionelles RyR3 untersucht. Diese Tiere zeigen keine besonderen phenotypischen Auffälligkeiten. Es wird nur eine gesteigerte Bewegungsaktivität festgestellt und die Ca²⁺ Ausschüttung im Skelettmuskel SR ist leicht reduziert. Und obwohl RyR3 in T-Zellen exprimiert wird, proliferieren Milzzellen aus solchen Mäusen normal (Takeshima *et al.*, 1996).

2.2.5 Die Regulation der *RyR* Expression

2.2.5.1 Regulatorische Elemente in *RyR* Promotoren

Über die transkriptionelle Regulation der *RyR* Gene ist noch sehr wenig bekannt. Der Transkriptionsstart für *RyR1* aus dem Kaninchen wurde 138 Basen stromaufwärts des Translation-iniziiierenden ATGs festgelegt. Zudem wurden zwei GC Boxen und eine CCAAT Box identifiziert. Eine TATA Box fehlt im *RyR1* Promotor (Takeshima *et al.*, 1989). Vom humanen *RyR1* Gen wurden 2,4 kb 5'-Bereich analysiert (Phillips *et al.*, 1996). Der Promotor enthält ebenfalls eine CCAAT Box und einige potentielle Bindungsstellen für Sp1. Der vermutliche Transkriptionsstart liegt bei -130 bp. Die 5'-Region enthält noch eine Reihe von potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die aber nicht näher charakterisiert worden sind.

Die 5'-Region des *RyR2* Gens wurde ebenfalls untersucht. Der Promotor enthält keine CCAAT oder TATA Box, aber eine der überlappenden GC Boxen bindet Sp1 und scheint für die Transkriptionsaktivierung von Bedeutung zu sein. Außerdem wurden noch zwei regulatorische Elemente identifiziert, die möglicherweise die *RyR2* Expression verstärken. Zudem zeigte sich, daß die *RyR2* Promotor Region nicht herz-spezifisch aktiv ist, vielmehr

wurde im Bereich -209 bis -90 bp ein negativ regulierendes Element beschrieben, das die *RyR2* Expression in Muskelzellen unterdrückt (Nakai *et al.*, 1990).

RyR3 wird möglicherweise durch TGF- β reguliert, da die cDNA ursprünglich aus Lungenepithel des Nerzes isoliert wurde, deren Expression durch Einwirken von TGF- β induziert wird (Giannini *et al.*, 1992).

2.2.5.2 Die Regulation des porcinen *RyR1* Gens

Schmoelzl *et al.* (1996) analysierten den Promotor des porcinen *RyR1* Gens. Der Transkriptionsstart wurde bei Position -110 relativ zum Translationsstart festgelegt und beinhaltet das Dinukleotid GT. Wie in der humanen und der Nager-Sequenz fand man keine TATA Box. Einige GC-reiche Regionen liegen um den Transkriptionsstart. Sie zeigen Homologie zur Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors Sp1 (Gidoni *et al.*, 1985). In Promotoren ohne TATA Box vermittelt häufig Sp1 die Bindung des TATA bindenden Proteins (TBP) an die DNA (Hernandez, 1993) und ermöglicht damit die Transkriptionsinitiierung durch die RNA-Polymerase II. Ein CCAAT Box Motiv wurde zwischen Position -92 und -88 gefunden. Zusätzlich zu diesen basalen Promotorelementen konnte im 5'-Bereich an Position -342 bis -328 eine A/T reiche Region identifiziert werden, die in 10 von 10 bp mit dem beschriebenen Konsensusmotiv von MEF2 übereinstimmt (Cserjesi und Olson, 1991). Obwohl das Motiv in negativer Orientierung vorhanden ist, scheint es Bindungsaktivität für MEF2 zu haben. Ebenfalls in negativer Orientierung befindet sich 58 bp weiter stromaufwärts ein in 7 von 9 Basen homologes Konsensusmotiv für MEF3 (Parmacek *et al.*, 1994), das allerdings keine Bindungsaktivität aufweist. Das Motiv ist aber nur wenig konserviert und die Sequenzspezifität von MEF3 scheint gering zu sein (Hidaka *et al.*, 1993). Retentionsanalysen mit Bereichen zwischen -390 bp und -340 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart lieferten Hinweise auf zwei Bindungsstellen für mögliche neue Transkriptionsfaktoren. Für diese Faktoren wurde vermutet, daß sie neuronalen Ursprungs sind und damit könnte erklärt werden, warum *RyR1* auch in einigen Bereichen des Gehirns gebildet wird.

Schmoelzl *et al.* (1996) exprimierten weiters eine Reihe von chimären Konstrukten aus Promotor-Bereichen und Chloramphenicolacetyltransferase in unterschiedlichen Zelltypen

(Fibroblasten, Myoblasten und Myotuben). Dabei zeigte sich, daß das erste Intron von *RYR1* wichtig für die gewebespezifische Expression des Gens ist. Dieses Intron enthält eine Reihe von E-Boxen die teilweise tandemartig angeordnet sind. Diese E-Boxen stellen potentielle Bindungsmotive für myogene bHLH Proteine dar. Diese Gruppe von muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren spielt eine bedeutende Rolle in der Differenzierung und Aufrechterhaltung der myogenen Gewebe. Die Orientierung dieser Bindungsstellen scheint dabei wichtig zu sein, da nur Konstrukte, welche das erste Intron in positiver Orientierung enthielten, auch gewebsspezifisch Expression zeigten. Der untersuchte Promotorbereich an sich schien keinen Einfluß auf die Gewebespezifität zu haben. Er umfaßte 552 bp und reichte aus, in allen untersuchten Zelltypen die Expression des Reporter Gens zu initiieren. In diesem Sequenzbereich sind einige G/C reiche Boxen zu finden, die für die Bindung von Sp1 von Bedeutung sein könnten.

2.3 Muskelspezifische Genexpression

2.3.1 Die myogenen Regulationsfaktoren (MRFs)

2.3.1.1 Die *MyoD* Genfamilie

Mit der Entdeckung der MyoD-Familie skelettmuskelspezifischer Transkriptionsfaktoren konnten erstmals auf molekularbiologischer Ebene die Zusammenhänge erklärt werden, die aus den Somiten des Embryos die Skelettmuskelfasern des adulten Tieres entstehen lassen. Diese Regulationsfaktoren, welche nur in Skelettmuskelzellen exprimiert werden und den myogenen Status der Myotomzellen festzulegen scheinen, gehören zur Familie der Helix-Loop-Helix (HLH) Proteine. In Vertebraten kennt man bis jetzt vier Mitglieder der MyoD-Familie: MyoD (Davis *et al.*, 1987), Myf5 (Braun *et al.*, 1989), Myogenin (Edmondson und Olson, 1989; Wright *et al.*, 1989) und MRF4 (=Myf-6, Herculin) (Rhodes und Konieczny, 1989; Braun *et al.*, 1990; Miner und Wold, 1990). Das HLH-Motiv befähigt diese Proteine

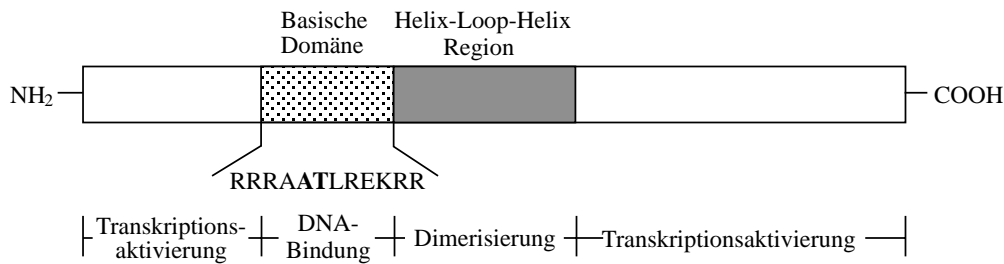


Abb. 2.2: Die Struktur myogener bHLH Proteine

Die basische Domäne der myogenen bHLH Faktoren mit den konservierten Aminosäuren Alanin und Threonin befähigt die Proteine an DNA zu binden. Die Helix-Loop-Helix Region dient der Interaktion mit den Bindungspartnern. N- und C-Terminus fungieren als Transkriptionsaktivierungsdomänen.

mit anderen HLH-Proteinen Dimere auszubilden, welche in den unterschiedlichsten Zelltypen Wachstum und Differenzierung regulieren (Kingston, 1989). Zusätzlich zur HLH-Region besitzen die myogenen Faktoren noch eine basische DNA Bindungsdomäne. Diese Domäne zeigt eine hohe Affinität für eine bestimmte Sequenzfolge (CANNTG) in den Promotoren vieler muskelspezifischer Gene, den sogenannten E-Boxen. E-Boxen werden für die Transkriptionsaktivierung vieler skelettmuskelspezifischer Gene benötigt, sind alleine aber nicht ausreichend, sondern wirken vielmehr im Zusammenhang mit anderen generellen und gewebsspezifischen Bindungsfaktoren. Bevorzugte Dimerisierungspartner der myogenen bHLH Proteine sind die ubiquitär exprimierten Produkte des E2A Gens, E12 und E47, deren Heterodimere mit MyoD die Transkription vieler E-Box enthaltender Gene steuern (Murre *et al.*, 1989; Lassar *et al.*, 1991; Weintraub *et al.*, 1991) (Abb. 2.2).

2.3.1.2 Die Regulation der MRFs

Die genauen Regulationsmechanismen, welche die Myogenese *in vivo* induzieren, sind zwar nicht bekannt, aber Untersuchungen an etablierten myogenen Zelllinien geben Einblicke in die muskelspezifischen Regulationskaskaden.

Eine wichtige Rolle in der Regulation der MRFs spielen die myogenen bHLH-Proteine selbst, denn *in vitro* wurde nachgewiesen, daß fast jedes Mitglied der MyoD-Genfamilie die anderen Faktoren und auch sein eigenes Gen aktivieren kann (Weintraub *et al.*, 1991). Mit MEF2 konnte ein weiterer bedeutender Regulator der muskelspezifischen Genexpression

charakterisiert werden (Gossett *et al.*, 1989). MEF2-Bindungssequenzen finden sich in den Promotoren vieler skelett- und herzmuskelspezifischer Gene. In der Skelettmuskelentwicklung wird MEF2C kurz nach Myogenin im Myotom exprimiert und durch Expression von myogenen bHLH-Faktoren in Fibroblasten kann die MEF2-Bindungsaktivität induziert werden (Lassar *et al.*, 1991). Es ist daher wahrscheinlich, daß MEF2 stromabwärts der myogenen bHLH-Proteine exprimiert wird.

Das HLH-Protein Id (Inhibitor of Differentiation), das in proliferierenden Myoblasten in großen Mengen nachgewiesen werden kann, wirkt als Antagonist der muskelspezifischen Genexpression, indem es mit den E2-Proteinen Heterodimere bildet und so deren Bindung an MRFs verhindert (Benezra *et al.*, 1990).

Weitere negative Regulatoren der Muskeldifferenzierung sind Wachstumsfaktoren wie TGF β (Transforming Growth Factor β) und FGF (Fibroblast Growth Factor), src-Genprodukt, Ras-Onkogen sowie c-Jun. Ebenso verhält es sich mit den Proteinkinasen PKC und PKA. Da alle diese Faktoren eine wichtige Rolle in der Übermittlung von Signalen von der Zelloberfläche zum Zellkern spielen, ist ihre reprimierende Wirkung wahrscheinlich Produkt der gegenseitigen Abhängigkeit voneinander (Krempler und Brenig, 1996).

2.3.2 Zinkfinger Proteine

Das Wirken der myogenen bHLH Proteine bestimmt maßgeblich die Determination des Muskelzellen-Phänotyps, doch auch diese Proteine sind eingebettet in einen komplizierten Regelkreislauf, wobei die Wirkung eines Proteins abhängig ist von der Wirkung eines anderen. Dabei ist vor allem interessant, wie die Expression der muskelspezifischen Gene im Detail gesteuert wird und Promotoranalysen sollten dabei Aufschluß über neue Transkriptionsfaktoren bringen.

2.3.2.1 Das klassische Zinkfingermotiv

Eine der am besten charakterisierten Gruppen von Transkriptionsfaktoren sind die Zinkfinger Proteine. Die bindungsaktive Domäne wurde als erstes im Transkriptionsfaktor TFIIIA von

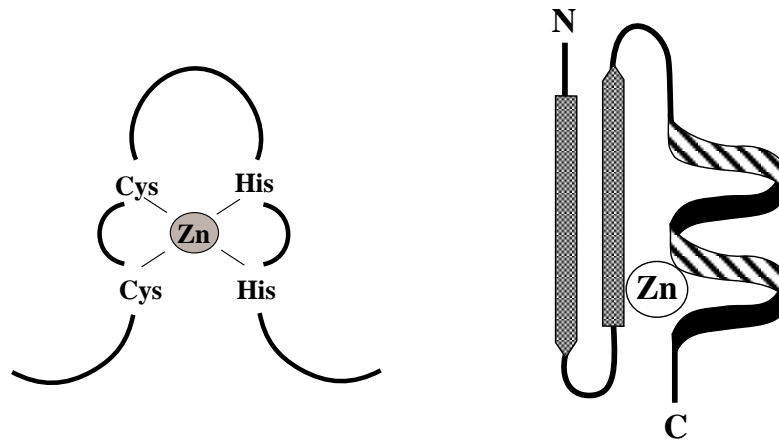


Abb. 2.3: Das klassische Zinkfinger-Motiv

Im klassischen Zinkfinger-Motiv komplexieren zwei Cysteine und zwei Histidine ein Zink-Ion. Dadurch wird im Protein ein antiparalleles β -Faltblatt in unmittelbare Nähe einer α -Helix gebracht.

Xenopus laevis identifiziert. Dieser Faktor ist bedeutend in der Transkription und Lagerung der 5S RNA (Miller *et al.*, 1985). Sequenzdaten zeigten eine neunfache Wiederholung von konservierten Cysteinen und Histidinen in einer 30 Aminosäuren umfassenden Domäne. Weitere biochemische Analysen führten zu der Erkenntnis, daß jede dieser neun Einheiten je ein Zink-Ion über Interaktion mit den Cysteinen und Histidinen komplexieren kann und daß diese "Minidomäne" fähig ist, DNA und in einigen Fällen auch RNA zu binden. Dieser sogenannte klassische Zinkfinger, bestehend aus zwei Cysteinen und zwei Histidinen (C₂H₂), wurde bald darauf in vielen anderen Proteinen gefunden (Abb. 2.3). Zu ihnen gehören Entwicklungsgene wie *Krüppel* (Jaeckle *et al.*, 1985), Transkriptionsfaktoren wie Sp1 (Kadonaga *et al.*, 1987) und Gene, die mit Krankheiten in Verbindung stehen wie *Wt1* (Call *et al.*, 1990). Diese Faktoren stammen aus den verschiedensten Organismen und die meisten wirken als Transkriptionsfaktoren. Heute nimmt man an, daß etwa 1 % der menschlichen Gene Zinkfinger Proteine kodieren (Hoovers *et al.*, 1992). Viele sind auf DNA Ebene charakterisiert, aber von nur sehr wenigen kennt man die genaue Funktion. Die Verteilung der Zinkfinger Gene auf den Chromosomen scheint auch nicht zufällig zu sein. So trägt das humane Chromosom 19 eine überdurchschnittlich hohe Anzahl (etwa 40 %) der bis jetzt bekannten und lokalisierten Zinkfinger Gene (Lichter *et al.*, 1992). Die Anzahl einzelner Fingerdomänen innerhalb eines Proteins ist sehr unterschiedlich und liegt im Allgemeinen zwischen 2 und 37 Wiederholungen. Die Zinkfinger sind dann häufig durch eine weitere

charakteristische Sequenzabfolge verbunden. Der sogenannte H/C - Linker liegt zwischen dem letzten Histidin eines Fingers und dem ersten Cystein des folgenden Motivs (Bellefroid *et al.*, 1989). Seine charakteristische Aminosäurenabfolge ist H T G E K P Y E/K (Schuh *et al.*, 1986). Da es wahrscheinlich keine Interaktion zwischen nebeneinander liegenden Fingern gibt, kann jedes Motiv als selbstständige Bindungseinheit betrachtet werden, was theoretisch sehr große Kombinationsmöglichkeiten eröffnet. Jeder Zinkfinger interagiert mit der DNA über den N-Terminus seiner α -Helix und lagert sich so in die große Furche des Doppelstrangs. Dabei spielen drei Aminosäuren in der Helix eine bedeutende Rolle bei der Basenerkennung (Pavletich und Pabo, 1991; Klug und Schwabe, 1995) und alle basenspezifischen Kontakte finden nur auf einem Strang der DNA statt (Pieler und Bellefroid, 1994). Allerdings interagieren nicht alle Zinkfinger eines Proteins mit der Zielsequenz. So sind die Finger 1-3 im Transkriptionsfaktor TF IIIA für DNA Bindung zuständig und die Zinkfinger 4-6 interagieren mit RNA (Theunissen *et al.*, 1992). Andere Proteine aus der Gruppe der Zinkfinger Proteine haben noch weitere bekannte Motive wie zum Beispiel Homeodomänen oder KRAB (Krueppel Associated Box) Domänen, welche für die Regelung der Transkription von Bedeutung sind (Bellefroid *et al.*, 1991).

Neben den klassischen Zinkfingern wurden auch andere Proteine mit konservierten Cysteinen und Histidinen isoliert, die fingerähnliche Domänen ausbilden und Zn^{2+} binden können. Da sich ihre Struktur aber von jener der klassischen Zinkfinger unterscheidet, und auch ihre Bindungseigenschaften von anderer Natur sind, z. B. Protein-Protein Interaktion, wurden die Zinkfingerproteine in verschiedene Klassen unterteilt. Beispiele sind die nukleären Hormonrezeptoren (Hollenberg *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 1987), die GATA Transkriptionsfaktoren (Trainor *et al.*, 1990) oder die LIM Proteine (Sanchez-Garcia und Rabbitts, 1994; Klug und Schwabe, 1995).

2.3.2.2 Klassische Zinkfinger Proteine im Skelettmuskel

In den letzten Jahren wurden immer mehr Zinkfinger Proteine charakterisiert, die eine erhöhte oder spezifische Expression in Skelettmuskelzellen zeigten, wie zum Beispiel OZF (Le Chalony *et al.*, 1994) und ZNF195 (Hussey *et al.*, 1997). Anderen konnte man spezifische Funktionen in der Differenzierung von Muskelzellen, der Kontrolle von muskelspezifischen

Genen oder die Beteiligung an der Muskelverankerung und der zielgerichteten Interaktion von Motoneuronen mit Muskelzellen zuweisen. In diesem Zusammenhang erwies sich *Drosophila melanogaster* einmal mehr als ideales System zur Erklärung der Vorgänge in der Muskelzellenentwicklung und -funktion. Die Zinkfinger Proteine Krüppel (Jaekle *et al.*, 1985), Knockout (Hartmann *et al.*, 1997), Abrupt (Hu *et al.*, 1995), BRC-Z1 (Sandstrom *et al.*, 1997) oder Stripe (Vorbruggen und Jackle, 1997) wurden im Zuge dieser Untersuchungen als wichtige Regulatoren der Muskelzellfunktion isoliert.

Obwohl die *Drosophila* - Genetik ein wertvolles Werkzeug in der Untersuchung von Entwicklungsprozessen ist und viele funktionelle Aspekte direkt auf höhere Organismen übertragen werden können, sind diese von ihrer Körperstruktur viel komplexer aufgebaut. Die modernen Methoden der Promotoranalyse (z. B. Transfektionsexperimente, Retentionsanalysen, Footprintanalysen und South-Western-Screening) erlauben einen direkten Zugriff auf ein bestimmtes Modellsystem und die wachsende Anzahl der isolierten Transkriptionsfaktoren unterstreicht die Bedeutung dieser methodischen Ansätze. In diesem Zusammenhang konnte deutlich gezeigt werden, daß klassische Zinkfinger-Proteine auch in höheren Organismen eine bedeutende Rolle in der Differenzierung und dem Wachstum von Muskelzellen erfüllen (Krempler und Brenig, 1999). Beispiele dafür sind: Ying Yang 1 (YY1) (Lee *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994), YY1 Associated Factor 2 (YAF2) (Kalenik *et al.*, 1997), Zinc Finger E-Box Binding Factor (ZEB) (Postigo und Dean, 1997) oder Enolase Repressing Factor 1 (BERF-1) (Passantino *et al.*, 1998)

2.3.2.3 LIM Proteine in der Muskelentwicklung

Das LIM Motiv ist eine doppelte Zinkfinger Struktur (C2HC, C4C3D oder C4C3H), die in einer Gruppe von Proteinen auftritt, deren Funktionen in der Aufrechterhaltung der Zellidentität, der Differenzierung und der Wachstumskontrolle liegen. Der Begriff LIM leitet sich von den beiden *C. elegans* Genen *lin-11* und *mec-3*, sowie vom Nager-Gen *Isl-1* ab (Sanchez-Garcia und Rabbitts, 1994). LIM Proteine werden in vier Unterklassen aufgeteilt: (i) die LIM/Homeodomain Proteine, Transkriptionsfaktoren, die eine große Bedeutung in der Zelldetermination und -differenzierung besitzen, und aufgrund ihrer Homeodomäne meist Transkriptionsfaktoren sind; (ii) die LIM Kinasen mit zwei LIM - Fingern und einer C-

terminalen Kinase Domäne; (iii) Proteine mit LIM Domänen an ihrem C-terminalen Ende sowie zusätzlichen Domänen von meist unbekannter Funktion (z. B. Paxillin und Zyxin); und (iv) LIM-only Proteine, die keine weiteren Motive aufweisen (Arber und Caroni, 1996). Die eigentliche Funktion der LIM Motive ist bis jetzt ziemlich unklar, aber man vermutet, daß sie Protein-Protein Interaktion vermitteln und als Adaptoren fungieren, deren Aufgabe darin besteht, spezifische Proteinkomplexe aufrecht zu erhalten. Biochemische Untersuchungen von cytoplasmatischen LIM Proteinen bestätigen diese Funktion. Zudem sind viele dieser Proteine mit dem Cytoskelett assoziiert. LIM Proteinen, die im Zusammenhang mit Muskelentwicklung isoliert wurden, sind unter anderem Muscle LIM Protein (MLP) (Arber *et al.*, 1997) und DALP (Death-Associated LIM-only Protein) (Hu *et al.*, 1999).

2.4 Four and a half LIM Domain Proteine (FHLs)

2.4.1 Die FHL Isoformen

Four and a half LIM Domain Proteine (FHLs) sind eine Gruppe von LIM Proteinen, die im Skelettmuskel, aber auch in anderen Geweben identifiziert wurden. Charakteristisch sind 4 aufeinanderfolgende LIM Domänen und ein GATA1 ähnlicher Zinkfinger am N-Terminus (Morgan und Madgwick, 1996). Bis jetzt wurden vier Isoformen in unterschiedlichen Organismen beschrieben (FHL1-4) (Morgan und Madgwick, 1996; Chan *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998a; Morgan und Madgwick, 1999a) und zumindest von FHL1 kennt man zwei Splice-Varianten des Gens (FHL1B/SLIMMER und KyoT2) (Taniguchi *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Alle vier cDNAs der FHL Isoformen, die Splice-Varianten von FHL1 ausgenommen, kodieren für ein Protein mit etwa 280 Aminosäuren (MW = 32 kDa). Die vier LIM Domänen sind durch jeweils acht Aminosäuren getrennt.

FHL1 und FHL3 werden vorwiegend im Skelettmuskel exprimiert, wobei FHL1 mit einem Anstieg der nachweisbaren RNA nach der Myotubenfusion, dem Expressionsmuster von

Myogenin folgt. FHL3 hat einen reziproken Expressionsverlauf, mit den höchsten Anteilen im Myoblastenstadium und sinkender Expression nach der Muskeldifferenzierung (Lee *et al.*, 1998a; Morgan und Madgwick, 1999b).

FHL2 ist die vorherrschende Isoform im Herzmuskel und weist auf cDNA Basis eine 97 % Identität zur Sequenz von DRAL auf, einem LIM Faktor, der dadurch identifiziert wurde, weil er beim Übergang von Myoblasten zu Rhabdomyosarcoma (RMS) Zellen vermindert exprimiert wird (Genini *et al.*, 1997). Auf Aminosäuren Ebene sind die beiden Proteine bis auf eine Aminosäure identisch (Chan *et al.*, 1998).

Von FHL4 kennt man exprimierte Produkte nur im Hoden, was eine Funktion in der Spermatogenese vermuten läßt. Von seiner Aminosäuresequenz ist es mit FHL1 am nächsten verwandt (Morgan und Madgwick, 1999a).

Die chromosomale Lokalisation beim Menschen ist von FHL1, FHL2 und FHL3 bekannt. FHL1 befindet sich auf Chromosom Xq27.2 (Lee *et al.*, 1998a; Greene *et al.*, 1999) in der Nähe des Locus für Fragile X, und den Genloci von Myotubularin und Emirin. Mutationen in diesen Genen wurden mit myotubulärer Myopathie und der Emery-Dreifuss muskulären Dystrophie in Zusammenhang gebracht (Bione *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1996; Laporte *et al.*, 1996). FHL2 wurde auf Chromosom 2q12-2q13 lokalisiert ohne offensichtliche Korrelation zu einer genetisch manifestierten Herzerkrankung (Genini *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1998). FHL3 befindet sich auf Chromosom 1p34.2-p32.3 in unmittelbarer Nähe des Allels für Kongenitale Ptosis (PTOS1) und dem Allel für das Schwartz-Jampel Syndrom. In beiden Krankheitsbildern können auch myopathische Veränderungen auftreten (Lee *et al.*, 1998b; Morgan und Madgwick, 1999b).

2.4.2 FHL1/SLIM1/KyoT1

FHL1 cDNAs kennt man aus verschiedenen Spezies wie Mensch, Maus, Ratte und Zebrafisch. Die vorhergesagte Proteinsequenz besteht aus 280 Aminosäuren und ist zwischen den Organismen sehr hoch konserviert. Starke Expression des Gens ist im Skelettmuskel, in den Genitalorganen und in der Lunge, geringe Expression ist im Thymus, den Lymphknoten und der Leber zu beobachten. In mit FHL1 transfizierten COS-7 Zellen ist das Protein in

Assoziation mit den Focal Adhesion Zonen der Zelle und entlang der Aktin Filamente zu beobachten. Über die genaue Funktion von FHL1 ist nichts bekannt, man vermutet aber, daß es aufgrund seiner LIM Domänen als Verbindungsprotein in einem größeren Funktionskomplex innerhalb der Focal Adhesion Bereiche auftritt (Brown *et al.*, 1999).

Von FHL1 sind auch Teile der Genomstruktur bekannt. Der kodierende Bereich erstreckt sich über 4 kb und ist in 6 Exons (einschließlich eines alternativ gespleißten Exons) gegliedert. Das erste Exon und der 5'-UTR konnten bis jetzt noch nicht identifiziert werden (Taniguchi *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 1999).

2.4.3 Die Splice-Varianten von FHL1

Von FHL1 sind zwei Splice-Varianten bekannt - FHL1B/SLIMMER und KyoT2. KyoT2 ist mit 194 Aminosäuren kürzer, FHL1B/SLIMMER mit 323 Aminosäuren länger als FHL1. Durch Spleißen von zwei Exons bei KyoT2 besitzt das Protein nur die ersten beiden LIM-Domänen von FHL1. Durch Verwendung eines alternativ gespleißten Exons sind bei FHL1B/SLIMMER die ersten drei LIM Domänen aus FHL1 zu finden. Dadurch kommt es in beiden Fällen auch zu einer Verschiebung des Leserahmens im letzten Exon des Gens und zu einem späteren Stop der Proteinsynthese als in FHL1. In diesem neuen C-Terminus finden sich in beiden Proteinen Sequenzen, die eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor RBP-J vermitteln (Taniguchi *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Für diesen Faktor wird vermutet, daß er eine Rolle in der Entwicklung des Zentralnervensystems und der Somiten spielt (Oka *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang wurde für KyoT2 bewiesen, daß es mit RBP-J interagiert, dessen Bindung an die DNA verhindert und somit Transkription von Zielgenen in negativer Weise reguliert. FHL1/KyoT1 zeigte in diesen Studien nur schwache Bindung an RBP-J. Vermehrte Expression von KyoT2 tritt im Gehirn, der Lunge, den Nieren und den Genitalorganen auf.

KyoT2 wurde vornehmlich im Kern lokalisiert. Man konnte allerdings kein eindeutiges Kernlokalisierungssignal feststellen und daher wird vermutet, daß die Interaktion mit anderen Proteinen die Translokation in den Kern bewerkstelligt (Taniguchi *et al.*, 1998).

FHL1B/SLIMMER konnte in den Kernen von Myoblasten und COS-7 Zellen nachgewiesen werden, geringe Mengen finden sich aber auch im Cytoplasma. Nach der Differenzierung in Myotuben wird es ausschließlich im Cytosol beobachtet. Die Aminosäuresequenz von FHL1B/SLIMMER enthält neben der RBP-J Bindungssequenz noch drei überlappende, zweiteilige Kernlokalisierungssignale sowie eine Lysin-reiche Region, die als Kernexportsignal wirkt. Es konnte gezeigt werden, daß die Translokation des Proteins in den Kern durch das erste Kernlokalisierungssignal vermittelt wird. Über die genaue Funktion von FHL1B/SLIMMER ist nichts bekannt, durch sein duales Auftreten im Kern und im Cytoplasma verhält es sich aber in ähnlicher Weise wie das LIM Protein MLP (Arber *et al.*, 1994). Untersuchungen über das gewebespezifische Auftreten von FHL1B/SLIMMER sind kontrovers. Brown *et al.* (1999) beobachteten Expression von FHL1B/SLIMMER in Skelettmuskeln, im Herzen, im Dickdarm, der Prostata und im Dünndarm. Lee *et al.* (1999) berichten, daß FHL1B eine gehirnspezifische Splice-Variante von FHL1 darstellt

3 Material

3.1 Genbanken, Bakterien, Phagen, Plasmide,

Die verwendeten Bakterien, Phagen, Plasmide und Genbanken stammen aus der Stammsammlung des Tierärztlichen Institutes der Universität Göttingen, Abteilung Molekularbiologie.

3.1.1 Genbanken

Porcine Hirn cDNA-Bank (Cortex) in λ gt11 von CLONTECH Laboratories GmbH (Heidelberg)

Porcine genomische Bank in λ FIXII von Stratagene GmbH (Heidelberg)

Porcine PAC Genbank (IVM PAC 714) (Al-Bayati *et al.*, 1999)

3.1.2 Bakterien und Phagen

Y1090r⁻ (CLONTECH Laboratories GmbH, Heidelberg)

araD139, hsdR (r_k⁻, m_k⁺), mcrA⁻, rpsL, supF, trpC22::Tn10, Δ lacU169, Δ lon, (pMC9)

XL1-Blue (Stratagene GmbH, Heidelberg)

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lac^q Z Δ M15, Tn10 (Tet^r)]

XL1-Blue MRA (P2) (Stratagene GmbH, Heidelberg)

Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac (P2 lysogen)

XL1-Blue MRF' (Stratagene GmbH, Heidelberg)

Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB lac^q Z Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

SOLR (Stratagene GmbH, Heidelberg)

e14 (*McrA*⁻) Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *uvrC*, *umuC::Tn5*, (Kan^r) *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endAI* λ^R [*F'* *proAB lacI^q Z Δ m15*] Su⁻ (nonsuppressing)

ExAssist interference-resistant helper phage 1.0 x 10¹⁰ pfu/ml (Stratagene GmbH, Heidelberg)

3.1.3 Plasmide

pGEM[®]-4Z (Promega GmbH, Mannheim)

3.2 Enzyme, Nukleotide, Chemikalien und Kits

3.2.1 Enzyme

Life Technologies (Karlsruhe): SuperScript II reverse Transkriptase

New England Biolabs GmbH (Schwalbach): Restriktionsenzyme, Alkalische Phosphatase, T4-DNA Ligase, Polynuklotidkinase, T4-DNA Polymerase

Qiagen GmbH (Hilden): *Taq*-Polymerase

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim): Restriktionsenzyme, DNase I

Roth GmbH (Karlsruhe): RNase A

3.2.2 Nukleotide

INTERAKTIVA Biotechnologie GmbH (Ulm): unmarkierte Oligonukleotide, Biotin markierte Oligonukleotide

Hartmann Analytics (Braunschweig): radioaktiv markierte Nukleotide

METABION (Martinsried): unmarkierte Oligonukleotide

MWG AG Biotech (Ebersberg): IRD 800-fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, unmarkierte Oligonukleotide

Roth GmbH (Karlsruhe): dNTPs

3.2.3 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg), Biozym Diagnostic GmbH (Hess. Oldendorf), Calbiochem (Bad Soden), ICN Biomedicals GmbH (Eschwege), Life Technologies GmbH (Heidelberg), Merk AG (Darmstadt), QIAGEN GmbH (Düsseldorf), Roth GmbH (Karlsruhe), und Sigma-Adrich Vertriebs GmbH (Deisenhofen) bezogen.

3.2.4 Kits

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg): ECL DNA labelling system, T7 Sequencing™ Kit, Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Cycle Sequencing Kit

Qiagen GmbH (Hilden): Plasmid-Kits, QiaexII Kit, Oligotex mRNA Kit

Life Technologies GmbH (Karlsruhe): RadPrime DNA Labelling System

Stratagene GmbH (Heidelberg): cDNA Synthese Kit, ZAP-cDNA Gigapack III Gold cloning Kit, Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit

CLONTECH Laboratories GmbH (Heidelberg): Marathon cDNA Amplification Kit, Advantage 2 PCR Enzyme System

3.3 Verbrauchsartikel und Glaswaren

Verbrauchsartikel wurden von den Firmen Greiner Labortechnik GmbH (Solingen), Integra Biosciences GmbH (Fernwald), Krannich GmbH & Co. KG (Göttingen), Nerbe plus GmbH (Winsen/Luhe), Sarstedt (Nürnbrecht), Schütt Labortechnik (Göttingen) und Schleicher und Schuell (Dassel) bezogen.

Glaswaren wurden von den Firmen Schütt Labortechnik (Göttingen) und Krannich GmbH & Co. KG (Göttingen) bezogen.

3.4 Laborgeräte

Agfa-Gevaert AG (Leverkusen): Entwicklermaschine CURIX 60

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg): Netzgeräte, FPLC-Chromatographie-Anlage mit Fraktionensammler

Bio-Rad Laboratories GmbH (München): Agarose-Gelkammern, Gelrockner, Mini Protean II Elektrophorese-System

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen): Reinraum-Bank

Heraeus Instruments GmbH (Hannover): Inkubator, Zentrifugen (Megafuge 1.0R; Biofuge 28RS)

Infors (Bottingen): Schüttelinkubator CH-4103

Kendor Laboratory Products GmbH (Hamburg): Sorvall Zentrifugen (RC5B und Combi plus)

Krannich GmbH & Co. KG (Göttingen): Chromatographie-Säulen

Life Technologies GmbH (Karlsruhe): Elektrophorese-Apparatur S2

Millipore GmbH (Eschborn): Reinwasseranlage

MWG AG Biotech (Ebersberg): Hybridisierofen Mini10, LI-COR Sequenzierer Modell 4000L

Sauer Laborgeräte GmbH (Reutlingen): Heizblock, UV-Schirme, Hybridisierröhren

Schütt Labortechnik (Göttingen): Bioclav, Kühlschränke und Gefrierschränke, Haake

Wasserbad DC3, Eppendorf Tischzentrifuge 5415C, Eppendorf Pipetten, Savant Speed- Vac SC110A, GFL Wasserbäder, Eppendorf Thermostat 5320, IKA Magnetrührer, Vortex Genie II, IKA Ultraturrax

Stratagene GmbH (Heidelberg): Eagle Eye II, RoboCycler Gradient 2000

Thermo-dux (Wertheim): Techne Genius Thermocycler

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Arbeiten

4.1.1 Bakterienvorkultur

Bakterien aus einer Glycerinkultur wurden mit einer Impföse auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz zur Einzelkolonie ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Danach wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz mit einer Einzelkolonie inokkuliert und über Nacht bei 37 °C (250 U/min) geschüttelt.

LB-Medium: 20 g LB Broth (Sigma)
ad 1000 ml H₂O bidest.
nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden dem Medium Antibiotika zugesetzt (Endkonzentration s. u.)

LB-Agarplatten: 35 g LB Agar (Sigma)
ad 1000 ml H₂O bidest.
nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C wurden der Agarlösung Antibiotika bzw. X-Gal mit den angegebenen zugesetzt und etwa 0,5 cm hoch in Petrischalen gegossen.

Ampicillin: 50 µg/ml
Tetrazyclin: 12,5 µg/ml
Kanamycin: 25 µg/ml
X-Gal: 40 µg/ml

4.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

20 ml TYM-Medium wurden in einem 250 ml Kolben mit 50 µl Bakterienvorkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, bis die Bakterien eine optische Dichte von $OD_{600nm} = 0,5$ bis $0,8$ erreicht hatten. Die Kultur wurde mit TYM-Medium auf 100 ml verdünnt und in einem 2000 ml Kolben erneut bis zu einer $OD_{600nm} = 0,5 - 0,8$ vermehrt. Es wurde auf 500 ml verdünnt und bis zu einer $OD_{600nm} = 0,6$ unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde durch vorsichtiges Schütteln in einem NaCl/Eiswasserbad rasch abgekühlt und bei 4000 rpm 10

min bei 4 °C in der Sorvall RC5B (GSA-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 100 ml kaltem TfBI resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dann wurde das Bakterienpellet in 20 ml kaltem TfBII resuspendiert, je 200 µl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C aufbewahrt.

TYM-Medium:	20	g	Trypton
	5	g	Hefeextrakt
	5	g	NaCl
	2	g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
	ad 1000 ml		H ₂ O bidest
TfBI:	30	mM	K-Acetat
	50	mM	MnCl ₂
	100	mM	KCl
	10	mM	CaCl ₂
	15	% (v/v)	Glycerin
TfBII	10	mM	Na-MOPS, pH 7,0
	75	mM	CaCl ₂
	10	mM	KCl
	15	% (v/v)	Glycerin

4.1.3 Transformation von Plasmiden in Bakterien

Transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 100 µl zur DNA-Lösung (Ligationsansatz) pipettiert. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Wärmebehandlung bei 42 °C im Wasserbad für 2 min. Dem Ansatz wurden 400 µl NZCYM-Medium zupipettiert und die Reaktion 1 Stunde bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurden je nach Ausgangskonzentration des Plasmids 50 - 200 µl Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika + X-Gal ausplattiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet.

NZCYM-Medium	10	g	NZ-Amine A
	5	g	Hefeextrakt
	1	g	Casaminoacids
	5	g	NaCl
	2	g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
ad 1000 ml		H ₂ O bidest.	

4.2 DNA-Isolierung

4.2.1 Isolierung größerer Mengen von Plasmid DNA mit QIAGEN Plasmid Kits

Um größere Mengen hochreiner Plasmid DNA zu erhalten, wurden QIAGEN Plasmid Kits eingesetzt. Die Bakterien werden dabei zunächst durch eine NaOH/SDS - Behandlung lysiert und Proteine und assoziierte genomische DNA durch KOAc gefällt. Anschließend wird über Ionenaustauschchromatographie die Plasmid DNA gewonnen.

250 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika wurden mit 100 µl einer Bakterienvorkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C (250 U/min) geschüttelt. Zum Pelletieren der Bakterien wurde die Kultur 10 min bei 4000 rpm in der Sorvall RC5B (GSA-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeleert und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde das gleiche Volumen Puffer P2 zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 ml P3 zupipettiert und die Lösung zuerst geschwenkt und dann geschüttelt. Es folgten 15 min Inkubation auf Eis. Der Niederschlag aus Proteinen, SDS und chromosomaler DNA wurde durch 30 min Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0R) abgetrennt. Der Überstand wurde abgeleert und auf Eis aufbewahrt.

Zur Reinigung der Plasmide wurde zunächst eine QIAGEN-Säule (Tip 500) mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert, dann wurde die Plasmidlösung appliziert. Gewaschen wurde die Säule mit 2 X 30 ml Puffer QC. Die Elution erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Die eluierte Plasmid DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol ausgefällt. Die DNA wurde durch 30 min Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0R) pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und 10 min luftgetrocknet. Das Plasmidpellet wurde schließlich in einem entsprechendem Volumen TE Puffer gelöst.

P1:	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	DNase-freie RNase A
P2:	200	mM	NaOH
	1	% (w/v)	SDS
P3:	3	M	KOAc, pH 5,5

QBT:	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	% (v/v)	Isopropanol
	0,15	% (v/v)	Triton X-100
QC:	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	% (v/v)	Isopropanol
QF:	1,25	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 8,5
	15	% (v/v)	Isopropanol
TE:	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1	mM	EDTA

4.2.2 Isolierung von PAC-DNA im großen Maßstab

Eine 500 ml Übernacht-Kultur (LB-Medium mit Kanamycin) wurde in zwei Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 4000 rpm 10 min bei Raumtemperatur in der Sorvall RC5B (GSA Rotor) zentrifugiert. Jedes Pellet wurde in 25 ml Puffer P1 resuspendiert, je 25 ml Puffer P2 zugegeben, leicht geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50 ml Puffer P3 wurde der Ansatz gemixt und 20 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde das Präzipitat durch 30 min Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C in der Sorvall RC5B (GSA Rotor) vom DNA-hältigen Überstand abgetrennt.

Eine QIAGEN-Säule (tip 500) wurde mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert und anschließend der DNA-Überstand aus der Zentrifugation auf die Säule aufgebracht. Danach wurde die Säule mit 2 X 30 ml Puffer QC gewaschen. Eluiert wurde die PAC-DNA indem man in 5 Schritten je 3 ml Puffer QF (65 °C warm) auf die Säule pipettierte und den Durchlauf sammelte. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol zum Eluat wurde die DNA ausgefällt und konnte bei 6 000 rpm /4 °C 30 min in der Heraeus Megafuge 1.0R pelletiert werden. Das Pellet wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und die Restflüssigkeit mit einer Pasteurpipette und der Wasserstrahlpumpe entfernt. Anschließend wurden 300 µl TE auf das DNA-Pellet pipettiert und die DNA wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, um quellen zu können.

4.2.3 Schnellaufschluß durch alkalische Lyse

4.2.3.1 Plasmide

5 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikazusatz wurden mit Einzelkolonien beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (250 U/min). Die Kulturen wurden dann bei 4000 rpm 10 min in der Heraeus Megafuge 1.0R bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 150 µl Puffer P1 aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Lyse der Bakterien wurden 150 µl Puffer P2 zupipettiert, die Lösung vorsichtig geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl 4 °C kaltem Puffer P3 wurden Proteine, SDS und chromosomale DNA ausgefällt. Die Proben wurden gut gemischt, der Niederschlag durch 10 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge (max. rpm) abgetrennt und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 1 ml 96 % Ethanol ausgefällt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die DNA bei 22 000 rpm 30 min bei 4 °C in der Heraeus Biofuge 28RS pelletiert. Der Überstand wurde abgeleert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in der Speed Vac 10 min getrocknet und in 50 µl TE gelöst. 2 µl Schnellaufschluß-DNA wurden zur Kontrolle mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten und auf einem Agarosegel analysiert. Die Plasmid-DNA wurde direkt in die Reaktionen für die radioaktive oder nicht-radioaktive Sequenzierung verwendet.

4.2.3.2 PAC-DNA

Aus 5 ml Übernacht-Kultur oder 5 ml abgeschwemmter Klone von Agar-Platten (mit LB-Medium) wurden 1300 µl entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde kurz bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer P1 aufgenommen und dann 300 µl Puffer P2 zupipettiert und vorsichtig gemischt. Zur Lyse der Bakterien wurde der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann wurden 300 µl Puffer P3 zugegeben. Nach dem Durchmischen wurde die Lösung 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4 °C und 22 000 rpm in der Biofuge 28RS zentrifugiert. 700 µl des Überstandes kamen in ein neues Reaktionsgefäß, wurden mit 800 µl Isopropanol gefällt (30 min auf Eis) und dann 30 min bei 22 000 rpm und 4 °C in der Biofuge 28RS zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in der Speed Vac ohne Zuschalten von Hitze getrocknet und in 50 µl TE gelöst.

4.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut

Tiefgefrorenes Blut (3-5 ml) wurde aufgetaut und mit 10 ml 1 X SSC versetzt. Nachdem es gut gemischt war, wurde es 10 min bei Raumtemperatur und 6000 rpm in der Heraeus Megafuge 1.0R zentrifugiert. Das Leukozytenpellet wurde erneut in 1 X SSC resuspendiert und abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis das Pellet weiß war. Die Leukozyten wurden daraufhin in 5 ml 0.2 M Na-Acetat, pH 7,0 resuspendiert und 0,5 ml 10 % (v/v) SDS zugegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurden 5 ml Phenol/CIA zupipettiert und der Ansatz gut gemischt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur in der Heraeus Megafuge 1.0R getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt. Dann wurden 5 ml CIA zugegeben, gut gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein Röhrchen überpipettiert. Zum Fällern wurden 5 ml Isopropanol zugegeben. Die ausgefallene DNA konnte mit einer Pasteurpipette gefischt werden. Sie wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur DNA wurde ein entsprechendes Volumen TE pipettiert und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

1 X SSC:	150	mM	NaCl
	15	mM	Na-Citrat
Phenol/CIA:	Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 25:24:1 gemischt		
CIA:	Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 gemischt		

4.3 Enzymatische Behandlung von DNA

4.3.1 Restriktionsspaltung

DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen gespalten. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Die DNA wurde mit 1-5 U pro µg DNA 1-4 h bei 37 °C inkubiert. Die vollständige Spaltung der DNA wurde auf Agarosegelen überprüft.

4.3.2 Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Nach Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen trägt das 5'-Ende der gespaltenen DNA eine Phosphatgruppe. Um eine Religation von linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurde dieser Phosphatrest mit alkalischer Phosphatase abgespalten. 10 µg Vektor-DNA wurde mit 5 U alkalischer Phosphatase in 1 X Reaktionspuffer des Herstellers (Reaktionsvolumen: 80 µl) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die Reaktion 20 min auf 68 °C erhitzt.

4.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit den entsprechenden Plasmiden

DNA-Fragment und dephosphorylierter Vektor wurden etwa im molaren Verhältnis 1:1 in die Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsvolumen lag zwischen 30 µl und 70 µl. Der Ansatz enthielt neben dem entsprechenden Reaktionspuffer 400 - 800 U T4-DNA Ligase. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C oder alternativ 2-3 Stunden bei Raumtemperatur.

4.4 Auftrennung und Gewinnung von DNA-Fragmenten

4.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von enzymatischen Schritten oder zur Gewinnung von DNA Fragmenten wurden horizontale Agarosegele verwendet. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,5 - 2 % gewählt. Die jeweilige Menge Agarose wurde in einem Erlenmeyer-Kolben eingewogen und im entsprechenden Volumen 1 X TBE-Laufpuffer suspendiert. Die Agarose wurde in der Mikrowelle gelöst, abgekühlt und Dimidiumbromid-Lösung bis auf eine Endkonzentration von 0,4 µg/ml zupipettiert. Die Gellösung wurde in abgeklebte Gelschiffchen mit entsprechenden Kämmen gegossen. Nach dem Verfestigen wurde der Kamm gezogen und das Gel in eine mit 1 X TBE gefüllte Gelkammer gesetzt. Das Gel war dabei vollständig mit Laufpuffer bedeckt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen Ladepuffer beschwert und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei Feldstärken von 5-10 V/cm. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Dimidiumbromids unter UV-Licht bei 366 oder 312 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Eagle Eye II - Systems.

10 X TBE-Laufpuffer:	121	g	Tris-Base
	51,4	g	Borsäure
	3,72	g	EDTA
	ad 1000 ml		H ₂ O bidest.
10 X Auftragspuffer:	50	% (v/v)	Glycerin
	0,1	M	EDTA, pH 8,0
	0,25	% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25	% (w/v)	Xylencyanol
Dimidiombromid-Lösung:	6 mg/ml	in H ₂ O	

4.4.2 Elution von DNA aus Agarosegelen durch Zentrifugation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten, die aus größeren Spaltungsansätzen stammten, reichte es aus, die ausgeschnittenen Gelstücke in der Tischzentrifuge für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit zu zentrifugieren. Die Agarose kollabierte, der Überstand mit der eluierten DNA wurde vollständig abgenommen und direkt in die Ligations-Reaktionen eingesetzt.

4.4.3 Elution von DNA aus Agarosegelen mit QIAEXII

Ausgeschnittene Agarosestückchen wurden gewogen und 3 Volumen Puffer QX1, 10 µl QIAEXII-Lösung und 3 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,8 zupipettiert. Dieser Ansatz wurde 20 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Die QIAEXII-Partikel mit der gebundenen DNA wurden durch 30 sec Zentrifugation in der Tischzentrifuge (max. rpm) pelletiert und der Überstand abgeleert. Um restliche Agarose zu lösen, wurden weitere 500 µl Puffer QX1 zupipettiert, das QIAEXII-Pellet resuspendiert und 5 min bei 50 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, 500 µl Waschpuffer PE zugegeben, das Pellet resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet 15 min luftgetrocknet. Um die DNA zu eluieren, wurde das Pellet mit 20 µl TE 5 min bei 50 °C inkubiert, 30 sec zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.5 Transfer und Detektion von DNA auf Membranen

4.5.1 Alkalischer Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Reed und Mann, 1985)

Die Agarosegele mit der zu transferierenden DNA wurden zweimal 10 min in 0,4 M NaOH geschwenkt und das Gel anschließend mit der Oberseite nach unten auf Haushaltsfolie gelegt. Eine passend zugeschnittene, positiv geladene, in 0,4 M NaOH angefeuchtete Nylonmembran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht. Drei Lagen Whatman 3MM Papier wurden ebenfalls in NaOH angefeuchtet und auf die Membran gelegt. Danach wurde der Blot etwa 5 cm hoch mit saugfähigem Papier überschichtet, eine Glasplatte zur gleichmäßigen Druckverteilung aufgelegt und mit etwa 0,5 - 1 kg beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Dann wurden das saugfähige Papier und die Whatman Papiere entfernt, die Taschen des Agarosegels auf der Membran mit Buntstift markiert und die Membran kurz in 2 X SSC geschwenkt. Anschließend wurde die Nylonmembran zwischen zwei Blättern Whatmanpapier luftgetrocknet.

4.5.2 Nichtradioaktive Hybridisierung mit dem ECL Direct Labelling System (Amersham-Pharmacia)

Getrocknete Membranen (Nitrocellulose oder Nylon) wurden in Hybridisierlösung 1 Stunde bei 42 °C im Hybridisierofen vorhybridisiert. Zur Markierung der spezifischen Sonde wurden zunächst 10 ng DNA/ ml Hybridisierlösung für 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Dann wurden 1 Vol Labelling Reagens und 1 Vol Glutaraldehyd zur denaturierten Sonde gegeben und die Reaktion für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Sonde wurde unmittelbar danach zur Hybridisierungslösung pipettiert und die Membran unter Rotation über Nacht bei 42 °C hybridisiert.

Zur Detektion wurde die Membran 2 X 20 min mit Waschpuffer I bei 42 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Anschließend wurde die Membran in ein flaches Gefäß überführt und 2 X 5min bei Raumtemperatur in Waschpuffer II gewaschen. Dann wurde die Membran kurz angetrocknet und 1 min mit einer der Größe entsprechenden Menge Detektionsflüssigkeit inkubiert. Die Membran wurde kurz angetrocknet, auf PE-beschichtetes Papier ausgelegt, mit Haushaltsfolie bedeckt und 1 min - 4 h mit Kodak XOMAT-LS Röntgenfilm exponiert.

Hybridisierlösung:	25	ml	Gold Puffer
	0,73	g	NaCl
	1,25	g	Blocking Reagent
	bei 42 °C für ca. 1 Stunde rühren		
Waschpuffer I:	6	M	Harnstoff
	0,4	% (w/v)	SDS
	0,5 X		SSC
Waschpuffer II:	0,2 X		SSC
Detektionslösung:	1	Vol	Detection Reagent I
	1	Vol	Detection Reagent II

4.6 Radioaktive Markierung von DNA

4.6.1 Radioaktive Markierung von DNA mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP und dem RadPrime DNA Labelling System (GIBCO/BRL)

Pro Markierungsreaktion wurden 30 ng DNA eingesetzt, welche vorher durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min einzelsträngig gemacht wurde. Zu 29 μl DNA-Lösung in H_2O kamen 20 μl 2.5 X RadPrime Puffer, je 1 μl der drei nicht markierten Nukleotide und 50 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. Dieser Ansatz wurde mit 5 U Klenow-Fragment 10 min bei 37 °C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion mit 5 μl Stop-Puffer. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch Applikation auf eine Sephadex G-50 Säule. Die Säule wurde zunächst mit 5 ml TE äquilibriert, dann wurde die Markierungsreaktion aufgetragen. Weiters wurden 400 μl TE auf die Säule pipettiert, der Durchlauf wurde aber verworfen, da er keine radioaktiven Signale enthielt. Nach Auftrag von weiteren 400 μl TE wurde das Eluat der Säule zu je 3 Tropfen in Reaktionsgefäßen gesammelt. Durch Messung mit dem Geigerzähler wurden die markierten Sonden identifiziert und gegebenenfalls in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

4.6.2 Radioaktive Markierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden durch Kinasierung mit $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP

Diese Form der radioaktiven Markierung wurde dazu verwendet, doppelsträngige Oligonukleotide für Gelretentions-Analysen zu markieren. Dazu wurden je 100 pmol der einzelsträngigen Oligonukleotide in 10 μl steriles Wasser aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 2

min bei 95 °C denaturiert und dann schrittweise auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Kinase-Reaktion wurden 10 pmol doppelsträngige Oligonukleotide mit 5 µl 10 X Kinase-Puffer, 5 µl γ -³²P-dATP (10 µCi/µl) und 1 µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl) in einem 50 µl Reaktionsansatz 60 min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Radioaktivität wurde über Sephadex G-50 Säulen abgetrennt (s. Punkt 4.6.1), markierte Fraktionen der Säule gepoolt und bei 4 °C etwa eine Woche gelagert.

4.7 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

4.7.1 Ligation von doppelsträngigen Oligonukleotiden zu Konkatemeren

Bei Hybridisierungen nach der South-Western-Methode werden neben klonierten DNA Fragmenten auch Oligonukleotide als Sonden verwendet. Um eine effektivere Markierung und damit stärkere Signale in der Detektion zu ermöglichen, enthalten die Oligonukleotide an ihren Enden jeweils komplementäre Überhänge, wodurch die Fragmente nach Kinasierung zu längeren DNA Strängen aufligiert werden können. Die verwendeten Oligonukleotide A51 und A52 trugen an ihrem 5'-Ende jeweils Teile der *SalI* - Erkennungssequenz. Je 5 µg der einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotide wurden in 30 µl 1 X Kinase-Puffer + 100 mM Spermidin durch schrittweises Abkühlen von 95 °C auf Raumtemperatur hybridisiert. Inkubation mit 20 U T4 Polynukleotidkinase bei 37 °C für eine Stunde führte zur Phosphorylierung der nun doppelsträngigen Oligonukleotide. Danach wurden noch 20 µl 1 X Kinase-Puffer sowie 200 U T4 DNA Ligase zupipettiert und zur Ligation der Oligonukleotide über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde dann auf ein 2 % präparatives Agarosegel aufgetragen, eine kurze Distanz aufgetrennt und Bereiche > 300 bp (entspricht 10mer und größer) ausgeschnitten und aus der Agarose eluiert. Diese Oligomere konnten nun in die Markierungsreaktion eingesetzt werden.

1 X Kinase-Puffer:	70	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	10	mM	MgCl ₂
	5	mM	DTT
	1	mM	rATP
	0,1	% (w/v)	BSA

4.7.2 Präparation von konkatemeren Oligonukleotiden mit Biotin-Markierung

Zur Bindung von ligiertem Oligonukleotid A5 (= Oligo A5) an Streptavidin-Agarose wurden zunächst zwei Hybridisierungsansätze pipettiert. Der erste Ansatz entsprach der unter Punkt 4.7.1 besprochenen Ligationsreaktion von Oligo A5, der zweite Ansatz enthielt in gleicher Konzentration Oligo A52 und Oligo A51B, welches an seinem 5'-Ende mit Biotin markiert war. Zudem wurden die vier Basen TCGA des *SalI* - Überhangs entfernt. So entstanden im doppelsträngigen Oligonukleotid glatte Enden, die nicht weiter mit *SalI* - Schnittstellen ligiert werden konnten. Die beiden Ansätze wurden zunächst getrennt hybridisiert und kinasiert (Punkt 4.7.1), dann wurde der Ansatz A51/A52 für 2 Stunden bei Raumtemperatur ligiert, erst anschließend wurden dem Ansatz 15 µl der Reaktion A51B/A52 zugefügt und unter weiterer Zugabe von 200 Units T4 DNA Ligase über Nacht bei 16 °C ligiert.

4.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

4.8.1 PCR-Reaktionen

Geeignete Primerpaare wurden mit dem Programm OSP Version 1.1 (MacIntosh) ermittelt (Hillier und Green, 1991). Ein Standardansatz enthielt in 50 µl Gesamtvolumen etwa 100 ng Matrizen-DNA, 5 µl 10 X *Taq*-Puffer des Herstellers, je 50 pmol Primer, 200 µM der jeweiligen dNTPs und 2,5 U *Taq* DNA Polymerase. Die Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis pipettiert, gemischt und die Reaktionsgefäße in einen Thermocycler überführt. Nach 3 min Denaturierung bei 95 °C folgten 30 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing bei der jeweiligen Annealingtemperatur des Primerpaares und 1 min Elongation bei 72 °C. Nach dem Ende der Reaktionen wurden die Produkte auf Agarosegelen analysiert.

4.8.2 Klonierung von PCR Produkten

Um PCR Produkte in Vektoren zu klonieren wurde dem PCR Ansatz zunächst 1 µl T4 Polymerase (3 U/µl) zupipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Behandlung wurden die PCR Reaktionen auf einem präparativen Gel aufgetrennt, die Produkte ausgeschnitten und mit QIAEXII eluiert (25 µl Elutionsvolumen). Zum Eluat kamen 3 µl 10 X Ligase Puffer, 1 µl T4 Polynukelotidkinase (10 U/µl) und 1 µl destilliertes Wasser. Der Ansatz

wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend das Enzym 20 min bei 68 °C denaturiert. Zur Ligation der kinasierten PCR Fragmente in den Vektor wurden der Reaktion 1 µl 10 X Ligase Puffer, 1 µl 10 mM rATP, 1 µl *Sma*I - Vektor (50 ng/µl), 1 µl T4 Ligase (400 U/µl) sowie 6 µl destilliertes Wasser zupipettiert und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz in die entsprechenden Bakterien transformiert.

4.9 Phagenisolierung

4.9.1 Herstellung phagenkompetenter Bakterien

100 µl einer Übernacht-Kultur der entsprechenden Phagen-Wirtsbakterien wurden in 100 ml LB-Medium ohne Antibiotika + 10 mM MgSO₄ + 0,2 % Maltose überimpft und bei 37 °C (250 U/min) bis zu einer OD_{600nm} = 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden dann 10 min bei 4000 rpm in der Megafuge 1.0R bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Bakterienpellet mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD_{600nm} = 0,5 resuspendiert. Die Suspension konnte für 3-5 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

4.9.2 Ausplattieren von Phagen auf Agarplatten

Für Filterabzüge, Anlage von Plattenpools und Vereinzlung von Phagen wurden entsprechende Bakterien mit den Phagen infiziert und in Top-Agarose auf Agarplatten ausgebracht. Konfluente Platten (150 mm Ø) enthalten etwa 5 X 10⁴ pfu (plaque-forming units). Um ein durchschnittliches Säugergenom abzudecken, sollten 1 X 10⁶ pfu ausplattiert werden, was 20 Platten mit 5 X 10⁴ pfu entspricht. Ein entsprechendes Volumen an Phagenlösung wurde mit 800 µl phagenkompetenter Bakterien 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Bakterien in 9 ml Top-Agarose (48 °C) resuspendiert und auf NZY-Agar-Platten ausgegossen. Nach dem Verfestigen der Top-Agarose wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

NZY-Agar:	5	g	NaCl
	2	g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
	5	g	Hefeextrakt
	10	g	NZ Amin A
	15	g	Bacto-Agar
	ad 1000 ml		H ₂ O bidest.
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren		

NZY Top-Agarose:	1	g	NaCl
	0,4	g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
	1	g	Hefeextrakt
	2	g	NZ-Amin A
	1,4	g	Agarose
	ad 200 ml		H ₂ O bidest.
	mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren		

4.9.3 Titerbestimmung einer Phagenlösung

In einer Verdünnungsreihe wurden 10 µl einer Phagenlösung jeweils 10fach mit λ-Diluent verdünnt. Je nach erwarteter Konzentration der Phagen wurden 10 µl der Verdünnungen zwischen 10⁻³ und 10⁻⁹ zur Infektion von phagenkompetenten Bakterien verwendet und auf NZY-Agar-Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Titer der Stammlösung wurde durch Multiplikation der gezählten Plaques (pfu) mit der entsprechenden Verdünnungsstufe pro ml berechnet.

λ-Diluent:	100	mM	NaCl
	10	mM	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
	35,5	mM	Tris/HCl, pH 7.5
	0,01	% (w/v)	Gelatine

4.9.4 Anlegen von Plattenpools

Zur Isolierung von Phagen mittels einer PCR gestützten Methode ist es von Vorteil, das ursprüngliche Phagenlysat in mehrere Pools aufzuteilen. Dazu wurden 10⁶ pfu einer Phagenbank auf 20 NZY-Agarplatten ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die konfluenten Platten wurden mit 10 ml λ-Diluent überschichtet und unter leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, in 20 50-ml Röhrchen pipettiert, die Platten mit weiteren 10 ml λ-Diluent nachgespült und mit den ersten Überständen vereinigt.

Nach einer 10 min Behandlung mit 2 ml Chloroform und 10 min Zentrifugation bei 4000 rpm in der Megafuge 1.0R bei Raumtemperatur wurden jeweils 1 ml Aliquots abgenommen und zur Aufbewahrung bei -80 °C mit 7 % (v/v) DMSO und bei 4 °C mit 20 % (v/v) Chloroform versetzt. Aus den restlichen Phagenüberständen wurde DNA präpariert und diese in einem entsprechenden Volumen TE bei 4 °C aufbewahrt. Die DNA konnte nun verwendet werden, um mittels PCR ein Fragment in einem Phagenpool zu identifizieren. Aus dem entsprechenden Pool wurden 5×10^4 pfu ausplattiert und daraus der Phage mit Standardmethoden isoliert.

4.9.5 Durchmusterung einer Genbank durch Hybridisierung mit einer DNA Sonde

Zur Durchmusterung einer Phagenbank wurden insgesamt 1×10^6 pfu nach Infektion phagenkompetenter Bakterien auf 20 NZY Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend 2 Filterabzüge je Platte angefertigt. Dazu wurden verstärkte Nitrocellulosefilter unter Vermeidung von Luftblasen auf die Platten aufgebracht und für 2 min (2. Abzug: 4 min) liegengelassen, so daß die Phagen an die Nitrocellulose anhaften konnten. Die Position der Filter wurde durch entsprechende Markierungen auf den Filtern und Platten festgehalten. Die Filter wurden vorsichtig abgenommen und für 2 min auf mit Denaturierungspuffer getränktes Whatman 3MM Papier gelegt. Anschließend wurden sie auf weiteres Whatman 3MM Papier transferiert, welches mit Neutralisierungspuffer getränkt war. Die Filter wurden darauf 4 min inkubiert und dann 10 min in 2 X SSC unter Schwenken gewaschen. Zur Fixierung der DNA auf der Nitrocellulosemembran wurden die Filter nach Lufttrocknen für 4 h bei 80 °C gebacken.

Denaturierungspuffer:	0,5	M	NaOH
	1,5	M	NaCl
Neutralisierungspuffer:	0,5	M	Tris/HCl, pH 7,5
	1,5	M	NaCl
2 X SSC:	0,3	M	NaCl
	30	mM	Natriumcitrat

Die gebackenen Filter wurden nach der Methode von Church und Gilbert (Church und Gilbert, 1984) mit einer $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierten Sonde hybridisiert. Dazu wurden die Filter in Kristallisationsschalen (20 Filter je Schale) 4 h bei 65 °C in 200 ml Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte im gleichen Puffer über Nacht bei 65 °C nach

Zugabe einer denaturierten, mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP radioaktiv markierten DNA Sonde. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zunächst bei Raumtemperatur mit niedrigstringentem Waschpuffer zweimal kurz gewaschen. Dann folgten mehrere Waschschrte mit hochstringentem Waschpuffer, wobei die Temperatur schrittweise erhöht wurde. Wenn die Strahlung der Filter nur mehr gering über der Hintergrundstrahlung lag, wurden die Filter auf beschichtetem PE-Papier ausgelegt und mit Haushaltsfolie abgedeckt. In einer Expositionskammer wurden die Filter auf Kodak XOMAT AR Filmen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1-3 Tage exponiert.

Hybridisierungspuffer:	1	% (w/v)	Bovines Serum Albumin
	1	mM	EDTA
	0,5	M	NaHPO ₄ , pH 7,2
	7	% (w/v)	SDS
Niedrigstringenter Waschpuffer:	0,5	5 (w/v)	Bovines Serum Albumin
	1	mM	EDTA
	40	mM	NaHPO ₄ , pH 7,2
	1	% (w/v)	SDS
Hochstringenter Waschpuffer:	1	mM	EDTA
	40	mM	NaHPO ₄ , pH 7,2
	1	% (w/v)	SDS

4.9.6 Isolierung eines Einzelphagen und Präparation von Phagen-DNA

Bereiche um doppelt positive Signale auf den Röntgenfilmen wurden mit einer gekürzten 1 ml Plastikpipettenspitze aus der Agar-Platte ausgestochen und in 400 μl λ -Diluent für 4 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ extrahiert. Diese Lösung wurde weiter eingesetzt, um erneut Bakterien zu infizieren und so eine Anreicherung und Vereinzlung von Phagen zu erreichen. Von entsprechenden Agarplatten wurden wieder Filterabzüge genommen und mit der Sonde hybridisiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis ein Signal eindeutig einem solitär liegenden Phagenplaque zugewiesen werden konnte. Der Plaque wurde ebenfalls ausgestochen und in λ -Diluent eluiert. Diese Lösung diente in weiterer Folge zur Isolierung von Phagen-DNA über QIAGEN-Säulen.

Dazu wurden 220 ml NZCYM-Medium bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt. 800 μl phagenkompetente Bakterien wurden mit 100 μl Phagen-Eluat 20 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und dann zum Medium gegeben. Wachstum, Vermehrung und Lyse erfolgten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln (250 U/min).

Nach vollständiger Lyse wurde die Kultur bei 4000 rpm, 10 min (Sorvall RC-5B, GSA Rotor) zentrifugiert und anschließend 200 ml Überstand mit 1 mg RNase und 1 mg DNase I 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend kamen 50 ml Puffer L2 zur Lösung. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde auf Eis. Durch Zentrifugation bei 12 000 rpm (Sorvall RC-5B, GSA Rotor) für 10 min bei 4 °C wurden die Phagenpartikel präzipitiert. Das Pellet wurde in 9 ml L3 resuspendiert. Um die Phagenpartikel zu lysieren, kamen 9 ml L4 dazu und der Ansatz wurde nach leichtem Schwenken 20 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis kamen 9 ml L5 dazu, wodurch Phagenproteine und SDS Präzipitate in Form von weißem Niederschlag bildeten. Zur Abtrennung der Phagen-DNA wurde der Ansatz 30 min bei 4 °C und 6000 rpm in der Heraeus Megafuge 1.0R zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dekantiert und auf Eis aufbewahrt.

Reine Phagen DNA wurde in weiterer Folge über Bindung an QIAGEN Anionentauscher-Säulen (Plasmid Tip 500) gewonnen. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Dann wurde die Phagen DNA-Lösung appliziert. Gewaschen wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC. Die Elution der Phagen DNA erfolgte mit 15 ml Puffer QF. Um die DNA auszufällen wurden 0,7 Volumen Isopropanol zupipettiert. Durch 30 min Zentrifugation bei 6000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) und 4 °C wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde abgeleert und das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde vorsichtig getrocknet und dann eine entsprechende Menge TE (etwa 300 µl) auf die DNA pipettiert, ohne das Pellet zu resuspendieren. Durch Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur quoll die DNA und konnte dann weiterverwendet werden.

NZCYM:	10	g	NZ-Amine A
	5	g	Hefeextrakt
	1	g	Casaminoacids
	5	g	NaCl
	2	g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
	ad 1000 ml		H ₂ O bidest.
	autoklavieren		
L2:	30	%	Polyethylenglykol (PEG 6000)
	3	M	NaCl
	bei 4 °C lagern		
L3:	100	mM	Tris/HCl pH 7.5
	100	mM	NaCl
	25	mM	EDTA
L4:	4	%	SDS
L5:	2,55	M	Kaliumacetat, pH 4,8

4.9.7 Exzission von Phagen-Inserts mit Helferphagen

Bei Verwendung der λ ZAP Express cDNA Bank konnten isolierte Phagen durch Einsatz des Helferphagen ExAssist direkt in Plasmidvektoren + Insert umgeschrieben und in entsprechende Bakterien (SOLR) transformiert und vermehrt werden.

Dazu wurden 200 μ l XL1-Blue MRF['] Bakterien ($OD_{600nm} = 1.0$) mit 200 μ l Einzelphageneluat und 1 μ l ExAssist ($> 1 \times 10^5$ pfu) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 3 ml LB-Medium zupipettiert und weitere 3 Stunden unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 20 minütige Denaturierung bei 70 °C. Die Bakterien wurden durch 15 min Zentrifugation bei 1000 rpm in der Heraeus Megafuge 1.0R pelletiert und dann der Überstand mit den exzisierten Vektor-DNAs in ein neues Röhrchen überführt. 10 μ l dieses Überstandes wurden mit 200 μ l SOLR Bakterien ($OD_{600nm} = 1.0$) für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 100 μ l dieses Transformationsansatzes auf Kanamycinplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und mit Kulturen aus Einzelklonen Schnellaufschlüsse gemacht.

4.9.8 South-Western Screening (Vinson *et al.*, 1988)

Diese Hybridisierungstechnik dient zur Isolierung von DNA-bindenden Proteinen aus einer Phagen cDNA-Bank. Als Hybridisierungssonde dient dabei der jeweilige DNA-Abschnitt. Durch Induktion der Phagen mit IPTG werden aus den DNA-Inserts Peptide und Proteine gebildet, die auf ihre DNA-Bindung untersucht werden können.

10^6 pfu der Expressions-Genbank wurden auf 20 NZY-Agar-Platten + 10 mM $MgSO_4$ (150 mm \varnothing) ausplattiert und 3,5 h bei 42 °C inkubiert. Danach wurden mit 10 mM IPTG imprägnierte Nitrocellulosefilter aufgelegt, markiert und 6 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Filter abgezogen und luftgetrocknet. Für die zweite Kopie wurden erneut IPTG imprägnierte Filter aufgelegt und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abnahme der Filter konnten die Agarplatten etwa 3 Monate bei 4 °C gelagert werden.

Filterhybridisierung:

Je 20 Filter (1. und 2. Abzug) wurden in zwei Kristallisationsschalen mit 250 ml 1 X Bindungspuffer + 6 M Guanidinium-Hydrochlorid 2 X 10 min bei 4 °C unter Schütteln (50U/min) inkubiert. Anschließend wurde der Puffer mit 1 Vol 1 X Bindungspuffer verdünnt und die Filter weitere 10 min inkubiert. Der Bindungspuffer wurde noch viermal auf die gleiche Weise verdünnt, um die Konzentration von Guanidinium-Hydrochlorid schrittweise abzusenken, und die Filter damit jeweils 10 min geschüttelt. Zum Schluß folgten noch zwei 10 min - Inkubationsschritte mit reinem 1 X- Bindungspuffer.

Zum Blockieren der freien Bindungsstellen auf den Nitrocellulosefiltern wurden die Filter 30 min in 250 ml 1 X - Bindungspuffer + 5 % Magermilchpulver bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Hybridisierung der Filter mit der markierten DNA - Sonde erfolgte in 100 ml 1 X - Bindungspuffer + 0,25 % Magermilchpulver unter Schütteln (50 U/min) für 2 Stunden bei 4 °C. Um unspezifische Bindungen der DNA-Sonde zu entfernen, wurden die Filter abschließend zweimal 10 min in 300 ml 1 X Bindungspuffer + 0,25 % Magermilchpulver gewaschen. Die Filter wurden anschließend noch feucht auf beschichtetes Papier aufgelegt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und bei -80 °C 24-48 Stunden mit Kodak-XOMAT-AR Filmen exponiert. Einzelne doppelt-positive Phagen wurden wie unter Punkt 4.9.6 beschrieben ausgestochen, in 400 µl λ-Diluent eluiert und vereinzelt.

10X Bindungspuffer	250	mM	NaCl
	50	mM	MgCl ₂
	5	mM	DTT
	250	mM	HEPES, pH 7.9

4.10 Konstruktion einer Expressions-cDNA-Bank in λ ZAP Express

Zur Konstruktion der cDNA-Bank wurde der cDNA Synthese Kit und der ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit von Stratagene verwendet. Alle aufgeführten Lösungen und Enzyme wurden von der Herstellerfirma mitgeliefert.

4.10.1 Erststrangsynthese

5µg mRNA wurden in 32,5 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde dann zu einem Syntheseansatz bestehend aus 5 µl 10 X Erststrangpuffer, 3 µl Erststrang-Methyl-dNTP-Mix, 2 µl Linker Primer und 1 µl Ribonuklease-Inhibitor pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Primerbindung zu ermöglichen. Dazu kamen dann 1,5 µl MMLV Reverse Transkriptase (50 U/µl) und der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

4.10.2 Zweitstrangsynthese

Der Erststrangsyntheseansatz wurde auf Eis gestellt und 20 µl 10 X Zweitstrangpuffer, 6 µl Zweitstrang-Nukleotid-Mix und 115,9 µl steriles Wasser zupipettiert. Zu diesem Ansatz kamen 2 µl RNase H (1,5 U/µl) und 11,1 µl DNA Polymerase (9 U/µl). Die Reaktion wurde gemischt, zentrifugiert und für 2,5 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

4.10.3 Glätten der cDNA-Enden und Ligation der *EcoRI* Adaptoren

Zur Zweitstrangsynthese kamen 23 µl blunting dNTP Mix und 2 µl geklonte *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/µl). Die Reaktion wurde für nicht mehr als 30 min bei 72 °C inkubiert. Dann wurden 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) zupipettiert, gemischt und 2 min bei Raumtemperatur in der Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase mit der cDNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Volumen Chloroform dazupipettiert. Erneut wurde gemischt und zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und die cDNA nach Zugabe von 20 µl 3M Na-Acetat und 400 µl 96 % Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt.

Die cDNA wurde 1 h bei 22 000 rpm und 4 °C in der Heraeus Biofuge 28RS pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 8 µl *EcoRI* Adaptoren Lösung resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Zum Ansatz wurden dann 1 µl 10 X Ligase-Puffer, 1 µl 10 mM rATP und 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl) pipettiert. Die Reaktion wurde über Nacht bei 8 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte für 30 min bei 70 °C.

4.10.4 Kinasierung der *EcoRI* - Enden und *XhoI* Spaltung

Nach Inaktivierung der Ligation wurden 1 µl 10 X Ligase Puffer, 2 µl 10 mM rATP, 6 µl steriles Wasser und 1µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl) zum Ansatz pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann 30 min bei 70 °C hitzeinaktiviert.

Für die Spaltung mit *XhoI* wurden 28 µl *XhoI* Puffer-Zusatz und 3 µl *XhoI* (40 U/µl) zupipettiert und der Reaktionsansatz 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurden 5 µl 10 X STE-Puffer dazupipettiert.

4.10.5 Größenfraktionierung der cDNA-Fragmente über eine Sephacryl S-500 Säule

Um möglichst Volllänge-cDNAs zu erhalten und kleine cDNA Stücke abzutrennen wurde eine Größenfraktionierung über eine Gelfiltrations-Säule durchgeführt. Dazu wurden 2 ml Säulenmaterial (Sephacryl S-500) mit 20 ml 1 X STE-Puffer äquilibriert und eine 1 ml Spritze (mit Stopfwatte als Dichteabschluß) damit befüllt. Die Spritze wurde in ein 12 ml Reaktionsröhrchen gesetzt und 2 min bei Raumtemperatur und 400 rpm in der Heraeus Megafuge 1.0R zentrifugiert. Nun wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß ohne Deckel in das 12 ml Röhrchen gegeben und die Säule aufgesetzt, so daß Eluat im Reaktionsgefäß gesammelt wurde. Die gesamte cDNA-Lösung wurde auf die Säule pipettiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Durchlaufraktion wurde in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Die Säule wurde noch zweimal auf die gleiche Weise mit 60 µl 1 X STE-Puffer eluiert und die Fraktionen getrennt gesammelt. Das Volumen der Fraktionen wurde mit 1 X STE-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und die Ansätze mit Phenol/Chloroform extrahiert. Der wässrige Überstand wurde mit 2 Volumen 96 % Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach der Zentrifugation (22 000 rpm/4 °C/60 min in der Heraeus Biofuge 28RS) wurden die Pellets mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und insgesamt in 3 µl sterilem Wasser resuspendiert. Um die Konzentration der cDNA abzuschätzen, wurden 0,5 µl der cDNA-Lösung zusammen mit bekannten Konzentrationen eines DNA-Standards auf einer Agarose-Ethidiumbromid-Platte aufgespottet. Unter dem UV-Licht konnte die Konzentration durch Vergleich mit den Standards abgeschätzt werden.

4.10.6 Ligation der cDNA in die ZAP Express Vektor-Arme

Zur Ligation der cDNA in die Vektor-Arme wurden 100 ng cDNA zu einem Reaktionsgemisch mit 0,5 µl 10 X Ligase-Puffer, 0,5 µl 10 mM rATP, pH 7,5 und 1 µl Vektor-Arme (1 µg/µl) pipettiert. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 4,5 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 0,5 µl T4 Polymerase über Nacht bei 12 °C inkubiert.

4.10.7 Verpacken der ligierten cDNA-Vektor-Konstrukte mit Verpackungsextrakt

Ein Aliquot Verpackungsextrakt wurde angetaut, 1 µl des Ligationsansatzes zupipettiert und die Reaktion mit der Pipettenspitze leicht vermischt. Der Ansatz wurde 1,5 - 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 500 µl λ-Diluent und 20 µl Chloroform

versetzt. Die Reaktion wurde leicht gemischt und dann kurz anzentrifugiert, um Debris zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte bei 4 °C aufbewahrt werden. 1 µl der Lösung und 1 µl einer 1:10 Verdünnung wurden auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Dazu verwendete man Top-Agarose, die 2,5 mM IPTG und 4,2 mg/ml X-Gal enthält. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Plaques ausgezählt.

4.10.8 Amplifikation der primären cDNA-Bank

Zur Amplifikation der cDNA-Bank wurde der gesamte Verpackungsansatz je nach Titer auf eine entsprechende Menge NZY-Agarplatten ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Phagen wurden mit 20 ml λ-Diluent über Nacht bei 4 °C abgeschwemmt und die Überstände gesammelt. Die gepoolten Phagenüberstände wurden mit Chloroform ausgeschüttelt und anschließend bei 4000 rpm in der Heraeus Megafuge 1.0R 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aliquots des Überstandes wurden entweder mit 7 % (v/v) DMSO bei -80 °C oder 20 % (v/v) Chloroform bei 4 °C aufbewahrt. Zum Schluß wurde der Titer der amplifizierten Phagenbank bestimmt.

4.11 DNA-Doppelstrangsequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977)

4.11.1 Radioaktive Sequenzierung mit $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP

4.11.1.1 Sequenzreaktionen

Für die radioaktive Sequenzierung wurde ein kommerzieller Sequenzierungskit (T7 Sequencing™ Kit, Amersham-Pharmacia) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Zur Erzeugung einzelsträngiger DNA wurden 600 ng Schnellaufschluß-DNA mit 2 µl Sequenz-Primer (2 pmol/µl) und 2 µl 2M NaOH versetzt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl 3M NaOAc, pH 4,8, 7 µl H₂O und 60 µl 96 % Ethanol wurde für 30 min bei -80 °C gefällt. Die DNA wurde 30 min bei 22 000 rpm und 4 °C in der Heraeus Biofuge 28RS zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in der Speed Vac getrocknet.

Das Pellet wurde vorsichtig in 12 µl H₂O bidest. gelöst und 2 µl Annealingpuffer zugegeben. Zum Anlagern der Primer an die Vektorsequenz wurde die Reaktion zunächst 5 min bei 65 °C und anschließend 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 3 µl Labelling-Mix A, 1 µl α³⁵S-dATP (10 µCi/µl) sowie 2 µl verdünnter T7 DNA-Polymerase (3 U/µl) vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 4,5 µl dieser Lösung wurden auf je 2,5 µl der bei 37 °C vorgewärmten Stop-Mixe A, C, G und T pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach 5 min bei 37 °C wurden 5 µl Auftragspuffer hinzugegeben. Die Sequenzreaktionen wurden bis zum Auftragen auf das Gel bei -20 °C aufbewahrt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Proben bei 96 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Es wurden für lange Gelläufe 4 µl, für kurze Gelläufe 2 µl auf 5 % ige Polyacrylamid-Harnstoffgele aufgetragen.

4.11.1.2 Polyacrylamid-Sequenzgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen Sequenzreaktionen erfolgte auf 0,2 mm dicken, denaturierenden, 5 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgelen. Die Glasplatten wurden gründlich gesäubert und mit Ethanol nachgereinigt. Auf die kleinere Glasplatte wurden 5 ml einer 5 % Dichlordimethylsilanlösung in Chloroform gleichmäßig verteilt und poliert. Es wurden 0,2 mm dicke Spacer aufgelegt und die beiden Glasplatten mit Klebeband verklebt.

Die Gellösung wurde vor Gebrauch durch einen 0,45 µm Membranfilter filtriert und mit 700 µl 10 % (w/v) APS und 35 µl TEMED gemischt. Die Gellösung wurde zwischen die Glasplatten gegossen, die Kämme angebracht und mindestens 2 h polymerisiert. Das verfestigte Gel wurde in die Apparatur (BRL, S2) eingespannt und bei ca. 45 mA/54 W in 1 X TBE vorelektrophoretisiert. Vor dem Auftragen wurden die Kammtaschen mit 1 X TBE gespült. Die Elektrophorese wurde bei 35 mA/54 W je nach Gellauf 1,5 - 3 Stunden durchgeführt.

Nach der Gelelektrophorese wurde die obere, kleinere Platte abgetrennt und das Gel in 10 % Essigsäure/10 % Methanol 20 min fixiert. Anschließend wurde das Gel vorsichtig auf zwei 3 MM Whatman-Papiere übertragen und mit mit Haushaltsfolie abgedeckt. Das Gel wurde bei 90 °C eine Stunde unter Vakuum getrocknet und einen Tag bei Raumtemperatur auf Röntgenfilm (Kodak BioMaxMR1) exponiert.

DNA-Sequenzen wurden mittels eines Digitizer-Tablets in das Programm MacDNAsis Pro V3.6 eingelesen und bearbeitet. Zusätzlich wurde auch noch das Programm MacMolly 3.5 (Soft Gene GmbH) eingesetzt.

Urea-Diluent:	210	g	Harnstoff
	50	ml	10 X TBE
	ad 434 ml		H ₂ O bidest

5 % Gellösung:	9,2	ml	38 % Gellösung (19:1)
	ad 70 ml		Urea-Diluent

4.11.2 Nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA

4.11.2.1 Sequenzreaktionen

Sequenzreaktionen wurden mit dem Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia) durchgeführt. Es wurden 200 fmol Plasmid-DNA (ca 200 ng/kb) mit 2 pmol IRD 800 markiertem Primer und 1 µl DMSO versetzt und mit H₂O bidest. auf 26 µl aufgefüllt. Je 6 µl von diesem Ansatz wurden zu 2 µl der Terminationsmische pipettiert, mit Mineralöl überschichtet und der PCR zugeführt. Die PCR erfolgte im RoboCycler Gradient 2000 (Stratagene) mit 45 sec Denaturierung bei 94 °C, 45 sec Annealing bei 58 °C und 45 sec Extension bei 68 °C über 30 Zyklen. Um unspezifische Kettenbrüche an 7-deaza-dGTPs und die Degradierung des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden wurden 5 µl Auftragspuffer erst kurz vor dem Auftrag auf das Sequenzgel dazugegeben.

Auftragspuffer:	97,5	% (v/v)	deionisiertes Formamid
	10	mM	EDTA
	0,1	% (w/v)	Bromphenolblau

4.11.2.2 Automatisiertes Sequenzieren

Für die Auftrennung von nichtradioaktiven Sequenzreaktionen wurde das LI-COR Modell 4000L und die Steuersoftware BaseImageIR v2.30 verwendet. Als Gelmatrix für die Auftrennung von bis zu ca 850 bp wurde ein 6 % Sequagel XR unter Zusatz von 1 % (v/v) DMSO und 41 cm lange Glasplatten verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 1500 V, 35 mA und 31 W für ca. 14 Stunden. Als Laufpuffer wurde 1 X TBE long run verwendet.

Nach dem Lauf wurden die Sequenzen mit dem Programm V2.30 Image Analysis automatisch gelesen, korrigiert und in das SCF-Dateienformat umgewandelt. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Sequencher 3.0 bearbeitet und ausgewertet.

Sequagel XR 6 %:	24	ml	Sequagel XR
	6	ml	Sequagel complete Buffer
			Reagent
	300	μ l	DMSO
	300	μ l	10 % (w/v) APS
	10	μ l	TEMED
10 X TBE long run:	1,34	M	Tris Base
	450	mM	Borsäure
	25	mM	EDTA

4.12 RNA Analyse

Alle Lösungen für RNA-Analysen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Alle benutzten Glaswaren, Reaktionsgefäße und Pipetten waren steril und, soweit möglich, RNase frei.

DEPC-Wasser:	0,1	% (v/v)	DEPC
in destilliertem Wasser über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen und anschließend autoklavieren			

4.12.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Gewebe für RNA Präparationen wurde sofort nach Tötung des Tieres steril entnommen, in 50 ml Röhrchen gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 1 g dieses Gewebes wurde in 10 ml TRIZOL Reagens mit einem Ultraturrax und entsprechendem Vorsatz homogenisiert (3-4 X 10 sec bei mittlerer Umdrehungszahl). Um eine komplette Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu erhalten, wurde die Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Chloroform wurde der Ansatz 15 sec stark geschüttelt und dann 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation in der vorgekühlten Heraeus Megafuge 1.0R (6000 rpm, 15 min bei 4 °C). Es erfolgte eine Phasentrennung, wobei die wässrige Phase mit der RNA abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt wurde. Um die RNA auszufällen wurden 5 ml Isopropanol zupipettiert und der Ansatz zu 1 ml Aliquots bei -20 °C eingefroren. Vor Verwendung wurden die Aliquots 15 min bei 12 000 rpm und 4 °C in der Heraeus Biofuge 28RS zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und vorsichtig

getrocknet. Die erhaltene RNA wurde in einem entsprechenden Volumen RNase-freiem Wasser gelöst.

4.12.2 Isolierung von mRNA mit dem Oligotex mRNA Kit (QIAGEN)

300 µg Gesamt-RNA wurden in 250 µl DEPC Wasser gelöst und 250 µl Puffer OBB sowie 15 µl 37 °C warme Oligotex Suspension zupipettiert. Die Probe wurde für 3 min bei 70 °C inkubiert und dann 10 min bei Raumtemperatur stengelassen. In dieser Phase erfolgte die Bindung der mRNA an die Latexpartikel. Anschließend wurden die Oligotex-mRNA Komplexe durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl (2 min) in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer OW2 resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Nach Entfernen des Überstandes wurden 20 µl 70 °C warmer Elutionspuffer OEB zupipettiert, das Pellet resuspendiert und die Suspension 2 min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand mit der eluierten mRNA (etwa 6 µg) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.12.3 Isolierung von mRNA mit dem Poly(A) Quik mRNA Isolierung Kit (Stratagene)

Pro Isolierung konnten 500 µg Gesamt-RNA eingesetzt werden, die in 300 µl DEPC Wasser gelöst wurden. Die RNA - Probe wurde 5 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und 33 µl 10 X Probenpuffer zugesetzt. Die Poly(T)-Säule wurde 5 min aufrecht stehen gelassen, damit sich das Säulenmaterial gleichmäßig setzen konnte. Mit einer 10 ml Spritze wurde der Aufbewahrungspuffer langsam (1 Tropfen/2 sec) aus der Säule gedrückt. Dann wurden 2 mal 200 µl Hochsalzpuffer appliziert und auf dieselbe Weise durch die Säule gedrückt. Anschließend wurde die RNA-Probe aufgetragen und durchgedrückt. Das Eluat wurde aufgefangen und ein zweites Mal auf die Säule appliziert. Die Säule wurde mit 2 X 200 µl Hochsalzpuffer und 3 X 200 µl Niedrigsalzpuffer gewaschen. Die mRNA wurde anschließend mit vier 200 µl - Aliquots von 65 °C warmem Elutionspuffer eluiert und in vier 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Den Proben wurden 20 µl 10 X Probenpuffer und 2,5 Vol 96 % Ethanol zupipettiert. Zum Fällen der RNA wurden sie dann über Nacht bei -20 °C inkubiert, anschließend bei 22 000 rpm und 4 °C 30 min in der Heraeus Biofuge 28RS zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in der Speed Vac kurz angetrocknet. Das RNA Pellet wurde schließlich in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser gelöst.

10 X Probenpuffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1	mM	EDTA
	5	M	NaCl
Hochsalzpuffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1	mM	EDTA
	0,5	M	NaCl
Niedrigsalzpuffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1	mM	EDTA
	0,1	M	NaCl
Elutionspuffer:	10	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1	mM	EDTA

4.12.4 RT-PCR

Für die Erststrangsynthese wurden zunächst 1 µg Gesamt-RNA und 500 ng Primer Poly-dT₍₂₄₎ in 12 µl sterilem Wasser 10 min bei 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Alternativ konnten auch direkt 2 pmol des reversen genspezifischen Primers eingesetzt werden. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Dazu wurden dann 4 µl 5 X Erststrang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP Mix pipettiert. Die Reaktion wurde für 2 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 200 U SuperScript II reverse Transkriptase (GIBCO/BRL) zupipettiert. Die Reaktion wurde 50 min bei 42 °C im Wärmeschrank inkubiert und anschließend bei 70 °C für 15 min inaktiviert. 2 µl dieser Reaktion wurden dann in eine Standard-PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt.

4.12.5 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) mit dem Marathon cDNA Amplification Kit und dem Advantage 2 PCR Enzyme System

Zu 1 µg mRNA (in 4 µl DEPC Wasser) wurde 1 µl cDNA Synthese Primer (10 µM) pipettiert und 2 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis gesetzt und kurz zentrifugiert. Zur Probe kamen dann 2 µl 5 X Erststrangpuffer, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl DEPC Wasser und 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (100 U/µl). Der Ansatz (10 µl) wurde für eine Stunde bei 42 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Zum Erststrangsynthese-Ansatz kamen dann 16 µl 5 X Zweitstrangpuffer, 1,6 µl 10 mM dNTP-Mix, 48,4 µl DEPC Wasser und 4 µl 20 X Zweitstrang Enzym-Mix. Diese Reaktion wurde 1,5 Stunden bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl T4 DNA-Polymerase (10 U)

zugegeben und weitere 45 min bei 16 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 4 µl EDTA/Glycogen zugegeben. Der Ansatz wurde mit 100 µl Phenol/CIA extrahiert, der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl CIA behandelt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und zum Fällern der DNA 0,5 Vol. 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol 95 % Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur und maximaler Umdrehungszahl in der Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet mit 300 µl 80 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Die cDNA wurde in 10 µl destilliertem Wasser gelöst und konnte so bei -20 °C gelagert werden. Zur Adaptorligation wurden 5 µl der cDNA-Lösung mit 2 µl cDNA-Adaptor (10µM), 2 µl 5 X DNA Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA Ligase (1 U/µl) bei 16 °C über Nacht inkubiert. Das Enzym wurde dann bei 70 °C 5 min deaktiviert und anschließend 1:50 und 1:250 Verdünnungen mit EDTA-Tricine Puffer hergestellt. Die Verdünnungen wurden 2 min bei 94 °C denaturiert und 5 µl in die PCR eingesetzt.

Für die PCR wurden 36 µl destilliertes Wasser mit 5 µl 10 X Klen-Taq Puffer, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 50 X Polymerase Mix, 5 µl der verdünnten cDNA, 1 µl Primer AP1 und 1 µl genspezifischem Primer vermischt und im Thermocycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

	1 min	94 °C
5 Zyklen:	1 min	94 °C
	5 min	72 °C
5 Zyklen:	30 sec	94 °C
	5 min	70 °C
25 Zyklen	20 sec	94 °C
	5 min	68 °C

Bei nur geringer Amplifikation konnte eine weitere PCR mit versetzten Primern (AP2 und ein weiterer genspezifischer Primer) angeschlossen werden. Dazu wurden 5 µl der ersten PCR mit 245 µl Tricine-EDTA Puffer verdünnt und 5 µl davon in der PCR verwendet.

4.12.6 Nichtradioaktive Primer Extension Analyse (Altermann *et al.*, 1999)

Für die nichtradioaktive Primer Extension Analyse auf einem LI-COR Sequenziergerät wurden unterschiedliche Mengen (1 µg - 9 µg) Gesamt-RNA aus entsprechenden Geweben mit 15 pmol

IRD800-markiertem Oligonukleotiden (30 bp, GC-Gehalt >50 %) in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 2 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden über 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend pro Reaktion 7,5 µl 5 X Erststrang Puffer, 3,5 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 24,5 µl dest. Wasser und 1 µl SuperScript II reverse Transkriptase (200 U/µl) zupipettiert. Die Proben wurden 90 min bei 42 °C in der Dunkelheit inkubiert. Dann wurden 3,3 µl 0,2 M EDTA + 3 ng/µl RNase A zupipettiert und 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Zum Fällern der DNA wurden 4 µl 100 mM Spermin zu den Proben gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 22 000 rpm/4 °C/30 min wurden die Extensions-Produkte pelletiert, der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 2 µl LICOR-Auftragspuffer gelöst. Kurz vor dem Auftrag auf ein 6 % Sequagel wurden die Proben 2 min bei 70 °C denaturiert und anschließend 1 µl der Reaktion in die Taschen des Sequenzgels pipettiert. Die Laufbedingungen des Gels entsprachen jenen normaler Sequenzreaktionen.

4.13 Protein Analyse

4.13.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Skelettmuskelgewebe

Alle Schritte des Gewebeaufschlusses wurden bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Die Geräte und Lösungen wurden dazu ebenfalls vorgekühlt.

Etwa 200 g Skelettmuskelgewebe wurden einem frisch geschlachteten Tier entnommen und konnten für kurze Zeit bei 4 °C gelagert werden. 25 g Portionen wurden abgewogen und in kaltem PBS-d 2 min gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in 100 ml Puffer A überführt und 15 min unter leichtem Schwenken bei 4 °C inkubiert. Das Gewebe wurde dann 2 X 2 min in kaltem Puffer B gewaschen. In einem Haushaltsmixer wurde die Gewebeprobe mit 250 ml Homogenisierpuffer in 3 X 30 min - Schritten (max. Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Um unzerkleinertes Material abzutrennen wurde das Homogenat durch 2 Lagen Verbandgaze filtriert. Anschließend wurden 250 ml Glycerin zugesetzt, verrührt und in Plastikgefrierbeutel zu etwa 400 ml abgefüllt, die mit einem Vakuumgerät verschweißt wurden. Diese Homogenate konnten bis zum Gebrauch bei - 80 °C gelagert werden.

PBS-d:	137	mM	NaCl
	3	mM	KCl
	10	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄

Puffer A:	100	mM	KCl
	5	mM	MgCl ₂
	5	mM	EGTA
	5	mM	Natriumpyrophosphat, pH 6,8
Puffer B:	50	mM	KCl
	5	mM	MgCl ₂
	5	mM	EGTA
	1	mM	Natriumpyrophosphat, pH 6,8
Homogenisierpuffer:	10	mM	HEPES, pH 7,6
	5	mM	KCl
	10	mM	MgCl ₂
	0,5	mM	DTT
	0,3	M	Sucrose

4.13.2 Herstellung eines rohen Kernextraktes für die Säulenchromatographie (modifiziert nach El-Osta *et al.*, 1997)

200 ml Muskelhomogenat wurden aufgetaut und mit 300 ml Homogenisierpuffer verdünnt. Das Homogenat wurde 15 min bei 4 °C und 11 000 rpm in der Sorvall RC5B (GSA-Rotor) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 80 ml HB-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 2 h auf Eis inkubiert und anschließend in der Heraeus Megafuge 1.0R 30 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Vor dem Auftrag auf eine Chromatographiesäule wurde der Extrakt durch ein Faltenfilter filtriert.

HB-Puffer:	20	mM	HEPES, pH 7,9
	25	% (v/v)	Ethylenglykol
	800	mM	KCl
	1,5	mM	MgCl ₂
	0,2	mM	EDTA
	0,5	mM	DTT
	0,2	mM	PMSF

4.13.3 Isolierung von Zellkernen aus dem Skelettmuskelhomogenat (modifiziert nach Takai *et al.*, 1994)

Zur Isolierung von Zellkernen wurden die bei -80 °C eingefrorenen Gewebekomponenten verwendet. 200 ml Homogenat wurden mit 2 Volumen 1 X Homogenisierungspuffer ohne Sucrose verdünnt. Dadurch wurde das Glycerin ausverdünnung und die anschließende Zentrifugation erleichtert. Die Suspension wurde bei 8000 rpm und 4 °C in der Sorvall RC5B (GSA-Rotor) 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeleert, das Pellet in 200 ml Puffer NA aufgenommen und durch ein 45 µm Polyamidnetz filtriert. Das Filtrat wurde 10 min bei 4000 rpm und 4 °C in der Sorvall RC5B zentrifugiert und das Pellet in 140 ml Puffer NB resuspendiert. Die Suspension wurde in 36 ml - Ultrazentrifugenröhrchen vorsichtig auf ein 10 ml Kissen Puffer NB pipettiert und anschließend bei 28 000 rpm in der Sorvall Combiplus Ultrazentrifuge (Rotor AH928) 60 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen vorsichtig aus den Buckets genommen, die oberste, feste Schicht mit einer Impföse abgehoben und der Puffer mit einer Pasteurpipette und der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Kernpellets wurden schließlich in 1-2 ml Bindungspuffer aufgenommen und im Mikroskop kontrolliert.

Puffer NA:	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	25	mM	MgCl ₂
	0,5	mM	DTT
	0,3	M	Sucrose
	0,25	% (v/v)	Nonidet P-40
Puffer NB:	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	25	mM	MgCl ₂
	0,5	mM	DTT
	2,4	M	Sucrose
	0,1	% (v/v)	Nonidet P-40
Bindungspuffer:	20	mM	HEPES, pH 7,9
	50	mM	KCl
	10	% (v/v)	Glycerin
	0,2	mM	EDTA
	0,5	mM	DTT

4.13.4 Extraktion von Kernproteinen

Zur Extraktion von Kernproteinen wurden die Kerne 30 sec in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und dann in Bindungspuffer mit 450 - 500 mM KCl resuspendiert. Die Suspension wurde 1-2 h auf Eis gehalten und gelegentlich gemischt. Abschließend wurde 30 min bei 4 °C und 22 000 rpm in der Heraeus Biofuge 28RS zentrifugiert, der Überstand auf 40 % Glycerin eingestellt, die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.13.5 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

10 ml des Skelettmuskelhomogenats wurden zunächst mit 1,44 g Ammoniumsulfat-Salz (dies entspricht einer Sättigung von 25 %) versetzt und auf Eis 10 min gerührt. Die Proteinlösung wurde dann in der Heraeus Biofuge 28RS bei 22 000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das gewonnene Proteinpellet wurde in 2 ml Bindungspuffer aufgenommen, der Überstand in einem Gefäß gesammelt und mit weiteren 1,57 g Ammoniumsulfat (50 % Sättigung) 10 min gerührt. Die Präzipitate wurden erneut durch Zentrifugation gewonnen und in einer entsprechenden Menge Bindungspuffer wieder gelöst. Diese Schritte wurden beliebig oft bis zur gewünschten Endkonzentration wiederholt. Die Mengen an einzusetzendem Ammoniumsulfat wurden protein-biochemischen Tabellen entnommen.

4.13.6 Säulenchromatographie - Ionentauscher

4.13.6.1 Packen einer Chromatographiesäule

Zum Packen einer Chromatographiesäule wurde das Säulenmaterial zunächst 2 X in einem Standzylinder mit destilliertem Wasser aufgeschlämmt. Zum Absetzen der Säulenpartikel wurde das Säulenmaterial 5-10 min stehen gelassen und dann der Überstand mit den Feinpartikeln abgossen. Diese Feinpartikel würden sonst die Fritten der Säulen blockieren. Danach wurde das Säulenmaterial auf die gleiche Weise noch 2 X mit 2 M NaCl und noch 3 X mit destilliertem Wasser behandelt.

Wurde die Probe im Batch-Verfahren an das Trägermaterial gebunden, wurde die gesamte Probe in einem Erlenmeyer - Kolben zusammen mit dem Säulenmaterial für 2 h bei 4 °C inkubiert. Gelegentlich wurde der Ansatz durch Schwenken resuspendiert. Die Proteinprobe

sollte möglichst partikelfrei sein (klare Lösung) und eine Salzkonzentration unter 50 mM KCl aufweisen. Höherkonzentrierte Lösungen wurden mit Bindungspuffer ohne KCl entsprechend verdünnt. Bei allen Aufreinigungen mit Hilfe der Pharmacia FPLC-Anlage wurde das Glycerin im Bindungspuffer durch die gleiche Menge Ethylenglycol ersetzt, da Glycerin im UV zu stark angeregt wurde und damit Proteinpeaks beim Monitoring überdeckte.

Zum Befüllen der Chromatographie-Säule wurde zunächst der Auslaßhahn zugedreht und die Säule mit aufgeschlammtem Material befüllt. Die Flüssigkeit wurde durch Öffnen des Auslaßhahns entfernt oder von oben mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Gelbett etwa 5 cm unter dem Säulenrand war. Die Säule wurde nun mit destilliertem Wasser oder Bindungspuffer bis an den oberen Rand befüllt und der Säulenadapter luftblasenfrei aufgesetzt und festgeschraubt. Die Chromatographiesäule wurde nun an das Pumpen- und Monitoring-System der FPLC-Anlage angeschlossen, der Auslaufhahn geöffnet und das Mehrwegventil auf "load" gestellt. Die Säule wurde manuell mit 5 Volumen Bindungspuffer + 50 mM KCl gewaschen (Flußgeschwindigkeit einer 30 ml-Säule: 10 ml/min) und anschließend der Adapter noch einmal nachjustiert. Alle Waschschritte wurden über die Leitfähigkeit und die UV-Absorption bei 280 nm kontrolliert.

4.13.6.2 Probenauftrag und Entwickeln der Säule

Die Proteinprobe konnte auch über das Pumpensystem der FPLC-Anlage auf die Säule aufgebracht werden. Dabei wurde bei den groben Kernextrakten mit einer Salzkonzentration von 800 mM KCl die Proteinlösungen vor Auftrag entsprechend mit Bindungspuffer ohne KCl verdünnt oder über die Pumpen mit dem Bindungspuffer ohne KCl vermischt. Das Beladen der Säule (Flußgeschwindigkeit bei 30 ml Packungsvolumen: 5 ml/min) wurde über die UV- und Leitfähigkeitsschreiber kontrolliert. Nach dem Beladen wurde die Säule mit Bindungspuffer + 50 mM KCl solange gewaschen, bis der UV-Schreiber keinen Ausschlag mehr anzeigte. Die Pumpen wurden dann mit den entsprechenden Start- und Endpuffern (Bindungspuffer + 50 mM KCl und Bindungspuffer + 2 M KCl) befüllt und die Säulen im gewünschten Gradienten entwickelt. Die Eluate wurden über einen Fraktionensammler in Aliquots gesammelt und dem Nachweisverfahren zugeführt.

Nach Beendigung der Elution wurde das Säulenmaterial zunächst mit Bindungspuffer + 50 mM KCl, dann mit 500 mM NaOH/1M NaCl und schließlich nochmals mit Bindungspuffer + 50 mM KCl gewaschen. Die Puffer enthielten jeweils 0,05 % (w/v) Na-Azid, um die Säulen für die Lagerung zu stabilisieren. Die Pumpen wurden mit destilliertem Wasser + 0,05 % (w/v) Na-Azid gewaschen.

4.13.7 Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Agarose und Biotin-markiertem Oligo A5

Zur Bindung der Oligonukleotide an das Trägermaterial wurden 50 µl Streptavidin Agarose zunächst dreimal mit Bindungspuffer gewaschen, um Feinteile zu entfernen. Dann wurde die Agarose zusammen mit dem Ligationsansatz für Biotin markierte Oligonukleotide (Punkt 4.7.2) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die beladene Agarose in eine 1 ml Plastiksäule gefüllt, deren Auslauf mit einer Glaskugel abgedichtet war. Die Säule wurde 3 X mit 500 µl Bindungspuffer + 0,005 % Nonidet P-40, 2 X mit 500 µl Bindungspuffer + 0,005 % Nonidet P-40 + 2 M KCl und schließlich noch 3 X mit 500 µl Bindungspuffer + 0,005 % Nonidet P-40 gewaschen. Die Probe wurde auf die Säule appliziert und diese mit 3 X 500 µl Bindungspuffer + 0,005 % Nonidet P-40 gewaschen. Die Säule wurde mit jeweils 100 µl der entsprechenden KCl-Konzentrationen eluiert und diese im Nachweis Assay untersucht.

4.13.8 Gelretention

Pro Reaktionsansatz wurden 5-10 µl Proteinextrakt, 1-3 µl γ ³²P-dATP-markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid (Punkt 4.6.2), 1 µl PolydIdC (1 µg/µl) und 1 µl Bovines Serumalbumin (10 mg/ml) eingesetzt. Zu spezifisch kompetitierten Ansätzen kamen noch 2 pmol unmarkiertes Oligonukleotid. Die Reaktionen wurden mit Bindungspuffer auf 27 µl aufgefüllt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 3 µl 10 X Auftragspuffer dazupipettiert und der Ansatz auf ein 8 % nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, das 30 min bei 90 V in 1 X TBE vorlief. Der Gellauf erfolgte bei 90 - 120 V für 2 h in einer BioRad Proteingelkammer. Danach wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier überführt und im Vacuumtrockner für 15 min bei 90 °C getrocknet. Das trockene Gel wurde über Nacht mit Kodak XOMAT-AR Röntgenfilm bei -80 °C exponiert und dann entwickelt.

10 X Auftragspuffer:	625	mM	HEPES, pH 7,9
	100	mM	DTT
	25	% (v/v)	Glycerin
	0,01	% (w/v)	Xylencyanol
	0,01	% (w/v)	Bromphenolblau

8 % nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel:

2,1	ml	30%
		Polyacrylamidlösung (37,5:1)
800	μ l	10 X TBE
5,1	ml	dest. H ₂ O
5	μ l	TEMED
40	μ l	10 % (w/v) APS

4.13.9 Dot-Blot Analyse von DNA-bindenden Proteinen

Große Probenmengen bei der Aufreinigung des DNA-bindenden Proteins wurden über ein Dot-Blot-Verfahren getestet, wobei man markiertes Oligonukleotid in einem Bindungspuffer an Proteine gebunden wurde, die auf einer Nitrocellulosemembran fixiert waren.

Die zu testenden Proteinproben wurden mittels einer Dot-Blot Kammer auf verstärkte Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Die Membran wurde kurz in Bindungspuffer gewaschen und dann für 2 h bei Raumtemperatur in 100 ml Bindungspuffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver und PolydIdC (1 μ g/ml) unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Oligonukleotide zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Die Membran wurde dann kurz in Bindungspuffer gewaschen, getrocknet und über Nacht bei -80 °C auf Röntgenfilm Kodak XOMAT-AR exponiert.

4.13.10 DNase Footprint Analyse auf einem automatischen Sequenziergerät

Das verwendete DNA Fragment bestand aus einem doppelsträngigem Oligonukleotid, das auf einem Strang am 5'-Ende durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Die optimale DNase Konzentration wurde in einem Versuchsgel durch Einsatz unterschiedlichster Verdünnungen des Enzyms bestimmt. In einem Versuchsansatz wurden zunächst die jeweilige Menge an Proteinlösung mit 2 pmol doppelsträngigem, IRD-800 markiertem Oligonukleotid und 20 μ l 10 X Assaypuffer versetzt und mit destilliertem Wasser auf 193 μ l aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert, um eine Bindung der Proteine zu ermöglichen. Zum Ansatz kamen dann 7 μ l einer DNase I Lösung der Konzentration 0,1 mg/ml. Die Reaktion wurde für genau 2 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und mit 700 μ l Stop-Solution gestoppt. Anschließend wurde die DNA für 30 min bei - 80 °C gefällt, zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Pellets wurden in 25 μ l TE aufgenommen und mit 2 Volumen LI-COR-Auftragungspuffer versetzt. Je Probe wurden 1,5 μ l auf ein 10 % Polyacrylamidgel (Laufpuffer: TBE long run) aufgetragen und in einem LI-COR Sequenziergerät (Modell 4000L) mit der

Steuersoftware BaseImageIR v 2.30 laufen gelassen. Die Auftrennung erfolgte bei 800 V, 37 mA, 40 W für ca. 1,5 Stunden.

10 X Assaypuffer:	100	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100	mM	KCl
	50	mM	MgCl ₂
	10	mM	CaCl ₂
	20	mM	DTT
	500	µg/ml	BSA
	20	µg/ml	PolyIdC
Stop-Solution (für 1 Probe):	645	µl	96 % Ethanol
	0,5	µl	tRNA(10 mg/ml)
	50	µl	gesättigtes Ammonium- acetat
10 % Polyacrylamidgel:			
Urea-Diluent:	20	ml	10 X TBE für LI-COR
	84 ad 150 ml	g	Harnstoff H ₂ O bidest.
für ein Gel (25 cm)	5	ml	40 % PA- Gellösung (19:1)
	15	ml	Urea-Diluent
	200	µl	DMSO
	200	µl	10 % (w/v) APS
	10	µl	TEMED

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der RyREF2-Bindungsstelle

5.1.1 South-Western Screening einer porcinen Hirn cDNA-Bank

Zur Isolierung von RyREF2 wurden 10^6 pfu einer kommerziell erhältlichen λ gt-11 cDNA Bank aus porcinem Gehirn auf 20 NZY-Agar-Platten ausplattiert. Die cDNA-Bank aus Gehirn wurde gewählt, da RYR1 auch in bestimmten Bereichen des Großhirns exprimiert wird (Ledbetter *et al.*, 1994). Doppelte Abzüge der IPTG imprägnierten Nitrocellulose-Filter wurden dann mit konkatemem Oligo A5 nach der Methode von Vinson *et al.* (1988) hybridisiert und gewaschen. Die Nukleotidsequenz des doppelsträngigen Oligos A5 stammt aus der Promotorregion des porcinen *RyR1* Gens und umfaßt den Bereich zwischen -343 bis -370 relativ zum Transkriptionsstart. Für diesen Bereich wurde gezeigt, daß Bindungsaktivität für ein Protein vorhanden ist, dessen Bindungssequenz noch nicht bekannt ist. Die Sequenz von Oligo A5 schließt damit am 3'-Ende direkt an das Bindungsmotiv des Transkriptionsfaktors MEF2 (-328 bis -342) an, für den Bindungsaktivität im porcinen RyR1 Promotor nachgewiesen werden konnte (Schmoelzl *et al.*, 1996). Um eine Ligation der Fragmente zu ermöglichen, wurden an die 5'-Enden der Promotorsequenz noch Teile der Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *SalI* synthetisiert. Nach Hybridisierung der Einzelstränge durch schrittweises Abkühlen von 95 °C auf Raumtemperatur entstanden so überhängende Enden, die nach der Ligation gegebenenfalls eine Klonierung in die *SalI* Schnittstelle des Vektors pGEM-4Z erlaubten (Abb. 5.1). Für die radioaktive Hybridisierung der Phagenfilter wurden ligierte Fragmente > 300 bp verwendet. Dabei konnte ein doppelt positives Signal ermittelt werden, das dann in weiterer Folge vereinzelt wurde. Nach Isolierung und selektiver Vermehrung des positiven, rekombinanten Phagens (REF2 λ 11.2) wurde Phagen-DNA im großen Maßstab gewonnen und das Insert mit *EcoRI* aus den Phagenarmen gespalten. Es konnte ein 2.5 kb großes Fragment gewonnen werden, das in das Plasmid pGEM-4Z kloniert wurde (REF2p11.E1). Durch Restriktionsspaltung mit den Enzymen *HindIII*, *AvaI* und *HincII* entstanden Subklone zur radioaktiven Sequenzierung des cDNA Klons. Analyse der Sequenzen identifizierte zwei klassische Zinkfinger-Motive der Form C2H2 (Klug und Schwabe, 1995) an den cDNA - Positionen 703 bp - 765 bp (Z1) und 787 bp - 849 bp (Z2). Der längste offene Leserahmen (ORF) ergab sich von Anfang des Klons bis zu Position 1028 bp, wo ein Stopcodon (TAA) den Leserahmen beendete. Ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) wurde an Position 1078 bp

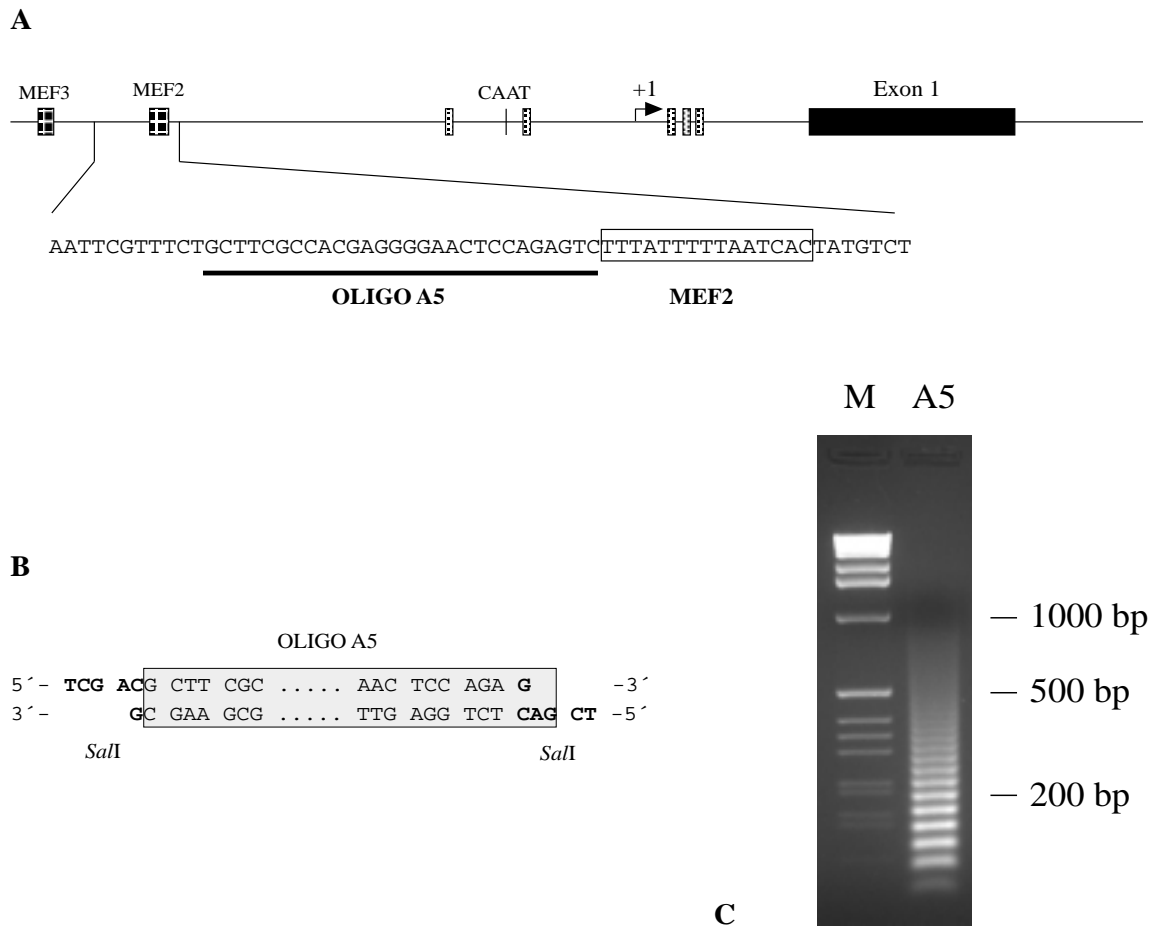


Abb. 5.1: Der porcine *RyR1* Promotor und das Oligo A5

A) Darstellung der Promotorregion, des ersten Introns und des ersten Exons. Der Transkriptionsstart ist durch +1 dargestellt. Neben der MEF2-, MEF3- und CAAT-Box gibt es noch einige GC-Boxen (unbeschriftete Kästchen) im Promotor und im ersten Intron. Die Sequenz und Lage des Oligos A5 ist im vergrößerten Ausschnitt dargestellt.

B) Das hybridisierte Oligo A5 trägt an den Enden die Schnittstellen für *SalI* (fette Buchstaben). Die graue Box zeigt die Bindungssequenz.

C) 10 μ l der Ligation von Oligo A5 wurden auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Der Bereich > 300 bp wurde für die Hybridisierung der Phagenfilter verwendet. M = Marker (5 μ l), A5 = Ligation des Oligos A5.

des cDNA Klon identifiziert (Abb. 5.2). Es wurde daher zunächst angenommen, daß es sich bei REF2 λ 11.2 um einen chimären Klon handelt, der durch Ligation zweier cDNAs bei der Konstruktion der Bank entstanden ist. Aus diesem Grund, aber auch aus Mangel an geeigneten Restriktionsschnittstellen wurde der Bereich zwischen Position 1457 bp bis 2272 bp nicht weiter sequenziert. Ein Vergleich der vorhandenen Sequenzdaten mit den Eintragungen in der GenBank Datenbank über den BLAST Algorithmus zeigten eine 99 prozentige Homologie zu zwei Fragmenten auf Chromosom 14 von *Saccharomyces cerevisiae*, die im Rahmen des Hefe-Genomprojektes kloniert und sequenziert wurden. Die beiden überlappenden Fragmente YNL027w (Access. Nr. Z71303, Y13139) und YNL029c (Access Nr. Z71305, Y13139) bein-

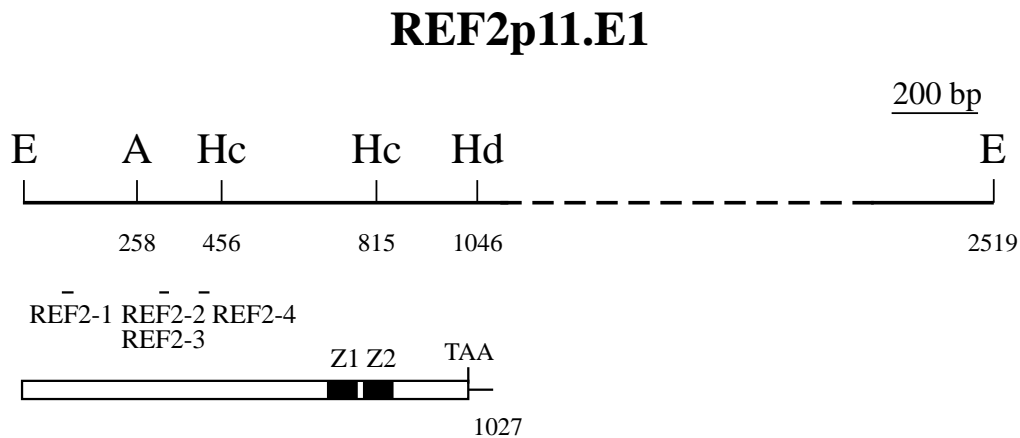


Abb. 5.2: Der cDNA-Klon REF2p11.E1

Schematische Darstellung des isolierten cDNA-Klons REF2p11.E1. Die unterbrochene Linie symbolisiert nicht sequenzierte Bereiche. Die Schnittstellen der für die Subklonierung verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet: E (*EcoRI*), A (*AvaI*), Hc (*HincII*), Hd (*HindIII*). Die kleinen Linien bezeichnen die Positionen der verwendeten Primer. Der Balken unter der Restriktionskarte zeigt den offenen Leserahmen, die dunklen Flächen geben die Position der beiden Zinkfinger motive (Z1 und Z2) wieder.

halten jeweils einen offenen Leserahmen, die durch 295 bp voneinander getrennt liegen. ORF YNL027w codiert für ein Protein mit zwei Zinfinger Motiven am C-terminalen Ende des vorhergesagten Proteins und einer Polyglutamin-reichen Region am N-terminalen Ende. Die vorhergesagte Sequenz umfaßt 679 Aminosäuren und weist keine signifikanten Homologien zu bekannten Proteinen auf. Die höchsten Homologien im Bereich der beiden Zinkfinger Motive bestehen zum ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 (Briggs *et al.*, 1986) und zum neuronalen Transkriptionsfaktor Zic3 aus *Xenopus laevis* (Nakata *et al.*, 1997). ORF YNL029c wurde als der codierende Bereich für Mannosyltransferase KTR5 (Lussier *et al.*, 1997b) identifiziert (Abb. 5.3).

5.1.2 Konstruktion und Screening einer porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank

Da RyR1 zwar im Gehirn exprimiert wird, das Protein aber vor allem im Skelettmuskel eine bedeutende Rolle spielt, wurde eine porcine Skelettmuskel cDNA-Bank (Expressionsbank) im Phagen λ ZAP Express mit Hilfe eines entsprechenden cDNA Synthese Kits (Stratagene) konstruiert.

Der Titer der primären Genbank lag bei 500 000 pfu. Wenn man davon ausgeht, daß etwa 100 000 Gene pro Zelle transkribiert werden, deckt die Genbank 5 mal den mRNA-Bestand einer Muskelzelle ab. Die gesamte Genbank wurde auf 10 NZY-Agarplatten ausplattiert und mit λ -

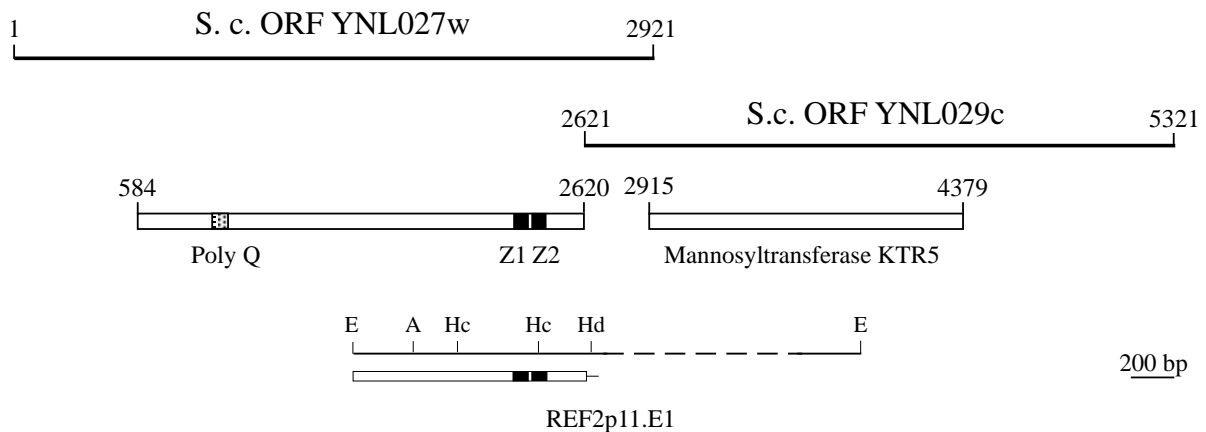


Abb. 5.3: Die überlappenden Fragmente aus *S. cerevisiae*

Schematische Darstellung der beiden genomischen Fragmente S.c.ORFYNL027w und S.c.ORFYNL029c, die im Zuge des Hefe-Genomprojektes sequenziert wurden. Die Balken zeigen die beiden offenen Leserahmen des Zinkfingerproteins und der Mannosyltransferase. Die beiden Zinkfinger motive sind als dunkle Felder dargestellt, das schraffierte Feld symbolisiert die Glutamin-reiche Region. Dazu wird maßstäblich der isolierte cDNA-Klon REF2p11.E1 dargestellt.

Diluent abgeschwemmt. Durch diese Amplifikation erreichte die Genbank einen letztendlichen Titer von $3,4 \times 10^8$ pfu/ml. 10^6 pfu dieser amplifizierten Genbank wurden auf 20 NZY-Agarplatten ausplattiert und die doppelten Filterabzüge mit der Sonde A5 im South-Western-Verfahren nach Vinson *et al.* (1988) hybridisiert. Nach dem Waschen und Exponieren auf Röntgenfilm konnten keine eindeutig doppelt positiven Signale identifiziert werden.

5.1.3 PCR und RT-PCR auf porcinen DNA und RNA Proben

Die isolierte DNA aus dem Phagen REF2 λ 11.2 zeigte bei Expression eindeutig Interaktion mit dem Oligo A5. Daher sollte geklärt werden, ob es homologe Sequenzen auch im Schweinegenom gibt. Zunächst wurden zwei Primer (REF2-1 und REF2-2; Abb. 5.2) aus dem 5'-Bereich des Klons REF2p11.E1 ausgewählt. Dieser Bereich beinhaltet keine bekannten Sequenzmotive und liegt auch außerhalb der Zinkfinger Region. Damit sollte verhindert werden, daß unspezifische Amplifikationen durch konservierte Sequenzmotive auftreten. Die Primer ergaben bei Amplifikation auf Hefe DNA ein Produkt mit 240 bp Länge. In der PCR auf genomischer Schweine DNA konnte keine Amplifikation festgestellt werden.

Da die Möglichkeit bestand, daß die Primer auf genomischer DNA einen großen Intron-Bereich umspannen, der mit herkömmlicher *Taq*-Polymerase nicht amplifizierbar ist, wurde zunächst ein zweites Primer Paar (REF2-3 und REF2-4; Abb. 5.2) ausgewählt. Der Primer REF2-3 entsprach in seiner Sequenz der komplementären Sequenz von REF2-2. Der Gegenprimer lag

112 bp entfernt. Eine PCR Reaktion mit diesen Primern zeigte auf genomischer Schweine DNA ebenfalls keine Amplifikation.

Mittels RT-PCR sollte nun versucht werden, direkt die gebildete mRNA in Schweinegehirn nachzuweisen. Dazu wurde Gesamt-RNA aus dem Gehirn eines 4 Wochen alten Ferkels isoliert und mit Hilfe reverser Transkriptase ein komplementärer DNA Strang synthetisiert. Als Primer für die Polymerisation diente ein PolydT₍₂₄₎ - Primer (LT8), der an den PolyA-Tail der mRNA binden konnte. Die anschließende PCR-Reaktion mittels der genspezifischen Primer REF2-1 und REF2-2 bzw. REF2-3 und REF2-4 brachte allerdings kein Ergebnis. Um auszuschließen, daß es sich um einen muskelspezifischen Transkriptionsfaktor handelt wurden sämtliche RT-PCR Ansätze auch mit RNA aus Schweine-Skelettmuskel durchgeführt. Es konnten ebenfalls keine spezifischen Amplifikate beobachtet werden.

5.1.4 Screening einer porcinen genomischen Bank mit einer Sonde aus dem Zinkfingerprotein

Weiters wurde eine genomische Phagenbank vom Schwein (λ -FIXII) mit einer Sonde aus dem Hefe DNA-Fragment durchmustert. Die Sonde wurde durch Restriktionsspaltung des Klons REF2p11.E1 mit den Restriktionsenzymen *HincII* und *EcoRI* hergestellt. Dadurch entstanden drei Fragmente mit 360 bp, 456 bp und 1706 bp Länge. Das längste Fragment beinhaltete den C-terminalen Teil des zweiten Zinkfinger Motifs und den 3' untranslatierten Bereich des Zinkfingerproteins sowie den zweiten codierenden Bereich für einen Teil der Mannosyltransferase. Das 360 bp Fragment beinhaltete den gesamten ersten Zinkfinger und den N-terminalen Teil des zweiten Zinkfingers. Da Zinkfinger-Motive sehr hoch konserviert sind und Kreuzreaktionen aufgrund dieser Homologien vermieden werden sollten, wurde das 456 bp Fragment als Sonde ausgewählt. 10⁶ pfu der genomischen Phagenbank wurden auf 20 NZY Platten ausgebracht und doppelte Filterabzüge genommen. Nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde und Exposition der Filter zeigte die genaue Analyse der Röntgenfilme keine eindeutig doppelt-positiven Signale.

5.1.5 Isolierung von RyREF2 Protein

In Retentionsanalysen mit Skelettmuskelpräparationen wurde für das Oligo A5 Bindungsaktivität mit einem Protein beobachtet, welches durch das unspezifische Oligonukleotid PolydIdC nicht kompetitierbar ist. Daher sollte versucht werden, diesen Faktor über proteinbiochemische Methoden aufzureinigen und zu charakterisieren. Als

Nachweismethode der einzelnen Reinigungsschritte diene zunächst die Retentions-Analyse. Später wurde aufgrund der Probenmenge ein Dot-Blot Verfahren mit anschließendem Bindungsnachweis durch radioaktive Hybridisierung mit dem Oligo A5 eingesetzt.

5.1.5.1 Proteinisolierung und Retentionsanalyse

Nach den Ergebnissen von Schmoelzl *et al.* (1996) wurde Bindungsaktivität für RyREF2 sowohl in Gesamtzellextrakten als auch in Kernextrakten nachgewiesen. Die Banden aus Kernextrakten hatten aber generell eine geringere Intensität als Gesamtzellextrakte. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß die Methode zur Kernpräparation weniger schonend ist, als der Zellaufschluß bei der Gesamtzellextraktion. Die Kerne wurden dabei im Wesentlichen nach der Methode von Mar und Ordahl (1990) isoliert. Zunächst wurden die Skelettmuskel-Proben in entsprechenden Puffern, die EGTA enthielten, relaxiert, da dies die Ausbeute der Kernpräparation wesentlich erhöhte. Diese Behandlung wurde beibehalten, jedoch die folgenden Schritte anhand neuerer Protokolle (Neufer *et al.*, 1993; Takai *et al.*, 1994) modifiziert und optimiert. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode lag in der Aufarbeitung größerer Mengen von Muskelgewebe, die dann als Homogenat weggefroren und gelagert werden konnten. Portionsweise wurden die Homogenate dann der eigentlichen Kernpräpa-

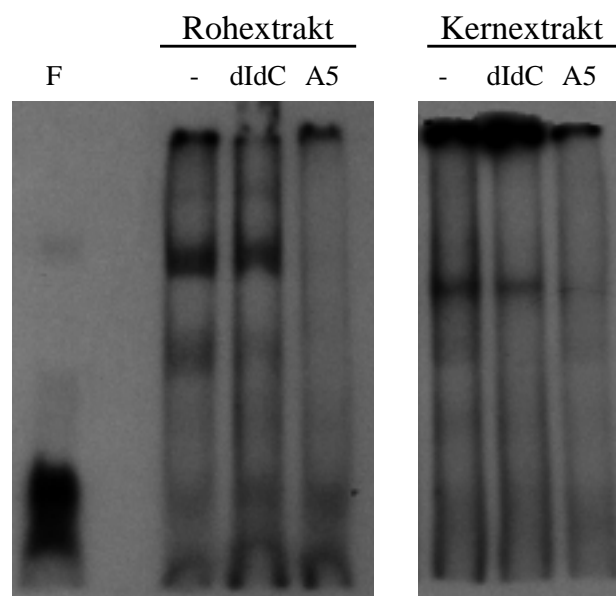


Abb. 5.4: Gelretention mit Rohextrakt und Kernextrakt

15 µl Rohextrakt und Kernextrakt wurden in die Bindungsreaktion mit 2 µl markiertem Oligo A5 eingesetzt. Die unspezifische Konkurrenz erfolgte mit 1 µg PolydIdC, die spezifische Konkurrenz mit 2 pmol unmarkiertem Oligo A5. F = freies Oligo ohne Proteinzugabe. Die Auftrennung erfolgte in einem 8 % PAA - Gel bei 90 V.

ration zugeführt. Bei der Analyse der so präparierten Kernextrakte und Gesamtzellextrakte im Retentionsgel konnte Bindungsaktivität bei Einsatz von Oligo A5 gezeigt werden. Diese Bindungsaktivität wurde durch den unspezifischen Kompetitor PolydIdC nicht kompetitiert, nur bei Zugabe von nicht markiertem Oligo A5 im Überschuß verschwand die entsprechende Retentionsbande. Dies konnte sowohl für Kernextrakte als auch für Gesamtzellextrakte gezeigt werden (Abb. 5.4). Auf Grund dieser Tatsache wurden in der Folge bei den meisten Versuchsansätzen Gesamtzellextrakte eingesetzt, da diese weniger prozessiert waren und sich die Wahrscheinlichkeit eines Proteinabbaus minimierte.

5.1.5.2 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Eine erste Auftrennung der Proteinkomponenten im Skelettmuskel-Rohextrakt sollte mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung erfolgen. Für den ersten Fällungsschritt wurden 10 ml Muskelhomogenat eingesetzt, dem Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungswert von 25 % zugesetzt wurde. Weitere Fällungsschritte erfolgten bei 50 % und 70 % Sättigung. Die Analyse der Proteinfractionen im Retentionsgel zeigte, daß der Hauptteil der bindungsaktiven Komponenten zwischen 50 % und 75 % Sättigung ausgefällt werden konnte (Abb. 5.5A). Daher wurden bei einem weiteren Versuch Sättigungswerte von 50 %, 60 % und 70 % eingesetzt. Die stärksten Signale traten in der 60 % Fraktion auf, in der 70 % Fraktion waren sie deutlich schwächer. Die 50 % Fraktion lag in ihrer Intensität zwischen den Ergebnissen der 60 % und 70 % Fraktion (Abb. 5.5B). Der Großteil des bindenden Proteins wurde demnach bei einer Ammoniumsulfat-Sättigung zwischen 50 % und 60 % ausgefällt. Diese Bindung konnte durch Zusatz des unspezifischen Kompetitors PolydIdC nicht kompetitiert werden. Durch Zugabe von unmarkiertem Oligo A5 (2 pmol) wurden die Banden eindeutig kompetitiert. Zudem waren bei den Retentionsanalysen in einigen Spuren Doppelbanden zu erkennen.

5.1.5.3 DNase Footprint Analyse

Um den Bindungsbereich des Faktors oder der Faktoren einzugrenzen, die in der Retentionsanalyse nachgewiesen werden konnten, wurde DNase Footprint Analyse durchgeführt. Die dabei verwendeten Oligonukleotide (A5univIRD und A5rev) entsprachen in ihrer Sequenz dem bei den Retentionsanalysen eingesetzten Oligo A5 (Strang und Gegenstrang ohne *Sal*-Enden). Zusätzlich befanden sich an den 5'-Enden Sequenzen der Standardsequenzierprimer M13-Universal und M13-Revers. Diese Verlängerung der Oligonukleotidsequenz sollte es im gegebenen Fall erlauben, das Oligonukleotid direkt von bei-

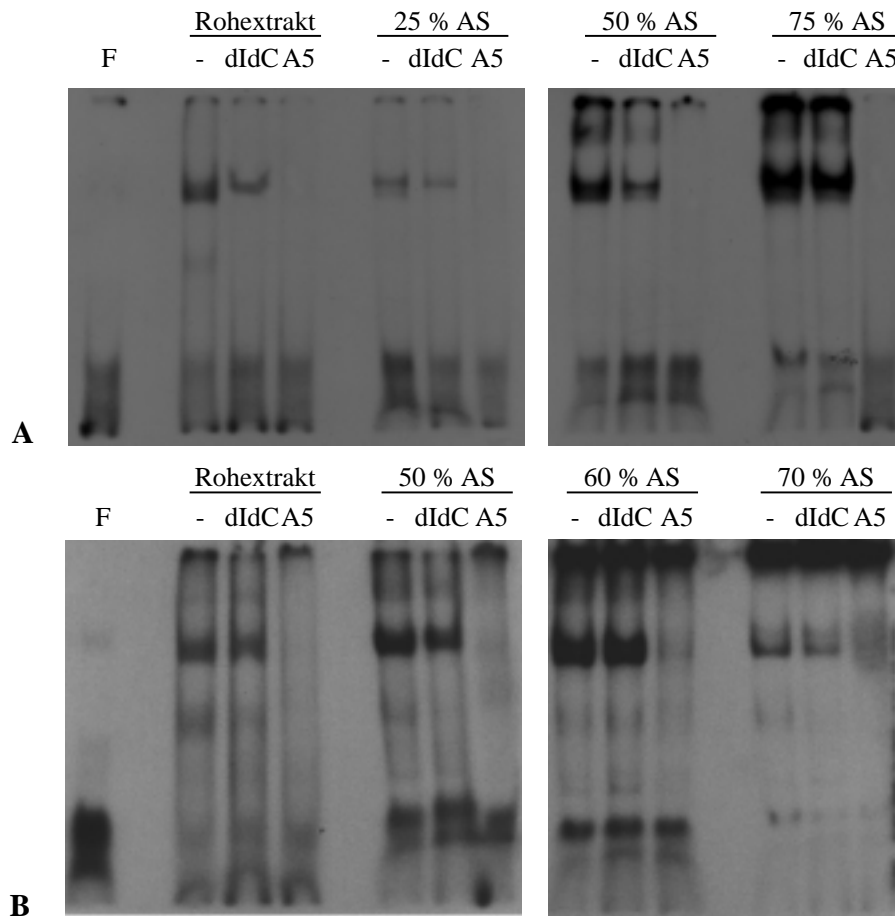
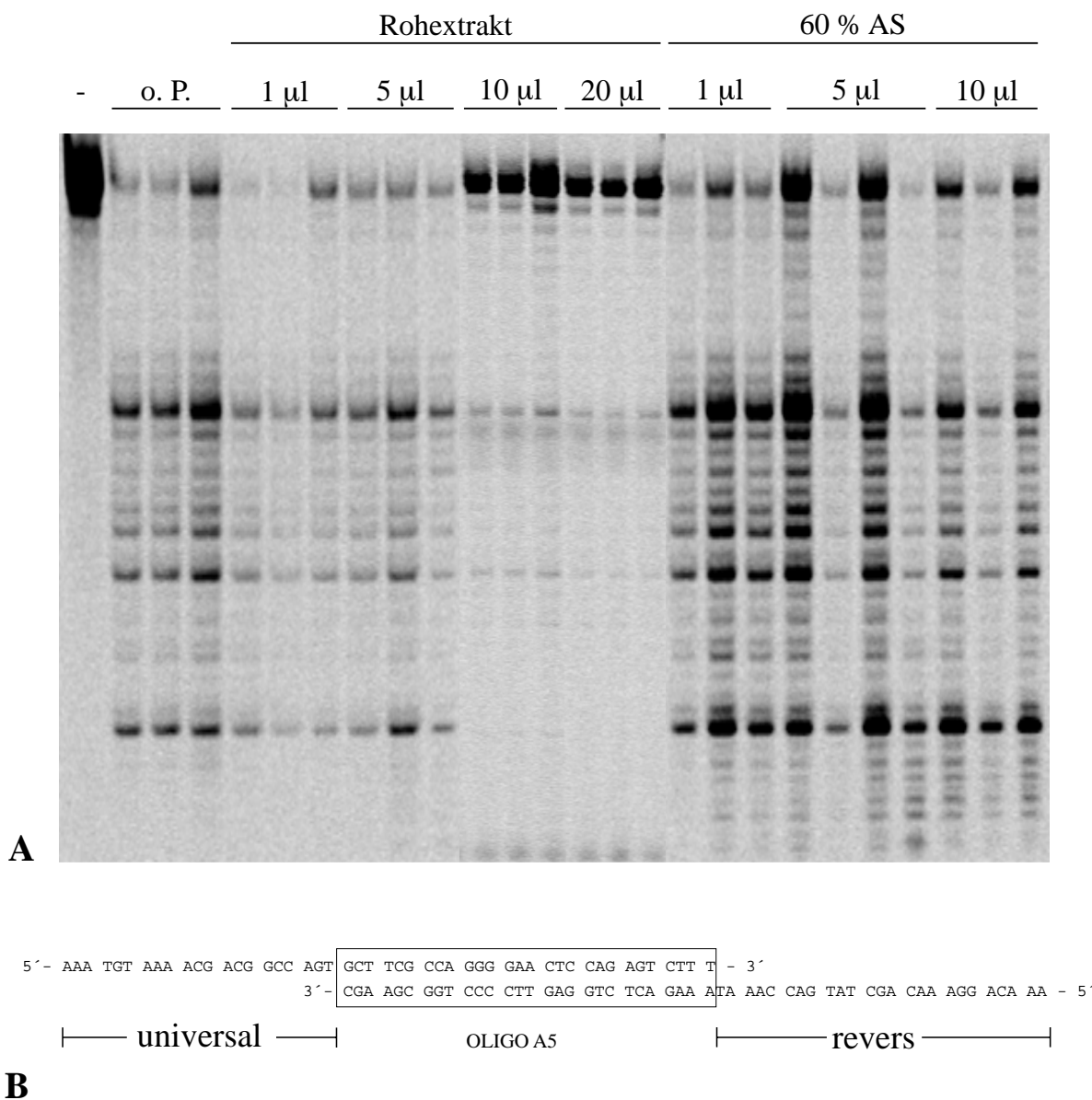


Abb 5.5: Gelretentionen der Ammoniumsulfatfällungen

A) + B) 10 μ l des Rohextraktes und jeder Fällungsfraction (AS) wurden in die Bindungsreaktion mit 2 μ l markiertem Oligo A5 eingesetzt. Die unspezifische Kompetition erfolgte mit 1 μ g PolydIdC, die spezifische Kompetition mit 2 pmol unmarkiertem Oligo A5. F = freies Oligo ohne Proteinzugabe.

den Seiten zu sequenzieren und als Referenz neben Footprint-Analysen im Sequenzgel laufen zu lassen (Abb. 5.6B).

Zunächst wurden unterschiedliche Mengen an Gesamtzellextrakt untersucht. Um Fehler in der Auswertung des Bandenmusters zu minimieren, wurden von jeder Proteinkonzentration mindestens drei unabhängige Reaktionen angesetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle diente eine Reaktion, bei der keine DNase Behandlung erfolgte sowie mehrere Reaktionen, denen kein Protein zugesetzt wurde. Vergleicht man die Abbaumuster bei Einsatz von 1 μ l, 5 μ l, 10 μ l und 20 μ l Gesamtzellextrakt mit dem Muster in Reaktionen ohne Proteinzusatz, so ist eine generelle Abnahme der Bandenintensität zu beobachten. Diese Reduktion in der Intensität der Signale erstreckt sich aber über den gesamten Bereich und ist nicht mit spezifischen Banden in Verbindung zu bringen. Wurden verschiedene Mengen an Protein aus einer 60 % Ammoniumsulfatfällung zugesetzt, nahm die Intensität der Signale wieder zu und konnte mit

**Abb. 5.6: DNase Footprint Analyse**

A) Unterschiedliche Mengen an Rohextrakt und einer 60 % Ammoniumsulfat-Fraktion (60 % AS) wurden in die Reaktionen einer DNase Footprint Analyse eingesetzt und die Fragmente auf einem 10 % PAA-Gel aufgetrennt. - = ohne DNase; o. P. = ohne Proteinzusatz.

B) Darstellung der für den DNase Footprint verwendeten Oligonukleotide mit den angefügten Sequenzen der universellen Sequenzprimer M13-Universal und M13-Revers.

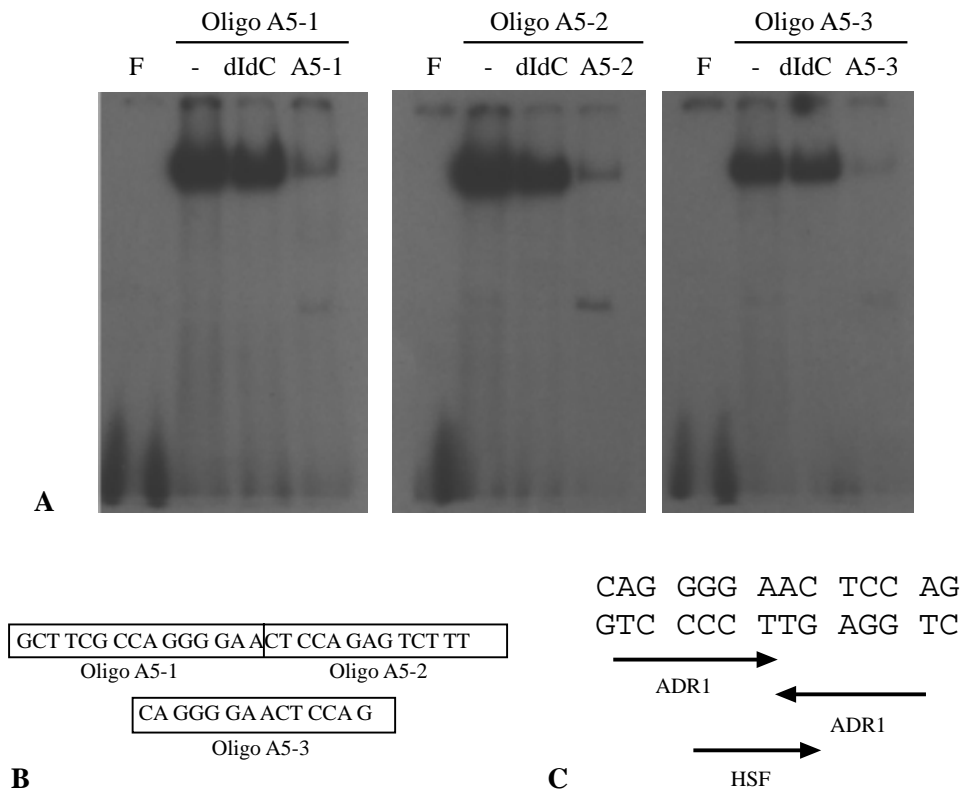
jener der Kontrollansätze verglichen werden, aber auch hier wurde kein eindeutiger Bereich definiert, der auf spezifische Proteinbindung schließen ließ (Abb. 5.6A).

5.1.5.4 Retentionsanalyse mit Subfragmenten des Oligos A5

Da es nicht möglich war, die Proteinbindungsstelle über DNase Footprint Analyse festzulegen, wurde das Oligo A5 in Subfragmente (A5-1, A5-2 und A5-3) unterteilt. Oligo A5-1 und A5-2 ergaben zusammengesetzt wieder Oligo A5. Das Oligo A5-3 entsprach dem Mittelteil von Oligo A5 und enthielt demnach die 3'-Sequenzen von Oligo A5-1 und die 5'-Sequenzen von Oligo A5-2. Alle Oligonukleotide wurden in der Retentionsanalyse untersucht (Abb. 5.7B). Als Proteinprobe diente die 60 % - Fraktion einer Ammoniumsulfatfällung. Proteinbindung konnte bei allen drei Subfragmenten festgestellt werden. Die Bindung wurde nicht durch PolydIdC kompetitiert, wohl aber durch Zugabe von unmarkiertem Subfragment. Die Bindungsbanden aller drei Subfragmente traten in der gleichen Höhe auf, was schließen läßt, daß es sich um das gleiche Protein handelt (Abb. 5.7A). Ein Vergleich der Oligonukleotidsequenz mit Sequenzmotiven für Transkriptionsfaktoren in der TRANSFAC Datenbank ergab, daß keine bekannten Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren aus höheren Tieren vorhanden waren, jedoch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus *S. cerevisiae* und *D. melanogaster*. Aufgrund der Bindungsaktivität aller drei Oligonukleotide im Retentionsgel schien die Sequenz des Oligos A5-3 am aufschlußreichsten zu sein, da es gemeinsame Sequenzen mit den beiden anderen Oligonukleotiden hatte. Auf Oligo A5-3 befanden sich die Bindungsstellen für zwei Hefe-Faktoren: Alkohol Dehydrogenase Genregulator 1 (ADR1) und Hitzeschock Faktor (HSF). Die Bindungsstelle für den Hitzeschock Faktor lag in positiver Orientierung, wobei drei Basen seiner Konsensussequenz auf Oligo A5-1 zu finden waren und zwei Basen auf Oligo A5-2. Für ADR1 waren 2 Konsensussequenzen in unterschiedlicher Orientierung vorhanden. Die Bindungsstelle in positiver Orientierung war zur Gänze auch auf Oligo A5-1 zu finden, jene in negativer Orientierung zur Gänze auch auf Oligo A5-2 (Abb. 5.7C).

5.1.5.5 Retentionsanalyse der Proteinbindung unter Zugabe von 1,10 - o - Phenantrolin und EDTA

Die Ergebnisse des South-Western Screenings und der Retentionsanalyse ließen auf das Bindungsverhalten eines Zinkfingerproteins schließen. Diese Proteine benötigen Zn^{2+} für ihre Funktion. Es sollte nun untersucht werden, ob die Bindung des gesuchten Faktors durch Zu-

**Abb. 5.7: Retentionsanalyse mit Subfragmenten**

A) Je 7 μ l einer 60 % Ammoniumsulfatfällung wurden in die Retentionsanalysen mit den markierten Oligos A5-1, A5-2 und A5-3 eingesetzt. Die unspezifische Konkurrenz erfolgte mit 1 μ g PolydIdC, die spezifische Konkurrenz mit 2 pmol der unmarkierten Oligonukleotide. F = freies Oligo ohne Proteinzugabe.

B) Darstellung der Subfragmente von Oligo A5. Das Oligo A5-3 überlappt in seiner Sequenz mit den beiden Oligos A5-1 und A5-2.

C) Die Lage der Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren ADR1 und HSF innerhalb der Sequenz von Oligo A5-3.

gabe steigender Konzentrationen des Zn-Chelators *1,10 - o - Phenantrolin* (Lange *et al.*, 1995) unterbunden werden kann. Konzentrationen von 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM und 2 mM zeigten keine Auswirkungen auf das Bindungsverhalten des Proteins. Erst ab einer Konzentration von 2 mM Phenantrolin konnte eine deutliche Abnahme bis hin zum Verschwinden der Bande beobachtet werden. Dies wurde aber auf den hohen Salzgehalt in der Reaktion zurückgeführt, der eine Bindung von Proteinen an DNA generell verhindert. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Verwendung des Chelators EDTA in der Bindungsreaktion erzielt (Abb. 5.8).

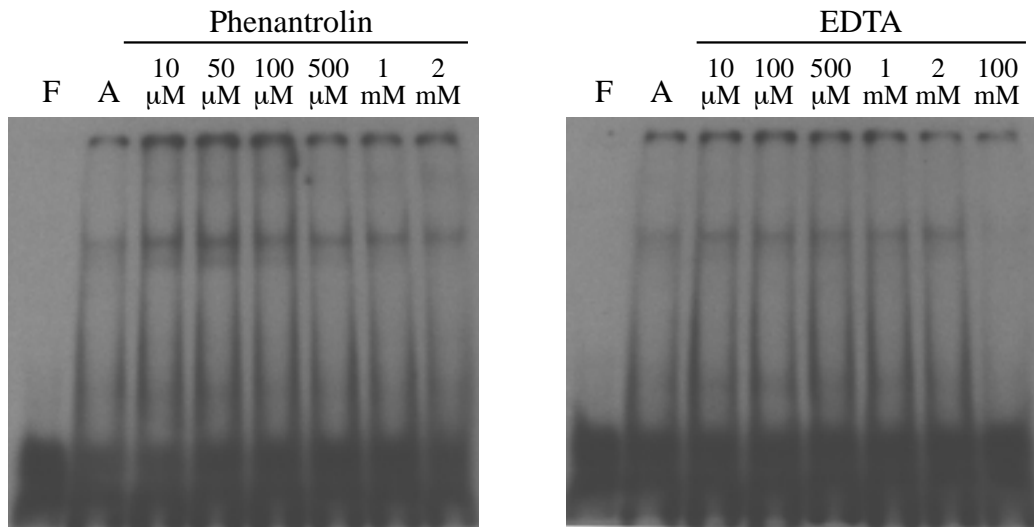


Abb. 5.8: 1,10 - o - Phenantrolin und EDTA

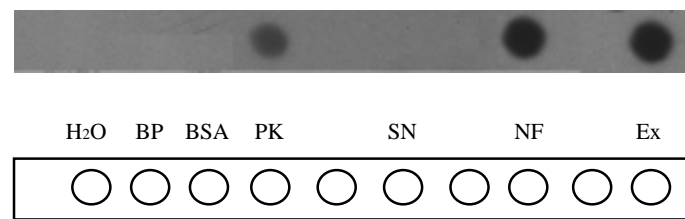
10 μl einer 60 % Ammoniumsulfatfällung wurden unterschiedliche Konzentrationen der Zn-Chelatoren Phenantrolin und EDTA zugesetzt. Jeder Reaktion wurde 1 μg PolydIdC (unspezifischer Kompetitor) zugegeben. F = freies Oligo ohne Proteinzugabe; A = Probe ohne Zugabe von Chelator.

5.1.5.6 Präparation von rohen Kernextrakten und Dot-Blot Analyse

Die in den Retentionsanalysen verwendeten Proteinlösungen aus Skelettmuskelrohextrakt sind in der Säulenchromatographie wegen der Verunreinigungen und des noch teilweise partikulären Materials nicht einsetzbar. Es wurde daher eine Methode zur Kernproteinextraktion angewandt, die vor allem bei klinischen Proben mit nur einer sehr geringe Anzahl von Zellen gute Ergebnisse erzielt hat (El-Osta *et al.*, 1997).

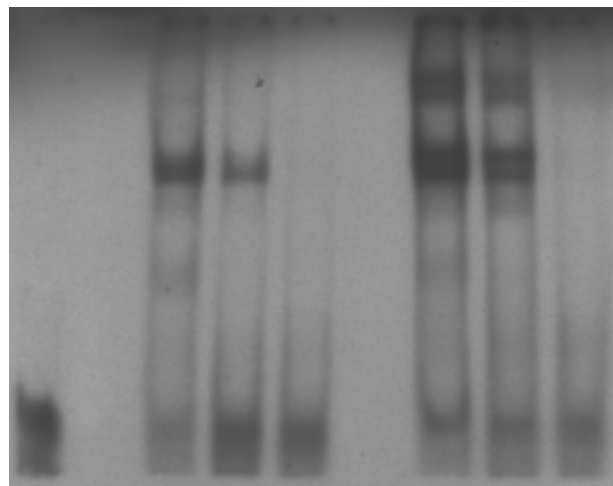
Um die einzelnen Schritte der Probenaufbereitung zu verfolgen, wurden jeweils Aliquots zu 50 μl entnommen und in einem Dot-Blot Verfahren getestet. Diese Methode wurde vom South-Western Screening abgeleitet, wobei native Proteine an Nitrocellulose-Membranen gebunden wurden. Diese Membran wurde anschließend mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde (Oligo A5) inkubiert und so Bindungsaktivität nachgewiesen.

Im Dot-Blot zeigte sich, daß der Zentrifugations-Überstand nach dem Pelletieren des Zellmaterials und der Kerne keine Bindungsaktivität besitzt. Nach Extraktion im Hochsalzpuffer konnte Bindungsaktivität nachgewiesen werden, und nach Filtration durch ein Faltenfilter war ebenfalls Bindungsaktivität vorhanden. Als Kontrollen für unspezifische Bindungen dienten reines Wasser, BSA und Bindungspuffer. Als Positivkontrolle wurde Muskelhomogenat aufgetragen (Abb. 5.9A). Zusätzlich zu diesem Dot-Blot Verfahren wurde der 800 mM Extrakt in der Retentionsanalyse kontrolliert (Abb. 5.9B). Hier zeigten sich im Vergleich zur Retentions-



A

F	Rohextrakt		gr. Kernextrakt	
	-	dIdC A5	-	dIdC A5



B

Abb. 5.9: Dot-Blot und Retentionsanalyse von rohen Kernextrakten

A) Auf eine Nitrocellulosemembran wurden je 50 µl Wasser (H₂O), Bindungspuffer (BP), Bovines Serum Albumin (BSA), Zentrifugationsüberstand nach Pelletieren des Zellmaterials (SN), 800 mM Extrakt (Ex) und 800 mM Extrakt nach der Filtration durch ein Faltenfilter (NF) aufpipettiert. Die Membran wurde abgesättigt und dann mit dem radioaktiv markiertem Oligo A5 inkubiert.

B) Retentionsanalyse von Rohextrakt und rohem Kernextrakt. Es wurden je 10 µl Proteinprobe eingesetzt. Die unspezifische Kompetition erfolgte mit 1 µg PolyIdC, die spezifische Kompetition mit 2 pmol unmarkiertem Oligo A5. F = freies Oligo ohne Proteinzugabe.

bande im Gesamt-Zellhomogenat vier Banden. Eine lief in derselben Höhe, von den drei zusätzlichen, höher gelegenen Banden, waren zwei stärker abgesetzt. Alle vier Banden ließen sich durch PolyIdC nicht kompetitieren, bei Zugabe von unmarkiertem Oligo A5 im Überschuß verschwanden alle Banden. Es mußte also davon ausgegangen werden, daß es sich bei allen Banden um spezifische Bindungen handelte.

Aufgrund dieser Ergebnisse schien diese Präparationsmethode geeignet zu sein, ausreichend Ausgangsmaterial für die Säulen-Chromatographie in relativ kurzer Zeit zu gewinnen.

5.1.5.7 Aufreinigung von rohen Kernextrakten über PEI-Cellulose

Polyethylenimin (PEI) ist ein bei neutralem pH positiv geladenes Molekül, weshalb Nukleinsäuren und saure Proteine bei geringen Ionenstärken durch Bildung von Neutralisationskomplexen ausgefällt werden. Daher wurde PEI-Cellulose, ein Material, das seine Anwendung hauptsächlich in der Dünnschicht-Chromatographie findet (Chen und Roe, 1978), als Trägermaterial in der Säulenchromatographie eingesetzt. Für den Auftrag auf eine 30 ml PEI-Säule wurden 200 ml eingefrorenes Muskelhomogenat in 80 ml Hochsalzpuffer extrahiert. Nach Filtration durch ein Faltenfilter wurde dieses Extrakt auf eine KCl-Konzentration von 50 mM verdünnt und so im Batch-Verfahren an das Säulenmaterial gebunden. Nachdem die Säule gepackt war, wurde nach einem intensivem Waschschrift die Säule zunächst in zwei Stufen eluiert. In der ersten Stufe wurde Bindungspuffer + 200 mM KCl eingesetzt, in der zweiten Stufe Bindungspuffer + 800 mM KCl. Der Fortgang der Elution wurde über Leitfähigkeitsmessung und UV-Absorption bei 280 nm verfolgt. Erwartungsgemäß stieg der Absorptionswert nach Aufbringen des 200 mM Elutionspuffers an und erreichte seinen Höchstwert bei einer $OD_{280nm} = 0,17$. Die Kurve sank rasch wieder ab und bei Erreichen des Basiswertes wurde der 800 mM Elutionspuffer auf die Säule gebracht. Das damit eluierte Protein erreichte einen Höchstwert bei einer $OD_{280nm} = 0,65$. Die Kurve stieg rasch ab, erreichte nicht ganz den Basiswert und stieg nach 1,5 Säulenvolumen wieder bis auf einen Wert $OD_{280nm} = 0,09$. Dieser Peak lief sehr langsam aus und der Elutionsgradient 800 mM - 2 M KCl wurde in diesen auslaufenden Peak hineingestartet. Dadurch kam es zu keinem Anstieg in der Elutionskurve, woraus geschlossen wurde, daß es sich bei dem eluierten Protein um nicht gebundenes Material handeln mußte, das nur sehr langsam durch die Säule lief. Die Elutionskurve stieg erst wieder bei einer Salzkonzentration von 1,4 M KCl bis zu einem Höchstwert von $OD_{280nm} = 0,1$ an (Abb. 5.10). Bei diesen Salzkonzentrationen werden bei PEI normalerweise nur Nukleinsäuren eluiert (Burgess, 1991), die Fraktionen wurden daher auf vorhandene DNA untersucht. Tatsächlich konnte im Agarosegel DNA nachgewiesen werden. Das gesamte Volumen des Waschschriftes wurde gesammelt und ein Aliquot von 1 ml für die Analyse aufbewahrt. Das Volumen des Elutionsprofils wurde in 5 ml-Schritten von einem Fraktionensammler gesammelt. Von den Elutionsstufen 200 mM und 800 mM wurden jeweils die Fraktionen, die im Peak beinhaltet waren, vereinigt (P1(200 mM) = 15 ml; P2(800 mM) = 25 ml) und mit Ammoniumsulfat gefällt. Fraktionen, die im Gradienten 800 mM bis 2M beinhaltet waren, wurden einzeln im Dot-Blot getestet.

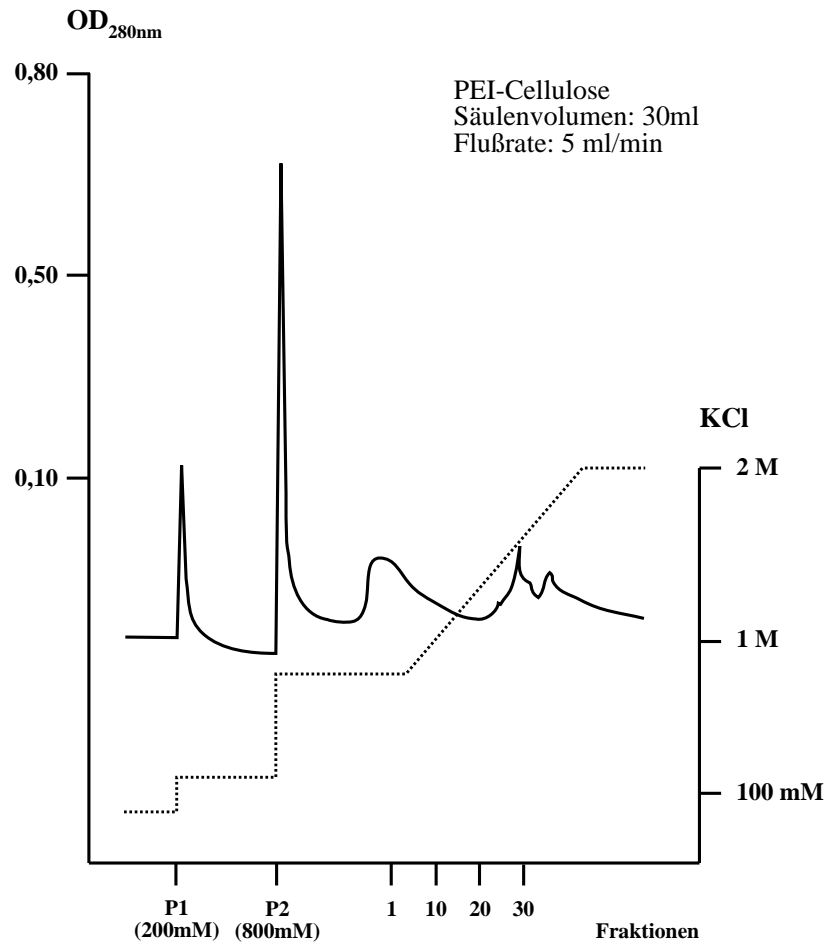


Abb. 5.10: Elutionsprofil der PEI-Säule

Eine 30 ml PEI-Säule wurde in zwei Gradientenstufen (200 mM KCl und 800 mM KCl) und einem linearen Gradienten (800 mM - 2 M KCl) eluiert. Die durchgehende Linie gibt den Verlauf der Proteinelution wieder. Die gepunktete Linie stellt den Salzgradienten dar. P1(200mM) und P2(800mM) bezeichnen die gesammelten Fraktionen der beiden Stufen, die Fraktionen 1-30 wurden in 5 ml-Schritten gesammelt.

5.1.5.8 Analyse der PEI-Elution im Dot-Blot und im Retentionsgel

Die gesammelten Fraktionen der beiden Konzentrationsstufen 200 mM und 800 mM wurden mit Ammoniumsulfat gefällt (80 % Sättigung) und das Pellet in 500 µl Bindungspuffer aufgenommen. Je 100 µl wurden im Dot-Blot auf Bindungsaktivität für das Oligo A5 getestet. Zusätzlich wurden je 200 µl der ungefällten Probe und 100 µl der Waschfraktion aufgetragen. Als Positivkontrolle diente 50 µl Rohhomogenat, als Negativkontrollen je 50 µl Wasser, Bindungspuffer und BSA (10 mg/ml).

Die Waschfraktion zeigte ein deutlich positives Signal im Dot-Blot. Dies könnte auf ungebundenes Protein zurückzuführen sein, welches durch das Batch-Verfahren auf die Säule gelangt war und beim Waschen eluiert wurde. Die ungefällte 200 mM Fraktion (St200) hatte

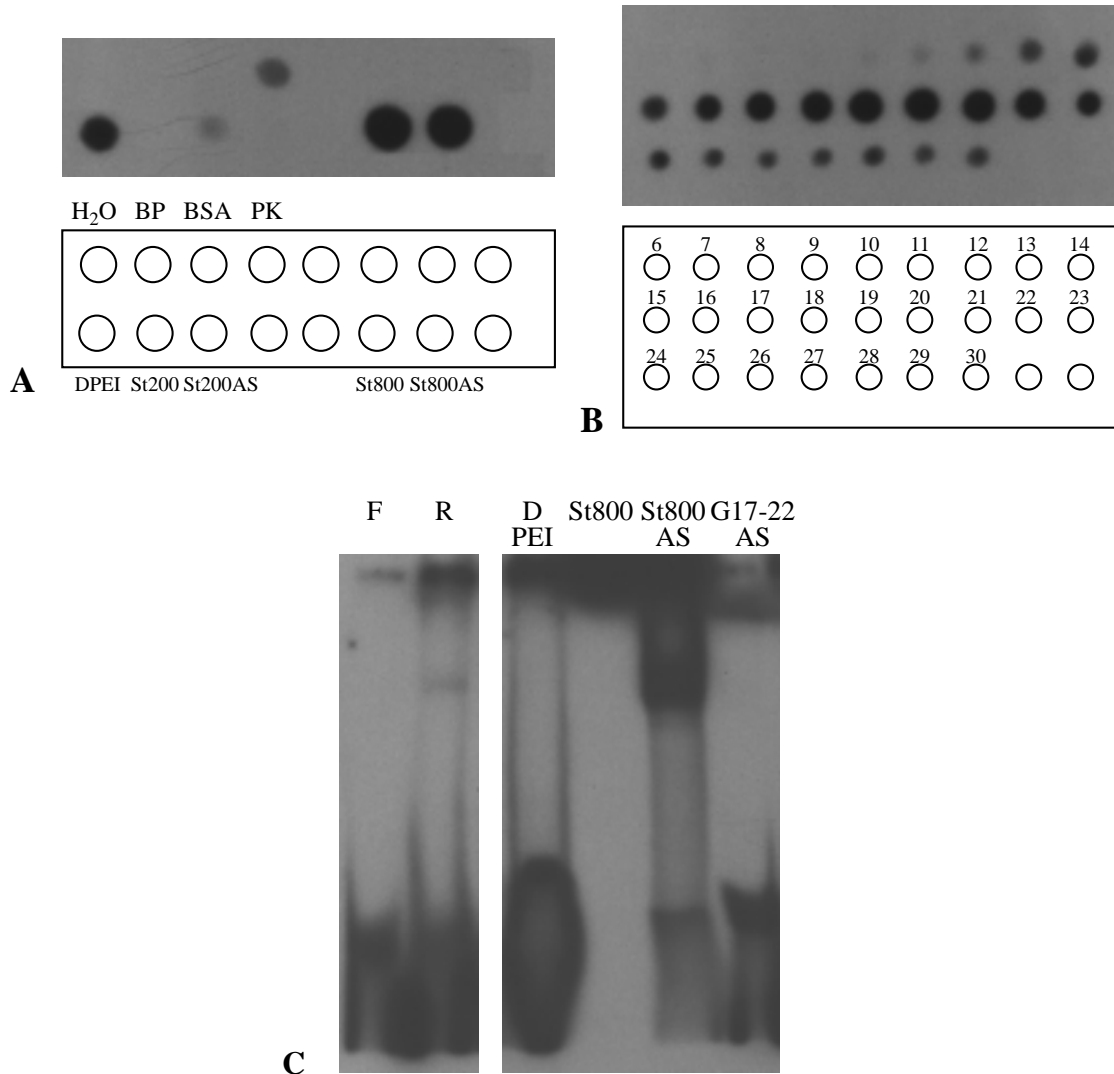


Abb. 5.11: Dot-Blot und Retentionsgel der PEI-Elution

A) Die Proben der Stufengradienten wurden im Dot-Blot getestet. Als Negativkontrolle wurden je 50 μ l dest. Wasser (H₂O), Bindungspuffer (BP) und Bovines Serum Albumin (BSA) aufgetragen, als Positivkontrolle (PK) diente Rohhomogenat. Von den mit Ammoniumsulfat gefällten Proben (St200AS und St800AS) wurden 100 μ l aufgetragen, von den nicht gefällten Elutionsproben (St200 und St800) je 200 μ l. Von der Durchlaufraction (D-PEI) kamen 100 μ l auf die Membran. Die Membran wurde mit markiertem Oligo A5 hybridisiert.

B) Die Proben des linearen KCl-Gradienten (800 mM - 2 M) G6-30 wurden im Dot-Blot Verfahren getestet. Von jeder Probe wurden 50 μ l auf die Membran aufgebracht und mit dem markierten Oligo A5 hybridisiert.

C) Retentionsgel der im Dot-Blot positiven Proben. Es wurden je 15 μ l der Proben eingesetzt. Als unspezifischer Kompetitor wurde allen Proben 1 μ g PolyIdC zugegeben. F = freies Oligo ohne Proteinzugabe; R = Rohhomogenat; D-PEI = Durchlaufraction der PEI-Säule; St800 = nicht gefällte Probe der Elutionsstufe 800 mM KCl; St800AS = Ammoniumsulfat-Fällung der Elutionsstufe 800 mM KCl; G17-22AS = Ammoniumsulfat-Fällung der im Dot-Blot positiven Proben des linearen Gradienten 800 mM - 2 M KCl.

keine Bindungsaktivität, in der mit Ammoniumsulfat gefällten Probe (St200AS) konnte schwache Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Deutliche Signale traten sowohl bei der ungefällten als auch bei der gefällten 800 mM Fraktion auf (St800 und St800AS) (Abb. 5.11A). Von den Einzelfractionen der 800 mM - 2 M - Elution (G6 - G30) wurden je 50 μ l auf die NC-

Membran gespottet. Nach Bindung des Oligos A5 konnte ein Anstieg der Bindungsaktivität von Probe G10 ab beobachtet werden. In den Fraktionen G17 - G22 zeigte sich die höchste Aktivität, dann nahm die Intensität der Spots wieder ab (Abb. 5.11B). Die Proben G17 - G22 wurden daher vereinigt, ebenfalls mit Ammoniumsulfat gefällt und zusammen mit den Fraktionen der Gradienten-Stufe 800 mM im Retentionsgel getestet. Dabei konnte nur für die Probe St800AS eindeutig Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Die ungefällte Probe St800 verhielt sich im Retentionsgel wie eine Probe mit gelöstem PEI. Die gefällten Proben G17-22 zeigten ebenfalls keine spezifische Bindung an das Oligo A5 (Abb. 5.11C).

Demnach konnte mit Hilfe von PEI-Cellulose ein an das Oligo A5 bindendes Protein isoliert werden, das bei einer KCl-Konzentration zwischen 200 mM und 800 mM von der Säule eluiert. Allerdings mußten die Proben für das Nachweisverfahren erst mit Ammoniumsulfat gefällt werden, um eine Interaktion zwischen PEI und Sonde zu verhindern. Dies schien für größere Probenmengen im präparativen Stil nicht praktikabel.

5.1.5.9 Säulenchromatographie von rohem Kernextrakt mit TMAE

Trimethylaminoethan (TMAE) -Fractogel ist ein starker Anionentauscher, der eine sehr feine Auftrennung von Proteingemischen erlaubt (Heitmann *et al.*, 1998). Dieses Säulenmaterial wurde deshalb zur Aufreinigung von 80 ml rohem Kernextrakt in einer 30 ml Chromatographiesäule verwendet. Die Proteinprobe wurde in diesem Fall mit dem Pumpensystem der FPLC-Anlage auf die Säule appliziert, wobei die Verdünnung der Probe durch entsprechendes Beimischen von Bindungspuffer ohne KCl erfolgte. Nach Auftrag der Proteinprobe wurde die Säule über einen Gradienten von 50 mM KCl bis 2 M KCl eluiert. Die Eluate wurden in Fraktionen von 10 ml gesammelt. Da der Gradient sehr steil über nur 4 Säulenvolumen gewählt wurde, traten im Elutionsprofil zwei knapp aufeinander folgende, steile Kurven auf, wobei die erste ihren Höchstwert bei $OD_{280nm} = 3,6$ und die zweite den Höchstwert bei einer $OD_{280nm} = 4$ erreichte (Abb. 5.12A). Alle gesammelten Fraktionen (TG1 - TG13) wurden zunächst im Dot-Blot getestet. Die Fraktionen TG3-5 zeigten Bindungsaktivität, bei Fraktion TG6 war die Bindung von Oligo A5 nur relativ schwach, stieg bei Probe TG7 aber wieder an und war bei TG8 - TG11 stark nachzuweisen (Abb. 5.12B). Im Elutionsprofil lagen die Proben TG3 - TG5 im ersten Peak bei einer KCl - Konzentration von 600 mM bis 800 mM, die Proben TG8 - TG7 im zweiten Peak bei Konzentrationen von 1,5 M bis 1,8 M. Die Fraktionen TG3 - TG5 waren zudem von einer starken Trübung geprägt. Um die Bindungsaktivitäten dieser positiven Proben genauer zu untersuchen wurden die Fraktionen TG3, TG4 und TG8 - 11 im Retentionsgel überprüft. Die Proben TG3 und TG4 zeigten eine

retardierte Bande in Höhe der Retentionsbande des 800 mM Extrakts, bei den Fraktionen TG8 - 11 konnte keine spezifische Bindung beobachtet werden (Abb. 5.12C).

5.1.5.10 Rechromatographie der positiven Proben TG3 - 5

Die Proben TG3 - TG5 wurden vereinigt und noch einmal unter Verdünnung mit Bindungspuffer auf eine TMAE-Säule appliziert. Da das Säulenvolumen diesmal nur 5 ml TMAE betrug, wurde die Flußrate entsprechend auf 3 ml/min reduziert. Die Säule wurde in

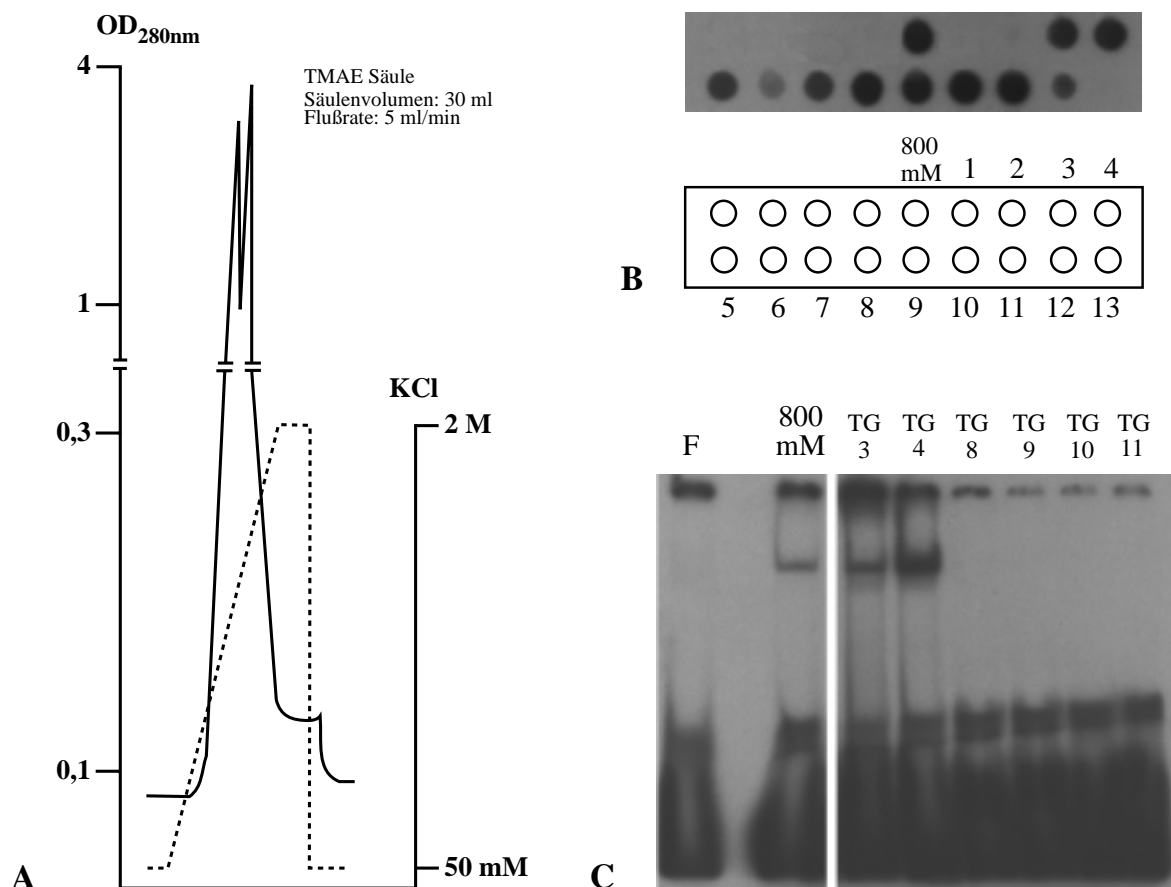


Abb. 5.12: Elutionsprofil, Dot-Blot und Retentionsgel der TMAE-Säule

A) Eine 30 ml TMAE-Säule wurde über einen linearen Gradienten (50 mM - 2 M KCl) eluiert. Die durchgehende Linie gibt den Verlauf der Proteinelution wieder. Die gepunktete Linie stellt den Salzgradienten dar. Das Eluat wurde in 10 ml Fraktionen gesammelt.

B) Dot-Blot Analyse der Proben aus der TMAE Elution. Als Positivkontrolle diente das 800 mM Hochsalzextrakt (800 mM; 50 μ l Auftrag), von den einzelnen Fraktionen (TG1 - 13) wurden je 100 μ l aufgetragen. Die Membran wurde mit markiertem Oligo A5 hybridisiert.

C) Retentionsgel der positiven Dot-Blot Proben. Es wurden jeweils 10 μ l der Proben eingesetzt, als unspezifischer Kompetitor wurde allen Ansätzen 1 μ g PolyIdC zugesetzt. F = freies Oligo ohne Proteinzugabe; 800 mM = 800 mM Hochsalzextrakt; TG3,4,8-11 = positive Proben der Dot-Blot Analyse.

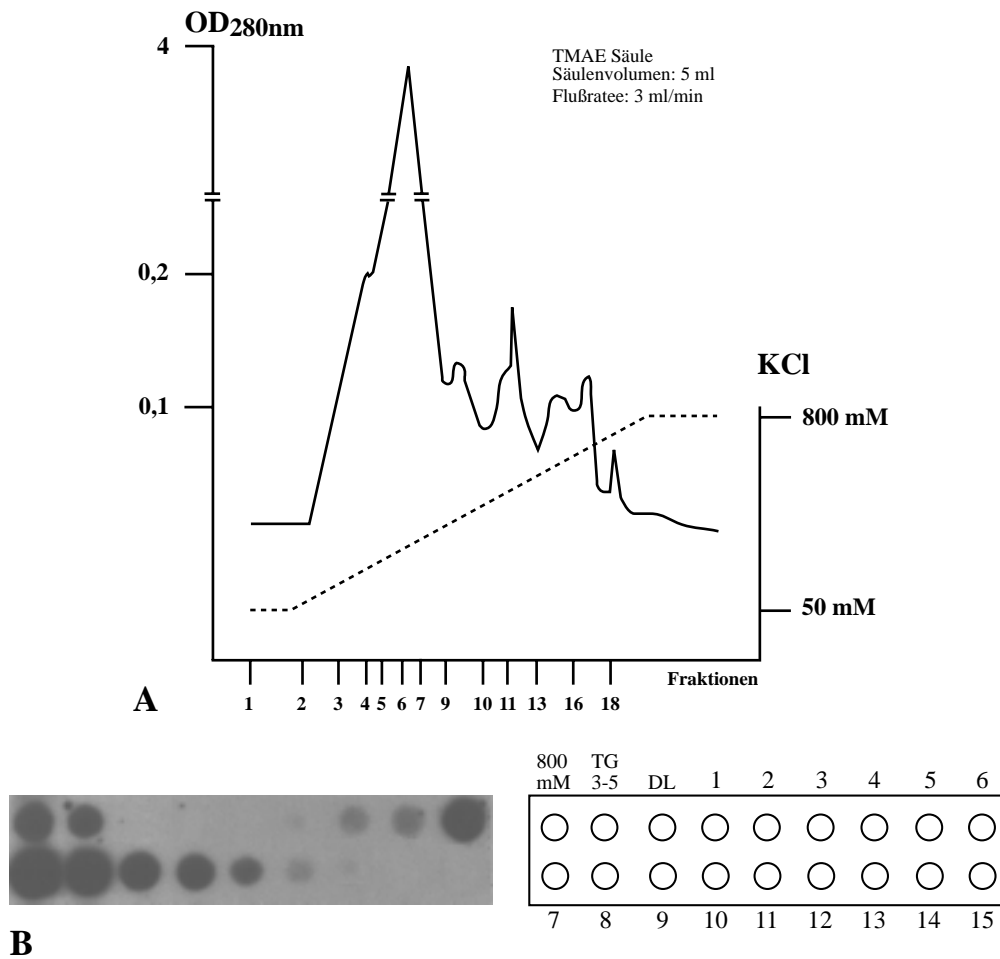


Abb. 5.13: Rechromatographie über eine TMAE-Säule und Dot-Blot Analyse

A) Elutionsprofil der Chromatographie über eine 5 ml TMAE Säule im Salzgradienten 50 mM - 800 mM KCl. Die durchlaufende Linie gibt die Proteinelution wieder. Die gepunktete Linie stellt den Salzgradienten dar. Das Eluat wurde in 3 ml Fraktionen gesammelt.

B) Dot Blot Analyse der gesammelten Proben RTG1-15. Es wurden jeweils 100 µl jeder Probe untersucht, als Positivkontrollen dienten 50 µl roher Kernextrakt (800 mM) und die vereinigten Proben TG3-5 (TG3-5). Dazu wurden noch 100 µl der Waschfraktion aufgetragen. Der Blot wurde mit markiertem Oligo A5 hybridisiert.

einem Gradienten von 50 mM bis 800 mM über 10 Säulenvolumen entwickelt, damit erreichte man eine bessere Auftrennung der einzelnen Proteinpeaks. Das Elutionsprofil zeigte mehrere klar definierte Proteinpeaks, wobei die Hauptmenge an Protein im ersten Peak eine Absorption von $OD_{280nm} = 4$ erreichte (Abb. 5.13A). Die Eluate wurden in 3 ml-Fractionen gesammelt und je 200 µl jeder Probe im Dot-Blot untersucht. Als Positivkontrolle dienten 50 µl 800 mM roher Kernextrakt und 50 µl der Ausgangsprobe TG3 - TG5. Die Wasch-Fraktion (DL; 100 µl) zeigte keine Bindungsaktivität, in den Proben RTG6 - RTG10 konnte ein starkes Bindungssignal beobachtet werden (Abb. 5.13B). Diese Proben lagen im Elutionsprofil im absteigenden Bereich des Hauptpeaks bei einer KCl-Konzentration von 280 mM bis 470 mM und zeigten bei der Elution eine starke Trübung. Diese Trübung der Fraktionen schien von lipophilen Anteilen

der Proteinproben zu kommen, die sich möglicherweise durch Zusatz von Detergenzien aufheben ließen.

Es wurde daher in Folge die Wirkung von Detergenz auf den Nachweis-Assay getestet. Zunächst wurde Tween-20 in steigender Konzentration (0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,5 % und 1% (v/v)) bei der Extraktion von Muskelhomogenat mit 800 mM KCl-Puffer zugesetzt. Zusätzlich wurden gleiche Konzentrationen Tween-20 dem bereits extrahierten Material zupipettiert. Das Retentionsgel zeigte keine Unterschiede zwischen dem Zusatz von Detergenz bei der Extraktion und dem Zusatz nach der Extraktion. Bis zu einer Endkonzentration von 1 % Tween-20 konnten auch keine Unterschiede in der Intensität der Banden festgestellt werden. Das Detergenz schien also keinen Einfluß auf die Bindungsaktivität des nachzuweisenden Proteins zu haben, da die Intensität der Banden jener der Ausgangsprobe (800 mM - Extrakt ohne Detergenz) entsprach. Das gleiche Ergebnis wurde auch bei Verwendung von Nonidet P-40 als Detergenz erzielt (Abb. 5.14).

Wurden dieselben Proben allerdings im Dot-Blot untersucht, konnte keine spezifische Bindungsaktivität mehr nachgewiesen werden. Die Ursache dafür wurde nicht näher untersucht, aber Detergenz sollte demnach nur in den finalen Schritten der Aufreinigung eingesetzt werden, wo aufgrund der geringerer Probenmengen ein Nachweis über Retentionsanalyse praktikabel erschien.

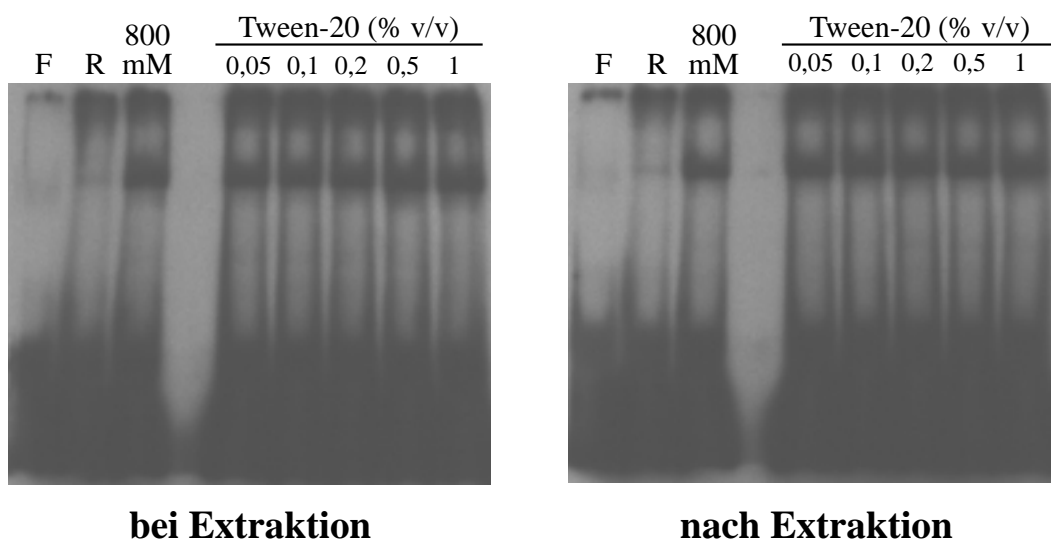


Abb.5.14: Die Wirkung von Detergenz

Retentionsgel mit verschiedenen Konzentrationen an Tween-20, die bei oder nach der Extraktion mit 800 mM KCl-Puffer zugesetzt wurden. F = freies Oligo ohne Proteinbindung; R = Rohextrakt; 800 mM = 800 mM roher Kernextrakt ohne Zugabe von Detergenz.

5.1.5.11 Reinigung der positiven TMAE-Proben über Heparin-Sepharose

Die Proben RTG6-9 der zweiten TMAE-Fraktionierung wurden vereinigt und Nonidet P-40 bis zu einer Endkonzentration von 1 % zugefügt. Die Probe wurde über das Pumpensystem auf eine 5 ml Heparin Sepharose CL6B - Chromatographiesäule unter Verdünnung mit Bindungspuffer appliziert. Um die lipophilen Anteile in Lösung zu halten, wurde allen Puffern Nonidet P-40 bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugefügt. Die Säule wurde über 10 Säulenvolumen in einem Gradienten von 50 mM KCl bis 800 mM KCl entwickelt (Abb. 5.15A). Fraktionen von 2 ml wurden gesammelt und im Retentionsgel getestet. Die Fraktionen HS3-8 zeigten Bindungsaktivität. Im Elutionsprofil lagen diese Fraktionen im ersten Anstieg, der durch einen größeren ($OD_{280nm} = 0,9$) und mehrere kleinere ($OD_{280nm} = 0,7$) Peaks charakterisiert war. Dieser Bereich lag im Konzentrationsgradienten zwischen 260 mM und 380 mM KCl (Abb. 5.15B).

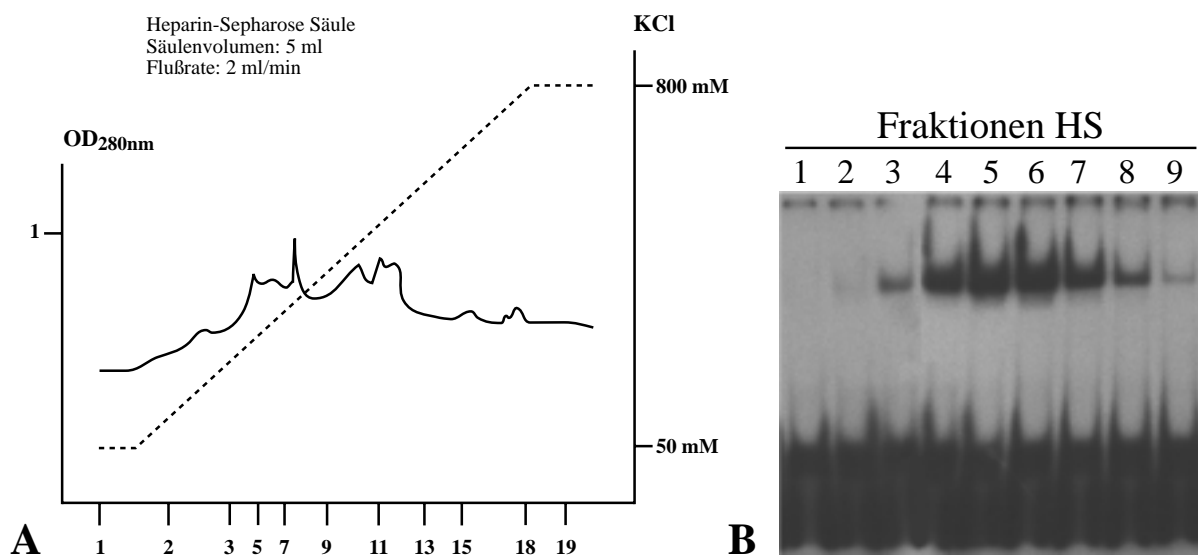


Abb. 5.15: Die Auftrennung positiver TMAE Fraktionen auf Heparin-Sepharose

A) Elutionsprofil der 5 ml Heparin-Sepharose Säule im Salzgradienten 50 mM - 800 mM KCl. Die durchgehende Linie gibt die Proteinelution wieder. Die gepunktete Linie stellt den Salzgradienten dar. Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt.

B) Retentionsgel der Fraktionen HS1-11. Pro Fraktion wurden 5 µl in die Reaktion eingesetzt. Als unspezifischer Kompetitor wurden jedem Ansatz 1 µg PolyDIdC zupipettiert.

5.1.5.12 Affinitätsreinigung der positiven Probe HS5

1 ml der stark positiven Probe HS5 wurde auf eine 50 μ l Streptavidinsäule mit gebundenem Oligo A5 appliziert und nach dreimaligem Waschschrift mit Bindungspuffer + 0,005 % Nonidet P-40 in 6 Stufen (200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM, 1M und 2M KCl in Bindungspuffer + 0,005 % Nonidet P-40) zu je 4 X 100 μ l eluiert. 10 μ l der 6 Elutionsstufen wurden im Retentionsgel getestet, wobei das 400 mM - Eluat Bindungsaktivität zeigte. Die Retentionsbande war aber im Vergleich zur Ausgangsprobe von geringerer Intensität, was vermuten ließ, daß eine Aufreinigung und Elution nur zu einem geringen Grad stattgefunden hatte. Allerdings konnte weder in der Durchlaufraktion noch im Waschschrift Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Ebenso waren in den restlichen Elutionsstufen keine Banden zu erkennen (Abb. 5.16).

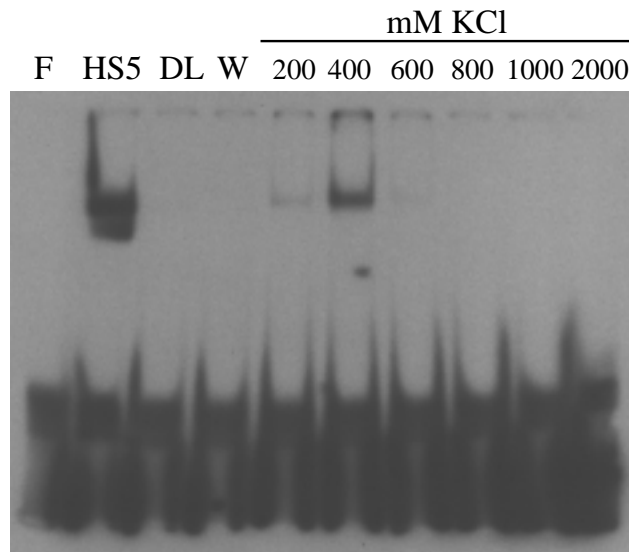


Abb. 5.16: Retentionsgel der Affinitätssäule

Je 10 μ l der eluierten Fraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden in die Reaktion eingesetzt. Als unspezifischer Kompetitor wurde 1 μ g PolydIdC zu jedem Ansatz pipettiert. F = freies Oligo ohne Proteinbindung; HS5 = positive Probe aus der Heparin-Sepharose Säule; DL = Durchlauf bei der Applikation auf die Säule; W = Waschschrift.

5.1.5.13 Retentionsanalyse mit reinen Kernextrakten

Da die vorangegangenen Chromatographie-Schritte nicht zur Isolierung des gesuchten Proteins geführt hatten, wurden erneut Kernextrakte aus Skelettmuskelkernen hergestellt und im Retentionsgel untersucht. Das Kernpellet aus 200 ml Homogenat wurde dabei in 1 ml Bindungspuffer + 420 mM KCl für eine Stunde auf Eis extrahiert. Als Positivkontrolle diente bei den Retentionsanalysen die Bindungssequenz des ubiquitären Transkriptionsfaktors Sp1 (Briggs *et al.*, 1986; Kadonaga *et al.*, 1987). Zusätzlich wurde rekombinantes Sp1-Protein als Vergleich eingesetzt. Zunächst zeigten sich für das Oligo A5 und für das Oligo Sp1 Retentionsbanden in gleicher Höhe und Intensität. Die Retentionsbande für das rekombinante Protein Sp1 war allerdings wesentlich höher zu sehen (Abb. 5.17A). Auch bei Dialyse der Kernextrakte gegen Bindungspuffer zur Verringerung der Salzkonzentration konnte keine Sp1-Retentionsbande in der Höhe des Vergleichsproteins erhalten werden. Weiters war die Intensität der Retentionsbanden bei Sp1 nicht durch den Chelator EDTA (100 μ M, 400 μ M und 1000 μ M) zu beeinflussen, dies sollte aber der Fall sein, da Sp1 ein Zinkfingerprotein ist, dem durch EDTA die Zinkionen entzogen werden. Durch Zugabe von *E. coli*-DNA als unspezifischen Kompetitor verschwanden die Banden im Retentionsgel sowohl bei Oligo A5 als auch bei Oligo Sp1. Die Zugabe von PolydIdC beeinflusste die Bindungsaktivität in beiden Fällen nicht. Eine spezifische Bindungsaktivität für Sp1 konnte in diesen Kern-Extrakten nicht nachgewiesen wer-

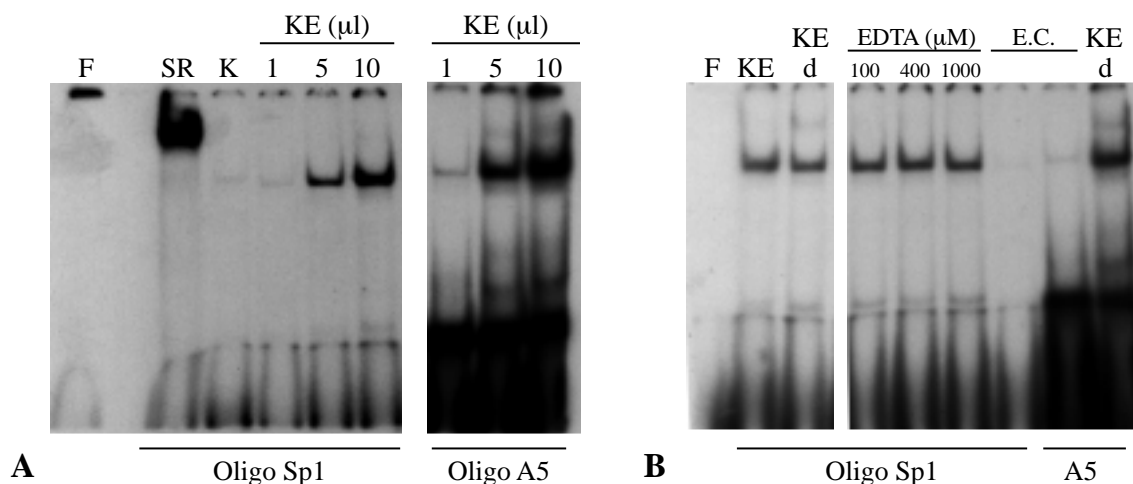


Abb. 5.17: Retentionsgel der 420 mM Kernextrakte

A) Unterschiedliche Mengen von 420 mM Kernextrakt (KE) wurden mit den beiden Oligos Sp1 und A5 getestet. B) Je 10 μ l dialysiertes Kernextrakt wurde mit Oligo Sp1 und Oligo A5 im Retentionsgel getestet. Bei beiden Oligonukleotiden wurden zusätzlich 100 ng *E. coli*-DNA als unspezifischen Kompetitor untersucht (E.C.), Retentionsreaktionen mit Oligo Sp1 wurde zudem mit verschiedenen Mengen EDTA versetzt. Als unspezifischer Kompetitor wurde (außer beim Versuch mit *E. Coli*-DNA) 1 μ g PolydIdC zugegeben. F = freies Oligo Sp1 ohne Proteinzugabe; SR = rekombinantes humanes Sp1 (1 μ g); K = 1 μ l Kernextrakt ohne Zusatz von PolydIdC; KE = Kernextrakt; KE d = dialysiertes Kernextrakt; E.C. = Zugabe von 100 ng *E. coli*-DNA.

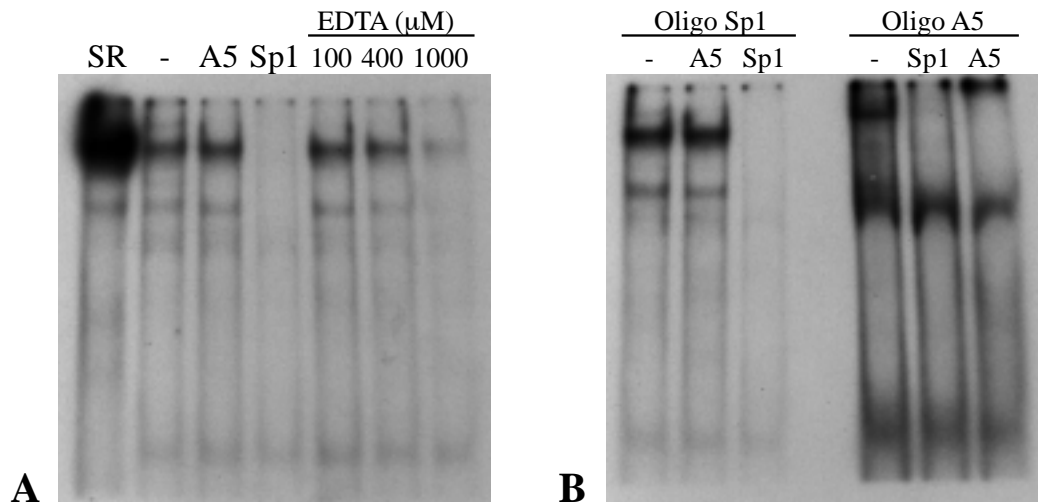


Abb. 5.18: Retentionsanalyse mit Kernextrakten und Oligo Sp1 sowie Oligo A5

A) Je 10 µl Kernextrakt wurden mit Oligo Sp1 inkubiert und die Bindung durch verschiedene Kompetitoren beeinflusst. SR = 1 µg humanes rekombinantes Sp1. Es wurden 2 pmol unmarkiertes Oligo A5 als unspezifischer Kompetitor und 2 pmol unmarkiertes Oligo Sp1 als spezifischer Kompetitor verwendet. B) Je 10 µl Kernextrakt wurden in Retentionsversuche mit markiertem Oligo Sp1 und markiertem Oligo A5 eingesetzt. Die unspezifische Competition erfolgte mit 2 pmol des jeweils anderen, unmarkierten Oligonukleotids, die spezifische Competition mit 2 pmol des jeweiligen unmarkierten Oligonukleotids.

den, da es möglicherweise in zu verdünnter Form vorlag (Abb. 5.17B). Aus diesem Grund wurden Kernextrakte präpariert, die in nur 100 µl Bindungspuffer + 420 mM KCl extrahiert wurden. In Retentionsgelen mit diesen Extrakten konnten Banden in der Höhe der Retentionsbande des rekombinanten Proteins beobachtet werden. Diese Retentionssignale ließen sich durch Zugabe von EDTA (100 µM, 400 µM und 1000 µM) abschwächen. Die Zugabe von nicht markiertem Oligo A5 zeigte keinen Einfluß auf die Bindungsaktivität. Durch Zusatz von nicht markiertem Oligo Sp1 konnte die Bande vollständig kompetitiert werden (Abb. 5.18A). Das ließ den Schluß zu, daß durch Verringerung des Extraktionsvolumens auf 100 µl der Transkriptionsfaktor Sp1 in ausreichender Menge aus isolierten Kernextrakten gewonnen werden konnte, um in Retentionsgelen als Bande aufzutreten. Wurden dieselben Kernextrakte zur Analyse des Oligos A5 verwendet, konnte keine spezifische Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Entweder verschwand die Bande bei Zugabe von Oligo Sp1 als unspezifischen Kompetitor oder sie blieb auch bei Zugabe von nicht markiertem Oligo A5 als spezifischen Kompetitor erhalten (Abb. 5.18B).

Dies führte zu dem Schluß, daß die Bindungsaktivitäten für das Oligo A5 bei Gesamtzellextrakten und rohen Kernextrakten wahrscheinlich durch Interaktion eines unspezifischen Proteins hervorgerufen wurden. Dieses Protein konnte durch PolydIdC nicht kompetitiert werden. In reinen Kernextrakten konnte keine Bindungsaktivität für ein spezifisches Protein nachgewiesen werden. Ist ein Transkriptionsfaktor vorhanden, so liegt

dessen Konzentration unter der Nachweisgrenze des Retentionsgels und eine Aufreinigung im großen Maßstab schien daher unpraktikabel.

5.2 Isolierung von Zinkfinger-Motiven mittels PCR

5.2.1 Touch-Down PCR auf den Phagenpools der porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank

Da es Hinweise darauf gab, daß der an das Oligo A5 bindende Transkriptionsfaktor ein Zinkfinger Protein sein könnte und im Schwein zudem nur sehr wenige Zinkfingersequenzen bekannt sind (11 Einträge über porcine Zinkfinger Proteine in der GenBank Datenbank), wurde versucht, Zinkfinger Sequenzen mittels PCR aus der Skelettmuskel cDNA Bank zu isolieren. Die Primersequenz des Vorwärts-Primers (ZF-deg) wurde durch den Vergleich mehrerer humaner Zinkfinger Sequenzen und ihrer Verbindungsregion, dem H/C Linker, erstellt. Diese Linkerregion ist in den meisten klassischen Zinkfinger Proteinen hoch konserviert und kodiert für die Aminosäuren T G E K P Y E/K (Schuh *et al.*, 1986). Zusätzlich wurde die isolierte Sequenz des Zinkfinger-Proteins aus *S. cerevisiae* miteinbezogen. Der resultierende Primer enthielt die H/C Linker Aminosäuren T G E K P sowie zwei Aminosäuren des Zinkfingers ZF1 aus *S. cerevisiae* (T H). In fünf Triplets traten in der Primersequenz alternative Basen in der dritten Position auf, sodaß unterschiedliche Basenkombinationen für die gleiche Aminosäure berücksichtigt wurden (Abb. 5.19). Der reverse Primer (pBK-CMVT7) entsprach der T7 Promotor-Sequenz im 3'-Bereich der Klonierungsstelle von pBK-CMV. Der 3'-Bereich wurde gewählt, da viele Zinkfinger motive am C-terminalen Ende der Proteine gefunden wurden (Abrink *et al.*, 1995) und der zu amplifizierende Teil relativ klein gehalten werden sollte. Als Matrizen DNA dienten die DNA-Pools der porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank.

Da durch Amplifikation bei Standardbedingungen (30 Zyklen und 65 °C Annealing-Temperatur) kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte, wurde eine spezielle Methode der PCR angewandt, wobei die Annealing Temperatur über 30 Zyklen schrittweise von 70 °C auf 42 °C gesenkt wurde. Dadurch amplifizierten in den Plattenpools D, E, F, G, H und I spezifische Produkte (D: 250 bp, E: 250 bp, F: 500 bp, G: 700 bp, H: 190 bp I: 900 bp)(Abb. 5.20A). Die PCR-Banden wurden ausgeschnitten, aus der Agarose eluiert, kinasiert und in die *SmaI* Schnittstelle des Vektors pGEM-4Z kloniert. Nach Schnellaufschluß und Sequenzierung konn-

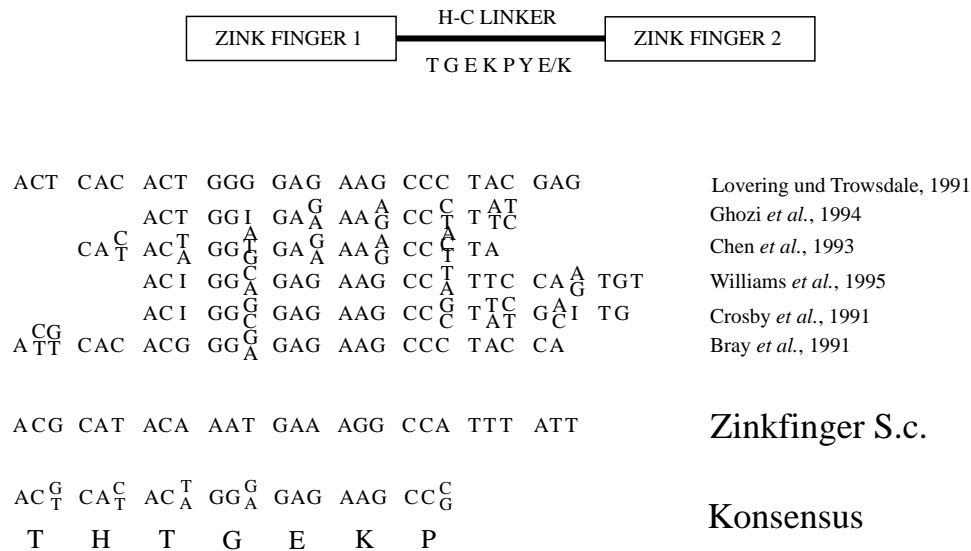
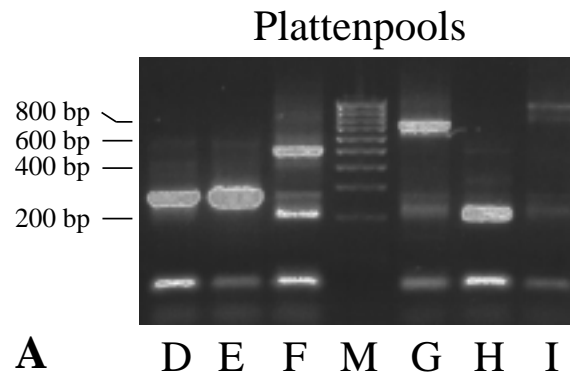


Abb. 5.19: Primer Design zur Isolierung von Zinkfinger Sequenzen

Sechs publizierte Konsensussequenzen für den H/C Linker in klassischen Zinkfingermotiven wurden verglichen und die Linkersequenz des isolierten Zinkfingerproteins aus Hefe miteinbezogen. Aus der erhaltenen Sequenz wurde ein degenerierter Primer (ZF-deg) konstruiert.

ten in den Fragmenten F, G, H und I Zinkfingersequenzen nachgewiesen werden (Abb. 5.20B). Die Klone pZF-F4 und pZF-G5 enthielten Sequenzen mit je drei klassischen Zinkfingermotiven (C2H2), konnten aber bei Vergleich in der GenBank Datenbank keinen bekannten Genen zugeordnet werden. pZF-F4 zeigte allerdings signifikante Homologien mit Sequenzen aus einem Cosmid des humanem Chromosoms 19. Das Fragment aus pZF-I4 wurde als Teil des porcinen OZF - Gens identifiziert. Dieses Gen ist bereits bei Mensch (Le Chalony *et al.*, 1994), Maus (Acc. Nr. AJ 224763), Rind (Le Chalony *et al.*, 1996) und Zebrafisch (Acc. Nr. AA 494709) bekannt. Der Klon pZF-H17 zeigte starke Homologien zum 3'-UTR des FHL1-Gens (Four and a half LIM domain 1). Dieses Gen kodiert für ein Protein mit 1 GATA ähnlichen Zinkfinger und 4 LIM Domänen und ist beim Menschen sehr gut charakterisiert (Morgan und Madgwick, 1996; Lee *et al.*, 1998a), aber auch bei der Maus (Taniguchi *et al.*, 1998; Morgan und Madgwick, 1999b), der Ratte (Acc. Nr. AF 134773) und dem Zebrafisch (Morgan und Madgwick, 1999b) beschrieben. Das Gen ist zwischen den Spezies sehr stark konserviert und wird im Skelettmuskel hoch exprimiert.

Auf Grund dieser Tatsache wurde in Folge dieses Gen weiter charakterisiert.



Klon	bp	Zinkfinger	Homologie	Referenzen
pZF-F4	352 bp	3 C2H2	hum. Chr. 19	GenBank Acc. Nr. AC004262
pZF-G5	747 bp	3 C2H2	unbekannt	
pZF-H17	180 bp	keiner, 3' UTR	FHL1	Lee <i>et al.</i> , 1998
pZF-I4	814 bp	6 C2H2	OZF	Ferbus <i>et al.</i> , 1996

B

Abb. 5.20: Touch-Down PCR auf den Plattenpools der porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank
A) Über PCR mit den Primern ZF-deg und pBK-CMVT7 konnten in den Plattenpools D - I spezifische Produkte amplifiziert werden. 20 µl der jeweiligen PCR wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. M = Marker
B) Die PCR Produkte wurden kloniert, sequenziert und mit den Eintragungen in der GenBank Datenbank verglichen. Die Sequenzen aus den Plattenpools F, G, H und I wiesen Homologien mit Zinkfinger Sequenzen auf.

5.3 Isolierung und molekulare Charakterisierung des porcinen *FHL1* Gens

5.3.1 Isolierung der *FHL1* cDNA

Das klonierte Fragment aus pZF-H17 wurde dazu verwendet, den cDNA - Phagen aus dem entsprechenden Plattenpool der cDNA-Bank zu isolieren. Dazu wurde das Plasmid pZF-H17 zunächst retransformiert und aus 8 Klonen Schnellaufschlüsse gemacht. Die isolierten DNAs wurden vereinigt und 30 µl Schnellaufschluß-DNA mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *XhoI* gespalten. Durch Verwendung des Enzyms *XhoI* wurden die restlichen Vektorsequenzen der Phagenarme, die durch die PCR amplifiziert worden waren, abgespalten. *PstI* spaltet in der Multiple Cloning Site des Vektors pGEM-4Z kurz nach der *SmaI* Schnittstelle. Die Fragment-

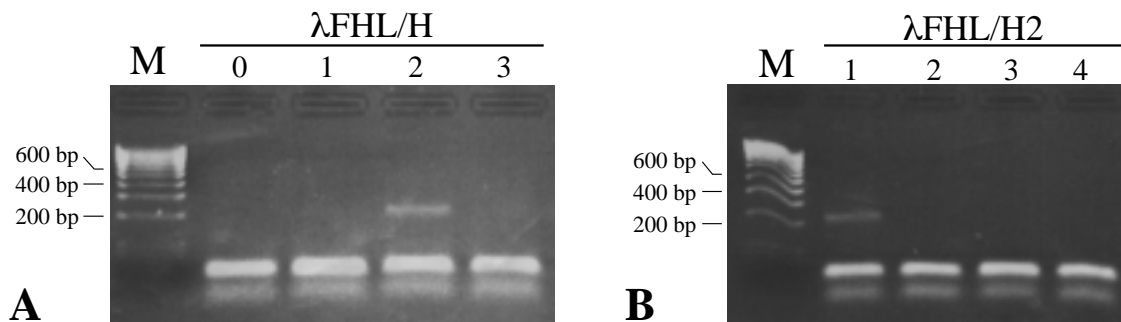


Abb. 5.21: PCR auf den positiven Phagen der Hybridisierung mit pZF-H17

A) Je 10 μ l der Phageneluat λ FHL/H0-3 wurden in die PCR eingesetzt und anschließend 20 μ l auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. M = Marker
 B) Je 10 μ l der Phageneluat λ FHL/H2.1-4 wurden in die PCR eingesetzt und anschließend 20 μ l auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. M = Marker

bande wurde aus einem präparativen Gel ausgeschnitten und mit QIAEX II eluiert. Diese präparierte DNA diente als Sonde für die nicht radioaktive Hybridisierung mit dem ECL-System.

Von einer konfluenten Phagenplatte, sowie der entsprechenden 10^{-1} Verdünnung des Pools H wurden einfache Filterabzüge genommen und mit der Sonde pZF-H17 hybridisiert. Nach Exposition auf Röntgenfilm konnten 3 positive Bereiche (λ FHL/H1-3) ausgestochen und eluiert werden. Zusätzlich wurde noch ein Bereich ausgestochen, der kein positives Signal enthielt (λ FHL/H0). Dies diente als negative Kontrolle in der folgenden PCR, die auf 10 μ l der Eluate mit den Primern ZF-deg und pBK-CMVT7 durchgeführt wurde. Nur im Eluat λ FHL/H2 trat ein PCR Produkt auf (Abb. 5.21A). Daher wurde diese Phagenlösung für die weitere Hybridisierung verwendet. Zwei Filter der Phagenplatten mit den Verdünnungen 10^{-1} und 10^{-2} wurden erneut mit der Sonde pZF-H17 hybridisiert und anschließend vier positive Einzelphagen-Plaques ausgestochen (λ FHL/H2.1 - H2.4). Wieder wurden die Phageneluat mittels PCR getestet und ein positives Signal in der Probe λ FHL/H2.1 nachgewiesen (Abb. 5.21B). Der Vektor pBK-CMV mit dem enthaltenen Insert wurde mit Hilfe des Helferphagen Ex-Assist aus den Phagenarmen geschnitten und in SOLR Bakterien transformiert. 6 Spaltungen der Schnellaufschlüsse von Klonen zeigten alle ein Insert von etwas über 500 bp. Der Klon pFHL/H600-3 wurde schließlich von beiden Seiten sequenziert. Die Sequenz enthielt 518 bp der 3'-UTR-Sequenz des porcinen *FHL1* Gens. Im Vergleich zur humanen Sequenz ist das Polyadenylierungssignal (AATAAA) konserviert und der Bereich 1098 - 1331 relativ zur humanen Sequenz hoch homolog (Abb. 5.22).

Um die gesamte cDNA zu isolieren wurden aus dem 5'-Bereich des Klons pFHL/H600-3 zwei Primer (FHL1 und FHL2; Abb. 5.22) gewählt und erneut PCR auf den Plattenpools der cDNA-


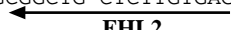
781	TTATTGTTTT	TAATTAATAT	TTTTGTTTTA	ATTGATAGCA	AAATAGTTTA	TGGGTTTGGG	840
1					TGGGTTTGGG	GACTTGCATG	20
							
841	AACTTGCATG	AAAATATTTT	AGCCCCCTCA	GATGTTCTCTG	CAGTGCTGAA	ATTCATCCTA	900
21	AGAATGTTTT	CGCCCCCTCA	GACGTTCTCTG	CGGTTTTGCA	ATTTACCCTC	CAGAAGTAAC	80
901	CGGAAGTAAC	CGCAAAACTC	TAGAGGGGGA	GTTGAGCAGG	CGCCAGGGCT	GTCATCAACA	960
81	CATAAAACCT	GAGAGGGGCA	GGTGAGCAGG	TGCCAGGACT	GTCACTGACA	TGGACATGCC	140
961	TGGATATGAC	ATTTCACAAAC	AGTGACTAGT	TGAATCCCTT	GTAACGTAGT	AGTTGTCTGC	1020
141	GTTTCCAGAC	ATGGCAGAGT	GGGCTTCCCC	CTAACCCTCG	GCGGCGGCTG	CTCTTGTGAG	200
							
1021	TCCTTGTCCA	TGTGTTAATG	AGGACTGCAA	AGTCCCTTCT	GTTGTGATTC	CCAGGACTTT	1080
201	TCCTTAGGACC	GTTCCCTCAAG	AGCTTACAGC	TGGATCGCTG	GGGGAGCGGG	GAGGCCACGG	260
1081	TCCTCAAGAG	GAAATCTGGA	TTTCCACCTA	CCGCTTACCT	GAAATGCAGG	ATCACCTACT	1140
261	TCCCAGCAGG	CAGAACCAGG	TGTCCACGTA	GCGCTTACCT	GAGACGCAGG	AGCACCTCCT	320
1141	TACTGTATTC	TA_C_AT__T	ATTATATGAC	ATAGTATAAT	___GAGACAA	_TATCAAAAG	1192
321	TACTGTATTC	TAGCTACT	GTTATATTAC	ATAGCATA_T	CCCCGAGACGA	CT_TCAAGAG	378
1193	TAAACATGTA	ATGACAATAC	ATACTAACAT	TCTTGTAGGA	GTGGTTAGAG	AAGCTGATGC	1252
379	TACACACGTA	ATGACAGCGC	GTATTAACAT	TCTCGTAGGA	GTGGTTAGAG	AAGCCGAAGC	438
1253	CTCATTCTTA	CATTCTGTCA	TTAGCTATTA	TCATCTAACG	TTTCAGTGTA	TCCTTACAGA	1312
439	CTCATTGCTA	CATTTTGTCA	TTAGCTTTGA	TCATCTAACG	TTTCAGTGTA	TCCTTACGGA	498
1313	AATAAA GCAG	CATATGAAT					1331
499	AATAAA GCAG	CATATAAAG					518

Abb. 5.22: Alignment der Sequenzen aus pFHL/H600-3 mit dem 3'-UTR der humanen FHL1 cDNA

Die beiden Sequenzen (hum. = obere Reihe; porc. = untere Reihe) wurden mit dem Programm COMPARE verglichen. Die Nummerierung der humanen Sequenz entspricht dem gesamten 3'-UTR (1 = TAA; Stopcodon des offenen Leserahmens), die Nummerierung der porcinen Sequenz entspricht der Länge des sequenzierten Klon. Gleiche Basen sind durch Querbalken gekennzeichnet, Lücken durch einen Strich markiert. Das Polyadenylierungssignal (Box) ist in Schwein und Mensch konserviert. Durch Pfeile sind die Primer angegeben, die für das weitere Screening der Phagenpools verwendet wurden.

Bank durchgeführt. Es zeigte sich in allen Proben ein positives Signal, das der Größe des PCR-Produkts (202 bp) aus dem ursprünglichen Klon pFHL/H600-3 entsprach. Es wurde der Plattenpool F ausgewählt, konfluent ausplattiert und ein Filterabzug genommen. Die Membran wurde mit dem 202 bp PCR-Produkt als Sonde hybridisiert und 4 Phagenbereiche ausgestochen (λ FHL/F1 - 4). Auf den Eluaten wurden PCRs mit den Primern FHL2 und pBK-CMVT3 durchgeführt. Die Sequenz von pBK-CMVT3 liegt auf dem Phagenarm 5' der Klon-

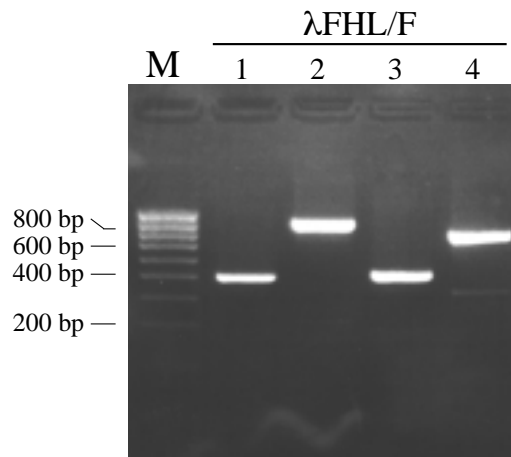


Abb. 5.23: PCR auf den Phageneluaten λ FHL/F1-4

Für die PCR auf den Phageneluaten λ FHL/F1-4 wurden die Primer FHL2 und pBK-CMVT3 verwendet. Je 20 μ l der Reaktionen wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Das PCR-Produkt im Eluat λ FHL/F2 enthielt das längste Fragment mit etwa 800 bp.

ierungsstelle und es konnte auf diese Weise das längste cDNA-Insert unter den eluierten Phagen ermittelt werden. Das Phageneluat λ FHL/F2 zeigte das längste PCR Produkt mit etwa 800 bp (Abb. 5.23) und wurde deshalb in den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} ausplattiert. Durch erneute Hybridisierung mit der 202 bp - Sonde konnte ein Einzelphage (λ FHL/F2.1) ausgestochen und als Plasmid kloniert werden. Der Klon pFHL/F1200-5 wurde sequenziert. Das Insert umfaßte 1139 bp und enthielt neben den bereits bekannten Sequenzen aus pFHL/H600-3 noch weitere 622 bp aus dem 3'-UTR des porcinen *FHL1* Gens. Im Vergleich mit dem 3'-UTR des menschlichen Gens lag das 5'-Ende des Klons etwa 200 bp vom Stop-Codon des offenen Leserahmens entfernt. Verglichen mit der humanen Sequenz zeigte sich auch in diesem Abschnitt des Gens ein sehr hoher Grad an Homologie (Abb. 5.24). Betrachtet man den gesamten 3'-UTR liegt die Identität zwischen Mensch und Schwein bei 64 %.

Aus der bekannten Sequenzinformation der Klone pFHL/H600-3 und pFHL/F1200-5 wurden erneut Primer gebildet (FHL3 und FHL4; Abb. 5.24), um die Plattenpools nach neuen cDNA-Klonen zu durchmustern. Alle Plattenpools zeigten positive Signale (293 bp) in unterschiedlicher Intensität. Die stärksten Banden traten in den Pools B, C und D auf und es wurde daraufhin Pool B für weitere Untersuchungen ausgewählt. Von zwei Verdünnungsstufen (10^{-1} und 10^{-2}) wurden Filterabzüge genommen und mit dem 293 bp PCR-Produkt als Sonde hybridisiert. Aus beiden Platten wurden insgesamt 10 Phagenbereiche ausgestochen und eluiert (λ FHL/B1-10). Über PCR mit den Primern FHL4 und pBK-CMVT3 konnte das Eluat λ FHL/B9 als der längste Klon mit einer zusätzlichen Sequenzinformation von etwa 1200 bp identifiziert werden. Das Phageneluat wurde in den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} aus-

plattiert, Filter genommen und erneut mit der 293 bp Sonde hybridisiert. Daraufhin konnte der positive Einzelphage λ FHL/B9-1 ausgestochen, eluiert und exzisiert werden. Die erhaltenen Klone trugen ein Insert von etwa 2200 bp Länge. Die Inserts wurden mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Hind*III gespalten, die Subfragmente kloniert und sequenziert. Dadurch konnte ein offener Leserahmen von 840 bp und der 3'-UTR des porcinen *FHL1*-Gens mit 1345 bp ermittelt werden. Das in Mensch und Maus beschriebene Startcodon befindet sich an Position 19, sehr nahe am 5'-Ende des Klon, und zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der Konsensussequenz für einen Translationsstart (RCCAUGG; (Kozak, 1996)). Das Stopcodon TAA wurde an Position 858 identifiziert. Demnach kodiert dieser offene Leserahmen für ein Protein mit 280 Aminosäuren. An Position 2184 liegt ein Polyadenylierungssignal (AATAAA), dem 14 bp stromabwärts der PolyA-Tail folgt (Abb. 5.25).

5.3.2 Das porcine FHL1 Protein

Die vorhergesagte Aminosäuresequenz für das porcine FHL1, ausgehend vom ersten ATG der isolierten cDNA, umfaßt 280 Aminosäuren. An Sequenzmotiven sind ein GATA-ähnlicher Zinkfinger am N-Terminus und 4 LIM Domänen vorhanden. Die LIM-Domänen sind jeweils durch 8 Aminosäuren voneinander getrennt. Das entspricht den für das humane und murine FHL1 Protein beschriebenen Motiven. Betrachtet man die Zusammensetzung an Aminosäuren, ist ein überdurchschnittlich hoher Anteil an der basischen Aminosäure Lysin (12,5 %) und an Cysteinen (11,5 %) zu beobachten. Das theoretische Molekulargewicht liegt bei MW = 33,6



Abb. 5.25: Die cDNA des porcinen *FHL1* Gens

Schematische Darstellung der isolierten porcinen cDNAs. Der offene Leserahmen ist durch eine schwarze Box dargestellt, die Linien zeigen den 5'- und 3'- UTR. Darunter ist die Lage und Größe der sequenzierten Klone gezeigt. Die Restriktionskarte gibt die Lage der verwendeten Restriktionsenzyme wieder.


```

FHL1sus/LIM1  CVECRKPIG---ADSKEVHYKNRYWHDTCFRCSKCLHPLANETFMAKDNKILCNKC
FHL1sus/LIM2  CKGCFKPIV---AGDQNVEYKGTVWHKDCFTCSNCKQVIGTGSFFPKGEDFYCVTC
FHL1sus/LIM3  CVKCNKAIT-----SGGITYQDQPWHAECFVCVTCSKKLAGQRFTAVEDQYYCVDC
FHL1sus/LIM4  CAGCKNPITGFGKGSSVVAYEGQSWHDYCFHCKKCSVNLANKRFVFHQEQVYCPDC

```

* * + + * + + * ** ** * * + + * + * *

CX₂CX₃IX₆₋₁₁YX₄WHXCFXCX₂CX₈CX₂C

Abb. 5.26: Vergleich der vier LIM Domänen im porcinen FHL1 Protein

Die Aminosäuresequenzen der vier LIM Domänen im porcinen FHL1 Protein wurden miteinander verglichen und eine Konsensussequenz definiert. Ein * bezeichnet identische Aminosäuren in allen vier Domänen, ein + Aminosäuren, die in mindestens drei der vier Domänen vorhanden sind. Die fettgedruckten C und H zeigen die konservierten Cysteine und Histidine des LIM-Motivs.

kDa und das Protein besitzt einen vorhergesagten isoelektrischen Punkt von pI = 8,7.

Vergleicht man die vier LIM Domänen des porcinen FHL1 Proteins miteinander, so können neben den Zink-komplexierenden Cysteinen und dem Histidin (C2HC/C4) noch weitere konservierte Aminosäuren festgestellt werden. Die Konsensussequenz für die LIM Domänen im porcinen FHL1 Protein lautet demnach: **C-X₂-C-X₃-I-X₆₋₁₁-Y-X₄-W-H-X-C-F-X-C-X₂-C-X₈-F-X₈-C-X₂-C** (Abb. 5.26).

Ein Vergleich der einzelnen LIM-Domänen mit LIM-Proteinen außerhalb der Gruppe der FHL Proteine zeigt die höchsten Identitäten mit Proteinen, welche an Focal Adhesion Plaques lokalisiert wurden, wie z. B. Zyxin, Paxillin, UNC-97 und CRP (Sadler *et al.*, 1992; Salgia *et al.*, 1995; Beckerle, 1997).

5.3.3 5'-RACE PCR zur Identifizierung des 5'-UTR

FHL1 cDNA-Sequenzen, die von Maus und Mensch in der GenBank Datenbank abgelegt sind, haben längere 5'-UTRs als der isolierte cDNA Klon vom Schwein. Beim Menschen ist dieser Bereich 84 bp lang, bei der Maus 136 bp. Es wurde daher auf isolierter Skelettmuskel-RNA mittels 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) untersucht, ob der 5'-UTR beim Schwein ebenfalls eine entsprechende Länge aufweist.

1 µg mRNA wurde aus dem Skelettmuskel eines 4 Wochen alten Ferkels (Deutsche Landrasse) präpariert und eine 5'-RACE-Reaktion mit Hilfe des Marathon cDNA Amplification Kits und des Advantage 2 PCR Enzyme Systems durchgeführt. Für die erste der beiden PCR-Schritte wurde ein genspezifischer Primer (FHL-R) 570 bp vom beschriebenen Startcodon entfernt gewählt. Nach der ersten PCR konnte in den beiden Verdünnungsstufen 1:50 und 1:250 der Adaptor-cDNA eine Bande bei etwa 700 bp im Agarosegel identifiziert werden (Abb. 5.27A).

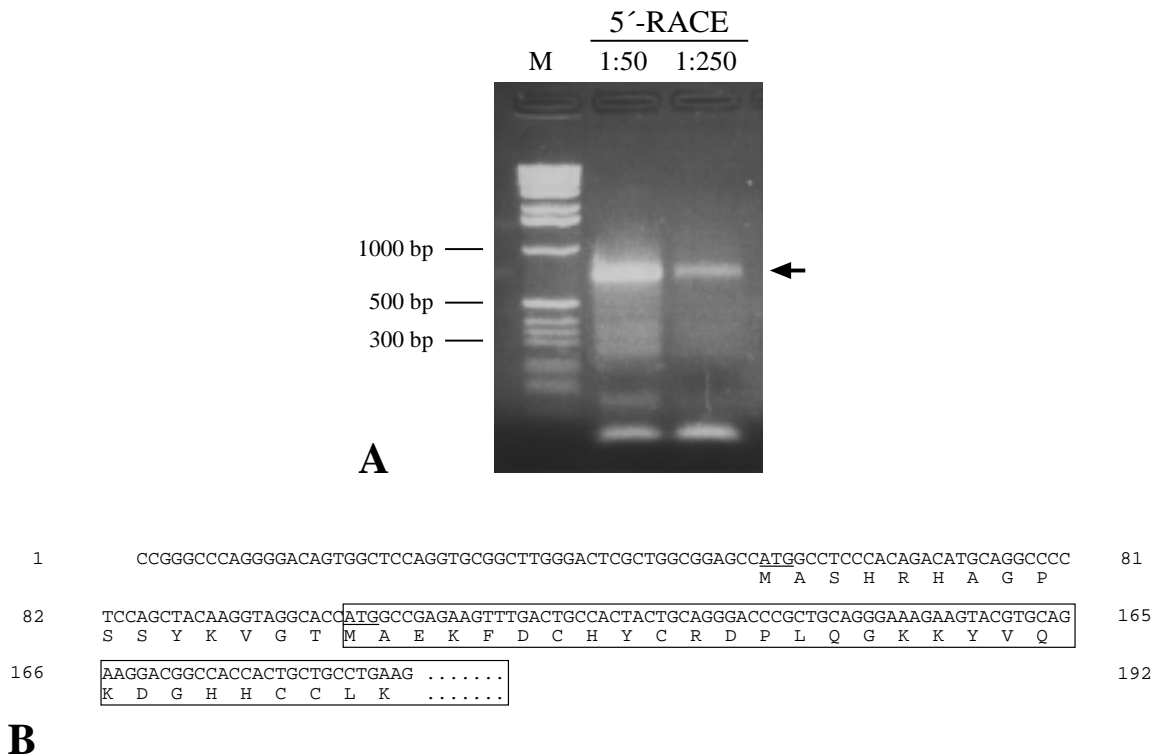


Abb. 5.27: RACE-PCR auf isolierter porciner Skelettmuskel-RNA

A) Die gebildete Skelettmuskel cDNA wurde 1:50 und 1:250 verdünnt, 5 µl davon wurden in die PCR mit den Primern FHL-R und AP1 eingesetzt. 5 µl der PCR Reaktion wurde auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen, der Rest wurde weiter verdünnt und einer zweiten PCR mit den Primern FHL-NR und AP2 unterzogen. Das Produkt wurde kloniert und sequenziert. Das Bild zeigt das Ergebnis der ersten PCR, der Pfeil markiert das Hauptsignal bei etwa 700 bp.

B) Sequenzanalyse und Translation des RACE-Produkts. Die Sequenzen in der Box zeigen die bereits in anderen Spezies beschriebenen Aminosäuren des FHL1 Proteins. Die beiden Startcodons sind unterstrichen. Die Nummerierung bezieht sich auf die Sequenz des RACE-Klons.

Es wurde eine zweite PCR mit einem weiteren genspezifischen Primer (FHL-NR) 71 bp vom ATG entfernt angeschlossen. Im Agarosegel konnte eine stark ausgeprägte Bande bei etwa 200 bp identifiziert werden. Die Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in pGEM-4Z kloniert und sequenziert. Die Analyse der Sequenzdaten zeigte nach Entfernen der Adaptor- und Vektorsequenzen ein 175 bp Fragment mit einem 102 bp langen 5'-UTR. Interessanterweise konnte innerhalb dieser Sequenz ein weiteres ATG 48 bp stromaufwärts des beschriebenen Initiator-ATGs identifiziert werden. Das Codon liegt im offenen Leserahmen des FHL1-Proteins und die Sequenz (GCCATGG) folgt den Regeln der Konsensussequenz für einen starken Translationsstart (Kozak, 1996). Dadurch wird der offene Leserahmen um 16 Aminosäuren am N-Terminus verlängert werden. Diese zusätzlichen 16 Aminosäuren ergaben beim Vergleich in der SWISSPROT Datenbank keine Homologien mit bereits bekannten Sequenzeinträge. Es handelt sich also nicht um ein bekanntes Proteinmotiv mit funktioneller Bedeutung (Abb. 5.27B).

Diese auffälligen Sequenzabweichungen im 5'-Bereich zwischen Schwein und Mensch/Maus führten zu einem genaueren Vergleich dieses Abschnittes mit publizierten cDNAs von FHL1. Es stellte sich heraus, daß alle drei Spezies bis 28 bp stromaufwärts des beschriebenen ATGs (MAEK.....) eine auffällig hohe Homologie auf cDNA Ebene aufweisen, ähnlich den Sequenzen aus den Protein-kodierenden Abschnitten der cDNA. Weiter stromaufwärts der cDNA Sequenzen bricht die Homologie zwischen Schwein und Mensch/Maus völlig ab. Vergleicht man allerdings die 5'-Sequenzen von Mensch und Maus getrennt ist noch weiter stromaufwärts eine große Sequenzidentität festzustellen (Abb. 5.28).

		M A S H R
sus sTCCAGGTGCGGCTTGGGACTCGCTGGCGGAGCC <u>AT</u> GGCCTCCCACA	
homo sAGG-TA-C-AAGCCTTTG-C--AATA-ATCCTATCTG--A-A--TC	
mus mAA-T---AGCTG--CTTAGCT-TGCC-AGTC-TTCT-GAA-A--TC	
homo s	--CAAGGATATCCAAGCCTTTGCCCGAATA	<u>CATCCTATCTGCCACACATC</u>
mus m	GGGC-ACTGG-AGCT-TTC--AG-TGTGCC	--GT-CT----GA-----
		H A G P S S Y K V G T M A E K F
sus s	GACATGCAGGCCCTCCAGCTACAAGGTAGGCACCC <u>AT</u> GGCCGAGAAGTTT	
homo s	C-GCGTG---T-----G-----G-----	
mus m	CTGTGTG---T-----T-----G-----T-G-----C	
homo s	<u>CAGCGTGAGGTCCCTCCAGCTACAAGGTGGGCACCC</u>	<u>ATGGCCGAGAAGTTT</u>
mus m	-T-T-----T-----	---T-----C
		D C H Y C R D P L Q G K K
sus s	GACTGCCACTACTGCAGGGACCCGCTGCAGGGAAGAAGT	
homo s	-----CT-----G-----	
mus m	-----T-G-----CT-----G-----	
homo s	GACTGCCACTACTGCAGGGATCCCTTGCAGGGAAGAAGT	
mus m	-----T-G-----C-----	

Abb. 5.28: Vergleich der FHL1 5'-UTRs

Die publizierten 5'-UTR Regionen aus Mensch (homo s) und Maus (mus m) wurden mit der durch 5'-RACE amplifizierten Sequenz des Schweins (sus s) verglichen. Zudem erfolgte ein weiterer Vergleich zwischen den beiden Sequenzen aus Mensch und Maus. Die Startcodons sind unterstrichen, homologe Bereiche außerhalb der Protein-kodierenden Sequenzen für FHL1 in allen drei Organismen in einer grauen Box dargestellt, homologe Bereiche zwischen Mensch und Maus sind durch eine weiße Box abgebildet. Die Aminosäuresequenz wird oberhalb der cDNA-Sequenz angegeben. Gleiche Basen sind durch einen Strich dargestellt, divergierende Basen sind jeweils angegeben.

5.3.4 In FHL1 cDNAs sind zwei Arten von 5'-UTRs zu finden

Aufgrund der Ergebnisse des Sequenzvergleichs im 5'-UTR wurde überprüft, ob die Unterschiede in den 5'-Sequenzen möglicherweise durch alternative Splice-Prozesse entstehen können. Dazu wurden die ersten 50 Basen der Protein-kodierenden Sequenz der humanen FHL1 cDNA mit Einträgen in der dbEST-Datenbank verglichen. Es stellte sich heraus, daß in der Tat verschiedene Arten von 5'-Sequenzen für das *FHL1* Gen existieren. Sowohl für Mensch als auch für Maus konnten EST-Einträge gefunden werden, die den 5'-UTR Sequenzen im Schwein entsprechen. In allen Fällen ist auch das in der porcinen Sequenz beschriebene ATG innerhalb einer starken Konsensussequenz vorhanden und die folgenden Basentriplets führen zu einer der porcinen Sequenz entsprechenden Proteinsequenz am N-Terminus. (Abb. 5.29). Damit stellt die identifizierte cDNA eine neue Variante des *FHL1* Gens dar, wobei es im N-terminalen Bereich zu einer Verlängerung des Proteins um 16 Aminosäuren kommt. Daher wird diese neue Variante in Folge mit FHL1C bezeichnet.

5.3.5 Isolierung genomischer Sequenzen des porcinen *FHL1* Gens

Da davon ausgegangen werden konnte, daß sich der gesamte 3'-UTR auf einem Exon befindet, wurde das Primer-Paar FHL1 und FHL2 dazu verwendet, mittels PCR die Plattenpools der porcinen genomischen Phagenbank (λ FIX II) zu durchmustern. Dadurch konnten die genomischen Pools 9 und 10 als positiv ermittelt werden. Es wurde der Pool 9 gewählt, da hier das PCR Signal am stärksten vorhanden war. Von zwei Verdünnungsstufen (10^{-1} und 10^{-2}) wurden Filterabzüge gemacht und mit dem PCR-Produkt hybridisiert. Es konnten drei positive Phagenbereiche (λ FHLgen9.1-3) ausgestochen und eluiert werden. Von λ FHLgen9.2 wurden Platten mit den Verdünnungen 10^{-1} und 10^{-2} ausplattiert und die Filterabzüge mit der PCR-Sonde (200 bp) hybridisiert. Von den drei ausgestochenen Einzelphagen (λ FHLgen9.2.1-3) wurde das Eluat λ FHLgen9.2.2 weiter verwendet und eine Phagenpräparation im großen Maßstab durchgeführt.

Die gewonnene Phagen-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *XbaI* und *SalI* gespalten. Das gesamte Insert, das durch *SalI* aus den Phagenarmen gespalten wurde, umfaßte 14 kb. Durch Spaltung mit *EcoRI* erhielt man ein Fragment mit etwa 7 kb, die Spaltung mit *XbaI* brachte drei Fragmente von 3,5, 4 und 7 kb Länge. Ein Agarosegel mit allen drei Restriktionsspaltungen wurde auf Nylon-Membran geblottet und mit der 200 bp Sonde aus der PCR-Amplifikation mit den Primern FHL1 und FHL2 hybridisiert. Positive Hybridisierungs-

	sus s	GGAGGGTGGGCCATCTGCTCTCGGTTATTTTCGTGTTACACCGCTTCCCCT
	AL046995 (h1)
	AA196436 (h1)
	AI746917 (m1)
	AI930469 (m1)
	AI173818 (m1)
	AI536550 (h2)GACAG
	AI354729 (h2)GCGGCCGCCGCCGAGACAG
	AW258815 (m2)GTCTGTGCTGCCGCTGTCCCG
	AI173399 (m2)	CATCCACGCCGCCGAGGGGGCTCAGTCCTGTGCTGCCGCTGTCCCG
<hr/>		
	sus s	TAAATGTATGTATGTTTACAACCGAGCCGAGCCTTATCAGCCGGGCCA
	AL046995 (h1)GTTG
	AA196436 (h1)
	AI746917 (m1)TCATCTGGGGTTG
	AI930469 (m1)TTATCATCTGGGGGG
	AI173818 (m1)CACAAATGAGCCAAAGCGTTATCATCTGGGGTTG
	AI536550 (h2)	CTGCGC-----GGGCGAGCATC----CCCACGCAGCACCTTGGA
	AI354729 (h2)	CTGCGC-----GGGCGAGCATC----CCCACGCAGCACCTTGGA
	AW258815 (m2)	CTGCGCTTTGGTCTCGGAGCTGGCAGCGCCGCCGCTGCCGCGCC---TAGA
	AI173399 (m2)	CTGCGCTTTGGTCTCGGAGCTGGCAGCGCCGCCGCTGCCGCGCCCTAGA
<hr/>		
	sus s	GGGGACAGTGGCTCCAGGTGCGGCTTG*GGACTCGTGGCGGAGCCATGG
	AL046995 (h1)	AGGGAAGACTGGTCTAGGTGCTGCTCCTGAACTTGGTCTCTGAGCCATGG
	AA196436 (h1)ACTGGTCTAGGTGCTGCTCCTGAACTTGGTCTCTGAGCCATGG
	AI746917 (m1)	AGGGAAGACAGGTCTGGGTGCCGCTCCTGAACTTGGCCTCTGAGCCATGG
	AI930469 (m1)	AGGGAAGACAGGTCTGGGTGCCGCTCCTGAACTTGGTCTCTGAGCCATGG
	AI173818 (m1)	AGGGAAGACAGGTCTGGGTGCCGCTCCTGAACTTGGCCTCTGTGCCATGG
	AI536550 (h2)	-AGTTGTTTT--CAACCA-TATCCAGCCTTTGCCGAATACATCCTATCTG
	AI354729 (h2)	-AGTTGTTTT--CAACCA-TATCCAGCCTTTGCCGAATACATCCTATCTG
	AW258815 (m2)	CAGCTGCGCGGGCAACTGGTAGCTGTTCTTAGCTGTGCCAGTCTCTCTG
	AI173399 (m2)	CAGCTGCGCGGGCAACTGGTAGCTGTTCTTAGCTGTGCCAGTCTCTCTG
<hr/>		
	sus s	CCTCCCACAGACATGCAGGC.....
	AL046995 (h1)	CTTCCCATAGACTCAGGT.....
	AA196436 (h1)	CTTCCCATAGACTCAGGT.....
	AI746917 (m1)	CTTCTCAAAGACTCAGGT.....
	AI930469 (m1)	CTTCTCAAAGACTCAGGT.....
	AI173818 (m1)	CTTCTCAAAGACTCAGGT.....
	AI536550 (h2)	CCACACATCCAGCGTGAGGT.....
	AI354729 (h2)	CCACACATCCAGCGTGAGGT.....
	AW258815 (m2)	GAACACATCCTGTGTGAGGT.....
	AI173399 (m2)	GAACACATCCTGTGTGAGGT.....

A

	sus s.	MASHRHAGPSSYKVGTMAEKF...
	homo s.	MASHRHSGPSSYKVGTMAEKF...
B	mus m.	MASQRHSGPSSYKVGTMSEKF...

Abb. 5.29: Die Analyse von EST-Sequenzen

A) Die 5'-Regionen von EST Sequenzen aus Mensch und Maus mit Homologie zur Protein-kodierenden Region von FHL1 wurden im Programm CLUSTAL V mit der isolierten 5'-Sequenz im Schwein (sus s) verglichen. Es ergaben sich zwei Gruppen von Sequenzen: (h1) und (m1) bezeichnen EST-Einträge von Mensch (h) und Maus (m) mit Homologie zum 5'-Bereich im Schwein, (h2) und (m2) entsprechen den 5'-Bereichen der publizierten cDNAs von Mensch und Maus. Das konservierte, neue Startcodon ist durch eine Box dargestellt. Die EST-Einträge sind durch die Acc. Nr. wiedergegeben.

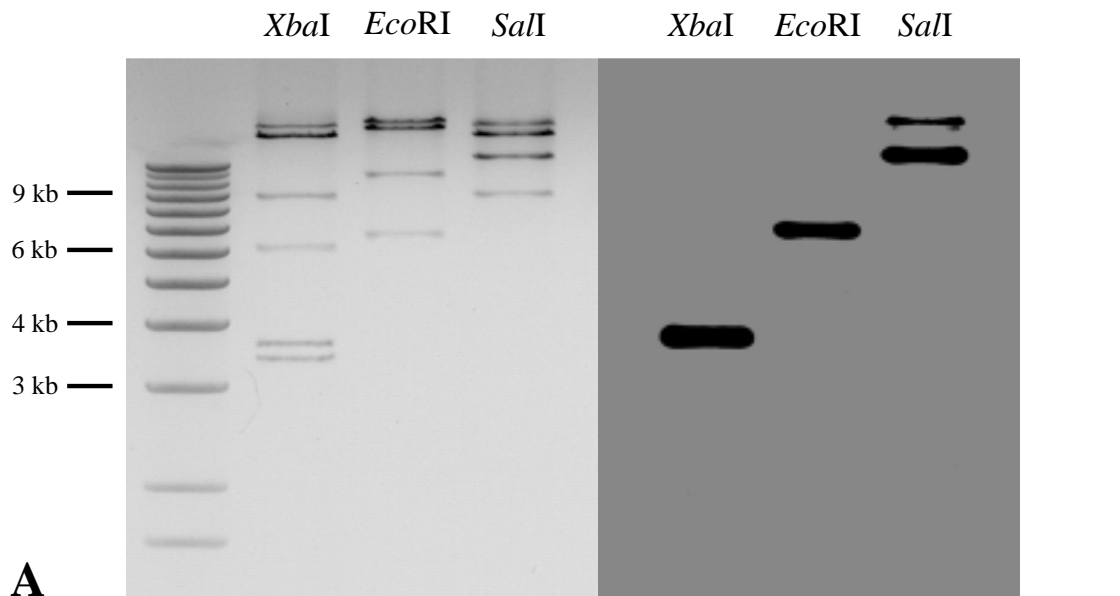
B) Die sich aus den EST-Einträgen ergebenden Aminosäuresequenzen im N-terminalen Bereich von FHL1C weisen ebenfalls einen hohen Grad an Homologie auf. Die auch in FHL1 auftretende Sequenz ist durch die graue Box dargestellt.

signale traten bei den Fragmenten Sal-14kb, Eco-7kb und Xba-4kb auf (Abb. 5.30A). Dies lässt vermuten, daß sich zumindest der 3'-Bereich des Gens auf dem Phageninsert befand. Weiters wurden alle Fragmente in den Vektor pGEM-4Z kloniert und die Ränder sequenziert. Dabei konnte bereits festgelegt werden, daß sich der Großteil des offenen Leserahmens und der 3'-UTR von FHL1 und FHL1C auf dem Phagen befanden. Die Plasmid-DNA der Fragmente pFHLgen/E7, pFHLgen/X3,5 und pFHLgen/X4 wurde im großen Maßstab präpariert und mit den restlichen Enzymen der Multiple Cloning Site von pGEM-4Z gespalten. Die erhaltenen Subfragmente wurden erneut kloniert und sequenziert. Die Sequenzen wurden mit dem Programm SEQUENCHER zusammengefügt und noch vorhandene Lücken oder Unsicherheiten durch erneute Subklonierung oder durch Verwendung von 9 sequenzspezifischen, markierten Primern beseitigt. Die Gesamtsequenz des analysierten Bereiches umfaßte 8576 bp, wobei vom Fragment pFHLgen/X7 nur soweit Sequenzinformation enthalten war, wie es mit dem Fragment pFHLgen/E7 überlappte. Das Fragment pFHLgen/X4 war zur Gänze im Fragment pFHLgen/E7 enthalten und es konnten drei Exons identifiziert werden. Das Fragment pFHLgen/X3,5 überlappte mit dem 5'-Bereich von pFHLgen/E7 und trug ebenfalls drei Exons. Daher konnten insgesamt 6 Exons (Exon 2 - 6) von FHL1 gefunden werden, wobei FHL1/FHL1C von den Exons 2, 3, 4, 5a und 6 kodiert wird. Exon 5b ist in der Splice-Variante FHL1B/SLIMMER zu finden (Brown *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Die ersten fünf Exons weisen eine durchschnittlich Größe von etwa 180 bp auf, das letzte Exon beinhaltet mit 1496 bp den gesamten 3'-UTR (Abb. 5.30B). Das für Mensch und Maus beschriebene ATG in FHL1 wurde auf Exon 2 identifiziert, das Stop Codon (TAA) befindet sich auf dem letzten Exon. Innerhalb des untersuchten Bereiches konnten keine repetitiven Elemente oder SINE - Sequenzen gefunden werden.

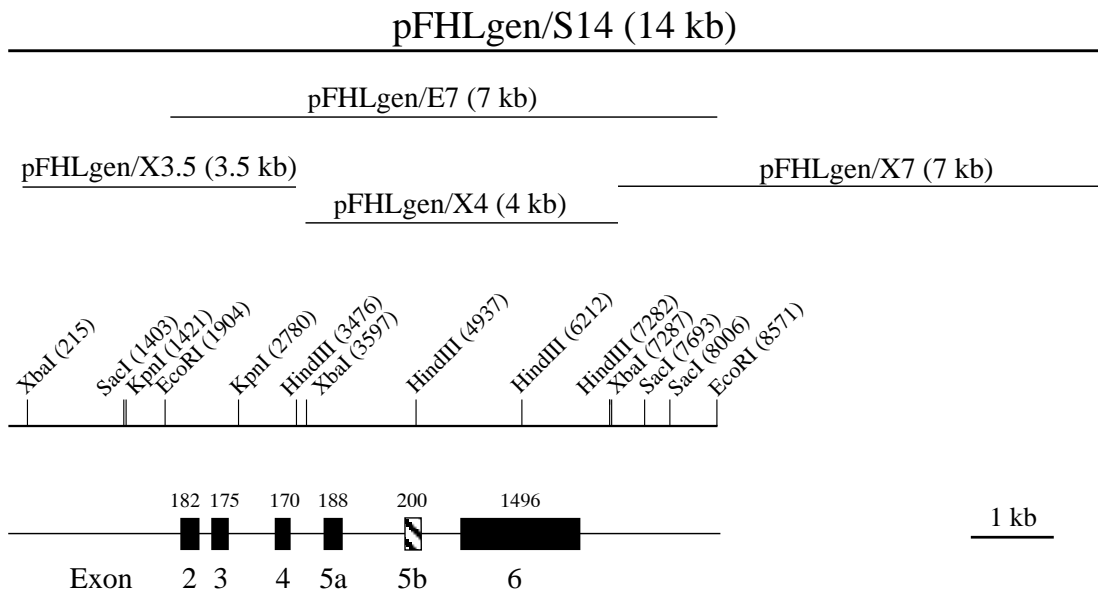
Der cDNA-Klon λ FHL/B9 enthielt 18 bp des 5'-UTRs, die auf Exon 2 liegen. Von den zusätzlichen Sequenzen des 5'-RACE-Klons konnten noch 8 bp stromaufwärts verifiziert werden, dann kam es zum Abbruch der Homologie und es folgte eine gut definierte Splice-Donor Stelle. Stromaufwärts von Exon 2 waren noch 2207 bp im Phageninsert enthalten. Innerhalb dieses Bereiches konnten keine weiteren kodierenden Bereiche identifiziert werden, sodaß davon ausgegangen werden mußte, daß weitere Introns und Exons weiter 5' liegen.

5.3.6 Isolierung eines PAC Klons aus einer porcinen PAC-Genbank

Da die Entfernung noch nicht identifizierter Exons aus dem 5'-Bereich des Gens von den bereits bekannten Sequenzen nicht abzusehen war, wurde entschieden, keinen weiteren Phagen zu suchen, sondern die vorhandene porcine PAC-Genbank nach entsprechenden Klonen zu durch-



A



B

Abb. 5.30: Isolierung und Sequenzierung eines genomischen Phagen

A) Die isolierte Phagen-DNA aus λ FHLgen9.2.2.2 wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *XbaI* und *SalI* gespalten. Die Spaltungen wurden auf einem 0,5 % Agarosegel aufgetrennt, die DNA auf Nylonmembran geblotet und mit der PCR-Sonde hybridisiert.

B) Schematische Darstellung des Phageninserts und seiner Schnittstellen. Die Lage und Größe der Exons 2 - 6 ist im Verhältnis zum gesamten Phagen-Insert wiedergegeben. Das alternative Exon 5b ist schraffiert dargestellt.

Mustern, da diese im Durchschnitt Inserts zwischen 200 - 300 kb tragen.

Die porcine PAC-Genbank ist in 560 96er Mikrotiterplatten und 95 384er-Mikrotiterplatten organisiert. Die DNA der PAC-Klone ist für die Durchmusterung mittels genspezifischer Primer in 655 Plattenpools (PP), 66 Superpools (SP) und 13 Super-Superpools (SSP) vereinigt (Al-Bayati *et al.*, 1999). Zunächst wurden mit den beiden Primern FHL1gen und FHL2gen (aus dem 5'-Bereich des Phagenklons λ FHLgen9.2.2) 13 PCRs auf den Super-Super-Pools durchgeführt. Dabei ergaben die SSP 1, 5, 10 und 13 ein positives Signal von 402 bp. Die SSP beinhalten jeweils 5 Superpools, die bei allen vier positiven SSP untersucht wurden. Der Superpool 063 aus dem SSP 13 zeigte eines der stärksten Signale und wurde daher weiter verwendet. Der SP 063 besteht aus DNA der Plattenpools O061 - O070. Die Pools wurden gescreent und ein stark positives Signal auf Plattenpool O062 erhalten. Von dieser Mikrotiterplatte wurden die Reihen und Spalten (je zwei zusammengefaßt), sowie die Quadranten (je 96 Klone) auf Kanamycin/Agar-Platten ausplattiert und von jeder Platte im Schnellaufschlußverfahren DNA präpariert. Die PCR auf diesen Reihen-, Spalten- und Quadrantenpools ergab als Kreuzungspunkt den positiven PAC-Klon PACFHL-O062/F4 (Abb. 5.31). Dieser Klon wurde im großen Maßstab präpariert und DNA gewonnen.

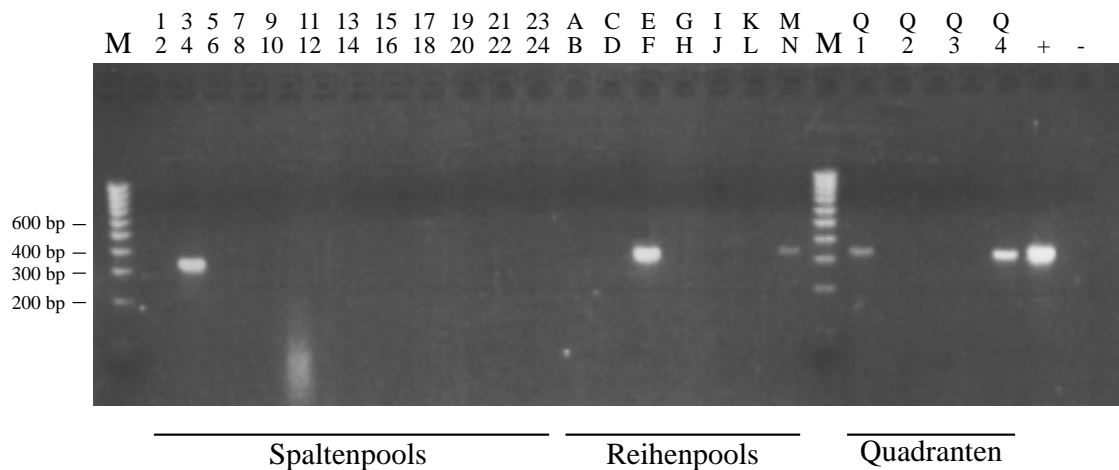


Abb. 5.31: Identifizierung eines PAC Klons in einer 384er Mikrotiterplatte

Die DNA jeweils zweier Reihen (A-N) oder Spalten (1-24) sind in einer Reaktion zusammengefaßt. Die Identifizierung erfolgt über die Quadranten (Q). Auf allen Proben wurde eine PCR mit den Primern FHL1gen und FHL2gen durchgeführt und 20 μ l der Reaktion auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. M = Marker; + = positive Kontrolle (porcine DNA); - = negative Kontrolle (H₂O).

5.3.7 Identifizierung von Restriktionsfragmenten aus dem PAC-Klon

Je 8 µg der isolierten PAC-DNA (PACFHL-O062/F4) wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *SacI*, *XbaI*, *PstI* und *HindIII* gespalten. Die Reaktionen wurden auf einem 0,5 % Agarosegel aufgetrennt, geblottet und mit dem Produkt der RACE-PCR sowie einem PCR-Produkt aus dem Intronbereich zwischen 3. und 4. Exon (Primer FHL-GS1 und FHL-GS2) nicht radioaktiv hybridisiert. Aufgrund des Bandenmusters auf dem Röntgenbild (Abb. 5.32A) wurden die zugehörigen Banden aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und in die entsprechenden Vektoren kloniert. Schnellaufschlüsse mit entsprechenden Insertlängen wurden erneut auf einem 0,5 % Gel aufgetrennt, geblottet und hybridisiert. Dadurch konnten die positiven Klone PacFHL-E1(11 kb) aus der *EcoRI*-Spaltung, PacFHL-H1 (1,5 kb) und PacFHL-H2 (> 12 kb) aus der *HindIII*-Spaltung, PacFHL-X1 (3,5 kb) und PacFHL-X2 (>12 kb) aus der *XbaI*-Spaltung, PacFHL-P1 (1 kb) aus der *PstI*-Spaltung und PacFHL-Sc1 (6 kb) aus der *SacI*-Spaltung gewonnen werden. Die erhaltenen Klone wurden zunächst von ihren Rändern her sequenziert. PacFHL-H1, PacFHL-X1, PacFHL-Sc1 und PacFHL-P1 lagen innerhalb des bereits sequenzierten Bereiches von Phage λFHLgen9.2.2. Das Fragment PacFHL-E1 bildete das Anschlußfragment stromaufwärts des Phagenfragmentes pFHLgen/E7. PacFHL-H2 und PacFHL-X2 überlappten an beiden Enden, waren demnach von ihrer Größe her fast identisch und trugen den gleichen Sequenzabschnitt. Es konnten aber keine Überlappungsbereiche mit vorhandenen Sequenzen festgestellt werden. Auf einer Randsequenz beider Klone wurden allerdings die fehlenden 76 bp des RACE-Produktes gefunden (Abb. 5.32B).

5.3.8 Sequenzierung des ersten Introns und des ersten Exons von FHL1C

Aufgrund der Sequenzinformationen der Randsequenzen wurde entschieden, mit den beiden Fragmenten PacFHL-H2 und PacFHL-E1 weiterzuarbeiten. Beide Klone wurden mit den Enzymen der Multiple Cloning Site gespalten und die gewonnenen Subfragmente in die entsprechenden Vektoren kloniert. Schnellaufschluß-DNA wurde sequenziert und die Daten im Programm SEQUENCHER zusammengefügt. Dabei zeigte sich, daß die beiden Fragmente überlappten. Es wurde mit dem Fragment PacFHL-E1 weitergearbeitet, da es sowohl Sequenzen aus dem isolierten Phagen als auch Sequenzen des ersten Exons enthält. Ein Subklon, PacFHL-E1-Sc3, erwies sich als hilfreich, da er den fehlenden Bereich zwischen

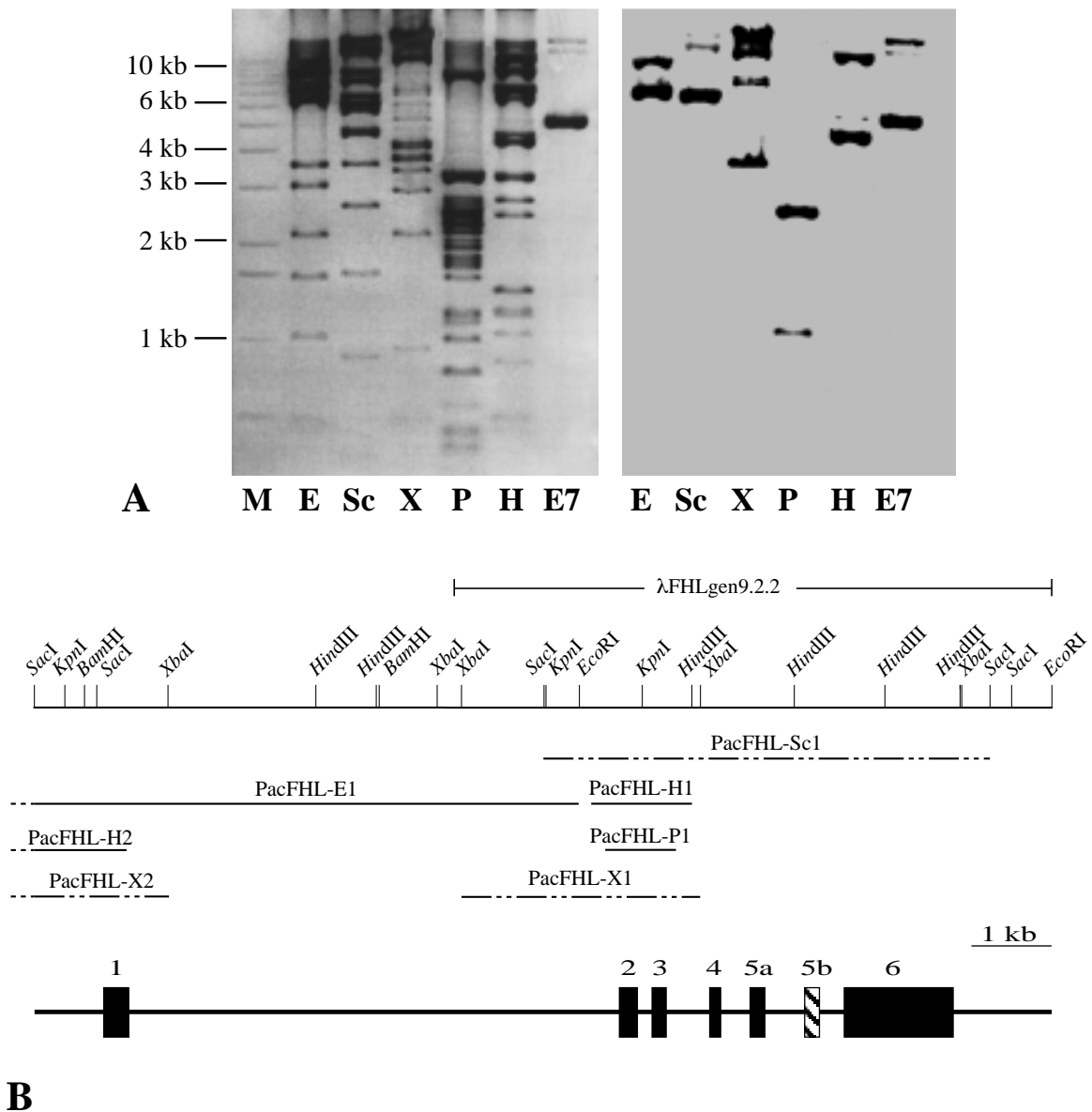


Abb. 5.32: Isolierung von PAC Fragmenten

A) Je 8 µg PAC-DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (E), *SacI* (Sc), *XbaI* (X), *PstI* (P) und *HindIII* (H) gespalten, auf einem 0,5 % Agarosegel aufgetrennt und mit den Sonden "RACE" und "FHL-GS1/2" hybridisiert. M = Marker; E7 = Plasmid pFHLgen/E7.

B) Die positiven Fragmente wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Die Abbildung gibt die relative Lage der sequenzierten Fragmente wieder. Durchbrochene Linien bedeuten, daß diese Fragmente nur von ihren Rändern her sequenziert wurden. Die Punkte am 5'-Ende von PacFHL-E1, PacFHL-H2 und PacFHL-X2 zeigen, daß diese Fragmente noch weiter Richtung 5' führen. Im oberen Teil ist die Lage des Phagenfragmentes λFHLgen9.2.2 und die Positionen einiger Restriktionsschnittstellen dargestellt. Der untere Teil stellt die Lage der gefundenen Exons (schwarze Boxen) dar, das alternativ gespleißte Exon 5b wurde als schraffierte Box eingefügt.

RACE-Sequenzen und Phagensequenzen umfaßte. Vom Fragment PacFHL-H2 wurden nur 1312 bp analysiert.

Um Lücken im Klon zu schließen und Unklarheiten zu beseitigen wurden aus dem Subklon PacFHL-E1-Sc3 weitere Fragmente gespalten und kloniert, sowie 10 Sequenzierprimer eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß das erste Intron etwa 7 kb umfaßt. In diesem Bereich konnten auch keine repetitiven Elemente oder SINE - Sequenzen gefunden werden. Über die Größe des ersten Exons war mit den vorhandenen Sequenzierdaten noch keine Aussage zu treffen. Insgesamt umfaßt der genomische Bereich von FHL1C etwa 15 kb, wovon 14372 bp sequenziert wurden. Der Genabschnitt ist einschließlich des alternativ gespleißten Exons 5b in 7 Exons gegliedert (Abb.5.32B). Alle Exon-Intron Übergänge entsprechen der Konsensussequenz für Splice-Akzeptor und Splice-Donor Stellen (Abb. 5.33). Das zusätzliche ATG, 48 bp stromaufwärts des beschriebenen Startcodons für FHL1, konnte durch die Sequenzierung der genomischen PAC-Fragmente verifiziert werden. Im Überlappungsbereich zwischen den PAC-Klonen und den Phagen-Klonen wurden zudem neun Basenaustausche festgestellt. Diese lagen aber alle in Intron-Bereichen oder jenseits des letzten Exons und wurden nicht weiter untersucht.

Exon	bp	Splice Akzeptor	Splice Donor	Intron	bp
1	364	n. d.	AGACATGCAG g taaacgcgg	1	6714
2	182	ccccccgc ag GCCCCTCCAG	TGACTCCAAG g tagcgcccg	2	212
3	175	eggttccc ag GAGGTGCACT	ATCGTGGCAG g taccggcca	3	614
4	170	ccccccgc ag GCGATCAGAA	GTGCAACAAG g tacgttgtc	4	438
5a	188	cctggtct ag GCCATCACAT	CCCATCACT g taggctaaa	5a	575
5b	200	ccatcctc ag GGAAAAGGAC	TCGAGGCCCG g taagtgcac	5b	352
6	1496	tcctccgc ag GTTTGGTAA	n. d.		

Abb. 5.33: Exon-Intron Grenzen des porcinen *FHL1* Gens

In der Abbildung sind die Sequenzen der Exon/Intron Übergänge dargestellt. Exon-Abschnitte sind mit großen Buchstaben bezeichnet, Intron-Abschnitte mit kleinen Buchstaben. Die konservierten Nukleotide AG/GT sind fett hervorgehoben. Berücksichtigt wurde in dieser Aufstellung auch das alternativ gespleißte Exon 5b, das im Menschen beschrieben ist und sich in der porcinen Sequenz wiederfindet.

5.3.9 Primer Extension Analyse der FHL1C Genvariante

Um den Transkriptionsstart der FHL1C Genvariante festzulegen, wurde eine nicht radioaktive Primer Extension Analyse mit fluoreszenz-markierten Oligos nach der Methode von Altermann *et al.* (1999) durchgeführt. Als Primer für die reverse Transkription auf Skelettmuskel-RNA dienten ein 30 bp Oligomer (FHL-Prex1) aus dem zweiten Exon des FHL1 Gens und ein 25 bp Oligomer (FHL-Prex4) aus dem ersten Exon. In die Reaktion wurden 5 µg und 9 µg Gesamt-RNA aus porcinem Skelettmuskel eingesetzt. Als Referenz diente eine Sequenzreaktion auf einem entsprechenden Klon (pFHL-X3,5 und PacFHL-H2-B7) mit den beiden Primern der Extension-Analyse.

Die Auswertung des Sequenzgels zeigte eine klar definierte Bande 396 bp vom 3'-Ende des Primers FHL-Prex1 entfernt. Bezogen auf die Sequenzdaten stromaufwärts der bekannten Sequenzen von Exon 1 bedeutete dies, daß der mutmaßliche Transkriptionsstart an einem TAC 260 bp von der letzten bekannten Base aus dem RACE-Produkt entfernt liegt. Das würde für das erste Exon eine Länge von 336 bp ergeben. Die Primer Extension Analyse mit FHL-Prex4 ergab auf gleicher Höhe ein Produkt, allerdings war auf dem Sequenzgel noch weiter stromaufwärts ein zweite, klare Bande zu erkennen. Diese endet an einem CCACGGC 290 bp von der letzten bekannten Base des RACE-Klons entfernt, was einer Größe von 364 bp für das erste Exon entsprechen würde (Abb. 5.34). Für diesen Startpunkt der Transkription spricht auch, daß sich 36-41 bp stromaufwärts eine TATAA-Box befindet. An weiteren Promotor-Motiven konnten noch eine CAAT-Box (CAACT, -79 bis -85), eine AP1-Bindungsstelle (RSTGACTNMNW) in negativer Orientierung, die Kernsequenzen für 4 Sp1-Bindungsstellen (GGGCGG) und zwei Kernmotive für E-Boxen (CANNTG) identifiziert werden (Abb. 5.35).

Innerhalb des 5'-UTRs befinden sich mehrere ATGs, die aber entweder nur für sehr kurze Peptide kodieren oder in einem schlechten Gesamtkontext stehen. Daher scheint das hier beschriebene ATG den Translationsstart für die FHL1C Genvariante zu definieren.

5.3.10 RT-PCR im 5'-Bereich

Um die Ergebnisse der Primer-Extension Analyse abzusichern, wurden RT-PCRs auf Gesamt-RNA aus Skelettmuskel durchgeführt. Der reverse Primer (FHLtrans-rev) wurde aus dem 2. Exon ausgewählt, um Amplifikationen auf genomischer DNA zu verhindern. Aus dem definierten 1. Exon wurden drei versetzt gelegene Primer verwendet (FHLtrans-fwd1-3). Nach der Amplifikation wurden die Produkte auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und die Banden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Die PCR Produkte der Vorwärts-Primer

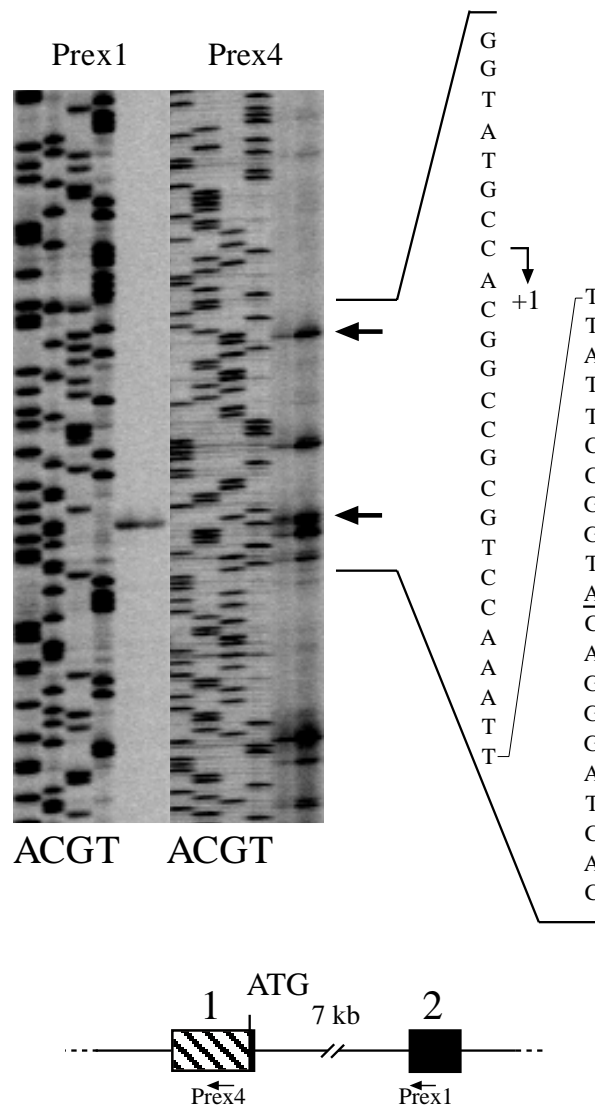


Abb. 5.34: Primer Extension Analyse

Mit den Primern FHL-Prex1 und FHL-Prex4 wurde eine nicht radioaktive Primer Extension Analyse durchgeführt. Die Primer wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRD-800 markiert und die Produkte auf einem 6% Sequagel zusammen mit einer entsprechenden Sequenzreaktion aufgetrennt. Der Transkriptionsstart (+1) wurde damit bei einem CA Dinukleotid kartiert. Das Ende des Primer Extension Produkts aus der Kartierung mit Primer FHL-Prex1 ist in der Sequenz unterstrichen. Die Pfeile geben die beiden kartierten Transkriptionsstarts an.

Im unteren Teil der Abbildung ist schematisch die Lage der beiden Sequenzprimer innerhalb des ersten bzw. zweiten Exons wiedergegeben.

FHLtrans-fwd3 (236 bp) und FHLtrans-fwd2 (335 bp) entstammten eindeutig dem Bereich des definierten ersten Exons. Das PCR-Produkt des Vorwärts-Primers FHLtrans-fwd3 zeigte keine Homologien zu den Sequenzdaten aus diesem genomischen Bereich (Abb. 5.36).

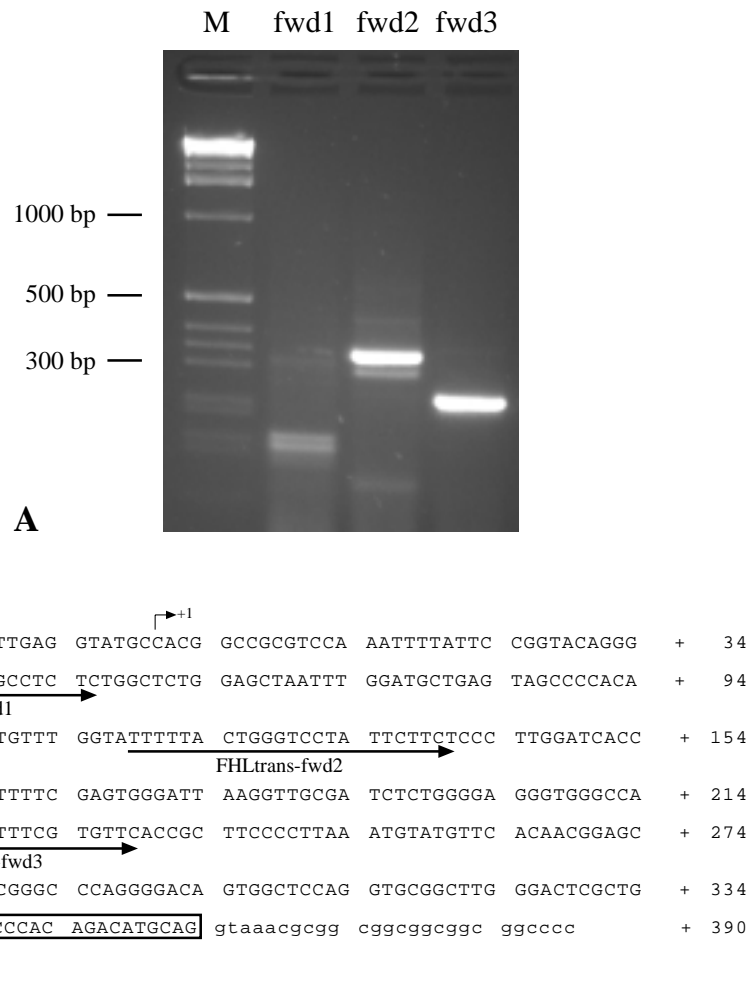
Weiters wurde PCR auf den Pools der porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank durchgeführt. Der reverse Primer (FHL-NR2) liegt im ersten Exon in unmittelbarer Nähe des RT-Primers

CTGGCAGTCC	GGGCTGTCTT	TAGAATAACT	TCCCGTGAGA	CAGTGGAAGG	GCACAGGCGT	-	867
CCTCAGAGTC	TGGCATCCGT	TGCTGAAGCG	GGTATGGCTC	ACCGGCCAGG	CCTGGGGACA	-	807
GAAGACGAGG	AAAGCATGGC	CCTGGCCCCC	GAGTCAGGGT	TGTCTACACT	CCTTGATGTT	-	747
	E-Box						
CAGTGGCGGA	AGC <u>CACTTG</u> T	AGGGTTCTGG	GTGGGACTGT	GTTTCACTTT	TATGTGAGGC	-	687
				API			
TTGGCAAACC	CTTTTCAAGT	TGTGGAATTT	GGTTTTTCCA	<u>CACGGAGTCA</u> CT	GAGGAAGC	-	627
TGGGGGCAGT	GGGGGCAGCG	TTCGGCGGGG	TGGCTGGGGA	AGATGGCCCC	AGAAAGTGAC	-	567
				GC-Box			
CTGAAGCCAA	GCCTGGAGGA	AGCAGAGGAG	CCAGCGCGAG	GCCCC <u>GGGCG</u> G	AGGGCCCCGG	-	507
	GC-Box		GC-Box				
CTGCCCGGG	<u>CGG</u> <u>CGG</u> STACCCT	GGGGT <u>GGGC</u> GG	STGAGGAG	GGCGCAGGGC	ACGGCCC <u>GGG</u>	-	447
GC-Box							
<u>CGG</u> GGGCGCC	ACGGCTCCTC	CTGGGGCCCC	GTCTCCAGCC	ATCGCATGGC	CCGTTGGGGT	-	387
CACGGTGTTT	CTGTCCCCGT	TTCTGCTTTC	ATCGTCCCTG	ACAGTGGAAA	GCAAGGGGCT	-	327
			E-Box				
GCGTTTGTGG	GACACGGTCT	CTTCTCGTG	TACTAG <u>CAGG</u> TG	TGTGCGTG	TGTCTGCCCC	-	267
TGGGGCCCGC	CCTGTCTGGC	ACTCAGGAGG	GGTGCTCTTT	TCAGGATCCT	GCCAACCTCC	-	207
GGGACAGACC	CAGGAGGACA	CGGGCCGTGC	CCTCGACCTG	TGTGGCCCTC	GGGTCCAGTG	-	147
CGTCTTTCCC	CCGCTGCCGC	CGGCGGTCTG	TCTCGTACAG	TTACTTTGAC	CAGTAGCAGC	-	87
CAAT-Box				TATAA-Box			
<u>CAAACT</u> CGC	GTCCTTCCGG	GGCCCCGGGG	CGAGCTCATC	GGGCG <u>TATAA</u> AG	TAGATTAA	-	27
		└─▶+1					
TGGGGTGGCT	CAGCGTTGAG	GTATGCCACG	GCCGCGTCCA	AATTTTATTC	CGGTACAGGG	+	34
ATCACTTTCT	CTGCGGCCTC	TCTGGCTCTG	GAGCTAATTT	GGATGCTGAG	TAGCCCCACA	+	94
GGTATTTATA	TGTAGTGTTC	GGTATTTTATA	CTGGGTCCTA	TTCTTCTCCC	TGGATCACC	+	154
TAAAATGGTT	AAGAATTTTC	GAGTGGGATT	AAGGTTGCGA	TCTCTGGGGA	GGGTGGGCCA	+	214
TCTGCTCTCG	GTTATTTTCG	TGTTACCCGC	TTCCCTTAA	ATGTATGTTT	ACAACGGAGC	+	274
CGCAGCCTTA	TCAGCCGGGC	CCAGGGGACA	GTGGCTCCAG	GTGCGGCTTG	GGACTCGCTG	+	334
GCGGAGCCAT	GGCCTCCCAC	AGACATGCAG	gtaaacgcgg	cggcggcggc	ggcccc	+	390
	Me	tAlaSerHis	ArgHisAlaG				

Abb. 5.35: Die Promotorregion von FHL1C

Darstellung der Promotorregion von FHL1C. Der Transkriptionsstart wurde an einem CA Dinukleotid festgelegt und ist mit +1 bezeichnet. Innerhalb des sequenzierten Promotorabschnittes konnten mehrere Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Der kodierende Abschnitt des ersten Exons ist in Aminosäuren übersetzt, das folgende erste Intron in Kleinbuchstaben dargestellt.

FHLtrans-fwd3. Als Vorwärts-Primer wurde pBK-CMVT3 aus dem Phagenarm gewählt. Von den 10 Plattenpools konnten in 6 klare PCR-Banden identifiziert werden (Abb. 5.37). Dabei entspricht die Bande in Pool H jener in Pool D und die Banden in Pool J jenen in den Pools B und F. Die Produkte aus den Plattenpools B (301 bp), C (161 bp), D (205 bp) und F (466 bp) wurden kloniert und sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten ergab, daß nur die Bande aus Plattenpool 4 spezifisch für Sequenzen im 1. Exon von FHL1C war. Die Sequenz war nach Entfernen der Vektor-Amplifikate 112 bp lang und endet damit 25 bp vor Beginn des Primers FHLtrans-fwd2.

**Abb. 5.36: RT-PCR im 5'-Bereich**

A) 20 µl der RT-PCR Reaktion mit den Primern FHLtrans-fwd1-3 und FHLtrans-rev wurden auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Die erhaltenen Banden wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

M = Marker

B) Ausschnitt aus dem 5'-Bereich des FHL1 Gens und die Lage der RT-Primer innerhalb des 5'-UTRs. Der Transkriptionsstart ist mit +1 bezeichnet, der codierende Abschnitt des ersten Exons ist durch eine Box dargestellt, die beginnende Intronsequenz ist in Kleinbuchstaben angegeben.

5.3.11 RT-PCR zum Nachweis von FHL1 und FHL1C in verschiedenen porcinen Geweben

Um die Expression von FHL1 und FHL1C in verschiedenen Geweben des Schweins zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus Skelettmuskel, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, einer Arterie und dem Hoden gewonnen. Mit reverser Transkriptase wurde auf jeweils 1 µg RNA, ausgehend von den zwei Primern FHLtrans-rev (FHL1C) und FHL-RTE_{x6} (FHL1), der DNA-Strang synthetisiert. Primer RTE_{x6} liegt im 6. Exon des *FHL1* Gens und

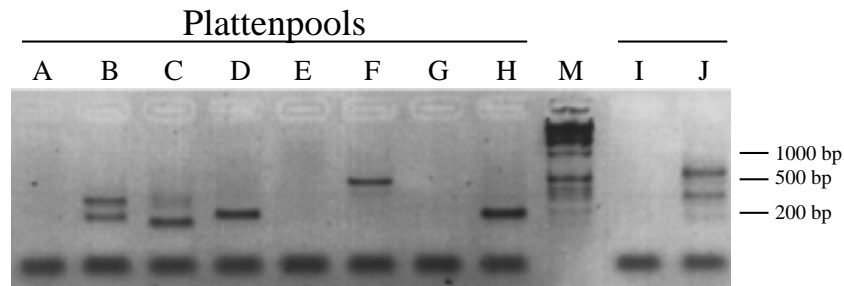


Abb. 5.37: Isolation des 5'-UTRs über PCR auf den Plattenpools der Skelettmuskel cDNA-Bank

Auf den 10 Plattenpools wurde PCR mit den Primern pBK-CMVT3 und FHL-NR2 durchgeführt. 20 µl jeder Reaktion wurden auf ein 2 % Agarosegel aufgetragen. Die Produkte aus den Pools B, C, D und F wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

sollte in Kombination mit dem Primer FHL-RTE_{x4} aus dem vierten Exon auch die beiden beschriebenen Splice-Varianten FHL1B/SLIMMER (Brown *et al.*, 1999, Lee, 1999 #283) und Kyoto2 (Taniguchi *et al.*, 1998) erfassen. In beiden Varianten treten Splice-Vorgänge auf, welche die beiden Exons 5a und 5b betreffen.

Die Amplifikation von FHL1C-spezifischen Produkten erfolgte zunächst über PCR mit den Primern FHLtrans-rev und FHLtrans-fwd2. Da hier nach Kontrolle auf einem Agarosegel keine spezifischen Banden identifiziert werden konnten, wurde mit 3 µl PCR-Produkt erneut eine Amplifikation mit den Primern FHLtrans-rev und FHLtrans-fwd3 durchgeführt.

Nach Auftrag der PCR Produkte auf ein Agarosegel konnten bei FHL1 Banden in drei unterschiedlichen Größen beobachtet werden (318 bp, 436 bp und 637 bp) (Abb. 5.38A). Die Fragmente wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Nur das Fragment mit der Länge von 637 bp entsprach der cDNA von FHL1, die beiden anderen Fragmente enthielten unbekannte Sequenzen. Splice-Varianten konnten in den Amplifikaten nicht gefunden werden. Die höchste Intensität an FHL1-PCR Produkt wurde im Skelettmuskel und im Herzen beobachtet. Deutliche Banden traten auch in der Lunge und der Blutgefäß-Probe auf, schwache Signale wurden im Gehirn, in der Milz, der Niere und im Hoden identifiziert. Kein Signal trat in der Leber auf. Die Ergebnisse stimmen damit im Wesentlichen mit den Northern-Blot Analysen von Greene *et al.* (1999) überein.

Das Agarosegel mit den FHL1C-Produkten zeigte zwei prominente Banden bei 350 bp und 200 bp (Abb. 5.38B). Die 350 bp - Bande wurde kloniert und sequenziert. Das Amplifikat steht in keinem Zusammenhang mit FHL1C. Die 200 bp - Bande entspricht dem erwarteten Produkt von 236 bp. Das Signal tritt stark in der Skelettmuskel-Probe und im Blutgefäß auf, schwache Banden sind in Herz und Lunge zu beobachten. Damit zeigt die Expression von FHL1C eine Gewebespezifität, die von jener in FHL1 und den anderen beschriebenen Splice-Varianten abweicht.

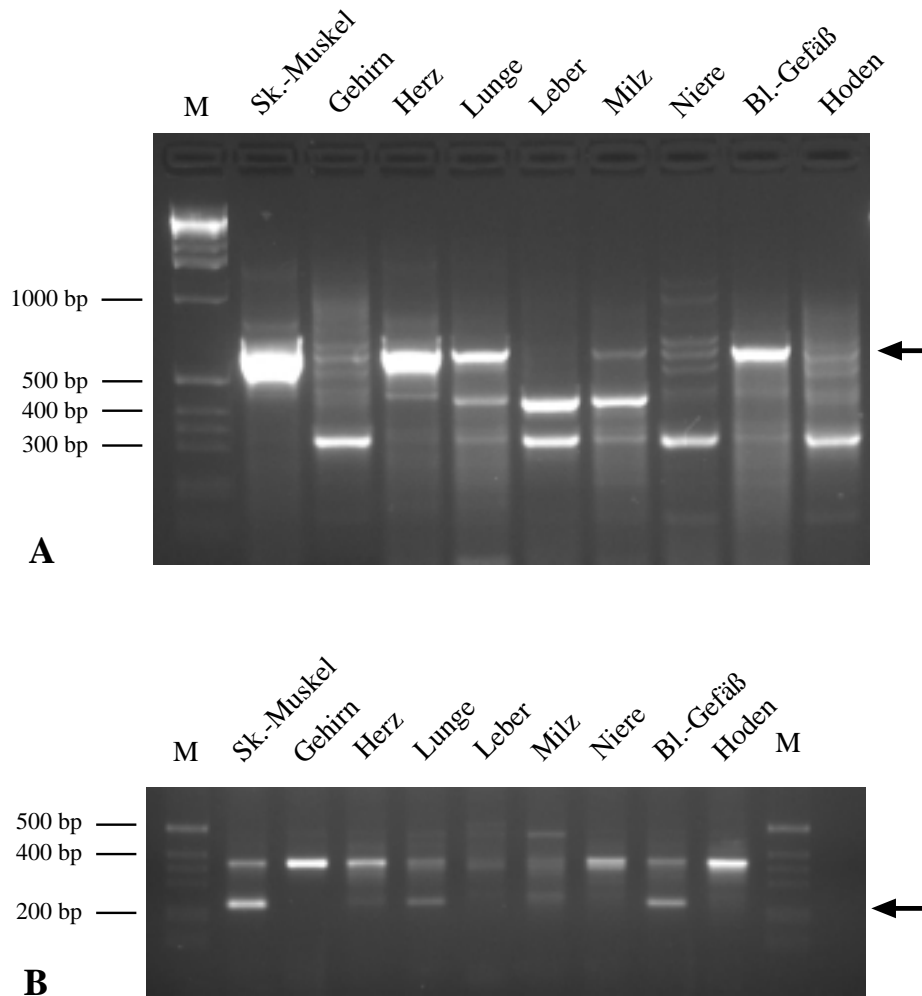


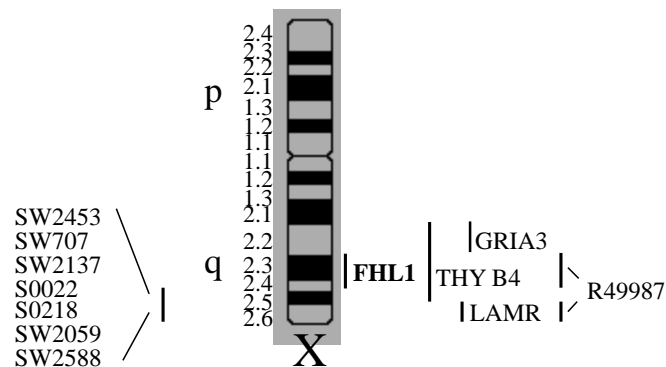
Abb. 5.38: RT-PCR zum Nachweis von FHL1 und FHL1C Genprodukten in verschiedenen porcinen Geweben

A) Mit Gesamt-RNA aus verschiedenen porcinen Geweben wurde mit den Primern FHL-RTE_x4 und FHL-RTE_x6 RT-PCR durchgeführt. 20 µl der PCR-Reaktionen wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Der Pfeil markiert das spezifische FHL1 Produkt mit einer Länge von 637 bp. M = Marker.

B) Mit RNA aus den gleichen Geweben wie unter A) wurde zunächst RT-PCR mit den beiden Primern FHLtrans-fwd2 und FHLtrans-rev durchgeführt. 3 µl dieser PCR-Produkte wurden in eine erneute PCR mit den Primern FHLtrans-fwd3 und FHLtrans-rev eingesetzt. 20 µl der PCR wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. Der Pfeil markiert das spezifische FHL1C-Produkt (236 bp). M = Marker.

5.3.12 Chromosomale Lokalisation des porcinen *FHL1* Gens

Der Phage λFHLgen9.2.2 wurde dazu verwendet, mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auf Metaphasenchromosomen des Schweins die chromosomale Lage zu bestimmen. Analog zur bekannten Lokalisation auf Chromosom Xq27.2 beim Menschen (Greene *et al.*, 1999) wurden Signale auf dem porcinen Chromosom Xq23-24 erhalten. In diesem Bereich sind beim Schwein nur einige humane ESTs (Lahbib-Mansais *et al.*, 1999) und porcine ESTs



Typ I Marker			
GRIA3	Glutamat Rezeptor ionotrophisch AMPA3	Xq22	Larsen <i>et al.</i> , 1999
THYB4	Porcine ESTs	Xq22-q25	Wintero <i>et al.</i> , 1998
R49987	Humane ESTs	Xq23-q24, Xq26	Lahbib-Mansais <i>et al.</i> , 1999
LAMR	Laminin Rezeptor	Xq26	Wintero <i>et al.</i> , 1998
Typ II Marker			
SW2453, SW2588	Mikrosatellit		Lopez-Corrales <i>et al.</i> , 1999
SW707	Mikrosatellit		Rohrer <i>et al.</i> , 1994
SW2137, SW2059	Mikrosatellit		Alexander <i>et al.</i> , 1996
S0022, S0218	Mikrosatellit		Archibald <i>et al.</i> , 1992

Abb. 5.39: Lokalisation von FHL1 im distalen Bereich von Chromosom Xq

Schematische Darstellung des porcinen Chromosoms X und Lokalisation von Genen und Markern im Bereich zwischen Xq22-q26. Links sind Marker vom Typ II angegeben, rechts Genloci und kartierte ESTs. Die Loci sind im unteren Bereich genauer aufgelistet. Die Typ II Marker sind Mikrosatelliten auf unbekanntem DNA Fragmenten, die im Bereich Xq25-26 kartiert wurden.

(Wintero *et al.*, 1998) kartiert, mehrere Typ II Marker (Mikrosatelliten) liegen in dem Bereich, können aber noch nicht eindeutig zugeordnet werden (Hawken *et al.*, 1999) (Abb. 5.39). Weiters wurde ein somatischer Zell-Hybrid-Panel (Yerle *et al.*, 1996), bestehend aus den DNAs von 27 Hybrid-Zellen, mittels PCR gescreent. Dazu wurden je 25 ng der DNA in eine 50 µl Standardreaktion mit den Primern FHLg31 und FHLg32 eingesetzt. Die Verteilung des Bandenmusters wurde über einen Algorithmus der INRA ausgewertet. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,7992 konnte das Gen der chromosomalen Region Xq23-24 zugeordnet werden (Korrelations-Koeffizient: 0,8748).

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung der RyREF2-Bindungsstelle

6.1.1 Screening porciner DNA-Banken

6.1.1.1 South-Western Hybridisierung einer porcinen Gehirn cDNA-Bank

Um den von Schmoelzl *et al.* (1996) beschriebenen Faktor RyREF2 im Promotorbereich des porcinen RyR1 Gens zu isolieren und charakterisieren wurde zunächst eine porcine Hirn cDNA-Bank mittels South-Western Screening (Vinson *et al.*, 1988) durchmustert. Die Bindung eines spezifischen Faktors wurde zwar für Zellextrakte aus Skelettmuskel gezeigt, RyR1 wird neben der Skelettmuskulatur aber auch in bestimmten Bereichen des Großhirns vermehrt exprimiert (Ledbetter *et al.*, 1994), und somit wurde die Expression des Faktors auch im Gehirn vermutet. Eine porcine Hirn cDNA-Bank (λ gt11) war zudem kommerziell erhältlich und machte die aufwendige Konstruktion einer cDNA-Bank zunächst unnötig.

Das Screening Verfahren wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Isolierung eukaryotischer DNA-bindender Proteine eingesetzt (Singh *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1990; Gaston und Fried, 1992; Zhang *et al.*, 1995). Dabei werden die in die Phagenarme klonierten cDNA-Fragmente nach Induktion mit IPTG exprimiert, die gebildeten Proteine auf Nitrocellulosefilter fixiert und mit der spezifischen Sonde hybridisiert. Zwei wesentliche Vorteile der verbesserten Methode von Vinson *et al.* (1988) liegen darin, daß 1) die exprimierten Proteine zunächst durch 6 M Guanidinium Chlorid denaturiert und anschließend schrittweise renaturiert werden. Dadurch wird verhindert, daß Proteine durch das Bakteriensystem anders gefaltet werden als im Eukaryotensystem und ihre Funktion verlieren. Die De- und Renaturierung *in vitro* erlaubt eine "zufällige" Renaturierung in den nativen Zustand in einem gewissen Anteil des exprimierten Proteins, der dann durch die Sonde erkannt wird. 2) Die Ligation der Sonden-DNA zu konkateren Strukturen führt zu einer stärkeren Markierung mit dem radioaktiven Nukleotid. Positive Signale sind daher leichter von unspezifischen Signalen zu unterscheiden.

Im Fall von RyREF2 handelte es sich bei der Sonde um den Promotorabschnitt -343 bis -370 (Oligo A5) relativ zum Transkriptionsstart des porcinen *RyR1* Gens, für den in Zellextrakten aus porcinem Skelettmuskel Bindungsaktivität nachgewiesen wurde. Synthetische Oligonukleotide mit dieser Basensequenz wurden zu Konkateren ligiert und Fragmente mit 10 und mehr Wiederholungen der Bindungssequenz radioaktiv markiert und in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Dies führte zur Isolierung eines 2,5 kb langen DNA-

Fragmentes (REF2λ11.2), welches zu einem großen Teil sequenziert wurde. Analysen der sequenzierten Bereiche identifizierten zwei Zinkfinger Motive vom Typ C2H2 am N-terminalen Ende des offenen Leserahmens. Zinkfinger Motive wurden als typische DNA- und RNA-bindende Strukturen beschrieben und sind in wichtigen Transkriptionsfaktoren wie Sp1 (Kadonaga *et al.*, 1987), Wt1 (Call *et al.*, 1990) oder Krox20 (Chavrier *et al.*, 1990) zu finden. Das ließ vermuten, daß es sich bei dem isolierten Fragment tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelte. Der offene Leserahmen endet an Position 1028 mit einem Stopcodon (TAA), gefolgt von einem Polyadenylierungssignal an Position 1078. Allerdings konnte kein für cDNAs typischer PolyA-Teil gefunden werden. Es wurde daher zunächst davon ausgegangen, daß es sich bei dem klonierten Fragment um einen chimären Klon, bestehend aus zwei unterschiedlichen cDNA-Fragmenten, handelt. Der Vergleich mit Eintragungen in der GenBank Nukleotid Datenbank zeigte aber bald eine 99 % Homologie mit sequenzierten Bereichen aus dem Genom von *S. cerevisiae*. In diesem Sequenzdaten-Eintrag sind zwei offene Leserahmen vorhergesagt, die durch einen 295 bp Bereich getrennt liegen. Das klonierte Fragment aus der cDNA Bank enthält Teile beider Leserahmen.

Das Vorkommen von Fragmenten aus dem Hefe-Genom in einer porcinen Hirn-cDNA Bank kann nur dadurch erklärt werden, daß von der Herstellerfirma tRNA zur effektiveren Präzipitation der Gehirn-cDNA verwendet wurde, und diese noch zum Teil mit genomischer DNA verunreinigt ist. Das Fragment wurde im richtigen Leserahmen in die Phagenarme kloniert, sodaß bei Induktion mit IPTG ein funktionelles Protein gebildet werden konnte. Ähnliche Verunreinigungen einer cDNA-Bank wurden von Stuempfle und Floros (1997) beschrieben. Bei der Analyse eines Promotorfragmentes aus dem *SP-A* Gen der Ratte, welches die Bindungsstelle für Thyroid Transcription Factor 1 (TTF-1) enthielt, wurden zwei positive cDNA-Fragmente isoliert. Ein Klon kodierte für eine DNA-bindende Untereinheit des generellen DNA Replikations-Komplexes, der andere enthielt *E. coli* Sequenzen eines Proteins, das im Rekombinationsprozeß der Bakterien eine Rolle spielt.

Die Interaktion mit der Sonden-DNA wurde höchstwahrscheinlich durch die beiden Zinkfinger-Motive vermittelt. Für die Tatsache, daß Aminosäuresequenzen aus der Hefe an DNA-Elemente eines porcinen Genpromotors binden, gibt es mehrere Erklärungen:

1. Eine Sequenzabfolge im verwendeten Promotorfragment entspricht der Bindungssequenz eines oder beider Zinkfinger motive. Da es sich bei dem isolierten Hefe-Fragment mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Transkriptionsfaktor handelt, müßten diese Bindungssequenzen in Promotorbereichen von Hefe-Genen zu finden sein. Die exakte Bindungsstelle wurde aber nicht näher untersucht. Die Interaktion zwischen Zinkfingern und DNA beruht zudem im Wesentlichen auf der Wechselwirkung von 3 Aminosäuren im α -helikalen Teil des Zinkfinger-Motivs mit 3-5 Basen auf der Erkennungssequenz (Elrod-Erickson und Pabo, 1999) und ein

genereller Code für die Basenerkennung der einzelnen Aminosäuren in Zinkfingern konnte trotz intensiver Vergleiche bis jetzt nicht gefunden werden (Wolfe *et al.*, 1999).

2. Die Bindung eines Proteins an die DNA wird zwar im Wesentlichen durch die Bindungsmotive vermittelt, jedoch beeinflusst auch die Gesamtstruktur die Bindungseigenschaften eines Transkriptionsfaktors. Das isolierte Fragment stellt nur einen Teil eines größeren Proteins dar und könnte deshalb aufgrund fehlender Strukturen besseren Zugang zu DNA-Sequenzen finden als im nativen Zustand. In vielen Zinkfinger Proteinen sind mehr Zinkfinger-Motive vorhanden, als für die DNA-Bindung benötigt werden. Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor TF IIIA, wo nur drei der vorhandenen Motive die DNA-Interaktion bewirken (Theunissen *et al.*, 1992). Allerdings beinhaltet der gesamte offene Leserahmen des Hefe-Fragments YNL027w nur die beiden beschriebenen Zinkfinger motive. In diesem Zusammenhang wurde auch nicht weiter untersucht, ob das Promotorfragment A5 mit dem Volllänge-Protein aus *S. cerevisiae* interagieren würde.

3. Die Denaturierung und schrittweise Renaturierung der exprimierten Proteine im Genbank-Screen bewirkt eine Sekundärstruktur des Peptids, die eine Bindung an die DNA ermöglicht. Diese Struktur entspricht aber nicht dem nativen Zustand und es können damit keine Zusammenhänge zwischen der Funktion des Proteins in der Hefe und seinen Bindungseigenschaften bezüglich des verwendeten Fragments gezogen werden.

4. Es ist nicht klar, ob nur eines oder beide Zinkfinger-Motive an die DNA Sequenz binden. In jedem Fall könnte die 31 bp Sonde die "optimale" Bindungssequenz beinhalten und eine Interaktion ermöglichen. Diese Bindungssequenz muß nicht der natürlichen Sequenz in Hefe-Promotoren entsprechen, denn die Affinität eines Transkriptionsfaktors für sein Bindungselement ist auch ein bedeutender Faktor in der Regulation der Genexpression.

Über die Funktion der nativen Proteine auf den Hefe-Fragmenten YNL027w und YNL029c konnte bis jetzt noch keine Aussagen getroffen werden. Neben den beiden Zinkfinger motiven im mutmaßlichen Transkriptionsfaktor wurde aber noch eine Polyglutamin-reiche Region im N-terminalen Bereich des Proteins identifiziert. Solche Polyglutamin-reichen Regionen sind in mehreren Hefe-Proteinen mit regulatorischer Funktion beschrieben und könnten bei der Transaktivierung von Genen von Bedeutung sein (White *et al.*, 1991; Xiao und Jeang, 1998).

Der zweite auf dem klonierten Fragment enthaltene Teil eines offenen Leserahmens enthält keine DNA bindenden Motive und wurde in den South-Western Versuchen wahrscheinlich nicht exprimiert, da in der Zinkfinger-Sequenz bereits ein Stop-Codon vorhanden ist. Diese Sequenz ist Teil des kodierenden Bereichs für Mannosyltransferase KTR5 (Lussier *et al.*, 1997b). Diese Gruppe von Mannosyltransferasen stellt Transmembranproteine in den Golgi Vesikeln dar und bewerkstelligt die O-Glykosylierung posttranslational modifizierter Protein in *S. cerevisiae*

(Lussier *et al.*, 1997a). Allerdings könnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Zinkfinger-Protein und der Mannosyltransferase bestehen. Da die beiden Gene nur durch 295 bp voneinander getrennt liegen, ist die Regulation durch ein gemeinsames Promotorelement sehr wahrscheinlich. Solche "Operons", ähnlich denen in Prokaryoten, wurden auch in eukaryotischen Genomen beschrieben (Blumenthal, 1998; Zhang und Smith, 1998; Niehrs und Pollet, 1999).

6.1.1.2 Screening einer Skelettmuskel cDNA-Bank

Im Skelettmuskel ist der Ryanodin Rezeptor 1 wesentlich am EC-Kopplungsmechanismus und damit der Muskelkontraktion beteiligt. Im Gehirn ist die genaue Funktion des Rezeptors unklar (Giannini *et al.*, 1995). Es war daher nicht auszuschließen, daß der gesuchte Faktor speziell für die Regulation der Expression in der Skelettmuskulatur benötigt wird, und im Gehirn keine Funktion besitzt. Daher wurde eine porcine Skelettmuskel cDNA-Bank konstruiert und diese erneut mit dem Promotorfragment A5 hybridisiert. Es konnten aber keine positiven Signale identifiziert werden.

Um eine Bindung im South-Western Verfahren nachweisen zu können, müssen die klonierten cDNA-Fragmente in der richtigen Orientierung und im entsprechenden Leserahmen in die Vektorarme kloniert werden. Bei nicht gerichteter Klonierung beträgt der Anteil an Sequenzen, die richtig exprimiert werden, nur etwa 8 %. Die Orientierung der Fragmente kann durch die Klonierungsstrategie beeinflußt werden, wodurch der Anteil an korrekt gebildetem Protein um etwa einen Faktor zwei verbessert wird (Davis und Benzer, 1997). Die Klonierung im richtigen Leserahmen ist nicht zu beeinflussen und stark abhängig von der optimalen Behandlung der verwendeten RNA.

RNA ist in den Reaktionen schwieriger zu handhaben als DNA, da hier ständig die Gefahr eines Abbaus durch RNAsen besteht. Auch werden durch die Homogenisierung des Gewebes und durch Pipettierschritte lange RNA-Moleküle zerstört. Weiters synthetisiert die reverse Transkriptase, besonders bei sehr langen mRNAs, manchmal nicht bis zum Ende des Transkripts. Die Stabilität des RNA-RT Komplexes ist zwar durch optimale Inkubationsbedingungen positiv zu beeinflussen, das Enzym wird aber dennoch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vor Ende des Transkripts die Synthese beenden. Damit würde später der Translationsapparat der Bakterien das erste ATG als Startpunkt der Translation wählen. Dieses Triplet kann aber in jedem beliebigen Leserahmen vorkommen und es würde damit ein nicht natives Protein oder Peptid gebildet. Das eigentliche Protein wäre im South Western Verfahren nicht nachzuweisen.

Nach dem Transfer der gebildeten Proteine auf Nitrocellulose-Filter wurde eine De- und Renaturierung der transferierten Proteine durchgeführt. Dabei sollten Sekundärstrukturen aufgelöst werden, die durch das prokaryotische Expressionssystem zu nicht funktionellen Proteinen führen. Die Renaturierung erfolgte durch schrittweises Verdünnen der chaotropen Substanz. Dies kann bei einigen Proteinen zu einer Konformation führen, die nicht dem nativen Zustand in der Zelle entspricht. Das Protein verliert seine Funktionalität und kann nicht mehr nachgewiesen werden.

Eine cDNA-Bank repräsentiert die Gesamtmenge an exprimierten Genen einer bestimmten Zelle oder eines Gewebes zu einem definierten Zeitpunkt. Die porcine Skelettmuskel cDNA-Bank wurde aus dem Gewebe eines 4 Wochen alten Ferkels erstellt und repräsentiert damit hauptsächlich den Genbestand in differenzierten Muskelzellen. Die Retentionsversuche von Schmoelzl *et al.* (1996) wurden zwar ebenfalls mit Gewebeproben eines Ferkels durchgeführt, aber dieser Test beruht auf dem Nachweis des Proteins und nicht der transkribierten RNA. Wie bei TF IIIA könnte die Expression des Gens zu einem früheren Zeitpunkt stattfinden und es anschließend zu einer Lagerung des Proteins in der Zelle kommen (Theunissen *et al.*, 1992). In diesem Fall wäre keine RNA in den Zellen nachzuweisen und die cDNA nicht in der Genbank vertreten.

Selbst Fragmente eines Proteins besitzen Bindungsaktivität, wie die Interaktion des Hefe-Fragments oder viele Untersuchungen über Bindungsdomänen durch Verkürzen der Gesamtproteine zeigen. Es könnte sich bei der nachgewiesenen Bindung von RyREF2 auch um bereits im Abbau befindliche Protein-Fragmente handeln, die durch den Zellaufschluß aus ihren Kompartimenten freigesetzt wurden.

Nicht zuletzt können suboptimale Hybridisierungs- und Waschbedingungen der Filter zu einem Verlust der Signale führen. Die Signalintensität der Filter wurde allerdings bei jedem Waschschrift mit dem Geigerzähler kontrolliert.

Damit stellt die Hybridisierung von exprimierten Proteinen im South Western Verfahren zwar eine geeignete Methode zur Identifizierung von DNA bindenden Sequenzen dar, die dargestellten Gründe für ein negatives Ergebnis eines solchen Screens und die Möglichkeit der Isolierung von Artefakten darf aber nicht außer Acht gelassen werden.

6.1.2 Homologe Bereiche aus dem Hefe-Fragment sind nicht im Schwein zu finden

Da die Interaktion des Oligos A5 mit dem exprimierten Proteinfragment doch sehr spezifisch zu sein schien, wurden PCRs mit Primern aus dem Hefe-Fragment auf genomischer Schweine

DNA und RT-PCRs auf RNA aus Gehirn und Muskel durchgeführt. Dabei wurden die Positionen der Primer so gewählt, daß sie außerhalb des Zinkfingerbereichs lagen. Primer-Kombinationen innerhalb der Zinkfinger-Domänen hätten möglicherweise zur Amplifikation vieler Zinkfingersequenzen aus dem Genom geführt. In keiner der Reaktion trat ein PCR-Signal auf.

Das negative Ergebnis kann einerseits dadurch erklärt werden, daß die gewählten Primer größere Intronbereiche umspannen, die mit herkömmlicher *Taq*-Polymerase nicht amplifizierbar sind. Andererseits kann die Identität zwischen zwei homologen Genen in Hefe und Schwein so gering sein, daß die Primer aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenz auf Schweine DNA und RNA nicht binden können.

Daher wurde eine genomische Schweinebank mit einem Fragment hybridisiert, das außerhalb des Zinkfingerbereichs lag, aber auch hier konnten keine positiven Signale gefunden werden. Das bedeutet, daß es im Schwein keine Sequenzen gibt, die eine ausreichende Homologie zu den isolierten Hefesequenzen besitzen, um durch PCR oder Hybridisierung nachgewiesen werden zu können. Die Bindung des exprimierten Fragments beruht damit auf der Spezifität der Zinkfingersequenzen und kann rein zufällig sein. Ein weiterer Versuchsansatz hätte darin bestehen können, die genomische DNA-Bank oder die cDNA-Bank mit dem Zinkfinger-Bereich zu hybridisieren und erhaltene Klone weiter zu untersuchen. Dieser Ansatz wurde nicht weiter verfolgt, da jeder Klon auf seine Bindungseigenschaften untersucht hätte werden müssen. Zudem bestand die Möglichkeit, über protein-biochemische Methoden den Faktor direkt zu isolieren. Es wurde daher beschlossen, über biochemische Aufreinigung das Protein zu isolieren und durch eine teilweise Aminosäuresequenz das Gen zu charakterisieren.

6.1.3 Zell- und Kernextrakte aus porcinem Skelettmuskelgewebe zeigen Bindungsaktivität

Aus dem Skelettmuskelgewebe von Ferkeln wurden Gewebhomogenate hergestellt und diese mit 50 % Glycerin bei -80 °C gelagert. Der Zusatz von Glycerin bewirkte eine Stabilisierung der Kernstruktur und es konnten in weiterer Folge intakte Kerne aus den eingefrorenen Homogenaten gewonnen werden. Der Vorteil dieses Vorgangs lag darin, daß größere Mengen an Gewebe gleichzeitig aufgearbeitet werden konnten und die Kernpräparation anschließend mit kleineren Mengen durchgeführt wurde. Dies war notwendig, da die Kapazität der Ultrazentrifuge auf 6 X 36 ml beschränkt ist und damit pro Präparation nur etwa 250 ml Homogenat mit einem Gewebeanteil von 12 g aufgearbeitet werden konnten. Eine längere Lagerung (1 Tag) bei 4 °C führte bei Gewebhomogenaten bereits zu einer starken Abnahme der

Bindungsaktivität und diffuseren Banden im Retentionsgel, was auf proteolytischen Abbau während dieser Zeit hindeutet. Die Lagerung von Geweben und deren Homogenaten bei unterschiedlichen Temperaturen wurde in Bezug auf die Aktivität von Enzymen bereits mehrfach untersucht und zeigte, daß die Funktion von Proteinen, die in bestimmten Kompartimenten der Zelle auftreten, kaum durch den Einfriervorgang beeinträchtigt wird (Stahl und Swanson, 1975; Prento, 1997).

Sowohl die Gewebehomogenate als auch Kernextrakte zeigten in der Retentionsanalyse die bei Schmoelzl *et al.* (1996) beschriebene Bindungsaktivität. Diese Interaktion wurde durch den unspezifischen Kompetitor PolydIdC nicht beeinflusst. Die Methode des Zellaufschlusses und der Kernpräparation schien somit geeignet für die weitere Aufreinigung des Faktors.

Als ersten Reinigungsschritt wurde fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, wobei die höchste Bindungsaktivität in den Fraktionen mit 50 - 60 % Sättigung auftrat. Teilweise dabei beobachtete Doppelbanden in den Retentionsgelen wurden als Hinweis darauf gedeutet, daß das Protein als Homo- oder als Heterodimer bindet. Die niedrigere Bande wäre dadurch zu erklären, daß das Protein auch als Monomer Bindungsaktivität besitzt. Ein Beispiel für eine solche Dimerbildung ist der Thyroid Hormon Rezeptor, welcher als Monomer, als Homodimer und als Heterodimer mit seiner palindromischen Bindungssequenz interagieren kann und damit Gene reguliert, die in ihrer Expression von Thyroid Hormon abhängig sind (Lazar *et al.*, 1991). Heterodimerbildung ist auch ein wichtiger Prozeß der Genregulation im Skelettmuskel und kann sowohl aktivierend, wie beim Komplex MyoD/E-Protein, als auch reprimierend (MyoD/Id-Protein; MyoD/Mist1) wirken (Benezra *et al.*, 1990; Lemercier *et al.*, 1998). Eine solche synergistische Bindung von Proteinen wurde aufgrund der Retentionsanalysen auch von Schmoelzl *et al.* (1996) vermutet. Der Promotorabschnitt A5 liegt in unmittelbarer Nähe der Bindungsstelle für MEF2 und bei Kompetition der Retentionsansätze mit einem Fragment, das die MEF2 Bindungsstelle enthält, wurde die Bindung von RyREF2 verstärkt. Es wurde daher angenommen, daß die Interaktion von RyREF2 und MEF2 die Bindung stabilisiert und verstärkt.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der Doppelbanden wäre das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Faktoren, die an das gleiche Bindungsmotiv binden und zudem ähnliche Fällungseigenschaften in Bezug auf Ammoniumsulfat aufweisen. Einer dieser Faktoren könnte dann als Repressor, der andere als Aktivator fungieren. Ein solches Repressor/Aktivator System wurde in Muskelzellen für die Mitglieder der bHLH Familie und den Transkriptionsfaktor ZEB beschrieben, die beide an E Box-Motive binden können (Postigo und Dean, 1997) und so die spezifische Expression von Genen steuern, die durch myogene bHLH Proteine in ihrer Aktivität reguliert werden.

Um die Bindungseigenschaften des Proteins genauer zu untersuchen, wurden DNase Footprints, Bindungsversuche mit Subfragmenten aus Oligo A5 und Kompetitionsversuche mit Zink-chelatierenden Reagenzien durchgeführt.

Die DNase Footprint Analyse führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, da keine Bereiche definiert werden konnten, die für DNase durch Bindung eines Proteins nicht mehr zugänglich wären. Dies wurde daraufhin zurückgeführt, daß die Proteinproben noch zu viele Unreinheiten enthielten und unspezifische Interaktionen mit Proteinen zu den verminderten Signalen in einigen Proben geführt haben könnten.

Die Bindungsversuche mit den Subfragmenten ergaben, daß der Faktor mit allen drei verwendeten Oligonukleotiden zu interagieren im Stande ist. Es wurde daher nach Sequenzmotiven gesucht, die auf allen Fragmenten zu finden sind. Bei der Analyse der Oligonukleotidsequenz aus A5-3 in der TRANSFAC Datenbank zeigten sich zwar keine bekannten Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren aus höheren Eukaryoten, aber es wurden zwei Sequenzmotive für die Bindungsstelle des Hefe-Proteins ADR1 in gegenläufiger Orientierung identifiziert. Jeweils eines dieser Motive ist auch auf den mit Oligo A5-3 überlappenden Bereichen der Subfragmente A5-1 und A5-2 zu finden. Für ADR1 ist bewiesen, daß es als Homodimer an seine palindromische Erkennungssequenz bindet und nur so in der Lage ist, das Zielgen zu transaktivieren. ADR1 ist ein Zinkfingerprotein mit zwei Zinkfinger-Motiven und kann in Bindungsstudien sowohl als Monomer als auch als Dimer mit seiner Zielsequenz interagieren (Thukral *et al.*, 1991). Es ist zwar nicht zu erwarten, daß homologe Proteine zu ADR1 mit dem Erkennungsmotiv in Oligo A5 wechselwirken, zumal bis jetzt auch keine solchen Proteine in höheren Organismen charakterisiert wurden, aber die Untersuchung zeigt, daß die Möglichkeit einer potentiellen Interaktion von Transkriptionsfaktoren besteht, welche in ähnlicher Weise wirken. Die Erkenntnisse aus den Studien um ADR1 beweisen auch, daß es theoretisch möglich ist, an allen drei Subfragmenten Signale zu erhalten. Diese lassen sich durch Interaktion der Monomere mit dem Oligonukleotid erklären. Bei den Versuchen mit Oligo A5-3 sollten sich bei dieser Theorie zwar in den Retentionsgelen Doppelbanden zeigen, jedoch könnte dies durch einen Überschuß an Zielsequenz oder ungünstige Pufferbedingungen verhindert worden sein. Die teilweise auftretenden Doppelbanden bei den Untersuchungen der mit Ammoniumsulfat gefällten Proben würden aber dadurch bestätigt.

Auf dem Oligo A5-3 wurde weiters die Konsensussequenz für die Bindungsstelle eines Hitzeschockfaktors aus *Drosophila* identifiziert. Die Erkennungssequenz ist allerdings so gelegen, daß sie auf den anderen beiden Subfragmenten nur zum Teil erhalten ist. Es ist daher in beiden Fällen ein Ausfall oder ein Abschwächen der Signale zu erwarten, was in keiner der Retentionsbanden zu beobachten war.

Da es immer mehr Hinweise darauf gab, daß es sich bei dem interagierenden Protein um einen Faktor mit Zinkfingermotiven handelt, wurde die Auswirkung der beiden Chelat-Bildner *1,10-o*-Phenantrolin und EDTA auf die Bindungseigenschaften getestet. Beide Salze binden divalente Kationen und entziehen demnach Zinkfinger Proteinen das Zn^{2+} . Sie verlieren damit ihre dreidimensionale Struktur und eine Interaktion mit DNA ist nicht mehr möglich. Dieses Verfahren wird dazu verwendet, nachzuweisen, daß es tatsächlich die Zinkfingerstrukturen eines Proteins sind, welche die DNA Bindung vermitteln (Czupryn *et al.*, 1992; Lange *et al.*, 1995; Dalton *et al.*, 1997; Kisu *et al.*, 1998).

Beide Substanzen zeigten keinen Einfluß auf die Bindungsaktivität des Proteins. Daraus ist zu schließen, daß die Interaktion nicht auf der Funktion von Zinkfingermotiven beruht, oder in den verwendeten Proteinhomogenaten genug freie, divalente Kationen vorhanden sind, um alle Bindungsstellen in den Chelator-Molekülen abzusättigen.

6.1.4 Rohe Kernextrakte zeigen verstärkte Bindungsaktivität mit Oligo A5

Zur weiteren Auftrennung der Proteinproben wurden Ionentauscher-Chromatographiesäulen eingesetzt. Dies erforderte allerdings eine neue Methode der Proteinpräparation, da Muskelhomogenate zu viel partikuläres Material enthalten, welches die Säulen blockiert hätte. Die Zellkerne sowie Zellpartikel wurden zunächst durch Zentrifugation pelletiert und anschließend mit Hochsalzpuffer extrahiert. Nach weiteren Zentrifugations- und Filtrationsschritten blieb ein klarer Überstand mit den extrahierten Proteinen zurück.

In Retentionsgelen zeigte der Proteinüberstand Bindungsaktivität, wobei gegenüber dem Parallelansatz mit Zellhomogenaten drei weitere Signale auftraten. In Zellhomogenaten sind neben Kernproteinen auch viele zytoplasmatische Proteine vertreten, die einerseits die Konzentration an Kernproteinen in einem definierten Volumen verringern, andererseits durch spezifische oder unspezifische Interaktion mit Kernproteinen die Bindung an DNA verhindern können. In den rohen Kernextrakten sollten primär extrahierte Kernproteine und Proteine der pelletierten Zellkompartimente vorhanden sein, und damit eindeutigere Signale liefern. Im einfachsten Fall ließen sich die vier Banden durch Dimerbildung der interagierenden Proteine erklären. Das erhaltene Muster von jeweils zwei dicht zusammenliegenden Banden, die durch einen größeren Abstand voneinander getrennt sind, könnte durch Dimerbildung von zwei unterschiedlichen Proteinen zustande kommen. Das würde für ein Aktivator/Repressor Modell sprechen, wobei beide Faktoren als Dimere binden. Andere Erklärungsmöglichkeiten liegen im Vorhandensein von akzessorischen Proteinen, die nicht direkt mit der DNA interagieren, sondern mit dem Transkriptionsfaktor über Protein-Protein Interaktion in Wechselwirkungen

treten und die Aktivität modulieren. Solche Multiproteinkomplexe spielen in der generellen Transkriptionsaktivierung (Shilatifard, 1998) und in der DNA-Replikation (Kelly *et al.*, 1994) eine wichtige Rolle. Wie bereits erwähnt, wurde von Schmoelzl *et al.* (1996) eine direkte Interaktion von RyREF2 mit MEF2 vermutet. MEF2 wiederum interagiert synergistisch mit anderen Faktoren wie Kinasen (Yang *et al.*, 1998), Sp1 (Krainc *et al.*, 1998), bHLH-Faktoren und dem Thyroidhormon Rezeptor (Brand, 1997; Black *et al.*, 1998), um die Transkription der entsprechenden Gene zu regulieren. Solche Multiproteinkomplexe können in der Retentionsanalyse bei optimalen Bedingungen in Erscheinung treten.

Neben der Retentionsanalyse wurde noch ein weiteres Nachweissystem über Immobilisierung der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen verwendet (Majumdar *et al.*, 1996). Die Untersuchung der Bindungsaktivität mit Dot-Blot wurde eingeführt, weil durch die Auftrennung über größere Chromatographiesäulen sehr viele Einzelaktionen anfallen, die getestet werden müssen. Durch Aufspotten auf Nitrocellulose-Membranen können sehr viele Einzelproben gleichzeitig unter denselben Bedingungen untersucht werden. Ein weiterer Vorteil der Dot-Blot Technik liegt darin, daß die Bindung unabhängig von der Salzkonzentration der Probe erfolgt, da die Flüssigkeit abgesaugt und der Blot nach Aufbringen der Probe gewaschen wird. Auf der Membran bleiben nur die Proteine zurück. Das ist vor allem von Vorteil, wenn der Faktor erst bei sehr hohen Salzkonzentrationen von einer Chromatographie-Säule eluiert und diese hohen Konzentrationen in weiterer Folge den Nachweistest beeinträchtigen. Weiters können bei Dot Blots größere Volumina an Probenlösung auf einer relativ kleinen Fläche aufgebracht werden. Das ist bei sehr niedrig konzentrierten Proben oder geringer Konzentration des gesuchten Faktors von Vorteil. In den Retentionsanalysen ist man hier abhängig vom Fassungsvermögen der Geltasche. Ein Nachteil des Dot Blot Verfahrens ist allerdings, daß unterschiedliche Signalbanden nicht erkannt werden können. Die Methode sollte daher zur Vorselektion bindungsaktiver Fraktionen verwendet werden und diese dann im Retentionsgel nachkontrolliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung mit Hilfe von radioaktiv markierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Es ist aber durchaus möglich, daß man bei dieser Art von Nachweis auch Fluoreszenzfarbstoffe oder andere, für den Farbnachweis geeignete Liganden, für die DNA Markierung verwendet und damit die Notwendigkeit radioaktiver Arbeiten reduziert.

6.1.5 Bei der Auftrennung von Proteinhomogenaten über Ionentauscher-Säulen sind einzelne Fraktionen bindungsaktiv

Die Präparation von groben Kernextrakten ermöglicht eine schnelle Herstellung von bindungsaktiven Proteinlösungen, die auf Chromatographiesäulen aufgebracht werden können. Der Nachteil besteht allerdings darin, daß die Lösung sehr hohe Salzkonzentrationen enthält, und in dieser Form ungeeignet für die Applikation auf Ionentauschersäulen ist. Eine Methode zur Verringerung der Salzkonzentration ist die Dialyse. Aufgrund der Probenmenge und der Möglichkeit des Proteinabbaus wurden die Proben nicht dialysiert, sondern die Salzkonzentration durch Verdünnung mit Bindungspuffer gesenkt. Die Proben wurden entweder mit dem Pumpensystem der FPLC-Anlage auf die Säule aufgebracht, oder mit entsprechenden Mengen an Bindungspuffer ohne KCl im Batch-Verfahren an das Säulenmaterial gebunden. Da Ionentauschersäulen, im Gegensatz zu Gelfiltrationssäulen, bei der Beladung unabhängig vom Probenvolumen sind, sondern alleine die Konzentration an bindenden Substanzen ausschlaggebend ist, stellt diese Form der Proteinapplikation die einfachste Methode dar.

Eine erste Auftrennung erfolgte über PEI-Cellulose in zwei Elutionsstufen (200 mM und 800 mM KCl) sowie einem Gradienten von 800 mM - 2 M KCl. Die eluierten Fraktionen wurden zunächst im Dot-Blot getestet. Dazu wurden die Proben der beiden Elutionsstufen mit Ammoniumsulfat gefällt, die Fraktionen des Gradienten direkt auf die Membran aufgebracht. Neben einem starken Signal bei der ungefällten und gefällten 800 mM Fraktion traten in den Proben des linearen KCl-Gradienten ebenfalls bindungsaktive Eluate auf. Diese wurden vereinigt, mit Ammoniumsulfat gefällt und im Retentionsgel getestet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Dot-Blots konnten hier keine Signale identifiziert werden. Ebenso zeigte die ungefällte 800 mM KCl - Probe keine Bindungsaktivität. Zudem wurden bei keiner der ungefällten Proben freie Oligonukleotide beobachtet. Es war daher anzunehmen, daß keine Oligonukleotide oder DNA - Protein-Komplexe in die Gelmatrix eingelaufen waren. Diese Tatsache konnte nur dadurch erklärt werden, daß zusammen mit den Proteinfractionen PEI-Moleküle eluiert wurden, die im Reaktionsansatz sowohl freie als auch gebundene Sonden-DNA präzipitierten. Die Komplexe waren daher nicht in der Lage, in das Gel einzuwandern. Bei der Dot-Blot Analyse wurden diese PEI-Moleküle durch den Waschvorgang vor der Hybridisierung entfernt und es kam dadurch zu keiner Interaktion mit der Sonden-DNA. Die im Dot-Blot positiven Proben aus der Gradientenelution enthielten DNA, die bei hohen Salzkonzentrationen von PEI-Cellulose eluiert wird. Diese DNA wurde an die Nitrocellulose

gebunden und einzelsträngige Abschnitte hybridisierten möglicherweise unspezifisch mit einzelsträngigen, markierten Oligonukleotiden.

Da das eluierte PEI den Nachweis der Bindungsaktivität im Retentionsgel erheblich erschwerte, wurde PEI - Cellulose nicht mehr für die Auftrennung verwendet.

Weitere Kernprotein-Präparationen wurden durchgeführt und die Proteine auf Ionenaustauscher-Säulen mit TMAE als Trägermaterial getrennt. In einem ersten Ansatz wurde die Säule in einem Gradienten (50 mM bis 2 M KCl) über nur vier Säulenvolumen eluiert. Dies führte zu zwei sehr eng aneinander liegenden Protein-Peaks, wobei in der Dot-Blot Analyse positive Fraktionen sowohl im ersten als auch im zweiten Peak zu beobachten waren. Ähnlich den Proben der PEI-Elution waren auch hier nur die Eluate des ersten Peaks im Retentionsgel positiv. Die Fraktionen fielen allerdings durch eine starke Trübung auf, die von Lipoproteinkomplexen stammen könnte. Für High Density Lipoprotein (HDL) wurde gezeigt, daß es nach Auftrennung auf Chromatographiesäulen in den entsprechenden Fraktionen zu einer Trübung der Eluate kommt (Olofsson und Gustafson, 1976; Rajaram und Barter, 1986). HDL Komplexe werden hauptsächlich im Serum nachgewiesen, konnten aber auch aus Skelettmuskelhomogenaten isoliert werden, da HDL im Skelettmuskel in den interstitiellen Bereichen auftritt (Sloop *et al.*, 1993). Weitere, nicht lösliche Komponenten könnten Membranproteine mit oder ohne Lipidanteil sein, die aufgrund ihrer Hydrophobizität im wässrigen Milieu ohne Zusatz von Detergenz aggregieren (Seppen *et al.*, 1995).

Die bindungsaktiven Fraktionen wurden deshalb erneut über TMAE aufgetrennt, es erfolgte allerdings keine Abtrennung von den getrüben Fraktionen, woraufhin den Proteinproben Detergenz zugesetzt wurde. Die Zugabe von Tween-20 oder Nonidet P-40 beeinflusste die Bindungsaktivität im Retentionsgel nicht, führte aber zu einem Verlust der Detektierbarkeit auf Nitrocellulose-Membranen. Wahrscheinlich werden die Bindungsdomänen bei den Proben im Dot-Blot durch das Detergenz blockiert, wohingegen beim Retentionsgel im flüssigen Milieu der Bindungsreaktion die Sonden-DNA die Mizellenstruktur aufbrechen und mit den Proteinen interagieren kann. Der Zusatz von nicht ionischem Detergenz bei der Kernextraktion kann zudem die Ausbeute an bindungsaktivem Protein erhöhen (Caruccio und Banerjee, 1999).

Bei der folgenden Auftrennung der positiven TMAE Fraktionen über eine Heparinsepharose-Säule konnte in den eluierten Fraktionen zwischen 260 mM und 380 mM KCl Bindungsaktivität festgestellt werden. Eine Eintrübung der Fraktionen trat durch Zusatz des Detergenz Nonidet-P40 nicht mehr auf.

6.1.6 Affinitätschromatographie führt zu keiner Konzentrierung des bindungsaktiven Faktors

Viele Protokolle zur Proteinisolation beinhalten Affinitätschromatographie als finalen Schritt bei der Aufreinigung bestimmter Faktoren. Dies setzt voraus, daß man geeignete Liganden wie Antikörper oder interagierende Proteine kennt. Im Falle von DNA-interagierenden Proteinen wird die Bindungssequenz als Ligand bei der Aufreinigung eingesetzt (Eisenberg *et al.*, 1990). Der Versuch, den bindungsaktiven Faktor über Affinitätschromatographie der positiven Heparin Probe HS5 aufzureinigen und zu konzentrieren, war nicht erfolgreich. Das 400 mM KCl - Eluat zeigte zwar Bindungsaktivität, die Intensität der Retentionsbande war aber im Vergleich zur Ausgangsprobe geringer und der Versuch brachte keinen Reinigungseffekt. Bindungsaktivität konnte in keinem weiteren getesteten Eluat oder in den Waschfraktionen nachgewiesen werden. Dafür gibt es mehrere Erklärungen. Entweder ist das Protein zum größten Teil auf der Säule zurückgeblieben, oder es wurde während der Reinigung von Proteasen abgebaut. Weiters könnte die bindungsaktive Konformation gestört oder Co-Faktoren entfernt worden sein. Da die Pufferbedingungen im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen gleich blieben, sind Veränderungen der Proteinstruktur eher unwahrscheinlich. Auch Protease-Abbau ist auszuschließen, da nur sehr geringe Mengen bearbeitet wurden und die Versuchszeit, im Vergleich zur Ionentauscher-Chromatographie, sehr kurz war. Ein Verbleiben auf der Affinitätssäule ist nur durch extrem starke Interaktion des Faktors mit der DNA oder durch Aggregatbildung zu erklären.

Das Prinzip der Affinitätschromatographie ist die spezifische Interaktion einer Substanz mit seinem Liganden, das Prinzip der Ionentauscherchromatographie beruht hauptsächlich auf den Unterschieden in der Nettoladung von Proteinen. Es wäre daher möglich, daß benötigte Co-Faktoren in der Ionentauscher-Chromatographie aufgrund gleicher Eigenschaften in denselben Fraktionen eluieren wie der bindungsaktive Faktor. Bei der Affinitätschromatographie könnten diese Co-Faktoren aber durch die Wasch- und Elutionsbedingungen nicht mehr vorhanden sein. Der bindungsaktive Faktor verliert seine Affinität, wird eluiert und ist nicht mehr im Retentionsgel nachzuweisen. Mehrere Signalbanden in manchen Retentionsgelen weisen auf mögliche Cofaktoren hin. Zwar wurde für die niedrigste Bande immer angenommen, daß es sich dabei um die Interaktion eines einzigen Proteins mit der DNA handelt, es könnte sich aber auch um einen Dimerkomplex handeln, dessen Bindung vom Vorhandensein beider Faktoren abhängig ist. Weitere akzessorische Proteine würden unter günstigen Reaktionsbedingungen mit diesem Protein - DNA Komplex interagieren und somit die höher geschifteten Banden erklären. Ein Beispiel für einen solchen Heterodimer-Komplex ist das Mec3/UNC-86 System in *C. elegans*. Das LIM-Homeodomain Protein Mec3 kann ohne das POU-Homeodomain Protein

UNC-86 *in vitro* nicht mit seiner Bindungssequenz im *mec3* Gen interagieren. Erst wenn beide Proteine vorhanden sind, kommt es zur Aktivierung des Gens (Lichtsteiner und Tjian, 1995).

6.1.7 Reine Kernpräparationen zeigen Bindungsaktivität für Sp1, spezifische Aktivität für RyREF2 kann nicht nachgewiesen werden

In neuerlichen Kernpräparationen diente der ubiquitäre Transkriptionsfaktor Sp1 als Referenzprotein. Der Faktor ist als rekombinantes Protein kommerziell erhältlich und bietet damit eine eindeutige Referenz für Kernpräparationen in Retentionsgelen. In den zunächst verwendeten Kernpräparationen konnte kein Sp1 nachgewiesen werden. Erst als die Präparationsmethode dahingehend geändert wurde, daß die Extraktion der Proteine in nur 1/10 des Salzpuffers stattfand, kam es zu einem Nachweis von Sp1 in diesen Kernextrakten. Für Oligo A5 konnte in diesen Präparationen keine spezifische Bande identifiziert werden.

In den ursprünglichen Kernextrakten traten zwar Retentionsbanden bei Sp1 und Oligo A5 auf, die sich durch PolydIdC nicht kompetitieren ließen, diese Banden verschwanden aber in beiden Fällen durch Zugabe von DNA aus *E. coli*. Da die Signale in gleicher Höhe und abweichend vom Signal des rekombinanten Sp1 Proteins auftraten, wurde daraus geschlossen, daß es sich um eine unspezifische Interaktion handelt. Solche Kernextrakte wurden auch in den Untersuchungen von Schmoelzl *et al.* (1996) verwendet. Es wurde allerdings kein Referenzprotein eingesetzt, und die unspezifische Kompetition erfolgte nur mit synthetischem PolydIdC sowie PolydAdT. Es ist also möglich, daß die beschriebene Interaktion durch einen unspezifischen, DNA-bindenden Faktor hervorgerufen wird. Das Autoantigen Ku ist ein Kernprotein, das als Heterodimer mit DNA-Enden wechselwirkt und als unspezifische Bande in Retentionsanalysen auftreten kann (Klug, 1997). Ku Protein besteht aus zwei Untereinheiten mit 70 und 80 kDa. Zwei Bindungsdomänen in der Ku p70-Untereinheit vermitteln die Interaktion mit DNA, wobei die N-terminale Domäne die 80 kDa - Untereinheit benötigt, um an DNA binden zu können. Die C-terminale Untereinheit ist unabhängig davon. Beide Domänen müssen aber intakt sein, um in Retentionsanalysen Bindungsaktivität zu zeigen. Ku Protein ist wiederum Teil eines größeren Proteinkomplexes: der DNA Dependend Protein Kinase (DNA-PK), die neben dieser DNA-bindenden Einheit noch aus einer großen katalytischen Einheit besteht. Bei Fehlen von DNA-PK kommt es zu einer UV-Sensibilität und Defekten in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen sowie der V(D)J Rekombination. Weitere akzessorische Proteine wurden ebenfalls beschrieben (Ting *et al.*, 1998) und zumindest die 70 kDa Untereinheit scheint mit der Kernmatrix zu interagieren (Allaway *et al.*, 1990). Alle diese Eigenschaften machen das Protein zu einem Kandidaten für die Interaktion mit dem Oligo A5.

Diese Wechselwirkung scheint unspezifisch zu sein, da sie bei allen drei Subfragmenten von Oligo A5 aufgetreten ist. Retentionsbanden in Versuchen mit Gesamtzellextrakten könnte damit erklärt werden, daß Ku Protein auch im Cytosol nachgewiesen wurde (Bakalkin *et al.*, 1998).

Ob auch andere DNA-bindende Proteinkomplexe unspezifisch mit doppelsträngigen Oligonukleotiden in Retentionsanalysen interagieren, ist nicht klar. Möglich wäre dies für DNA-Rekombinations-Komplexe, DNA-Ligations-Komplexe oder andere DNA-Reparatursysteme, die von ihrer Funktion her sequenzunabhängig binden müßten.

Weiters könnte die unspezifische Interaktion auch durch cytosolische Komponenten, die in Kernpräparationen nur als Verunreinigungen in Erscheinung treten, zustande gekommen sein. Ein indirekter Hinweis darauf, daß DNA-interagierende Proteine auch außerhalb des Zellkerns vorhanden sind, liefern Transfektions-Experimente mit reiner DNA zur Gentherapie. Vor allem in Muskelgeweben konnten hier gute Ergebnisse erzielt werden (Wolff *et al.*, 1990). Dabei muß ein Mechanismus existieren, der DNA in die Zellen aufnimmt und sie bis zum Zellkern transportiert. Dies geschieht möglicherweise über DNA-bindende Rezeptoren und zytosolische Proteine.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß mit Hilfe von molekularbiologischen und biochemischen Methoden keine spezifische Interaktion eines Kernproteins mit dem Promotorfragment A5 des *RyR1*-Gens nachzuweisen war. Bindungsaktivitäten mit Zellextrakten und groben Kernextrakten müssen auf unspezifische Interaktionen von nukleären oder cytoplasmatischen Proteinen zurückgeführt werden. Dies wird auch für die von Schmoelzl *et al.* (1996) nachgewiesene Bindungsaktivität mit dem Oligo A5 vermutet. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein Faktor existiert, der in der Lage ist, spezifisch mit dem Promotorfragment zu interagieren und die Regulation des *RyR1* Gens zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Proben von differenzierten Muskelzellen verwendet. Stadiumsspezifische oder gewebespezifische Expression von Proteinen wurde daher außer Acht gelassen. Ebenso wären sehr geringe Mengen von Protein nicht nachzuweisen gewesen.

6.2 Isolierung und Charakterisierung des porcinen *FHL1* Gens

6.2.1 Touch-Down PCR führt zur Isolierung porciner *FHL1* cDNA

Durch eine spezielle Form der PCR und unter Verwendung eines degenerierten Primers (ZF-deg) aus der H/C - Linker Region von Zinkfinger Domänen wurden mehrere

Zinkfingersequenzen aus einer porcinen Skelettmuskel cDNA Bank isoliert. Die PCR Zyklen wurden so gewählt, daß die Annealing Temperatur in jedem Zyklus um 0,9 °C abgesenkt wurde. In den ersten Schritten der PCR konnten somit nur Fragmente amplifiziert werden, in denen die Primersequenz exakt mit der cDNA-Sequenz übereinstimmte. Mit fortlaufender Reaktion wurden durch Senken der Temperatur auch unspezifischere Bindungen zugelassen, was einerseits die Möglichkeit bot, auch Zinkfinger-Sequenzen zu amplifizieren, die nicht genau mit der Primersequenz übereinstimmten, andererseits wurden unspezifische Produkte, die aufgrund partieller Bindung des Primers entstanden in den Hintergrund gedrängt.

Die Zahl der erhaltenen Fragmente pro cDNA-Pool war mit 1-2 prominenten Banden sehr gering. Dies ist auf die relativ stringenten Bedingungen der PCR (die anfängliche Annealing Temperatur von 70 °C entspricht der maximalen berechneten Temperatur des degenerierten Primers) zurückzuführen, wodurch früh entstandene PCR Produkte stärker amplifiziert wurden, als solche, deren primäre Produkte erst in späteren Zyklen auftraten. Zudem wurden nur Sequenzen amplifiziert, deren Primer-Bindungsstelle relativ nahe (bis zu etwa 1,5 kb) am 3'-Ende der cDNA zu finden ist.

Durch den Versuchsansatz konnten nach Sequenzanalyse der Fragmente drei Sequenzen mit klassischen Zinkfinger Motiven und eine Sequenz mit Homologien zum 3'-Ende der humanen FHL1 cDNA identifiziert werden. Da für FHL1 eine vermehrte Expression im Skelettmuskel beschrieben ist (Morgan und Madgwick, 1996) und Sequenzen häufig in der porcinen cDNA Bank aufgetreten waren, wurde dieses Protein für die nähere Analyse ausgewählt.

Interessanterweise stammen die PCR-Produkte bei FHL1 aus dem 3'-Bereich und nicht, wie vermutet, aus der Linker-Region zweier Zinkfinger Domänen. Die Primer-Sequenz stimmt in nur 12 von 21 Basen mit der cDNA-Sequenz des porcinen *FHL1* Gens an dieser Position überein. Die Amplifikation des Produktes muß daher erst im Laufe der PCR eingesetzt haben, aufgrund der Stärke des Signals aber sehr viel Ausgangs-DNA vorhanden gewesen sein.

Mit dem PCR-Produkt als Sonde wurde der entsprechende cDNA-Klon aus den Phagenpools isoliert und sequenziert. Diese Sequenzinformationen dienten dann dazu, noch drei weitere, überlappende cDNA-Phagen zu finden, die den gesamten offenen Leserahmen und den 3'-Bereich der cDNA umfaßten.

6.2.2 Vergleich der porcinen FHL1 cDNA mit der humanen und murinen cDNA

Vergleicht man die cDNA Sequenz des isolierten FHL1 cDNA Phagen mit dem humanen Isolat (Morgan und Madgwick, 1996), findet man in beiden Sequenzen den offenen Leserahmen von

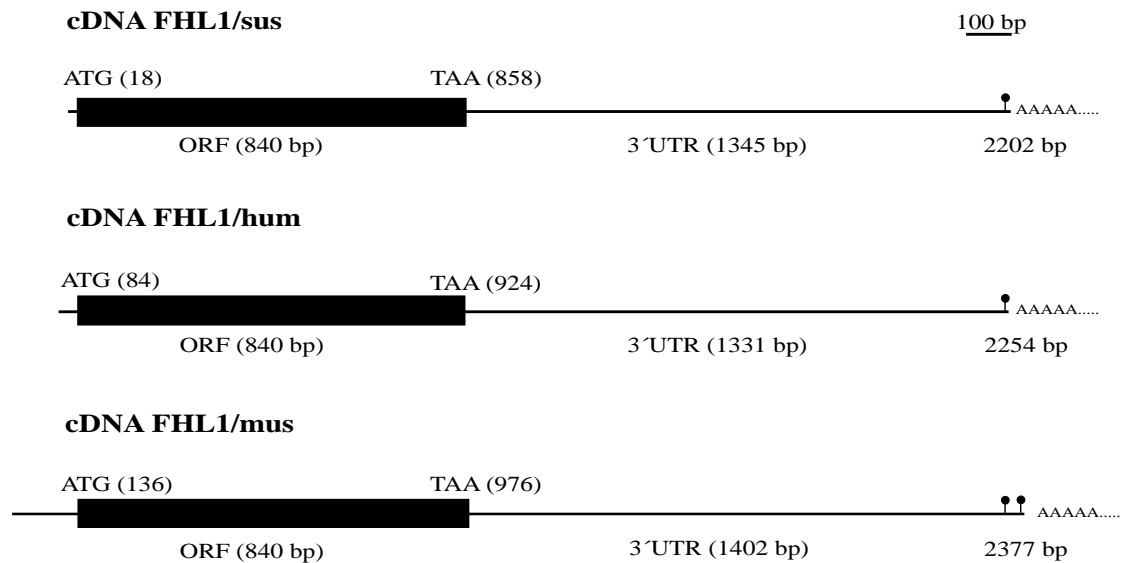


Abb. 6.1: Vergleich der FHL1 cDNA-Sequenzen in Schwein, Mensch und Maus

Der Vergleich der aus der Skelettmuskel cDNA-Bank isolierten Sequenzen von FHL1 aus dem Schwein mit den cDNAs aus Mensch und Maus zeigt einen hohen Grad an Konservierung. Der offene Leserahmen ist durch eine schwarze Box dargestellt, die Striche bezeichnen untranslatierte Bereiche. Die Polyadenylierungssignale sind am 3'-Ende der cDNAs markiert.

840 bp, der zwischen den beiden Spezies hoch konserviert ist und eine Identität von 94,7 % auf DNA-Ebene aufweist. Das Stop Codon ist in beiden Fällen ein TAA Triplet, dem beim Menschen ein 1331 langer 3'-UTR und beim Schwein ein etwas längerer 3'-UTR mit 1345 bp folgt (Abb. 6.1). Ein Polyadenylierungssignal vom Typ AATAAA liegt 13 bp vor dem Ende der cDNA. PA-Signale mit dieser Konsensus-Sequenz werden in rund 80 % der eukaryotischen mRNAs gefunden und sind ein wichtiges Element für den Transkriptionsapparat, die exakte Schnitt- und Polyadenylierungsstelle zu definieren. Ein weiteres Element im Zusammenhang mit der Polyadenylierung von mRNAs liegt etwa 30 bp stromabwärts der Polyadenylierungsstelle (DSE: Downstream Element). Es ist ein T-reicher oder TG-reicher Sequenzabschnitt, der dem Cleavage Stimulatory Factor (CstF) als Bindungsstelle dient. Das DSE ist aber sehr wenig konserviert und in vielen Genen nicht klar zu definieren (Zhao *et al.*, 1999). Auch im genomischen Bereich des porcinen *FHL1* - Gens kann an dieser Position nur eine mutmaßliche DSE Sequenz bestimmt werden (Abb. 6.2).

Auffällig ist auch ein sehr hoher Grad an Homologie in weiten Bereichen des 3'-UTR zwischen Schwein und Mensch. Da 3'-UTRs oftmals eine bedeutende Rolle in der Regulation der Translation sowie in der Stabilität von mRNAs spielen (Decker und Parker, 1995), könnten 3'-UTRs von FHL1 in unterschiedlichen Spezies aufgrund solcher Translationskontrollen konserviert sein.

im Kern korrekt zu prozessieren und damit einen Export aus dem Kern zu garantieren. Man kennt aber auch eine Reihe von Genen, in denen die Verwendung alternativer PA-Signale stark vom Entwicklungsstadium oder vom Gewebe, in dem sie exprimiert werden, abhängig ist (Edwards-Gilbert *et al.*, 1997). Bis jetzt gibt es allerdings keine Analysen über den Zusammenhang zwischen spezifischer Expression und verwendeter PA-Signale bei FHL1.

6.2.3 Der 5'-UTR der isolierten FHL1-cDNA aus dem porcinen Skelettmuskel unterscheidet sich von den publizierten Sequenzen aus Mensch und Maus

Durch 5'-RACE auf porciner Skelettmuskel cDNA konnte eine neue Genvariante von FHL1 identifiziert werden. FHL1C unterscheidet sich von den publizierten FHL1 cDNA-Sequenzen aus Mensch und Maus durch einen veränderten 5'-Bereich, wo ein bis jetzt noch nicht beschriebenes Startcodon 48 bp stromaufwärts des bekannten Initiations-ATGs die Translation initiieren könnte. Durch dieses neue ATG wird die N-terminale Aminosäuresequenz um 16 Aminosäuren verlängert. Es kommt dadurch zu keiner Verschiebung des Leserahmens und der Rest des Proteins entspricht in seiner Aminosäure-Sequenz jener von FHL1 (Abb. 6.3). Die Richtigkeit der Sequenz wurde in weiterer Folge durch die Sequenzdaten des genomischen Abschnittes bestätigt und mittels Primer Extension Analyse konnte die Größe des 5'-UTRs bestimmt werden. EST-Einträge von Mensch und Maus bestätigten das Auftreten einer neuen Genvariante von FHL1. Auch in diesen Einträgen ist das beschriebene ATG konserviert und die vorhergesagte Aminosäuresequenz entspricht jener vom Schwein. Die Analyse dieser zusätzlichen Aminosäuren am N-terminalen Ende brachte keine Information bezüglich der Funktion des Proteins. In Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von FHL1 wurden aber neben intensiven cytoplasmatischen Signalen in einigen Zelltypen auch schwache Signale im Kern entdeckt (Brown *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Das könnte ein Indiz für unterschiedliche funktionelle Bedeutungen der beiden Varianten sein.

Eine ähnliche Divergenz im 5'-UTR wurde auch für ein weiteres Mitglied der FHL-Familie beschrieben. Die Aminosäure-Sequenzen der FHL-Isoform FHL2 und dem LIM-Protein DRAL stimmen bis auf eine Aminosäure überein, die 5'-Bereiche divergieren aber sehr stark voneinander (Chan *et al.*, 1998). Bis jetzt wurde angenommen, daß die beiden RNAs von zwei verschiedenen Genen transkribiert werden. In Anbetracht der Untersuchungen zum 5'-Ende von FHL1 ist es aber möglich, daß auch für FHL2 unterschiedliche Varianten bezüglich des 5'-UTRs vorhanden sind.

CACGGCCGCGTCCAAATTTTATTCCGGTACAGGGAT

CACTTCTCTGCGGCCTCTCTGGCTCTGGAGCTAATTTGGATGCTGAGTAGCCCCACAGGTATTTATATGTAGTGTGGTATT
 TTTACTGGGTCTATTTCTTCCCTTGGATCACCTAAAATGGTTAAGAATTTTCGAGTGGGATTAAGGTGCGATCTCTGGGGA
 GGGTGGCCATCTGCTCTCGGTTATTTTCGTGTTCCACCGCTTCCCCTTAAATGTATGTTTACAACGGAGCCGACGCTTATCAG
 CAGCCGGGCCAGGGGACAGTGGCTCCAGGTGCGGCTTGGGACTCGCTGGCGGAGCCATGGCTCCACAGACATGCAGGCCCC
M A S H R H A G P

TCCAGCTACAAGGTAGGCACCATGGCCGAGAAGTTTGACTGCCACTACTGCAGGGACCCGCTGCAGGGAAAGAAGTACGTGCAG
 S S Y K V G T M A E K F D (C) H Y (C) R D P L Q G K K Y V Q

AAGGACGGCCACCCTGCTGCCTGAAGTGTTCGACAAGTTCTGCGCCAACACCTGCGTGGAGTGCCGCAAACCCATCGGCGCT
 K D G H H C (C) L K (C) F D K F C A N T (C) V E (C) R K P I G A

GACTCCAAGGAGGTGCACTACAAGAACCGCTACTGGCAGCACACCTGCTTCCGCTGCTCCAAGTGCCTTACCCCTTGGCCAAT
 D S K E V H Y K N R Y W (H) D T (C) F R (C) S K (C) L H P L A N

GAGACCTTTATGGCCAAGGACAACAAGATCCTGTGCAACAAGTGCACCCTCGCGAGGATTTCCCAAGTGAAGGGGTGCTTC
 E T F M A K D N K I L (C) N K (C) T T R E D S P K (C) K G (C) F

AAGCCCATCGTGGCAGGCGATCAGAACGTGGAGTACAAGGGCACCGTCTGGCACAAAGACTGCTTACCTGCAGCAACTGCAAG
 K P I V A G D Q N V E Y K G T V W (H) K D (C) F T (C) S N (C) K

CAAGTCATTGGGACAGGAAGCTTCTTCCCCAAAGGGGAGGACTTCTACTGCGTGACTTGCCATGAGACCAAGTTTGCCAAGCAC
 Q V I G T G S F F P K G E D F Y (C) V T (C) H E T K F A K H

TGCGTGAAGTGCAACAAGGCCATCACATCTGGAGGAATCACTTACCAGGATCAGCCCTGGCATGCCGAGTGCTTTGTGTGTGT
 (C) V K (C) N K A I T S G G I T Y Q D Q P W (H) A E (C) F V (C) V

ACCTGCTCTAAGAAGCTGGCTGGGCGAGCTTTACCGCTGTGGAGGACCAGTATTACTGCGTGGATTGCTACAAGAACTTTGTG
 T (C) S K K L A G Q R F T A V E D Q Y Y (C) V D (C) Y K N F V

GCCAAGAAGTGTGCTGGATGCAAGAACCCCATCACTGGGTTTGGTAAAGGCTCCAGTGTGGTGGCCTATGAAGGACAATCTGG
 A K K (C) A G (C) K N P I T G F G K G S S V V A Y E G Q S W

CAGACTACTGCTTCCACTGCAAAAAATGCTCCGTGAATCTGGCCAACAAGCGCTTTGTTTTCCATCAGGAGCAAGTGTATTGC
 (H) D Y (C) F H (C) K K (C) S V N L A N K R F V F H Q E Q V Y (C)

CCCGACTGTGCCAAAAAGCTGTAAAGTGACAGGGGCTCCTGTCTGTAAAAATGGAATTTGAGTCTTGTTCCTTGTCTCTCGCC
 P D (C) A K K L

CTCTGCCCGTACCACCCCTGGGGCCAGAGAGGCCTTTTACCTCTCCGAGTTGCTCCTCCTGTCTTCTTCCATTTTACAGT
 TACGCTCAAGTACGGGCACGAGTATCATGTTAGGATTTAGCGAAAAGCAACCCCTGCAGCAACGTTACTGTCTGATAGCTG
 CAGTTAGCAAACGAACACGCTAGCTAGATTGACTTCTTGCATGTTTATCCTAGAGCAGAAAAGCGCCGACATTTAGCTGTTA
 GTGATGTAAGCAAGAAGCCTAAGAGATAAAGCCCCACTGAGATGCCTCTCGTGGCTCAGCTGGGACCCACCGTGTCCGTACA
 CGACACCGGAGAGTTGACGCGGCTGCTCCAACCTCGGCTGCTCACCTGTCTGTGAGCAGCAGGAATACCGAGATGCATG
 GTTTAACTTCCCCATCAACACCTTCCCTCTGTTCTTTGTGCTTTTACACCACTAATACGGATTTCCAGAAAATAACATTTGA
 ATTTAGCTGTAATTTAACCAGCTTTTCCCTGTACTAACGTTGGATTTGGATTTGTGGCGTGTCTTCCGAGCGTCTCTCTGC
 CAAGCATGGAACACGCAAGGCGATTGGGAGAGTGTAGGCAGTCTGAGAAAACGAGCCTGTGTACCAGAATGTCTGCACAGCG
 AATACTTCTGGAAGCTTAACAAAATAACCCAGCTGTCTTTATCTTTTTTAATGAATAATGTTTTGTTTTAATGAATAGCAG
 CATAGTTTATGGGTTTGGAGACTTGCATGAGAATGTTTTCGCCCCCTCAGACGTTCTCTGCGGTTTTGCAATTTACCTCCAGAA
 GTAACCATAAAACCTGAGAGGGGACAGGTGAGCAGGTGCCAGGACTGCTACTGACATGGACATGCCGTTTCCAGACATGGCAGAG
 TGGGCTTCCCCCTAACCGTCCGGCGGCGGCTGCTCTGTGAGTCTTAGGACCGTCTCAAGAGCTTACAGCTGGATCGTGGGG
 GAGCGGGGAGGCCACGGTCCCGGCAGGACAGAACCGGATGTCCACGTAGCGCTTACCTGAGACGAGGAGCACCTCTTACTGTA
 TTCTAGCTACTGTATATACATAGCATATCCCGAGACGACTTCAAGAGTACACAGTAATGACAGCGCGTATTAACATCTCT
 CGTAGGAGTGGTTAGAGAAGCCGAAGCCTCATTGCTACATTTGTGATTAGCTTTGATCATCTAACGTTTACAGTGTATCTTAC
 GGAATAAAGCAGCATATAAAG

Abb. 6.3: Die cDNA-Sequenz von FHL1C

Darstellung der cDNA-Sequenz von FHL1C. Im codierenden Bereich wurden die Aminosäuren unter die entsprechenden Basen-Triplets eingetragen. Das Start- und Stop-Codon von FHL1C sind durch Boxen dargestellt. Das Start-Codon von FHL1 sowie das Polyadenylierungssignal sind unterstrichen. Die konservierten Histidine (H) und Cysteine (C) der LIM-Domänen sind eingekreist.

6.2.4 Die Sequenz der isolierten cDNA erstreckt sich über 14 kb genomischen Bereich

Durch die Sequenzinformation aus den cDNA Fragmenten und den Ergebnissen der 5'-RACE konnten ein genomischer Phage und ein PAC-Klon identifiziert werden, aus denen insgesamt 14372 bp des genomischen Bereichs des porcinen *FHL1*-Gens sequenziert wurden. Innerhalb dieser Sequenz kodieren 6 Exons die gesamte isolierte cDNA von FHL1C. Zudem wurde noch das aus der humanen Sequenz bekannte, alternativ gespleißte Exon 5b identifiziert (Brown *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Das erste Exon (364 bp) ist durch ein etwa 7 kb großes Intron vom folgenden Exon getrennt und enthält den gesamten 5'-untranslatierten Bereich sowie das vorhergesagte Startcodon von FHL1C. Die restlichen 6 Exons mit Längen von 170 bp (Exon 4) bis 1496 bp (Exon6) liegen innerhalb von 5 kb und sind durch Introns von 212 bp (2. Intron) bis 614 bp (3. Intron) voneinander getrennt. Das Stopcodon TAA ist auf dem letzten Exon zu finden. Im Vergleich zu den humanen Sequenzen aus dem BAC Klon RP11-535K18 stimmen die Exons 2-4 in ihren Größen exakt mit der porcinen Sequenz überein. Exon 5a ist im Menschen 1 bp kürzer, Exon 5b 1 bp länger als im porcinen Isolat. Exon 6 ist im Schweine-Genom um 18 bp länger als im humanen Genom, was auf die Unterschiede im 3'-UTR zurückzuführen ist. Die Größe von Exon 1 im Menschen wurde aufgrund der Homologien mit der porcinen Sequenz mit 366 bp festgelegt. Die Intron-Größen variieren zwischen den beiden Organismen stärker, am Auffälligsten ist das um etwa 2,6 kb größere Intron 1 im Menschen. Intron 2 ist in der humanen Sequenz ebenfalls größer (ca. 200 bp) als im Schwein (Abb. 6.4).

	porcin		human	
	Exon	Intron	Exon	Intron
1	364 bp	6714 bp	366 bp	9272 bp
2	182 bp	212 bp	182 bp	427 bp
3	175 bp	614 bp	175 bp	601 bp
4	170 bp	438 bp	170 bp	492 bp
5a	188 bp	575 bp	187 bp	601 bp
5b	200 bp	352 bp	201 bp	428 bp
6	1496 bp		1479 bp	

Abb. 6.4: Exon- und Intronlängen in Schwein und Mensch

Gegenüberstellung der Exon- und Intronlängen in den *FHL1*-Genen von Schwein und Mensch. Die Größenangaben im humanen Gen wurden aus der Sequenz des BAC-Klons RP11-535K18 ermittelt.

In den Intron-Sequenzen konnten zudem mehrere Abschnitte mit hoher Homologie zwischen Schwein und Mensch identifiziert werden. Dies betrifft vor allem die flankierenden Regionen der Exons 4, 5a und 5b. Da diese Exons in alternative Splice-Prozesse involviert sind, könnten die konservierten Bereiche dabei von Bedeutung sein.

Neben diesen flankierenden Sequenzen wurden im ersten Intron größere interne Sequenzen mit auffälliger Homologie gefunden. In einigen Genen befinden sich innerhalb des ersten Introns wichtige Regulationselemente für die Steuerung der Transkription. Beispiele dafür sind das Alpha 1(I) Collagen Gen, das im ersten Intron sowohl positiv als auch negativ regulierende Elemente besitzt (Liska *et al.*, 1992), das Insulin Rezeptor Gen (McKeon *et al.*, 1997) oder das Glutamin Synthetase Gen, wobei Elemente im ersten Intron für die gewebsspezifische Expression des Gens verantwortlich zu sein scheinen (Gaunitz *et al.*, 1997). Ähnliche Regulationsbereiche könnten auch im ersten Intron von FHL1C vorhanden sein. Die Analyse der homologen Regionen in der TRANSFAC Datenbank brachte allerdings keine signifikanten Homologien zu Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren.

6.2.5 Die Expression der FHL1-Genvarianten wird möglicherweise von zwei verschiedenen Promotoren gesteuert

Der Transkriptionsstart der FHL1C Genvariante wurde durch Primer Extension Analyse mit einem Primer aus dem ersten Exon an einem CA Dinukleotid kartiert. Bei vielen eukaryotischen Genen liegt der Transkriptionsstart innerhalb der Konsensussequenz YCANYYYY, die jedoch nicht stark konserviert ist. Die kartierte Sequenz CCACGGC stimmt in 5 von 7 Basen mit dieser Konsensussequenz überein. Die Analyse der stromaufwärts gelegenen Sequenzen identifizierten eine TATAA-Box (TATAAA) und eine CAAT-Box (CAAAC) in den für eukaryotische Gene typischen Abständen zum Transkriptionsstart (Penotti, 1990). Die analysierten 947 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthielten noch eine gut übereinstimmende Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor AP1 in negativer Orientierung, mehrere GC-Boxen und zwei Kernmotive für E-Boxen. In der humanen Sequenz ist eine TATAA-Box an vergleichbarer Stelle zu finden, die CAAT-Box an entsprechender Position ist nicht so gut konserviert (CAAAC). Kernmotive für E-Boxen konnten ebenfalls gefunden werden. Die in der porcinen Sequenz auftretenden GC-Boxen sind in der humanen Sequenz nicht vorhanden und auch das AP1-Motiv fehlt. Die vorhandenen Promotor-Elemente bei Schwein und Mensch in diesem Genom-Abschnitt lassen darauf schließen, daß die Transkription der FHL1C-Genvariante von diesem Bereich aus reguliert wird. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, daß die Transkription von einem weiter stromaufwärts gelegenen Promotor gesteuert wird.

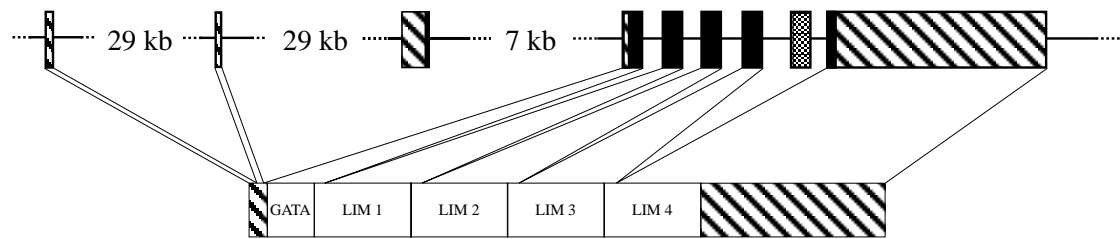
Analysen der 5'-Enden aus der humanen FHL1- und FHL1B/SLIMMER-cDNA mit den BAC Sequenzen des Klons RP11-535K18 (Acc. Nr.: AL078638) zeigen, daß die 5'-UTRs dieser cDNAs von zwei Exons kodiert werden, die etwa 36 kb und 63 kb vom Rest des Gens entfernt liegen. Diese Produkte müßten von einem bis jetzt noch nicht charakterisierten Promotor weiter stromaufwärts reguliert werden (Abb. 6.5). Theoretisch wäre es möglich, daß dies auch für die neue Variante FHL1C gilt. Dagegen spricht allerdings, daß in den analysierten RACE-Produkten und in den gefundenen EST-Sequenzen nie "Hybrid"-Produkte aus beiden 5'-UTRs auftreten. Die große genomische Distanz zwischen den jeweiligen Exons könnte ein alternatives Promotorelement zulassen.

Alternative Promotoren sind in einigen Genen zu finden, die eine besondere gewebsspezifische Expression aufweisen. Beispiele dafür sind Uroporphyrinogen III Synthase, wo ein alternativer Promotor die Expression in erythroiden Zellen steuert (Aizencang *et al.*, 2000); das Gen für den Growth Hormon Rezeptor, wo die spezifische Expression in der Leber von einem alternativen Promotor gesteuert wird (O'Mahoney *et al.*, 1994) oder das Gen für Carbonische Anhydrase I, wo zwei Promotoren für die Bildung gewebespezifischer mRNAs verantwortlich sind (Fraser *et al.*, 1989). Eine hohe gewebsspezifische Expression liegt auch für FHL1C vor. RT-PCR Untersuchungen mit FHL1C-spezifischen Primern zeigten eine starke Expression in der Skelettmuskulatur und in Blutgefäßen. Das Signal im Aterien-Gewebe ist möglicherweise auf Expression in der glatten Muskulatur zurückzuführen. Weitere schwache Signale traten im Herz- und im Lungengewebe auf. Das alternative Promotorelement könnte damit diese gewebespezifische Expression steuern. In diesem Zusammenhang konnten im untersuchten Promotorabschnitt zwei E-Box-Motive identifiziert werden. Diese Sequenzmotive bilden die Bindungsstellen für die myogenen bHLH-Proteine und könnten bei der Skelettmuskelspezifischen Expression eine Rolle spielen. Weitere Kernmotive für E-Boxen sind auch im ersten Intron zu finden. Im entsprechenden genomischen Abschnitt beim Menschen wurden ebenfalls E-Boxen identifiziert.

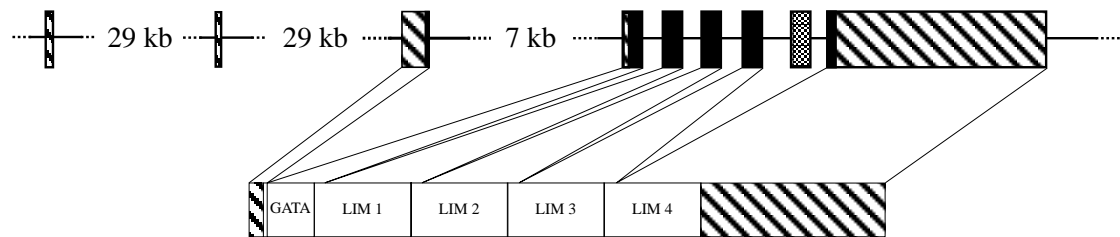
6.2.6 Die chromosomale Lokalisation im Schwein entspricht dem Genlocus für FHL1 im Menschen

Durch FISH Analyse und PCR auf einem somatischen Zellhybrid Panel konnte die chromosomale Lage des porcinen *FHL1*-Gens auf Chromosom Xq23-24 festgelegt werden. Dies entspricht der Position des humanen *FHL1*-Gens auf Chromosom Xq27.2 (Lee *et al.*, 1998a). Im Schwein ist diese Region noch nicht sehr gut charakterisiert, aufgrund der großen Synthänie zwischen Schwein und Mensch können aber die Ergebnisse der humanen Analysen

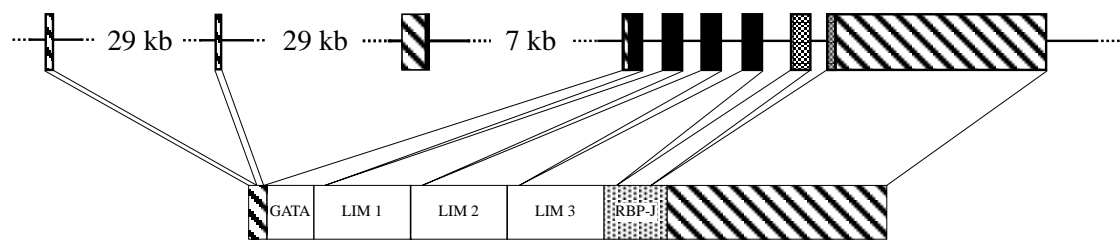
FHL1



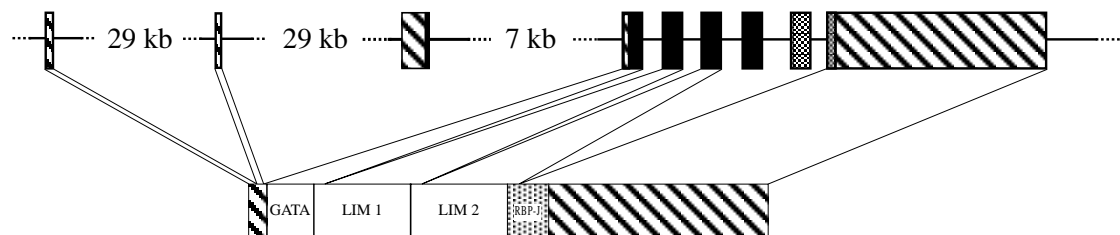
FHL1C



FHL1B/SLIMMER



KyoT2

**Abb. 6.5: Die Splice-Produkte des *FHL1* Gens**

Durch Splice-Prozesse entstehen vier verschiedene Transkripte des *FHL1*-Gens. Die Expression von FHL1C wird dabei möglicherweise von einem alternativen Promotor gesteuert. FHL1B/SLIMMER und KyoT2 unterscheiden sich von FHL1 und FHL1C durch die Anzahl der LIM-Domänen und die veränderten 3'-UTRs.

Schraffierte Boxen bezeichnen untranslatierte Bereiche, schwarze Boxen zeigen die Protein-kodierenden Exons. Alternativ gespleißte Exons innerhalb des kodierenden Bereichs sind gepunktet dargestellt, Linien bezeichnen Intronsequenzen.

in diesem Bereich auch für die Analyse des Schweinegenoms in Betracht gezogen werden. Direkte Zusammenhänge zwischen einer Veränderung im *FHL1*-Gen und einer auftretenden genetischen Erkrankung konnten bis jetzt nicht gefunden werden, Analysen über die Funktion des Proteins *in vivo* würden aber wesentliche Anhaltspunkte für mögliche pathogene Auswirkungen liefern.

6.2.7 FHL1 Proteine sind stark konserviert

Der Vergleich der aus der cDNA erhaltenen Protein Sequenz mit unterschiedlichen FHL1-Isolaten aus Mensch und Maus läßt erkennen, daß es sich bei FHL1 um stark konservierte Proteine handelt. Die Proteine aus den verschiedenen Spezies sind von ihrer Länge her identisch und weisen nur eine geringe Zahl von Aminosäuren-Austauschen auf. FHL1 ist auf Protein Ebene zu 98 % zwischen Schwein und Mensch und zu 93 % zwischen Schwein und Maus identisch. Die meisten Aminosäuren-Austausche liegen in der ersten LIM-Domäne und im Verbindungsbereich zwischen erster und zweiter LIM-Domäne. In der zweiten LIM-Domäne ist ein Alanin (A) in Mensch und Maus durch ein Prolin (P) im Schwein ersetzt. Die dritte LIM-Domäne ist zwischen Schwein und Maus vollständig konserviert, im Menschen tritt an Stelle einer Glutaminsäure (E) eine Asparaginsäure (D) auf. Die vierte LIM-Domäne ist zwischen Schwein und Mensch vollständig konserviert, wohingegen die Maus ein Asparagin (N) anstatt eines Glutamins (Q) besitzt (Abb. 6.6).

Dieser hohe Grad an Konservierung läßt vermuten, daß es sich bei FHL1 möglicherweise um ein funktionell bedeutendes Protein handelt, dessen Ausfall zu massiven Beeinträchtigungen der Zellfunktion führt. Das Protein besteht lediglich aus den 4 LIM-Domänen und einem GATA1-ähnlichen Zinkfinger, die Verbindungsregion zwischen den einzelnen Domänen umfaßt acht Aminosäuren. Es ist zwar nicht klar, ob alle Zinkfinger Domänen in FHL1 funktionelle Bedeutung haben, sollte dies aber der Fall sein, besteht nur wenig Spielraum für die Tolerierung von bedeutenden Änderungen in der Proteinsequenz.

Aufgrund der hohen Konservierung der dritten und vierten LIM Domäne könnten diese für die Funktion von FHL1 und FHL1C von Bedeutung sein. Die beiden Aminosäuren-Austausche, die in Maus und Mensch im Vergleich zum porcinen Protein auftreten, dürften keine Auswirkung auf die Struktur oder Funktion der beiden Domänen haben, da in beiden Fällen der Unterschied zwischen den beiden ausgetauschten Aminosäure-Resten in nur einer Methyl-Gruppe liegt. Größere Auswirkungen sind für den Austausch in der zweiten LIM-Domäne von Alanin in Mensch und Maus zu Prolin im Schwein zu erwarten. Die zyklische Aminosäure Prolin zählt zwar, wie Alanin, zu den aliphatischen Aminosäuren ohne reaktive Gruppen, die Ringstruktur des Aminosäure-Restes hat aber eine große Auswirkung auf die Rotationsmög-

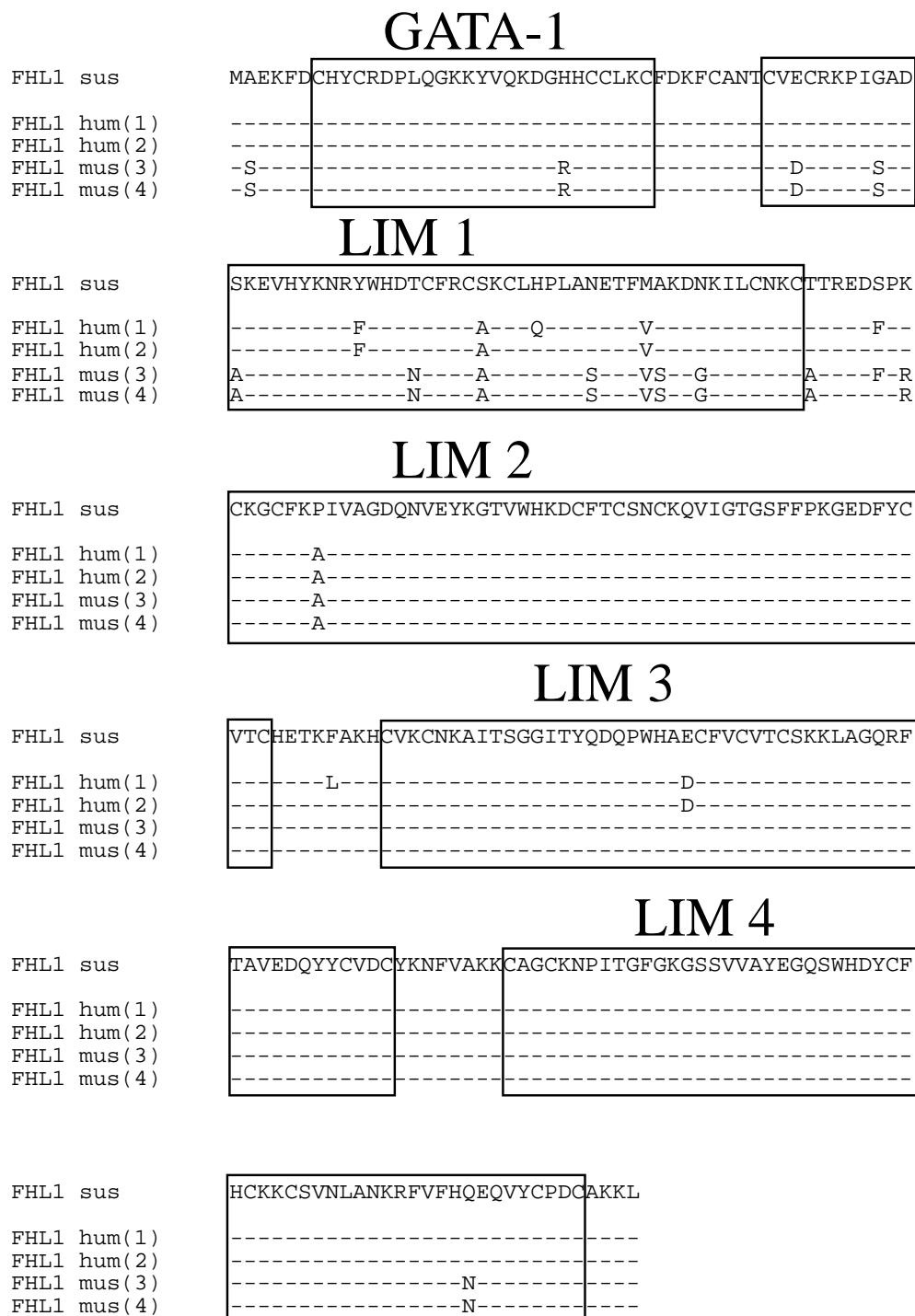


Abb. 6.6: Aminosäuren-Vergleich der FHL1 Proteine aus Schwein, Mensch und Maus

Die erhaltene Aminosäure Sequenz aus der porcinen FHL1-cDNA wurde mit unterschiedlichen Isolaten aus Mensch und Maus verglichen. Die Zinkfingerdomänen sind durch Boxen markiert, gleiche Aminosäuren durch einen Strich dargestellt. Veränderungen in der Aminosäuresequenz sind durch die jeweils ausgetauschte Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben.

Die unterschiedlichen Sequenzen stammen aus: FHL1 hum(1) = Morgan und Madgwick, 1996; FHL1 hum(2) = Greene *et al.*, 1999; FHL1 mus(3) = Morgan und Madgwick, 1999b; FHL1 mus(4) = Taniguchi *et al.*, 1998; Unterschiede in den beiden humanen Sequenzen stammen höchstwahrscheinlich von Sequenzierfehlern und sind keine Polymorphismen.

lichkeiten der N-C Bindung im Protein-Rückrat und somit Einfluß auf die Gesamtstruktur des Proteins. Die Bedeutung einer solchen Konformationsänderung im Schwein ist unklar, könnte aber eventuell in Splice-Varianten von *FHL1* im Schwein von Bedeutung sein, die wie das humane KyoT2 nur die erste und zweite LIM-Domäne aufweisen.

6.2.8 Die Funktion der FHL1 Proteine

Die genaue Funktion der FHL1 Proteine ist unbekannt, Immunfluoreszenz Analysen in transfizierten Zellen zeigen aber, daß FHL1 an Focal Adhesions sowie in Assoziation mit Aktin-Filamenten zu finden ist (Brown *et al.*, 1999). Focal Adhesion Plaques treten in kultivierten Zellen dort auf, wo die Membran in direktem Kontakt mit dem Substrat und der extrazellulären Matrix steht. Zudem bilden sie die Anheftungsstellen für Stress-Fasern an die Zellmembran. Stress-Fasern und Adhesion Plaques sind *in situ* kaum zu finden, aber die Dense Plaques in glatten Muskelzellen sind insofern mit Adhesion Plaques zu vergleichen, als sie Anheftungsstellen für Aktin-Filamente bilden und den Kontakt zur extrazellulären Matrix herstellen (Burrige *et al.*, 1987). Im Zuge der biochemischen Untersuchung von Adhesion Plaques wurden eine Reihe von Proteinkomponenten isoliert und Analysen der Protein-Interaktionen haben zu einem guten Verständnis der Adhesion Plaque Architektur geführt (Abb.6.7). Neben den dargestellten Proteinen, welche hauptsächlich die Struktur der Plaques aufrecht erhalten, sind auch noch Proteasen, Protein-Kinasen, Phosphatasen und Signalmoleküle assoziiert (Craig und Johnson, 1996). Die Plaque-Struktur ist jedoch sehr heterogen und einzelne Komponenten können in unterschiedlicher Zusammensetzung auftreten (Zamir *et al.*, 1999). Interessanterweise finden sich unter diesen Proteinen eine ganze Reihe von LIM-Proteinen (Paxillin, Zyxin und CRP), die in diesen Multiproteinkomplexen hauptsächlich als Verbindungsmoleküle dienen, aber auch teilweise im Kern lokalisiert wurden.

Zyxin ist ein Phospho-Protein mit drei LIM-Domänen und einer Prolin-reichen Region. Diese Prolin-reiche Domäne dient der Interaktion mit α -Actinin und VASP, zwei weiteren Komponenten von Focal Adhesions, die wichtig für den Aufbau und die Integrität des Aktin-Cytoskeletts sind (Crawford *et al.*, 1992; Reinhard *et al.*, 1995). Zyxin besitzt aber auch ein Kernexportsignal innerhalb seiner Aminosäuren-Sequenz und es wurde nachgewiesen, daß es sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorkommt. Es könnte demnach als Signal-Übertragungsmolekül für extrazelluläre Stimuli zum Kern fungieren (Nix und Beckerle, 1997). Cysteine Rich Proteins (CRPs) sind eine Familie von LIM Proteinen mit zwei LIM-Domänen und assoziierten Glycin-reichen Regionen. Alle drei bis jetzt bekannten CRPs (CRP1, CRP2 und CRP3/MLP) treten in Verbindung mit dem Aktin-Cytoskelett auf und interagieren dort mit

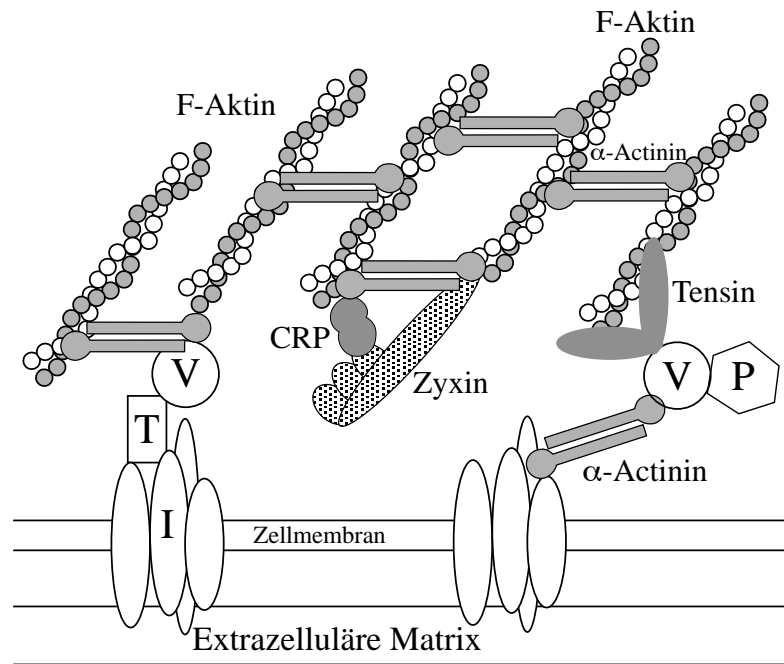


Abb. 6.7: Focal Adhesion Plaques

Focal Adhesion Plaques sind die Anheftungsstellen der Aktin-Filamente (Stress-Fasern) an die Zellmembran und bilden die Kontaktpunkte der Zelle mit der extrazellulären Matrix. Die wichtigsten Strukturkomponenten sind hier dargestellt. CRP = Cysteine Rich Protein, I = Integrine, P = Paxillin T = Talin, V = Vinculin.

α -Actinin und Zyxin. Sie werden gewebsspezifisch exprimiert und die vorherrschende Form im Skelettmuskel, CRP3/MLP, ist auch wesentlich an der Muskeldifferenzierung beteiligt (Louis *et al.*, 1997).

Paxillin ist ein Protein mit vier LIM-Domänen und einer Prolin-reichen Region. Es wird in einer Vielzahl von Zellen exprimiert und Phosphorylierung des Proteins ist entscheidend bei Signalprozessen, die von der Anheftungen an die extrazelluläre Matrix ausgehen (Salgia *et al.*, 1995). Paxillin wurde *in vivo* an den Dense Plaques der glatten Muskulatur sowie an den Verbindungen von Skelettmuskeln zu Sehnen und den neuromuskulären Kontaktpunkten identifiziert (Turner *et al.*, 1991). Über seine Interaktion mit Vinculin, das seinerseits direkt mit F-Aktin wechselwirkt (Huttelmaier *et al.*, 1997), ist Paxillin eng mit Focal Adhesions assoziiert. Die dritte und die vierte LIM-Domäne von FHL1 weisen Homologien mit den LIM-Domänen aller drei Focal Adhesion LIM Proteine auf und könnten somit Hinweise auf die Funktion des Proteins liefern. CRP und Zyxin interagieren über ihre LIM-Domänen miteinander, wobei von Zyxin eine LIM-Domäne und von CRP beide LIM-Domänen an dieser Interaktion beteiligt sind (Sadler *et al.*, 1992; Schmeichel und Beckerle, 1998). FHL1 wurde in Zellkultur mit Paxillin colokalisiert und könnte in ähnlicher Weise wie CRP/Zyxin mit Paxillin interagieren. Von den vier LIM Domänen in Paxillin weiß man, daß die dritte Domäne verantwortlich dafür ist, daß Paxillin an Focal Adhesions lokalisiert (Brown *et al.*, 1996). Die erste und die vierte LIM

Domäne von Paxillin zeigen die höchsten Homologien mit der dritten und vierten LIM-Domäne von FHL1. Diese beiden Domänen sind in FHL1 auch innerhalb der Spezies am höchsten konserviert, was möglicherweise von funktioneller Bedeutung für beide Proteine ist. Für LIM-Domänen wurde bis jetzt nur nachgewiesen, daß sie Protein - Protein Interaktion vermitteln und FHL1 könnte somit, wie auch die anderen LIM-Proteine der Focal Adhesions, Teil eines größeren Proteinkomplexes sein und durch seine LIM-Domänen als strukturbildendes Element dienen.

Von FHL1C ist noch keine subzelluläre Lokalisation bekannt, aufgrund der weitgehenden Ähnlichkeit mit FHL1 ist aber ein Auftreten im Cytoplasma zu vermuten. Die Bedeutung der 16 N-terminalen Aminosäuren ist nicht klar, eventuell werden spezifische Bindungseigenschaften dadurch moduliert und könnten das Auftreten in einer begrenzten Anzahl von Geweben erklären. So könnte die vergleichsweise hohe Expression in Skelettmuskelzellen mit dem Auftreten kontraktiver Aktin-Myosin Filamente in diesen Geweben zusammenhängen.

6.2.9 Die Splice-Varianten FHL1B/SLIMMER und KyoT2

Mit der hier beschriebenen Genvariante FHL1C kennt man nun vier Produkte des *FHL1* Gens (FHL1, FHL1B/SLIMMER, FHL1C und KyoT2). Allen vier cDNAs sind die ersten beiden LIM-Domänen und der GATA-ähnliche Zinkfinger gemeinsam. Die LIM-Domänen drei und vier treten nur in FHL1 und FHL1C auf. Bei FHL1B/SLIMMER und KyoT2 kommt es aufgrund der Verwendung alternativ gespleißter Exons zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zu veränderten C-Termini. FHL1C unterscheidet sich von FHL1 nur durch 16 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus (Abb. 6.5).

Die Aminosäuresequenz am C-Terminus von KyoT2 und FHL1B/SLIMMER ist in der Lage, mit dem Transkriptionsfaktor RBP-J zu interagieren. RBP-J ist ein hoch konserviertes, DNA-bindendes Protein, dessen Verlust zu Abnormitäten in der Entwicklung des Nervensystems und der Somiten führt (Oka *et al.*, 1995). In *Drosophila* ist das Protein Teil des Notch-Signaltransduktionsweges und in Säugerzellen wurde gezeigt, daß RBP-J direkt mit dem intrazellulären Teil von Notch interagieren kann (Tamura *et al.*, 1995). KyoT2 ist in der Lage an RBP-J zu binden. Es verhindert dadurch die Bindung von RBP-J an seine Zielsequenz und fungiert somit als Repressor der RBP-J-abhängigen Transkription (Taniguchi *et al.*, 1998). Für FHL1B/SLIMMER sind keine Bindungspartner bekannt, aufgrund der vorhandenen C-terminalen Sequenz kann aber eine Interaktion mit RBP-J vermutet werden. Die Unterschiede in den vorhandenen LIM-Domänen (drei in FHL1B/SLIMMER und zwei LIM-Domänen in KyoT2) könnten aber Einfluß auf die Bindungsfähigkeit weiterer akzessorischer Proteine haben, die an der Transkriptionsaktivierung durch RBP-J beteiligt sind. KyoT2 wird in einer

großen Anzahl von Geweben exprimiert, die Expressionsanalyse von FHL1B/SLIMMER brachte unterschiedliche Ergebnisse, mRNA wurde aber generell in weniger Geweben nachgewiesen als für KyoT2 (Taniguchi *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Demnach könnte FHL1B/SLIMMER mehr gewebsspezifisch wirken als KyoT2.

Eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der FHL-Proteine könnte ebenfalls auf die unterschiedliche Anzahl von vorhandenen LIM-Domänen zurückzuführen sein. Möglicherweise sind die dritte und/oder vierte LIM-Domäne ausschlaggebend für die Lokalisierung von FHL1 im Cytoplasma. Eine oder beide Domänen fehlen in den Splice-Varianten FHL1B/SLIMMER und KyoT2, und diese beiden Proteine werden hauptsächlich im Kern lokalisiert. Die dritte und vierte LIM-Domäne sind zwischen den Spezies am höchsten konserviert und könnten über Protein-Protein-Interaktion mit cytoplasmatischen Faktoren FHL1 im Cytoplasma halten. FHL1B/SLIMMER besitzt zwar eine dritte LIM-Domäne, deren Bindungsfähigkeit könnte aber abgeschwächt sein und die Interaktion mit anderen Faktoren über die erste und zweite LIM-Domäne zulassen. In FHL1B/SLIMMER konnte ein aktives Kernlokalisierungssignal nachgewiesen werden, welches die Translokation in den Kern bewirkt und das Protein dort möglicherweise befähigt, mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren. FHL1B/SLIMMER ist nur in Myoblasten kernlokalisiert, in differenzierten Myotuben ist es ausschließlich im Zytoplasma zu finden (Brown *et al.*, 1999). Demnach könnte ihm neben einer gewebsspezifischen Funktion auch eine entwicklungsbiologische Bedeutung zukommen.

KyoT2 ist ausschließlich im Kern zu finden, was wiederum auf die zwei vorhandenen LIM-Domänen und die fehlende dritte und vierte LIM-Domäne zurückzuführen sein könnte. KyoT2 besitzt kein Kernlokalisierungssignal, wird aber vielleicht über Assoziation mit Proteinen, die ein solches Signal tragen, in den Kern gelangen können.

In den RT-PCR Versuchen mit verschiedenen porcinen Geweben war es nicht möglich, Produkte zu amplifizieren, die in ihren Sequenzen FHL1B/SLIMMER oder KyoT2 entsprochen haben. Möglicherweise lag die Expression dieser Splice-Varianten im Schwein unter der Nachweisgrenze der PCR. In jedem Fall konnte auch in der porcinen genomischen Sequenz das alternativ gespleißte Exon 5b identifiziert werden und es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß entsprechende Splice-Produkte auch im Schwein auftreten.

Zusammenfassend wurde aus einer porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank eine neue Variante des FHL1-Gens isoliert. FHL1C unterscheidet sich von FHL1 durch einen veränderten 5'-Bereich, wobei ein weiteres ATG die Verlängerung des Proteins um 16 Aminosäuren im N-terminalen Bereich bewirkt. Weiters wurde der genomische Bereich des porcinen *FHL1*-Gens isoliert. 14 kb genomische Sequenz und sechs Exons beinhalten die gesamte cDNA für FHL1C. Primer Extension Analysen lassen zudem vermuten, daß FHL1C von einem alternativen

Promotorelement gesteuert wird. Dies steht in Einklang mit der spezifischen Expression des FHL1C Genproduktes in nur einer geringen Anzahl von porcinen Geweben.

7 Zusammenfassung

Zur Charakterisierung der von Schmoelzl *et al.* (1996) beschriebenen Bindungsaktivität eines Transkriptionsfaktors an ein Promotorfragment des porcinen *RyR 1* Gens wurde zunächst eine porcine Gehirn-cDNA-Bank über das South-Western Verfahren durchmustert. Als Sonde diente der entsprechende Promotorabschnitt (Oligo A5). Dies führte zur Isolierung eines 2,5 kb großen Fragments mit zwei Zinkfinger Motiven. Das Fragmente stellte sich aber als Verunreinigung der Genbank mit Hefe-DNA heraus. In weiterer Folge wurde eine porcine Skelettmuskel cDNA-Bank konstruiert und erneut mit dem Promotorfragment hybridisiert. Es konnten keine positiven Signale identifiziert werden. Auch Versuche, über PCR auf genomischer Schweine-DNA, RT-PCR auf Skelettmuskel RNA oder Hybridisierung einer porcinen genomischen Bank homologe Bereiche der interagierenden Hefe-Sequenzen zu identifizieren, blieben erfolglos.

Es wurde daher versucht, den Faktor über proteinbiochemische Methoden aufzureinigen und zu charakterisieren. Als Nachweisverfahren diente die Retentionsanalyse mit dem Promotorfragment sowie ein Dot-Blot Verfahren. Bei der Analyse von präparierten Kernextrakten und Gesamtzellextrakten aus porcinem Skelettmuskel konnte für das Oligo A5 zunächst Bindungsaktivität nachgewiesen werden, die durch Einsatz des unspezifischen Kompetitors PolyIdC nicht kompetitierbar war. Bei der Auftrennung durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zeigte sich der bindungsaktive Faktor in den Fällungsfractionen zwischen 50 % und 60 % Sättigung, EDTA und *1,10-o*-Phenantrolin beeinflussten die Bindungsaktivität nicht.

Die Aufreinigung der Proteinextrakte über verschiedene Ionentauscher-Säulen (Polyethylenimin, Trimethylaminoethan, Heparin) ergab Bindungsaktivität in einzelnen Fraktionen der Säulen. Affinitätschromatographie über Bindung an das Oligo A5 brachte keine weitere Aufreinigung und Konzentrierung der positiven Fraktionen.

Die Optimierung der Kernpräparation führte zum Nachweis des Referenzproteins Sp1 in den Kernextrakten, für das Oligo A5 konnte keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Es muß daher angenommen werden, daß die Bindungsaktivität in Gesamtzellextrakten auf Interaktion eines unspezifischen Proteins beruht, das durch PolyIdC nicht kompetitierbar ist.

Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß ein für die Expression von RyR 1 benötigter Faktor an das Oligo A5 bindet. Es könnte sich dabei um ein Protein handeln, das in nur sehr geringer Konzentration vorhanden ist, oder nur in bestimmten Phasen der Entwicklung exprimiert wird und somit durch die vorliegende Untersuchung nicht identifiziert werden konnte.

Hinweise auf die Interaktion eines Zinkfinger Proteins mit dem Promotorfragment führten zur Durchmusterung der porcinen Skelettmuskel cDNA-Bank mittels PCR. Dadurch konnte die gesamte porcine cDNA des LIM Proteins FHL1 charakterisiert werden. Drei überlappende Phagenfragmente enthielten den offenen Leserahmen und den gesamten 3'-untranslatierten Bereich der FHL1 cDNA. Durch Isolierung eines genomischen Phagen und eines porcinen PAC Klons war es zudem möglich, 14 kb des genomischen Bereichs von FHL1 zu untersuchen und die Genomstruktur festzulegen. 5'-RACE Experimente führten zur Identifizierung einer neuen FHL1 Genvariante (FHL1C). Das FHL1C Protein weist gegenüber FHL1 16 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus auf, die aufgrund eines ATGs im ersten Exon von FHL1C translatiert werden. Der Vergleich dieser Sequenz mit Einträgen der dbEST Datenbank bestätigten diese Ergebnisse. Der Transkriptionsstart wurde mittels Primer Extension festgelegt. Die Analyse der Promotorregion von FHL1C lieferte Hinweise, daß diese Genvariante durch ein alternatives Promotorelement reguliert werden könnte. Die Expression von FHL1 und FHL1C wurde mittels RT-PCR auf verschiedenen porcinen Geweben untersucht. Dabei zeigte sich für FHL1C eine hohe gewebsspezifische Expression mit deutlichen Signalen im Skelettmuskel und im Gewebe von Blutgefäßen, schwache Signale konnten in Herz und Gehirn beobachtet werden. Die chromosomale Lokalisation des porcinen FHL1 Gens auf Chromosom Xq23-24 erfolgte über Screening eines somatischen Cell Hybrid Panels sowie durch FISH Analyse von porcinen Metaphasechromosomen.

8 Literaturverzeichnis

- Abbrink M., Aveskogh M. und Hellman L.** (1995) Isolation of cDNA clones for 42 different Kruppel-related zinc finger proteins expressed in the human monoblast cell line U-937. *DNA Cell Biol* **14**: 125-36.
- Airey J. A., Beck C. F., Murakami K., Tanksley S. J., Deerinck T. J., Ellisman M. H. und Sutko J. L.** (1990) Identification and localization of two triad junctional foot protein isoforms in mature avian fast twitch skeletal muscle. *J Biol Chem* **265**: 14187-94.
- Aizencang G. I., Bishop D. F., Forrest D., Astrin K. H. und Desnick R. J.** (2000) Uroporphyrinogen III Synthase. An alternative promoter controls erythroid-specific expression in the murine gene. *J Biol Chem* **275**: 2295-2304.
- Al-Bayati H. K., Duscher S., Kollers S., Rettenberger G., Fries R. und Brenig B.** (1999) Construction and characterization of a porcine P1-derived artificial chromosome (PAC) library covering 3.2 genome equivalents and cytogenetical assignment of six type I and type II loci. *Mamm Genome* **10**: 569-72.
- Allaway G. P., Vivino A. A., Kohn L. D., Notkins A. L. und Prabhakar B. S.** (1990) Characterization of the 70KDA component of the human Ku autoantigen expressed in insect cell nuclei using a recombinant baculovirus vector. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 747-55.
- Altermann E., Klein J. R. und Henrich B.** (1999) Synthesis and automated detection of fluorescently labeled primer extension products. *Biotechniques* **26**: 96-8, 101.
- Arber S. und Caroni P.** (1996) Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions *in situ*. *Genes Dev* **10**: 289-300.
- Arber S., Halder G. und Caroni P.** (1994) Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* **79**: 221-31.
- Arber S., Hunter J. J., Ross J., Jr., Hongo M., Sansig G., Borg J., Perriard J. C., Chien K. R. und Caroni P.** (1997) MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* **88**: 393-403.
- Bakalkin G., Yakovleva T., Hurd Y. L., Nussenzweig A., Li G. C. und Terenius L.** (1998) Autoantigen Ku in the brain. Developmentally regulated expression and subcellular localization. *Neuroreport* **9**: 2147-51.
- Beckerle M. C.** (1997) Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays* **19**: 949-57.
- Bellefroid E. J., Lecocq P. J., Benhida A., Poncelet D. A., Belayew A. und Martial J. A.** (1989) The human genome contains hundreds of genes coding for finger proteins of the Kruppel type. *DNA* **8**: 377-87.
- Bellefroid E. J., Poncelet D. A., Lecocq P. J., Revelant O. und Martial J. A.** (1991) The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3608-12.
- Benezra R., Davis R. L., Lockshon D., Turner D. L. und Weintraub H.** (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**: 49-59.
- Bione S., Maestrini E., Rivella S., Mancini M., Regis S., Romeo G. und Toniolo D.** (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* **8**: 323-7.
- Black B. L., Molkentin J. D. und Olson E. N.** (1998) Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol Cell Biol* **18**: 69-77.

- Blumenthal T.** (1998) Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *Bioessays* **20**: 480-7.
- Brand N. J.** (1997) Myocyte enhancer factor 2 (MEF2). *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 1467-70.
- Braun T., Bober E., Winter B., Rosenthal N. und Arnold H. H.** (1990) Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J* **9**: 821-31.
- Braun T., Buschhausen-Denker G., Bober E., Tannich E. und Arnold H. H.** (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J* **8**: 701-9.
- Bray P., Lichter P., Thiesen H. J., Ward D. C. und Dawid I. B.** (1991) Characterization and mapping of human genes encoding zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9563-7.
- Briggs M. R., Kadonaga J. T., Bell S. P. und Tjian R.** (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**: 47-52.
- Brillantes A. B., Ondrias K., Scott A., Kobrinsky E., Ondriasova E., Moschella M. C., Jayaraman T., Landers M., Ehrlich B. E. und Marks A. R.** (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* **77**: 513-23.
- Brown M. C., Perrotta J. A. und Turner C. E.** (1996) Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* **135**: 1109-23.
- Brown S., McGrath M. J., Ooms L. M., Gurung R., Maimone M. M. und Mitchell C. A.** (1999) Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform SLIMMER in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J Biol Chem* **274**: 27083-91.
- Burgess R. R.** (1991) Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins. *Methods Enzymol* **208**: 3-10.
- Burridge K., Molony L. und Kelly T.** (1987) Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl* **8**: 211-29.
- Call K. M., Glaser T., Ito C. Y., Buckler A. J., Pelletier J., Haber D. A., Rose E. A., Kral A., Yeger H. und Lewis W. H.** (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* **60**: 509-20.
- Callaway C., Seryshev A., Wang J. P., Slavik K. J., Needleman D. H., Cantu C., Wu Y., Jayaraman T., Marks A. R. und Hamilton S. L.** (1994) Localization of the high and low affinity [3H]ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J Biol Chem* **269**: 15876-84.
- Cameron A. M., Steiner J. P., Sabatini D. M., Kaplin A. I., Walensky L. D. und Snyder S. H.** (1995) Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1784-8.
- Caruccio L. und Banerjee R.** (1999) An efficient method for simultaneous isolation of biologically active transcription factors and DNA. *J Immunol Methods* **230**: 1-10.
- Chan K. K., Tsui S. K., Lee S. M., Luk S. C., Liew C. C., Fung K. P., Waye M. M. und Lee C. Y.** (1998) Molecular cloning and characterization of FHL2, a novel LIM domain protein preferentially expressed in human heart. *Gene* **210**: 345-50.

- Chavrier P., Vesque C., Galliot B., Vigneron M., Dolle P., Duboule D. und Charnay P.** (1990) The segment-specific gene *Krox-20* encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the *Hox-1.4* gene. *EMBO J* **9**: 1209-18.
- Chen E. Y. und Roe B. A.** (1978) The application of PEI-cellulose thin-layer chromatography for the resolution of large oligonucleotide fragments of transfer ribonucleic acids. *Anal Biochem* **89**: 45-59.
- Chen H., Kalaitzidaki M., Warren A. C., Avramopoulos D. und Antonarakis S. E.** (1993) A novel zinc finger cDNA with a polymorphic pentanucleotide repeat (ATTTT)_n maps on human chromosome 19p. *Genomics* **15**: 621-5.
- Chowdhary B. P., Thomsen P. D., Harbitz I., Landset M. und Gustavsson I.** (1994) Precise localization of the genes for glucose phosphate isomerase (GPI), calcium release channel (CRC), hormone-sensitive lipase (LIPE), and growth hormone (GH) in pigs, using nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **67**: 211-4.
- Church G. M. und Gilbert W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991-5.
- Collins J. H.** (1991) Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 1288-90.
- Coronado R., Morrissette J., Sukhareva M. und Vaughan D. M.** (1994) Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* **266**: C1485-504.
- Craig S. W. und Johnson R. P.** (1996) Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 74-85.
- Crawford A. W., Michelsen J. W. und Beckerle M. C.** (1992) An interaction between zyxin and alpha-actinin. *J Cell Biol* **116**: 1381-93.
- Crosby S. D., Puetz J. J., Simburger K. S., Fahrner T. J. und Milbrandt J.** (1991) The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol* **11**: 3835-41.
- Cserjesi P. und Olson E. N.** (1991) Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol Cell Biol* **11**: 4854-62.
- Czupryn M., Brown W. E. und Vallee B. L.** (1992) Zinc rapidly induces a metal response element-binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10395-9.
- Dalton T. P., Bittel D. und Andrews G. K.** (1997) Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain. *Mol Cell Biol* **17**: 2781-9.
- Damiani E., Tobaldin G., Volpe P. und Margreth A.** (1991) Quantitation of ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle, heart and brain. *Biochem Biophys Res Commun* **175**: 858-65.
- Davis C. A. und Benzer S.** (1997) Generation of cDNA expression libraries enriched for in-frame sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2128-32.
- Davis R. L., Weintraub H. und Lassar A. B.** (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**: 987-1000.
- Decker C. J. und Parker R.** (1995) Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 386-92.

- Ebashi S.** (1991) Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Physiol* **53**: 1-16.
- Edmondson D. G. und Olson E. N.** (1989) A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* **3**: 628-40.
- Edwards-Gilbert G., Veraldi K. L. und Milcarek C.** (1997) Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* **25**: 2547-61.
- Eisenberg S., Francesconi S. C., Civalier C. und Walker S. S.** (1990) Purification of DNA-binding proteins by site-specific DNA affinity chromatography. *Methods Enzymol* **182**: 521-9.
- El-Osta S., Kantharidis P. und Zalberg J. R.** (1997) Sequential extraction of DNA and DNA-binding proteins from low cell numbers. *Biotechniques* **22**: 645-8.
- Elrod-Erickson M. und Pabo C. O.** (1999) Binding studies with mutants of Zif268. Contribution of individual side chains to binding affinity and specificity in the Zif268 zinc finger- DNA complex. *J Biol Chem* **274**: 19281-5.
- Ferbus D., Le Chalony C., Prospero M. T., Muleris M., Vincent-Salomon A. und Goubin G.** (1996) Identification, nuclear localization, and binding activities of OZF, a human protein solely composed of zinc-finger motifs. *Eur J Biochem* **236**: 991-5.
- Ferguson D. G., Schwartz H. W. und Franzini-Armstrong C.** (1984) Subunit structure of junctional feet in triads of skeletal muscle: a freeze-drying, rotary-shadowing study. *J Cell Biol* **99**: 1735-42.
- Fill M., Stefani E. und Nelson T. E.** (1991) Abnormal human sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channels in malignant hyperthermic skeletal muscle. *Biophys J* **59**: 1085-90.
- Flucher B. E. und Franzini-Armstrong C.** (1996) Formation of junctions involved in excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8101-6.
- Fraser P., Cummings P. und Curtis P.** (1989) The mouse carbonic anhydrase I gene contains two tissue-specific promoters. *Mol Cell Biol* **9**: 3308-13.
- Froemming G. R. und Ohlendieck K.** (1998) Oligomerisation of Ca²⁺-regulatory membrane components involved in the excitation-contraction-relaxation cycle during postnatal development of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **1387**: 226-38.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V. K., Weiler J. E., O'Brien P. J. und MacLennan D. H.** (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**: 448-51.
- Furuichi T., Shiota C. und Mikoshiba K.** (1990) Distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA in mouse tissues. *FEBS Lett* **267**: 85-8.
- Futatsugi A., Kuwajima G. und Mikoshiba K.** (1995) Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing in mouse skeletal muscle ryanodine receptor mRNA. *Biochem J* **305**: 373-8.
- Gaston K. und Fried M.** (1992) The isolation of transcription factors from lambda gt11 cDNA expression libraries: human steroid 5 alpha-reductase 1 has sequence-specific DNA binding activity. *Nucleic Acids Res* **20**: 6297-301.
- Gaunitz F., Gaunitz C., Papke M. und Gebhardt R.** (1997) Cis-regulatory sequences from the first intron of the rat glutamine synthetase gene are involved in hepatocyte specific expression of the enzyme. *Biol Chem* **378**: 11-8.

- Genini M., Schwalbe P., Scholl F. A., Remppis A., Mattei M. G. und Schafer B. W.** (1997) Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma. *DNA Cell Biol* **16**: 433-42.
- Ghozi M. C., Weiss Y., Chen X. N., Bernstein Y., Dafni N., Korenberg J. R. und Groner Y.** (1994) Isolation, chromosomal localization, and sequence analysis of human chromosome 21 zinc finger domains. *Genomics* **20**: 487-9.
- Giannini G., Clementi E., Ceci R., Marziali G. und Sorrentino V.** (1992) Expression of a ryanodine receptor-Ca²⁺ channel that is regulated by TGF-beta. *Science* **257**: 91-4.
- Giannini G., Conti A., Mammarella S., Scrobogna M. und Sorrentino V.** (1995) The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J Cell Biol* **128**: 893-904.
- Gidoni D., Kadonaga J. T., Barrera-Saldana H., Takahashi K., Chambon P. und Tjian R.** (1985) Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science* **230**: 511-7.
- Gillard E. F., Otsu K., Fujii J., Khanna V. K., de Leon S., Derdemezi J., Britt B. A., Duff C. L., Worton R. G. und MacLennan D. H.** (1991) A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* **11**: 751-5.
- Gorza L., Schiaffino S. und Volpe P.** (1993) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in heart: evidence for its concentration in Purkinje myocytes of the conduction system. *J Cell Biol* **121**: 345-53.
- Gossett L. A., Kelvin D. J., Sternberg E. A. und Olson E. N.** (1989) A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* **9**: 5022-33.
- Greene W. K., Baker E., Rabbitts T. H. und Kees U. R.** (1999) Genomic structure, tissue expression and chromosomal location of the LIM-only gene, SLIM1. *Gene* **232**: 203-7.
- Grunwald R. und Meissner G.** (1995) Luminal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* **270**: 11338-47.
- Guo W., Jorgensen A. O. und Campbell K. P.** (1996) Triadin, a linker for calsequestrin and the ryanodine receptor. *Soc Gen Physiol Ser* **51**: 19-28.
- Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H. und Imoto K.** (1992) Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* **312**: 229-35.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Harbitz I., Kristensen T., Bosnes M., Kran S. und Davies W.** (1992) DNA sequence of the skeletal muscle calcium release channel cDNA and verification of the Arg615Cys615 mutation, associated with porcine malignant hyperthermia, in Norwegian landrace pigs. *Anim Genet* **23**: 395-402.
- Harbury P. B., Zhang T., Kim P. S. und Alber T.** (1993) A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* **262**: 1401-7.
- Hartmann C., Landgraf M., Bate M. und Jackle H.** (1997) Kruppel target gene knockout participates in the proper innervation of a specific set of *Drosophila* larval muscles. *EMBO J* **16**: 5299-309.
- Hawken R. J., Murtaugh J., Flickinger G. H., Yerle M., Robic A., Milan D., Gellin J., Beattie C. W., Schook L. B. und Alexander L. J.** (1999) A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mamm Genome* **10**: 824-30.

- Heitmann D., Ziehr H. und Muthing J.** (1998) Large scale purification of gangliosides GM3(Neu5Ac) and GM3(Neu5Gc) by trimethylaminoethyl-Fractogel high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **710**: 1-8.
- Hernandez N.** (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* **7**: 1291-308.
- Herrmann-Frank A., Darling E. und Meissner G.** (1991) Functional characterization of the Ca(2+)-gated Ca²⁺ release channel of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Arch* **418**: 353-9.
- Hidaka K., Yamamoto I., Arai Y. und Mukai T.** (1993) The MEF-3 motif is required for MEF-2-mediated skeletal muscle-specific induction of the rat aldolase A gene. *Mol Cell Biol* **13**: 6469-78.
- Hillier L. und Green P.** (1991) OSP: a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. *PCR Methods Appl* **1**: 124-8.
- Hohenegger M. und Suko J.** (1993) Phosphorylation of the purified cardiac ryanodine receptor by exogenous and endogenous protein kinases. *Biochem J* **296**: 303-8.
- Hollenberg S. M., Weinberger C., Ong E. S., Cerelli G., Oro A., Lebo R., Thompson E. B., Rosenfeld M. G. und Evans R. M.** (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**: 635-41.
- Hoovers J. M., Mannens M., John R., Blik J., van Heyningen V., Porteous D. J., Leschot N. J., Westerveld A. und Little P. F.** (1992) High-resolution localization of 69 potential human zinc finger protein genes: a number are clustered. *Genomics* **12**: 254-63.
- Hu L. J., Laporte J., Kioschis P., Heyberger S., Kretz C., Poustka A., Mandel J. L. und Dahi N.** (1996) X-linked myotubular myopathy: refinement of the gene to a 280-kb region with new and highly informative microsatellite markers. *Hum Genet* **98**: 178-81.
- Hu S., Fambrough D., Atashi J. R., Goodman C. S. und Crews S. T.** (1995) The *Drosophila abrupt* gene encodes a BTB-zinc finger regulatory protein that controls the specificity of neuromuscular connections. *Genes Dev* **9**: 2936-48.
- Hu Y., Cascone P. J., Cheng L., Sun D., Nambu J. R. und Schwartz L. M.** (1999) Lepidopteran DALP, and its mammalian ortholog HIC-5, function as negative regulators of muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10218-23.
- Hussey D. J., Parker N. J., Hussey N. D., Little P. F. und Dobrovic A.** (1997) Characterization of a KRAB family zinc finger gene, ZNF195, mapping to chromosome band 11p15.5. *Genomics* **45**: 451-5.
- Huttelmaier S., Bubeck P., Rudiger M. und Jockusch B. M.** (1997) Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur J Biochem* **247**: 1136-42.
- Jackle H., Rosenberg U. B., Preiss A., Seifert E., Knipple D. C., Kienlin A. und Lehmann R.** (1985) Molecular analysis of *Kruppel*, a segmentation gene of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**: 465-73.
- Kadonaga J. T., Carner K. R., Masiarz F. R. und Tjian R.** (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**: 1079-90.
- Kalenik J. L., Chen D., Bradley M. E., Chen S. J. und Lee T. C.** (1997) Yeast two-hybrid cloning of a novel zinc finger protein that interacts with the multifunctional transcription factor YY1. *Nucleic Acids Res* **25**: 843-9.
- Kelly T. J., Jallepalli P. V. und Clyne R. K.** (1994) Replication and transcription. Silence of the ORCs. *Curr Biol* **4**: 238-41.

- Kim K. C., Caswell A. H., Talvenheimo J. A. und Brandt N. R.** (1990) Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* **29**: 9281-9.
- Kingston R. E.** (1989) Transcription control and differentiation: the HLH family, c-myc and C/EBP. *Curr Opin Cell Biol* **1**: 1081-7.
- Kisu Y., Ono T., Shimofurutani N., Suzuki M. und Esaka M.** (1998) Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant Cell Physiol* **39**: 1054-64.
- Klug A. und Schwabe J. W.** (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. *Faseb J* **9**: 597-604.
- Klug J.** (1997) Ku autoantigen is a potential major cause of nonspecific bands in electrophoretic mobility shift assays. *Biotechniques* **22**: 212-4, 216.
- Knudson C. M., Stang K. K., Jorgensen A. O. und Campbell K. P.** (1993) Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem* **268**: 12637-45.
- Kozak M.** (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* **7**: 563-74.
- Krainc D., Bai G., Okamoto S., Carles M., Kusiak J. W., Brent R. N. und Lipton S. A.** (1998) Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1. *J Biol Chem* **273**: 26218-24.
- Krempler A. und Brenig B.** (1996) Muskelspezifische Genexpression in der Embryonalentwicklung. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr* **103**: 408-13.
- Krempler A. und Brenig B.** (1999) Zinc finger proteins: watchdogs in muscle development. *Mol Gen Genet* **261**: 209-15.
- Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J. R. und Chambon P.** (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51**: 941-51.
- Lahbib-Mansais Y., Dalias G., Milan D., Yerle M., Robic A., Gyapay G. und Gellin J.** (1999) A successful strategy for comparative mapping with human ESTs: 65 new regional assignments in the pig. *Mamm Genome* **10**: 145-53.
- Lange R., Christoph A., Thiesen H. J., Vopper G., Johnson K. R., Lemaire L., Plomann M., Cremer H., Barthels D. und Heinlein U. A.** (1995) Developmentally regulated mouse gene NK10 encodes a zinc finger repressor protein with differential DNA-binding domains. *DNA Cell Biol* **14**: 971-81.
- Laporte J., Hu L. J., Kretz C., Mandel J. L., Kioschis P., Coy J. F., Klauck S. M., Poustka A. und Dahl N.** (1996) A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* **13**: 175-82.
- Lassar A. B., Davis R. L., Wright W. E., Kadesch T., Murre C., Voronova A., Baltimore D. und Weintraub H.** (1991) Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero- oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**: 305-15.
- Lazar M. A., Berrodin T. J. und Harding H. P.** (1991) Differential DNA binding by monomeric, homodimeric, and potentially heteromeric forms of the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol* **11**: 5005-15.

- Le Chalony C., Apiou F., Pibouin L., Dutrillaux B. und Goubin G.** (1996) Constitutive amplification of a zinc finger protein gene in cattle. *DNA Cell Biol* **15**: 83-8.
- Le Chalony C., Prospero M. T., Haluza R., Apiou F., Dutrillaux B. und Goubin G.** (1994) The OZF gene encodes a protein consisting essentially of zinc finger motifs. *J Mol Biol* **236**: 399-404.
- Leach L. M., Ellis M., Sutton D. S., McKeith F. K. und Wilson E. R.** (1996) The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. *J Anim Sci* **74**: 934-43.
- Ledbetter M. W., Preiner J. K., Louis C. F. und Mickelson J. R.** (1994) Tissue distribution of ryanodine receptor isoforms and alleles determined by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Biol Chem* **269**: 31544-51.
- Lee S. M., Li H. Y., Ng E. K., Or S. M., Chan K. K., Kotaka M., Chim S. S., Tsui S. K., Waye M. M., Fung K. P. und Lee C. Y.** (1999) Characterization of a brain-specific nuclear LIM domain protein (FHL1B) which is an alternatively spliced variant of FHL1. *Gene* **237**: 253-63.
- Lee S. M., Tsui S. K., Chan K. K., Garcia-Barcelo M., Waye M. M., Fung K. P., Liew C. C. und Lee C. Y.** (1998a) Chromosomal mapping, tissue distribution and cDNA sequence of four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1). *Gene* **216**: 163-70.
- Lee S. M., Tsui S. K., Chan K. K., Kotaka M., Li H. Y., Chim S. S., Waye M. M., Fung K. P. und Lee C. Y.** (1998b) Chromosomal mapping of a skeletal muscle specific LIM-only protein FHL3 to the distal end of the short arm of human chromosome 1. *Somat Cell Mol Genet* **24**: 197-202.
- Lee T. C., Shi Y. und Schwartz R. J.** (1992) Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9814-8.
- Lee T. C., Zhang Y. und Schwartz R. J.** (1994) Bifunctional transcriptional properties of YY1 in regulating muscle actin and c-myc gene expression during myogenesis. *Oncogene* **9**: 1047-52.
- Leeb T. und Brenig B.** (1996) Structural analysis of the porcine skeletal muscle ryanodine receptor gene coding region 3385 to 4623. *Mamm Genome* **7**: 152-4.
- Leeb T. und Brenig B.** (1998a) cDNA cloning and sequencing of the human ryanodine receptor type 3 (RYR3) reveals a novel alternative splice site in the RYR3 gene. *FEBS Lett* **423**: 367-70.
- Leeb T. und Brenig B.** (1998b) Ryanodine receptors and their role in genetic diseases (Review). *Int J Mol Med* **2**: 293-300.
- Leeb T., Rettenberger G., Hameister H., Brem G. und Brenig B.** (1995) Construction of a porcine YAC library and mapping of the cardiac muscle ryanodine receptor gene to chromosome 14q22-q23. *Mamm Genome* **6**: 37-41.
- Leite M. F., Dranoff J. A., Gao L. und Nathanson M. H.** (1999) Expression and subcellular localization of the ryanodine receptor in rat pancreatic acinar cells. *Biochem J* **337**: 305-9.
- Lemercier C., To R. Q., Carrasco R. A. und Konieczny S. F.** (1998) The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *EMBO J* **17**: 1412-22.
- Lichter P., Bray P., Ried T., Dawid I. B. und Ward D. C.** (1992) Clustering of C2-H2 zinc finger motif sequences within telomeric and fragile site regions of human chromosomes. *Genomics* **13**: 999-1007.
- Lichtsteiner S. und Tjian R.** (1995) Synergistic activation of transcription by UNC-86 and MEC-3 in *Caenorhabditis elegans* embryo extracts. *EMBO J* **14**: 3937-45.

- Liska D. J., Robinson V. R. und Bornstein P.** (1992) Elements in the first intron of the alpha 1(I) collagen gene interact with Sp1 to regulate gene expression. *Gene Expr* **2**: 379-89.
- Louis H. A., Pino J. D., Schmeichel K. L., Pomies P. und Beckerle M. C.** (1997) Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J Biol Chem* **272**: 27484-91.
- Lovering R. und Trowsdale J.** (1991) A gene encoding 22 highly related zinc fingers is expressed in lymphoid cell lines. *Nucleic Acids Res* **19**: 2921-8.
- Lussier M., Sdicu A. M., Bussereau F., Jacquet M. und Bussey H.** (1997a) The Ktr1p, Ktr3p, and Kre2p/Mnt1p mannosyltransferases participate in the elaboration of yeast O- and N-linked carbohydrate chains. *J Biol Chem* **272**: 15527-31.
- Lussier M., Sdicu A. M., Winnett E., Vo D. H., Sheraton J., Dusterhoft A., Storms R. K. und Bussey H.** (1997b) Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence allows identification of KTR5, KTR6 and KTR7 and definition of the nine-membered KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family in this organism. *Yeast* **13**: 267-74.
- MacLennan D. H., Duff C., Zorzato F., Fujii J., Phillips M., Korneluk R. G., Frodis W., Britt B. A. und Worton R. G.** (1990) Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* **343**: 559-61.
- Majumdar K. C., Shetty S., Wadhwa R., Bhaskar S., Ganesan M. und Singh L.** (1996) Detection and purification of sequence-specific DNA binding protein. *Anal Biochem* **241**: 23-9.
- Mar J. H. und Ordahl C. P.** (1990) M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* **10**: 4271-83.
- Marziali G., Rossi D., Giannini G., Charlesworth A. und Sorrentino V.** (1996) cDNA cloning reveals a tissue specific expression of alternatively spliced transcripts of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) calcium release channel. *FEBS Lett* **394**: 76-82.
- Mayrleitner M., Timerman A. P., Wiederrecht G. und Fleischer S.** (1994) The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein: effect of FKBP-12 on single channel activity of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Cell Calcium* **15**: 99-108.
- McCarthy T. V., Healy J. M., Heffron J. J., Lehane M., Deufel T., Lehmann-Horn F., Farrall M. und Johnson K.** (1990) Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* **343**: 562-4.
- McKeon C., Accili D., Chen H., Pham T. und Walker G. E.** (1997) A conserved region in the first intron of the insulin receptor gene binds nuclear proteins during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 701-6.
- McPherson P. S., Kim Y. K., Valdivia H., Knudson C. M., Takekura H., Franzini-Armstrong C., Coronado R. und Campbell K. P.** (1991) The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* **7**: 17-25.
- Michalak M., Dupraz P. und Shoshan-Barmatz V.** (1988) Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane; comparison between cardiac and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **939**: 587-94.
- Mickelson J. R., Knudson C. M., Kennedy C. F., Yang D. I., Litterer L. A., Rempel W. E., Campbell K. P. und Louis C. F.** (1992) Structural and functional correlates of a mutation in the malignant hyperthermia-susceptible pig ryanodine receptor. *FEBS Lett* **301**: 49-52.

- Miller J., McLachlan A. D. und Klug A.** (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **4**: 1609-14.
- Miner J. H. und Wold B.** (1990) Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1089-93.
- Miyatake R., Furukawa A., Matsushita M., Iwahashi K., Nakamura K., Ichikawa Y. und Suwaki H.** (1996) Tissue-specific alternative splicing of mouse brain type ryanodine receptor/calcium release channel mRNA. *FEBS Lett* **395**: 123-6.
- Morgan M. J. und Madgwick A. J.** (1996) Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 632-8.
- Morgan M. J. und Madgwick A. J.** (1999a) The fourth member of the FHL family of LIM proteins is expressed exclusively in the testis. *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 251-5.
- Morgan M. J. und Madgwick A. J.** (1999b) The LIM proteins FHL1 and FHL3 are expressed differently in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 245-50.
- Murre C., McCaw P. S., Vaessin H., Caudy M., Jan L. Y., Jan Y. N., Cabrera C. V., Buskin J. N., Hauschka S. D. und Lassar A. B.** (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**: 537-44.
- Nakai J., Imagawa T., Hakamat Y., Shigekawa M., Takeshima H. und Numa S.** (1990) Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* **271**: 169-77.
- Nakashima Y., Nishimura S., Maeda A., Barsoumian E. L., Hakamata Y., Nakai J., Allen P. D., Imoto K. und Kita T.** (1997) Molecular cloning and characterization of a human brain ryanodine receptor. *FEBS Lett* **417**: 157-62.
- Nakata K., Nagai T., Aruga J. und Mikoshiba K.** (1997) *Xenopus* Zic3, a primary regulator both in neural and neural crest development. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**: 11980-5.
- Neufer P. D., Carey J. O. und Dohm G. L.** (1993) Transcriptional regulation of the gene for glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle. Effects of diabetes and fasting. *J Biol Chem* **268**: 13824-9.
- Niehrs C. und Pollet N.** (1999) Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* **402**: 483-7.
- Nix D. A. und Beckerle M. C.** (1997) Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J Cell Biol* **138**: 1139-47.
- O'Mahoney J. V., Brandon M. R. und Adams T. E.** (1994) Identification of a liver-specific promoter for the ovine growth hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol* **101**: 129-39.
- Ogawa Y.** (1994) Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **29**: 229-74.
- Oka C., Nakano T., Wakeham A., de la Pompa J. L., Mori C., Sakai T., Okazaki S., Kawaichi M., Shiota K., Mak T. W. und Honjo T.** (1995) Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**: 3291-301.
- Olivares E. B., Tanksley S. J., Airey J. A., Beck C. F., Ouyang Y., Deerinck T. J., Ellisman M. H. und Sutko J. L.** (1991) Nonmammalian vertebrate skeletal muscles express two triad junctional foot protein isoforms. *Biophys J* **59**: 1153-63.

- Olofsson S. O. und Gustafson A.** (1976) Studies on human serum high-density lipoproteins. V. Isolation and characterization of a cholesterol ester-rich lipoprotein after in vitro incubation. *Scand J Clin Lab Invest* **36**: 67-74.
- Otsu K., Fujii J., Periasamy M., Difilippantonio M., Uppender M., Ward D. C. und MacLennan D. H.** (1993) Chromosome mapping of five human cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum protein genes. *Genomics* **17**: 507-9.
- Otsu K., Khanna V. K., Archibald A. L. und MacLennan D. H.** (1991) Cosegregation of porcine malignant hyperthermia and a probable causal mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene in backcross families. *Genomics* **11**: 744-50.
- Otsu K., Nishida K., Kimura Y., Kuzuya T., Hori M., Kamada T. und Tada M.** (1994) The point mutation Arg615-->Cys in the Ca²⁺ release channel of skeletal sarcoplasmic reticulum is responsible for hypersensitivity to caffeine and halothane in malignant hyperthermia. *J Biol Chem* **269**: 9413-5.
- Oyamada H., Murayama T., Takagi T., Iino M., Iwabe N., Miyata T., Ogawa Y. und Endo M.** (1994) Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *J Biol Chem* **269**: 17206-14.
- Parmacek M. S., Ip H. S., Jung F., Shen T., Martin J. F., Vora A. J., Olson E. N. und Leiden J. M.** (1994) A novel myogenic regulatory circuit controls slow/cardiac troponin C gene transcription in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **14**: 1870-85.
- Passantino R., Antona V., Barbieri G., Rubino P., Melchionna R., Cossu G., Feo S. und Giallongo A.** (1998) Negative regulation of beta enolase gene transcription in embryonic muscle is dependent upon a zinc finger factor that binds to the G-rich box within the muscle-specific enhancer. *J Biol Chem* **273**: 484-94.
- Pavletich N. P. und Pabo C. O.** (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**: 809-17.
- Penotti F. E.** (1990) Human DNA TATA boxes and transcription initiation sites. A statistical study. *J Mol Biol* **213**: 37-52.
- Pessah I. N. und Zimanyi I.** (1991) Characterization of multiple [3H]ryanodine binding sites on the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Mol Pharmacol* **39**: 679-89.
- Phillips M. S., Fujii J., Khanna V. K., DeLeon S., Yokobata K., de Jong P. J. und MacLennan D. H.** (1996) The structural organization of the human skeletal muscle ryanodine receptor (*RYR1*) gene. *Genomics* **34**: 24-41.
- Pieler T. und Bellefroid E.** (1994) Perspectives on zinc finger protein function and evolution--an update. *Mol Biol Rep* **20**: 1-8.
- Postigo A. A. und Dean D. C.** (1997) ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *EMBO J* **16**: 3935-43.
- Prento P.** (1997) The effects of freezing, storage, and thawing on cell compartment integrity and ultrastructure. *Histochem Cell Biol* **108**: 543-7.
- Quane K. A., Healy J. M., Keating K. E., Manning B. M., Couch F. J., Palmucci L. M., Doriguzzi C., Fagerlund T. H., Berg K. und Ording H.** (1993) Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nat Genet* **5**: 51-5.

- Rajaram O. V. und Barter P. J.** (1986) Increases in the particle size of high-density lipoproteins induced by purified lecithin: cholesterol acyltransferase: effect of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **877**: 406-14.
- Reed K. C. und Mann D. A.** (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res* **13**: 7207-21.
- Reinhard M., Jouvenal K., Tripier D. und Walter U.** (1995) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7956-60.
- Rhodes S. J. und Konieczny S. F.** (1989) Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* **3**: 2050-61.
- Robinson R., Curran J. L., Hall W. J., Halsall P. J., Hopkins P. M., Markham A. F., Stewart A. D., West S. P. und Ellis F. R.** (1998) Genetic heterogeneity and HOMOG analysis in British malignant hyperthermia families. *J Med Genet* **35**: 196-201.
- Roseblit N., Moschella M. C., Ondriasa E., Gutstein D. E., Ondrias K. und Marks A. R.** (1999) Intracellular calcium release channel expression during embryogenesis. *Dev Biol* **206**: 163-77.
- Sadler I., Crawford A. W., Michelsen J. W. und Beckerle M. C.** (1992) Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *J Cell Biol* **119**: 1573-87.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. und Erlich H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Salgia R., Li J. L., Lo S. H., Brunkhorst B., Kansas G. S., Sobhany E. S., Sun Y., Pisick E., Hallek M. und Ernst T.** (1995) Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem* **270**: 5039-47.
- Samso M. und Wagenknecht T.** (1998) Contributions of electron microscopy and single-particle techniques to the determination of the ryanodine receptor three-dimensional structure. *J Struct Biol* **121**: 172-80.
- Sanchez-Garcia I. und Rabbitts T. H.** (1994) The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet* **10**: 315-20.
- Sandstrom D. J., Bayer C. A., Fristrom J. W. und Restifo L. L.** (1997) Broad-complex transcription factors regulate thoracic muscle attachment in *Drosophila*. *Dev Biol* **181**: 168-85.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-7.
- Savineau J. P. und Mironneau J.** (1990) Caffeine acting on pregnant rat myometrium: analysis of its relaxant action and its failure to release Ca²⁺ from intracellular stores. *Br J Pharmacol* **99**: 261-6.
- Schmeichel K. L. und Beckerle M. C.** (1998) LIM domains of cysteine-rich protein 1 (CRP1) are essential for its zyxin-binding function. *Biochem J* **331**: 885-92.
- Schmoelzl S., Leeb T., Brinkmeier H., Brem G. und Brenig B.** (1996) Regulation of tissue-specific expression of the skeletal muscle ryanodine receptor gene. *J Biol Chem* **271**: 4763-9.
- Schuh R., Aicher W., Gaul U., Cote S., Preiss A., Maier D., Seifert E., Nauber U., Schroder C. und Kemler R.** (1986) A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell* **47**: 1025-32.

- Seppen J., Jansen P. L. und Oude Elferink R. P.** (1995) Immunoaffinity purification and reconstitution of the human bilirubin/phenol UDP-glucuronosyltransferase family. *Protein Expr Purif* **6**: 149-54.
- Shilatifard A.** (1998) The RNA polymerase II general elongation complex. *Biol Chem* **379**: 27-31.
- Shoshan-Barmatz V. und Ashley R. H.** (1998) The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels. *Int Rev Cytol* **183**: 185-270.
- Singh H., LeBowitz J. H., Baldwin A. S., Jr. und Sharp P. A.** (1988) Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell* **52**: 415-23.
- Sloop C. H., Castle C. K., Lefevre M. und Wong L.** (1993) Comparison of the lipid and apolipoprotein composition of skeletal muscle and peripheral lymph in control dogs and in dogs fed a high fat, high cholesterol, hypothyroid-inducing diet. *Biochim Biophys Acta* **1169**: 196-201.
- Sorrentino V., Giannini G., Malzac P. und Mattei M. G.** (1993) Localization of a novel ryanodine receptor gene (*RYR3*) to human chromosome 15q14-q15 by *in situ* hybridization. *Genomics* **18**: 163-5.
- Stahl W. L. und Swanson P. D.** (1975) Effects of freezing and storage on subcellular fractionation of guinea pig and human brain. *Neurobiology* **5**: 393-400.
- Stuempfle K. J. und Floros J.** (1997) Caution is advised when cDNA expression libraries are screened by southwestern methodologies. *Biotechniques* **22**: 260-4.
- Sugiyama T., Yamamoto-Hino M., Miyawaki A., Furuichi T., Mikoshiba K. und Hasegawa M.** (1994) Subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in human hematopoietic cell lines: dynamic aspects of their cell-type specific expression. *FEBS Lett* **349**: 191-6.
- Suko J., Maurer-Fogy I., Plank B., Bertel O., Wiskovsky W., Hohenegger M. und Hellmann G.** (1993) Phosphorylation of serine 2843 in ryanodine receptor-calcium release channel of skeletal muscle by cAMP-, cGMP- and CaM-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* **1175**: 193-206.
- Sutko J. L., Airey J. A., Murakami K., Takeda M., Beck C., Deerinck T. und Ellisman M. H.** (1991) Foot protein isoforms are expressed at different times during embryonic chick skeletal muscle development. *J Cell Biol* **113**: 793-803.
- Takai D., Kirinoki M., Miyazaki J. und Hirabayashi T.** (1994) Detection and characterization of muscle-specific nuclear proteins. *J Biochem (Tokyo)* **115**: 219-23.
- Takehima H., Iino M., Takekura H., Nishi M., Kuno J., Minowa O., Takano H. und Noda T.** (1994a) Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* **369**: 556-9.
- Takehima H., Ikemoto T., Nishi M., Nishiyama N., Shimuta M., Sugitani Y., Kuno J., Saito I., Saito H., Endo M., Iino M. und Noda T.** (1996) Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J Biol Chem* **271**: 19649-52.
- Takehima H., Nishi M., Iwabe N., Miyata T., Hosoya T., Masai I. und Hotta Y.** (1994b) Isolation and characterization of a gene for a ryanodine receptor/calcium release channel in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett* **337**: 81-7.
- Takehima H., Nishimura S., Matsumoto T., Ishida H., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H., Ueda M., Hanaoka M., Hirose T. und et al.** (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**: 439-45.

- Takeshima H., Shimuta M., Komazaki S., Ohmi K., Nishi M., Iino M., Miyata A. und Kangawa K.** (1998) Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem J* **331**: 317-22.
- Tamura K., Taniguchi Y., Minoguchi S., Sakai T., Tun T., Furukawa T. und Honjo T.** (1995) Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* **5**: 1416-23.
- Taniguchi Y., Furukawa T., Tun T., Han H. und Honjo T.** (1998) LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with the RBP-J DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* **18**: 644-54.
- Tarroni P., Rossi D., Conti A. und Sorrentino V.** (1997) Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **272**: 19808-13.
- Theunissen O., Rudt F., Guddat U., Mentzel H. und Pieler T.** (1992) RNA and DNA binding zinc fingers in Xenopus TFIIIA. *Cell* **71**: 679-90.
- Thukral S. K., Eisen A. und Young E. T.** (1991) Two monomers of yeast transcription factor ADR1 bind a palindromic sequence symmetrically to activate ADH2 expression. *Mol Cell Biol* **11**: 1566-77.
- Timerman A. P., Jayaraman T., Wiederrecht G., Onoue H., Marks A. R. und Fleischer S.** (1994) The ryanodine receptor from canine heart sarcoplasmic reticulum is associated with a novel FK-506 binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **198**: 701-6.
- Ting N. S., Kao P. N., Chan D. W., Lintott L. G. und Lees-Miller S. P.** (1998) DNA-dependent protein kinase interacts with antigen receptor response element binding proteins NF90 and NF45. *J Biol Chem* **273**: 2136-45.
- Trainor C. D., Evans T., Felsenfeld G. und Boguski M. S.** (1990) Structure and evolution of a human erythroid transcription factor. *Nature* **343**: 92-6.
- Tunwell R. E., Wickenden C., Bertrand B. M., Shevchenko V. I., Walsh M. B., Allen P. D. und Lai F. A.** (1996) The human cardiac muscle ryanodine receptor-calcium release channel: identification, primary structure and topological analysis. *Biochem J* **318**: 477-87.
- Turner C. E., Kramarcy N., Sealock R. und Burridge K.** (1991) Localization of paxillin, a focal adhesion protein, to smooth muscle dense plaques, and the myotendinous and neuromuscular junctions of skeletal muscle. *Exp Cell Res* **192**: 651-5.
- Vinson C. R., LaMarco K. L., Johnson P. F., Landschulz W. H. und McKnight S. L.** (1988) *In situ* detection of sequence-specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage. *Genes Dev* **2**: 801-6.
- Vorbruggen G. und Jackle H.** (1997) Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic stripe expression in the developing *Drosophila* epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8606-11.
- Walker M. D., Park C. W., Rosen A. und Aronheim A.** (1990) A cDNA from a mouse pancreatic beta cell encoding a putative transcription factor of the insulin gene. *Nucleic Acids Res* **18**: 1159-66.
- Waterhouse A. L., Pessah I. N., Francini A. O. und Casida J. E.** (1987) Structural aspects of ryanodine action and selectivity. *J Med Chem* **30**: 710-6.
- Weintraub H., Dwarki V. J., Verma I., Davis R., Hollenberg S., Snider L., Lassar A. und Tapscott S. J.** (1991) Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* **5**: 1377-86.
- Wen G., Leeb T., Reinhart B., Schmoelzl S. und Brenig B.** (1996) The porcine skeletal muscle ryanodine receptor gene structure coding region 1 to 10614 harbouring 71 exons. *Anim Genet* **27**: 297-304.

- White M. J., Hirsch J. P. und Henry S. A.** (1991) The OPI1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a negative regulator of phospholipid biosynthesis, encodes a protein containing polyglutamine tracts and a leucine zipper. *J Biol Chem* **266**: 863-72.
- Williams A. J., Khachigian L. M., Shows T. und Collins T.** (1995) Isolation and characterization of a novel zinc-finger protein with transcription repressor activity. *J Biol Chem* **270**: 22143-52.
- Wintero A. K., Jorgensen C. B., Robic A., Yerle M. und Fredholm M.** (1998) Improvement of the porcine transcription map: localization of 33 genes, of which 24 are orthologous. *Mamm Genome* **9**: 366-72.
- Wolfe S. A., Greisman H. A., Ramm E. I. und Pabo C. O.** (1999) Analysis of zinc fingers optimized via phage display: evaluating the utility of a recognition code. *J Mol Biol* **285**: 1917-34.
- Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. und Felgner P. L.** (1990) Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**: 1465-8.
- Wright W. E., Sassoon D. A. und Lin V. K.** (1989) Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**: 607-17.
- Xiao H. und Jeang K. T.** (1998) Glutamine-rich domains activate transcription in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 22873-6.
- Yang C. C., Ornatsky O. I., McDermott J. C., Cruz T. F. und Prody C. A.** (1998) Interaction of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) with a mitogen- activated protein kinase, ERK5/BMK1. *Nucleic Acids Res* **26**: 4771-7.
- Yerle M., Echard G., Robic A., Mairal A., Dubut-Fontana C., Riquet J., Pinton P., Milan D., Lahbib-Mansais Y. und Gellin J.** (1996) A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet* **73**: 194-202.
- Zamir E., Katz B. Z., Aota S., Yamada K. M., Geiger B. und Kam Z.** (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **112**: 1655-69.
- Zhang L., Kelley J., Schmeisser G., Kobayashi Y. M. und Jones L. R.** (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **272**: 23389-97.
- Zhang W., Zhang J., Kornuc M., Kwan K., Frank R. und Nimer S. D.** (1995) Molecular cloning and characterization of NF-IL3A, a transcriptional activator of the human interleukin-3 promoter. *Mol Cell Biol* **15**: 6055-63.
- Zhang X. und Smith T. F.** (1998) Yeast "operons". *Microb Comp Genomics* **3**: 133-40.
- Zhang Y., Chen H. S., Khanna V. K., De Leon S., Phillips M. S., Schappert K., Britt B. A., Browell A. K. und MacLennan D. H.** (1993) A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease. *Nat Genet* **5**: 46-50.
- Zhao J., Hyman L. und Moore C.** (1999) Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 405-45.
- Zorzato F., Fujii J., Otsu K., Phillips M., Green N. M., Lai F. A., Meissner G. und MacLennan D. H.** (1990) Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **265**: 2244-56.

9 Anhang

Primersequenzen:

Standardsequenzierprimer (IRD800 markiert oder unmarkiert):

M13universal: 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

M13revers: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

Oligo A5:

A5-1: 5'-TCG ACG CTT CGC CAC GAG GGG AAC TCC AGA G-3'

A5-2: 5'-TCG ACT CTG GAG TTC CCC TCG TGG CGA AGC G-3'

Oligo Sp1:

Sp1-1: 5'-ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C-3'

Sp1-2: 5'-GCT CGC CCC GCC CCG ATC GAA T-3'

PCR-Primer für RyREF2:

REF2-1: 5'-TAA CAA TCT ACT TCG TCC AG-3'

REF2-2: 5'-CCA TCT CCA ATA ACT TTT CC-3'

REF2-3: 5'-GGA AAA GTT ATT GGA GAT G-3'

REF2-4: 5'-AAT TGC TAC TGT TAA TGG TG-3'

DNase I Footprint:

A5univIRD: 5'-AAA TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCT TCG CCA GGG GAA CTC
CAG AGT CTT T-3' (IRD800 markiert)

A5rev: 5'-AAA CAG GAA ACA GCT ATG ACC AAA TAA AGA CTC TGG AGT
TCC CCT GGC GAA GC-3'

Subfragmente von Oligo A5

A5-1.1: 5'-GCT TCG CCA GGG GAA-3'

A5-1.2: 5'-TTC CCC TGG CGA AGC-3'
A5-2.1: 5'-CTC CAG AGT CTT T-3'
A5-2.2: 5'-AAA GAC TCT GGA G-3'
A5-3.1: 5'-CAG GGG AAC TCC AG-3'
A5-3.2: 5'-CTG GAG TTC CCC TG-3'

Zinkfinger Konsensussequenz:

ZF-deg: 5'-AC(G/T) CA(C/T) AC(T/A) GG(G/A) GAG AAG CC(C/G)-3'

Primer aus den Phagenarmen von λ ZAP Express:

PBK-CMVT7: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
PBK-CMVT3: 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'

PCR Primer für FHL1:

FHL1: 5'-GGG TTT GGA GAC TTG CAT G-3'
FHL2: 5'-AGA CTC ACA AGA GCA GCC G-3'
FHL3: 5'-AAG AGA TAA AGC CCC CAC-3'
FHL4: 5'-GCC ACA AAT CCA AAT CC-3'
FHL1gen: 5'-ATC AAA AGA GAG AGG GAC G-3'
FHL2gen: 5'-ATC ACA GGG ACA GAA GG-3'
FHL-GS1: 5'-CAA GAG AAG GAA GCG ACA AG-3'
FHL-GS2: 5'-TCC AGA GGG GAG GGA AC-3'
FHLg31: 5'-AAC AGC CTC ACT GAC TGA C-3'
FHLg32: 5'-AAA CCC AAC CTC CTT CCT C-3'

5'-RACE von FHL1:

FHL/R: 5'-GTA ACA CAC ACA AAG CAC TCG GC-3'
FHL/NR: 5'-CCG TCC TTC TGC ACG TAC TTC TTT CCC-3'

Primer Extension von FHL1C:

FHLprex1: 5'-CCC TGC AGT AGT GGC AGT CAA ACT TCT CGG-3'

FHLprex4: 5'-CCC CAG AGA TCG CAA CCT TAA TCC C-3'

Primer für RT-PCR:

FHLtrans-rev: 5'-TTC TGC ACG TAC TTC TTT CC-3''

FHLtrans-fwd1: 5'-TTT CTC TGC GGC CTC TC-3'

FHLtrans-fwd2: 5'-TTT TTA CTG GGT CCT ATT CTT C-3'

FHLtrans-fwd3: 5'-TCT CGG TTA TTT TCG TGT TC-3'

FHL/NR2: 5'-TTT AAG GGG AAG CGG TGA ACA CG-3'

FHL-RTE_x4: 5'-GAA CGT GGA GTA CAA GGG-3'

FHL-RTE_x6: 5'-AAG AAG GAC AGG AGG AGC-3'

Sequenzierprimer für FHL1:

FHLgen3: 5'-TTT GCT TTT GTT TCC TCC GC-3'

FHLgen4: 5'-CAC ACG TAA TGA CAG CGC G-3'

FHLgen5: 5'-GGG CTT CTC CGC TTT ATC C-3'

FHLgen6: 5'-ATA CGC GCT GTC ATT ACG TG-3'

FHLgen7: 5'-GGC AGG AGG AAC GCT CCG-3'

FHLgen8: 5'-ATG CTT CTT CCT GGG GTG C-3'

FHLgen9: 5'-GGC TAG GTC TTG CGC ATG G-3'

FHLgen10: 5'-GCT CAC TCT TGA CAC AGT CC-3'

FHLgen17: 5'-TGA GCC CAG AGA CCT GCC-3'

FHLgen18: 5'-GGA AAG GGA GGC GTA GAG C-3'

FHLgen19: 5'-GGA AAG CAA GGG GCT GCG-3'

FHLgen20: 5'-GCT CCA GAG CCC TTT GGC-3'

FHLgen21: 5'-AGG CGC CCG ACG GGC TGG-3'

FHLgen22: 5'-CGC GGT GTA CTT GGG AGG-3'

FHLgen23: 5'-GAT GTT TCA AGG GCG AGC C-3'

FHLgen24: 5'-ACG ATG AAA GCA GAA ACG GG-3'

FHLgen25: 5'-CCC TTC CAC TGT CTC ACG G-3'

FHLgen26: 5'-GTC AGT GAG GCT GTT CAC C-3'

FHLgen27A: 5'-CGC CAC TTC CCC TCC TGG-3'

Gesamtsequenz des analysierten genomischen Abschnittes aus den Klonen λ FHLgen9.2.2 und PACFHL-O062/F4. Die Sequenz ist bei der EMBL Nucleotide Sequence Database gespeichert (ACC: AJ275967).

CTGGCAGTCC	GGGCTGTCTT	TAGAATAACT	TCCCGTGAGA	CAGTGGAAGG	GCACAGGCGT	60
CCTCAGAGTC	TGGCATCCGT	TGCTGAAGCG	GGTATGGCTC	ACCGGCCAGG	CCTGGGGACA	120
GAAGACGAGG	AAAGCATGGC	CCTGGCCCCC	GAGTCAGGGT	TGTCTACACT	CCTTGATGTT	180
CAGTGGCGGA	AGCCACTTGT	AGGGTTCCTGG	GTGGGACTGT	GTTTCACTTT	TATGTGAGGC	240
TTGGCAAACC	CTTTTCAAGT	TGTGGAATTT	GGTTTTTCCA	CACGGAGTCA	CTGAGGAAGC	300
TGGGGGCAGT	GGGGGCAGCG	TTCGGCGGGG	TGGCTGGGGA	AGATGGCCCG	AGAAAAGTGAC	360
CTGAAGCCAA	GCCTGGAGGA	AGCAGAGGAG	CCAGCGCGAG	GCCCGGGGCG	GAGGGCCCCG	420
CTGCCGGGGG	CGGGTACCCT	GGGGTGGGGC	GGGTGAGGAG	GGCGCAGGGC	ACGGCCCCGG	480
CGGGGGCGCG	ACGGCTCCCT	CTGGGGCCCC	GTCTCCAGCC	ATCGCATGGC	CCGTTGGGGT	540
CACGGTGTTT	CTGTCCCCGT	TTCCTGCTTT	ATCGTCCCTG	ACAGTGGAAA	GCAAGGGGCT	600
GCGTTTGTGG	GACACGGTCT	CTTCCCTCGT	TACTAGCAGG	TGTGTGCGTG	TGTCTGCCCC	660
TCGGGCCCGC	CCTGTCTGGC	ACTCAGGAGG	GGTGCTCTTT	TCAGGATCCT	GCCAACCTCC	720
GGGACAGACC	CAGGAGGACA	CGGGCCGTGC	CCTCGACCTG	TGTGGCCCTC	GCCACCAGTG	780
CGTCTTTCCC	CCGCTGCCGC	CGGCGGTCTG	TCTCGTACAG	TTACTTTGAC	CAGTAGCAGC	840
ACAAACTCGC	GTCTTCCGG	GGCCCGCGGG	CGAGCTCATC	GGGCGTATAA	AGTAGATTAA	900
TGGGGTGGCT	CAGCGTTGAG	GTATGCCACG	GCCGCGTCCA	AATTTTATTC	CGGTACAGGG	960
ATCACTTTCT	CTGCGGCCTC	TCTGGCTCTG	GAGCTAATTT	GGATGCTGAG	TAGCCCCACA	1020
GGTATTTATA	TGTAGTGTTT	GGTATTTTTTA	CTGGGTCCCTA	TTCTTCTCCC	TTGGATCACC	1080
TAAAATGGTT	AAGAATTTTC	GAGTGGGATT	AAGGTTGCGA	TCTCTGGGGA	GGGTGGGCCA	1140
TCTGCTCTCG	GTTATTTTTCG	TGTTACACGC	TTCCCTTAA	ATGTATGTTT	ACAACGGAGC	1200
CGCAGCCTTA	TCAGCCGGGC	CCAGGGGACA	GTGGTCCAG	GTGCGGCTTG	GGACTCGCTG	1260
GCGGAGCCAT	GGCTTCCAC	AGACATGCAG	GTAAACGCGG	CGGCGGCGGC	GGCCCCGGGC	1320
GGCCCCGGCT	TCTCGGAGCA	CAGGGTGCCG	AGGGCCCCGC	GTCCGACCTT	TGTTTAAAGAG	1380
ATATTTTGG	GTGACGTGAT	TTCAGTCCCTG	TCTAAATAGT	AACAGAGCCG	TAGCTCCTCT	1440
CTGCTCAGGC	CTTGCCCTCCC	TCTAATGCTG	TTTCCGGGAC	AAAAGAGATC	TTGTTTCAAGG	1500
AAAGTCAACA	GCTCGAGTAG	CTTATTTCTT	GAAAACATGT	AAACACGTTG	CTCCAGAGCC	1560
CTTTGGCAGG	ACGTCTGGGA	GGCTGGAAGC	GATTGGGTGA	GGAAAAGAGG	TTTTCGTCGTG	1620
ACTGTTTCGA	GTTTGGGGGT	TATTTGTAAAG	ATACAGATCT	TCATCTTGAC	AGTGCTTTAA	1680
ACCGAATTTT	AATGTTTAGA	AAAGGTACAG	CGTGGAACAT	GGAGCTGCAA	GAAGGAAGAC	1740
TGATAACGCA	AAGTCCGTGC	TGCCCTAAGG	CCCTTCTCTC	CTCGGAAGGG	CCCTGTGTCT	1800
GGTCTCCCG	GACACACAGC	CGGGAGCCTT	CGGCTGTGAC	ACGTAGCCCC	CCAAGTCTTC	1860
TGATCAGAAA	ACAGGGCAA	GCTGCGGCC	CTCTAGACTG	TCGGTGCCCC	AAGAGTCTCC	1920
CTCTCGTTTG	ATGCCCTGAC	GTGGAGGAAG	CCTCTGGCGT	GGACCAGACC	CCCCGGGGGA	1980
CGGGGCCCGA	GGGCTGCAGG	GCGGGCAGGT	CTCTGGGCTC	AGCCTGCTGC	CTCGCTCCTC	2040
CCAAGCCAGG	ACTGTCGCTG	TGGCTCTGTG	GCCCTCTTGC	TAAGGAACGG	TCCCCTTTCT	2100
TAGCAGCCAG	GCACTTCGGC	CCATCTCTCA	GCTTTCAGAT	GAAGGGTCGA	TGTCATTCTC	2160
AGTGGCAGTC	TTTTGGAAAC	AACAGTTTTG	AGAACTGAGT	GTTGCCTGTG	GCTGTTTAGA	2220
TAAAGGCAGT	ACTGGGCTGT	TTAGATAAAG	GCAGTACTGG	GTCAGATTTT	TCTGTGCGGG	2280
TTTGAACCAA	GCGTGTCTGC	GTGGGATGCG	CTGCTTTGGT	CCGCCTGTCC	GCTTGTCTCT	2340
CTTGTTCCCA	AGGCTCTCGA	GCTGCCTGCT	GTCTTCTCCT	CCACCCGGGA	GCCATTGTAC	2400
CAGCTCGGCA	CCACAGGCC	GAGACTGTGC	TAATCTAATC	GGCCAACGTC	CGCAAGCTCT	2460
GGGTGTAGAC	AAACTAGCCG	GCTGTACCAG	TTGTTCCAGT	GGACCTTGGA	CGCAGGTTAA	2520
CTGGTAGAGG	AACTGCCCGT	TTTATTTTACT	AATTTAAATGA	CAGGATAAGG	AAATCTGTTT	2580
CAAAGGTGAC	ATGTTTATAA	CACGCCCAAC	CTTGGATTTT	GAAACTATAC	CACATCCTGA	2640
CGTTATTTCT	CTATAAATCT	GGAGGCTGTA	ACTGTAACGA	AATTAGACAA	ATTGCTGACA	2700
CCTTCTAGGT	GATTTTTTAAA	ATCAGGAGCT	AGCATCTTGT	GTCGCGTTAG	GTTCATAGG	2760
TCCGTGAGAG	CAGATGAGAG	AGAAGTGACC	TGAAGTGGAC	TTTGTGTGGA	CAGGATAGAG	2820
GCTTGCAGAA	TCGATAGGT	CAGAATCCAT	TTTTAGGGGC	CGTCCGCATC	CAGAGAGGAT	2880
GTTTCAAGGG	CGAGCCTTGA	TCCTTACTGT	CTACAGAGGG	CCTTCCCTTA	CCCTTTGGCC	2940

CTTCACGTCG	AGGCCGGCCT	GGCGGGGGCC	AGCGTGGGGG	GGTGTGCTGG	GCTGGGGGCG	3000
CGATCCCGGG	GGACCGCGTC	CTAAAATAAC	GGAAGACTTG	GGCGAGGGTG	ACACTGAAAG	3060
CTTTGTACTT	GCCGTGACCA	CTAGCGGACG	GCCTGCCGCT	TCGCCCGAGA	AACCGAAAAC	3120
ACATGTTGCT	GCCAGTGTGT	GCCCTGCTCG	GCCCGCCCCG	TGTCAGCACC	GAGCGGCCCT	3180
GGACGGGGCG	GGGCGGGGGC	GGGGCTTGGA	CCCCGGAGGC	CAGTGTCAAC	TGCCACCAGC	3240
CGCCCGCAGG	AGACTTGCGG	TGTTTTCCCTA	ACACAGCGTA	GGAGGCAAGT	TGTTAAACAAC	3300
GGTCTGTTTG	TAAGGGAAAA	ACACTTGGCG	GTGTTCCGGC	AAATTCCTCTG	ACCGGCCCTT	3360
TTTCGCGGGT	CTCCTGAGCC	CGCCCCGTGG	CAGCCGCTTA	GGTGTTC AAT	CCCCAGCCCCG	3420
TCGGGCGCCT	CCCCTTCCCC	CGCTGAGGCT	TCCCCCGCCA	AGGCTTGGTT	CTCTGTCTGC	3480
TGAGTGTGCT	CGGGAAAGCA	GTGTACCCTT	TCCCTGGGAG	CCAGTACCTA	TACGCAGAGT	3540
GACTAATGTA	CTGCTGGGTT	GGACTGAGCA	ATTAACAGAC	CAGACGTAAC	GGGCATTTTT	3600
TCCCCATTTG	AGCGACTGCT	CATTGTTTAC	ACTGTACATC	ACACCCCTCA	GGGAAAAATGC	3660
AGTTAGAAAA	ACGCTACCTG	GTCGTAATAA	TTCACTTTTT	CCTTAAATCG	CTTTTATTTT	3720
GAGCCATCTG	GGCAGGCGGG	GAGAAAATGAA	GATTAGCAGG	AAAACATGAG	CGAATATATA	3780
CAAAACCAGA	AACAAGATGA	TTAAATGCAA	ATTGGATCTT	CTCTAATGAG	GTTTATAGTT	3840
TAAAAAATAA	AGTTGTAACA	TTGTATTTCC	TGTATGTGTA	CATGACTAAA	TCGAAAAGCCA	3900
AAACGATTTT	GGAGATAACT	GAGGTCTGCA	TAGGCCCTC	TCAGCGTGCT	GGCTATAGTT	3960
CAGGAATTTT	CTCAAAGAGG	AAGCTTGTTT	ATTAGGTGAA	GAATGATGTG	TCTTTTGAAG	4020
CAGACATGGC	AAGAAGGTCC	AGCTATCCCT	TTGGAATAAA	TACCGAATAG	TTGATCACGC	4080
AGTCGCATTT	CCAGCTGCAT	TCTAAGTATA	GGAAGGACCG	TTAGTTCCCC	ATCAGCACCT	4140
CGGGGTCGCA	GGAGCTGCCT	CTGGATTTTC	TACAACAGAC	GTCTTTGTTA	TAAAATGCTC	4200
TTAAGAAAAG	AGGTTTTGGA	ATCCCTGGT	GGCCTGGCGG	TTAAAGGATC	TGGCATTTGTC	4260
ACTGCCGTGG	CCTGGGTTCC	ATCGCTGGTT	CTTCATTGTA	TGCTGTGGGT	GCAACCAAAA	4320
AAACTGTTTG	TAAGAAAAAA	GAAAAGAGGT	TTTAGAAGGT	TAATCATGGT	GGTGACATCT	4380
GCAGGTGTCA	GTCCGCAGGT	ATGGACTGTG	GGAGCCACGC	GGCAAGGCC	GGGGTGGGCG	4440
GGTGGCGCCC	GGTGTCTTG	CAGAGCTGGC	AGCGGCGGGG	TCAGGCGCAC	CCTGGCATGG	4500
GCTCGGCCAG	GAGGGGAAGT	GGCGCCTGCA	GCCGTGTGTC	TGATGGCTCC	GCTCGCAGTC	4560
CAGGCTGTGC	CCTCTCCAG	GCAGCAGCAG	CAGGTCGAGG	CGGACAGACA	GGGATGTTTCG	4620
GGGAAGGTTA	AAAGTCTTA	CGCATCATGT	GCCCCGAAAT	TGCCACGGGG	GTAAAGAAAAG	4680
GACTCCCCGA	GAGAGAAACA	TCCAGTGCAT	GTAATTCACG	AAGATGAAAG	CGAAGACCAA	4740
AGAGGACGTA	AAAACACCCT	TTTTATTTTT	TTCTCTATCC	TCTTCTTTCT	AACGAAGGGA	4800
AAGGGAGGCG	TAGAGCTTTT	CTTTCCATGG	GAAATCGAAG	CTTGACTCTG	CCTTATTTTTG	4860
GTGGATCCCA	CGAATCAGGG	ATTTTGTGGT	CTCTTAGGAA	CCTCTGGGTC	TCAGTGTGTT	4920
CTGTCACCTA	GCAGCTGTTG	TCTTAGGGTG	GTTCATCTCT	TTGGAGATAA	GTAGTAACAA	4980
AATATGTTGC	TCATATGCAG	ACTGTGTGAC	TTGGATGCAG	AGTTCTGATG	CAGTAACTGT	5040
CTCTCATCAG	CAGGAATGCA	TTGCTCCAGC	TTCCCTCCAA	GTACACCGCG	TGAAGGCTTG	5100
AAATAGTTTT	GGATCAAATA	ATCCTAAGGT	TAGAAAAACA	CGAGGTAAGC	GCATTCAGGT	5160
TGCCCAGAGT	TCCACTCAGT	TGGATTTATT	GCAAAAAAAT	ACTAAAGTTC	ATGAATTTGA	5220
CATCGACATT	ATAAACGTGC	CTTCAGTATT	TCCAGCCTAT	TACTTATTA	GGCAATAAAG	5280
TCTGCAATCC	TCGAAGTGCC	TATTTTATCT	TGACAAATCA	GTGTTTCCAC	ACACATGAAA	5340
AAGGCTTGAG	TCAGCTGTGG	AAATCTGTTT	TAAAAGGATA	TGCCCTTTGA	AATCTGTCTC	5400
TCCATCTGGA	CACAGACTCT	TTGGGTTAGA	GTATACAGTG	GTGGGGAATG	GGAGCCGACC	5460
CGGAGCTTTT	CATTCTACTG	AAAGACAAAG	TAATAACGCC	TAAATCTCGG	AGTGAAAACC	5520
ACTAAAAGCA	GTGGAATAAC	ATTGCCCTGGG	GGGCTGATTG	ACTTAATTTT	CCTTCTGCTT	5580
GGTTTACGAC	CCTGGACCGT	AGGCACGATA	CAGGGGTGAA	CAGCCTCACT	GACTGACTCC	5640
ATGTTTATGG	ATGAGCCATG	GATTATTTCCG	TCATCCGGAT	ACCTAGAAAC	TCTGAGCAAG	5700
TCGTGATCTA	GAACTATGAA	AGTAACCAGT	GAAGAACCTG	GTGTTGGTAA	AATGATAGTT	5760
TGAAAAGTGT	GTGGTTTTTAA	GGTGGGAAAG	GCTTGGCAGG	TAAGATCTCT	CTGGTACTGT	5820
GAAGCACAGT	GGGTTTCCCT	ATCTCTGAGA	CCTCTGAAAA	CCTAAGTGGG	ATTCATTGTG	5880
TTTTCTGGTG	CTTTGCTTCC	TTGGGTGACA	CGAATACCTG	CATTTCTCCT	GTAAGTTAG	5940
GACTCAGGAA	TACCCAGTGA	TAGGACTCCC	CTTAGGTGGG	TCTCTGTATG	GTAATTTAAT	6000
ATAGAAATAT	CTAGAATCCA	TTTTTTTTCTT	TGAACAACAT	CAAAAAGAGAG	GGACGTTACA	6060
GTGAGGAGGG	TTTAGACTCT	AAGTAGAGAC	TTTGGTGAGG	AAGGAGGTTG	GGTTTTCAGA	6120
CGTGGTCCAA	GCAGGTAGTC	CTTGCTAGAA	CCAGCCATGG	TACTTGCCCG	TGCAGGAAGC	6180
CCGTCTGTGC	TAATCTCACA	AGTTCTGATT	TCCTGCCAAA	TGGCATTTGG	GAGCCACTGA	6240
TAATTTAATT	TCCTGGCACT	TACTGTTGCT	GGGATTTTAT	TTGGTTTCTC	TCCGCAGCTC	6300
TTAACAAGAA	AGTAAATCTC	AACAGAGCGC	ACAGTTTCAG	TGTGGAAACA	CTAATAAGAC	6360
AAGGATTTTA	TGTGACATGT	GCAAGACCAG	CAAGAACGAA	TTAATAAGGA	GAGTGATTTT	6420
CAACCTTCTG	TCCCTGTGAT	AGACGCTCTT	TCCTGTAGAC	GCGGGGGCTG	AAGACAGTTT	6480

TAAAGCTGCC	TCCCTAAACA	GTGCGTCGTC	GTTCAAGGAG	ACGGACCCCA	GGGTCCGGGC	6540
GGCTCTCCTT	TTCTAAGCTG	GCTGTGTAAAG	GGAACACCTC	GGATTTCTTT	TGGGGGAAAG	6600
AGGGCCAGTA	AGAGCCGTTT	TCTAGTCTCA	GAAAATCTCT	GAACCGTGAC	CCAAGTGTCC	6660
CAGGCCCTTT	TCTTGGCACA	GGACTGTCAC	TCCTTGCCCTC	GGTCGGGTCG	TCGGGTGTCT	6720
GGAGAGGAGG	GTCTGTGTGA	GCAGATGGGC	CGGGGCGGGC	TGCTGGCCGC	CCTTGGCTGG	6780
AGGCGGGTTC	TGAGTGAGAG	TTCACAGCTT	CCTGGCGGTG	CTCAGACACA	GGGTGTGGTT	6840
TCCTTAGCTC	ACTCTGCTAT	TTGGTTGCCT	ACAGCAACAA	GATCCAAACA	AGTTGGACAT	6900
GTGTTTGTAT	AAAAAACTG	GGAATGGGAC	CCAAAGTGGG	TGTCCGGGGC	CGTTCAGTTA	6960
GTGGAGGAGC	CGAGGTGAGT	ACGGGCAGCT	GCTCCTTTCT	CTTCCCTCCT	TCTTTCTCTT	7020
TAAATCAGTT	CCCGGATGTT	TGCGCGCACG	ACCACCGTGT	TCGTGGGTAG	CGGGAGAAAG	7080
TGCTCTCTCT	TCTCGTGTG	TCTGGGCGCG	TTAAATAAAT	GCTGTCTCTT	TACCCGTGGA	7140
AGTTTCTTTT	TCAGGGAGAG	AAGAAGAAAT	AAGCATGTGT	TTATGGAAAC	TGAGAGCTCA	7200
TAGAAACAT	TGTACCTTTT	TTGGTGGCGC	GATGAACAGA	CTGCTTTTGA	GCGGTGGTGA	7260
CCGCAGGCC	TCGGGTGGG	GCCGGGGGA	GTTGTTTCAGC	TGCAGGCAGT	GCGGGAGGG	7320
TTCTTGACAA	AATCCGCCTG	ACACTTTTTTA	CAAAGTCATC	CCCGCCCCCA	CCTAGATGCT	7380
GCTTGAAGAT	GGCAGTTTTG	CAAACCTGCAG	GGTCTGAAT	CCTGACTT	CATGGACTCT	7440
ATTGATCCTC	ACTTGCTTGG	ATGAAGGGGG	ATTTGATTTT	TGGCGGTCA	CGAAGCCAAA	7500
CGCCACTGTG	ACAGATAGCT	CACGGGTGCA	GAACGTATTG	CTCAGGCCTC	CAGAGTCAGT	7560
AAACTGTCTT	GGAAGTCATT	CTGTAGGATC	ATTTTCAGGA	TTACAAAGTG	CTCTGCCAGA	7620
TTTGAATAA	ATGCTTACGC	ACTGCTCATG	TCCCTAGCAT	GGTCTGGTGT	TGGCAGAAAG	7680
TTTGGGTTC	GATGCGCTGA	ATTCCGTGGC	TGGGAGCGTG	GGGGCCTTCT	CCCTCCCCCG	7740
CCAGCCTCTC	CTCCTAGGAG	CTGCAGACGC	TGCCCCAGCG	GCCGCCCGCC	CAGCTCGGCT	7800
CAGAGCCGCC	TGGCCCCCTC	AGTGTCCCTT	CAGAGGCAGT	GCAGGGGGAT	GGCCAGTGG	7860
GACCTCTCC	CGGGAGCCCA	GGGACTGTCT	GTTTCATCGC	CGGAGTCACC	AGTGAACTGC	7920
CTCTGGCCTC	AGCGCCCTGG	CCGCAGTCCC	CGAACCCCTT	GGCCTTCGCG	TCTCATTTGT	7980
TCTGCCTCCT	TGCCCCCCCG	AGGCCCTCC	AGCTACAAGG	TAGGCACCAT	GGCCGAGAAG	8040
TTTACTTGCC	ACTACTGCAG	GGACCCGCTG	CAGGGAAAAG	AGTACGTGCA	GAAGGACGGC	8100
CACCATGCT	GCTTGAAGTG	CTTCGACAAG	TTCTGCGCCA	ACACCTGCGT	GGAGTGCCCG	8160
AAACCCATCG	CGCTGACTC	CAAGGTAGCG	CCCCTGGGGC	CAGGGTTGGG	GGGGGGCAGG	8220
CGAGGGCCGG	GCGCGGAGG	AGCAGCCACA	CTTCCATCCC	TGGCTGGCTG	ATGGGGAACA	8280
CGGCCAGACG	CCAGCCCTTG	CGATTGTCTC	AGGAGTGGAG	TCTTCCAGCC	TCCCCGCAT	8340
CCAGGGTGTG	AGGGACTGTG	TCATCCTGAC	GGCCACCCCC	TGTGCTCGGT	TCCCAGGAGG	8400
TGCACTACAA	GAACCGCTAC	TGGCACGACA	CCTGCTTCCG	CTGCTCCAAG	TGCCCTTACC	8460
CCTTGGCCAA	TGAGACCTTT	ATGGCCAAGG	ACAACAAGAT	CCTGTGCAAC	AAGTGCACCA	8520
CTCGCGAGGA	TTCCCCCAAG	TGCAAGGGGT	GCTTCAAGCC	CATCGTGGCA	GGTACCGGCC	8580
ACACTCAGCC	CCGGGCAGCC	AGGGAGGAGG	CCCTGAGGGC	AGCGTGGCGC	AGGGGTGCTT	8640
GTGATGGGGA	TGACGCTGGC	GGGAGCCGCT	GCCGGAGGTT	AGCATATATA	TGCATGCATA	8700
TATACACCCG	TATATATGTG	TACACATATA	TGCTCGCACA	CACGCACACA	CTCGGCAAGT	8760
AAAGAACCCT	GGAGAGAACG	GGCTGTGGCA	AGAGAAGGAA	GCGACAAGTA	TGTAGCGCTT	8820
TCTCATTTGG	GTTTAGTAAG	TGATCGAAGC	ATGCTTCTTC	CTGGGGTGCT	GTTCTTGGTC	8880
AAGGAGCCCC	TTCCCCTG	AATCTCTTGA	GTCCATGCAG	GGGGTGGGGG	CGCGGGCGC	8940
GGGGATTCAG	GCGTCTGAGC	CCCACAAGGT	ACAGCCAGGC	CCCCCCCCC	CACGGACAGC	9000
GTCTGGGTCG	GCATGACCGC	ACGGGGGGCG	CGGTAGGGGA	GCCACGGGC	AGGGTCAGGG	9060
GAAGTGTGAG	GCCAACAAC	GCAGGGCCTG	CGTTCCCTCC	CCTCTGGAGG	GCCAGGGAG	9120
GCTGAGCGGA	TGCAGCCCC	TGCAGGGCAC	TGTCAGTGGG	GCTACCCCTT	CGTTCCCCC	9180
CGCAGGCGAT	CAGAACGTGG	AGTACAAGGG	CACCGTCTGG	CACAAAGACT	GCTTCACTG	9240
CAGCAACTGC	AAGCAAGTCA	TTGGGACAGG	AAGCTTCTTC	CCCAAAGGGG	AGGACTTCTA	9300
CTGCGTGA	TGCCATGAGA	CCAAGTTTGC	CAAGCACTGC	GTGAAGTGCA	ACAAGGTACG	9360
TTGTCAAGGG	CGTTCTGCGC	TGGCCATTGT	TTCTAGAAGC	ATTTGACAGT	TTGCAGAGCA	9420
CCTGACACACA	CACATATCCCA	TTCCATCCTC	ACGACAGCCC	TGCGACGTAG	GAATTATTAT	9480
TCTCGTGTCA	CAGAGGAGGA	GACCGGGGGC	GTCGAAAGCA	GCGCCAGGC	CGAGGCAGGC	9540
ACCCTGACTG	GCTCTGGAGG	CCGGCCTCCG	CCACCCGGTT	GCCGCGTTAA	CCTTGCACAC	9600
GGGCTCGCCT	TCCCCGAGCC	CCGGTGTCC	CGTCTGGAAC	CTGGGGATAA	TAATGGCACC	9660
TGCCTCCCAT	GGCCGTTGTG	GCGATTC AAT	GAGATACTGT	AGACCCGAGC	GCCAGCACA	9720
GTGCCTGGCA	CGTAGTAGGC	ATTCAACAAA	ATGGTTGTTG	AATCTGAATC	CGGTGCTACA	9780
CTCCCTGGTC	TAGGCCATCA	CATCTGGAGG	AATCACTTAC	CAGGATCAGC	CCTGGCATGC	9840
CGAGTGCTTT	GTGTGTGTTA	CCTGCTCTAA	GAAGCTGGCT	GGGCAGCGTT	TCACCGCTGT	9900
GGAGGACCAG	TATTACTGCG	TGGATTGCTA	CAAGAACCTT	GTGGCCAAGA	AGTGTGCTGG	9960
ATGCAAGAAC	CCCATCACTG	GTAGGCTAAA	GAGTCCCTGC	TAAGTCTGCC	AGGCTAGGTC	10020

TTGCGCATGG	TAACCATCTC	TCATTTTCCT	ACGTCGTCGG	TTTCATCCAC	AAAGGCCCCA	10080
GAGAGTGCCC	CCTCCCCCTG	CCACTGTGGT	CCCAAAGGCC	CCCAAATAGT	GCGGATTCTC	10140
CCCCAGGCCA	GGTTAGCCTT	TGCAACACAG	AACACTTCTG	ACTACTGCCG	ACTAACTTAC	10200
GATGCTGCCG	GAGATCACGA	GCCTGAGACC	CACGGCCACG	GGCAGGCACT	GCGCGGGGAT	10260
GCTGGGGGCG	GGGGAGGGGC	GGGGGGGGGC	CAGGCGCGGG	CTGGGCTGGG	GTGCGGGAGG	10320
GGAGCGGGGG	AGGGGGGGCG	GCGAGCCAGA	AGCTGGGATG	CAAACACCCC	GTAGGGGAAG	10380
GTAGCTCAGA	GGTGCCAGTG	GGCAGGTCTT	TTGCGATCAG	GAGCCAAGCG	AATCACTTCA	10440
TTCCTCATCT	CGCGGCCGCG	GTCCACGTGC	CCTGGGCCCT	CTCCCCCGTC	TCCAATTTTC	10500
CCATCTCCCG	GGGAGCCTTG	AAATGTACAT	TTGAGAAGAC	TTTTGCCATC	CTCAGGGAAA	10560
AGGACTGTGT	CAAGAGTGAG	CCACCCAGTC	TCTAAAGCTA	GGAAGGCCCC	AGTGTGCCAC	10620
GGGAAACGCT	TGCCCTCAC	CTGTTTTCCC	AGCGCCAACC	TCCGGGGCAG	GCATCCGGGT	10680
GGAGAGAGGA	CTTGTCCCTC	GTGGGTGGTG	GTTCTTTATA	GAAAAAATCG	AAGCTTAGCA	10740
GCTCCTCGAG	GCCCGGTAAG	TGCACACCCC	ACAAACGGCC	CAAGTTTGCC	TCCTGGTGGC	10800
CACTTTGATG	CCATGGCCCT	GACCTAAATC	AAAGAAACTG	GTTGTGCTGG	GAGGTCGGTG	10860
CGCGTCAGTC	ACAGGGCGAT	GGCGGTGGCA	GGGGATGTGG	GTTCTGGAAA	GCACGGGAGC	10920
CCTCGGCGGA	GC'TTTGGCAT	C'TTCTCAGGT	CCCGGCGGGC	CGGGGGACGG	CGGCGCGCGC	10980
GCGCGGTGGA	GCGGGGGGCC	GGGCGCCGGG	CGGCCGCTGC	CCGCGCGCTG	GTGGGCCCCG	11040
TGGACGGCCT	GGCTCCCACC	TGTGTGCACT	CAGCTGTGCG	TCTTGT'TTGC	TTTTGT'TTCC	11100
TCCGCAGGGT	TTGGTAAAGG	CTCCAGTGTG	GTGGCCTATG	AAGGACAATC	CTGGCACGAC	11160
TACTGCTTCC	ACTGCAAAAA	ATGCTCCGTG	AATCTGGCCA	ACAAGCGCTT	TGTTTTCCAT	11220
CAGGAGCAAG	TGTATTGCCC	CGACTGTGCC	AAAAAGCTGT	AAAGTGACAG	GGGTCCTGT	11280
CCTGTAAAAT	GGAATTTGAG	TCTTGT'TCCT	TGTGTCCCTG	CCCTCTGCCC	CGTACCACCC	11340
CTGGGGCCAG	AGAGGCC'TTT	TCACCTCTCC	GAGTTGCTCC	TCCTGTCCCT	CTTCCCATTT	11400
TACAGTTACG	CCTCAAGTAC	GGGCACGCAG	TGATCATGTT	AGGATTTAGC	GAAAAGCAAC	11460
CCTGCAGCAA	CGTTACTGTC	CTGATAGCTG	CAGTTAGCAA	ACGAACACGT	AGCTAGATTG	11520
ACTCTTCTGC	ATGTTTATCC	TAGAGCAGAA	AAGCGCCGAC	CATTTAGCTG	CTTAGTGATG	11580
TAAGCAAGAA	GCCTAAGAGA	TAAAGCCCCC	ACTGAGATGC	CTCTCGTGCC	TCAGCTGGGA	11640
CCCACCGTGT	CCGTACACAG	ACACACGCAG	GAGTTGCAGC	GGCTGCTCCA	ACTCGGCTGC	11700
TCACCTGTG	CTGTGAGCAG	CAGGAAC'TTA	CCGAGATGCA	TGGTTTAACT	TCCCCATCAA	11760
CACCTTCCCT	CTGT'TC'TTTT	GTGCTTTCAC	ACCATAATA	CGGATTTCCA	GAAAACTAAC	11820
ATTTGAATTT	AGCTGTAAAT	CTAACCGACC	TTTCCCCTGT	ACTAACGTTG	GATTTGGATT	11880
TGTGGCGTGC	TTTCGGAGCG	TTCC'TCCTGC	CAAGCATGGA	ACACGCAAGG	CGATTGGGAG	11940
AGTGTAGGCA	GGTCTGAGAA	AACGAGCCTG	TGTCACCAGA	ATGTCGTCAC	AGCGAATACT	12000
TCTGGAAGCT	TAACAAA'ACT	AACCCAGCTG	TCCTTTATCT	TTTTTTAATG	AATAATGTTT	12060
TGTTTTAATG	AATAGCAGCA	TAGTTTATGG	GTTTGGAGAC	TTGCATGAGA	ATGTTTTTCGC	12120
CCCCTCAGAC	GTTCCTGCGG	TTTTTGCAAT	TACCCTCCAG	AAGTAACCAT	AAAACCTGAG	12180
AGGGGCAGGT	GAGCAGGTGC	CAGGACTGTC	ACTGACATGG	ACATGCCGTT	TCCAGACATG	12240
GCAGAGTGGG	CTTCCCCCAA	CCGTGCGCGG	CGGCTGCTCT	TGTGAGTCTT	AGGACCGTTC	12300
CTCAAGAGCT	TACAGCTGGA	TCGCTGGGGG	AGCGGGGAGG	CCACGGTCCC	GGCAGGCAGA	12360
ACCGGATGTC	CACGTAGCGC	TTACCTGAGA	CGCAGGAGCA	CCTCCTTACT	GTATTCTAGC	12420
TACACTGTTA	TATTACATAG	CATATCCC'GA	GACGACTTCA	AGAGTACACA	CGTAATGACA	12480
GCGCGTATTA	ACAT'TCTCGT	AGGAGTGGTT	AGAGAAGCCG	AAGCCTCATT	GCTACATTTT	12540
GTCATTAGCT	TTGATCATCT	AACGTTT'CAG	TGTATCCTTA	CGGAAATAAA	GCAGCATATA	12600
AAGAACCTGC	CTCATGACTC	CTGAT'TCTGC	CGGGTGGCCC	TGTTCTCAGG	TGATACCGCT	12660
GGTCCAGAGG	CCGGAATGAG	C'TTCTCCTT	CCCTCCGTCG	CATTACATGG	AACCTAGGGA	12720
TTATGAACAA	GATCAGCCTT	GGCTCCTGTT	AGGAACAGTA	CCAACCAAAA	ACCCACTCC	12780
GACCTCACAT	GACTTTT'CCC	AGATGTGCGT	AGCC'TTTTAA	AAGGGCAAAC	CGACTTCTTT	12840
TGGCTAGGGG	GC'TGGGGGAG	GGAATCGCAG	CTGAAGGGTG	GCCTCGGGAA	GTCTCACGCT	12900
CCCTCTTTTG	TCGGCTGCCC	TCTCCCTGTT	CCCTCCAGAG	CCCCAAGCTC	TGGCTGCTGC	12960
TCGCTCCTGC	C'ACTGTCAGG	CCTCCAGAAG	GCCGATCGCC	TCTTGGATGG	CGCTCGTTTG	13020
GGCTGGTGTG	CCTCTGGGGT	GGCAGGCACA	GGGACAGTGT	GGGCGGAGGT	GGAGGAAGCT	13080
TCTAGATGGT	GGCCACGTGT	CTGAGGTGCA	GGTCGCGGAG	GAGCACGTGG	TCATTTTAGA	13140
ATGGCGCCCG	AGGCCCAGGA	ACACAGACGT	CGGCCACCTG	CTCATCAGAG	GGGCGGGTCC	13200
CCAGGCCAAA	GGGGCACCTT	CAAGCAAAGG	TGGAGTCGGG	AGGAGGGGGT	CTCAGCTTCG	13260
AGGAGCCTCG	TGCCCAGGGA	TATCAAAGGA	CAGAACCCTT	TTGGTGTCTG	TAGAAACCAT	13320
GAGCATTTCT	ATGAGCGGGA	AGCAGCCCTT	TGCGTGTCTC	CATAGAGAAA	TCAGTCATAG	13380
CCCTCAAAAAC	AACGAAGAGC	CTGTCCGGTC	TGCTCACCTC	CCGGGGTCCC	GAGGAAGCGG	13440
GGTGGGGAGT	TGAGACGGCG	CCCCTCTGCT	TCCCGAGGGG	TGGAGCTCAG	GGGAACCTGC	13500
CTGGGAAGCG	GGGGGAGGGG	GCAGGGAGAG	ACCTGACAC	ACTGGCCGTT	CCCCCGCTC	13560

TGCCGGCTCT	GTGCTGGCCA	AGCCTGCCTC	TCCTCGGACC	CGCTCCCTCC	CTTCCTGGTC	13620
CTCACCCCTCC	AGCCTGCCAG	TGACAACGAT	GACGACGATG	CTCCAGCTGC	CTCTCGCAGC	13680
CCCTTCTCCC	TCTTCAGCTG	CCTGGGCTTC	TCCGCTTTAT	CCCTTTCACA	TTCTTGCCCC	13740
CCTCAAGCCT	GTCGCCCTTT	GTTTCTCATA	CCACTTGGCC	CACGCCTGGG	CCAAAGAGCT	13800
CTGCTGAGAA	GTAGATGTCT	GTGGAGCCAG	ACTGCAGGCC	CTTGGCCGGC	CCGAGAGCCC	13860
CTAAGATGCT	ATTGCTCAAG	TCCCTCAGTG	CTGCAGTGAG	GCCTTAGACA	CACGATAGCC	13920
AGCCCTCACG	GCCGGCACCG	GCACCGCTGC	CTCATTCCCC	AAATGACAAA	GCTGGAGGTC	13980
ACACAGCAAG	GGACAAAACA	CCACCCAGGG	CACACCTCTA	GCCCAAGGCA	CTGCCCTAGG	14040
GCAGGGCCAA	TGCCTGTTCT	GGCATCATGA	GGACACCGCC	ATCATAACACA	GCGTTCGATA	14100
CTTAATTTTCG	AGAGTGACAG	ACAACCTGAG	ACTTGAAGG	AAGGAGGGGC	CGTTTCAAGG	14160
CAAGCGCATT	TGCAGGCGAG	AACCCCTTTC	TCCCACATCA	TGAAGGCGGT	CAGAATATCG	14220
GTGCATCTGC	TTCCAGGTAA	CAGGGTGGGT	TCTGGAGCTA	TACTGCCTGG	CTTCAAATCC	14280
TGGCCGCGCT	GCTGCTTTGC	ATTATGACAC	CTTGGGCAGG	TTACCTAACC	TCTGAGCTGC	14340
TTTCCTCGCC	TGTAAAGTGA	AACCGAATTC				

