

**Charakterisierung der humanen  
*TWIST*-Region – strukturelle  
und funktionelle Analysen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Christian Kosan

aus Bonn

Marburg/Lahn, November 2002

Vom Fachbereich der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am  
11.12.2002 angenommen.

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

(Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg)

Zweitgutachter: HD Dr. Jürgen Kunz

(Fachbereich Humanmedizin, Philipps-Universität  
Marburg)

Tag der mündlichen Prüfung am: 18.12.2002

Diese Arbeit wurde am Medizinischen Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von HD Dr. Jürgen Kunz in der Zeit von Juni 1998 bis Mai 2002 angefertigt.



**Für Maren**



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Craniosynostosen.....	1
1.2 Acrocephalosyndactylien (ACS) .....	1
1.3 Strukturelle Eigenschaften des Transkriptionsfaktors TWIST .....	4
1.4 Die molekulare Pathologie des Saethre-Chatzen Syndroms – Effekte verschiedener Mutationen auf die Funktionalität des TWIST-Proteins .....	5
1.5 Twist als Entwicklungsgen .....	8
1.6 Twist in der Vertebratenentwicklung.....	11
1.7 Transkriptionsregulation bei Vertebraten.....	13
1.8 Der japanische Kugelfisch ( <i>Fugu rubripes rubripes</i> ) als Modellorganismus für die Struktur des vertebraten Genoms .....	15
1.9 Ziele der Arbeit.....	16
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Material .....	18
2.1.1 Geräte und Zubehör.....	18
2.1.2 Chemikalien .....	20
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	21
2.1.4 Enzyme.....	25
2.1.5 Größenstandards.....	25
2.1.6 Nukleinsäuren, Nukleotide.....	26
2.1.7 Vektorsysteme .....	27
2.1.8 Expressionssysteme.....	28
2.1.9 Bakterienzellen.....	29
2.1.10 Fertigsysteme zum Aufreinigen von DNA und RNA .....	29

2.1.11	Fertigsysteme .....	30
2.1.12	Nährmedien .....	30
2.1.13	Zellkultur: Medien, Zusätze, Transfektionsreagenzien und Materialien .....	31
2.1.14	Zelllinien .....	32
2.1.15	Antikörper .....	32
2.1.16	Datenbanken und Software .....	33
2.1.16.1	Software.....	33
2.1.16.2	Datenbanken .....	34
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen (Miller et al., 1988).....	35
2.2.2	Restriktionsspaltung von dsDNA.....	35
2.2.3	Generierung künstlicher Schnittstellen .....	36
2.2.3.1	Schnittstellengenerierung mit Hilfe modifizierter Oligonukleotide .....	36
2.2.3.2	Adapter-Ligation .....	37
2.2.4	Dephosphorylierung von Vektoren .....	38
2.2.5	Ligation .....	38
2.2.6	Klonierung von PCR-Produkten .....	38
2.2.7	Transformation von Calcium-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly, 1979).....	39
2.2.9	Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform .....	40
2.2.10	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren .....	40
2.2.11	Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	40
2.2.12	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	40
2.2.13	Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988).....	41
2.2.14	DNA Sequenzierung – nach Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977).....	42
2.2.15	Gelelektrophorese.....	42
2.2.15.1	Konventionelle Gelelektrophorese .....	43



2.2.15.2	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	43
2.2.16	Photodokumentation der Agarosegele .....	44
2.2.17	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	44
2.2.18	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Feinberg und Vogelstein, 1983) .....	45
2.2.19	DNA-Transfer auf Nylonmembran - Southern-Blot (Southern, 1975).....	45
2.2.19.1	Vakuum-Blot-Verfahren.....	45
2.2.20	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten.....	46
2.2.21	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	46
2.2.21.1	Chromosomenpräparation .....	47
2.2.21.2	Markierung der DNA-Sonde mit Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP.....	47
2.2.21.3	Vorbehandlung der Chromosomenpräparate.....	48
2.2.21.4	Denaturierung chromosomaler DNA.....	48
2.2.21.4.1	Vorbereitung der Proben-DNA.....	48
2.2.21.5	Hybridisierung und Detektion .....	49
2.2.21.6	Auswertung und Dokumentation der FISH-Ergebnisse .....	50
2.2.22	Isolierung von gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen.....	50
2.2.23	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe (Mausembryonen).....	51
2.2.24	Isolierung von poly A <sup>+</sup> -RNA .....	51
2.2.25	Quantifizierung von RNA .....	52
2.2.25.1	Quantifizierung von poly A <sup>+</sup> -RNA.....	52
2.2.26	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA und poly A <sup>+</sup> -RNA .....	52
2.2.27	Northern-Blot-Analyse (Ausubel et al., 1993).....	52
2.2.27.1	Fraktionierung von RNA-Fragmenten mittels Elektrophorese in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel.....	53
2.2.27.2	Transfer der RNA auf eine Nylonmembran .....	54
2.2.27.3	Hybridisierung auf Northern-Blots.....	54
2.2.27.4	Dehybridisierung von Northern-Blots .....	55
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden (Dracopoli et al., 1997) .....</b>	<b>55</b>
2.3.1	Kultivierung und Lagerung von humanen Zelllinien.....	55

2.3.2	Transiente Transfektion von Reportergenkonstrukten in eukaryote Zellen mittels Liposomentransfektion (Felgner et al., 1987).....	56
2.3.3	Generierung stabiler Zelllinien – Integration von Fremd-DNA in das Genom eukaryoter Zellen.....	56
2.3.4	Promotoranalysen im zellulären System .....	57
2.3.4.1	Dual-Luciferase Reporter Assay System.....	58
<b>2.4</b>	<b>Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....</b>	<b>58</b>
2.4.1	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	58
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung und Charakterisierung der humanen <i>TWIST</i> homologen Region beim japanischen Kugelfisch <i>Fugu rubripes rubripes</i> .....</b>	<b>61</b>
3.1.1	Isolierung eines genomischen Klons, der die <i>Twist</i> -Region des japanischen Kugelfisches <i>Fugu</i> repräsentiert.....	61
3.1.1.1	Sequenzanalyse der genomischen <i>Twist</i> -Region von <i>Fugu</i> .....	66
3.1.2	Charakterisierung der genomischen <i>Fugu-Twist</i> -Region.....	66
3.1.2.1	Identifizierung benachbarter Transkripte der <i>Fugu Twist</i> -Region mit Hilfe von Datenbankanalysen .....	67
3.1.2.2	Vergleich der genomischen Struktur der identifizierten Gene bei Mensch und <i>Fugu</i> .....	70
3.1.2.3	Chromosomale Lokalisation des <i>Fugu Twist</i> -Gens mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	75
<b>3.2</b>	<b><i>TWIST</i>.....</b>	<b>77</b>
3.2.1	Vergleich der Aminosäuresequenzen der <i>Twist</i> -Proteine.....	77
3.2.2	Identifizierung genregulatorischer Sequenzabschnitte.....	80
3.2.3	Charakterisierung der humanen <i>TWIST</i> -Promotor-Region .....	85
3.2.3.1	Herstellung von Deletionskonstrukten zur funktionellen Promotoranalyse des humanen <i>TWIST</i> -Gens .....	87
3.2.3.2	Analyse humaner Zelllinien auf endogene <i>TWIST</i> -Expression.....	87
3.2.3.3	Untersuchung des humanen <i>TWIST</i> -Promotors im zellulären System .....	89

3.2.3.4	Untersuchung des humanen <i>TWIST</i> -Promotors auf konservierte Sequenzabschnitte und mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen .....	93
3.2.4	<i>TWIST</i> als Transkriptionsfaktor und sein Einfluss auf die Expression putativer Zielgene .....	96
3.2.4.1	Expression von exogenen <i>TWIST</i> -Expressionskonstrukten .....	96
3.2.4.2	Subzelluläre Lokalisation des <i>TWIST</i> -c-myc-Fusionsproteins.....	100
3.2.4.3	Auswirkung der exogenen <i>TWIST</i> -Expression auf die Transkription der <i>FGFR</i> -Gene .....	101
<b>3.3</b>	<b>Identifizierung eines nicht-charakterisierten Transkripts auf Chromosom 7p21 – <i>TWIST NEIGHBOR (TWISTNB)</i>.....</b>	<b>104</b>
3.3.1	<i>TWISTNB</i> als Kandidatengen in der SRO (“smallest region of overlap”) des Mikrodeletionssyndrom 7p21 .....	104
3.3.1.1	Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation des <i>Twistnb</i> -Gens der Maus .....	106
3.3.1.2	Vergleich der Aminosäuresequenz von <i>TWISTNB</i> bei Mensch, Maus und <i>Fugu</i> .....	107
3.3.1.3	Expressionsstudien von <i>Twistnb</i> bei Mensch und Maus .....	108
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>111</b>
<b>4.1</b>	<b>Konservierte Elemente der Twist-Proteine.....</b>	<b>113</b>
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der <i>Twist</i>-flankierenden Region bei <i>Fugu</i> .....</b>	<b>115</b>
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung konservierter nicht-codierender Sequenzabschnitte innerhalb der <i>Twist</i>-flankierenden Regionen.....</b>	<b>118</b>
<b>4.4</b>	<b>Identifizierung regulatorischer Sequenzabschnitte in der Promotorregion des humanen <i>TWIST</i>-Gens.....</b>	<b>120</b>
<b>4.5</b>	<b>Regulatorische Wirkung von <i>TWIST</i> auf die Expression der Fibroblasten Wachstumsfaktoren Rezeptoren (FGFRs).....</b>	<b>127</b>
<b>4.6</b>	<b>Identifizierung eines neuen Kandidatengens für das Mikrodeletionssyndrom 7p21 – <i>TWISTNB</i> .....</b>	<b>130</b>

<b>4.7</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>133</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>135</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>149</b>
<b>7.1</b>	<b>Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide .....</b>	<b>149</b>
<b>7.2</b>	<b>Anhang 2: Prozentuale Auswertung der durchgeführten Dual- Luciferase Assays in OHS- und CCL-136-Zellen.....</b>	<b>156</b>
<b>7.3</b>	<b>Anhang 3: Datenbankeinträge am NCBI.....</b>	<b>157</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>158</b>
<b>9.</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>161</b>
<b>9.1</b>	<b>Originalarbeiten .....</b>	<b>161</b>
<b>9.2</b>	<b>Poster .....</b>	<b>161</b>
<b>9.3</b>	<b>Vorträge .....</b>	<b>161</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>162</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>164</b>
<b>12.</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>166</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Craniosynostosen**

Molekularbiologische Untersuchungen haben die Identifizierung von Ursachen vieler monogener Erbkrankheiten ermöglicht. Aufgrund dieses Basiswissens ergeben sich immer wieder neue Fragestellungen hinsichtlich der Analyse komplexer genetischer Regulationsmechanismen, deren Störungen ursächlich für solche Krankheiten sein können.

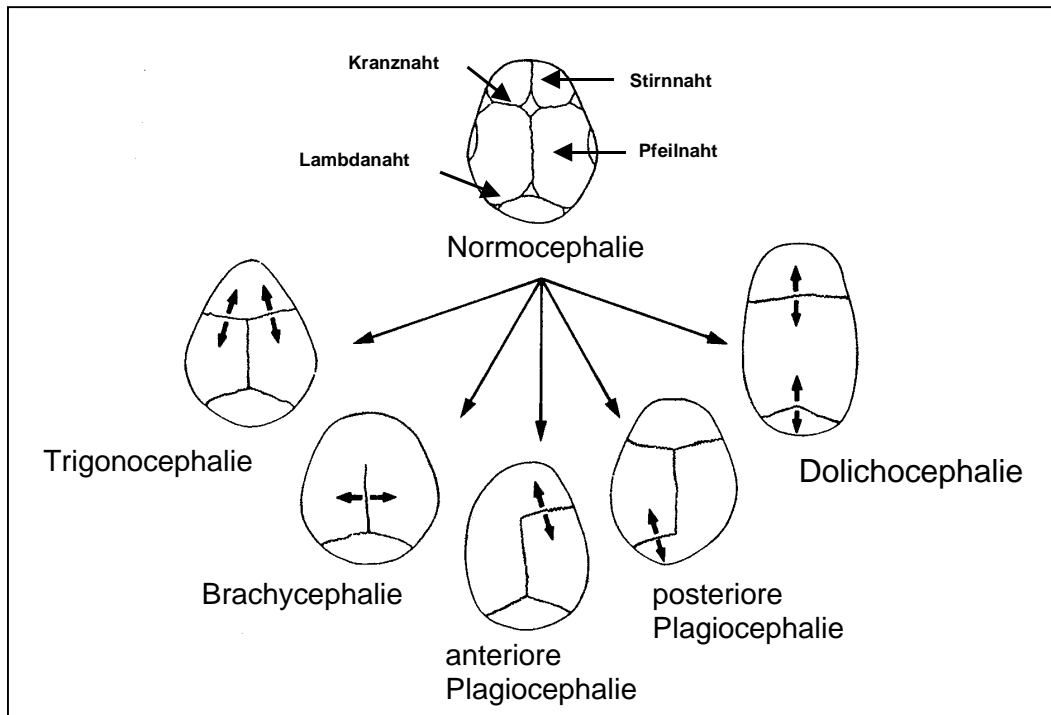
Craniosynostosen sind Entwicklungsstörungen, die auf einen frühzeitigen Verschluss einer oder mehrere Schädelnähte zurückzuführen sind (Abb. 1-1). Die Prävalenz beträgt in allen ethnischen Bevölkerungsgruppen 1 Betroffener pro 2.100-3.000 Neugeborenen (Hunter und Rudd, 1976; Lajeunie et al., 1995a) Craniosynostosen treten sowohl isoliert, als auch mit anderen Fehlbildungen assoziiert auf. Die Ätiologie der Craniosynostosen ist sehr heterogen und kann anhand ihrer phänotypischen Merkmale in etwa 100 Untergruppen unterteilt werden (Winter und Baraitser, 1994). Sie unterscheiden sich nach der Art der betroffenen Schädelnaht, craniofacialen Anomalien, assoziierten Extremitätenanomalien und Fehlbildungen anderer Organsysteme. Eine große Variabilität äußert sich ebenfalls im Vererbungsmuster, wobei in den meisten Fällen ein autosomal-dominanter Erbgang vorliegt. In seltenen Fällen sind aber auch autosomal-rezessive (z. B. Cranioectodermale Dysplasie; MIM 218330; Amar et al., 1997) und X-gekoppelte Erbgänge (z. B. Craniofrontonasal Syndrom; MIM 304110; Feldman et al., 1997) nachgewiesen worden.

Eine Untergruppe der Craniosynostosen bilden die Acrocephalosyndactylien (ACS), die als gemeinsame phänotypische Merkmale Craniosynostosen und Anomalien der Extremitäten aufweisen (Winter und Baraitser, 1994). Diese Untergruppe unterteilt sich in typische und atypische Formen (Blank, 1960).

### **1.2 Acrocephalosyndactylien (ACS)**

Als typische Acrocephalosyndactylie wird das Apert Syndrom (MIM 101200) angesehen, da hier neben der Craniosynostose, Syndactylien an Händen und Füßen besonders ausgeprägt sind.

Die atypischen Formen der ACS zeigen in der Ausprägung der phänotypischen Merkmale - insbesondere bei den Extremitäten-Fehlbildungen - eine starke Variabilität. Zu dieser Untergruppe gehören das Crouzon- (MIM 123500), das Jackson-Weiss- (MIM 123150), das Pfeiffer- (MIM 101600) und das Saethre-Chatzen Syndrom (MIM 101400).



**Abbildung 1-1: Schädeldeformation nach frühzeitigem Nahtverschluss**

Die jeweilige betroffene Naht führt zu unterschiedlichen Schädeldeformationen. Ein Verschluss der Kranznaht bedingt eine Brachycephalie, ein unilateraler Verschluss der Kranznaht eine anteriore Plagiocephalie, der Verschluss der Pfeilnaht führt zu einer Dolichocephalie. Der Verschluss der Stirnnaht resultiert in einer Trionocephalie und ein Verschluss der Lambdanaht bedingt eine posteriore Plagiocephalie. Durch Pfeile sind die Richtungen gekennzeichnet, in die der Schädel auswächst (modifiziert nach Cohen und MacLean, 2000).

Das Apert Syndrom zeigt innerhalb der ACS den stärksten Phänotyp. Neben einer starken Brachycephalie, die auch als Turribrachycephalie (Turmschädel) bezeichnet wird, haben Patienten mit dem Apert Syndrom charakteristische Fehlbildungen an den Extremitäten. Die mittleren drei Finger bzw. Zehen weisen eine vollständige cutane Syndactylie mit einer Tendenz zur Knochenfusion auf (Upton, 1991; Collins et al., 1995; Slaney et al., 1996).

Für das Apert Syndrom konnten Mutationen im *FGFR2*-Gen nachgewiesen werden (Wilkie et al., 1995). Die meisten Patienten mit Apert Syndrom besitzen eine von zwei Punktmutationen in der extrazellulären Domäne des *FGFR2*-Gens (S252W; P253G) (Muenke und Wilkie, 2001).

Die atypischen Acrocephalosyndactylien zeigen eine stärkere Variabilität in der Ausprägung ihrer phänotypische Merkmale, wobei solche Patienten in der Regel einen moderateren Phänotyp aufweisen, als Betroffene mit Apert Syndrom.

Für das Crouzon-, Jackson-Weiss- und das Pfeiffer Syndrom wurden ebenfalls Mutationen im *FGFR2*-Gen identifiziert (Jabs et al., 1994; Reardon et al., 1994; Lajeunie et al., 1995b; Rutland et al., 1995; Schell et al., 1995). Neben Mutationen im *FGFR2*-Gen konnten für einige ACS-Patienten zusätzlich Mutationen in anderen *FGFR*-Genen identifiziert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass Patienten mit Pfeiffer Syndrom ebenfalls Mutationen im *FGFR1*-Gen besitzen können, wird dieser Krankheit eine genetische Heterogenität zugeschrieben (Muenke et al., 1994).

Bei Patienten mit Crouzon Syndrom, die zusätzlich eine Acanthosis Nigricans (Hautkrankheit) aufweisen, wurden Mutationen im *FGFR3*-Gen nachgewiesen (Meyers et al., 1995). Ebenso wird das Münke Syndrom (MIM 134934) durch Mutationen im *FGFR3*-Gen verursacht (Bellus et al., 1996; Muenke et al., 1997). Patienten mit dem Münke Syndrom zeigen eine große Variabilität in der Ausprägung ihrer phänotypischen Merkmale, weshalb sie fälschlicher Weise häufig zu anderen ACS-Formen, wie Crouzon-, Pfeiffer-, Jackson-Weiss- und dem Saethre-Chotzen Syndrom gezählt wurden. Folglich kann hierbei nicht von einem typischen klinischen Bild des Münke Syndroms gesprochen werden. Allen Patienten mit dem Münke Syndrom ist eine definierte Mutation im *FGFR3*-Gen (P250R) gemein, so dass in diesem Fall die syndromale Zuordnung aufgrund des Genotyps und nicht, wie üblich, anhand der phänotypischen Merkmale erfolgt.

Auch das autosomal-dominant vererbte Saethre-Chotzen Syndrom wird den Acrocephalosyndactylien zugeordnet. Patienten mit dem Saethre-Chotzen Syndrom zeigen eine Brachycephalie, die oftmals durch eine coronale Syndactylie hervorgerufen wird. Zu den weiteren phänotypischen Merkmalen zählen niedriger Haaransatz, Ptosis (herabhängende Augenlider), tief angesetzte Ohren sowie verbreiteter Augenabstand (Hypertelorismus). Zusätzlich können cutane Syndactylien, hauptsächlich zwischen dem 2. und 3. Finger bzw. Zeh auftreten (Saethre, 1931; Chotzen, 1932).

Innerhalb der Gruppe der Acrocephalosyndactylien stellt das Saethre-Chotzen Syndrom (SCS) eine Besonderheit dar. Als krankheitsverursachendes Gen konnte bei

SCS-Patienten das *TWIST*-Gen identifiziert werden, welches auf Chromosom 7p21 lokalisiert ist (Bourgeois et al., 1996; El Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997).

Betrachtet man die phänotypischen Merkmale der einzelnen atypischen Acrocephalosyndactylien und ihre genetischen Ursachen, so wird deutlich, dass eine Phänotyp-Genotyp Korrelation hierbei schwierig ist. Neben der genetischen Heterogenität des Pfeiffer- und des Crouzon Syndroms verdeutlicht die phänotypische Varianz des Münke Syndroms die Schwierigkeiten für die molekulare Diagnostik.

Diese Erkenntnisse müssen bei den Untersuchungen der einzelnen Patientengruppen berücksichtigt werden. Da zum Beispiel Betroffene mit dem Münke Syndrom ursprünglich aufgrund ihres Phänotyps als Saethre-Chatzen Patienten diagnostiziert wurden, ermöglicht die molekulare Differential-Diagnostik eine eindeutige Zuordnung. Erschwert wird eine solche syndromale Zuordnung, wenn neben verschiedenen intragenischen Veränderungen weitere Mutationen auftreten, die den codierenden Bereich eines Gens nicht betreffen.

So konnte beim humanen *TWIST*-Gen neben intragenischen Mutationen, die sowohl „nonsense“-, als auch „missense“-Mutation beinhalten (El Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997; El Ghouzzi et al., 1999), zusätzlich cytogenetische Deletionen und Translokationen identifiziert werden (Lewanda et al., 1994; Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997; Johnson et al., 1998). Alle beschriebenen Translokationen befinden sich stromabwärts von *TWIST* und betreffen den codierenden Bereich des Gens nicht (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997). Inwieweit diese Translokationsereignisse die Expression von *TWIST* verändern ist noch ungeklärt.

### **1.3 Strukturelle Eigenschaften des Transkriptionsfaktors TWIST**

Das humane *TWIST*-Gen besteht aus zwei Exons, von denen das erste Exon den offenen Leserahmen mit 606 bp repräsentiert. Dieser offene Leserahmen codiert für ein Protein mit 202 Aminosäuren, das zur Gruppe der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren gezählt wird.

Proteine dieser Familie beinhalten eine basische Domäne und zwei  $\alpha$ -Helices, die durch eine flexible Schlaufe, welche für die Ausbildung der Tertiärstruktur essentiell ist, miteinander verbunden sind. Die beiden  $\alpha$ -Helices sind in der Regel verantwortlich für die Dimerisierung mit anderen Helix-Loop-Helix-Proteinen.



Durch diese Dimerisierung wird eine Furche gebildet, die so die Bindung der basischen Domänen an die DNA ermöglicht (Rose und Malcolm, 1997). Helix-Loop-Helix-Proteine bilden Homo- oder Heterodimere, die im Promotorbereich ihrer Zielgene an eine spezifische Erkennungssequenz binden und so die Transkription aktivieren bzw. reprimieren können (Jones, 1990).

Die Ausbildung von Heterodimeren kann für die Regulierung von Zielgenen eine wichtige Rolle spielen. Zu einer Aktivierung von Zielgenen kann es zum einen dadurch kommen, dass die DNA-Bindungseigenschaften eines bHLH-Proteins durch eine Heterodimerisierung erhöht werden. Andererseits können durch die Heterodimerisierung neue Bindesequenzen erkannt werden. Eine Repression der Aktivität wird in der Regel durch eine Bindung an ein Protein mit HLH-Motiv bewerkstelligt, dem die DNA-bindende Domäne fehlt, oder durch eine veränderte Aminosäuresequenz der basischen Domäne hervorgerufen. In beiden Fällen wird eine Bindung an die DNA verhindert. Eine negative Regulation für bHLH-Proteine konnte zum Beispiel für das Id-Protein (Inhibitor of DNA binding), dem die basische DNA-Binde-Domäne fehlt, und für das *Drosophila* Hairy-Protein, das durch ein Prolin in der basischen Domäne keine DNA Bindungseigenschaften zeigt, nachgewiesen werden (Rushlow et al., 1989b; Benezra et al., 1990).

Das *Twist*-Gen ist mittlerweile in einer Vielzahl von Organismen identifiziert worden. Es zeigt sich, dass vor allem die basische Helix-Loop-Helix Domäne einem starken evolutionären Druck unterliegt und folglich essentiell für die Funktion des Proteins sein muss (Spring et al., 2000).

N-terminal der bHLH-Domäne unterscheiden sich die Proteine einzelner Spezies stark in Länge und Struktur. So weist das Twist-Protein von *Drosophila melanogaster* 490 Aminosäuren auf, wohingegen das humane TWIST-Protein aus nur 202 Aminosäuren besteht.

#### **1.4 Die molekulare Pathologie des Saethre-Chotzen Syndroms – Effekte verschiedener Mutationen auf die Funktionalität des TWIST-Proteins**

Die Ausprägung des Saethre-Chotzen Phänotyps basiert auf intragenischen Mutationen, Deletionen sowie spezifischen genetischen Veränderungen außerhalb des codierenden Bereichs des *TWIST*-Gens. Es stellt sich daher die Frage, warum ein durch Mutationen verändertes Genprodukt pathogen wirken kann. Um eine Antwort

finden zu können, müssen die verschiedenen Effekte der bisher identifizierten Mutationen auf die Funktionalität des *TWIST*-Proteins analysiert werden. Das Mutationsspektrum bei Patienten mit Saethre-Chatzen Syndrom ist breit gefächert und erstreckt sich von Basensubstitutionen, über Insertionen und Deletionen bis hin zu chromosomalen Anomalien.

Innerhalb des codierenden Bereichs konnten beispielsweise neben „nonsense“- und „missense“-Mutationen auch intragenische Insertionen und Deletionen charakterisiert werden (El Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997).

Zusätzlich zu diesen intragenischen Mutationen können Translokationen und Deletionen ebenfalls das klinische Bild des Saethre-Chatzen verursachen (Lewanda et al., 1994; Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997; Johnson et al., 1998).

Deletionen von 3,5 - 10,2 Mb in der *TWIST*-Region konnten bei SCS-Patienten mit zusätzlicher mentaler Retardierung identifiziert werden. Da das Auftreten einer solchen mentalen Retardierung bei Patienten mit SCS atypisch ist, kann dieses Phänomen nicht ausschließlich auf das Fehlen des *TWIST*-Gens zurückgeführt werden. Die Hypothese, dass dieses zusätzliche phänotypische Merkmal durch das Fehlen eines oder mehrerer Gene hervorgerufen wird, wird durch weitere Patienten mit kleineren Deletionen, die nur das *TWIST*-Gen betreffen, unterstützt. Es liegt die Vermutung nahe, dass in dieser Region weitere Gene lokalisiert sind, deren Deletion für diesen Phänotyp verantwortlich sind (Johnson et al., 1998).

Ebenfalls wird durch Translokationen im 3'-Bereich von *TWIST* das Saethre-Chatzen Syndrom hervorgerufen. Bei diesen Patienten ist die Ursache für den krankheitsverursachenden Defekt nicht geklärt, da durch die Translokation der codierende Bereich des *TWIST*-Gens in keiner Weise betroffen ist. Es wird vermutet, dass ein Positionseffekt für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich ist (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997).

Da gezeigt werden konnte, dass kleinere Deletionen, die nur das *TWIST*-Gen betreffen, ebenfalls zur phänotypischen Ausprägung des Saethre-Chatzen Syndroms führen, kann hier von einer Haploinsuffizienz ausgegangen werden. Durch den Verlust bzw. Funktionsverlust einer Kopie des humanen *TWIST*-Gens wird der Phänotyp des Saethre-Chatzen Syndroms verursacht.

Für eine Reihe intragenischer Mutationen konnte mittlerweile der Grund für den Funktionsverlust analysiert werden.

El Ghouzzi und Mitarbeiter (2000) konnten dies für drei „nonsense“-Mutationen *in vitro* zeigen. Hierzu wurden *in vitro* Translationsexperimente durchgeführt, wobei zunächst durch Northern-Blot Analysen gezeigt werden konnte, dass die unterschiedlichen „nonsense“-Mutationen keinen Einfluss auf die Stabilität der RNA haben. Durch Immunoblot-Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion konnte gezeigt werden, dass Proteine mit „nonsense“-Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Protein schneller abgebaut werden. Da die untersuchten „nonsense“-Mutationen an unterschiedlichen Positionen des Proteins auftreten (Y103X, E126X und Q161X), konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus unabhängig von der Länge des trunkeierten Proteins ist und somit vermutlich generell für alle „nonsense“-Mutationen gilt.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch „missense“-Mutationen innerhalb der beiden Helices keine Heterodimerisierung mit dem E12 Protein mehr eingegangen werden kann, wohingegen „missense“-Mutationen innerhalb der Loop-Region keine Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften von TWIST haben - zumindest bezogen auf das E12 Protein. TWIST-Proteine, die keine Heterodimerisierung mit E12 eingehen können, zeigten eine cytoplasmatische Lokalisation und konnten aufgrund dessen ihre Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern nicht ausüben. Für diese Untersuchungen wurden jeweils eine Punktmutation in den Helices (Helix I: A129P; Helix II: L159F) sowie eine Punktmutation in der „Loop“-Region (K145E) analysiert. Inwieweit dieser Mechanismus für andere Punktmutationen gilt und welche Auswirkungen Mutationen in der „Loop“-Region auf die Funktionalität des Proteins haben, ist bisher unklar.

Ebenfalls noch ungeklärt sind die Auswirkungen der Translokationsereignisse auf die Transkription von *TWIST*, die den codierenden Bereich des Gens nicht betreffen. Alle bisher beschriebenen chromosomalen Translokationen befinden sich im 3'-Bereich von *TWIST* und sind zwischen 5 und 250 kb entfernt (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997). Als Ursache für die Haploinsuffizienz von *TWIST* können hierbei sogenannte Positionseffekte angenommen werden. Die Auswirkungen auf ein Gen, die auf einem solchen Effekt beruhen, sind noch weitestgehend unverstanden. Es wird vermutet, dass durch die chromosomale Veränderung das Gen von seiner ursprünglichen euchromatischen Umgebung in die Nähe von Heterochromatin gebracht wird. Aufgrund dessen könnte sich die Kondensierung des

Heterochromatins auf das translozierte Gen ausbreiten und somit dieses inaktivieren (Eissenberg, 1989; Henikoff, 1990; Bedell et al., 1996).

Neben dieser Hypothese der Veränderung der Chromatinstruktur könnten durch solche Translokationen auch regulatorische Elemente wie „Enhancer“ bzw. „Silencer“ betroffen sein.

Für einige Gene der Vertebraten konnten weit entfernte, regulatorische Elemente identifiziert werden. So befindet sich die Lokus Kontroll Region (LCR: locus control region) des  $\beta$ -Globulin-Gens 50-65 kb entfernt im 5'-Bereich des Gens (Li et al., 1999). Für das *Apolipoprotein B*-Gen der Maus konnte ein „Enhancer“-Fragment 55 kb stromaufwärts des Gens identifiziert werden. In diesem Fall konnte das regulatorische Element zusätzlich auf 315 bp eingegrenzt werden (Antes et al., 2000).

Da gezeigt werden konnte, dass das Saethre-Chotzen Syndrom durch eine Haploinsuffizienz ausgelöst und so der Phänotyp durch eine Konzentrationsveränderung des TWIST-Proteins verursacht wird, stellt sich die Frage nach der Auswirkung der Translokationsereignisse im 3'-Bereich des *TWIST*-Gens. Störungen der Transkriptionsregulation könnten, ähnlich wie „missense“-Mutationen oder Deletionen, zu einer Fehlregulation der Genexpression von *TWIST* führen.

### 1.5 Twist als Entwicklungsgen

Um die Funktion von humanen Genen besser verstehen zu können, werden häufig Tiermodelle eingesetzt. Untersuchungen an Tiermodellen könnten Aufschluss über die Expression, die Regulation und andere Faktoren, wie Zielgene oder Interaktionspartner liefern. Auch wenn die Entwicklungsprozesse der jeweiligen Spezies sich von der menschlichen Entwicklung unterscheiden, zeigen viele Gene, dass sie in Sequenz und Funktion innerhalb der Eukaryoten zumindest bedingt konserviert sind.

Das *Twist*-Gen wurde zuerst bei *Drosophila melanogaster* identifiziert und spielt hier eine entscheidende Rolle während der Embryonalentwicklung. Es gehört zur Gruppe der „dorsoventralen Gene“ und wird sowohl vor als auch während der Gastrulation exprimiert (Simpson, 1983; Thisse et al., 1988).

Homozygote *twist*-Mutanten zeigen eine abnorme Gastrulation. Sie bilden eine reduzierte ventrale Furche, kein Mesoderm oder Mesodermderivate sowie keine

inneren Organe und sterben während der Embryonalentwicklung (Simpson, 1983; Nüsslein-Volhard et al., 1984; Leptin, 1991). Der Körper dieser Embryonen zeigt eine verdrehte Form („twisted“), die verantwortlich für die Namensgebung des Gens ist.

Für die vollständige Mesodermentwicklung sind die Gene *twist* und *snail* essentiell. In den Vorläuferzellen des Mesoderms konnte gezeigt werden, dass Twist als Aktivator für mesodermale Gene agiert, während Snail ein Repressor für ventrolaterale Gene ist (Leptin, 1991).

Während der Embryogenese ist das Twist-Protein ein Regulator der mesodermalen Differenzierung und der Myogenese. Die stärkste Expression kann in den Vorläufern der somatischen Muskulatur gezeigt werden. Vorläuferzellen anderer mesodermaler Derivate, wie viscerales Mesoderm oder Herz, zeigen eine schwächere Expression (Baylies und Bate, 1996).

Während der späten Embryonalentwicklung wird *twist* in proliferierenden Zellen exprimiert, die laterale und dorsale „Cluster“ bilden und die Vorläufer der adulten abdominalen Muskeln sind, wohingegen in differenzierten larvalen Muskelzellen keine *twist*-Expression mehr nachgewiesen werden kann (Bate et al., 1991; Baylies und Bate, 1996). Twist reguliert folglich Gene, die für die Differenzierung bestimmter Zelltypen wichtig sind, spielt aber in den weiteren Differenzierungsprozessen allem Anschein nach keine Rolle mehr.

Während der Metamorphose übernimmt das *Drosophila* Twist-Protein eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der indirekten Flugmuskulatur (Anant et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass ein Markergen (*erect-wing: ewg*) für die Differenzierung dieser Muskulatur erst dann exprimiert wird, wenn in diesen Zellen keine *twist*-Expression mehr nachweisbar ist.

Neben dem Expressionsmuster konnten durch Untersuchungen bei *Drosophila* auch Gene identifiziert werden, die an der Regulation von *twist* beteiligt sind bzw. durch das Twist-Protein reguliert werden.

In Zellen der mittleren ventralen Domäne des Blastoderms werden *twist* und *snail* durch das maternale Morphogen Dorsal aktiviert. Durch den Transport in den Kern werden Zielgene von Dorsal wie zum Beispiel das *twist*-Gen, aktiviert bzw. reprimiert (Roth et al., 1989; Rushlow et al., 1989a; Steward, 1989). Durch Jiang und Mitarbeiter (1992) konnte eine Bindung von Dorsal an den *twist*-Promotor, die zur Aktivierung des *twist*-Gens führt, nachgewiesen werden.

*Drosophila* Mutanten für das *dCBP*-Gen (CBP: „CREB binding protein“) zeigten einen ähnlichen Phänotyp, wie *twist*-Mutanten. In diesen Mutanten war keine *twist*-Expression nachweisbar und es konnte gezeigt werden, dass Dorsal für die Aktivierung des *twist*-Promotors den Co-Faktor CBP benötigt (Akimaru et al., 1997). Neben der Interaktion mit Dorsal konnte für CBP eine Bindung an den Transkriptionsfaktor CREB („cAMP response element binding protein“) gezeigt werden (Kwok et al., 1994).

Die humanen Homologen von Dorsal, CBP und CREB könnten folglich Kandidaten für die *TWIST*-Regulation beim Menschen sein. Als das humane Homolog zu Dorsal gilt die p50 Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Ghosh et al., 1990; Kieran et al., 1990). Für das humane *CBP*-Gen konnten Mutationen, vorwiegend Deletionen, identifiziert werden, die zur Ausbildung des Rubinstein-Taybi Syndrom (MIM 190849) führen. Dieses Syndrom gehört zwar nicht in die Gruppe der Acrocephalosyndactylien, weist aber ebenfalls Extremitätenfehlbildungen auf (Petrij et al., 1995).

Ein direkter Einfluss von Twist auf ihre Expression konnte für die mesodermalen Gene *dMef2* und *tinman* gezeigt werden (Bodmer et al., 1990; Lilly et al., 1994; Nguyen et al., 1994; Taylor et al., 1995; Yin et al., 1997). Beide Gene werden in den mesodermalen Vorläuferzellen durch das *Drosophila* Twist-Protein reguliert, zeigen jedoch in einem späteren Entwicklungsstadium eine Twist unabhängige Expression (Taylor et al., 1995; Yin et al., 1997). Für das *DFRI*-Gen, das als das Homologe zu den *FGFR*-Genen der Vertebraten gilt, konnte in frühen Embryonen ebenfalls eine Twist abhängige Expression gezeigt werden (Shishido et al., 1993).

Neben diesen Genen gibt es aber vermutlich noch eine Reihe von weiteren Genen, die direkt oder indirekt von Twist reguliert werden. So konnten durch „Microarray“-Hybridisierungen, bei denen die RNA aus *Drosophila twist*-Mutanten- mit der der Wildtyp-Embryonen verglichen wurde, gezeigt werden, dass etwa 280 Gene ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen - unter ihnen auch 15 mesoderm-spezifische Gene (Furlong et al., 2001). Zu diesen mesodermalen Genen gehören unter anderem auch *tinman* und *dMef2*, für die ein direkter Zusammenhang mit der *twist*-Expression gezeigt werden konnte.

Allerdings sind vermutlich nicht alle identifizierten Gene direkte Zielgene des Twist-Proteins, aber diese Analysen verdeutlichen eine entscheidende Rolle von Twist bei der Regulation entwicklungsbiologisch relevanter Prozesse.

## 1.6 Twist in der Vertebratenentwicklung

Die Informationen, die durch Untersuchungen bei *Drosophila* gewonnen wurden, können erste Hinweise auf eine mögliche Funktion in der Vertebratenentwicklung liefern. Als ein geeigneter Modellorganismus für die Vertebratenentwicklung kann die Maus angesehen werden, da die entwicklungsbiologischen Prozesse denen des Menschen vermutlich sehr ähnlich sind.

In der Embryonalentwicklung der Maus wird *Twist* erstmals am Tag 7,5 d.p.c im anterior-lateralen Mesoderm nachgewiesen (Ang und Rossant, 1994). Am Tag 8,0 d.p.c wird *Twist* in den Somiten und dem Somatopleura der neuralen Platte exprimiert (Wolf et al., 1991). Zunächst ist die Expression in den Somiten sehr homogen verteilt, aber mit dem Einsetzen der zellspezifischen Differenzierung innerhalb der Somiten wird die Expression des *Twist*-Gens in den myotomalen Kompartimenten herunter reguliert (Hebrok et al., 1994; Fuchtbauer, 1995). Die Expression myogener bHLH-Proteine, wie z.B. *Myf5* und *MyoD*, wird in diesen Geweben hingegen gesteigert (Ott et al., 1991; Pownall und Emerson, 1992; Sassoon, 1993; Smith et al., 1994; Cossu et al., 1996). Durch eine *Twist*-Überexpression in murinen Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen die Fähigkeit zur Differenzierung verlieren und die Expression myogener bHLH-Faktoren (*MyoD*, *Myf-5* und *Myogenin*), die für diese Differenzierung essentiell sind, herunter reguliert wird (Hebrok et al., 1994).

Daraus schließen die Autoren, dass das vertebraten *Twist*-Protein eine negative Regulation auf Gene ausübt, die für die Differenzierung wichtig sind.

Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass die negative regulatorische Wirkung des murinen *Twist*-Proteins auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Hierbei spielt die Fähigkeit von *Twist* zur Heterodimerisierung und DNA-Bindung eine wichtige Rolle. So konnte bei der Regulation der Muskel-Kreatin-Kinase (MCK) gezeigt werden, dass *Twist* die Aktivierung durch *MyoD* in unterschiedlicher Weise reprimieren kann. Durch die Bildung eines Heterodimers mit dem E12-Protein besetzt *Twist* einen für die Zielgenaktivierung essentiellen Co-Faktor von *MyoD*. Darüber hinaus führt eine direkte Bindung des *Twist*-Proteins an *MyoD* ebenfalls zu einer Reprimierung der aktivierenden Wirkung von *MyoD* (Hamamori et al., 1997). Eine weitere Repressionsmöglichkeit und folglich ein Verhindern der Aktivierung

myogener Gene wird Twist durch seine direkte Bindung an Mef2 gegeben (Spicer et al., 1996). Weitere funktionelle Analysen zeigten, dass unterschiedliche Proteindomänen für die Heterodimerisierung verantwortlich sein können. So konnte beispielsweise die Interaktion des murinen Twists mit dem Mef2-Protein auf die Heterodimerisierung der HLH-Domänen sowie den C-terminalen Bereich beider Proteine zurückgeführt werden. Für die Heterodimerisierung von Twist und MyoD hingegen ist die basische Domäne, die in der Regel an der DNA-Bindung beteiligt ist, essentiell (Hamamori et al., 1997).

Untersuchungen an „*Twist*-Knock-out“ Mäusen zeigten, dass Mäuse, die keine Kopie des *Twist*-Gens mehr aufweisen (*Twist*-null) am Tag 11,5 d.p.c der Embryonalentwicklung sterben. Bei diesen Mäusen ist der Verschluss der cranialen Neuralfalte gestört. Da Wildtyp-Mäuse keine Expression von Twist im Neuralrohr aufweisen, liegt diesem Defekt vermutlich eine gestörte Induktion aus dem darunter liegenden mesenchymalen Gewebe, in dem Twist stark exprimiert wird, zugrunde. Des weiteren sind bei „*Twist*-Knock-out“ Mäusen die Branchialbögen, die Somiten und die Extremitätenknospen fehlgebildet (Chen und Behringer, 1995).

Mäuse, die Heterozygotie für das *Twist*-Gen aufweisen, besitzen einen moderaten Phänotyp. Der Phänotyp dieser Tiere weist einige Gemeinsamkeiten mit dem klinischen Bild des Saethre-Chatzen Syndroms auf. Ein gemeinsames Merkmal ist ein beschleunigter Verschluss verschiedener Schädelnähte, woraus eine Asymmetrie des Kopfes resultieren kann, die vergleichbar mit den Gesichtsasymmetrien bei Patienten mit Saethre-Chatzen Syndrom ist (Bourgeois et al., 1998; Carver et al., 2002). Einige dieser Tiere zeigen auch Veränderungen an den Extremitäten. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um cutane Syndactylien, sondern um die zusätzliche Ausbildung eines oder mehrerer Zeh(en) (Bourgeois et al., 1998).

Die Untersuchungen an den beschriebenen Tiermodellen könnten wichtige Informationen über die Genregulation und die molekulare Pathogenese des humanen *TWIST*-Gens liefern. So könnten die humanen Homologen der *Drosophila* Gene, die an der Regulation von *twist* beteiligt sind, bzw. durch das Twist-Protein reguliert werden, möglicherweise in einem ähnlichen Zusammenhang stehen. Zum Beispiel könnten die humanen Homologen zu Dorsal, CBP und CREB an der transkriptionellen Regulation von *TWIST* beteiligt sein. Ebenfalls könnte die Twist-abhängige Expression von *DFR1* von besonderem Interesse sein, da *DFR1* als das



*Drosophila* Homolog zu den vertebraten *FGFR*-Genen gilt. Basierend auf dieser Erkenntnis wäre eine direkte Regulation eines oder mehrerer *FGFR*-Gene durch TWIST denkbar. Da für das murine Twist-Protein eine repressorische Wirkung bei Differenzierungsprozessen gezeigt werden konnte, könnte man von einer ähnlichen Funktion bei der Regulation der *FGFRs* ausgehen. Dies würde bedeuten, dass die Transkription der *FGFR*-Gene durch TWIST reprimiert wird.

Der reprimierende Einfluss des TWIST-Proteins auf die Genexpression während der Osteogenese konnte ebenfalls in Zellkulturanalysen nachgewiesen werden. Zellen, die TWIST überexprimieren, bleiben in einem undifferenzierten Zustand und zeigen eine verminderte Expression von Osteoblasten spezifischen Marker-Genen, wie die *Alkalische Phosphatase (ALP)* und *Typ I Collagen (COLIA1)* (Lee et al., 1999). Zusätzlich konnte an Osteoblasten, die aus Gewebe von Saethre-Chatzen Patienten gewonnen wurden und eine Stopp-Mutation für ein Allel des *TWIST*-Gens (Y103X) tragen, gezeigt werden, dass diese beiden Marker-Gene hoch reguliert werden (Yousfi et al., 2001). In Osteoblasten von Patienten mit Apert Syndrom, die eine Mutation im *FGFR2*-Gen aufweisen, konnte ebenfalls eine erhöhte Expression der *Alkalische Phosphatase* und des *Typ I Collagens* gezeigt werden (Lomri et al., 1998), was auch als ein weiterer Hinweis auf ein Zusammenspiel zwischen *TWIST* und den Genen der *FGFRs* angesehen werden kann. Bisher jedoch konnte dieser Zusammenhang weder an kultivierten Zellen, noch an vertebraten Tiermodellen gezeigt werden.

## 1.7 Transkriptionsregulation bei Vertebraten

Die transkriptionelle Regulation eukaryoter Gene spielt eine wichtige Rolle bei deren zeitlicher und gewebsspezifischer Expression.

Auf der DNA befinden sich Sequenzabschnitte, an die Proteine - sogenannte Transkriptionsfaktoren - binden und so die Transkription des jeweiligen Zielgens regulieren können.

Die Transkription wird durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase gesteuert. Bei Eukaryoten wird die Transkription durch die RNA-Polymerase II (Pol II) vermittelt. Die RNA-Polymerase II besteht aus 12 Untereinheiten und bindet im Zusammenspiel mit anderen Proteinen als basaler Transkriptionskomplex an den Basalpromotor (Core-Promotor). Dieser befindet sich in der Regel zwischen Position - 40 und + 50

relativ zum Transkriptionsstart (Smale, 1997). TFIID ist ein Protein, das aus mehreren Untereinheiten besteht und den Basalpromotor unabhängig und spezifisch erkennt. Zu den Untereinheiten von TFIID gehören TBP (TATA binding protein) sowie etwa 10 TAFs (TBP associated factor). Für die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) und die Einleitung der Transkription durch die RNA-Polymerase II werden neben den generellen Transkriptionsfaktoren noch weitere Faktoren benötigt.

Ein typischer Basal-Promotor setzt sich aus mehreren Elementen zusammen. Das „TATA“-Motiv wird durch die Consensus-Sequenz „TATAAA“ repräsentiert (Lee und Young, 1998). Dieses Motiv befindet sich in der Regel 25-30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Die „TATA“-Box ist entscheidend für die Positionierung des Transkriptionsapparats auf der DNA und wird von der TBP-Untereinheit des TFIID-Transkriptionsfaktors erkannt (Hernandez, 1993; Burley und Roeder, 1996).

Ein weiteres konserviertes Element des Basalpromotors ist das Initiationselement (Inr), bestehend aus der Consensus-Sequenz „(Py) Py A+1 N T/A Py (Py)“ (Smale, 1997). Zusätzlich weisen viele eukaryote Basalpromotoren ein DPE-Element („downstream promotor element“) auf, das die Consensus-Sequenz „A/G G A A/T C G T T G“ trägt. Dieses Element befindet sich bei Promotoren 30 bp stromabwärts des Transkriptionsstarts (Burke und Kadonaga, 1996).

Neben dem basalen Promotor sind noch weitere regulatorische Elemente in unmittelbarer Nachbarschaft zum basalen Promotor lokalisiert. Diese Sequenzabschnitte bezeichnet man als regulatorische Promotorelemente. Über solche regulatorischen DNA-Motive können, neben den Faktoren des basalen Promotorkomplexes, weitere Transkriptionsfaktoren, direkt oder indirekt mit dem basalen Promotorkomplex in Wechselwirkung treten und somit die Transkription aktivieren oder reprimieren (Roberts, 2000). Eine indirekte Interaktion kann sowohl durch einzelne Cofaktoren, als auch durch einen Proteinkomplex, der als Mediator Komplex bezeichnet wird, kontrolliert werden (Rachez und Freedman, 2001).

Für eine spezifische Regulation werden oftmals weitere regulatorische Elemente, sogenannte „Enhancer“- oder „Silencer“-Elemente benötigt. Diese können sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich des Promotors lokalisiert sein. Solche „Enhancer“- bzw. „Silencer“-Elemente wirken richtungsunabhängig, wobei die Entfernung zum Promotor von Gen zu Gen variieren kann (Mitchell und Tjian, 1989).

Durch das Zusammenspiel von Aktivatoren und Repressoren sowie DNA-biegenden Faktoren wird ein sogenanntes „Enhanceosom“ gebildet, welches mit dem basalen Transkriptionskomplex bzw. den Mediatoren interagieren und so die Transkription modulieren kann (Kim und Maniatis, 1997).

Neben diesen regulatorischen Sequenzabschnitten spielt die gewebsspezifische Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Genexpression eine große Rolle. Durch eine zeitlich oder gewebsspezifisch limitierte Expression kann eine große Variabilität in der Regulation von Genen geschaffen werden.

### **1.8 Der japanische Kugelfisch (*Fugu rubripes rubripes*) als Modellorganismus für die Struktur des vertebraten Genoms**

Um mögliche regulatorische Sequenzmotive zu identifizieren, bietet sich der Sequenzvergleich zwischen genomischen Sequenzabschnitten unterschiedlicher Spezies an. Viele Modellorganismen weisen ähnlich große Genome wie das des Menschen auf und sind so für einen Sequenzvergleich schwierig zu handhaben.

Das Genom der Maus beispielsweise ist mit 3000 Mb ähnlich groß, wie das des Menschen (Venkatesh et al., 2000).

Zudem zeigte sich, dass zwischen Mensch und Maus viele nicht-codierende Sequenzabschnitte stark konserviert sind und so eine Identifizierung regulatorisch relevanter Sequenzabschnitte schwierig ist (Hardison et al., 1997; Loots et al., 2000).

Bei der Auswahl eines Modellorganismus für die Identifizierung funktioneller Sequenzabschnitte müssen diese Kriterien bedacht werden.

Das Genom des japanischen Kugelfisches *Fugu rubripes rubripes* (*Fugu*) bietet eine Reihe von Merkmalen, die es für die Analyse komplexer genomischer Regionen innerhalb der Vertebraten interessant macht. Der japanische Kugelfisch gehört zur Familie der Tetraodontidae und weist innerhalb der Vertebraten einen großen evolutionären Abstand zum Menschen auf. Der gemeinsame Ursprung liegt etwa 450 Millionen Jahre zurück (Powers, 1991). Schon 1968 konnten Hinegardner und Mitarbeiter zeigen, dass das Genom der Tetraodontidae relativ stark komprimiert ist.

Das Genom des Kugelfisches umfasst ca. 400 Mb und ist somit ca. 7,5 mal kleiner als das humane Genom. Es weist aber annähernd die gleiche Anzahl von Genen auf (Brenner et al., 1993), so dass etwa alle 7 kb ein Gen vermutet wird (Elgar et al., 1996).

Die Intron-Exon Grenzen vieler Gene sind zwischen *Fugu* und Mensch stark konserviert, wobei die Intronsequenzen beim japanischen Kugelfisch in vielen Fällen ebenfalls stark verkürzt und zwischen 60 und 150 bp lang sind (Elgar et al., 1996).

Aufgrund der evolutionären Distanz und der starken Komprimierung in den nicht-codierenden Sequenzabschnitten ist *Fugu* ein geeigneter Modellorganismus zur Identifizierung von regulatorischen DNA-Elementen. Dabei wird postuliert, dass diese Elemente einem starken evolutionären Druck unterliegen, so dass sie über eine Distanz von 450 Millionen Jahren konserviert wurden. Für einige Gene, wie beispielsweise für das *Sox9*- und das *Pax6*-Gen, konnten solche konservierten Sequenzabschnitte identifiziert werden (Miles et al., 1998; Bagheri-Fam et al., 2001). Auch für das murine *Hoxb4*-Gen konnten mit Hilfe eines genomischen Sequenzvergleichs mit *F. rubripes* ebenfalls konservierte Sequenzabschnitte identifiziert werden und ihre Funktionalität bzw. Relevanz in transgenen Mäusen partiell nachgewiesen werden (Aparicio et al., 1995).

### 1.9 Ziele der Arbeit

Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollten neue Erkenntnisse über mögliche Regulationsmechanismen des *TWIST*-Gens liefern. Hierbei standen Untersuchungen zur Identifizierung regulatorischer Sequenzabschnitte, die an der Transkription beteiligt sein können, im Mittelpunkt.

Die genomische *Twist*-Region des japanischen Kugelfisches (*Fugu*) sollte identifiziert und analysiert werden. Da die humane *TWIST*-Region auf Chromosom 7p21 einen hohen Anteil an repetitiver DNA aufweist, war geplant, durch den Sequenzvergleich zwischen Mensch und *Fugu* konservierte DNA-Elemente zu identifizieren. Diese DNA-Elemente könnten als potentiellen „Enhancer“- bzw. „Silencer“-Elemente an der transkriptionellen Regulation des *TWIST*-Gens beteiligt sein.

Des weiteren könnten durch die Untersuchung der *TWIST* homologen Region bei *Fugu* bisher uncharakterisierte Transkripteinheiten, die als Kandidatengene für das Mikrodeletionssyndrom 7p21 (Johnson et al., 1998) in Frage kommen, identifiziert werden.

Durch die Untersuchungen von Wang und Mitarbeitern (1997) konnte der Transkriptionsstart des humanen *TWIST*-Gens lokalisiert werden. Durch die

Generierung von Reporter-gen-Konstrukten sollte der flankierende Bereich des Transkriptionsstarts hinsichtlich seiner Funktionalität untersucht werden. Hierzu war geplant, unterschiedlich große Promotor-Fragmente in ein Expressionsvektorsystem zu inserieren und diese in unterschiedlichen Zelllinien auf ihre spezifischen Fähigkeiten bezüglich der Aktivierung des Reportergens (*Luciferase*) zu analysieren. Neben diesen Untersuchungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzabschnitten, die an der transkriptionellen Regulation des *TWIST*-Gens beteiligt sind, sollten die Auswirkungen der *TWIST*-Expression auf die Regulation unterschiedlicher *FGFR*-Gene (1-4) untersucht werden. Es war geplant in einer humanen Zelllinie, die keine endogene *TWIST*-Expression aufweist, das *TWIST*-Protein unter konstanten Bedingungen zu exprimieren und die Auswirkungen auf die *FGFR*-Expression auf RNA-Ebene zu analysieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
Binokular, DIAVERT	Leitz, Wetzlar
Brutschrank, Cytoperm	Heraeus, Hanau
Brutschrank, CO <sub>2</sub> -Auto-Zero	Heraeus, Hanau
Cellulosenitrat (0,2 µm)	Schleicher und Schuell, Dassel
Cryostat	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, USA
ABI Prism 377 DNA-Sequencer	Applied Biosystems, USA
Electrophoresis Constant Power Supply	Pharmacia, Schweden
ECPS 500/400 Fluorometer TKO 100	Hoefer Scientific Instruments, USA
Hamilton Spritze	Hamilton, Schweiz
Heizblock Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Horizontal Electrophoresis System	Owl Scientific, Inc., USA
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Incubator Shaker, Model G25	New Brunswick Scientific Co., USA
Liquid Scintillation System LS 1701 Analyser	Beckmans Instruments, USA
Membranen:	
Hybond-N	Amersham Pharmacia, USA
Biodyne B Transfer Membran	PALL, Dreieich
Mikroskope:	
Axioplan Mikroskop	Zeiss, Jena
Axiophot Epifluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
pH-Meter CG 836	Schott, Hofheim
Phosphoimager Fujix BAS 1000	Fuji, Japan
IP-Kassetten, Fuji BAS	Fuji, Japan
Imaging-Platten, Fuji BAS-III S	Fuji, Japan
Photometer:	

Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Schweden
Pharmacia Novospec II	Pharmacia Biotech, Schweden
Spectrophotometer, SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories, München
Pipetten:	
Eppendorf	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Gilson	Gilson, Frankreich
Röntgenfilm Scientific Imaging Film	Eastman Kodak, USA
Röntgenfilmkassette Cronex	DuPont, USA
Sterilbank Microflow Intermed	Stolco, Düsseldorf
Sterilbank LaminAir HA 2448 GS	Heraeus, Hanau
Thermocycler:	
PE 9600	Applied Biosystems, Foster City, USA
TRIO-Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
i cycler	Bio-Rad Laboratories, München
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, USA
UV-Transilluminator 2035	Herolab, Wiesloch
Waagen:	
Modell 2254	Sartorius, Göttingen
PM 2000	Mettler, Schweiz
Wasserbäder:	
Typ 3042	Köttermann, Hänigsen
Typ 1083	GFL, Burgwedel
Whatman-3M-Papier	Whatman, USA
Zentrifugen:	
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Osterode
Sorvall GLC-2B	Du Pont, Dreieich
Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge	Du Pont, Dreieich

### 2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firmen Boehringer (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), Difco (USA), Gibco BRL (USA)\*, Fluka (UK), Fresenius (Oberursel), Hoechst (Frankfurt), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) verwendet.

\*Alle Produkte der Firma Gibco BRL werden über die Firma Invitrogen (Niederlande) vertrieben

Alexa Fluor 488 Phalloidin	Molecular Probes Europe BV, Niederlande
DMSO	Serva Reinbiochemica, Heidelberg
ExpressHyb™ Hybridisation Solution	Clontech, USA
Ladepuffer	Applied Biosystems, USA
Long Ranger Gel Solution	BioWhittaker Molecular Applications, USA
IGEPAL (NP 40)	Vysis Inc., USA
TEMED	Serva Reinbiochemica, Heidelberg
Template Suppression Reagent	Applied Biosystems, USA
Trizol Reagent	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin	Serva Reinbiochemica, Heidelberg
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories Inc., USA



### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit A. dest. angesetzt und ggf. autoklaviert oder sterilfiltriert.

#### Antibiotika (Stammlösungen)

Chloramphenicol	34 mg/ml (Ethanol absolut)
Ampicillin	250 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Kanamycin	20 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
Neomycin (G418)	50 mg/ml (H <sub>2</sub> O)
6,6 µM Alexa Fluor 488 Phalloidin	300 Units (lyophilisiert) wurden in 1,5 ml (200 Units/ml) Methanol gelöst. Lagerung der Stocklösung bei -20°C.
DAPI (250 ng/ml) (Gebrauchslösung)	15 µl DAPI/50ml 0,5 % Tween-20 /PBS
Dehybridisierungslösung	1 % (w/v) SDS 0,01 M EDTA
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
100x Denhardts-Reagenz	2 % (w/v) BSA 2 % (w/v) Ficoll 400 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolone
DEPC (Diethylpyrocarbonat)- dH <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) DEPC
Dextransulfat-Lösung	50 % Dextransulfat (w/v) in H <sub>2</sub> O

## Material und Methoden

---

Dye-Lösung	100 ml 1x TNE 10 µl Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33258, 1mg/ml)
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
Gelladepuffer (6 x)	15 % Ficoll 400 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol
Hybridisierungslösung (nach Church and Gilbert, 1984)	7 % (w/v) SDS 1 % (w/v) BSA 0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,16 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Methylenblau-Färbelösung	0,02 % Methylenblau (w/v) 0,3 M NaAc pH 5,2
10X MOPS (3-[N-Morpholino] propane sulfonic acid) –Puffer	0,4 M MOPS; pH 7,0 0,1 M Natriumacetat 0,1 M EDTA (mit DEPC- H <sub>2</sub> O)
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl 3 M NaCl pH 7,0
PBS (pH 7,5)	80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 100 mM NaCl

PBS/EDTA	0,001 % Phenol rot (v/v) (Serva 32095) 0,02 % EDTA (w/v)
PBS-TWEEN	0,5 % TWEEN-20 (v/v) in PBS
RNA-Extraktions Puffer (Birstil-Puffer)	140 mM NaCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Tris-HCl (pH8,6) 0,5 % IGEPAL (Nonident NP-40) (v/v)
3 x SDS-PAGE-Ladepuffer	0,03 % Bromphenolblau (w/v) 6 % SDS (w/v) 26 % Glycerin (v/v) 7,5 % β-Mercaptoethanol (v/v) 0,15 M Tris/HCl pH 6,8
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
5 x TBE-Puffer	0,5 M Tris/HCl 0,5 M Borsäure 10 mM EDTA
10 x TNE-Puffer	100 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 1 M NaCl pH 7,4
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA
IPTG-Lösung	500 mg IPTG ad 2,5 ml H <sub>2</sub> O

## Material und Methoden

---

Lösung I (GET mit Lysozym)	10 mM EDTA (pH 8,0) 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM Glucose Lysozym (5mg/ml)
Lösung II	0,2 N Natriumhydroxid 1 % SDS (w/v)
Lösung III (3M Kaliumacetat-Puffer)	3 M Kaliumacetat 11,5 ml Eisessig ad 100 ml H <sub>2</sub> O pH 5,0
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0
Waschlösung I	2x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung II	1x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung III	0,1x SSC 0,1% (w/v)SDS

### 2.1.4 Enzyme

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	Invitrogen, Niederlande
RQI <i>DNase</i> I <i>DNase</i> I (grade I)	Promega, USA Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Large Fragment of DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	Invitrogen, Niederlande
<i>RNasin</i>	Promega, USA

### Restriktionsendonukleasen:

Alle Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

<i>RNase</i> H	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
<i>T4</i> DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, USA

### 2.1.5 Größenstandards

DNA-Größenstandards:

100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Niederlande
1 kb DNA Ladder	Invitrogen, Niederlande
Low-Range-PFG-Marker	New England Biolabs, Schwalbach

RNA-Größenstandard:

0,24-9,5 kb RNA Ladder	Invitrogen, Niederlande
------------------------	-------------------------

### 2.1.6 Nukleinsäuren, Nukleotide

Nukleotide:

$\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol) Amersham, Braunschweig

DNA-Polymerisations-Mix (20 mM/dNTP) Amersham Pharmacia Biotech, USA

Nukleinsäuren:

NM\_000474 (ursprünglich: X99268) Homo sapiens *TWIST*-cDNA

(Die *TWIST*-cDNA wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. F. Perrin-Schmitt zur Verfügung gestellt.)

NM\_011658 Muriner *Twist*-cDNA-Klon (Dieser *Twist*-cDNA-Klon wurde freundlicherweise von Prof. Dr. E.-M. Füchtbauer zur Verfügung gestellt.)

Ein genomisches Cosmid Contig der humanen *TWIST*-Region stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung

#### cDNA Klone und ESTs:

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA Klone wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Heidelberg) bezogen.

**Tabelle 2-1: Bezeichnung der cDNA-Klone, ihre Acc. Nr. und ihre Herkunft**

Bezeichnung	Acc. Nr.	Organismus
IMAGp998C242367	AA571602	<i>Mus musculus</i>
IMAGp998E091450	AA172774	<i>Mus musculus</i>
IMAGp998M106538	AW130325	<i>Homo sapiens</i>
IMAGp998H083677	AA908753	<i>Homo sapiens</i>
IMAGp998K012039	AA504560	<i>Homo sapiens</i>
IRALp962C0731	BC014574	<i>Homo sapiens</i>
IRAKp961I1462	BC013179	<i>Homo sapiens</i>

Lachssperma DNA, ultrabeschallt, Sigma, Deisenhofen  
(10 mg/ml)

Plazenta-DNA, ultrabeschallt (10 mg/ml) Sigma, Deisenhofen

Multiple Tissue Northern (MTN™) Blots Clontech, USA

- human fetal
- human adult
- mouse embryo

Human Multiple Tissue Expression  
(MTN™) Array Clontech, USA

Oligonukleotide Sigma Genosis, UK

**cDNA-Banken:**

GeneFinder cDNA Pool: MTP1 RZPD, Berlin

Zebrafisch und Fugu

Fugu cDNA library – Fugu cDNA HGMP, UK

**Genomische Banken:**

Fugu cosmid library No.: 66 RZPD, Berlin

Fugu FF PAC library No.: 707 RZPD, Berlin

**2.1.7 Vektorsysteme**

pB-II-KS (+)	Stratagene, Heidelberg
pcDNA 3.1 (+)	Invitrogen, Niederlande
pCR 2.1-TOPO	Invitrogen, Niederlande
pGL3-Basic	Promega, Heidelberg
pGL3-Promoter	Promega, Heidelberg
pRL-CMV Vektor	Promega, Heidelberg
pCMV-Taq Epitope Tagging-Vektor	Stratagene, Heidelberg

## 2.1.8 Expressionssysteme

Tabelle 2-2: Reportergenkonstrukte und eukaryote Expressionskonstrukte

Plasmidbezeichnung	Klonierungsstrategie	Referenz
pcDNA3.1- <i>TWIST</i> -sense	1: cDNA-Klon (X99268) mit <i>EcoRI</i> geschnitten, 1464 bp ligiert in 2: pCDNA3.1(+) <i>EcoRI</i> geschnitten	diese Arbeit
pcDNA3.1- <i>TWIST</i> -antisense	1a: cDNA-Klon (X99268) mit <i>EcoRI-PstI</i> geschnitten. 436 bp Fragment ligiert in 2a: pB-II-KS(+); geschnitten mit <i>EcoRI-PstI</i> . 1b: 452 bp Fragment geschnitten mit <i>BamHI-EcoRI</i> ligiert in 2b: pcDNA3.1 (+) mit <i>BamHI-EcoRI</i> geschnitten	diese Arbeit
pCMV-Taq-c-myc- <i>TWIST</i>	1: cDNA-Klon (X99268) mit <i>XhoI-EcoRI</i> geschnitten, 1355 bp ligiert in 2: pCMV-Taq3 mit <i>XhoI-EcoRI</i> geschnitten	(Godmann, 2001) unpubliziert
3,8 kb-pGL3-Basic	1: CosIII A9 mit <i>KpnI-XhoI</i> geschnitten, 3500 bp PCR-Produkt* mit <i>KpnI-MluI</i> geschnitten, ligiert; anschließend 3817 bp Fragment ligiert in 2: pGL3-Basic <i>KpnI-XhoI</i> geschnitten	diese Arbeit
3,5 kb-pGL3-Basic	1: pGL3-Basic-3,8 kb Promotor mit <i>KpnI-SmaI</i> geschnitten. 3296 bp ligiert in 2: pGL3-1,7 kb Promotor <i>KpnI-SmaI</i> geschnitten	diese Arbeit
3,0 kb pGL3-Basic	1: CosIII A9 mit <i>KpnI-MluI</i> gespalten, 2987 bp-Fragment ligiert zu 2: pGL3-Basic <i>KpnI-MluI</i> gespalten	diese Arbeit
2,5 kb-pGL3-Basic	pGL3-Basic-3,0 kb Promotor mit <i>KpnI-SmaI</i>	diese Arbeit



	geschnitten. 2477 bp-Fragment ligiert in 2: pGL3-Basic 1,7 kb Promotor mit <i>KpnI-SmaI</i> geschnitten	
1,7 kb-pGL3-Basic	1: 1709 bp mit PCR* amplifiziert und <i>MluI-BgIII</i> gespalten. Ligiert in 2: pGL3-Basic <i>MluI-BgIII</i> geschnitten	diese Arbeit
782 bp pGL3-Basic	1: 782 bp mit PCR amplifiziert und mit <i>BgIII</i> gespalten. Ligiert in 2: pGL3-Basic <i>BgIII</i> geschnitten	(Breitenbücher, 1998)
461 bp-pGL3-Basic	1: 461 bp mit PCR amplifiziert und mit <i>MluI-BgIII</i> gespalten. Ligiert in 2: pGL3-Basic <i>MluI-BgIII</i> geschnitten	(Breitenbücher, 1998)
355 bp-pGL3-Basic	1a: 355 bp mit PCR* amplifiziert und in de pCR 2.1-TOPO-Vektor ligiert. 1b: mit <i>KpnI-XhoI</i> gespalten. Ligiert in 2:pGL3-Basic <i>KpnI-BgIII</i> geschnitten	diese Arbeit

Bei der Klonierungsstrategie kennzeichnet 1: die Behandlung der Insert-DNA und 2: die Behandlung der Vektor-DNA. Die Bezeichnung a und b wurde gewählt, wenn zu Klonierung des endgültigen Konstrukts zwei Klonierungsschritte nötig waren. \*Oligonukleotide sind im Anhang 1 aufgeführt.

### 2.1.9 Bakterienzellen

DH5 $\alpha$ competent cells	Invitrogen, Niederlande
- subcloning efficiency	
- maximum efficiency	
Top10	Invitrogen, Niederlande

### 2.1.10 Fertigsysteme zum Aufreinigen von DNA und RNA

Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Large Construct Kit	Qiagen, Hilden
Oligotex <sup>™</sup> mRNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNeasy <sup>TM</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.11 Fertigsysteme

RadPrime Labelling System	Invitrogen, Niederlande
Superscript <sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Niederlande
Omniscript <sup>TM</sup> RT Kit	Qiagen, Hilden
DIG RNA Labeling kit (Sp6/T7)	Roche, Basel, Schweiz
Ready to go PCR Beads	Amersham Pharmacia Biotech, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Niederlande
Immunoprecipitation Kit (Protein G)	Roche Molecular Biochemicals
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Heidelberg
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, USA

### 2.1.12 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit A. dest. angesetzt und anschließend autoklaviert.

LB-Medium	10 g/l Bacto-Tryptone 5,0 g/l Bacto-Yeast Extract 5,0 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Bacto-Agar
SOB-Medium	20 g/l Bacto-Tryptone 5,0 g/l Bacto-Yeast Extract 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl pH 7,0

SOC-Medium

SOB-Medium

+ 20 mM Glucose (steril filtriert)

+ 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung (steril filtriert)

### 2.1.13 Zellkultur: Medien, Zusätze, Transfektionsreagenzien und Materialien

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit GlutamaxI, 4500 mg/LD-Glucose, ohne Natriumpyruvat

Gibco , Life Technologies, Karlsruhe

MEM Nichtessentielle Aminosäure Lösung ohne L-Glutamin

Gibco, Life Technologies, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin

Gibco, Life Technologies, Karlsruhe

Fötales Kälberserum

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

10% DMEM

440 ml DMEM

50 ml fötales Kälberserum

5 ml nichtessentielle Aminosäuren

5 ml Penicillin/Streptomycin

Effectene Transfection Reagent

Qiagen GmbH, Hilden

Lipofectin Transfektionsreagenz

Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe

Optimem

Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe

PBS-EDTA

0,02 % EDTA in PBS

0,05 %ige Trypsin-Lösung

pro 1 Liter:  
 0,5 g Trypsin  
 2,69 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat  
 6,0 g NaCl  
 auf pH 7,8 einstellen

Kulturflaschen, Schalen, Sechs-Loch-Kulturplatten („six-well plates“), Röhrchen sowie Objektträger mit aufgesetzter Kulturkammer (Lab-Tek II Chamber Slide) wurden von den Firmen Greiner, Frickenhausen, Nalge Nunc International, USA und Becton Dickinson, USA bezogen.

### 2.1.14 Zelllinien

**Tabelle 2-3: Art und Herkunft verwendeter Zelllinien**

Zelllinie	Gewebe	Ursprung
OHS	Osteosarkoma	<i>Homo sapiens</i>
CCL-136	Rhabdomyelosarcoma	<i>Homo sapiens</i>
U2-OS	Osteosarkoma	<i>Homo sapiens</i>
CCL-142 (RAG)	Adenocarcinoma (Niere)	<i>Mus musculus</i>

Die OHS und CCL-136-Zelllinien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. E.-M. Füchtbauer, Institut für Molekular- und Strukturbioogie, Aarhus Universität, Dänemark, zur Verfügung gestellt. Die U2-OS-Zelllinie (ATCC HTB-96) und die RAG-Zelllinie (ATCC CCL-142) wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

### 2.1.15 Antikörper

**Tab.2-4: Art und Herkunft verwendeter Antikörper**

Antikörper	Spenderorganismus	bezogen von
monoklonaler anti-human-c-myc	Maus (IgG1-Isotyp)	Sigma, USA
monoklonaler anti-human-c-myc (Klon 9E10)	Maus	AG Dr. Frank Seeber, Phillips-Universität Marburg
monoklonaler anti-human-c-myc (Klon 9E10), HRP gekoppelt	Maus (IgG1-Isotyp)	Boehringer, Mannheim
polyklonaler anti-Maus-IgG, Texas-Red gekoppelt	Kaninchen	Sigma, USA

## **2.1.16 Datenbanken und Software**

### **2.1.16.1 Software**

Für die Datenverarbeitung wurden die gängigen Microsoft Programme des Office-Pakets sowie Adobe-Grafikprogramme verwendet. Für alle Arbeiten mit Auswertungs-Software wurden die vom Hersteller mitgelieferten Software-Pakete benutzt. Des weiteren wurden das Sequenzanalyse Programm „Sequencher“ der Firma Gene Codes, das Bibliographieprogramm „Endnote“ der Firma Niles, das FISH-Analyseprogramm „Quips-FISH“ der Firma Vysis sowie das „In Situ Imaging System“ (ISIS) der Firma Meta Systems eingesetzt.

### 2.1.16.2 Datenbanken

Mit Hilfe der in Tabelle 2-5 dokumentierten Datenbanken wurden DNA- und Aminosäuresequenz auf Homologien, funktionelle Bereiche und Domänen untersucht. In der unten angegebenen Tabelle werden nur die Internetadressen aufgeführt, über die man zu den einzelnen Datenbanken gelangen kann.

**Tabelle 2-5: Verwendete Datenbanken mit Internetadressen**

Datenbank	Internetadresse
BCM - Search Launcher	<a href="http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher">http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/SearchLauncher</a>
EMBL <small>European Molecular Biology Laboratory</small>	<a href="http://www.embl-heidelberg.de">http://www.embl-heidelberg.de</a>
ExPASy Molecular Biology Server	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
Genoscope (Tetraodon)	<a href="http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetraodon">http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetraodon</a>
HGMP <small>Human Genome Mapping Project Resource Centre</small>	<a href="http://www.hgmp.mrc.ac.uk">http://www.hgmp.mrc.ac.uk</a>
MatInspector professional	<a href="http://www.genomatix.de/matinspector">http://www.genomatix.de/matinspector</a>
MultAlign	<a href="http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html">http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html</a>
NCBI <small>National Center of Biotechnology Information</small>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Pedant Genom Database	<a href="http://www.biomax.de/products/2_datab_alphabet.html">http://www.biomax.de/products/2_datab_alphabet.html</a>
Pipmaker	<a href="http://nog.cse.psu.edu/pipmaker">http://nog.cse.psu.edu/pipmaker</a>
Primer 3	<a href="http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi">http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi</a>
RZPD <small>Ressourcenzentrum im Deutschen Humangenomprojekt</small>	<a href="http://www.rzpd.de">http://www.rzpd.de</a>
Sanger Institute	<a href="http://www.sanger.ac.uk">http://www.sanger.ac.uk</a>
UCSC - Genome Bioinformatics	<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>
Transfac	<a href="http://transfac.gbf-braunschweig.de">http://transfac.gbf-braunschweig.de</a>
Webcutter	<a href="http://www.medkem.gu.se/cutter">http://www.medkem.gu.se/cutter</a>
Weizmann Institute	<a href="http://bioinformatics.weizmann.ac.il/index.html">http://bioinformatics.weizmann.ac.il/index.html</a>
Whitehead Institute	<a href="http://www-genome.wi.mit.edu">http://www-genome.wi.mit.edu</a>

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

Die folgenden Methoden sind Standardmethoden in der Molekularbiologie und Biochemie und wurden anhand von Protokollen aus der Methodensammlung von (Sambrook und Russel, 2001) sowie „Current Protocols of Human Genetics“ und „Current Protocols in Molecular Biology“ durchgeführt (Ausubel et al., 1993; Dracopoli et al., 1997). Die Verwendung von Fertigsystemen erfolgte, soweit nicht anders erläutert, nach Anleitung ihrer Hersteller.

Falls Modifikationen zu den Standardprotokollen durchgeführt wurden, sind diese im Folgenden erläutert.

### **2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen (Miller et al., 1988)**

Zur Gewinnung genomischer DNA aus kultivierten Zellen wurden diese mit einem Zellscharber abgelöst und in PBS für 5 min bei 20.800 x g sedimentiert. Das Sediment wurden in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden 1 % SDS (w/v) und 25 mg Proteinase K gegeben und für 16 h bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert.

Um Proteine und Zelltrümmer zu sedimentieren, wurden weitere 5 ml SE-Puffer und 2 ml 5 M NaCl zugegeben. Nach gründlichem Mischen und einer Inkubation von 10 min bei 55°C wurden die Proteine und Zelltrümmer für 15 min bei 3.500 x g sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 35 ml EtOH abs. versetzt. Nach vorsichtigem Schwenken konnte die DNA aus der Lösung mit einem Haken herausgenommen werde. Nach einmaligem Waschen mit 70 %igem EtOH wurde die DNA in einem entsprechendem Volumen TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

### **2.2.2 Restriktionsspaltung von dsDNA**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die bestimmte Basenabfolgen auf doppelsträngiger DNA erkennen und diese spalten. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II eingesetzt, bei denen Erkennungssequenz und Schnittstelle identisch sind.

Die Sequenzspezifität der Restriktionsendonukleasen hängt entscheidend von der Ionenkonzentration in der Reaktionslösung sowie von der Inkubationstemperatur ab.

Daher erfolgte die Spaltung der DNA bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur und in dem entsprechenden Reaktionspuffer für 2-4 h.

### **2.2.3 Generierung künstlicher Schnittstellen**

Da viele Vektorsysteme nur über eine bestimmte Anzahl von Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in ihrer „Multiple-cloning site“ (MCS) verfügen, die aber nicht immer in der Ziel-DNA vorhanden sind, mussten künstliche Schnittstellen generiert werden. Hierzu wurden zwei Methoden eingesetzt. Zum einen wurden Oligonukleotide generiert, die an ihren 5'-Enden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen aufweisen und zum anderen wurden sogenannte Adapter an die DNA-Fragmente ligiert.

#### **2.2.3.1 Schnittstellengenerierung mit Hilfe modifizierter Oligonukleotide**

Um DNA-Fragmente gerichtet in Expressionsvektoren zu inserieren, wurden Oligonukleotide synthetisiert, die an ihren 5'-Enden Schnittstellen für Restriktionsfragmente aufweisen. Diese Oligonukleotide wurden so hergestellt, dass im 3'-Bereich 20 bp komplementär zu dem zu amplifizierenden DNA-Fragment waren und im 5'-Bereich etwa 8 bis 10 Basenpaare, die die Schnittstelle repräsentierten. Dem nichtkomplementären Bereich wurden - zusätzlich zu den Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen - Nukleotide angefügt, da die meisten Enzyme neben ihrer Consensussequenz noch einige flankierende Basen benötigen, um ihr spezifisches Motiv zu erkennen. Die Länge dieser Abschnitte unterscheiden sich von Enzym zu Enzym.

Da durch diesen nichtkomplementären 5'-Bereich die Hybridisierungsbedingungen der Oligonukleotide nicht optimal sind, wurden anfänglich 5 Amplifikationszyklen mit niedrigerer Anlagerungstemperatur gefahren. In der Regel wurden diese PCRs nach dem folgenden Schema durchgeführt:



---

95°C – 5 min  
 95°C – 30 sec ———┐  
 55°C – 30 sec           5 x  
 72°C – x sec ———┘  
 95°C – 30 sec ———┐  
 60°C – 30 sec           30x  
 72°C – x sec ———┘  
 72°C – 10 min  
 4°C - ∞

Die Extensionszeit x richtet sich nach der Länge der zu generierenden PCR-Produkte. Hierbei wurde für jedes kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments 1 min für die Extensionszeit angesetzt.

### 2.2.3.2 Adapter-Ligation

Die Methode der Adapter-Ligation bietet sich vor allem bei einer Klonierung an, bei der das offene Leseraster eingehalten werden muss. Hierbei wird die DNA mit einer beliebigen Restriktionsendonuklease gespalten. Um DNA-Fragmente mit glatten Enden („blunt ends“) zu erhalten, wurden Enden mit 5'-Überhängen mit Hilfe des Klenowfragments der *DNA-Polymerase I* aufgefüllt. Hierzu wurden 5 µg gespaltene DNA mit 3 U Klenow und 40 mM dNTPs versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 min Inkubation des Reaktionsgemisches bei 68°C gestoppt und die DNA über ein Agarosegel aufgereinigt. (Bei 3'-Überhängen werden überschüssige Nukleotide durch eine T4 DNA Polymerase abgespalten, so dass glatte Enden entstehen.)

An die so generierten DNA-Fragmente mit glatten Enden („blunt ends“) wurden dann mit Hilfe einer Ligase doppelsträngige Adapter ligiert.

Die Ligation wurde in einem Gesamt-Volumen von 10 µl bei einer konstanten Temperatur von 16°C über Nacht durchgeführt. Nach anschließender Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 65°C, wurden die Proben extrahiert und präzipitiert.

Ansatz:        1,0 µl T4-DNA-Ligase Puffer (10 x)  
                  7,5 µl Proben DNA  
                  1,0 µl Linker-Oligonukleotide (0,4 µg/µl)  
                  0,5 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl)

### **2.2.4 Dephosphorylierung von Vektoren**

Um bei einer Ligations-Reaktion das Religieren des Vektors zu verhindern, musste dieser zuvor mit alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert werden, so dass die T4-DNA-Ligase die 5'-Hydroxyl- und die 3'-Phosphatgruppe des Vektors nicht verbinden kann. Hierzu wurde der Vektor, nach der Spaltung mit einem Restriktionsenzym, mit der entsprechenden Menge H<sub>2</sub>O, 10 x Puffer und alkalischer Phosphatase (1U) versetzt. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend bei 65°C gestoppt. Um alle Proteine zu entfernen, wurden die Vektoren entweder mit Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 2.2.8) oder über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 2.2.18).

### **2.2.5 Ligation**

Die Ligation eines Vektors mit einem DNA-Fragment wird durch die DNA-Ligase katalysiert. Dieses Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch eine 3'-OH- kovalent mit einer 5'- Phosphatgruppe unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung.

Für den Einbau eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde ein linearisierter und dephosphorylierter Vektor mit äquimolaren Mengen des Inserts gemischt.

Ligationsreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Hierzu wurde der Ligationsansatz mit 1 µl 10 x Puffer sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl) versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 14-16 h bei 16°C .

### **2.2.6 Klonierung von PCR-Produkten**

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des „Topo-Cloning Kits“ der Firma Invitrogen (Niederlande) nach Anleitung des Herstellers.

### **2.2.7 Transformation von Calcium-kompetenten *E. coli*-Zellen**

Um Fremd-DNA in Bakterien zu amplifizieren wurden Calcium-kompetente Bakterienzellen transformiert. Hierzu wurde Fremd-DNA mit einem Selektionsvorteil für eine transformierte Zelle, wie zum Beispiel einem Antibiotikaresistenzgen, in die Bakterien eingebracht. Nach erfolgreicher Transformation können die Bakterien unter geeignetem Selektionsdruck inkubiert und Zellen mit Fremd-DNA selektioniert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Calcium-kompetenten Zellen (DH5 $\alpha$ , Top10) wurden nach Beschreibung des Herstellers transformiert (Invitrogen).

### **2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly, 1979)**

Diese Methode macht sich zu Nutze, dass sich Plasmid-DNA und genomische bakterielle DNA unter alkalischem pH unterschiedlich verhalten. Aufgrund der superhelikalen Struktur denaturiert Plasmid-DNA später als die genomische bakterielle DNA der Wirtszelle. Bei der anschließenden Renaturierungsreaktion bildet die genomische DNA mit den Proteinen und zellulären Bestandteilen eine unlösliche Struktur, die sedimentiert werden kann. Die Plasmid-DNA wird danach mittels Ethanol präzipitiert und in einem geeigneten Volumen aufgenommen.

Die Methode wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um Plasmid-, Cosmid- oder PAC-DNA zu isolieren.

Die Plasmid-Präparation wurde, je nach benötigter DNA-Menge, im Mini- oder Maxi-Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien in dem entsprechenden Volumen LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum für 16 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss sedimentiert.

Die Mengen der eingesetzten Lösungen I, II oder III richtet sich nach dem Volumen der angeimpften Bakterienkultur (Sambrook und Russel, 2001).

Für die meisten Präparationen wurden die geeigneten Fertigsystem der Firma Qiagen (siehe 2.1.11), nach Anleitung des Herstellers, eingesetzt.

### **2.2.9 Extraktion von Nukleinsäuren mit Phenol/Chloroform**

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-Lösung wurde diese mit einem Volumen Phenol versetzt, gründlich gemischt und im Anschluss bei 20.800 x g für 5 min zentrifugiert. Nach vorsichtiger Abnahme der oberen Phase sowie dem Transfer in ein neues Reaktionsgefäß, wurde diese mit Phenol/Chloroform (1:1 v/v) versetzt, gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Zur Entfernung von Phenolresten wurde die wässrige Phase abermals in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Chloroform (1:1 v/v) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wird die nun proteinfreie DNA-Lösung in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.

### **2.2.10 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren**

Zur Präzipitation von DNA wurde eine DNA-Lösung mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat Lösung (pH 7,6) und 2,5 Vol. EtOH abs. versetzt, gemischt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch 30 min Zentrifugation bei 4°C und 20.800 x g sedimentiert. Die pelletierte DNA wurde 1x mit 70%igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

Für bestimmte Anwendungen musste die DNA mit anderen Alkoholen oder Salzen präzipitiert werden, was in den entsprechenden Kapiteln gesondert erwähnt wird (siehe auch Sambrook und Russel, 2001).

### **2.2.11 Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Am Fluorometer wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe eines nicht-interkalierenden Farbstoffs (Hoechst 33258) gemessen. Vor einer jeden Messung mußte das Fluorometer mit einer bekannten DNA-Konzentration (Kalbs-Thymus-DNA , 1 µg/µl) geeicht werden. Die DNA-Konzentration einer Probe konnte dann direkt vom Gerät abgelesen werden.

### **2.2.12 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Doppelsträngige DNA zeigt im Spektralphotometer ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Messung der Absorption erfolgt in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Hierbei entspricht eine Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Vor einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die zu messende DNA-Probe um den Faktor 50 auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt (bei zu hoher DNA-Konzentration empfiehlt sich eine Verdünnung um den Faktor 100).

Um eine eventuelle Proteinverunreinigung der Probe zu bestimmen, wurde zusätzlich der Proteingehalt bei einem Absorptionsmaximum von 280 nm gemessen. Liegt das Verhältnis von DNA-Konzentration zu Protein-Konzentration bei 1,8, ist die DNA-Probe weitgehend frei von Proteinverunreinigungen.

### **2.2.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988)**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR: Polymerase chain reaction) können definierte DNA-Abschnitte aus einer geringen DNA-Ausgangsmenge *in vitro* amplifiziert werden.

Für die PCR werden DNA-Fragmente, die bekannte Sequenzen im 5'- und im 3'-Bereich aufweisen, benötigt, um aus diesem Bereich Oligonukleotide (Primer) ableiten zu können.

Das Grundprinzip der PCR unterteilt sich in drei Reaktionsschritte, die zyklisch 25-35 Mal durchlaufen werden. Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei 94°C denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich die Primer an die DNA (Annealing). Dies geschieht meistens bei Temperaturen im Bereich von 50°C bis 65°C (die Temperatur hängt von der Länge der Primer und ihrer Basenzusammensetzung ab). Im dritten Schritt beginnt die Polymerisationsreaktion, bei der die Primer als Startpunkt dienen. Die Polymerase haftet sich an die angelagerten Primer und synthetisiert bei 72°C einen komplementären Strang (Extension), was immer in 3'-Richtung erfolgt.

Bei jedem neuen Zyklus kann die neusynthetisierte DNA ebenfalls als Matrize dienen. Somit erfolgt schließlich die exponentielle Vermehrung der gewünschten DNA-Sequenz.

Mit der Entdeckung der Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* wurde die PCR als Standardmethode ermöglicht. Die Taq-Polymerase hat ihr Aktivitätsoptimum bei 72°C. Sie toleriert jedoch auch Temperaturen von 95°C, welche beim Denaturieren der DNA benötigt werden.

#### **2.2.14 DNA Sequenzierung – nach Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977)**

Bei der Taq-Cycle-Sequenzierung wird die Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger modifiziert: eine geringe Menge an Template-DNA wird mit einer thermostabilen Polymerase in einer PCR amplifiziert. Zusätzlich zu den normalen Desoxynukleotiden (dNTPs) gibt man zu dem PCR-Ansatz auch Didesoxynukleotide (ddNTPs), welche nach ihrem Einbau zu einem Abbruch der Polymerisation führen. Statistisch kommt es an jeder Nukleotidposition der Ziel-DNA auf diese Weise zu einem Syntheseabbruch, so dass verschieden lange Fragmente in nachweisbarer Menge entstehen. Die verwendeten ddNTPs sind mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die eine automatische Detektion ermöglichen (Prober et al., 1987; Lee et al., 1992).

In dieser Arbeit wurde das „DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit“ der Firma Amersham Pharmacia eingesetzt. Die ddNTPs dieses Systems sind mit zwei Farbstoffen markiert. Zum einen mit Fluorescein und zum anderen jeweils mit einem unterschiedlich modifizierten Rhodamin. Das Fluorescein wird bei einer Wellenlänge von 488 nm mit Hilfe eines Argon Lasers angeregt, was eine Übertragung der freiwerdenden Energie auf das jeweiligen Rhodamin verursacht. Daraufhin emittiert dieses seinerseits Licht einer charakteristischen Wellenlänge, was Detektion des entsprechenden ddNTPs erlaubt. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

#### **2.2.15 Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente können entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Da die Phosphatreste der DNA dem Molekül eine negative Ladung verleihen, wandern sie in Richtung der Anode.

Die Laufeigenschaften im Agarosegel werden vom Molekulargewicht, von der Konformation der DNA, der Höhe der angelegten Spannung sowie der Konzentration des Gels beeinflusst.

### **2.2.15.1 Konventionelle Gelelektrophorese**

Als konventionelle Gelelektrophorese bezeichnet man die Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 70 bp und 60 kb in Agarosegelen, an die ein homogenes elektrisches Feld angelegt wird.

Die Trennung kleiner Fragmente von 100-400 bp erfolgte in 2 %igen Agarosegelen, an die eine Spannung von 6-8 V/cm angelegt wurde.

Fragmente mit einer Größe von 0,5 bis 15 kb, die bei Restriktionsenzymspaltung von PAC- oder Plasmid-DNA entstehen, wurden in 0,8 %igen Gelen aufgetrennt. Die angelegte Spannung und die Laufzeit der Gele variierten je nach Verwendungszweck von 2-6 V/cm und 2-20 h.

Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die Proben wurden zum Auftrag in Gelladepuffer aufgenommen. Das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau ermöglicht ein Abschätzen der Laufstrecke im Gel, während Ficoll ein Absinken der DNA in die Geltaschen sicherstellt.

Zur Anfärbung der DNA enthielten die Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, das sich interkalierend in doppelsträngige DNA einlagert. Durch UV-Licht angeregt, fluoresziert das interkalierte Ethidiumbromid und markiert somit die Lage der DNA-Banden. Die Intensität der Fluoreszenz kann - im Vergleich zu einer Probe bekannter Konzentration - Aufschluss über die DNA-Konzentration der jeweiligen Bande geben.

Zur Abschätzung der Größe der im Gel aufgetrennten DNA-Moleküle dienen Größenstandards definierter Konzentration.

### **2.2.15.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Alle linearen, doppelsträngigen DNA-Moleküle, deren Rotationsradius größer als die Porengröße eines Agarosegels ist, wandern mit der gleichen Geschwindigkeit im elektrischen Feld. Die DNA wird nicht mehr der Größe nach aufgetrennt, sondern wandert linearisiert „mit dem Ende voraus“ ins Gel (Lerman und Frisch, 1982). Die maximale Auftrennung von Agarosegelen liegt bei 750 kb, doch wären dazu Agarosegele mit einer Konzentration von 0,1 - 0,2 % nötig, die aufgrund der Instabilität nur schlecht zu handhaben sind.

Durch die Methode der Pulsfeldgelelektrophorese ist es möglich, größere DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen (Schwartz und Cantor, 1984). Das

angelegte elektrische Feld wird alternierend rechtwinklig geändert. Große DNA-Moleküle müssen sich dann zunächst an der neuen Richtung des elektrischen Feldes orientieren. Je größer das Molekül ist, desto länger dauert die Orientierung. Bei der Pulsfeldgelelektrophorese werden alle DNA-Moleküle aufgetrennt, deren Rotationszeit kürzer als die Dauer der alternierenden Feldzeit (Pulszeit) ist.

In dieser Arbeit wurde eine CHEF-(contour clamped homogenous field electrophoresis) Apparatur verwendet (Chu et al., 1986). Die Elektroden sind hexagonal um das horizontale Gel angeordnet. Durch diese Anordnung der Elektroden ist eine kontinuierliche Veränderung der Richtung des elektrischen Feldes möglich. Daraus resultiert eine Vergrößerung des Auftrennungsbereichs.

Für die PFGE wurde ein 1 %iges Agarosegel benötigt. Das Gel wurde in die PFGE-Kammer, die bereits mit 1 x TBE gefüllt war, eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden durch Restriktionsenzym gespaltene PAC-DNA nach dieser Methode aufgetrennt. Die Proben wurden mit Gelladepuffer versetzt und aufgetragen.

Als Größenstandard für die PFGE wurde der Low-Range-PFGE-Marker (NEB) verwendet.

Die Auftrennung erfolgte für 20 h bei 200 V (Pulszeiten: 5 – 15 s; Iteration: 1), der Laufpuffer mußte für die gesamte Laufzeit auf 12°C gekühlt werden.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente für 30 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gefärbt.

### **2.2.16 Photodokumentation der Agarosegele**

Die Zugabe von Ethidiumbromid zu Agarosegelen ermöglicht den Nachweis von DNA. Ethidiumbromid ist ein chemisches Agens, das zwischen den Basen der DNA interkaliert und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Zur Dokumentation wurden die Agarosegele bei UV-Licht von 302 nm fotografiert. Als Auswertungs- und Dokumentationssoftware stand das Programm E.A.S.Y. Rh-3 der Firma Herolabs zur Verfügung.

### **2.2.17 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente als Template zum Oligolabelling oder als Ligationsinsert zu erhalten, mussten diese präparativ aus dem Agarosegel isoliert werden. Dazu wurde



die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht von 302 nm vorsichtig mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen aufgereinigt.

Zur DNA-Extraktion wurde das Agarose-Stück zuerst mit dem QG-Puffer bei 50°C verflüssigt (10 min) und auf eine Säule aufgetragen. Bei hoher Salzkonzentration bindet die DNA an die Säulenmatrix. Durch Waschen mit einer Lösung niedriger Salzkonzentration (TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O) kann die DNA anschließend eluiert werden. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

### **2.2.18 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Feinberg und Vogelstein, 1983)**

Es wurden 20 ng DNA mit radioaktivem  $\alpha^{32}$ -P-dCTP durch „Random Priming“ markiert. Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit dem „RadPrime Labeling Kit“ der Firma Invitrogen (Niederlande) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden der Reaktionsansatz über eine Säulenmatrix (Nick columns, Amersham) gegeben und so von freien radioaktiven Nukleotiden befreit.

### **2.2.19 DNA-Transfer auf Nylonmembran - Southern-Blot (Southern, 1975)**

Beim Southern-Blot werden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine immobilisierende Nylonmembran übertragen. Hier wurde das Verfahren des Vakuum-Blots eingesetzt.

#### **2.2.19.1 Vakuum-Blot-Verfahren**

Beim Vakuum-Blot wird DNA mit Hilfe eines Niederdruckvakuums (40 – 50 cm H<sub>2</sub>O-Säule) vom Gel auf eine Membran transferiert. Hierzu wird die Membran angefeuchtet und auf den Träger in der Blotkammer gelegt. Anschließend wird das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Um ein Vakuum zu erzeugen, muss das System luftdicht abgeschlossen werden.

Das Gel wurde unter dem aufgebauten Vakuum mit folgenden Lösungen überschichtet:

1. 0,25 M HCl	10 min
2. Denaturierungslösung	10 min
3. Neutralisierungslösung	10 min
4. 20 x SSC	45-60 min

Nach dem Transfer der DNA wurde die Membran mittels UV Licht einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt und somit die DNA kovalent an die Membran gebunden.

### **2.2.20 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten**

Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis gegeben. Falls es sich bei der Hybridisierungsprobe um unbekannte DNA handelte, erfolgte zusätzlich eine Präassoziation (Sealey et al., 1985). Die denaturierte Sonde wurde mit der Hybridisierungslösung gemischt und zu der Membran gegeben, welche zuvor in der Hybridisierungslösung vorinkubiert worden ist.

Sowohl die Prä- als auch die Hybridisierung selbst fanden bei 68°C statt. Die Membran wurde für 16 h hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen mit den unterschiedliche Waschlösungen gewaschen. In der Regel wurde der erste Waschschrift mit 2 x SSC / 0,1 % SDS für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Gegebenenfalls erfolgten weitere Waschschriffe, zunächst mit 1 x SSC / 0,1 % SDS und anschließend 0,1 x SSC / 0,1 % SDS – jeweils für 15 min bei 65°C.

Zur Autoradiographie wurden die Membranen in Folie eingepackt und entweder auf einem Phosphoimager analysiert oder mittels Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

### **2.2.21 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)**

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist eine auf Fluoreszenzfarbstoffen basierende Nachweismethode zur Lokalisation definierter DNA- oder RNA-Sequenzen, die mit komplementären DNA- bzw. RNA-Abschnitten auf Chromosomen oder Gewebeschnitten unter geeigneten Bedingungen hybridisieren.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde am Max-Planck-Institute für Molekulare Genetik in Berlin in Zusammenarbeit mit Frank Grützner aus der Arbeitsgruppe von Thomas Haaf durchgeführt.

#### **2.2.21.1 Chromosomenpräparation**

Für die Präparation von *Fugu rubripes rubripes* Metaphase-Chromosomen wurde eine Fibroblasten-Zelllinie eingesetzt (Bradford et al., 1997).

Vor der Chromosomenpräparation wurde das Kulturmedium mit 0,1 µg/ml Colchicin versetzt und für weitere vier Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen, nach Zugabe einer Trypsinlösung durch vorsichtiges Klopfen gelöst und in ein Zellkulturröhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 1.000 x g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in einer hypotonen Lösung (50 mM KCl) für 20 min inkubiert. Nach erneuter Sedimentation wurde diese Lösung durch eine Fixierlösung ersetzt (3:1 Methanol/Eisessig) und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen auf entfettete Objektträger aufgetropft.

#### **2.2.21.2 Markierung der DNA-Sonde mit Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP**

Die DNA-Sonden wurden mittels Nick-Translation (Rigby et al., 1977) behandelt. Das Enzym *DNaseI* fügt bei geringer Konzentration und in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup>-Ionen statistisch verteilte Einzelstrangbrüche („Nicks“) in zirkuläre oder lineare DNA-Substrate ein. An diesen Stellen setzt die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase an und baut einzelne Nukleotide in 3'-Richtung ab. Die so entstandenen Lücken werden durch die Polymerase-Aktivität des Enzyms wieder geschlossen. Es werden am 3'-OH der Desoxyribose komplementäre Nukleotide eingebaut. Dem Enzym werden radioaktiv markierte oder chemisch modifizierte Desoxynukleotide als Substrat angeboten. Auf diese Weise werden die neu synthetisierten Stränge markiert.

Als modifiziertes Desoxyribonukleosid-Triphosphat wurde Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP zu der Reaktion gegeben.

### **2.2.21.3 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate**

Die Chromosomenpräparate wurden 5-10 min in 2 x SSC äquilibriert und anschließend einer *RNase* Behandlung unterzogen, um so eine Hybridisierung von DNA-Sonden mit RNA-Molekülen, die sich auf dem Objektträger befinden, zu vermeiden. Dazu wurde die *RNase* A-Lösung (10 mg/ml) in 2 x SSC 1:100 verdünnt. Es wurden 100 µl dieser Lösung auf die Objektträger aufgetropft, diese mit einem Deckglas abgedeckt und für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Präparate wurden 3 x 5 min in 2 x SSC gewaschen. Anschließend erfolgte mittels Pepsinverdau die Entfernung von Proteinen, die die Chromosomen umgeben. Der Pepsinverdau sowie die folgenden Waschschrte wurden in Glasküvetten mit einem Volumen von 50 ml unter Schütteln durchgeführt. Die Objektträger wurden für 10 min in einer 50 µg Pepsin / 0,01 N HCl (w/v) Lösung mit pH 2,3 inkubiert. Nachfolgend wurden sie 2 x 5 min in 1 x PBS und 1 x 5 min in 1 x PBS / 50 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und 10 min in 1 % Formaldehyd / 1 x PBS / 50 mM MgCl<sub>2</sub> fixiert. Die Präparate wurden 5 min in 1 x PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 100 % Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet.

### **2.2.21.4 Denaturierung chromosomaler DNA**

Die Denaturierung der Chromosomenpräparate erfolgte für 1 min bei 90°C in 70 % (v/v) Formamid / 2 x SSC. Um die vorzeitige Renaturierung der chromosomalen DNA zu verhindern, wurden die Objektträger in einer eisgekühlten, aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und 100 % Ethanol) je 3 min dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

#### **2.2.21.4.1 Vorbereitung der Proben-DNA**

Bei der FISH mit PAC-DNA-Sonden, die repetitive Sequenzen enthalten, wurden die Bedingungen der chromosomalen *in situ* Suppression (CISS)-Hybridisierung eingehalten. Die repetitiven DNA-Abschnitte der Sonde wurden vor der Hybridisierung mit Kompetitor-DNA präassoziert (Sealey et al., 1985; Landegent et al., 1987; Lichter et al., 1988; Lengauer et al., 1990). Grundlage dieser Vorbehandlung ist, dass denaturierte DNA-Stränge zuerst mit ihren im Überschuss vorhandenen repetitiven Anteilen renaturieren. Durch die Absättigung repetitiver DNA-Sequenzen werden Kreuzhybridisierungen verhindert und somit unspezifische Signale unterdrückt.

Bei den verwendeten PAC-Sonden diente genomische DNA des Kugelfischs *Fugu rubripes rubripes* und gescherte humane Placenta DNA als Kompetitor-DNA.

#### 2.2.21.5 Hybridisierung und Detektion

Für das Hybridisierungsgemisch wurden 400 ng markierte Proben-DNA (Biotin und/oder Digoxigenin) mit 1 - 5 µg gescherter genomischer *Fugu*-DNA und 10 – 20 µg gescherter menschlicher Placenta-DNA kopräzipitiert. Der Ansatz wurde in 50 % Formamid, 10 % Dextransulfat und 2 x SSC gelöst und für 10 min bei 80°C denaturiert. Zum Preannealing der repetitiven Sequenzen wurde der Hybridisierungsansatz bei 37°C für 30 min inkubiert.

Anschließend wurde das Hybridisierungsgemisch auf die denaturierten Präparate gegeben und diese mit einem Deckglas blasenfrei abgedeckt. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Präparate mit Fixogum versiegelt (Marabuwerke, Tamm). Die Hybridisierung erfolgte für drei Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer.

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläser vorsichtig von den Objektträgern genommen. Zum Entfernen überschüssiger oder unspezifisch gebundener Sonden wurden die Präparate 3 x 5 min in 50 % (v/v) Formamid / 1 x SSC bei 45°C und einmal 5 min in 0,1 x SSC bei 60°C gewaschen. Anschließend kühlte man die Objektträger auf Raumtemperatur in 4 x SSC / 0,1 % (v/v) Tween 20 ab.

Zur Vermeidung unspezifischer DNA/Protein- bzw. Protein/Protein-Wechselwirkungen erfolgte eine Absättigung freier Bindungsstellen mit 4 x SSC / 0,1 % Tween-20(v/v) / 3 % BSA(w/v) für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer.

Die biotinylierte DNA-Sonden wurden mit dem an Avidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) nachgewiesen. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß isoliertes Glykoprotein mit einer sehr hohen Bindungsaffinität zu Biotin.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurden FITC-Avidin (Stammlösung: 2,0 mg/ml) und ein biotinylierter Anti-Avidin Antikörper (0,5 mg/ml) jeweils 1:200 in 4 x SSC / 0,1 % Tween-20 (v/v) / 3 % BSA (w/v) verdünnt. Auf jeden Objektträger wurden 20 µl FITC-Avidin Gebrauchslösung aufgetropft, mit einem Deckglas abgedeckt und für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach den anschließenden Waschschritten, 3 x 5 min in 4 x SSC / 0,1 % Tween-20 (v/v) bei 45°C, wurde eine Verstärkerreaktion durchgeführt. Hierzu kam ein

gegen Avidin gerichteter biotinylierter Antikörper aus Kaninchen zum Einsatz. Es wurden 20 µl Biotin-Anti-Avidin-Gebrauchslösung aufgetropft, ein Deckglas blasenfrei aufgelegt und für 45 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Der nachfolgende Biotin-Nachweis mit FITC-Avidin und die anschließenden Waschschriffe erfolgten wie oben beschrieben. Diese Art der Verstärkung von Fluoreszenz-Signalen wird als „Sandwich-Technik“ bezeichnet.

Nach dem letzten Waschschriff wurden die Präparate durch 4,6 Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich interkalierend in die Doppelhelix der DNA ein. Für die mikroskopischen Auswertungen an einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate mit Vectashield (Vysis) eingedeckt

### **2.2.21.6 Auswertung und Dokumentation der FISH-Ergebnisse**

Die Lokalisation einer DNA-Sonde gilt als eindeutig, wenn in mindestens 20 Metaphasen Signale auf beiden homologen Chromosomen und jeweils ein Signal auf jeder Chromatide zu sehen sind. Um die Hybridisierungssignale einem bestimmten chromosomalen Bereich zuzuordnen, wurden die Fluoreszenzaufnahmen mit einem DAPI-Filter und einem FITC-Filter durchgeführt. Diese Bilder wurden übereinandergelegt und entsprechend eingefärbt.

Zur mikroskopischen Auswertung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung stand ein ZEISS Axioplan Mikroskop mit Epifluoreszenzeinrichtung und gekühltem CCD-Kameraaufsatz zur Verfügung. Die computergesteuerte Bildauswertung der mit der hochauflösenden Kamera aufgenommenen Graustufenbilder erfolgte an einem Macintosh Power PC 801 mit hochauflösendem Monitor unter der Verwendung der Software Quips-FISH der Firma Vysis. Der Einsatz dieser Analyseverfahren ermöglicht eine kontrastreiche Darstellung von Bandenmustern und Signalen.

### **2.2.22 Isolierung von gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryoten Zellen wurden diese in Kulturflaschen bis zu einer relativen Dichte von 80 - 90 % kultiviert. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen. Nach Austausch des PBS gegen eiskaltes PBS wurden die Zellen mit einem Zellscharber abgelöst, in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1.000 x g (4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in RNA-Extraktions-Puffer (Birnstil-Puffer) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in

einer vorgekühlten Zentrifuge bei 20.800 x g für 10 min zentrifugiert. Die im Überstand befindliche RNA wurde in ein neues 2,0 ml Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 20 µl 20 % SDS und 40 µl *Proteinase K* (10 mg/ml) bei 56°C für 30 min inkubiert. Hierauf erfolgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) das im Verhältnis von 1:1 zur RNA dazugegeben wurde. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz für 10 min bei 20.800 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben und erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Chloroform/Isoamylalkohol (1:1 v/v) versetzt, gemischt und bei 20.800 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte eine Ethanolpräzipitation (siehe Kap. 2.2.10). Das erhaltene Sediment wurde in einer entsprechenden Menge DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Kleine Mengen RNA wurden mit dem „RNeasy Kit“ (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

### **2.2.23 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe (Mausembryonen)**

Um die Genexpression in unterschiedlichen Stadien der Mausembryogenese und Organen zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA aus Embryonen unterschiedlicher Altersstadien und verschiedenen Organen isoliert. Hierzu wurden die Organe und Embryonen direkt nach der Entnahme in eiskaltem PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff homogenisiert. Embryonen vor dem Stadium 11 d.p.c. wurden durch Zentrifugation bei 20.800 x g (1 – 2 min) homogenisiert.

Das zerkleinerte Gewebe wurde anschließend in einer entsprechenden Menge TRIZOL (Fa. Gibco BRL) aufgenommen. Die Isolierung der RNA erfolgte nach der Anleitung des Herstellers und wurde bis zum Gebrauch mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol. Ethanol abs. bei –80°C gelagert.

### **2.2.24 Isolierung von poly A<sup>+</sup>-RNA**

Für die Isolierung von poly A<sup>+</sup>-RNA wurde in dieser Arbeit das „Oligotex<sup>™</sup> mRNA Kit“ von Qiagen nach Anleitung des Herstellers eingesetzt.

### **2.2.25 Quantifizierung von RNA**

Die Quantifizierung von Gesamt-RNA erfolgte, ebenso wie die Quantifizierung von DNA, mittels photometrischer Messung. Bei einer Wellenlänge von 260 nm ergibt die Absorption von 1 eine RNA-Menge von 40 µg/µl. Das optimale Verhältnis der OD  $A_{260}/A_{280}$  liegt bei RNA-Messungen bei Faktor 2.

#### **2.2.25.1 Quantifizierung von poly A<sup>+</sup>-RNA**

Da der Anteil von mRNA aus isolierter Gesamt-RNA zwischen 1 - 2% liegt, konnte diese nicht mit Hilfe des Photometers exakt quantifiziert werden. Um die generierte mRNA zu quantifizieren, wurde die mRNA mittels Ethidiumbromid und einem bekannten Standard am UV-Transilluminator quantifiziert.

Hierzu wurden von einer Gesamt-RNA, die zuvor photometrisch quantifiziert wurde, eine Verdünnungsreihe generiert - in diesem Fall von 0 - 12 ng/µl.

Zum Nachweis der RNA wurde eine Ethidiumbromid-Lösung mit 1,5 µg/ml Ethidiumbromid und 0,1 M Ammoniumacetat eingesetzt und diese im Verhältnis von 5:1 mit der jeweiligen RNA gemischt. Anhand der Intensität des Signals konnte die Konzentration der poly A<sup>+</sup>-RNA relativ genau abgeschätzt werden.

#### **2.2.26 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA und poly A<sup>+</sup>-RNA**

Die für die cDNA-Synthese eingesetzte RNA wurde zunächst einer *DNaseI* Behandlung unterzogen. Für jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde 1 U RQ *DNaseI* und die entsprechende Menge 10 x Puffer eingesetzt. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend, nach Zugabe von 1 µl „RQ *DNase*“ Stopp-Solution, bei 65° für 10 min inkubiert.

Zur Generierung von einzelsträngiger cDNA wurden die Fertigsysteme „Superscript II First-Strand Synthesis“ System für RT-PCR (Fa. Gibco BRL) und Omniscript (Fa. Qiagen) nach Anleitung der Hersteller eingesetzt.

Die cDNA wurde entweder mittels „Random-Priming“, oder „Oligo-(dt)-Priming“ synthetisiert.

#### **2.2.27 Northern-Blot-Analyse (Ausubel et al., 1993)**

Der Nachweis der Expression einzelner Gene und der Transkriptgröße dieser Gene wurde durch Hybridisierungsexperimente auf Northern-Blots erbracht. Ein Northern-Blot ist eine Nylon- oder Nitrocellulosemembran auf der, nach elektrophoretischer



Auftrennung, RNA immobilisiert wurde (Alwine et al., 1977; Bresser und Gillespie, 1983).

Mit radioaktiv markierten DNA- bzw. RNA-Fragmente können komplementäre RNAs identifiziert und somit Expression sowie Transkriptgröße der zu untersuchenden Gene bestimmt werden.

#### **2.2.27.1 Fraktionierung von RNA-Fragmenten mittels Elektrophorese in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel**

Da RNA-Moleküle in der Regel einzelsträngig vorliegen und zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen, wurde die elektrophoretische Auftrennung in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel durchgeführt. Formaldehyd verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle und sorgt dadurch für ein gleichmäßiges Wanderungsverhalten.

Die RNA wurde wie unter 2.3.1 beschrieben isoliert. Für die Fraktionierung der RNAs wurden entweder 25 - 30 µg Gesamt-RNA oder 2 - 6 µg poly A<sup>+</sup>-RNA eingesetzt. Die RNAs wurden mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol Ethanol abs. bei -80°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation bei 20.800 x g für 20 min (4°C) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in 3,3 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 7,5 µl deionisiertem Formamid, 1,5 µl 10 x MOPS-Puffer und 2,7 µl Formaldehyd versetzt, 15 min bei 55°C denaturiert und bis zum Beginn der Elektrophorese auf Eis gelagert.

Für die Elektrophorese wurde ein 1,2 %iges Agarosegel mit 2,2 M Formaldehyd und 1 x MOPS-Puffer angesetzt. Zu Beginn der Elektrophorese wurde die Gelkammer mit 1 x MOPS-Puffer gefüllt, die denaturierten RNA-Proben mit der entsprechenden Menge Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 5 V/cm durchgeführt. Die Proben wurden etwa 15 min lang elektrophoretisch aufgetrennt, bis der Farbstoff etwa 0,5 cm ins Gel gewandert war. Anschließend wurde soviel Laufpuffer abgenommen, bis das Gel nicht mehr bedeckt war, um so eine Diffusion von Formaldehyd in den Puffer zu minimieren. An beiden Enden des Gels wurden Pufferbrücken aus Filterpapier (3 MM Whatmanpapier) angelegt und das Gel wurde zum Schutz vor dem Austrocknen mit einer Folie abgedeckt. Die Auftrennung der RNA wurde mit 5 V/cm für 8 h durchgeführt.

### **2.2.27.2 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran**

Zur weiteren Analyse der RNA wurde diese mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert. Hierzu wurde das Gel zunächst durch mehrmaliges Abspülen mit H<sub>2</sub>O von oberflächlichem Formaldehyd befreit. Um die Transfereffizienz vom Gel auf die Nylonmembran zu erhöhen, wurde das Gel zunächst in 20 x SSC für 30 min inkubiert.

Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot für 16 h, als Puffer diente in diesem Fall 10 x SSC um den Transfer großer RNA-Moleküle (> 4 kb) zu unterstützen.

Nach dem Transfer der RNA auf die Nylonmembran wurde diese mit 2 x SSC gespült und für 10 min bei 80°C getrocknet. Die RNA wurde durch die UV-Bestrahlung (Wellenlänge: 254 nm) mit der Membran quervernetzt und somit immobilisiert. Im Anschluss wurde diese zusätzlich für 3 h bei 80°C inkubiert.

Nach dem Transfer auf die Nylonmembran wurden die Membranen 10 min mit Methylblau-Lösung gefärbt, um den Transfer zu kontrollieren. (Durch die Färbung mit Methylblau wird vor allem die 18 S und 28 S RNA sichtbar gemacht.)

Hierzu wurde die Membran zunächst in 0,5 %igem Eisessig für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung für 10 min mit 0,02 % Methylblau-Lösung (in 3 M Natriumacetat (pH 5,2)). Der nicht-gebundene Farbstoff wurde mit A. bidest. entfernt.

### **2.2.27.3 Hybridisierung auf Northern-Blots**

Die Hybridisierungsexperimente wurden in dieser Arbeit mit radioaktiv markierten DNA-Sonden durchgeführt. Um die Membran für die Hybridisierung vorzubereiten, wurde diese in „ExpressHyb“ (Fa. Clontech) für 30 min bei 68°C prähybridisiert.

Nach der Prähybridisierung wurde die Lösung ausgetauscht und die radioaktiv markierte Sonde, die zuvor 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gelagert wurde, zugegeben. Die Hybridisierung fand bei 68°C für 1 h im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation statt.

Die überschüssige und nicht korrekt gebundene Sonde musste durch mehrere Waschschrte von der Membran entfernt werden. Zunächst erfolgte eine Inkubation der Membran in 2 x SSC / 0,05 % SDS für 40 min bei Raumtemperatur, wobei die Lösung mehrere Male gewechselt wurde. Anschließend wurde die Membran für

40 min in 0,1 x SSC / 0,1 % SDS bei 50°C unter ständigem Schütteln gewaschen. Diese Lösung wurde alle 10 min gewechselt.

Zur Dokumentation erfolgte eine Exposition auf einem Röntgenfilm bei -80°C.

#### **2.2.27.4 Dehybridisierung von Northern-Blots**

Nach erfolgter Autoradiographie wurde die gebundene Sonde von der Membran entfernt, um diese somit für weitere Experimente einsetzen zu können. Hierzu wurde eine 0,5 %ige SDS-Lösung auf 90 - 100°C erhitzt und die Membran für 10 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach 10 min Abkühlen der Lösung wurde die Membran feucht eingepackt und bei -20°C gelagert.

### **2.3 Zellbiologische Methoden (Dracopoli et al., 1997)**

In dieser Arbeit wurden ausschließlich immortalisierte menschliche Zelllinien verwendet. Diese Zellen wurden unter definierten Bedingungen in Kultur zur Proliferation angeregt und zur langfristigen Lagerung in einem entsprechenden Medium in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **2.3.1 Kultivierung und Lagerung von humanen Zelllinien**

Alle Zelllinien wurden in DMEM (10 % FKS) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 80 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert.

Um die Zellen in Kultur zu halten, mussten diese in regelmäßigen Abständen passagiert werden. Da es sich bei allen verwendeten Zelllinien um adhärente Zellen handelte, mussten diese durch die Zugabe von 0,05 % Trypsin (U2-OS) bzw. PBS / EDTA (CCL-136 und OHS) von der Oberfläche gelöst werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und nach Zugabe der jeweiligen Lösung für etwa 30 sec bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zelle mechanisch vom Kulturflaschenboden gelöst und jeweils, in einem Verhältnis von 1:4, auf neue Kulturgefäße aufgeteilt.

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese von ihren Kulturflaschen gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen bei 1.000 x g für 5 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in einem Einfriermedium, das 15 % DMSO enthielt, resuspendiert und in ein Einfriereröhrchen (Fa. Nunc) überführt. Dieses wurde über Nacht bei -80°C vorinkubiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.3.2 Transiente Transfektion von Reportergenkonstrukten in eukaryote Zellen mittels Liposomentransfektion (Felgner et al., 1987)**

In dieser Arbeit wurden transiente Transfektionen an OHS, CCL-136 und U2-OS Zellen mit der Liposomentransfektionsmethode durchgeführt. Die eingesetzten Liposomen bestehen aus positiv geladenen und neutralen Lipiden. Die Lipide können mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle interagieren und bilden sogenannte Micellen. Dieser DNA-Liposomen-Komplex wird von den Zellen durch Endocytose aufgenommen.

Hierzu wurden am Vortag der Transfektionen  $1,5 \times 10^5$  Zellen in 35 mm Multiwell-Platten ausgesät und in 2 ml Wachstumsmedium (10 % DMEM) für 20 h kultiviert. Für jeden Transfektionsansatz wurden jeweils 5  $\mu$ l Lipofectin-Reagenz (Fa. Gibco BRL) und 100  $\mu$ l Optimem (Fa. Gibco BRL) sowie 100  $\mu$ l Optimem und eine entsprechende Menge DNA - es wurden DNA-Mengen von 100 ng bis 1  $\mu$ g eingesetzt - gemischt. Diese Ansätze wurden für 45 min getrennt bei RT inkubiert, anschließend gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit Optimem gewaschen, um das fötale Kälberserum komplett zu entfernen. Die Zellen wurden mit 800  $\mu$ l Optimem versetzt und jeweils mit 200  $\mu$ l Transfektionsansatz für 5 h inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde nach der Inkubationszeit gegen DMEM Medium, das 10 % fötales Kälberserum enthielt, ausgetauscht und die für 48 h im Brutschrank kultiviert.

Als Alternative zur Transfektion mittels Lipofectin wurde das Transfektionsreagenz Effectene der Firma Qiagen eingesetzt. Dieses Transfektionsreagenz wurde hauptsächlich bei U2-OS-Zellen verwendet, da diese unter diesen Bedingungen eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz und Überlebensrate zeigten.

### **2.3.3 Generierung stabiler Zelllinien – Integration von Fremd-DNA in das Genom eukaryoter Zellen**

Zur Untersuchung von RNA Populationen unter konstanten Bedingungen wurden humane Zelllinien mit Reportergenkonstrukten transfiziert. Die transformierten Reportergenkonstrukte sollten mit der chromosomalen DNA durch homologe Rekombination integrieren. Um diesen Vorgang und die Expression der jeweiligen Resistenzgene zu gewährleisten, wurden die Zellen 48 h mit dem jeweiligen

Wachstumsmedium (10 % DMEM) inkubiert und anschließend mit einem Antibiotikum auf die homologe Rekombination für 14 Tage selektioniert.

Vor der eigentlichen Selektion der transfizierten Zellen mußte zunächst für jede Zelllinie die optimale Konzentration des Antibiotikums austitriert werden, da diese von der Art der Zellen und des Antibiotikums abhängt. Für das Antibiotikum G418, das in dieser Arbeit verwendet wurde, liegt die Konzentration bei Säugern zwischen 0,1 - 2,0 mg/ml.

In dieser Arbeit wurden zwei Osteosarcomazelllinien (OHS und U2-OS) mit unterschiedlichen Vektorsystemen transfiziert. Beide verwendeten Vektoren enthalten das *Neomycin*-Gen, welches unter dem konstitutiven CMV-Promotor exprimiert wird. Neomycin inaktiviert das Antibiotikum G418-Sulfate durch Phosphorylierung. G418 inhibiert sowohl bei Prokaryonten, als auch bei Eukaryonten die Proteinbiosynthese.

Zur Bestimmung der Antibiotika-Sensitivität wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz in einer Sechs-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch G418-haltiges Medium ersetzt. Dem Medium wurden 0,1 - 1 mg/ml G418 zugesetzt. Das G418-haltige Medium wurde jeden Tage erneuert. So wurden die Zellen für 14 Tage unter konstanten Bedingungen kultiviert und nach 3 maliger Wiederholung konnte die Antibiotikasensitivität der jeweiligen Zelllinien bestimmt werden.

Für die Transfektion wurde neben dem oben erwähnten Lipofectin (Fa. Gibco, BRL) auch das Transfektionsreagenz Effectene der Firma Qiagen verwendet. Hierzu wurde jeweils 1 µg Plasmid DNA eingesetzt..

Nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen zunächst 48 h in 10 % DMEM kultiviert und anschließend 1:10 verdünnt, da bei zu dicht gewachsenen Zellen die Wirkung des Antibiotikums nachlassen kann. Die Selektion erfolgt für 20 Tage mit der vorher bestimmten Menge des Antibiotikums. Die so selektionierten Zellen wiesen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit den Einbau der transfizierten Plasmid-DNA auf. Für weitere Experimente wurden die Zellen erneut vereinzelt und kultiviert.

### **2.3.4 Promotoranalysen im zellulären System**

Zur Untersuchung von *cis*-regulatorischen Elementen wurden Reportergenkonstrukte generiert und mittels transienter Transfektion in humane Zellen eingebracht. Das Reportergen, die *Firefly*-Luciferase, wurde unter die Kontrolle der zu

untersuchenden *cis*-regulatorischen Elemente gebracht. Je nach Aktivierungspotential wurde das Reporter-gen stärker oder schwächer exprimiert. Als Standard wurde ein Kontroll-Vektor (pGL3-Promoter) eingesetzt. Bei diesem Kontroll-Vektor steht das *Firefly*-Luciferase-Gen unter der Kontrolle des viralen SV40-Promotors, der in nahezu allen Zellen eine starke Transkriptionsaktivierung aufweist.

Um die Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze bestimmen und vergleichen zu können, wurde eine Kotransfektion mit einem Kontrollvektor, der das Gen für die *Renilla*-Luciferase trägt, durchgeführt. Die Auswertung der Kotransfektions-experimente wurde mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Fa. Promega) durchgeführt.

### **2.3.4.1 Dual-Luciferase Reporter Assay System**

Das Prinzip dieser Nachweismethode beruht auf einer simultanen Expression und Messung unterschiedlicher Reporter-gene. Beide Vektoren tragen die *Luciferase*-Gene verschiedener Spezies, die bei der Zugabe spezifischer Substrate Licht freisetzen. Diese Lichtemission kann von einem Luminometer detektiert werden.

Die *Firefly*-Luciferase katalysiert eine ATP-abhängige, oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Freisetzung von Licht der Wellenlänge 562 nm. Die Lumineszenzreaktion der *Renilla*-Luciferase findet ebenfalls durch eine oxidative Decarboxylierung von Coelenterazin unter Freisetzung von Licht statt.

Alle Arbeiten mit diesem System wurden nach Anleitung des Herstellers des „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) durchgeführt.

## **2.4 Proteinbiochemische und immunologische Methoden**

### **2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht aufgrund spezifischer Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und seinem Antigen eine subzelluläre Lokalisation von Proteinen.

Nach der Aussaat von  $1,5 \times 10^5$  Zellen auf einem mit einer Kulturkammer versehenen Objektträger (Fläche:  $A = 10 \text{ cm}^2$ ), erfolgte entweder eine transiente Transfektion der Zellen mit den verschiedenen cDNA-Konstrukten oder es wurden bereits Zellen kultiviert, die das cDNA-Konstrukt stabil ins Genom integriert hatten.

Die Kulturdauer betrug 24 h. Anschließend wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Kammeraufsatz entfernt und die Objektträger in PBS inkubiert, um die Zellen zu waschen. Da es sich bei lebenden Zellen um dynamische Strukturen handelt, mußten diese so fixiert werden, dass eine möglichst authentische zelluläre sowie subzelluläre Struktur erhalten blieb. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 2,5 % Paraformaldehyd / PBS (frisch ansetzen!) 15 min bei RT. Anschließend fand eine Permeabilisierung der Zellen 5 min bei RT in 0,2 % Triton-100 / PBS statt. Um unspezifische Antikörper Wechselwirkungen zu verhindern, wurden pro Objektträger 70 µl PBS / 0,5 % Tween-20 mit 10 % BSA aufgetropft, diese mit einem Deckglas versehen, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern, und 30 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Objektträger 3 x jeweils 5 min mit PBS / 0,5 % Tween-20 gewaschen.

Um eine hohe Spezifität und Sensitivität zu erzielen, wurde zunächst ein spezifischer, nicht markierter primärer Antikörper zur subzellulären Detektion des exogenen TWIST-Proteins in der Zelle eingesetzt: 70 µl des monoklonale Antikörpers (1:500 verdünnt in PBS / 0,5 % Tween-20 mit 1,5 % BSA) wurden pro Objektträger aufgetropft und nach dem Abdecken mit einem Deckglas, 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Durch 3 x Waschen mit PBS / 0,5 % Tween-20 sollte überschüssiger Antikörper entfernt werden.

Zur Detektion des anti-human-c-myc-Antikörpers wurde ein mit „Texas Red“ gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörpers verwendet: Die Zellen wurden mit 70 µl des „Texas-Red“ gekoppelten Antikörpers (1:1000 in PBS / 0,5 % Tween-20 mit 1,5 % BSA) unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Dieser Inkubation schloss sich ein weiterer Waschschrift an.

Das Cytoskelett der Zellen wurde mit einem Alexa Fluor 488 gekoppelten Phalloidin angefärbt. Phalloidine sind aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* isolierte Toxine, die an F-Actin des Zytoskletts binden.

Pro Objektträger wurden 5 µl der 6,6 µM Stocklösung in 200 µl PBS / 1 % BSA verdünnt und vollständig aufgetropft. Mit einem Deckglas versehen, wurden diese 20 min bei RT unter Lichtabschluss inkubiert. Nachfolgend wurden die Objektträger kurz in PBS gewaschen.

Direkt im Anschluss erfolgte eine 3 min lange Gegenfärbung der Zellkerne mit dem Fluorochrom DAPI. Nach kurzem Waschen mit A. dest. wurden die Objektträger ca. 10 min getrocknet. Das Eindecken der Objektträger wurde mit „VECTASHIELD

Mounting Medium“ (Fa. Vysis) durchgeführt. Die anschließend mit einem Deckglas versehenen Objektträger (luftblasenfrei auflegen!) mußten mindestens 1 h bei 4°C gelagert werden, um das Eindeckmittel erhärten zu lassen.

Die mikroskopische Auswertung der Objektträger wurde mit einem Axiophot Epifluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Die Bilddokumentation erfolgte mit Hilfe des ISIS (In Situ Imaging System)-Programms von Meta Systems.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung und Charakterisierung der humanen *TWIST* homologen Region beim japanischen Kugelfisch *Fugu rubripes rubripes*

Die große evolutionäre Distanz zwischen *Fugu* und dem Menschen - der gemeinsame Ursprung liegt ca. 450 Millionen Jahre zurück - macht den japanischen Kugelfisch innerhalb der Vertebraten zu einem interessanten Modellorganismus. Das Genom des *Fugu* weist nahezu die gleiche Anzahl von Genen auf, wie das des Menschen, wobei die Größe des Genoms des *Fugu* nur einem Siebtel des humanen Genoms entspricht. Diese Komprimierung resultiert aus stark verkürzten inter- und intragenischen Abständen. Für eine Reihe von Genregionen konnte gezeigt werden, dass die Abfolge der Gene (Syntanie) beim *Fugu* der des Menschen entspricht (siehe Review: Elgar et al., 1996)

Ein Vergleich zwischen den genomischen Sequenzen der *Twist*-Region des japanischen Kugelfisches *Fugu* und des Menschen sollte Aufschluss über die genomische Organisation der menschlichen chromosomalen Region 7p21 liefern. Es sollten benachbarte Gene und konservierte Sequenzabschnitte, die als mögliche regulatorische Elemente für die transkriptionelle Regulation von *TWIST* in Frage kommen, identifiziert werden.

Für diese Analyse sollte ein genomischer Klon des *Fugu*, der das *Twist*-Gen repräsentiert, identifiziert und durch Sequenzvergleiche charakterisiert werden.

##### 3.1.1 Isolierung eines genomischen Klons, der die *Twist*-Region des japanischen Kugelfisches *Fugu* repräsentiert

Um einen genomischen Klon, der das *Twist*-Homologe repräsentiert, aus einer Genbibliothek von *Fugu* zu isolieren, wurde eine *Fugu*-Cosmidbibliothek (RZPD Nr. 66) mit einem murinen 1485 bp großen *Twist*-cDNA-Fragment (Acc. Nr.: NM\_011658) als Sonde durchsucht. Dieses Fragment repräsentiert neben dem codierenden Bereich auch 5'- und 3'- Sequenzabschnitte des *Twist*-Gens.

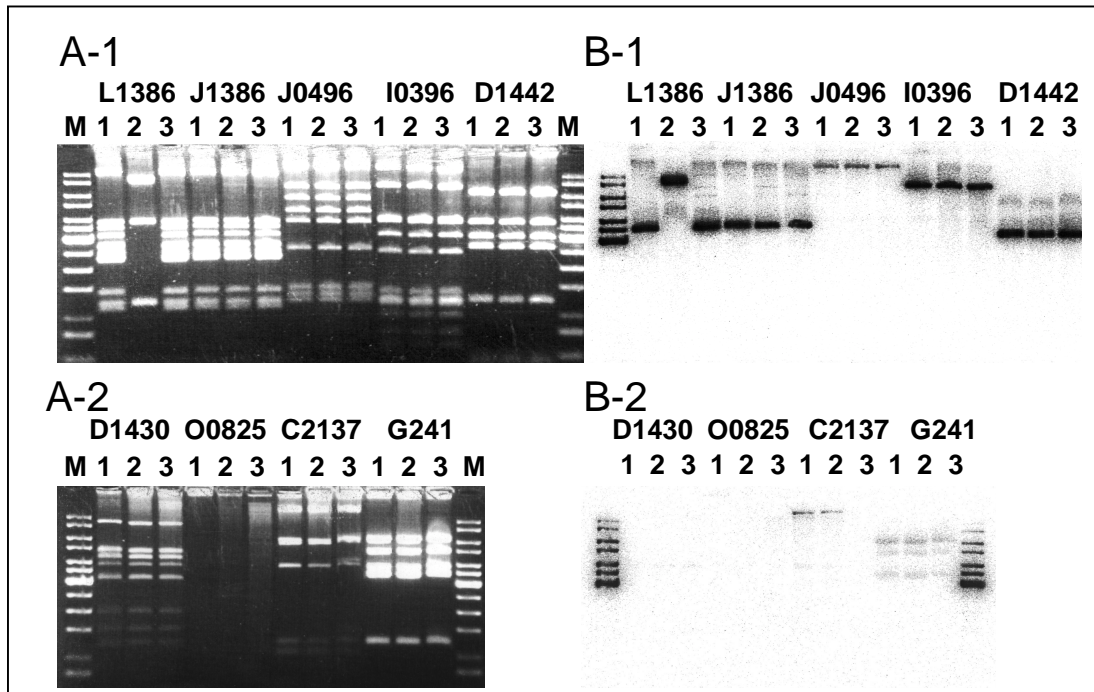
Nach Auswertung der Hybridisierung konnten 9 Cosmid-Klone identifiziert werden (Tab. 3-1). Die im Anschluss isolierte Plasmid-DNA wurde mit der

Restriktionsendonuklease *EcoRI* gespalten, die Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Nach Hybridisierung mit einem humanen 1396 bp großen *TWIST*-cDNA-Fragment (Acc. Nr.: NM\_000474) als Sonde zeigten fünf Cosmid-Klone (L1386, J1386, J0496, I0396 und D1442) ein positives Signal (Abb. 3-1).

**Tabelle 3-1: Identifizierte genomische Klone der *Fugu*-Cosmid-Bank RZPD, Nr. 66**

Klonbezeichnung	RZPD-Bezeichnung	Vektor
C2137	ICRFc66C2137	Lawrist 4
D1430	ICRFc66D1430	Lawrist 4
<b>D1442</b>	<b>ICRFc66D1442</b>	<b>Lawrist 4</b>
G241	ICRFc66G241	Lawrist 4
I0396	ICRFc66I0396	Lawrist 4
J0496	ICRFc66J0496	Lawrist 4
J1386	ICRFc66J1386	Lawrist 4
L1386	ICRFc66L1386	Lawrist 4
O0825	ICRFc66O0825	Lawrist 4

Zur weiteren Analyse wurden die identifizierten *EcoRI*-DNA-Fragmente der *Fugu*-Cosmid-Klone in den Klonierungsvektor pB-II-KS (+) (Stratagene) inseriert. Die Sequenzanalyse ergab nur für das 3 kb *EcoRI*-DNA-Fragment des Cosmids D1442 einen offenen Leserahmen (ORF), der eine Länge von 552 bp aufwies. Eine Datenbankanalyse (BLASTN, NCBI) zeigte, dass dieser offene Leserahmen (ORF) Sequenzhomologien zum humanen *TWIST*-Gen (Acc. Nr.: NM\_000474) und *DERMO-1*-Gen (Acc. Nr. NM\_057179), das dem humanen *TWIST*-Gen strukturell sehr ähnlich ist, aufweist. Die Datenbankanalyse mit diesem ORF ergab eine Sequenzhomologie von 80 % für das humane *TWIST*-Gen, die sich auf die Nukleotide 249-537 des offenen Leserahmens des 3 kb *EcoRI*-Subklons des *Fugu* beziehen.



**Abbildung 3-1:** Hybridisierung mit einem *H-TWIST*-cDNA-Fragment auf DNA von *Fugu* Cosmid-Klonen nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI*

(A) Elektrophoretische Auftrennung der DNA der *Fugu* Cosmid-Klone L1386, J1386, J0496, I0396, D1442 (A-1) und D1430, O0825, C2137, G241 (A-2) nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* (Es wurden jeweils drei Klone analysiert). Jeweils 1 µg der gespaltenen *Fugu* Cosmid-DNA wurden in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt. Als Größenstandard (M) wurde ein „1 kb-Ladder“ (Gibco-BRL) eingesetzt. Der Klon L1386-2 zeigte abweichende DNA-Fragmente im Vergleich zu den Klonen L1386-1 und L1386-3 und wurde deshalb für die weitere Auswertung nicht mit einbezogen.

(B) Hybridisierung mit einem 1396 bp *H-TWIST* cDNA-Fragment als Probe auf die DNA-Fragmente aus (A), die auf eine Nylonmembran transferiert wurden. Bei fünf *Fugu* Cosmid-Klonen konnten positive Hybridisierungssignale detektiert werden. Die Cosmid-Klone L1386 und J1386 zeigten ein positives Hybridisierungssignal mit einem ca. 5 kb großen *EcoRI*-DNA-Fragment. Beim Cosmid-Klon J0496 konnte ein *EcoRI*-DNA-Fragment, das größer als 10 kb war, detektiert werden. Die Hybridisierung ergab beim Cosmid-Klon I0396 ein positives Signal mit einer Größe von 8 kb und beim Cosmid-Klon D1442 eines mit einer Größe von 3 kb (B-1). Bei den *Fugu* Cosmid-Klonen D1430, O0825, C2137 und G241 konnte kein Hybridisierungssignal detektiert werden (B-2).

Die Detektion der DNA-Fragmente des „1 kb-Ladder“ (Gibco-BRL) resultiert aus radioaktiv markierten DNA-Fragmenten des Vektors pB-II-KS (+) (Stratagene).

Die Homologie des ORF zum humanen *DERMO-1*-Gen beträgt ebenfalls 80 %. Hierbei bezieht sich die Homologie auf die Nukleotide 244-537 der generierten *Fugu*-Sequenz. Eine Datenbankanalyse mit dem Programm BLASTX (NCBI), das den offenen Leserahmen in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt, zeigte ebenfalls eine Homologie zu den humanen Proteinen *DERMO-1* und *TWIST* auf. Hierbei konnte jeweils eine Sequenzhomologie von 83 % auf einer Länge von 100 Aminosäuren (Pos. 60-159 der *Fugu*-Aminosäuresequenz) gezeigt werden. Da anhand dieser Datenbankanalysen keine eindeutige Homologie gezeigt werden

konnte, wurde für eine genauere Analyse der ORF (*Fugu*) mit der gesamten codierenden Region des *H-TWIST*-Gens und des *H-DERMO-1*-Gens verglichen.

Dieser Vergleich ergab eine Sequenzhomologie auf Nukleinsäureebene von 68 % zu dem codierenden Bereich des humanen *TWIST*-Gens, der 609 bp umfasst und eine Nukleotidsequenzhomologie von 61 % zu *DERMO-1*, dessen codierender Bereich 483 bp umfasst (Abb. 3-2A). Der offene Leserahmen des *Fugu* Cosmid-Klons D1442 von 552 bp codiert für ein mögliches Protein mit 183 Aminosäuren, das eine Homologie von 68 % zum humanen *TWIST*-Protein (202 AS) sowie eine Homologie von 61 % zu *DERMO-1* (160 AS) aufweist (Abb. 3-2B). Anhand dieser Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem vorliegenden offenen Leserahmen um das Homologe zum humanen *TWIST*-Gen handelt.



### 3.1.1.1 Sequenzanalyse der genomischen *Twist*-Region von *Fugu*

Die vergleichende Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz hat gezeigt, dass der identifizierte *Fugu* Cosmid-Klon D1442 das Homologe zum menschlichen *TWIST*-Gen enthält.

Die Sequenzanalyse des Cosmid-Klons D1442 ergab für das inserierte DNA-Fragment eine Größe von 13 kb. Um eine umfassendere Untersuchung des homologen Bereichs des menschlichen Chromosoms 7p21 durchzuführen, mussten weitere genomische Klone identifiziert werden. Diese Klone sollten möglichst mit den Endfragmenten der Insert-DNA des Cosmid-Klons D1442 überlappen, um den genomischen Bereich in der 5'- bzw. 3'- Region des *Twist*-Gens für die nachfolgenden Analysen zu erweitern.

Hierzu wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden („fugu-tw 2F/R“ und „fugu-tw 3F/R“), die im 3'-Ende bzw. im 5'-Ende des Inserts des Cosmid-Klons D1442 hybridisieren, PCR-Produkte generiert, diese mittels „Random Priming“ markiert und für Hybridisierungsexperimente eingesetzt. Die Hybridisierung ergab 20 positive *Fugu* Cosmid-Klone. Diese Klone wurden durch eine weitere PCR-Reaktion mit den oben beschriebenen Oligonukleotiden erneut analysiert.

Mit dem PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden „fugu-tw 2F/R“ generiert wurde, konnte das Cosmid J0836 (RZPD, ICRFc66J0836), welches den genomischen 3'-Bereich von *Twist* enthält, identifiziert werden. Für den 5'-Bereich konnte auf diese Weise kein weiterer genomischer Klon identifiziert werden.

Mit Hilfe der Oligonukleotide „fugu-tw 3F/R“ wurde zusätzlich eine PAC-PCR-Genbibliothek (RZPD, FF PAC Nr. 707) getestet. Durch PCR mit den Oligonukleotiden „fugu-tw 3f/r“ wurden drei positive Klone identifiziert. Die PAC-Klone H1667 (RZPD, MPMGP707H1667), F21109 (RZPD, MPMGP707F21109) und F13112 (RZPD, MPMGP707F13112) repräsentieren alle den genomischen 5'-Bereich des *Fugu Twist*-Gens. Mit Hilfe der Sequenzinformation der identifizierten Klone konnte eine physikalische Karte erstellt werden (Abb. 3-3).

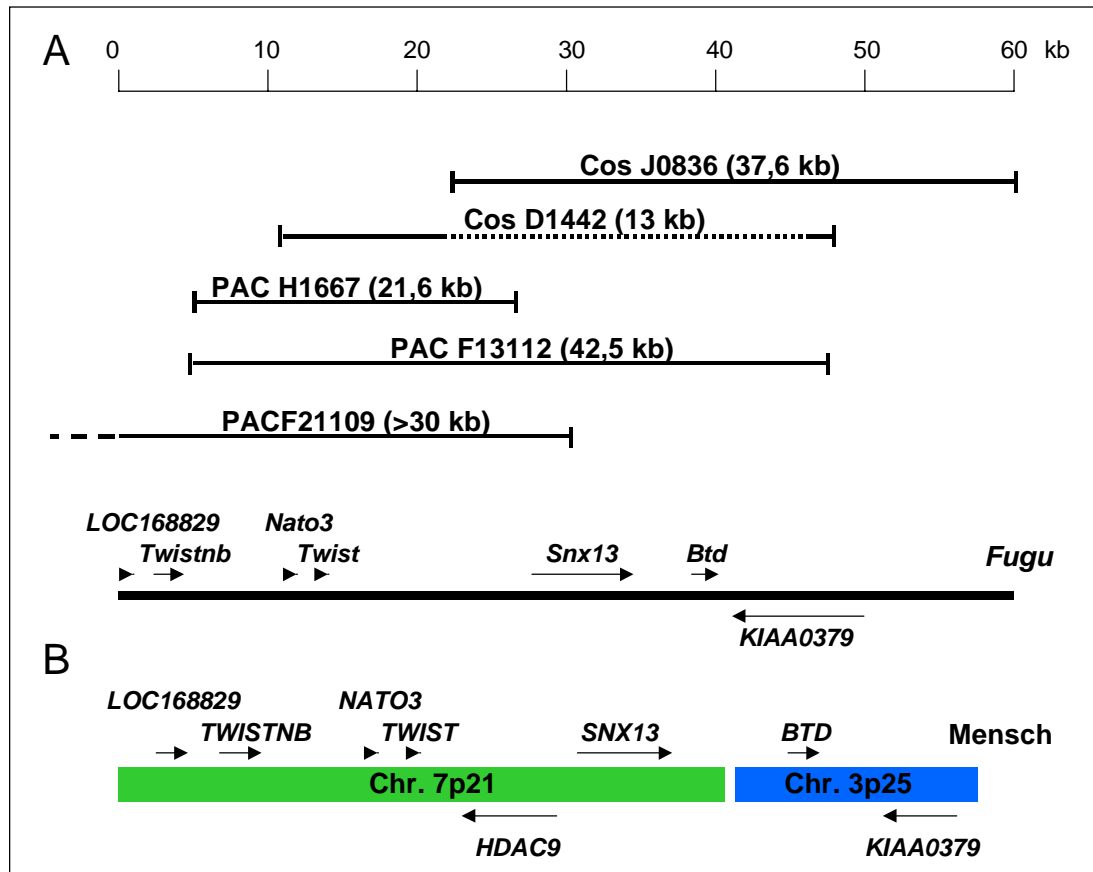
### 3.1.2 Charakterisierung der genomischen *Fugu-Twist*-Region

Durch die Sequenzierung des *Fugu*-PAC-Klons F21109 und des *Fugu*-Cosmid-Klons J0836 konnten insgesamt 60 kb aus der genomischen *Twist*-Region des *Fugu* charakterisiert werden.

Durch Sequenzvergleich dieser Region mit der menschlichen genomischen Sequenz von Chromosom 7p21 sollte überprüft werden, inwiefern diese beiden genomischen Bereiche zwischen den beiden Spezies konserviert sind. Hierzu sollten mit Hilfe von Datenbankanalysen mögliche *Fugu*-Gene identifiziert und mit den Genen aus der menschlichen *TWIST*-Region verglichen werden.

### **3.1.2.1 Identifizierung benachbarter Transkripte der *Fugu Twist*-Region mit Hilfe von Datenbankanalysen**

Die 60 kb große genomische Sequenz des *Fugu* wurde mittels Datenbankanalyse auf offene Leserahmen und die daraus resultierenden Genen untersucht. Diese Analyse wurde mit Hilfe der NIX-Datenbank (HGMP, UK) durchgeführt. Es konnten neben *F-Twist* drei weitere bekannte Gene identifiziert werden, die ebenfalls beim Menschen beschrieben worden sind (Abb. 3-3). Im 5'-Bereich von *Twist* konnte im Abstand von 1,6 kb das homologe Gen zum humanen *Nephew of Atonal 3 (NATO3)* identifiziert werden. Im 3'-Bereich von *Twist* wurden zwei weitere Gene charakterisiert. Mit einem Abstand von 10,7 kb konnte das Homologe zum humanen *Sorting Nexin 13 (SNX13)* und mit einem Abstand von 24,2 kb zu *Twist* das homologe Gen zur *Biotinidase (BTD)* ermittelt werden. Alle diese Gene befinden sich in der gleichen Orientierung wie das *Twist*-Gen. Neben diesen bekannten Genen konnten drei weitere Transkripteinheiten identifiziert werden, wobei zwei im 5'-Bereich auftreten und eines im 3'-Bereich von *Twist* lokalisiert ist. Im 5'-Bereich von *Twist* befinden sich das Homologe zum humanen *LOC221830*-Gen, das im folgenden als *TWISTNB* bezeichnet wird (siehe Kap. 3.3), sowie das Homologe zum humanen *LOC168829*-Gen; für dieses Gen konnte bei *Fugu* nicht der gesamte offene Leserahmen identifiziert werden. Die analysierte *Fugu*-Sequenz repräsentiert nur die drei terminalen Exons des *LOC168829*-Gens. Im 3'-Bereich konnte das *KIAA0379*-Gen, das als einziges dieser Gene in entgegengesetzter Richtung orientiert ist, identifiziert werden.



**Abbildung 3-3: Vergleich der durch Sequenzanalyse identifizierten Gene bei *Fugu* mit der chromosomalen Lokalisation der homologen Gene beim Menschen**

(A) Lage und Orientierung der Gene des *Fugu* innerhalb der analysierten genomischen Strecke von 60 kb. Darstellung der Lage der identifizierten genomischen *Fugu*-Klone. Cosmid-Klon D1442 weist ein genomisches Rearrangement auf (gepunktete Linie). Der PAC-Klon F21109 zeigt zusätzliche Sequenzinformationen, die nicht analysiert wurden (gestrichelte Linie).  
 (B) Abfolge und Orientierung der Gene in der chromosomalen Region 7p21 und 3p25 des Menschen.

Vergleicht man die Abfolge der Transkripteneinheiten beim *Fugu* mit der Anordnung der Gene auf dem entsprechenden menschlichen Chromosom, so zeigt sich, dass die Gene *LOC168829*, *TWISTNB*, *NATO3*, *TWIST* und *SNX13* in der chromosomalen Region 7p21 in unmittelbarer Nachbarschaft und gleicher Orientierung vorliegen. Das *BTD*- und das *KIAA0379*-Gen befinden sich in gleicher Orientierung wie beim *Fugu* und in direkter Nachbarschaft auf Chromosom 3p25. Die Lage und die Orientierung der Gene im Vergleich mit der Anordnung beim Menschen sind in Abbildung 3-3 schematisch dargestellt. Der Vergleich der *Fugu* Sequenz mit der menschlichen chromosomalen Region 7p21 zeigt bei der humanen Sequenz ein zusätzliches Gen, die *Histon Deacetylase 9 (HDAC9)*, die zwischen dem *TWIST*-



Gen und dem *SNX13*-Gen lokalisiert ist, nicht aber bei *Fugu* identifiziert werden konnte.

Für alle untersuchten Gene konnten bei *Fugu* stark verkürzte intergenische Abstände festgestellt werden (Tab. 3-3). Die Komprimierung der Abstände zwischen den einzelnen Genen variiert sehr stark. So ist z.B. der intergenische Abstand zwischen dem *LOC168829*-Gen und dem *Twistnb*-Gen um den Faktor 9 kürzer als der Abstand beim Menschen, wohingegen der Abstand zwischen *Twistnb* und *Nato3* um den Faktor 83 verkürzt ist. Diese starke Verkürzung der intergenischen Abstände ist auf den hohen Anteil an repetitiven DNA-Elementen zwischen dem humanen *TWISTNB*-Gen und dem *NATO3*-Gen zurückzuführen. Der große Unterschied im genomischen Abstand zwischen *Twist* und *Sorting Nexin 13* kann, neben dem ebenfalls hohen Anteil an repetitiven Sequenzen beim Menschen, auf das Fehlen des *HDAC9*-Gens, dessen transkribierte Region sich beim Menschen über eine etwa 458 kb große genomische Region erstreckt, erklärt werden.

**Tabelle 3-3: Intergenische Abstände von *Fugu* und Mensch**

	<i>Fugu rubripes</i>	<i>Homo sapiens</i>	Verhältnis
<i>LOC168829-Twistnb</i>	1,4 kb	13 kb	1:9
<i>Twistnb-Nato3</i>	6,6 kb	550 kb	1:83
<i>Nato3-Twist</i>	1,6 kb	29 kb	1:18
<i>Twist-Snx13</i>	12,8 kb	1322 kb	1:103
<i>Btd-KIAA0379</i>	11 kb	65 kb	1:6

Vergleich der intergenischen Abstände der jeweiligen *Fugu* Gene mit den intergenischen Abständen der menschlichen Gene, die auf dem entsprechenden menschlichen Chromosom in gleicher Orientierung lokalisiert sind.

Neben stark verkürzten intergenischen Abständen konnte durch den Sequenzvergleich ebenfalls eine starke Verkürzung der intragenischen Abstände festgestellt werden.

In Tabelle 3-4 sind die einzelnen Gene, ihre Homologen bei Mensch und Maus, der Sequenzvergleich der jeweiligen genomischen Strecke sowie die Aminosäuresequenzhomologien aufgeführt.

Der Vergleich der chromosomalen Anordnung zwischen Mensch und Maus ergab, dass sich die jeweiligen homologen Gene in gleicher Abfolge in den entsprechenden

chromosomalen Regionen befinden. Die homologen Gene des humanen Chromosoms 7p21 befinden sich in einem entsprechenden „Gencluster“ auf Chromosom 12 der Maus. Die putativen homologen Gene der *Biotinidase* und des *KIAA0379*-Gens, die beim Menschen auf Chromosom 3p35 lokalisiert sind, sind auf dem Maus-Chromosom 14 in gleicher Reihenfolge und Orientierung vorzufinden.

### **3.1.2.2 Vergleich der genomischen Struktur der identifizierten Gene bei Mensch und *Fugu***

Die *Twist*-Region des japanischen Kugelfisches zeigt bezüglich der Abfolge und der Orientierung der einzelnen Gene im Vergleich zur homologen Region auf Chromosom 7p21 des Menschen zum Teil eine konservierte Syntanie. Wie in Tabelle 3-4 zu sehen ist, sind die genomischen Strecken der *Fugu*-Gene im Vergleich zu den humanen bzw. den murinen Genen stark komprimiert.

Der Vergleich der einzelnen Gene zwischen *Fugu* und Mensch anhand ihrer genomischen Struktur zeigt, dass viele Exons eine identische Größe aufweisen. Die Größen der Introns sind bei *Fugu* aber meist stark verkürzt. Nur für das Intron 6 des *Snx13*-Gens konnte beim Menschen ein um 35 Basenpaare verkürztes Intron im Vergleich zum entsprechenden Intron beim *Fugu Snx13*-Gen identifiziert werden.

Die Exon- und Intron-Größen der humanen Gene von Chromosom 7p21 sind in Tabelle 3-5 und die humanen Gene von Chromosom 3p25 in Tabelle 3-6 mit den Exon- und Intron-Größen von *Fugu* verglichen. Das *Twistnb*-Gen zeigt die gleiche Anzahl von Exons, wobei Exon 1 und Exon 4 in der Größe variieren. Die Gene *Snx13* und *KIAA0379* zeigen beim *Fugu* eine geringere Anzahl von Exons, wobei die Intronphase bei fast allen Spleißstellen identisch ist; lediglich zwischen Exon 22 und 23 des *Snx13*-Gens zeigt sich eine Verschiebung der Intronphase um eine Base. Das Gen für die *Biotinidase (Btd)* zeigt als einziges dieser Gene bei *Fugu* eine größere Anzahl an Exons auf als beim Menschen.

Tabelle 3-4: Vergleich der identifizierten *Fugu*-Transkripteinheiten

Gen	Genomische Strecke (kb)		Anzahl der Aminosäuren		Aminosäure-identität (%)		Chrom. Lokalisation		Acc. Nr.	
	<i>Fugu</i>	Mensch Maus	<i>Fugu</i>	Mensch Maus	F/H	F/M	Mensch Maus	Mensch Maus	Mensch	Maus
<i>LOC168829</i>	>3,3	132	> 108	280	70		7p21		XM_108146	
<i>Twistmb</i>	2,0	10,8	348	338	34	35	7p21	12	XM_166508	AK010829
<i>Nato3</i>	0,5	0,5	151	166	40	42	7p21	12	AF369897	NM_033522
<i>TWIST</i>	0,5	1,9	183	202	68	69	7p21	12	NM_000474	NM_011658
<i>Snx13</i>	10,7	147	979	957	76	75	7p21	12	NM_015132	*ENSMUSG0000020590
<i>Btd</i>	2,4	10,8	504	543	42	43	3p25	14	NM_000060	NM_025295
<i>KIAA0379</i>	7,7	>192	1179	>1059	43	34	3p25	14	AB002377	*ENSMUSG0000014496

Vergleich der genomischen Strecke und der vorhergesagten Aminosäuresequenz zwischen *Fugu*, Mensch und Maus, sowie die Aminosäureidentität zwischen *Fugu* und Mensch (F/H), *Fugu* und Maus (F/M) sowie Mensch und Maus (H/M) Die Aminosäureidentität für das *LOC168829*-Gen bezieht sich nur auf den charakterisierten Bereich des *Fugu*-Gens. Zusätzlich ist noch die chromosomale Lokalisation und die jeweilige Acc. Nr. der RNA-Sequenz von Mensch und Maus angegeben. Die mit "\*" markierten Acc. Nr. sind Ensemble Gen-Identifikationsnummern.

Der Sequenzvergleich der nicht-codierenden Sequenzabschnitte der jeweiligen humanen Gene mit den genomischen *Fugu*-Sequenzen ergab keine signifikante Sequenzhomologie für die 5'- und 3'- untranslatierten Bereiche. Die humanen Gene *TWIST*, *SNX13* und *KIAA0379* weisen beim Menschen ein terminales Exon auf, das keine codierenden Sequenzinformationen mehr enthält. Für diese Exons konnten bei *Fugu* keine homologen Sequenzabschnitte identifiziert werden.

**Tabelle 3-5: Vergleich der Exon- und Intron-Größen der Gene *Twistnb*, *Nato3*, *Twist* und *Snx13* zwischen Mensch und *Fugu***

Gene	Exon Nr.	Exongröße		Intron Nr.	Introngröße	
		<i>Fugu</i>	Mensch		<i>Fugu</i>	Mensch
<i>Twistnb</i>	1	251	254	1	360	3842
	2	142	142	2	426	4498
	3	209	209	3	125	1344
	4	445	412			
<i>Nato3</i>	1	456	501	1		
<i>Twist</i>	1	552	606 (651)	1	/	539
	2	/	664*			
<i>Snx13</i>	1	147	12 (193)	1	1126	42837
	2	113	113	2	71	3899
	3	103	103	3	112	1696
	4	90	90	4	864	1061
	5	122	122	5	77	14572
	6	119	122	6	122	87
	7	105	102	7	121	1863
	8	89	89	8	310	5037
	9	84	84	9	77	17442
	10	139	139	10	104	390
	11	89	89	11	165	4652
	12	100	100	12	406	5594
	13	194	194	13	137	4941
	14	105	105	14	104	556
	15	171	133	15	/	4000
	15-1	/	38	15-1	140	3918
	16	70	70	16	415	4340
	17	143	173	17	77	5219
	18	108	108	18	76	1237
	19	111	111	19	92	11253
	20	162	162	20	76	1759
	21	72	72	21	86	2433
	22	162	146	22	34	250
	23	128	69	23	96	1750
	24	113	113	24	113	253
	25	236	248 (570)	25	/	211
26	/	82*				

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die codierende Sequenz inklusive Stopp-Codon. In Klammern sind die Größen der Exons inklusive der untranslatierten Bereiche angegeben. Mit \* sind untranslatierte Exons markiert. Exons mit identischer Größe sind grau unterlegt.

**Tabelle 3-6: Vergleich der Exon- und Intron-Größen der Gene *Btd* und *KIAA0379* zwischen Mensch und *Fugu***

Gen	Exon Nr.	Exongröße (bp)		Intron Nr.	Introngröße (bp)	
		<i>Fugu</i>	Mensch		<i>Fugu</i>	Mensch
<i>Btd</i>	1	210	228 (270)	1	453	6247
	2	150	150	2	61	2263
	3	149	1170 (1503)	3	81	/
	4	178	/	4	262	/
	5	555	/	5	65	/
	6	273	/			
<i>KIAA0379</i>	1	156	>46	1	1044	65138
	2	84	84	2	436	28910
	3	79	79	3	564	14413
	4	71	71	4	252	14516
	5	201	201	5	498	1535
	6	108	88	6	83	10885
	7	105	143	7	628	3254
	7-1	/	213	7-1	/	6258
	8	79	79	8	76	936
	9	115	115	9	124	1304
	10	83	83	10	74	865
	11	64	64	11	83	1474
	12	69	69	12	108	1603
	13	141	141	13	820	111678
	14	95	112	14	162	919
	15	85	27	15	119	374
	15-1	/	75	15-1	/	4518
	15-2	/	202	15-2	/	3709
	15-3	/	88	15-3	/	102
	16	118	118	16	97	556
	17	220	220	17	76	5662
	18	88	88	18	82	91
	19	84	84	19	73	946
	20	149	146	20	457	647
	21	83	83	21	86	423
22	83	83	22	98	984	
23	92	92	23	88	5341	
24	299	287(451)	24	/	1800	
25	/	1067*				

Die angegebenen Werte beziehen sich auf die codierende Sequenz inklusive Stopp-Codon. In Klammern sind die Größen der Exons inklusive der untranslatierten Bereiche angegeben. Mit \* sind untranslatierte Exons markiert. Exons mit identischer Größe sind grau unterlegt. Das 1. Exon des *KIAA0379*-Gens ist mit einem „>“ gekennzeichnet, da der genaue Startpunkt noch nicht identifiziert wurde.

### 3.1.2.3 Chromosomale Lokalisation des *Fugu Twist*-Gens mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Um die chromosomale Lokalisation des *Fugu Twist*-Gens zu bestimmen, wurde eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf Metaphase-Chromosomen von *Fugu* durchgeführt. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Frank Grützner aus der Arbeitsgruppe von Thomas Haaf (MPI, Berlin) durchgeführt.

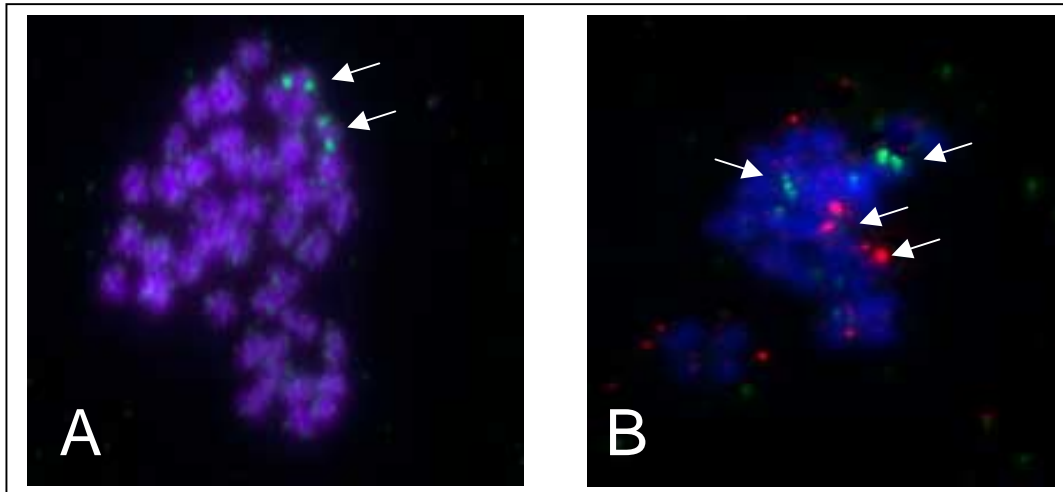
Der diploide Chromosomensatz des *Fugu* besteht aus  $2n=44$  Chromosomen, die morphologisch noch nicht charakterisiert sind. Durch eine Colokalisation mit einem weiteren *Fugu*-Klon, der Gene repräsentiert, deren menschliche Homologe auf Chromosom 7q32 lokalisiert sind, sollte überprüft werden, ob die konservierte Syntanie sich über größere chromosomale Regionen erstreckt.

Für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde der *Fugu*-PAC-Klon F21109, der das Homologe zum humanen *TWIST*-Gen repräsentiert, eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Doppelhybridisierung mit dem *Fugu*-Cosmid O2287 (RZPD, ICRFc66O2287), das die Gencluster von *MEST* und *COPG2* repräsentiert (Brunner et al., 2000), die beim Menschen ebenfalls auf Chromosom 7 (7q32) lokalisiert sind, durchgeführt.

Die DNA der beiden *Fugu*-Klone wurde mit unterschiedlich modifizierten Nukleotiden markiert, um diese durch eine spezifische Nachweisreaktion detektieren zu können. Die DNA des *Fugu*-PAC-Klons F21109 wurde mit Biotin-16-dUTP markiert und mit einem FITC gekoppelten Avidin nachgewiesen. Desweiteren wurde der *Fugu* Cosmid-Klon O2287 mit Digoxigenin-11-dUTP markiert und durch einen Cy3-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen.

Zur eindeutigen Bestimmung der chromosomalen Lokalisation der beiden genomischen Klone des *Fugu* wurden 20 Metaphasen, die jeweils ein Doppelsignal auf beiden Chromosomen zeigten, ausgewertet.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung ergab für beide *Fugu*-Klone klare Hybridisierungssignale auf jeweils zwei *Fugu*-Chromosomen (Abb. 3-4). Da die Hybridisierungssignale sich auf unterschiedlichen Chromosomen befanden, konnte gezeigt werden, dass über diese große genomische Distanz keine konservierte Syntanie zwischen *Fugu* und Mensch besteht.



**Abbildung 3-4: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf *Fugu* Metaphase-Chromosomen**

(A) Chromosomale Lokalisation des *Fugu-Twist*-Gens (grün) mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf mit DAPI gegengefärbten *Fugu*-Metaphase-Chromosomen ( $2n=44$ ). Der PAC F21109 (*Twist*) ergab ein distinktes Signal auf einem der kleinen *Fugu* Chromosomen.

(B) Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit dem *Fugu*-PAC F21109 (*Twist*) (grün) und *Fugu*-Cosmid O2287 (*MEST-COPG2*) (rot). Die Doppelhybridisierung ergab distinkte Signale auf zwei unterschiedlichen Chromosomen. Es konnte keine konservierte Syntänie für diesen chromosomalen Bereich nachgewiesen werden.



## 3.2 TWIST

### 3.2.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der Twist-Proteine

Der offene Leserahmen von 552 bp, des aus der *Fugu*-Cosmidbank isolierten DNA-Fragments, codiert für ein mögliches Protein mit einer Länge von 183 Aminosäuren. Vergleicht man dieses Protein mit Twist-Proteinen verschiedener Spezies, so zeigt sich, dass etwa 65 % der Aminosäuren identisch sind und ungefähr 75 % der Aminosäuren aus der gleichen Gruppe mit ähnlichen Ladungseigenschaften stammen.

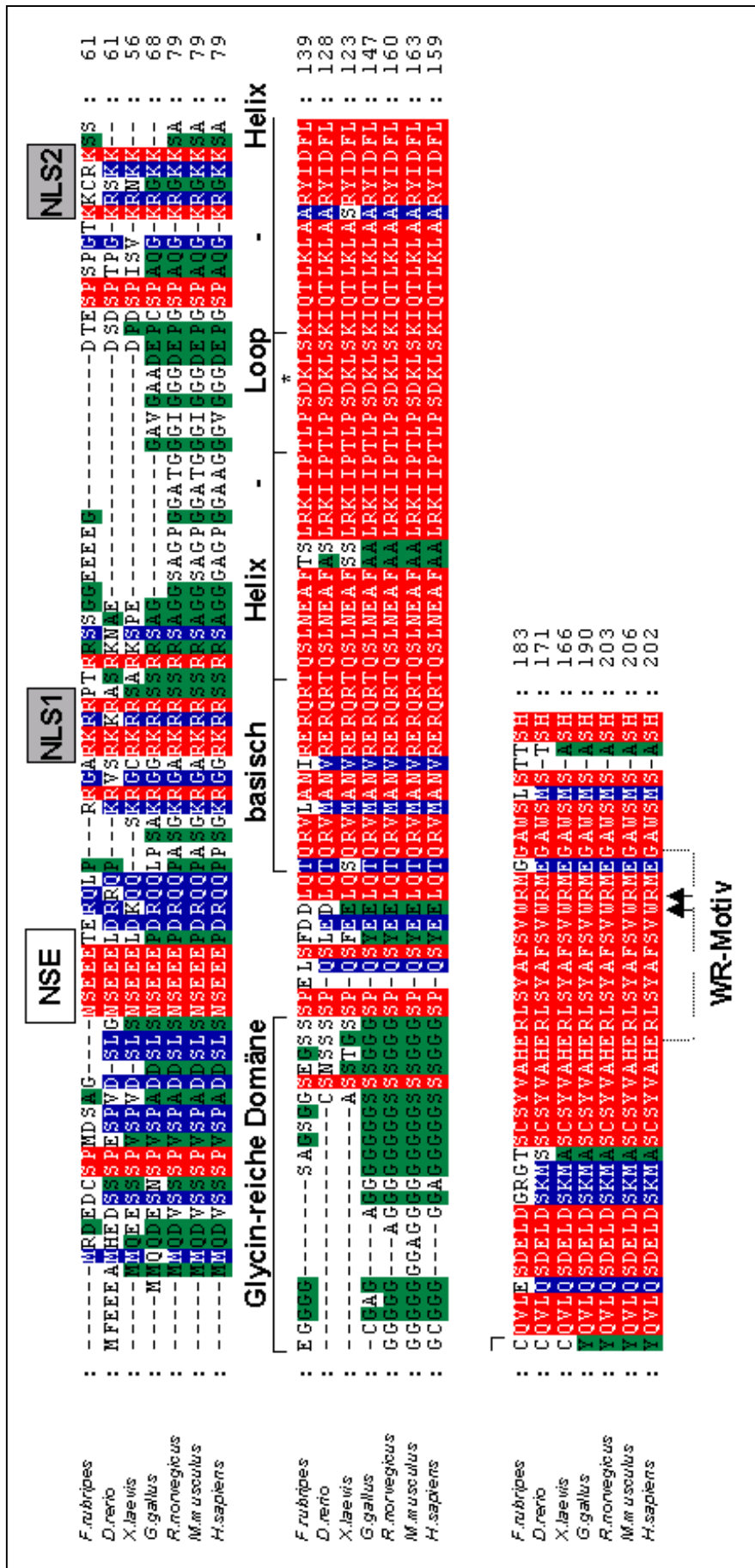
Die Homologie von Twist-Proteinen verschiedener Spezies im Vergleich zu dem Twist-Protein des japanischen Kugelfisches auf Aminosäureebene sind in Tabelle 3-7 aufgeführt.

**Tabelle 3-7: Homologie der Aminosäuresequenz der Twist-Proteine der angegebenen Spezies zum Twist-Protein des *Fugu***

	<i>Danio rerio</i> (Twist1)	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Homo sapiens</i>
identisch (AS)	63 %	61 %	65 %	69 %	69 %	68 %
gleiche Gruppe (AS)	76 %	72 %	75 %	80 %	80 %	79 %

Der Sequenzvergleich der Aminosäuren des *Fugu* Twist-Proteins mit den Twist-Proteinen anderer Spezies sollte Aufschluss über mögliche konservierte Domänen geben. Die Proteine der einzelnen Spezies unterscheiden sich zunächst in ihrer Länge. So ist das Twist-Protein des Krallenfrosches mit 166 Aminosäuren das Kürzeste und das Twist-Protein der Maus mit 206 Aminosäuren am längsten (Abb. 3-5).

Anhand des Aminosäuresequenzvergleichs wird deutlich, dass vor allem im C-terminalen Bereich, in dem sich auch die funktionelle bHLH-Domäne des Twist-Proteins befindet, eine sehr hohe Homologie zwischen den einzelnen Spezies vorhanden ist. Ein Vergleich zwischen Mensch, Maus und Huhn ergab für diese Region eine 100 %ige Identität, wohingegen die bHLH-Domänen des humanen und des *Fugu* Twist-Proteins nur zu 90 % identisch sind.



**Abbildung 3-5: Aminosäure-Sequenzvergleich von TWIST unterschiedlicher Spezies**

Aminosäure-Sequenzvergleich der Twist-Proteine von Kugelfisch (*F. rubripes*), Zebrafisch (*D. rerio*), Krallenfrosch (*X. laevis*), Huhn (*G. gallus*), Ratte (*R. norvegicus*), Maus (*M. musculus*) und Mensch (*H. sapiens*) zur Identifizierung konservierter Regionen. Farblich markierte Aminosäuren zeigen den Grad der Konservierung an (rot: bei 6 Spezies, blau: bei 5 Spezies und grün: bei 4 Spezies homolog). Die funktionelle bHLH-Domäne ist durch Klammern gekennzeichnet. NSE-Motiv: 5 stark konservierte Aminosäuren, mit ungeklärter Funktion. NLS1+2: putative Kernlokalisierungssignale. Stern: Position, an der die Loop-Region der Twist-Proteine-Familie um einen Aminosäurerest verkürzt ist (siehe Text). Gestrichelte Klammer: WR-Motiv, dessen namensgebende Aminosäuren mit Pfeilen gekennzeichnet sind. Dieses Motiv ist bis zu den Twist-Proteinen bei Invertebraten hoch konserviert (ohne Abbildung).

Innerhalb des bHLH-Motivs befindet sich eine Region, an der sich Proteine der Twist-Familie und der MyoD-Familie von anderen Proteinen mit bHLH-Domäne unterscheiden. Der Loop der bHLH-Domäne dieser Proteine ist um eine Aminosäure kürzer als der Loop anderer bHLH-Proteine. Da das MyoD-Protein dem Twist-Protein strukturell nicht sehr ähnelt, kann diese verkürzte Loop-Region mit der entsprechenden konservierten Aminosäuresequenz auch als ein Charakteristikum der Twist-Proteine angesehen werden. Diese charakteristische Region ist auch im Twist-Protein des *Fugu* enthalten (Abb. 3-5).

Neben der stark konservierten bHLH-Domäne weist der Bereich C-terminal des bHLH-Motivs ebenfalls ein hohes Maß an Sequenzhomologie auf. In diesem Bereich befindet sich ein weiteres Motiv, das aus 14 Aminosäuren besteht und als WR-Motiv bezeichnet wird. Dieses Motiv ist evolutionär bis zu den Twist-Proteinen der Invertebraten stark konserviert (Spring et al., 2000). Im Bezug auf diese Domäne zeigt das *Fugu* Twist-Protein als einziges eine unterschiedliche Aminosäure an Position 173, hier befindet beim *Fugu* Twist-Protein anstelle einer Glutaminsäure (E) ein Glycin (G).

Sequenzvergleiche, die N-terminal der bHLH-Domäne von Twist-Proteinen verschiedener Spezies durchgeführt wurden, zeigten nur partielle Homologien. Es konnte ein putatives Kernlokalisierungssignal (RKR/KR) (Aminosäure-Pos. 29-33; *Fugu*), das ebenfalls eine starke Konservierung aufzeigt, identifiziert werden. Bei den Twist-Proteinen von Mensch, Maus, Ratte und Huhn konnte noch ein zweites Kernlokalisierungssignal (KRGKK) identifiziert werden. Bei diesem putativen Kernlokalisierungssignal wiesen nur die beiden äußeren Aminosäuren eine 100 %ige Konservierung zum *Fugu* auf (Aminosäure-Pos. 44-49; *Fugu*). Für das mit einer 100 %igen Sequenzhomologie auftretende NSE-Motiv (Aminosäure-Pos. 14-18; *Fugu*), konnte mittels Datenbankanalysen (Prosite) keine Homologie zu bekannten funktionellen Domänen gezeigt werden.

Beim humanen TWIST-Protein befindet sich 9 Aminosäuren N-terminal der basischen Domäne eine Glycin-reiche Region. Der Vergleich mit Twist-Proteinen anderer Vertebraten ergab, dass diese Region nur bei der Maus, der Ratte und beim Huhn vorhanden ist, nicht aber beim Kugelfisch, dem Krallenfrosch und dem Zebrafisch. Durch diesen evolutionären Vergleich konnte gezeigt werden, dass die Glycin-reiche Domäne nur bei höheren Vertebraten konserviert ist.

### 3.2.2 Identifizierung genregulatorischer Sequenzabschnitte

Neben dem offenen Leserahmen spielen definierte Sequenzabschnitte wie Promotor oder Polyadenylierungsstelle, eine wichtige Rolle für die Transkription von Genen. Mit Hilfe von Datenbank-Analysen konnten innerhalb des 3 kb *EcoRI*-DNA-Fragments des *Fugu*-Cosmid-Klons D1442 einige dieser Elemente identifiziert werden.

Datenbankanalysen mit Hilfe der Datenbank TSSW (Transcription Start Site - Wingender database) wiesen auf einen putativen Transkriptionsstart 105 bp stromaufwärts des Translationsstarts mit einer „TATA“-Box hin, die weitere 27 bp in 5'-Richtung lokalisiert ist. Ein Bereich von 534 bp stromaufwärts des möglichen Transkriptionsstarts wurde auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen analysiert. Diese Untersuchungen erfolgten mit dem Computerprogramm „MatInspector professional“ (Quandt et al., 1995). Als Parameter für die Analyse wurde für die „Core-similarity“ der Transkriptionsfaktor-Bindestellen der Faktor „1.0“ ausgewählt, was einer 100%igen Übereinstimmung der „Core“-Sequenz entspricht. Für die „Matrix-similarity“ wurde die Einstellung „Optimized“ ausgewählt, die eine Variabilität für die einzelnen Transkriptionsfaktorbindestellen ermöglicht.

Neben der „TATA“-Box wurde noch eine „CAAT“-Box, eine Bindestelle für „Sp1“, „GFI1“, „NKX-2.5“, „CREB“ und eine für „NF-κB“ identifiziert (Abb. 3-6). Die Bindestellen für diese Faktoren befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum möglichen Transkriptionsstart.

Zusätzlich zu diesen regulatorischen Sequenzelementen konnte im 3'-Bereich des Gens eine mögliche Polyadenylierungsstelle mit der Nukleotidsequenz „AATAAA“ identifiziert werden. Diese Polyadenylierungsstelle befindet sich 609 bp stromabwärts des Stopp-Codons (Abb. 3-6).

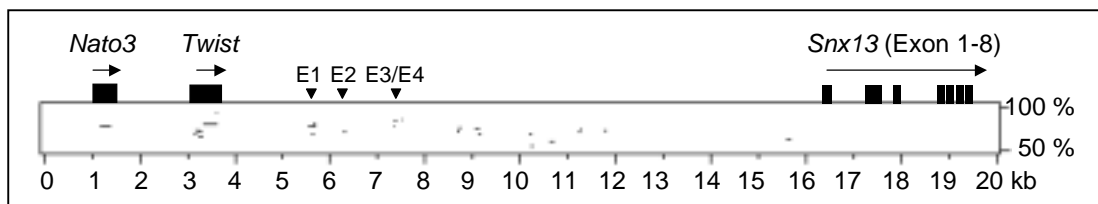


werden (grau unterlegt). Der putative Promotor zeigt eine „CAAT“-Box, sowie Bindestellen für „SP1“ („Stimulating Protein 1“), „GFI1“ („Growth Factor Independence 1 Zinc Finger Protein“), „NKX-2.5“ („Homeo Domain Factor Ncx-2.5“) , „CREB“ („cAMP Response Element Binding Protein“) und „NF-κB“ („Nuclear Factor Kappa B“), deren „Core“-Sequenzen grau unterlegt sind. Die Orientierung der Bindestellen wird durch die Lage der Striche dargestellt. Der Beginn des Translationsstarts ist durch die Aminosäuresequenz, die jeweils unter der zweiten Base des codierenden Triplets angegeben ist, dargestellt. Im 3′-Bereich des Gens, 609 bp stromabwärts des Stopp-Codons, konnte ein putatives Polyadenylierungssignal (Rahmen) identifiziert werden.

Durch den Vergleich der genomischen Sequenzen von *Fugu* mit der menschlichen Sequenzinformation sollten, neben der Identifizierung von Genen in der Region 7p21, auch konservierte DNA-Sequenzabschnitte identifiziert werden, die als mögliche regulatorische DNA-Elemente an der transkriptionellen Regulation von *TWIST* beteiligt sein können. Für diese Analyse wurde der genomische Bereich des *Fugu*, der die nicht-codierenden Sequenzabschnitte des 5′-Bereich und des 3′-Bereich von *F-Twist* repräsentiert und von *Nato3* und *Snx13* begrenzt wird, ausgewählt. Dieser Bereich von 20 kb genomischer Sequenz des *Fugu* wurde mit 400 kb (Acc. Nr. NT\_07819) genomische Sequenz von Chromosom 7p21 verglichen. Die humane DNA-Sequenz repräsentiert 40 kb der 5′-Region und 360 kb der 3′-Region des humanen *TWIST*-Gens. Die Auswahl der humanen Sequenz sollte gewährleisten, dass konservierte DNA-Elemente, die zwischen den flankierenden Genen *NATO3* und *HDAC9* lokalisiert sind, identifiziert werden können. Das *NATO3*-Gen befindet sich 29 kb stromaufwärts des humanen *TWIST*-Gens und das terminale Exon des *HDAC9*-Gens befindet sich etwa 200 kb stromabwärts des *TWIST*-Gens. Ein Vergleich mit der entsprechenden genomischen Mausequenz von Chromosom 12 (Acc Nr. NW\_000050) wurde nicht durchgeführt, da sich in diesem Bereich mehrere, nicht sequenzierte Abschnitte befinden.

Dieser Sequenzvergleich wurde mit dem Programm „PipMaker“ durchgeführt, das zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen auf Homologien überprüft. Hierzu wurde das Programm „Advanced PipMaker“ mit den Einstellungen „Chaining“, „High sensitivity and low time limit“ verwendet. Die Einstellung „Chaining“ gewährleistet, dass nur Sequenzabschnitte, die in gleicher Abfolge vorkommen, miteinander verglichen werden. „High sensitivity and low time limit“ wird für Sequenzen mit größerem evolutionären Abstand eingesetzt, da die Sensivität des Sequenzvergleichs erhöht wird. Der Sequenzvergleich zwischen Mensch und *Fugu* ergab, dass mehrere kurze homologe Sequenzabschnitte sich in der 3′-Region von *Twist* befinden. In

Abbildung 3-7 ist die „PipMaker-Analyse“ der *Fugu-Twist*-flankierenden-Region (20 kb) im Vergleich mit der humanen genomische Sequenz von 400 kb dargestellt. Der Vergleich dieser Sequenzen zwischen Mensch und *Fugu* ergab vier Sequenzabschnitte, die anhand ihrer Basenzusammensetzung und ihrer Sequenzhomologie als mögliche regulatorische Elemente identifiziert werden konnten. Die Länge der identifizierten Elemente variiert von 62 bp bis zu 128 bp. Die Elemente 1-3 zeigen beim Menschen und *Fugu* die gleiche Orientierung. Für das Element-1 konnte eine Sequenzhomologie von 57 % bei einer Gesamtlänge von 78 bp und für das Element-2 65 % auf einer Strecke von 62 bp festgestellt werden. Bei Element-3 betrug die Sequenzhomologie 62 % bei einer Sequenzlänge von 66 bp. Ein weiteres Element (4) mit Sequenzhomologien zwischen *Fugu* und Mensch konnte beim Menschen auf dem Gegenstrang identifiziert werden. Dieses Element weist auf einer Strecke von 128 bp eine Sequenzhomologie von 66 % auf. Durch die Einstellung „High sensitivity and low time limit“ wurden weitere homologe Sequenzabschnitte identifiziert (Abb. 3-7), die aber aufgrund ihrer Länge (<40 bp) und ihrer Basenabfolge - sie enthielten teilweise repetitive Sequenzabschnitte - in die weitere Analyse nicht mit einbezogen wurden.



**Abbildung 3-7: Identifizierung konservierter Sequenzabschnitte zwischen der *F-Twist*-Region (20 kb) und der homologen humanen genomischen Sequenz (400 kb)**

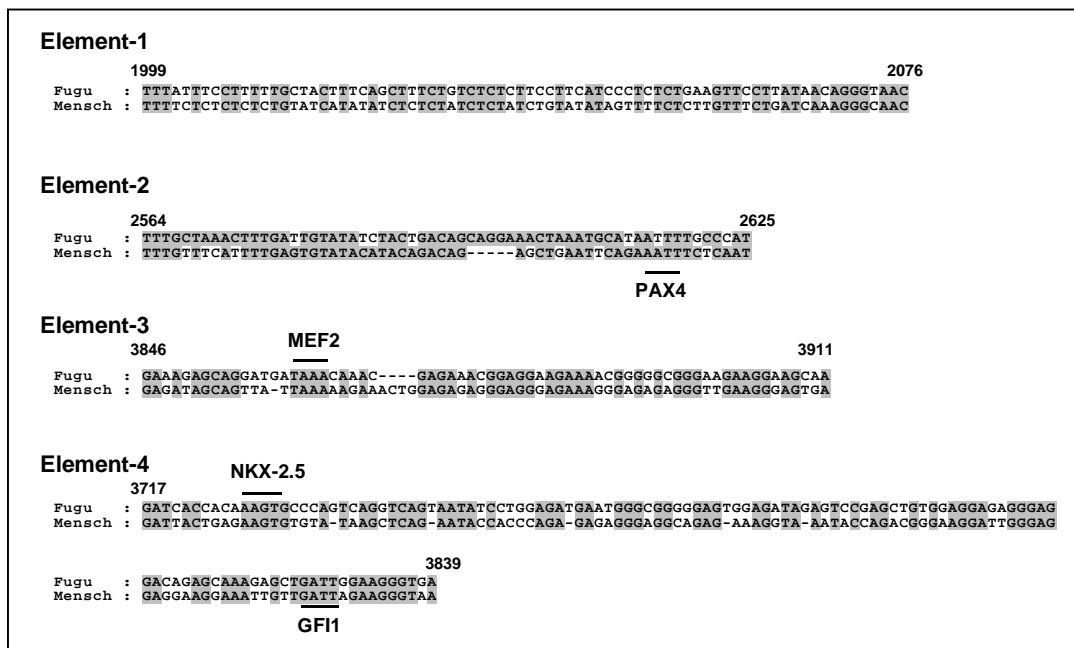
Sequenzvergleich der genomischen Region des *F-Twist*-Gens (20 kb) mit 400 kb humaner genomischer DNA, die das *H-TWIST*-Gen flankiert (30 kb der 5'-Region und 390 kb der 3'-Region). Die 20 kb große genomische *Fugu*-Sequenz enthält neben dem *F-Twist*-Gen auch den codierenden Bereich des *F-Nato3*-Gens und partiell den codierenden Bereich des *F-Snx13*-Gens (Exon 1-8), so dass die nicht-codierenden Regionen zwischen den flankierenden Genen repräsentiert sind (5'-Bereich – *Nato3*; 3'-Bereich – *Snx13*).

Durch Pfeile ist die Lage und Orientierung der jeweiligen *Fugu* Gene *Nato3*, *Twist* und *Snx13* dargestellt (5'- nach 3'-Orientierung). Die schwarzen Kästchen zeigen schematisch die Exons der jeweiligen *Fugu* Gene. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm „Advanced PipMaker“ mit der Einstellung „Chaining“ bzw. „Show all matches“ und „High sensitivity and low time limit“ durchgeführt. Homologe Sequenzabschnitte konnten neben den Genen *Nato3* und *Twist* im 3'-Bereich von *Twist* identifiziert werden. Innerhalb der putativen Promotorregion konnten durch diesen Sequenzvergleich keine homologen Sequenzabschnitte identifiziert werden.

E1-E4 zeigen nicht-codierende Sequenzabschnitte, die zwischen Mensch und *Fugu* konserviert sind. E1-E3 befinden sich bei beiden Spezies in gleicher Orientierung („Sense“), wohingegen E4 beim Menschen auf dem Gegenstrang („Antisense“) identifiziert werden konnte. Die prozentuale Homologie ist durch die Lage der Striche dargestellt.

Durch die Einstellung „High sensitivity and low time limit“ wurden weitere homologe Sequenzabschnitte im 3'-Bereich von *Twist* identifiziert, die aufgrund ihrer Basenzusammensetzung (sie enthielten teilweise kurze repetitive DNA-Sequenzabschnitte) oder ihrer Sequenzlänge (<40 bp) nicht weiter analysiert wurden.

Innerhalb dieser Sequenzabschnitte konnten mit dem Programm „MatInspector professional“ putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen identifiziert werden. Als Parameter für diese Analyse wurde für die „Core-similarity“ der Transkriptionsfaktor-Bindestelle der Faktor „1.0“ ausgewählt, was einer 100 %igen Übereinstimmung der Core-Sequenz entspricht. Für die Matrix-Übereinstimmung wurde die Einstellung „0,85“ ausgewählt. Hierdurch wurde eine Abweichung der Matrix-Sequenz des jeweiligen Transkriptionsfaktors zur analysierten Sequenz ermöglicht. Die einzelnen Sequenz-Elemente sind in Abbildung 3-8 im Vergleich dargestellt. Es konnte in Element-2 eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor „PAX4“, in Element-3 eine „MEF2“-Bindestelle sowie in Element-4 eine Bindestelle für „NKX-2.5“ und „GFI1“ identifiziert werden. Für das Element-1 konnte kein Sequenzabschnitt identifiziert werden, der als Bindestelle für einen bekannten Transkriptionsfaktor dient.



**Abbildung 3-8: Darstellung der zwischen *Fugu* und Mensch konservierten Sequenzabschnitte im 3'-Bereich von *TWIST***

Sequenzvergleich der homologen Sequenzabschnitte, die durch die PipMaker-Analyse (siehe Text) identifiziert wurden. Grau unterlegt sind die identischen Nukleotide der einzelnen Elemente (1-4). Die angegebenen Zahlen zeigen den Abstand der *Fugu* Sequenzen zum Stopp-Codon des *Twist*-Gens. Putative Transkriptionsfaktor-Bindestellen wurden mit dem Programm „MatInspector professional“ identifiziert (Einstellungen siehe Text). Element-3 enthält eine Bindestelle für „PAX4“ („Paired Domain protein“)-, Element-3 eine „MEF-2“ („Myogenic Enhancer Factor 2“)- und Element-4 eine



„NKX-2.5“ („Homeo Domain Factor Nkx-2.5“)- und eine „GFI1“ („Growth Factor Independence 1 Zinc Finger Protein“)-Bindestelle. Die Lage und Orientierung der jeweiligen Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind mit einer Linie gekennzeichnet. Markiert wurde die „Core“-Sequenz des jeweiligen Transkriptionsfaktors.

Der Vergleich der genomischen Abstände dieser Sequenzen bei *Fugu* und beim Mensch ergab eine starke Komprimierung der genomischen Distanzen in der *Fugu*-Sequenz.

In Tabelle 3-8 werden diese Elemente anhand ihrer Sequenzlänge, ihrer Homologie und ihrer genomischen Abstände zusammenfassend dargestellt. Die genomischen Abstände der nicht-codierenden Sequenzabschnitte zum *Twist*-Gen des *Fugu* und des Menschen zeigten eine starke Verkürzung bei *Fugu* - um ca. Faktor 50 - auf. Diese Verkürzung ist auf den hohen Anteil von repetitiver DNA zurückzuführen. Die humane Sequenz dieser Region weist ca. 37 % und die Sequenz des *Fugu* nur ca. 3 % repetitiver DNA-Sequenzabschnitte auf (Repeatmasker, EMBL).

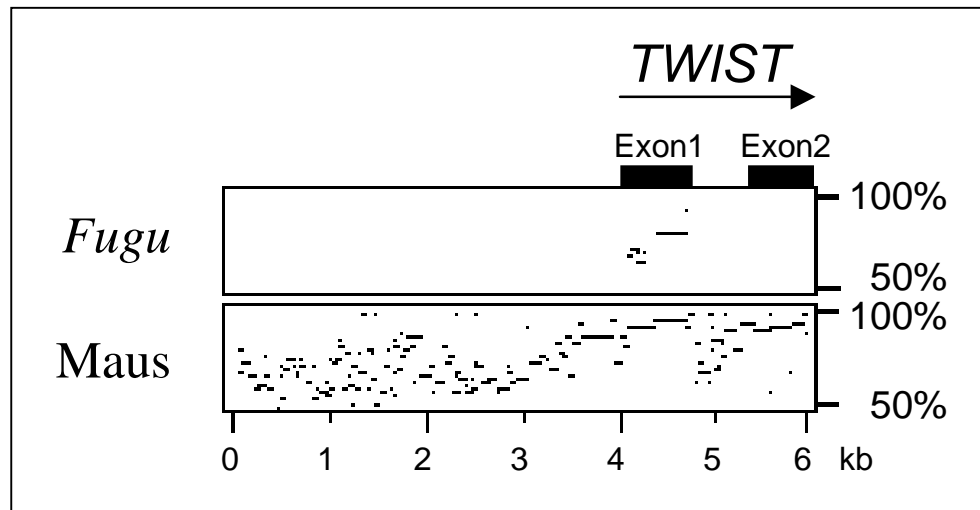
**Tabelle 3-8: Vergleich der genomischen Abstände, Sequenzlängen und Homologien der konservierten Elemente 1-4 zwischen *Fugu* und Mensch**

	Distanz zu <i>Twist</i> in kb		Länge der Elemente in bp	Identität in Prozent	Verhältnis
	<i>Fugu</i>	Mensch			
Element 1	2,0	148,2	78	57	1:74
Element 2	2,6	164,7	62	65	1:64
Element 3	3,8	175,4	66	62	1:45
Element 4	3,7	322,8	128	66	1:86

### 3.2.3 Charakterisierung der humanen *TWIST*-Promotor-Region

Durch die Sequenzierung der *Twist* homologen Region bei *Fugu* sollten auch konservierte DNA-Sequenzabschnitte im 5'-Bereich von *TWIST* identifiziert werden, die als putative, regulatorische Elemente bei der transkriptionellen Regulation von *TWIST* eine Rolle spielen könnten. Dieser Sequenzvergleich wurde mit dem Programm „PipMaker“ durchgeführt. Hierzu wurde das Programm „MultiAlign“ mit den Einstellungen „Chaining“, „High sensitivity and low time limit“ verwendet. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3-9 gezeigt. Der Sequenzvergleich der 5'-Regionen der *Twist*-Gene von Mensch und *Fugu* zeigte in diesem Bereich keine signifikante Sequenzhomologie (Abb. 3-9).

Der Vergleich der 5'-Region des humanen *TWIST*-Gens mit dem entsprechenden Bereich des *Twist*-Gens der Maus zeigten auf einer Strecke von 4 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine sehr starke Sequenzhomologie, so dass durch diesen Vergleich keine Rückschlüsse auf konservierte DNA-Motive, die an der Regulation des *TWIST*-Gens beteiligt sein können, gezogen werden konnten.



**Abbildung 3-9: Nukleotidsequenzvergleich der putativen *Twist*-Promotorregion bei Mensch, *Fugu* und Maus**

Nukleotidsequenzvergleich von 6 kb der genomischen Region von *H-TWIST* mit der entsprechenden Region von *F-Twist* und *M-Twist*. Alle drei Sequenzabschnitte wurden so ausgewählt, dass sie ca. 4 kb stromaufwärts des Translationsstarts repräsentieren. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm „PipMaker“-„MultiAlign“ und den Einstellungen „Chaining“ und „High sensitivity and low time limit“ durchgeführt. Die schwarzen Kästchen repräsentieren die beiden Exons des *H-TWIST*-Gens. Die Orientierung ist durch den Pfeil gekennzeichnet (5'- nach 3'-Orientierung). Der Sequenzvergleich zeigte, dass zwischen Mensch und *Fugu* lediglich Bereiche des 1. Exons, das den kompletten codierenden Bereich repräsentiert, konserviert sind. Für das 2. Exon, das Intron und den putativen Promotorbereich konnte keine signifikante Sequenzhomologie gezeigt werden. Der Sequenzvergleich zwischen Mensch und Maus zeigte eine sehr starke Homologie für die beiden Exons. Das Intron und der Promotorbereich weisen mehrere kurze Sequenzabschnitte auf, die ebenfalls stark konserviert sind. Die prozentuale Sequenzhomologie ist durch die Lage der Striche dargestellt.

Anhand dieser Nukleotidsequenzvergleiche konnten keine DNA-Sequenzmotive innerhalb der putativen Promotorregion identifiziert werden, die Rückschlüsse auf funktionelle, konservierte Regionen zulassen.

Um den potentiellen Promotor des humanen *TWIST*-Gens auf funktionelle Sequenzabschnitte zu untersuchen, wurden unterschiedliche Bereiche der potentiellen Promotorregion in ein Expressionsvektorsystem (pGL3-Basic, Promega) inseriert und auf ihre *cis*-aktivierende Wirkung im zellulären System untersucht.

Durch die Untersuchungen von Wang und Mitarbeitern (1997) konnte der Transkriptionsstart des humanen *TWIST*-Gens bestimmt werden. Dieser befindet sich 317 bp stromaufwärts des Translationsstarts. Mit Hilfe dieser Information konnte der

potentielle Promotor eingegrenzt werden, da die meisten Promotoren sogenannte „Core“-Sequenzen in einer Region um den Transkriptionsstart aufweisen.

Durch eine Datenbankanalyse mit Hilfe der Transkriptionsfaktor-Datenbank TSSW wurde der 5'-Bereich des humanen *TWIST*-Gens auf mögliche Promotoren untersucht.

Es konnte ein möglicher Promotor 72 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts mit einer „TATA“-Box (Pos. -110 bp) identifiziert werden. Zusätzlich konnten zwei mögliche Promotoren in dieser Region identifiziert werden. Ein Promotor ohne „TATA“-Box im Abstand von 688 bp zum Transkriptionsstart und ein Promotor mit einem Abstand von 1033 bp zum Transkriptionsstart, der eine „TATA“-Box enthält (Pos. -1063 bp) (Abb. 3-12 A).

### **3.2.3.1 Herstellung von Deletionskonstrukten zur funktionellen Promotoranalyse des humanen *TWIST*-Gens**

Um den genomischen Bereich stromaufwärts des Translationsstarts von *H-TWIST* auf funktionelle DNA-Elemente zu analysieren, wurden unterschiedlich lange DNA-Sequenzabschnitte in den Expressionsvektor pGL3-Basic kloniert, der als Reportergen das *Luciferase*-Gen enthält. Ein unterschiedliches Aktivierungspotential der Promotorelemente kann so anhand der gesteigerten Expression des Reportergens in relativen Lichteinheiten (RLUs) gemessen werden.

Der genomische Bereich, dessen Promotoraktivität analysiert wurde, umfasst 3,7 kb stromaufwärts des Start-Codons.

Die Generierung von Deletionskonstrukten dieser Region sollte den Bereich, der für die transkriptionelle Regulation des Reportergens verantwortlich ist, weiter eingrenzen. Die Größe und Lage der jeweiligen Reportergen-Konstrukte ist in Abbildung 3-12 B dargestellt.

### **3.2.3.2 Analyse humaner Zelllinien auf endogene *TWIST*-Expression**

Für die funktionellen Analysen der *TWIST*-Promotorregion wurden zunächst geeignete Zelllinien identifiziert. Um die spezifische Promotoraktivität zu analysieren, mussten Zellen identifiziert werden, die das *TWIST*-Gen endogen exprimieren, um zu gewährleisten, dass in diesen Zellen die Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, die die *TWIST*-Transkription aktivieren. Um eine spezifische

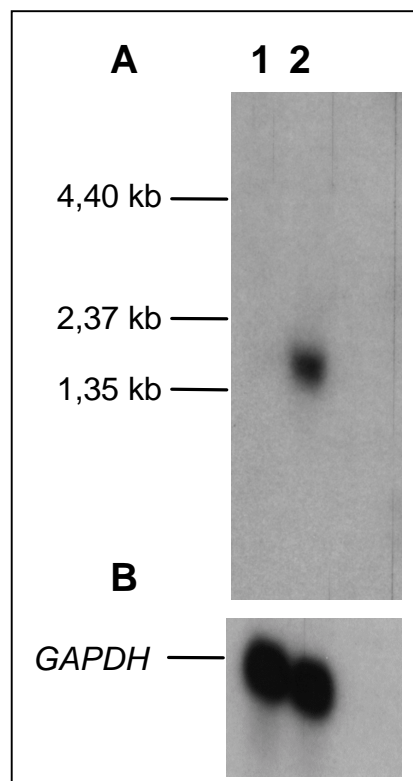
Aktivierung des Promotors von einer basalen Promotoraktivität unterscheiden zu können, sollte zusätzlich noch eine Zelllinie, bei der keine endogene *TWIST*-Expression nachgewiesen werden konnte, identifiziert werden.

Für die Promotoranalysen wurden Zelllinien zuvor mittels Northern-Blot Experimente auf endogene *TWIST*-Expression überprüft (Breitenbücher, 1998). Dabei wurde in OHS-Zellen eine endogene *TWIST*-Expression festgestellt, während sie hingegen in CCL-136-Zellen fehlt (Abbildung 3-10).

**Abbildung 3-10: Expressionsanalyse von *TWIST* in den humanen Zelllinien CCL-136 und OHS mittels Northern-Blot (Breitenbücher, 1998)**

(A) Es wurden jeweils 6 µg poly A<sup>+</sup>-RNA der Zelllinien CCL-136 (1) und OHS (2) aufgetrennt. Für die Hybridisierung wurde ein 455 bp großes cDNA-Fragment, das den 3'-untranslatierten Bereich des humanen *TWIST*-Gens repräsentiert, als radioaktiv markierte Sonde eingesetzt. Es konnte ein Transkript mit einer Größe von ca. 1,6 kb nur bei der RNA der OHS-Zellen detektiert werden.

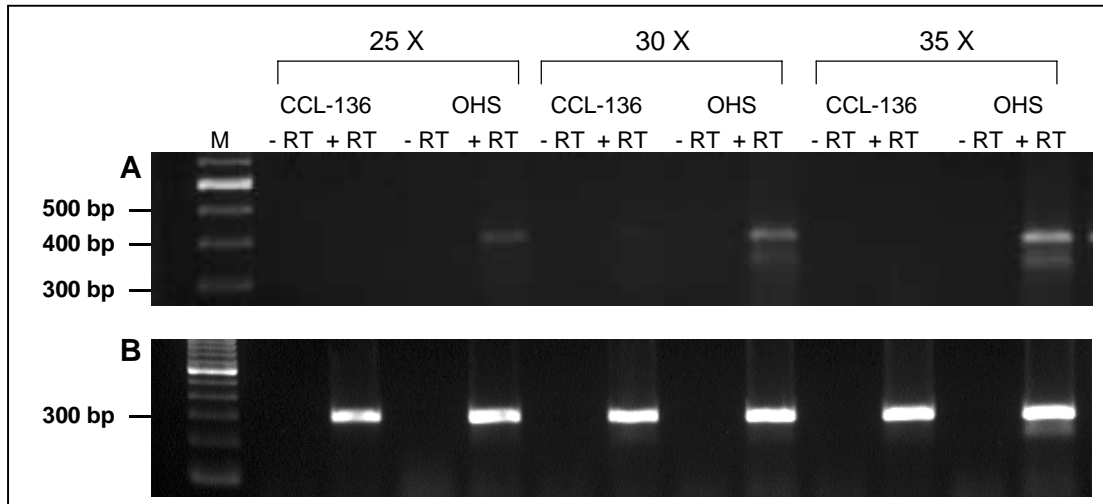
(B) Eine Kontrollhybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten Probe für das humane *GAPDH*-Gen durchgeführt. Hierbei konnte eine ungefähr gleich starke Expression in beiden Zelllinien gezeigt werden.



Da diese Zelllinien aus Tumorgewebe isoliert wurden und diese durch chromosomale Veränderungen auch ein verändertes Expressionsmuster zeigen können, wurden die Zellen in zeitlichen Abständen mittels RT-PCR bezüglich ihrer endogenen *TWIST*-Expression überprüft. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese mit den Oligonukleotiden „*TWIST*-1F“ und „*TWIST*-1R“ durch PCR bei unterschiedlicher Zyklenzahl überprüft (Abb. 3-11).

Diese Untersuchungen zeigten, dass zu den analysierten Zeitpunkten die OHS-Zellen *TWIST* endogen exprimieren. Bei den Rhabdomyosarcoma-Zellen konnte hingegen keine endogene *TWIST*-Expression nachgewiesen werden. Wenn man von einer transkriptionellen Regulation der *TWIST*-Expression ausgeht, würde dies bedeuten,

dass die OHS-Zellen über alle Faktoren, die für die Transkription von *TWIST* benötigt werden, verfügen, wohingegen in den CCL-136-Zellen diese Faktoren - wenigstens zum Teil - nicht vorhanden sind.



**Abbildung 3-11: Expressionsanalyse von *TWIST* in den humanen Zelllinien CCL-136 und OHS mit RT-PCR**

Es wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation erfolgte mit den Oligonukleotiden „*TWIST* 1F/R“ bei unterschiedlicher Zykluszahl (25X, 30X, 35X). Es konnte nur in OHS-Zellen eine *TWIST*-Expression nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle wurde die Expression des ubiquitär exprimierten *GAPDH*-Gens mit den Oligonukleotiden „*GAPDH* F/R“ bei den gleichen Zykluszahlen nachgewiesen. Für alle Proben wurde ein „-RT-Kontrolle“ (ohne reverse Transkriptase) durchgeführt, um so die generierte cDNA auf eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA zu untersuchen.

Als DNA-Größenstandard (M) wurde der „100 bp DNA-Ladder“ (Gibco, BRL) eingesetzt.

### 3.2.3.3 Untersuchung des humanen *TWIST*-Promotors im zellulären System

Um die Promotor-Deletionskonstrukte auf mögliche regulatorische Sequenzabschnitte zu untersuchen, wurde ihre Promotoraktivität durch transiente Transfektion in beiden humanen Zelllinien analysiert.

Diese Analysen wurden mittels „Dual Luciferase Assay“ durchgeführt. Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden in den pGL3-Basic-Vektor (Promega) inseriert, der als Reportergen das Gen für die *Firefly*-Luciferase enthält. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde ein Kontrollplasmid (pRL-CMV, Promega) in einem Verhältnis von 1/50 zur Menge der DNA des Reportergens co-transfiziert. Das Kontrollplasmid enthält das Gen der *Renilla*-Luciferase unter der Kontrolle des ubiquitär starken CMV-Promotors. Die ermittelten relativen Lichteinheiten (RLUs), resultierend aus der Verrechnung der *Renilla*-Luciferase-Aktivität und den Werten der *Firefly*-Luciferase-Aktivität, ergaben so die relative

Luciferaseaktivität der Reportergenkonstrukte. Die Bestimmung der relativen Luciferaseaktivität ermöglicht einen Vergleich der jeweiligen Transfektionsexperimente, da diese sich in ihrer Transfektionseffizienz unterscheiden können.

Zunächst wurden die Variablen des Reportergenassays durch Testexpressionen analysiert und standardisiert. Die Transfektionsexperimente wurden mit einer konstanten DNA-Menge von 100 ng durchgeführt und die transfizierten Zellen wurden nach der Transfektion für 48 h in Normalmedium kultiviert. In der Regel wurden alle Transfektionen in Doppelansätzen durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt. Um die einzelnen Transfektionen vergleichen zu können, wurde jeweils eine Negativkontrolle (pGL3-Basic-Vektor, Promega) und eine Positivkontrolle (pGL3-Promotor-Vektor, Promega) durchgeführt. Der pGL3-Basic-Vektor verfügt über keine regulatorischen DNA-Sequenzabschnitte vor dem Reportergen (*Luciferase*). Die nach Transfektion mit diesem Konstrukt ermittelten Werte konnten auf eine basale Expression des Reportergens zurückgeführt werden. Als Positivkontrolle wurden Transfektionen mit dem pGL3-Promotor-Vektor durchgeführt. Das Reportergen *Firefly-Luciferase* steht hierbei unter der Kontrolle des viralen SV40-Promotors, der in den meisten eukaryoten Zellen stark aktiv ist. Die ermittelten Werte wurden für jedes Transfektionsexperiment als 100 %-Wert definiert.

Für jedes Promotor-Konstrukt wurden zwei Transfektionsexperimente durchgeführt und die erhaltenen Werte (RLUs) gemittelt. Mit Hilfe mehrerer Transfektionsexperimente wurden für die einzelnen Promotorkonstrukte und die jeweiligen Zelllinien Durchschnittswerte ermittelt (Anlage 1). Die Ergebnisse der Promotoranalysen sind zusammenfassend in Abbildung 3-12 dargestellt.

Für die *TWIST* endogen exprimierenden Osteosarkomazelle (OHS) zeigte sich eine starke Aktivierung des Reportergens durch das 782 bp große Promotorkonstrukt. Der Wert der relativen Luciferaseaktivität beträgt 116,8 %. Die Analyse größerer genomischer Bereiche der 5'-Region von *TWIST*, die zusätzlich auch den 5'-untranslatierten Bereiche des *TWIST*-Gens repräsentieren, ergab keinen Anstieg der Reportergenaktivität. Die relative Luciferaseaktivität, ermittelt nach transienter Transfektion dieser Konstrukte, variiert zwischen 68 % („2,5 kb-pGL3-Basic“) und 109,4 % („3,0 kb-pGL3-Basic“). Das Deletionskonstrukt „461 bp-pGL3-Basic“ zeigt eine deutlich geringere Promotoraktivität im Vergleich zu dem 782 bp großen DNA-

Fragment. Der Wert der relativen Luciferaseaktivität beträgt 38 %. Transfektionsexperimente mit dem „355 bp-pGL3-Basic“ Reporter-genkonstrukt, bei dem 427 bp des 3'-Bereichs des „782 bp-pGL3-Basic“ Konstrukts deletiert wurden, ergaben eine relative Luciferaseaktivität von 6,8 %. Es konnte gezeigt werden, dass dieser 355 bp große Bereich des 782 bp Fragments allein keine Promotoraktivität besitzt.

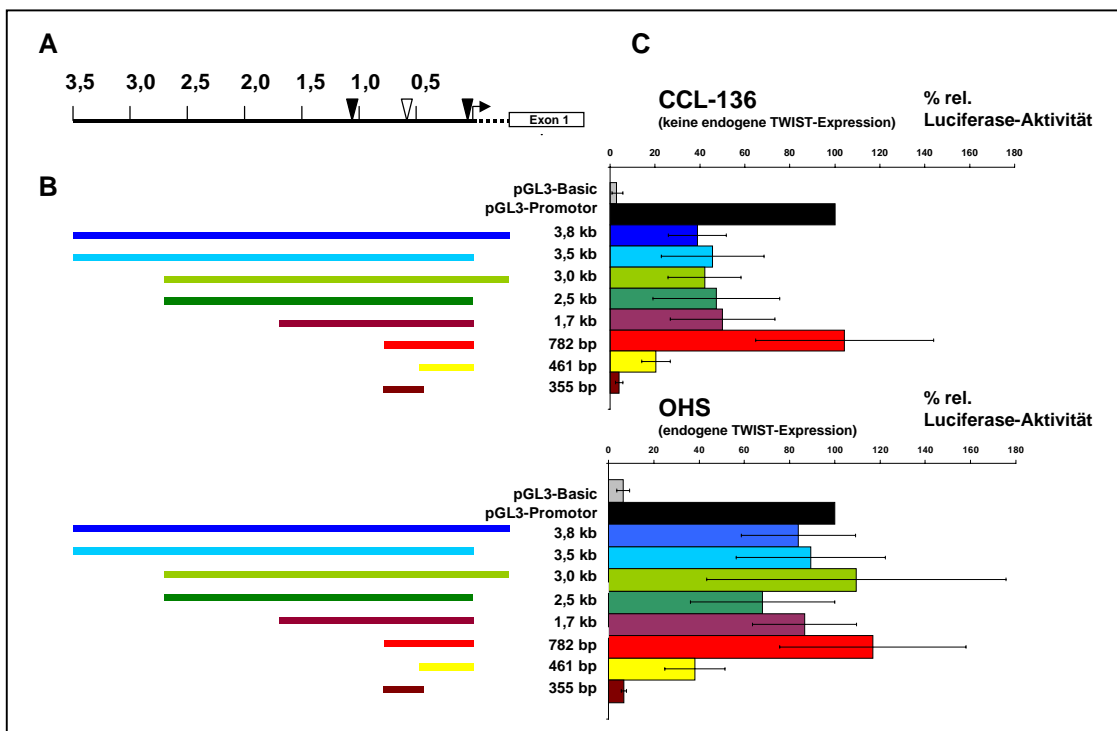
In Transfektionsexperimenten mit der auf endogene *TWIST*-Expression negativ getesteten CCL-136-Zelllinie wurden für das Reporter-genkonstrukt „782 bp-pGL3-Basic“ ähnliche Werte für die relative Luciferaseaktivität erzielt. Der ermittelte Wert für das „782 bp-pGL3-Basic“-Reporter-genkonstrukt liegt bei 104,4 %. Ebenso wie die Promotoranalysen in den OHS-Zellen zeigte die Untersuchung des 461 bp-Promotorfragments eine reduzierte Reporter-genaktivität. Der Wert der relativen Luciferaseaktivität liegt hier bei 20,4 %. Die Untersuchungen der größeren Promotor-Fragmente („1,7 kb- bis 3,8 kb-pGL3-Basic“) ergaben im Vergleich zu den OHS-Zellen eine geringere relative Luciferaseaktivität. Die Werte nach transienter Transfektion dieser Konstrukte liegen bei etwa 50 % relativer Luciferaseaktivität. Durch die Analyse der Promotor-Deletionskonstrukte konnte gezeigt werden, dass für die reduzierte Reporter-genaktivität in den CCL-136-Zellen, im Vergleich zur Reporter-genaktivität in den OHS-Zellen, ein 1,7 kb großer Bereich ausreichend ist.

Die Untersuchungen der Promotorregion des humanen *TWIST*-Gens zeigten, dass ein 782 bp großer Bereich die für eine Aktivierung essentiellen DNA-Elemente enthält. Durch Deletionskonstrukte konnte der Bereich, der für die Aktivierung entscheidend ist, auf 321 bp eingegrenzt werden. Dieser Bereich alleine führte aber zu keiner Aktivierung des Reportergens. Aufgrund dessen kann daraus geschlossen werden, dass für eine transkriptionelle Aktivierung das gesamte 782 bp große DNA-Fragment benötigt wird. Der Vergleich der Reporter-genaktivität in beiden Zelllinien ergab für diesen Bereich annähernd identische Resultate, so dass vermutlich keine Zelltyp-spezifische Regulation für das *TWIST*-Gen vorliegt.

Die Analyse der Promotor-Konstrukte, die weitere genomische Bereiche des humanen *TWIST*-Promotors repräsentieren, zeigten in beiden Zelllinien keine weitere Aktivierung des Reportergens. Der Vergleich der Transfektionsexperimente in den beiden Zelllinien ergab für diese Bereiche eine unterschiedlich starke regulatorische Wirkung. Durch die Vergrößerung der analysierten Promotorregion konnte bei den

CCL-136-Zellen eine deutlich reduzierte relative Luciferaseaktivität gemessen werden. Der Bereich, der für diese unterschiedliche Aktivierung verantwortlich ist, und so eine Rolle für eine spezifische Regulation von *TWIST* spielen kann, konnte auf etwa 900 bp eingegrenzt werden.

Durch die Analyse des „3,8 kb-pGL3-Basic“- und des „3,0 kb-pGL3-Basic“-Reportergenkonstrukts, die zusätzlich zu den 5'-Regionen stromaufwärts des Transkriptionsstarts, den 5'-untranslatierten Bereich des humanen *TWIST*-Gens repräsentieren, konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich wahrscheinlich nicht an der transkriptionellen Regulation von *TWIST* beteiligt ist.



**Abbildung 3-12: Analyse der Reporteraktivität unterschiedlicher Promotor-Konstrukte**

(A) Putative Promotorregion des humanen *TWIST*-Gens. Dreiecke markieren mögliche Promotoren, die von der Datenbank TSSW vorhergesagt wurden. Die schwarzen Dreiecke markieren Promotoren mit „TATA“-Box und das nicht ausgefüllte Dreieck einen Promotor ohne „TATA“-Box. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart von *TWIST*.

(B) Größe und Orientierung der Promotor-Fragmente die in den Expressionsvektor pGL3-Basic (Promega) kloniert und für die Transfektionsexperimente eingesetzt wurden.

(C) Auswertung der transienten Transfektionsexperimente in CCL-136- (keine endogene *TWIST*-Expression) und OHS-Zellen (endogene *TWIST*-Expression) mit Standardabweichung. Die Farbe der Balken entspricht den Farben der jeweiligen Promotor-Konstrukte (B). Als Negativ-Kontrolle wurde der pGL3-Basic-Vektor (Promega) ohne Insert und als Positiv-Kontrolle der pGL3-Promotor-Vektor (Promega) eingesetzt. Es wurden mehrere Transfektionsansätze (n) mit je zwei Transfektionen ausgewertet. Für die jeweiligen Reportergenkonstrukte wurden unterschiedlich viele Transfektionsansätze ausgewertet: pGL3-Basic n=13; pGL3-Promotor-Vektor n=13; „3,8 kb-pGL3-Basic“ n=4; „3,5 kb-pGL3-Basic“ n=7; „3,0 kb-pGL3-Basic“ n=4; „2,5 kb-pGL3-Basic“ n=3; „1,7 kb-pGL3-Basic“ n=7; „782 bp-pGL3-Basic“ n=9; „461 bp-pGL3-Basic“ n=5; „355 bp-pGL3-Basic“ n=4 (siehe Anhang 2).



---

#### **3.2.3.4 Untersuchung des humanen *TWIST*-Promotors auf konservierte Sequenzabschnitte und mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen**

Durch die funktionellen Untersuchungen des humanen *TWIST*-Promotors konnten Sequenzabschnitte identifiziert werden, die an der Regulation der Transkription von *TWIST* beteiligt sein können. Da regulatorische Elemente bei Vertebraten häufig stark konserviert sind, sollten durch einen Sequenzvergleich der genomischen Sequenz des humanen und murinen *Twist*-Promotors, konservierte DNA-Elemente identifiziert werden. Für diese Analysen wurden 3,7 kb humane genomische DNA, die den 5'-Bereich oberhalb des Transkriptionsstarts repräsentieren, mit 4 kb muriner genomischer DNA, die den 5'-Bereich des murinen *Twist*-Gens beinhaltet, verglichen. Dieser Vergleich wurde mit dem Programm „Blast 2 Sequences“ (NCBI) mit Standardeinstellungen durchgeführt. Im Gegensatz zur „PipMaker“-Analyse (Kap. 3.2.2) werden hierbei nur Sequenzabschnitte berücksichtigt, die zu mehr als 60 % homolog sind, so dass kürzere Sequenzbereiche, die größere Lücken in ihren homologen Bereichen aufweisen, nicht berücksichtigt werden.

Somit konnten sieben Sequenzabschnitte, die mindestens zu 77 % identisch sind, identifiziert werden (Abb. 3-13).



wurde neben einer „TATA“-Box eine Bindestelle für „NF- $\kappa$ B“ („Nuclear Factor Kappa B“), eine „STAT“-Bindestelle („Signal Transducer and Activator of Transcription“), eine CAAT-Box und eine „SOX5“-Bindestelle („Sex Determining Homeobox Factor 5“) identifiziert. In Element 2 eine „ATF“ („Activating Transkription Faktor 1“-) Bindestelle und eine Bindestelle für „EGRF“ („Early Growth Response Gene Factor“); in Element 4 eine „XBP1“-Bindestelle („X-Box-Binding Protein 1“). In Element 6 wurde eine „USF“-Bindestelle („Upstream Stimulating Factor“), sowie in Element 7 eine Bindestelle für „NKX-2.5“ („Homeo Domain Factor Nkx-2.5“) identifiziert. In den Elementen E3 und E5 konnten mit den gewählten Einstellungen keine Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Position der Nukleotide relativ zum Transkriptionsstart (+1). Identische Nukleotide sind grau unterlegt.

Diese konservierten DNA-Sequenzabschnitte wurden bezüglich putativer Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem Programm „MatInspector professional“ untersucht. Als Parameter für diese Analyse wurde für die „Core-similarity“ der Transkriptionsfaktor-Bindestelle der Faktor „1.0“ ausgewählt, was einer 100%igen Übereinstimmung mit der Core-Sequenz entspricht. Für die „Matrix-similarity“ wurde die Einstellung „Optimized“ ausgewählt, die für jede Transkriptionsfaktorbindestelle eine Variabilität für die „Matrix“-Sequenz ermöglicht.

Für die einzelnen Promotor-Elemente konnten eine Reihe von Transkriptionsfaktor-Bindestellen identifiziert werden, die an der transkriptionellen Regulation des humanen *TWIST*-Gens beteiligt sein könnten (Abb. 3-13). Mit einem Abstand von 110 bp zum Transkriptionsstart konnte eine „TATA“-Box identifiziert werden, die als Bindestelle für den „Tata-Binding Protein Factor“ (TBP) fungieren könnte.

Neben der „TATA“-Box wurden im Bereich bis -455 bp, der für die Aktivierung des Reportergens wichtig ist, für sich allein aber keine aktivierende Funktion ausübt, weitere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert. So konnten Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren „STAT“, „NF- $\kappa$ B“, „CREB“, „SOX9“, „EGRF“ sowie eine „CAAT“-Box und eine E-Box, die als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor „ATF“ dient, in diesem Bereich charakterisiert werden.

Anhand dieses Sequenzvergleichs war es möglich, innerhalb der für eine transkriptionelle Aktivierung wichtigen Sequenzabschnitte, eine Transkriptionsfaktorbindestelle für das „X-box-binding protein 1“ (XBP) in Element 4 zu identifizieren.

Die Bereiche, die sich weiter oberhalb dieser Sequenzabschnitte befinden und möglicherweise für das geringere Aktivierungspotential in den CCL-136-Zellen verantwortlich sind, zeigen nur kurze konservierte Bereiche. Innerhalb dieser

Sequenzabschnitte konnten Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren „USF“ (Element 6) und „NKX-2.5“ (Element 7) identifiziert werden.

Vergleicht man diese identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit denen innerhalb des *F-Twist*-Promotors, so zeigt sich, dass einige dieser Bindestellen zwischen Mensch, Maus und *Fugu* konserviert sind. Die Transkriptionsfaktoren „NF- $\kappa$ B“ und „NKX-2.5“ besitzen Bindestelle in den *Twist*-Promotor-Bereichen des Menschen, der Maus und des *Fugu*. Ebenfalls konnte dort eine „CAAT“-Box mit den gleichen Analyse-Parametern (MatInspector) identifiziert werden. Diese konservierten Bindestellen wurden bei dem Sequenzvergleich (PipMaker; Abb. 3-9) nicht identifiziert, da sie nicht in gleicher Orientierung vorliegen und sich auf sehr kurze Sequenzabschnitte beschränken.

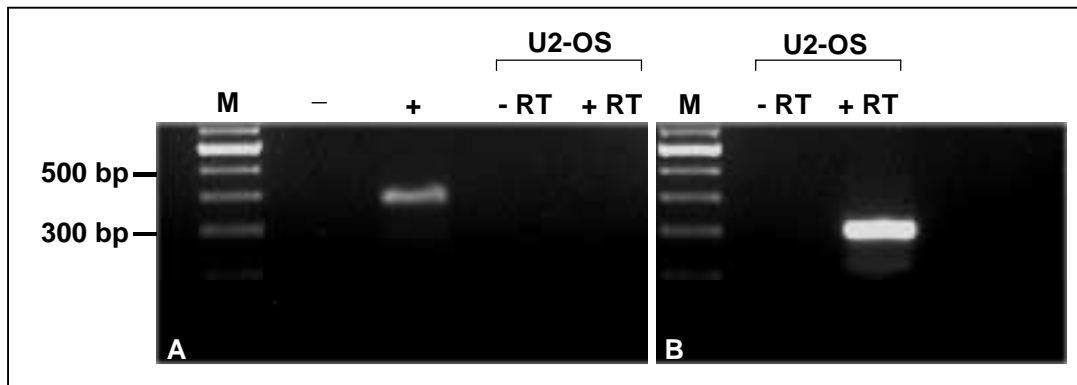
### **3.2.4 TWIST als Transkriptionsfaktor und sein Einfluss auf die Expression putativer Zielgene**

Das humane *TWIST*-Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor der bHLH-Familie. Die Funktion von Transkriptionsfaktoren ist die Aktivierung oder Reprimierung von Zielgenen.

Durch eine Überexpression von *TWIST* in einer humanen Zelllinie sollte die Regulation von Zielgenen durch *TWIST* analysiert werden. Von besonderem Interesse war hierbei eine mögliche transkriptionelle Regulation der *Fibroblasten-Wachstums-Faktoren-Rezeptoren (FGFRs)*, da für einige der *FGFRs* gezeigt werden konnte, dass intragenische Mutationen ebenfalls zu Craniosynostosen führen können. Für diese Analysen wurden *TWIST*-Expressionskonstrukte generiert, die stabil in das Genom einer humanen Zelllinie integrieren sollten, um so eine homogene *TWIST*-Expression zu gewährleisten.

#### **3.2.4.1 Expression von exogenen *TWIST*-Expressionskonstrukten**

Für die Generierung einer humanen Zelllinie, die ein exogenes *TWIST*-Expressionskonstrukt stabil exprimiert, wurde eine Osteosarcoma-Zelllinie (U2-OS) eingesetzt. Diese wurde zunächst auf eine endogene *TWIST*-Expression überprüft. Hierzu wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs wurden dann mit den *TWIST*-spezifischen Oligonukleotiden „*TWIST* 1F/R“ analysiert. Hierbei konnte keine endogene *TWIST*-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3-14).



**Abbildung 3-14: Expressionsanalyse der U2-OS-Zelle auf endogene *TWIST*-Expression mittels RT-PCR**

(A) Kontrolle der *TWIST*-Expression mit cDNA, die aus Gesamt-RNA von U2-OS-Zellen mit einer reversen Transkriptase (RT) generiert wurde, mit den *TWIST* spezifischen Oligonukleotiden „*TWIST* 1F/R“. Es konnte keine endogene *TWIST*-Expression bei einer PCR-Reaktion mit 35 Zyklen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (-) ohne DNA und eine Positiv-Kontrolle (+) mit humaner DNA (50 ng) durchgeführt.

(B) Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde mittels PCR (25 Zyklen) mit den Oligonukleotiden *GAPDH* F/R die Expression des ubiquitär exprimierten *GAPDH*-Gens nachgewiesen.

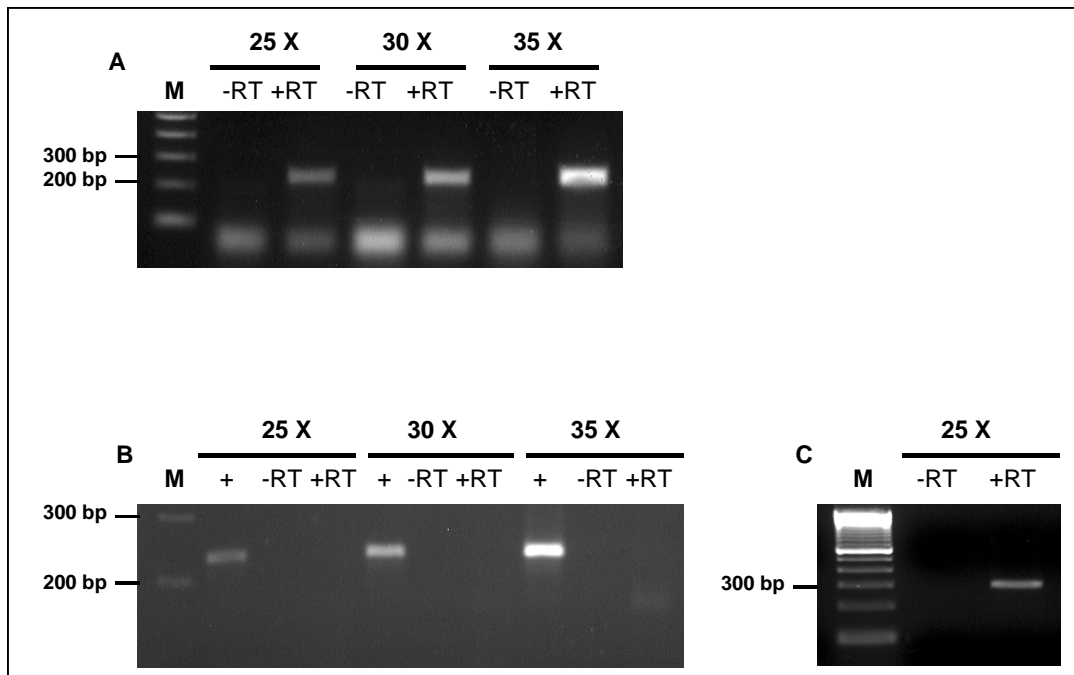
Es wurden 5 µg Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Als Größenstandard (M) wurde ein „100 bp-Ladder“ (Gibco, BRL) eingesetzt. Für alle Proben wurde eine „-RT-Kontrolle“ (ohne reverse Transkriptase) durchgeführt, um so die generierte cDNA auf eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA zu untersuchen.

Um die Auswirkung einer *TWIST*-Überexpression in dieser Zelllinie zu analysieren, sollten zwei Zelllinien generiert werden, die das Konstrukt stabil in ihr Genom eingebaut haben.

Hierzu wurden die *TWIST*-cDNA-Fragmente in „sense“- und „antisense“-Orientierung in den Expressionsvektor pcDNA 3.1(+) (Invitrogen) kloniert. Das „Antisense“-Konstrukt wurde so generiert, dass der codierende Bereich von *TWIST* in „antisense“-Orientierung transkribiert wird. Dieses sollte gewährleisten, dass die RNA des eventuell endogen exprimierten *TWIST* mit der „Antisense“-RNA, die im Überschuss in der Zelle vorliegt, hybridisiert und so nicht mehr translatiert werden kann. Für das „Sense“-Konstrukt wurde die cDNA mit 5′- und 3′-untranslatierten Bereich in den Expressionsvektor kloniert, um nach der Transkription eine möglichst native Translation zu gewährleisten. Diese cDNA-Konstrukte wurden zunächst mittels transienter Transfektion in U2-OS-Zellen eingebracht und die Expression auf RNA-Ebene kontrolliert.

Um die exogen eingebrachte mRNA von der endogenen mRNA unterscheiden zu können, wurden Oligonukleotide generiert, die nur die *TWIST*-mRNA, die mit Hilfe des Expressionsplasmids generiert wurde, amplifiziert.

Jeweils 5 µg Gesamt-RNA wurden in cDNA umgeschrieben und die Expression der Konstrukte überprüft. Beide Konstrukte konnten nach transients Transfektion nachgewiesen werden. Für das „Sense“-Konstrukt ist das Ergebnis dieser Untersuchung in Abbildung 3-15 A gezeigt.



**Abbildung 3-15: Expressionsanalyse von exogen exprimiertem *TWIST* („sense“) nach transients Transfektion und genomischer Integration**

Analyse der exogen exprimierten mRNA des Expressions-Konstrukts „pcDNA 3.1-*TWIST*-sense“ nach (A) transients Transfektion und (B) Integration in das Genom der U2-OS-Zellen. Jeweils 5 µg Gesamt-RNA wurden mittels reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die PCR erfolgte mit den Oligonukleotiden „vecPrimer 1F“ und „*TWIST*-cDNA 3R“. Das resultierende 230 bp große Fragment konnte nach transients Transfektion (A) mit 25, 30 und 35 Zyklen nachgewiesen werden. Nach Integration in das Genom der U2-OS-Zellen (B) konnte kein Transkript mehr detektiert werden. Als Positiv-Kontrolle (+) wurden 10 ng des Expressionskonstrukts „pcDNA 3.1-*TWIST*-sense“ eingesetzt. Die -RT-Kontrolle zeigte bei beiden Analysen kein Amplifikat, so dass es sich bei dem Produkt des +RT-Ansatzes um umgeschriebene RNA des transkribierten „pcDNA 3.1-*TWIST*-sense-Konstrukts handelt. (C) Kontrolle der cDNA aus (B) mit den Primern „GAPDH F/R“ in einer PCR-Reaktion mit 25 Zyklen.

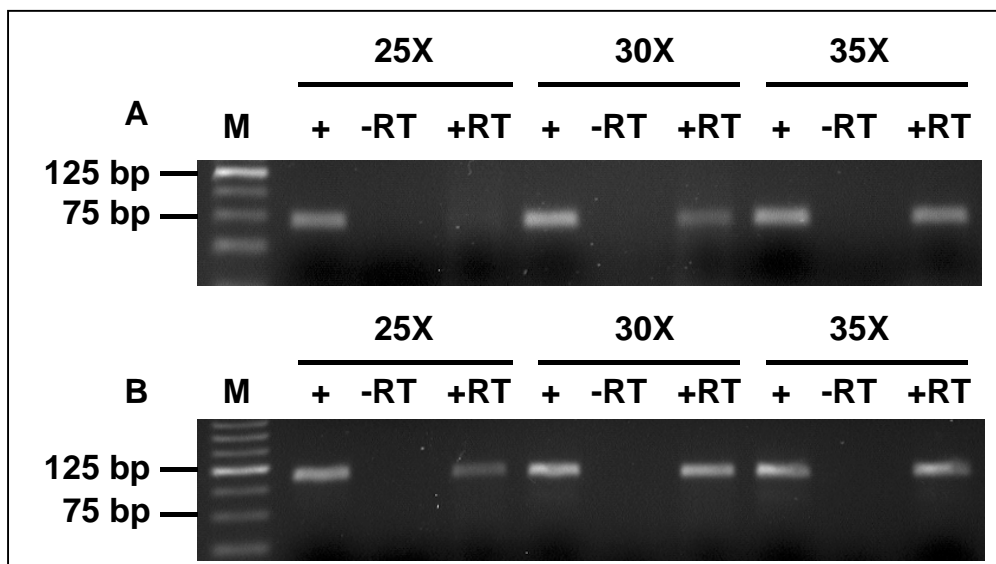
Als Größenstandard (M) wurde ein „100 bp-Ladder“ (Gibco, BRL) eingesetzt.

Um die Auswirkung der „Sense“- und „Antisense“-Konstrukte unter konstanten Bedingungen zu analysieren, wurden die U2-OS-Zellen mit den Konstrukten erneut transfiziert und für 14 Tage in Selektionsmedium (1 mg/ml G418) inkubiert. Die RNA der selektionierten Zellen wurde ebenfalls auf das exogen eingebrachte Konstrukt untersucht. Durch die Analyse der cDNAs konnte das „*TWIST*-Antisense“-Konstrukt nach Integration in das Genom der U2-OS-Zellen

nachgewiesen werden (Abb. 3-16 B). Das „*TWIST*-Sense“-Konstrukt hingegen konnte auch bei einer PCR mit 35 Zyklen nicht detektiert werden. Auch nach wiederholter Transfektion und erfolgreicher Selektionierung war es nicht möglich die „Sense“-RNA zu detektieren (Abb. 3-15 B).

Um eine Zelllinie mit konstanter Expression des „*TWIST*-Sense“-Konstrukts zu erhalten, wurde ein „c-myc-*TWIST*“-Fusionskonstrukt (pCMV-Taq Epitope Tagging Vektor, Stratagene), das in transienten Transfektionen sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene detektiert werden konnte (Godmann, 2001), für die Generierung einer stabilen Zelllinie eingesetzt. Nach Transfektion und Selektion konnte für diese Zelllinie ein exogenes Transkript nachgewiesen werden (Abb. 3-16 A).

Zusätzlich wurde die Integration der eingebrachten Konstrukte in das Genom der U2-OS-Zellen mittels PCR auf genomischer DNA überprüft (Abb. 3-17).

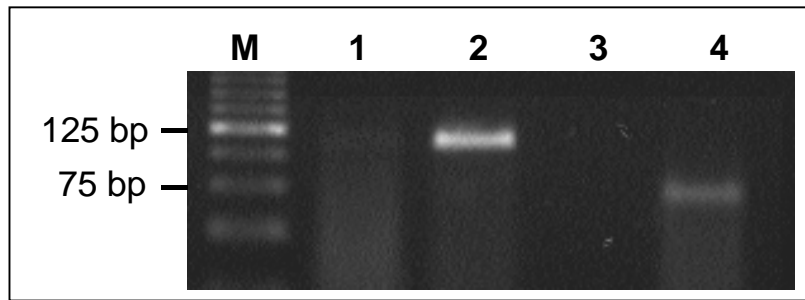


**Abbildung 3-16: Expressionsanalyse der exogen exprimierten „Sense“- und „Antisense“-Konstrukte in stabil-transfizierten U2-OS-Zellen**

(A) Expressionsanalyse des exogen exprimierten „pCMV-Taq-c-myc-*TWIST*“-Konstrukts in U2-OS-Zellen. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden „pCMV3C/twist F“ und „pCMV3C/twist R“ durchgeführt. Bei einer Amplifikation mit 30 und 35 Zyklen konnte eine Bande mit einer Größe von 70 bp detektiert werden (+RT). Bei einer PCR mit 25 Zyklen konnte kein Transkript nachgewiesen werden.

(B) Expressionsanalyse des exogen exprimierten „pcDNA3.1-*TWIST*-antisense“-Konstrukts in U2-OS-Zellen. Die PCR-Reaktion wurde mit den Oligonukleotiden „vecPrimer 1F“ und „*TWIST*-cDNA 2R“ durchgeführt. Hierbei konnte ein Fragment mit einer Größe von 120 bp, nach Amplifikation mit 25, 30, 35 Zyklen detektiert werden.

Es wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA mittels reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Als Größenstandard (M) wurde ein „25 bp Ladder“ (Invitrogen) eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle (+) wurden jeweils 10 ng des entsprechenden Plasmids (A) „pCMV-Taq-c-myc-*TWIST*“ und (B) „pcDNA3.1-*TWIST*-antisense“ eingesetzt. In der -RT-Kontrolle konnte bei keiner der Analysen ein Fragment detektiert werden (keine genomische Kontamination).



**Abbildung 3-17: Nachweis der genomischen Integration der „pCMV-Taq-c-myc-TWIST“- und „pcDNA3.1-TWIST-antisense“-Konstrukte in das Genom der U2-OS-Zellen mittels PCR**

Es wurden jeweils 50 ng genomische DNA aus nicht-transfizierten U2-OS-Zellen (1,3) sowie aus U2-OS-Zellen, die mit dem „pcDNA3.1-TWIST-antisense“-Konstrukt (2) und dem „pCMV-Taq-c-myc-TWIST“-Konstrukt (4) transfiziert wurden, für die PCR eingesetzt. Die genomische DNA der nicht-transfizierten U2-OS-Zellen wurde als Negativkontrolle eingesetzt, da ein spezifisches Produkt nur mit den exogen eingebrachten TWIST-Expressionskonstrukten generiert werden konnte.

Die PCR-Reaktion für das „antisense“-Konstrukt wurde mit den Oligonukleotiden „vecPrimer 1F“ und „TWIST-cDNA 2R“(1,2) und für das „sense“-Konstrukt mit den Oligonukleotiden „pCMV3C/twist F“ und „pCMV3C/twist R“ durchgeführt.

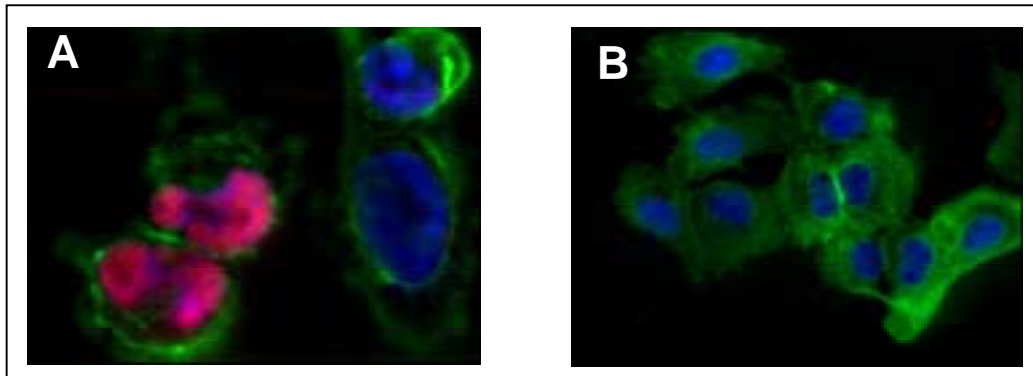
Die PCR zeigte, dass nur in den DNAs der transfizierten U2-OS Zelle ein positives Signal detektiert werden konnte. Als Größenstandard (M) wurde ein „100 bp-Ladder“ (Gibco, BRL) eingesetzt.

### 3.2.4.2 Subzelluläre Lokalisation des *TWIST*-c-myc-Fusionsproteins

Um zu überprüfen, ob das Fusionsprotein unter stabilen Bedingungen translatiert und in den Kern transportiert wird, wurden Immunfärbungen an fixierten Zellen durchgeführt. Zur Detektion des Fusionsproteins wurde ein anti-human-c-myc-Antikörper eingesetzt, der durch einen Texas Red gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper erkannt wird. Um die Lokalisation des Fusionsproteins zu bestimmen, wurden die Kerne mit DAPI gefärbt. In Abbildung 3-18 ist die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins gezeigt. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen, wurden Zellen, die mit „Antisense“-Konstrukten transfiziert wurden, unter gleichen Bedingungen analysiert. Diese Zellen zeigten kein spezifisches Signal.

Anhand dieser Antikörperfärbung konnte gezeigt werden, dass das „c-myc-TWIST“-Fusionsprotein exprimiert wird und im Zellkern lokalisiert ist. Bei den analysierten Zellen konnte allerdings keine Linie identifiziert werden, die das Protein homogen in allen Zellen exprimiert.





**Abbildung 3-18: Zelluläre Lokalisation des exogenen TWIST-Proteins in U2-OS-Zellen nach genomischer Integration**

(A) Zelluläre Lokalisation des „pCMV-Taq-c-myc-TWIST“-Fusionsproteins. Nach Integration des „pCMV-Taq-c-myc-TWIST“-Konstrukt in das Genom der U2-OS-Zellen wurden diese mit einem Texas-Red gekoppelter anti-Maus-IgG Antikörper inkubiert. Das „pCMV-Taq-c-myc-TWIST“-Fusionsprotein konnte im Zellkern detektiert werden, aber nicht alle Zellen zeigten eine Expression dieses Konstrukts.

(B) U2-OS-Zellen, bei denen das „pcDNA3.1-TWIST-antisense“-Konstrukt in das Genom integriert war, wurden mit dem Texas-Red gekoppelten anti-Maus-IgG Antikörper inkubiert. Hierbei konnte kein Signal detektiert werden.

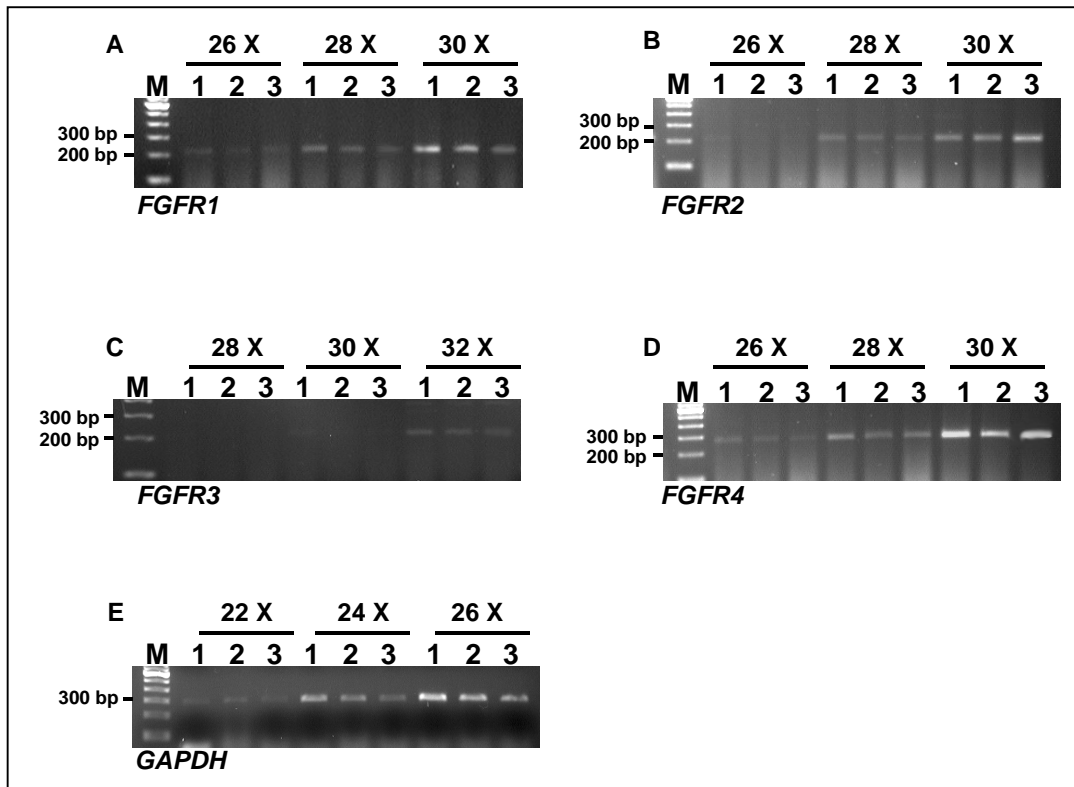
In beiden Ansätzen wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt und das cytoskeletale F-Actin mit Alexa-Fluor 488 Phalloidin (grün) markiert.

### 3.2.4.3 Auswirkung der exogenen TWIST-Expression auf die Transkription der *FGFR*-Gene

Um die mögliche Auswirkung einer Überexpression von TWIST auf die Transkription der *FGFRs* zu überprüfen, wurde RNA aus nicht-transfizierten sowie aus mit „Sense“- und „Antisense“-Konstrukten transfizierten U2-OS-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs wurden mittels Oligonukleotiden, die spezifisch für die jeweiligen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren waren, in einer PCR-Reaktion mit unterschiedlichen Zyklenzahlen analysiert. Alle Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass sich das Amplifikat von einer cDNA als Ausgangs-DNA von dem Amplifikat unterscheidet, welchem genomische DNA als Ausgangsmaterial diente. Somit wurde die Identifizierung einer möglichen genomischen Kontamination durch ein zusätzliches Amplifikat gewährleistet. In Abbildung 3-19 sind die Ergebnisse der RT-PCR dargestellt. Um einen Vergleich der generierten Produkte zu ermöglichen, wurden für die Analysen die gleichen Mengen an cDNA, die zusätzlich aus der gleichen reversen Transkriptions-Reaktion entnommen wurden, eingesetzt und unter gleichen PCR-Bedingungen amplifiziert. Zusätzlich wurden die cDNA-Proben mit Oligonukleotiden für das ubiquitär

exprimierte *GAPDH*-Gen („*GAPDH* 1F/R“) analysiert. Die Oligonukleotide wurden ebenfalls so generiert, dass ein Amplifikat mit cDNA als Ausgangsmaterial (300 bp) sich von einem Amplifikat mit genomischer DNA (600 bp) unterscheidet. In Abbildung 3-19 E ist die PCR mit den Oligonukleotiden „*GAPDH* 1F/R“ gezeigt. Bei einer PCR mit 22 Zyklen sind bei allen drei cDNAs von nicht-transfizierten Zellen sowie bei Zellen, die mit „Sense“- und „Antisense“-Konstrukten transfiziert worden waren, schwache Signale zu erkennen.

Die PCRs für die jeweiligen *FGFR*-Gene zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke. Bei geringer Zyklenzahl konnten für alle drei cDNAs ein etwa gleich starkes Signal detektiert werden. Die benötigte Zyklenzahl zum Nachweis der jeweiligen *FGFR*-Gene variierte zwischen den einzelnen Analysen (Abb. 3-19). Bei Reaktionen mit größerer Zyklenzahl konnten Unterschiede in der Signalstärke detektiert werden, die aber nicht auf eine unterschiedliche Expression der jeweiligen *FGFR*-Gene zurückzuführen ist.



**Abbildung 3-19: Expressionsanalyse verschiedener *FGFR*-Gene in U2-OS-Zellen nach Überexpression von H-TWIST**

Analyse der Expression unterschiedlicher *FGFR*-Gene in nicht-transfizierten U2-OS-Zelle (1), in U2-OS-Zellen nach genomischer Integration des „pCMV-Taq-c-myc-*TWIST*“-Konstrukt (2) und dem „pcDNA3.1-*TWIST*“-antisense-Konstrukt (3). PCR mit den Oligonukleotiden „*FGFR1* F/R“ (A), „*FGFR2* F/R“ (B), „*FGFR3* F/R“ (C), „*FGFR4* F/R“ (D) und „*GAPDH* F/R“ (E). Die Reaktionen wurde mit den jeweils angegeben Zyklenzahlen durchgeführt.

Mit den Oligonukleotiden „*FGFR1* F/R“, „*FGFR2* F/R“ und „*FGFR4* F/R“ konnte eine schwache Expression bei 26 Zyklen, in allen cDNAs, nachgewiesen werden. Die PCR mit den Oligonukleotiden „*FGFR3* F/R“ zeigte erst bei einer Amplifikation mit 32 Zyklen schwache Signale, ebenfalls in den cDNAs aus allen drei Zellpopulationen. Bei keiner PCR konnte ein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke der unterschiedlichen *FGFR*-cDNAs gezeigt werden. Die Kontrolle mit den „*GAPDH* F/R“ Oligonukleotiden zeigt, dass die eingesetzten cDNA-Mengen nahezu identisch waren. Hier konnte für alle drei cDNAs eine schwache Expression bei einer PCR mit 22 Zyklen nachgewiesen werden. Als Größenstandard (M) wurde ein „100 bp-Ladder“ (Gibco, BRL) eingesetzt.

### **3.3 Identifizierung eines nicht-charakterisierten Transkripts auf Chromosom 7p21 – *TWIST NEIGHBOR (TWISTNB)***

Durch den Vergleich der genomischen Sequenzen des *Fugu* und des Menschen, konnte für den noch nicht charakterisierten offenen Leserahmen *LOC221830 (TWISTNB)* gezeigt werden, dass dieser ebenfalls stark konserviert ist (Kap 3.1.2; Abb. 3.3). Da anhand von Datenbank-Analysen keine Funktion für dieses putative Gen bestimmt werden konnte - es zeigt keine funktionelle Domäne - wurde das Gen aufgrund seiner Nachbarschaft zum humanen *TWIST*-Gen, *TWISTNEIGHBOR (TWISTNB)* genannt. Diese Namensgebung wurde von dem Nomenklaturkomitee des Humanen Genom Projekts (HUGO) bestätigt.

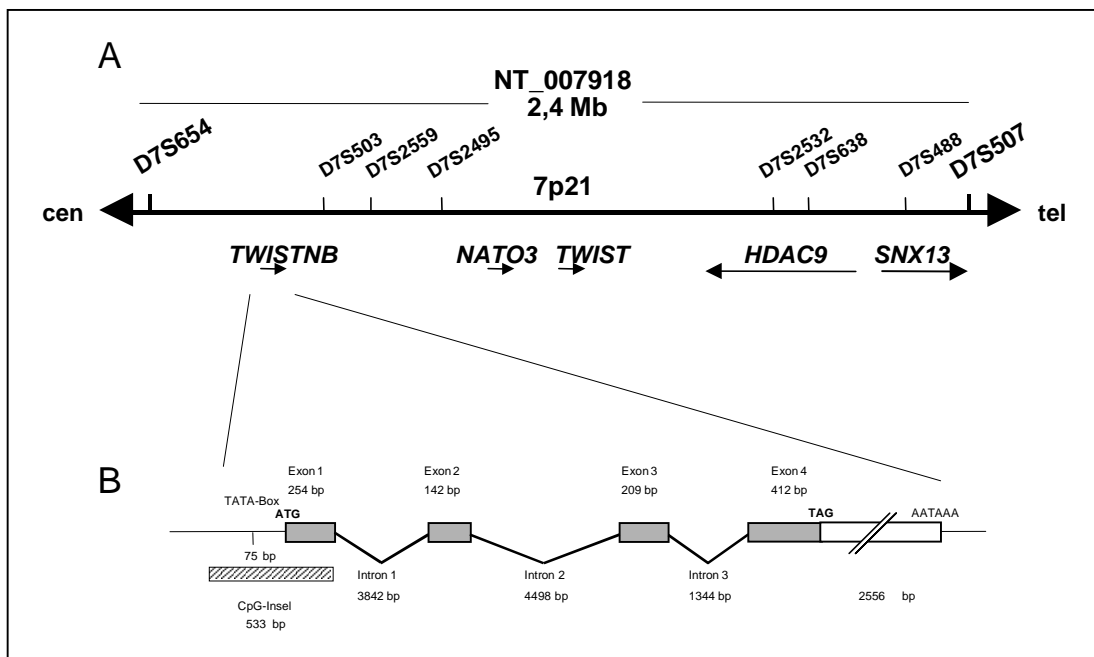
#### **3.3.1 *TWISTNB* als Kandidatengen in der SRO (“smallest region of overlap”) des Mikrodeletionssyndrom 7p21**

Durch seine chromosomale Lokalisation beim Menschen sollte zunächst untersucht werden, ob dieses Gen in der Mikrodeletion 7p21 Region lokalisiert ist und so als Kandidatengen relevant sein könnte (Johnson et al., 1998). Patienten mit dem Mikrodeletionssyndrom 7p21 weisen zusätzlich zur Ausprägung des Saethre-Chatzen Phänotyps eine Lernbehinderung auf, die für andere SCS-Patienten untypisch ist. Deshalb wird vermutet, dass die Veränderung eines oder mehrerer Gene für diesen Phänotyp verantwortlich sein könnte.

Mit Hilfe von Markeranalysen konnten Johnson und Mitarbeiter (1998) den relevanten genomischen Bereich, den kleinsten gemeinsamen Überlappungsbereich (SRO, smallest region of overlap), zwischen den genetischen Markern D7S507 und D7S654 kartieren. Mittels Sequenzinformationen des „Human Genom Projekts“ (HUGO) wurde dieser Bereich auf eine physikalische Strecke von etwa 2,4 Mb eingegrenzt.

Mit Hilfe einer Datenbankanalyse dieser Region wurden mögliche Kandidatengene für den zusätzlichen Phänotyp identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass neben den bekannten Loci für das *Sorting Nexin 13 (SNX13)*-, das *Histon-Deacetylase9 (HDAC9)*- und das *Nephew of Atonal 3 (NATO3)*-Gen, auch ein bisher uncharakterisiertes Transkript, das *LOC221830*-Gen (*TWISTNB*), innerhalb der kleinsten überlappenden deletierten Region (SRO) lokalisiert ist (Abb. 3-20).

*TWISTNB* (*LOC221830*) weist eine große Übereinstimmung zu cDNA-Klonen auf, deren Sequenzinformationen in dem „Unigene Cluster“ Hs.55896 zusammengefasst sind. Der transkribierte Bereich wird von 67 cDNA-Klonen repräsentiert, woraus eine mögliche RNA mit einer Länge von 3866 bp (Acc. Nr. XM\_166508) resultiert. Anhand dieser Sequenzinformationen wurde ein offener Leserahmen von 1017 bp, der für ein mögliches Protein mit 338 Aminosäuren codiert, das einem Molekulargewicht von 37,4 kDa entspricht, identifiziert. Dieses putative Protein gehört keiner bekannten Proteinfamilie an und verfügt über keine bekannte funktionelle Domäne. Mit Hilfe der Datenbank PSORT konnte mit einer Wahrscheinlichkeit von 87 % eine Kernlokalisierung vorhergesagt werden. Diese Vermutung einer Kernlokalisierung wird durch einen großen Anteil von Lysinen (K), die das Protein aufweist (Abbildung 3-21), begründet.



**Abbildung 3-20: Genomische Charakterisierung des kleinsten gemeinsamen Überlappungsbereichs (SRO) des Mikrodeletionssyndroms 7p21**

(A) Schematische Darstellung des kleinsten gemeinsamen Überlappungsbereichs (SRO) des Mikrodeletionssyndroms 7p21 zwischen den Markern D7S654 und D7S507 mit Lage und Orientierung der bekannten Gene und informativen Markern in dieser Region.

(B) Genomische Organisation des *TWISTNB*-Gens mit Angabe der Exon- und Intron-Größen, eines putativen Polyadenylierungssignals (2556 bp stromabwärts des Stopp-Codons), einer „TATA“-Box (75 bp stromaufwärts des Start-Codons (ATG)). Eine 533 bp große CpG-Insel befindet sich im Bereich des 1. Exons und des putativen 5'-untranslatierten Bereichs.

Beim Vergleich der Sequenzen der cDNA und der genomischen DNA des menschlichen PAC RP5-978E18 (Acc. Nr. AC004940) zeigte sich, dass der codierende Bereich auf genomischer Ebene aus vier Exons besteht, die durch drei Introns – die alle der GT-AG Regel folgen (Mount, 1982) – getrennt werden. Im 5'-Bereich konnte ein möglicher Transkriptionsstart 41 bp (TSSW) stromaufwärts des Translationstart identifiziert werden. Diese Region wird von einer CpG-Insel, die ein Merkmal für transkribierte Einheiten ist, flankiert. Oberhalb des Transkriptionsstarts befindet sich in einem Abstand von 34 bp eine „TATA“-Box.

Im 3'-Bereich wird ein 2556 bp langer nicht translatierter Bereich, der in einer putativen Polyadenylierungsstelle endet, vorhergesagt. Die genomische Struktur ist in Abbildung 3-20 (B) schematisch dargestellt.

Neben dem codierenden Bereich von *TWISTNB* auf dem menschlichen Chromosom 7p21 konnte mit Hilfe der Datenbank UCSC auf Chromosom 6q14.3 ein prozessiertes Pseudogen identifiziert werden. Dieses Pseudogen zeigt eine Sequenzhomologie von 64 % zur mRNA-Sequenz von *TWISTNB*. Diese Homologie erstreckt sich über eine Länge von etwa 2600 bp, die neben dem codierenden Bereich auch große Abschnitte des 3'-untranslatierten Bereichs umfasst. Es konnte aber kein offener Leserahmen und keine weiteren Merkmale, wie z.B. eine Promotorsequenz, die auf eine transkribierte Einheit hinweisen, identifiziert werden.

### **3.3.1.1 Genomische Organisation und chromosomale Lokalisation des *Twistnb*-Gens der Maus**

Der codierende Bereich des Maus *Twistnb*-Gens wird durch das „Unigene Cluster“ Mm. 196472 repräsentiert. Mit Hilfe einer genomischen Datenbank der Maus am Sanger Institut wurde das *Twistnb*-Gen der Maus auf Chromosom 12 lokalisiert.

Ein Vergleich mit der humanen Region auf Chromosom 7p21 zeigte, dass neben der großen Anzahl repetitiver DNA-Abschnitte auch die Anordnung und Organisation der oben beschriebenen Gene sehr stark konserviert ist. Die Abstände und Orientierung der einzelnen Gene entsprechen in etwa den Abständen auf dem menschlichen Chromosom 7p21. Da es sich bei den genomischen Mausequenzen um vorläufige Sequenzen („Draftsequenzen“) handelt, können die physikalischen Abstände allerdings nicht genau determiniert werden.

Mit Hilfe der genomischen Sequenzen der Maus konnten die Intron-Exon-Strukturen des *Twistnb*-Gens der Maus bestimmt werden. Hierbei zeigte sich, dass die

---

genomische Organisation sehr stark konserviert ist. Exon 1 besteht aus 254 bp (bezogen auf den Translationsstart), das zweite Exon aus 142 bp, das dritte Exon aus 209 bp und nur das Exon 4 der Maus ist um 24 bp länger als das entsprechende menschliche Exon.

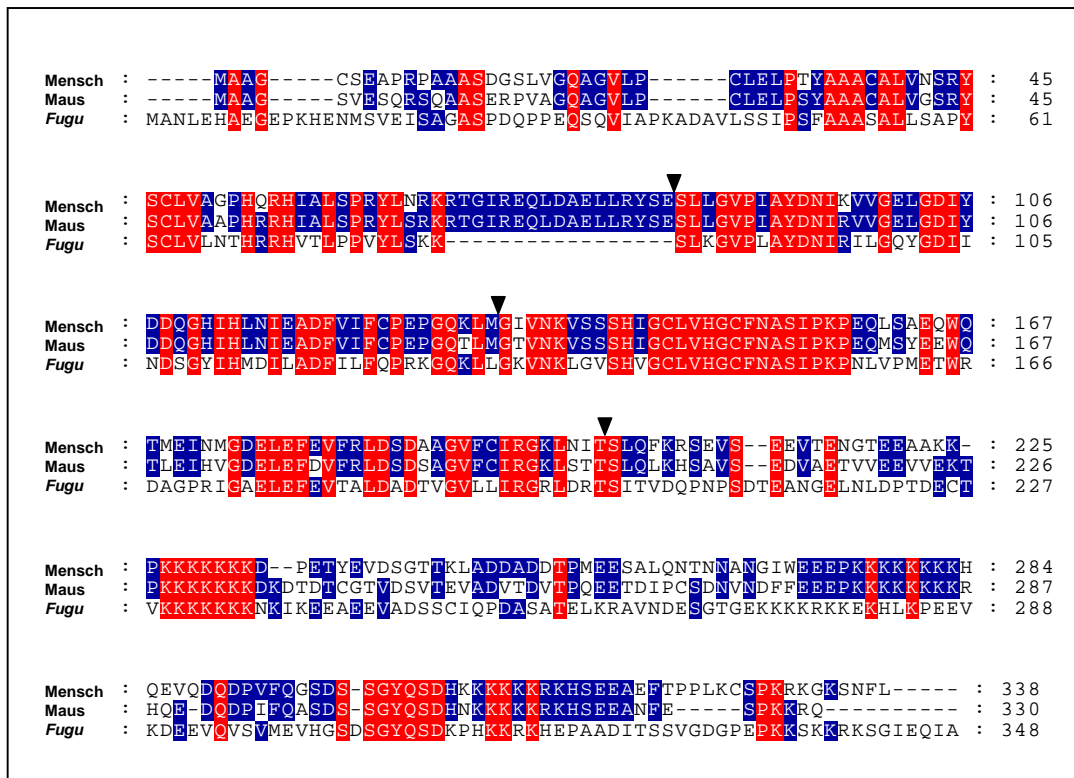
Anhand von Datenbank-Analysen (NIX) und EST Sequenzinformationen wurde für die Maus eine Transkriptgröße von etwa 2,5 kb vorhergesagt. Die vorhergesagte Länge des Transkripts unterscheidet sich vor allem im 3'-untranslatierten Bereich von der menschlichen Transkriptlänge.

### **3.3.1.2 Vergleich der Aminosäuresequenz von TWISTNB bei Mensch, Maus und *Fugu***

In Tabelle 3-4 sind die Sequenzhomologien der Twistnb-Proteine der Spezies Mensch, Maus und *Fugu* aufgeführt.

Die Proteine von Mensch und Maus weisen eine Aminosäure-Sequenzhomologie von 73 % auf. Das TWISTNB-Protein des *Fugu* ist nur zu 34 % homolog zum TWISTNB-Protein des Menschen und zu 35 % homolog zum Protein der Maus.

Betrachtet man den strukturellen Vergleich der Aminosäuren (Abb. 3-21), so zeigt sich, dass die Proteine von Mensch, Maus und *Fugu* einige stark konservierte Bereiche aufweisen. Diese konservierten Bereiche befinden sich im zentralen Bereich der Proteine, wohingegen der N-terminale und der C-terminale Bereich stärker variieren. Anhand der Intron-Positionen, die in Abbildung 3-21 durch Dreiecke markiert sind, zeigt sich, dass der Bereich mit der größten Aminosäuresequenz-Homologie durch die Exons 2 und 3 codiert wird.



**Abbildung 3-21: Sequenzvergleich der TWISTNB-Proteine von Mensch, Maus und Fugu**

Rot unterlegt sind die Aminosäuren, die bei allen drei Spezies identisch sind und blau unterlegt sind Aminosäuren, die bei 2 Spezies konserviert sind. Durch Dreiecke ist die Lage der Introns aller drei Spezies gezeigt.

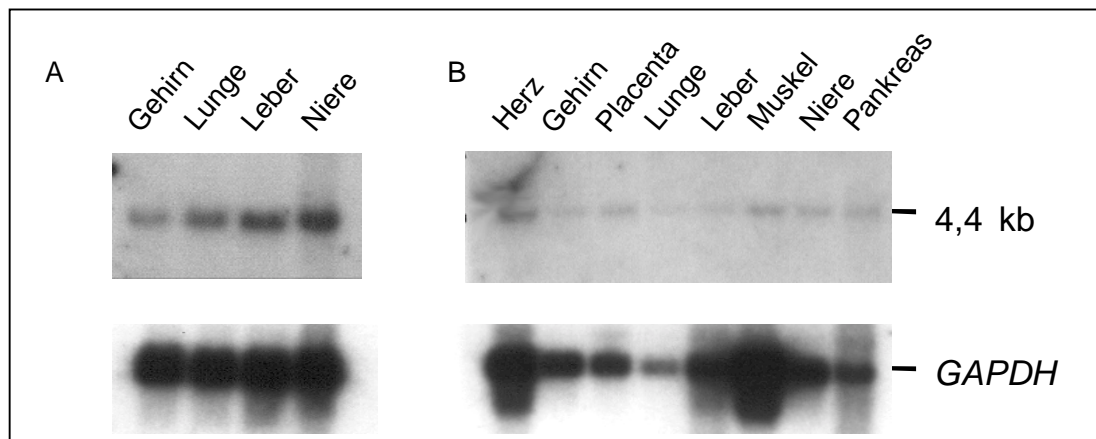
### 3.3.1.3 Expressionsstudien von *Twistnb* bei Mensch und Maus

Um die *in silico* generierten Daten über das *TWISTNB*-Gen zu überprüfen, wurden Expressionstudien bei der Maus und beim Menschen durchgeführt. Hierbei sollten Informationen über die tatsächliche Transkriptgröße und das Expressionsmuster in unterschiedlichen fötalen und adulten Geweben bestimmt werden.

Um Aussagen über eine mögliche Funktion, bzw. ein Expressionsmuster zu machen, wurden Northern-Blot Experimente durchgeführt. Diese Analysen wurden mit humanen „Multiple Tissue Northern Blots“ (Clontech) durchgeführt. Für die Hybridisierungsexperimente wurde der codierende Bereich von *TWISTNB* (Acc. Nr, AW130325) als radioaktiv markierte Probe eingesetzt. Wie in Abbildung 3-22 zu sehen ist, zeigt sich in allen getesteten Geweben eine ubiquitär exprimierte RNA mit einer Größe von ca. 4,3 kb. Zur Kontrolle der Quantität und Qualität der polyA<sup>+</sup>-RNA wurde nach anschließender Dehybridisierung eine Kontrollhybridisierung mit einer Sonde für das ubiquitär exprimierte *GAPDH*-Gen durchgeführt. Weil die RNA-

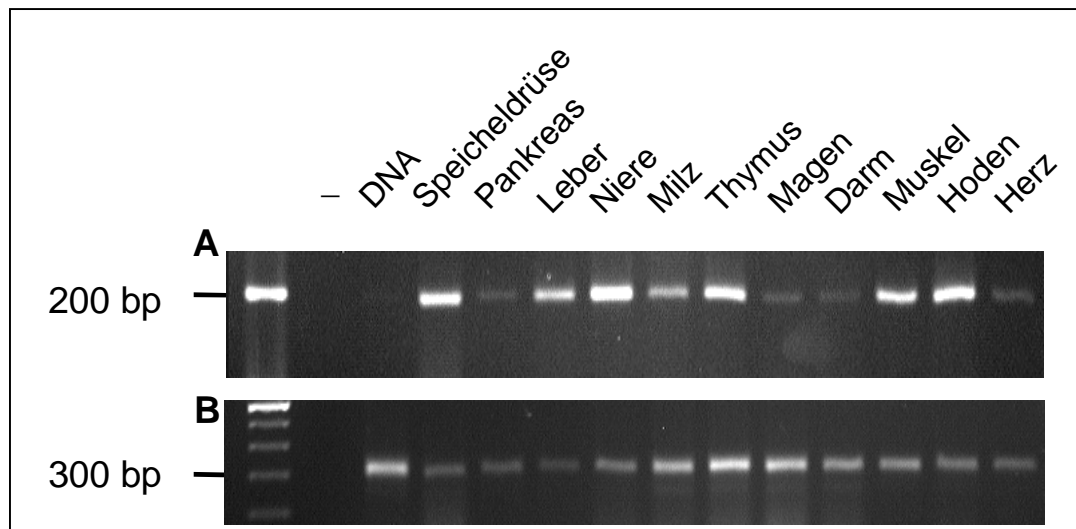


Mengen auf dem Northern-Blot mit den adulten Geweben zum Teil stark variierten, konnte ein Unterschied in der Expressionsstärke nicht bestimmt werden (Abb. 3-22). Um das Expressionsmuster von *Twistnb* bei der Maus zu determinieren, wurden cDNAs aus unterschiedlichen adulten Geweben der Maus bezüglich der *Twistnb*-Expression analysiert. Hierzu wurden 5 µg Gesamt-RNA aus den Geweben der Speicheldrüse, Pankreas, Leber, Niere, Milz, Thymus, Magen, Dünndarm, Muskel, Hoden und Herz mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer PCR-Reaktion überprüft. Die Oligonukleotide („mTwistnb 2F/R“) wurden so generiert, dass sie das zweite Intron überspannen und so nur ein Amplifikat von 197 bp mit cDNA als Ausgangsmaterial ergeben. Zur Kontrolle wurde die cDNA zunächst mit den „mGAPDH 1F/R“ Oligonukleotiden amplifiziert. In Abbildung 3-23 ist das Ergebnis der PCR dargestellt.



**Abbildung 3-22: Expressionsanalyse des humanen *TWISTNB*-Gen in fötalen und adulten humanen Geweben**

Expressionsanalyse von *TWISTNB* in fötalen (A) und adulten (B) humanen Geweben. „Multiple Tissue Northern-Blots“ (Clontech) mit mRNA aus fötalen und adulten Geweben wurde mit einem radioaktiv markiertem cDNA-Fragment (Acc. Nr. AW130325) des *TWISTNB*-Gens hybridisiert. In allen getesteten Geweben konnte eine *TWISTNB*-Expression dedektiert werden. Die Größe des detektierten Transkripts beträgt ca. 4,3 kb. Die Kontrollhybridisierung wurde mit einer radioaktiv markierten Probe für das *GAPDH*-Gen durchgeführt.



**Abbildung 3-23: Expressionsanalysen des *Twistnb*-Gens in unterschiedlichen adulten Mausgeweben**

(A) Expressionsanalyse des murinen *Twistnb*-Gens mittels einer RT-PCR in unterschiedlichen Mausgeweben. Es wurden cDNAs aus Speicheldrüse, Pankreas, Leber, Niere, Milz, Thymus, Magen, Dünndarm, Muskel, Hoden und Herz der Maus mit den Oligonukleotiden „mTwistnb 2F/R“ in einer PCR mit 26 Zyklen analysiert. Es konnte in allen getesteten Geweben ein Signal mit einer Größe von 197 bp nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde zum einen eine PCR ohne Ausgangsmaterial und zum anderen eine mit genomischer Maus-DNA (Fragmentgröße auf genomischer DNA: 4039 bp) durchgeführt. In beiden Negativkontrollen konnte kein spezifisches Signal detektiert werden.

(B) Zur Kontrolle wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden „mGAPDH 1F/1R“ durchgeführt. Es konnte in allen getesteten Geweben ein 300 bp großes Signal detektiert werden.

Die Expressionsanalysen zeigen bei den untersuchten Geweben von Mensch und Maus für das *TWISTNB*-Gen eine ubiquitäre Expression. Sowohl die Datenbankanalysen als auch die Expressionsexperimente konnten keinen weiteren Aufschluss über eine mögliche Funktion des resultierenden Proteins geben.

Anhand der Lokalisierung zwischen den Markern D7S654 und D7S507 konnte dieses Gen, neben dem *Sorting Nexin 13*-, dem *Histon-Dacetylase 9*- und *Nephew of Atonal 3*-Gen, innerhalb der SRO für das Mikrodeletionssyndrom 7p21 kartiert werden.

## 4. Diskussion

Das Saethre-Chatzen Syndrom (SCS) ist eine autosomal-dominant vererbte Entwicklungsstörung, die innerhalb der Gruppe der Craniosynostosen zu den Acrocephalosyndactyliien (ACS) gezählt wird. Die phänotypischen Merkmale des Saethre-Chatzen Syndroms sind Brachycephalie, die meist durch einen vorzeitigen Verschluss einer bzw. beider Kranznähte hervorgerufen wird. Hierzu kommen faciale Anomalien und Fehlbildungen der Extremitäten, zumeist cutane Syndactyliien zwischen den zweiten und dritten Fingern bzw. Zehen. Als krankheitsverursachendes Gen konnte 1997 von zwei Arbeitsgruppen das humane *TWIST*-Gen identifiziert werden (El Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997). Das humane *TWIST*-Gen codiert einen Transkriptionsfaktor mit einer basischen Helix-Loop-Helix Domäne, der bis zu den Invertebraten stark konserviert ist (Wolf et al., 1991; Bourgeois et al., 1996; Wang et al., 1997; Spring et al., 2000). Neben intragenischen „nonsense“- und „missense“-Mutationen wird das Saethre-Chatzen Syndrom auch durch chromosomale Deletionen und Translokationen, die bis zu 250 kb stromabwärts des *TWIST*-Gens lokalisiert sind, verursacht (Lewanda et al., 1994; Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997; Johnson et al., 1998).

Patienten, die größere chromosomale Deletionen aufweisen, zeigen zusätzlich zu den phänotypischen Merkmalen des Saethre-Chatzen Syndroms eine mentale Retardierung (Johnson et al., 1998). Da dieser zusätzliche Phänotyp nicht allein auf das Fehlen des *TWIST*-Gens zurückgeführt werden kann, wird vermutet, dass durch diese Deletionen mindestens noch ein weiteres Gen betroffen ist.

El Ghouzzi und Mitarbeiter (2000) demonstrierten für eine Reihe von intragenischen Mutationen eine Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit des *TWIST*-Proteins. So konnte für einige „nonsense“-Mutationen gezeigt werden, dass diese einen vorzeitigen Abbau des Proteins nach sich ziehen. „Missense“-Mutationen in der maßgeblich an der Heterodimerisierung beteiligten Helix-Loop-Helix Domänen des *TWIST*-Proteins, können einen zelluläre Fehlverteilung bewirken, welche vermutlich auf eine reduzierte Bindungsfähigkeit an einen Heterodimerisierungspartner (z.B. E12-Protein) zurückzuführen ist.

Die phänotypischen Merkmale lassen sich somit durch eine funktionelle Haploinsuffizienz - also durch den Funktionsverlust einer Kopie des *TWIST*-Gens - erklären.

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich nun die Frage, wie Translokationsereignisse, die den codierenden Bereich des *TWIST*-Gens nicht betreffen, ebenfalls zu einem Funktionsverlust des *TWIST*-Gens führen. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnte ein sogenannter „Positionseffekt“ sein. Hierbei handelt es sich um ein Translokationsereignis, durch welches das entsprechende Gen aus seiner ursprünglichen, transkriptionell aktiven Umgebung (Euchromatin) in einen transkriptionell inaktiven Bereich (Heterochromatin) gebracht wird (Bedell et al., 1996). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bietet die räumliche Trennung des humanen *TWIST*-Gens von *cis*-regulatorischen Elementen, die an seiner transkriptionellen Regulation beteiligt sind. Für einige humane Gene konnte die zuletzt genannte Theorie bestätigt werden. So befindet sich die Lokus-Kontroll-Region (LCR: Locus control region) des  $\beta$ -Globulin Gens 50-65 kb stromaufwärts des Genloki (Li et al., 1999). Für das *IL5*-Gen konnte ein „Enhancer“-Element 120 kb stromaufwärts des Gens gefunden werden (Loots et al., 2000).

Über die transkriptionelle Regulation des humanen *TWIST*-Gens war bisher wenig bekannt. Von Wang und Mitarbeitern (1997) wurde der Transkriptionsstart des *TWIST*-Gens 317 bp stromaufwärts des Translationsstartpunkts identifiziert, so dass erste Anhaltspunkte über die mögliche Promotorregion gewonnen werden konnten.

Neben der putativen Promotorregion des *TWIST*-Gens könnten vermutlich weit entfernte regulatorische Sequenzabschnitte im 3'-Bereich des Gens an der transkriptionellen Regulation beteiligt sein. Da solche „Enhancer“- bzw. „Silencer“-Elemente häufig zwischen den einzelnen Spezies stark konserviert sind, bietet beispielsweise der Vergleich genomischer Sequenzabschnitte unterschiedlicher Spezies eine Möglichkeit zur Identifizierung evolutionär konservierter, regulatorischer Elemente.

Eine Eingrenzung auf regulatorisch relevante Sequenzabschnitte gestaltet sich allerdings äußerst schwierig, wenn, wie zum Beispiel bei Mensch und Maus, relativ viele nicht-codierende genomische Sequenzabschnitte zwischen diesen beiden Spezies konserviert sind (Hardison et al., 1997; Loots et al., 2000). Das Genom des *Fugu* bietet für diese Untersuchungen eine Reihe von Vorteilen.

Das haploide Genom des *Fugu* besteht aus 400 Mb und entspricht damit in etwa einem Siebtel des menschlichen Genoms (3000 Mb), verfügt aber über eine annähernd gleiche Anzahl von Genen (Brenner et al., 1993). Zusätzlich sollte die

evolutionäre Distanz von ca. 450 Millionen Jahren gewährleisten, dass nur funktionell essentielle Sequenzabschnitte konserviert sind.

Zur Identifizierung solcher putativer regulatorischer Sequenzabschnitte wurde in dieser Arbeit der genomische Bereich der *Twist*-Region des japanischen Kugelfisches *Fugu rubripes rubripes* identifiziert und analysiert. Neben der Identifizierung möglicher regulatorischer Elemente in der 3'-Region von *TWIST* konnten auch neue Erkenntnisse über konservierte Abschnitte innerhalb des Twist-Proteins gewonnen werden. Zusätzlich wurde ein bisher nicht charakterisiertes Gen, welches als Kandidatengen für das Mikrodeletionssyndrom 7p21 in Frage kommt, identifiziert.

#### 4.1 Konservierte Elemente der Twist-Proteine

Durch die Identifizierung des *Fugu-Twist*-Gens wurde ein weiterer Vertreter der Vertebraten *Twist*-Gene beschrieben. Dem *Fugu-Twist*-Gen konnte ein offener Leserahmen von 552 bp, der für ein Protein mit 183 Aminosäuren codiert, zugeordnet werden. Aufgrund der großen evolutionären Distanz - der gemeinsame Ursprung liegt ca. 450 Millionen Jahre zurück - konnten durch Sequenzvergleiche auf Aminosäureebene konservierte Motive gefunden werden.

In Abbildung 3-5 ist zu erkennen, dass vor allem der C-terminale Bereich der Twist-Proteine, in dem u.a. die basische Helix-Loop-Helix Domäne und das sogenannte WR-Motiv lokalisiert sind, innerhalb der Vertebraten stark konserviert ist (Spring et al., 2000). Durch *in vitro* Analysen konnten die Relevanz der basischen Helix-Loop-Helix Domäne für die Heterodimerisierung und die DNA-Bindung gezeigt werden. Wie bei den meisten bHLH-Proteinen ist auch beim Twist-Protein die basische Domäne essentiell für die DNA-Bindung (Spicer et al., 1996). Für die Interaktion mit unterschiedlichen Dimerisierungspartnern spielen definierte Bereiche dieser Region ebenfalls eine essentielle Rolle (Spicer et al., 1996; Hamamori et al., 1997). Die Helix-Loop-Helix Domäne alleine ermöglicht die Bindung an das E12-Protein, wohingegen für die Heterodimerisierung des Twist-Proteins mit MyoD zusätzlich noch die basische Domäne benötigt wird (Hamamori et al., 1997). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben der Helix-Loop-Helix Domäne auch der C-terminale Bereich, der die WR-Domäne enthält, entscheidend für die Interaktion von Twist und MEF2 ist (Spicer et al., 1996).

Der in Bezug auf die basische Helix-Loop-Helix Domäne N-terminal gelegene Bereich weist hingegen nur kurze konservierte Abschnitte auf und ist funktionell wenig charakterisiert.

Zwei im aminoterminalen Bereich des Twist-Proteins identifizierte Kernlokalisationssignale (NLS1 und NLS2; Abb. 3-5) sind zwischen den einzelnen Spezies zum Teil stark konserviert. Trotz bestehender Unterschiede auf Aminosäureebene ist die Konsensussequenz dieser potentiellen Kernlokalisationssignale, welche sich durch die Abfolge von vier Argininen (R) bzw. Lysin (K) innerhalb eines Hexapeptids definiert (Boulikas, 1994), bei den untersuchten Spezies nicht beeinträchtigt. Ob es sich bei diesen putativen Kernlokalisationssignalen um funktionelle Kernimportsignale handelt, muss durch weitere Analysen gezeigt werden. Erste Hinweise auf die Funktionalität dieser Sequenzabschnitte lieferten Deletions-Experimente in der Arbeitsgruppe von HD Dr. J. Kunz. TWIST-Proteine mit deletierten NLS-Sequenzen zeigten im Vergleich zum Wildtyp-TWIST-Protein eine veränderte zelluläre Lokalisation (Godmann, 2001).

Des Weiteren konnte durch den Sequenzvergleich ein aus fünf Aminosäureresten bestehendes Motiv (NSE-Domäne; Abb. 3-5) identifiziert werden, das bei allen untersuchten Twist-Proteinen zu 100 % konserviert ist. Für diesen Sequenzabschnitt konnte anhand von Datenbankanalysen (Prosite) keine potentielle Funktion festgestellt werden. Auszuschließen ist für das NSE-Motiv jedoch eine Funktion als Kernlokalisationssignal, da Deletionskonstrukte, bei denen die ersten 33 Aminosäuren entfernt wurden, die gleiche subzelluläre Lokalisation wie das Wildtyp-TWIST-Protein aufwiesen und letztendlich im Nukleus detektiert wurden (Godmann, 2001). Ebenso spielt dieses Motiv keine Rolle für die bekannte Bindung an weitere Cofaktoren. Hamamori und Mitarbeiter (1999) haben für das murine Twist-Protein bewiesen, dass die Aminosäuren 30-60 des N-terminale Bereichs für die Bindung an die Histon-Acetyltransferase p300 essentiell sind. Eine funktionelle Relevanz des NSE-Motivs ist aber aufgrund seiner starken Konserviertheit als wahrscheinlich anzunehmen.

Ein weiteres Charakteristikum des humanen TWIST-Proteins wird durch die Glycin-reiche Domäne repräsentiert, die jedoch nur bei den höheren Vertebraten vorhanden ist (Abb. 3-5). Die Funktion solcher Glycin-reicher Domänen ist weitestgehend unbekannt, doch konnte am Beispiel des hnRNP A1-Protein, einem prä-mRNA bindenden Protein, eine Relevanz solcher Domänen für die nukleäre Lokalisation

gezeigt werden (Bonifaci et al., 1997). Jedoch kann aufgrund der Annahmen, dass funktionelle Domänen innerhalb aller Vertebraten konserviert sind, eine Relevanz dieses Sequenzabschnitts als potentiell Kernlokalisierungssignal ausgeschlossen werden. Hierfür spricht ebenfalls, dass die Länge dieser Glycin-reichen Region beim Menschen sehr variabel ist. Elanko und Mitarbeiter (2001) haben demonstriert, dass weder eine Deletion von 18 bp noch eine Insertion von bis zu 21 bp in dieser Region mit dem Saethre-Chatzen Syndrom assoziiert werden können.

#### 4.2 Charakterisierung der *Twist*-flankierenden Region bei *Fugu*

Zur Identifizierung und Charakterisierung konservierter, nicht-codierender Sequenzabschnitte, die an der Regulation des *TWIST*-Gens beteiligt sein könnten, wurde der entsprechende genomische Bereich des *Fugu* auf seine konservierte Homologie untersucht. Die Analyse ergab, dass die Syntanie nur zu einem gewissen Teil erhalten ist. Im 5'-Bereich des *Fugu-Twist*-Gens konnten die Gene *Nato3*, *Twistnb* und *LOC168829* identifiziert werden, die sich in gleicher Reihenfolge und Orientierung auf dem humanen Chromosom 7p21 befinden.. Die intergenischen Abstände sind bei *Fugu* im Vergleich zu den Abständen beim Menschen stark verkürzt, wobei die Komprimierung des Genoms zwischen den einzelnen Genen selbst stark variiert. Beispielsweise ist der Abstand zwischen *LOC168829* und *Twistnb* bei *Fugu* um den Faktor 9 und zwischen *Nato3* und *Twist* um den Faktor 18 komprimiert. Diese starken Komprimierungen entsprechen den Erwartungen, da das Genom des *Fugu* trotz gleicher Genanzahl nur ein Siebtel der Größe des humanen Genoms besitzt (Brenner et al., 1993). Das *Fugu*-Genom weist, ähnlich wie das humane Genom, Regionen auf, die in der Anzahl der Gene stark variieren (Aparicio et al., 2002). Daher könnten auch verschieden genomische Regionen unterschiedlich stark komprimiert sein. So konnte für den homologen Bereich des Alzheimer-Krankheits- Locus 3 (Alzheimer disease locus 3: AD3 Locus) bei *Fugu* für die Gene eine konservierte Syntanie gezeigt werden (*FOS*, *S3liii125* und *S20i15*). Diese drei Gene befinden sich bei *Fugu* auf einer genomischen Strecke von 12,4 kb, wohingegen sich die entsprechenden humanen Gene über eine genomische Strecke von mehr als 600 kb verteilen, was einer Komprimierung um den Faktor 48 entspricht (Trower et al., 1996)

Betrachtet man zum Beispiel den Abstand zwischen *Twistnb* und *Nato3*, so ist dieser um den Faktor 83 komprimiert. Dieser stark abweichende Wert ist vermutlich auf den hohen Anteil an repetitiven Sequenzabschnitten in dieser Region beim Menschen zurückzuführen.

Durch die Analyse der 3'-Region des *Twist*-Gens konnte bei *Fugu* das *Snx13*-, das *Btd*- und das *KIAA0379*-Gen identifiziert werden. Die humanen homologen Gene für die *Biotinidase* (*Btd*) und das *KIAA0379* befinden sich in der humanen chromosomalen Region 3p25. Beide Genen liegen beim Menschen sowie bei *Fugu* in gleicher Abfolge und entsprechender Orientierung vor. Die Komprimierung um einen Faktor sechs entspricht in etwa dem, was durch die Charakterisierung des *Fugu*-Genoms vorhergesagt wurde (Brenner et al., 1993).

Das *SNX13*-Gen ist beim Menschen ebenfalls in der chromosomalen Region 7p21 lokalisiert, jedoch befindet sich zwischen *TWIST* und *SNX13* noch das Gen für die *Histone Deacetylase 9* (*HDAC9*), welches bei *Fugu* nicht identifiziert werden konnte. Neben dem hohen Anteil an repetitiver DNA-Sequenz in dieser Region trägt auch das Fehlen des *HDAC9*-Gen bei *Fugu* zu einer starken Verkürzung der intergenischen Abstände bei, da der codierende Bereich sich über eine genomische Strecke von ca. 500 kb beim Menschen erstreckt. Das *SNX13*-Gen befindet sich beim Menschen ca. 1,3 Mb im 3'-Bereich von *TWIST*, wobei der Abstand bei *Fugu* nur 12,8 kb beträgt, was einer Komprimierung um den Faktor 103 entspricht.

Der Vergleich von anderen humanen genomischen Regionen mit *Fugu*-Sequenzabschnitten zeigte, dass trotz einer hohen Homologie solche Veränderungen in der Genabfolge häufiger vorkommen, als ursprünglich vermutet. Die Ursache dieser veränderten Genabfolge beruht auf chromosomalen Rearrangements, wobei es sich häufig um Inversionen handelt (Gilley und Fried, 1999). Betrachtet man das *Twist*-Gen und das *Snx13*-Gen bei *Fugu* und Mensch, so ist zu erkennen, dass beide Gene in gleicher Orientierung vorliegen und somit ein Inversionsereignis als Ursache für das „Fehlen“ des *HDAC9*-Gens bei *Fugu* ausgeschlossen werden kann.

Das „Fehlen“ des *Fugu HDAC9*-Gens könnte aber auch auf Unterschiede in der genetischen Ausstattung beider Genome zurückzuführen sein. In der kürzlich bekannt gewordenen genomischen *Fugu* Sequenz konnte gezeigt werden, dass für etwa 25 % der menschlichen Gene keine Homologen bei *Fugu* existieren. Es besteht folglich die Möglichkeit, dass das *HDAC9*-Gen bei *Fugu* nicht vorhanden ist (Aparicio et al., 2002). Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt



werden, dass die genomische *Twist*-Region zwischen *Fugu* und Mensch stark konserviert ist. Allerdings erstreckt sich diese Homologie nur über einen begrenzten genomischen Bereich. Dieses Resultat konnte auch durch die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bestätigt werden. Die analysierten *Fugu* Gene (*MEST-COPG2*; *Twist*), deren Homologe sich beim Menschen auf Chromosom 7 befinden, zeigten bei *Fugu* Signale auf unterschiedlichen Metaphase-Chromosomen, so dass keine konservierte Homologie über einen größeren genomischen Bereich auftritt.

Aufgrund von Homologievergleichen der korrespondierenden genomischen Regionen bei *Fugu* und Mensch konnte gezeigt werden, dass die Konservierung der Genabfolge sich in der Regel nur auf kurze genomische Bereiche beschränkt (Gilley et al., 1997; Gilley und Fried, 1999). Meist liegen sogar nicht mehr als drei bis vier Gene in der gleichen Reihenfolge vor (Aparicio et al., 2002).

Vergleicht man die genomische Struktur der identifizierten *Fugu*-Gene mit der Beschaffenheit der homologen menschlichen Gene, erkennt man, dass die Intron-Exon Strukturen über weite Teile ebenfalls stark konserviert sind. Während der Großteil der Exons beim Menschen und bei *Fugu* identische Größen aufweist, sind die meisten Introns stark komprimiert. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen humanen Introngrößen und dem Grad der Intron-Komprimierung bei *Fugu* festgestellt werden.

Zusätzlich konnte für das Intron 6 des *Snx13*-Gens gezeigt werden, dass dieses beim *Fugu* größer ist als der humane homologe Bereich (Tab.: 3-5). Ähnliche Strukturen sind beispielsweise für das *Topoisomerase 1*-Gen (*Top1*) gezeigt worden. Hierbei konnte für die meisten Introns bei *Fugu* ebenfalls eine starke Komprimierung gezeigt werden, wobei diese nicht mit der Größe der Introns korreliert. Neben dieser Beobachtung konnte für ein Intron des *Top1*-Gens gezeigt werden, dass dieses bei *Fugu* größer ist als sein menschliches Homolog (Smith et al., 2001).

Allerdings existieren auch Unterschiede in der Anzahl der Exons zwischen Mensch und *Fugu*. So konnten bei *Fugu* Gene identifiziert werden, die sowohl mehr (*Btd*) als auch weniger (*Snx13*; *KIAA0379*) Introns als ihre humanen Homologen aufweisen (Tab.: 3-5 und 3-6). Unterschiede in der Anzahl der Introns zwischen Mensch und *Fugu* sind auch bei anderen Genen identifiziert worden. So konnte beispielsweise Venkatesh und Mitarbeiter (1999) für sieben Gene (z.B. *RAG1*-Gen) zeigen, dass diese bei *Fugu* Introns aufweisen, die bei den humanen homologen Genen fehlen.

Ebenso konnten Gene identifiziert werden (*NUPI55*-Gen), die bei *Fugu* weniger Exons aufweisen als ihre humanen homologen Gene (Zhang et al., 2002).

Durch die Sequenzierung des *Fugu*-Genoms konnten für solche Unterschiede weitere Beispiele gefunden werden. Für 317 intronlose menschliche Gene konnten bei den Homologen von *Fugu* ein oder mehrerer Introns identifiziert werden. Ebenso konnte für 327 intronlose *Fugu* Gene menschliche Homologe mit einem oder mehreren Introns detektiert werden (Aparicio et al., 2002).

Letztendlich jedoch verdeutlicht diese starke Konservierung von Intron-Exon-Übergängen die Aufrechterhaltung von Mechanismen, die an der Gen-Expression beteiligt sind. Darüber hinaus könnte eine veränderte Anzahl von Introns neue Anhaltspunkte über die Verwandtschaftsgrade einzelner Spezies liefern (Venkatesh et al., 1999), da zumindest für einigen Introns eine Neuentstehung innerhalb der einzelnen Linien angenommen werden kann.

#### **4.3 Identifizierung konservierter nicht-codierender Sequenzabschnitte innerhalb der *Twist*-flankierenden Regionen**

Für eine Reihe von Patienten mit Saethre-Chotzen Syndrom konnten Translokationsereignisse im 3'-Bereich des *TWIST*-Gens als Ursache für die Ausprägung der phänotypischen Merkmale identifiziert werden (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997). Die Abtrennung eines oder mehrerer *cis*-regulatorischer Elemente proximal des *TWIST*-Gens könnte dabei eine plausible Erklärung für die Ausprägung des Phänotyps sein. Die Bruchpunkte befinden sich zwischen 5 und 250 kb stromabwärts des *TWIST*-Gens (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997).

Durch den Vergleich nicht-codierender Sequenzabschnitte der *Twist* flankierenden genomischen Regionen bei Mensch und *Fugu* konnten vier konservierte Sequenzabschnitte, die sich alle im 3'-Bereich von *Twist* befinden, identifiziert werden (Abb. 3-8). Der Abstand der identifizierten konservierten Elemente liegt beim Menschen zwischen 148,2 kb und 322,8 kb (Tab. 3-8) stromabwärts des Stopp-Codons des *TWIST*-Gens.

Für drei dieser konservierten Sequenzabschnitte konnten durch Datenbankanalysen Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die bei beiden Spezies vorlagen, ausfindig gemacht werden. Beispielsweise konnten hier Bindestellen für die

Transkriptionsfaktoren „GF11“, „NKX-2.5“, „MEF2“ und „PAX4“ identifiziert werden.

Innerhalb dieser vier identifizierten Transkriptionsfaktoren, kommt vermutlich „MEF2“ („Myoocyte-Specific Enhancer-Binding Faktor 2“), aufgrund seiner bekannten Funktion, am ehesten für eine *TWIST*-Regulation in Frage. „MEF2“ bindet in myogenen Geweben an Enhancer-Elemente von muskelspezifischen Genen und aktiviert so deren Transkription (Gossett et al., 1989). Da eine *TWIST*-Expression ebenfalls in mesodermalen Geweben nachgewiesen werden konnte, wäre so eine Regulation durch „MEF2“ denkbar. „NKX-2.5“, das als das Homologe zu *tinman* bei *Drosophila* gilt (Chen und Schwartz, 1995), wäre ebenfalls ein mögliches Kandidatengen, das an der Aktivierung von *TWIST* beteiligt ist. Bei *Drosophila* konnte ein direkter Zusammenhang zwischen *twist* und *tinman* gezeigt werden, allerdings wird hier die Transkription von *tinman* durch *Twist* reguliert (Bodmer et al., 1990; Lee et al., 1997). Auszuschließen ist vermutlich die Aktivierung von *TWIST* durch „GF11“ oder „PAX4“, da für beide Gene eine reprimierende Wirkung postuliert wird. Zusätzlich konnte die Funktion dieser beiden Gene auf bestimmte Gewebe eingeschränkt werden. „GF11“ spielt als Repressor eine Rolle in der T-Zell Entwicklung (Zweidler-Mckay et al., 1996) und „PAX4“ ist ein transkriptioneller Repressor während der frühen Pankreasentwicklung (Smith et al., 1999).

Der Sequenzvergleich der genomischen *Twist*-Region zwischen *Fugu* und Mensch zeigte, dass sich im 3'-Bereich des *TWIST*-Gens nicht-codierende Sequenzabschnitte befinden, die zwischen beiden Spezies stark konserviert sind. Diese Elemente können erste Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen sein. So könnte die Identifizierung von „*DNaseI* Hypersensitiven Stellen“, die als ein Merkmal für transkriptionell aktive Regionen gelten, weiteren Aufschluss über die Relevanz dieser Regionen bringen. Ferner könnte die Funktionalität dieser Elemente im zellulären System analysiert werden. Hierzu werden die zu untersuchenden Sequenzabschnitte in einen Reporter-genvektor eingebracht, der unter der Kontrolle des basalen *TWIST*-Promotors exprimiert wird. Eine Veränderung der Expressionsstärke des Reportergens könnte Klarheit über die funktionelle Relevanz eines oder mehrerer DNA-Elemente liefern.

Da „Enhancer“-Elemente zwar unabhängig vom Abstand zum jeweiligen Promotor funktionell sind, jedoch für eine genaue Regulation des Zielgens meist spezifisch mit dem entsprechenden Promotor interagieren müssen (Li und Noll, 1994; Merli et al., 1996; Ohtsuki et al., 1998), spielt die Beschaffenheit des humanen *TWIST*-Promotors für diese Untersuchungen eine wichtige Rolle. Für die spezifische Aktivierung müssen Proteine, die an „Enhancer“-Elemente binden, in Wechselwirkung mit Promotor-assoziierten Proteinen treten.

#### **4.4 Identifizierung regulatorischer Sequenzabschnitte in der Promotorregion des humanen *TWIST*-Gens**

Die transkriptionelle Genregulation bietet eukaryoten Organismen die Möglichkeit zu einer spezifisch räumlichen und zeitlichen Genexpression. Entscheidend für diese transkriptionelle Regulation sind die Promotoren. Hierbei handelt es sich um definierte Sequenzabschnitte, die für das Binden von Faktoren, welche die Transkription der jeweiligen Gene regulieren, essentiell sind. Die meisten Promotoren befinden sich in der Region des Transkriptionsstarts, wohingegen weiter von einem Promotor entfernte Sequenzelemente an der spezifischen Transkription beteiligt sind (Paranjape et al., 1994; Kornberg und Lorch, 1995; Gottesfeld und Forbes, 1997; Grunstein, 1997).

Wang und Mitarbeitern (1997) identifizierten den Transkriptionsstart des humanen *TWIST*-Gens durch „*RNase*-Schutz Experimente“ und „*S1*-Nuklease-Spaltung“ 317 bp stromaufwärts des Translationsstarts. In dieser Arbeit wurden im putativen Promotor-Bereich (824 bp) zwei „TATA“-Boxen an Position -110 und -32 identifiziert. Wobei nur die „TATA“-Box an Position -32 aufgrund ihrer Entfernung zum Transkriptionsstart, als funktionelle „TATA“-Box deklariert wurde. Bei fast allen Eukaryoten befindet sich die „TATA“-Box in einem definierten Abstand von 25-30 bp zum Transkriptionsstart (siehe Review: Struhl, 1995). Eine typische „TATA“-Box weist eine Consensus-Sequenz von „TATAAA“ auf, so dass für die „TATA“-Box an Position -32, die die Sequenzabfolge „TATAA“ aufweist, keine 100 %ige Übereinstimmung besteht. Für „TATA“-Boxen anderer Gene konnte, trotz einer Abweichung von der Consensus-Sequenz, eine Funktionalität nachgewiesen werden. Allerdings ist die Aktivität dieser „TATA“-Boxen reduziert (Hahn et al., 1989; Singer et al., 1990; Wobbe und Struhl, 1990). Obwohl durch den Vergleich

der humanen bzw. murinen Promotorregion mit der putativen Promotorregion bei *Fugu* keine konservierten Sequenzabschnitte identifiziert werden konnten, weist die Promotorregion des *Fugu* ebenfalls eine „TATA“-Box an Position -27 auf. Die „TATA“-Box des *Fugu* besitzt die gleiche Nukleotidsequenz, wie die identifizierte „TATA“-Box an Position -32 des humanen *TWIST*-Promotors. Da innerhalb der Promotor-Region des *Fugu-Twist*-Gens keine weiteren „TATA“-Boxen gefunden werden konnte und regulatorische relevante Sequenzabschnitte innerhalb der Vertebraten konserviert sind, bestätigen diese Beobachtung die Vermutung von Wang und Mitarbeitern (1997), dass es sich bei der „TATA“-Box an Position -32 des humanen *TWIST*-Promotors um eine funktionelle „TATA“-Box handelt - auch wenn diese nicht zu 100 % der Consensus-Sequenz „TATAAA“ entspricht.

Zur Untersuchung der putativen Promotorregion von *TWIST* wurden unterschiedlich große Promotor-Fragmente in Reporter-gen-Vektoren (pGL3-Basic, Promega) inseriert und auf ihre Funktionalität in Transfektionsexperimenten in humanen Zellen analysiert.

In ersten Untersuchungen konnte für das „782 bp-Promotor-Konstrukt“ eine aktivierende Wirkung auf das Reporter-gen (*Luciferase*) nachgewiesen werden. Das „461 bp-Promotor-Konstrukt“ hingegen weist eine deutlich reduzierte Reporter-gen-aktivität auf. Da die ermittelten relativen Luciferase-Werte in den *TWIST*-exprimierenden (OHS) und nicht-exprimierenden (CCL-136) Zellen nahezu identisch waren, kann eine zellspezifische Regulation allerdings ausgeschlossen werden (Breitenbücher, 1998). Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass diese Experimente mit einer relativ großen DNA-Mengen (1µg Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz) durchgeführt wurden und somit eine artifizielle Aktivierung des Reporter-gens nicht ausgeschlossen werden kann.

Zur Identifizierung funktioneller Sequenzabschnitte, die an der spezifischen Regulation von *H-TWIST* beteiligt sind, wurde ein Bereich von 3,8 kb analysiert, der neben dem 5'-untranslatierten Bereich weitere 3,5 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts repräsentiert. Zusätzlich wurde für diese Experimente die eingesetzte DNA-Menge um den Faktor 10 reduziert (100 ng Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz).

Die Analyse dieser generierten Promotor-Konstrukte ergab sowohl in den *TWIST*-exprimierenden Zellen (OHS) als auch in den nicht-exprimierenden Zellen (CCL-136) eine Aktivierung des Reporter-gens durch das „782 bp-Promotor-Konstrukt“

sowie eine reduzierte Aktivierung durch das „461 bp-Promotor-Konstrukt“. Die beobachtete transkriptionelle Regulation kann aufgrund dessen auch auf eine deutlich reduzierte DNA-Menge zurückgeführt werden. Eine weitere Verkürzung des „782 bp-Promotor-Konstrukts“ um die Bereiche, die sich unmittelbar vor dem Transkriptionsstart befinden, ergab keine Aktivierung des Reportergens („355 bp-Promotor-Konstrukt“), so dass dieser Bereich zwar wichtige Sequenzabschnitte enthält, die für die aktivierende Wirkung des „782 bp-Promotor-Konstrukts“ verantwortlich sind, allein jedoch keine Aktivierung nach sich zieht.

Durch den Sequenzvergleich dieser korrespondierenden Regionen bei Mensch und Maus konnten drei stark konservierte Sequenzabschnitte (E1-E3) identifiziert werden. Die Elemente 1 und 2 befinden sich in der Region, die zwar für die transkriptionelle Regulation benötigt werden, aber selbst keine gesteigerte Aktivierung des Reportergens bewirken können. Dieser Bereich, der als basaler Promotorbereich angesehen werden kann, weist einige konservierte Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf, die für die Anlagerungen von Faktoren des basalen Promotor-Komplexes wichtig sein können. Beispielsweise sind in dieser Region Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren „ATF“, „EGRF“, „SOX5“, „NF- $\kappa$ B“, „STAT“ und eine „CAAT“-Box lokalisiert. Die Transkriptionsfaktoren „ATF“ („Activating Transcription Faktor 1“; Yoshida et al., 1998), „EGFR“ („Early Growth Gene Response Faktor“; Swirnow und Milbrandt, 1995) und „STAT“ („Signal Transducer and Activator of Transcription Factor“; Horvath et al., 1995) können als allgemeine Transkriptionsfaktoren angesehen werden, da sie vermutlich an vielen unspezifischen Transkriptionsprozessen beteiligt sind. Der Transkriptionsfaktor „NF $\kappa$ B“ kann als das Homologe zu dem *Drosophila* Dorsal-Protein angesehen werden (Ghosh et al., 1990; Kieran et al., 1990). Da Dorsal für die Expression von *twist* in *Drosophila* entscheidend ist (Jiang et al., 1992), könnte „NF $\kappa$ B“ ebenfalls eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Aktivierung des humanen *TWIST*-Gens spielen. „SOX5“ („Sex Determining Homeobox Faktor 5“) ist ein wichtiger Faktor während der Spermatogenese und kann aufgrund dieser Funktion und des spezifischen Expressionsmusters wohl als Kandidat für die Regulation von *TWIST* ausgeschlossen werden (Denny et al., 1992).

In dem Bereich, der für die Aktivierung wichtig ist, konnte ein konserviertes Element identifiziert werden (E4), welches, laut Datenbankanalysen, eine Bindestelle für das „X-Box-Binding-Protein 1“ („XBP1“) beinhaltet. Dieser Leucinzipper

Transkriptionsfaktor könnte somit für die transkriptionell aktivierende Wirkung des Promotors verantwortlich sein, jedoch konnte bisher keine spezifische Expression in mesodermalen Geweben nachgewiesen werden (Clauss et al., 1996), so dass es sich hierbei wohl auch um einen allgemeinen Transkriptionsfaktor handelt.

Durch die Charakterisierung dieser Region konnten Bindestellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die vermutlich für die transkriptionelle Regulation von *TWIST* verantwortlich sind, aber nicht für eine gewebsspezifische Regulation ausreichen.

Ob diese identifizierten Transkriptionsfaktoren tatsächlich an der transkriptionellen Regulation von *TWIST* beteiligt sind, könnte durch „Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente“ untersucht werden. Hierbei werden die Transkriptionsfaktoren kovalent an Erkennungssequenzen im nativen Promotor gebunden. Anschließend werden die DNA-Moleküle durch Ultraschall gebrochen, wobei die Größe der entstehenden DNA-Moleküle dem Zufallsprinzip unterliegt. Die an die DNA-Fragmente gebundenen Proteine können durch einen spezifischen Antikörper, der an einer Matrix (Säule) fixiert ist, detektiert werden. Nach mehreren Aufreinigungsschritten werden die spezifisch gebunden DNA-Moleküle vom Protein abgelöst. Durch eine nachfolgende PCR, die spezifisch für die jeweilige Promotorregion ist, können die DNA-Bereiche amplifiziert werden, an die zuvor ein Protein gebunden hat. Es kann somit nachgewiesen werden, ob zuvor eine Protein-DNA Interaktion in dieser Region stattgefunden und folglich der analysierte Faktor tatsächlich an die Promotorsequenz gebunden hat.

Durch die Analyse der Promotor-Konstrukte, die bis zu 3,8 kb stromaufwärts des Translationsstarts beinhalten und somit auch den 5'-untranslatierten Bereich repräsentieren, konnte keine zusätzliche Aktivierung des Reportergens in den OHS-Zellen demonstriert werden. Somit ist davon auszugehen, dass sich weder in den weiter 5'-gelegenen Regionen stromaufwärts des Transkriptionsstarts noch im 5'-untranslatierten Bereich Sequenzabschnitte befinden, die an der spezifischen Aktivierung des humanen *TWIST*-Gens beteiligt sind. Vergleicht man jedoch die Reporterogenaktivität in den beiden Zelllinien, so kann eine reduzierte Aktivität der größeren Reportergenkonstrukte in den CCL-136 Zellen beobachtet werden. Der Bereich, der für die reduzierte Reportergen-Aktivität verantwortlich ist, konnte durch das „1,7 kb-Promotor-Konstrukt“ auf eine genomische Strecke von 900 bp eingegrenzt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die transkriptionelle

Regulation von *TWIST* nicht durch aktivierende Faktoren hervorgerufen werden, sondern müsste auf einer spezifischen Repression der Transkription beruhen. Da keine vollständige Repression der Reporterogenaktivität in den CCL-136-Zellen erzielt werden konnte, können die Resultate dieser Untersuchungen nur als erste Hinweise für eine solche Hypothese angesehen werden. Ebenfalls lässt die in den einzelnen Transfektions-experimenten auftretende Variabilität, die sich in den entsprechenden Standardabweichungen widerspiegelt, keine eindeutigen Rückschlüsse auf die repressorische Wirkung dieser Region zu. Es muss jedoch aufgrund der Tatsache, dass in beiden Zelllinien nach der Transfektion mit dem „782 bp-Promotor-Konstrukt“ eine ähnliche Aktivierung des Reportergens erzielt werden konnte, angenommen werden, dass sowohl die OHS als auch die CCL-136 Zellen mit den Transkriptionsfaktoren ausgestattet sind, die in diesem Bereich an den Promotor binden. Da jedoch eine prinzipiell ähnliche transkriptionelle Aktivierung des *TWIST*-Gens in den CCL-136 Zellen möglich ist, kann postuliert werden, dass diese durch einen reprimierenden Mechanismus reguliert wird.

Diese Repression der Transkription könnte durch die spezifische Bindung eines repressorischen Proteins an ein „Silencer“-Elemente im Promotorbereich von *TWIST* hervorgerufen werden. Ähnliche Mechanismen sind bereits von Ogbourne und Antalis (1998) beschrieben worden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Promotoranalysen könnte ein solches „Silencer“-Element in der Region 900 bp stromaufwärts des 782 bp Fragments lokalisiert sein. Die unvollständige Repression der Promotor-Aktivität ist durch den Überschuss an exogen eingebrachter DNA erklärbar. Denn wenn das verantwortliche Repressor-Protein limitiert in der Zelle vorliegt, ist es infolge des DNA-Überschusses nicht möglich, sämtliche Erkennungssequenzen zu besetzen und somit die Transkription vollständig zu reprimieren. Durch den Sequenzvergleich des murinen *Twist*-Promotors mit dem humanen *TWIST*-Promotor konnten in der vermutlich für die Repression verantwortlichen Region zwei stark konservierte Sequenzabschnitte (E5 und E6; Abb. 3-13) identifiziert werden. Mit Hilfe von Datenbankanalysen konnte innerhalb dieser Sequenzabschnitte lediglich eine Transkriptionsfaktor-Bindestelle für den „Upstream Stimulating Factor“ („USF“) ausgemacht werden. „USF“ wird ubiquitär exprimiert und kann sowohl als Aktivator als auch Repressor die Transkription von Zielgenen regulieren. Hierbei spielt die Interaktion mit Dimerisierungspartnern eine



wichtige Rolle (Sirito et al., 1994; Qyang et al., 1999), so dass „USF“ bzw. seine Dimerisierungspartner verantwortlich für die gewebsspezifische Repression des humane *TWIST*-Gens sein können.

Die repressorische Wirkung dieser Sequenzabschnitte könnte durch weitere Analysen näher charakterisiert werden. Beispielsweise müsste durch die Fusion dieser Region mit einem starken Promotor, wie zum Beispiel dem CMV-Promotor, ebenfalls eine Repression seiner Aktivität erzielt werden. Des Weiteren könnten Transfektions-experimente in beiden Zelllinien Aufschluss darüber geben, inwiefern diese reprimierende Wirkung spezifisch für die transkriptionelle Regulation des *TWIST*-Gens ist. Durch progressive Deletion der 5'- und 3'-Regionen dieses Fragments könnte der reprimierende Bereich systematisch eingegrenzt werden.

Neben dem möglichen inaktivierenden Einfluss von „Silencer“-Elementen muss eine weitere Theorie, die die Repression der *TWIST*-Transkription in den CCL-136 Zellen erklären könnte, in Betracht gezogen werden. Es ist bekannt, dass Nukleosomen, die aus unterschiedlichen Histonen zusammengesetzt sind, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenz verhindern können. Somit wird folglich der Chromatinstruktur eine repressorische Wirkung zugeschrieben. An „TATA“-Boxen freier bzw. unbesetzter DNA-Moleküle binden generelle Transkriptionsfaktoren (TBP, TFIIA und TFIIB) mit hoher Affinität (Imbalzano et al., 1994; Kingston et al., 1996). Der Mechanismus der repressorischen Wirkung der Chromatinstruktur ist noch wenig verstanden. Beim Übergang von repressorischer zu permissiver Chromatinstruktur spielt vermutlich die Hyper- bzw. Hypoacetylierung von Histonmoleküle eine wichtige Rolle. (Wolffe und Pruss, 1996).

Für die *TWIST* nicht-exprimierenden Zellen (CCL-136) würde dies bedeuten, dass zwar die Transkriptionsfaktoren, die an der Aktivierung des *TWIST*-Gens beteiligt sind, in der Zelle vorliegen, diese aber aufgrund der dort bestehenden Chromatinstruktur nicht an den nativen *TWIST*-Promotor binden können. Da die eingebrachten Reporter-gen-Konstrukte dieser Repression nicht unterliegen, können diese Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenz binden und so das Reporter-gen aktivieren.

Vergleicht man den humanen *TWIST*-Promotor mit dem putativen Promotor des *Fugu Twist*-Gens, konnte anhand dieses DNA-Sequenzvergleichs keine strukturelle Homologie erkannt werden. Diese Beobachtung lässt sich durch eine vermutete Komprimierung der Promotoren bei *Fugu*-Genen erklären. Da die meisten

Transkriptionsfaktoren relativ kurze Erkennungssequenzen (4-6 Basenpaare) aufweisen, würde das bedeuten, dass bei einem Sequenzvergleich diese konservierten DNA-Sequenzabschnitte nur schwer identifiziert werden können. Vergleicht man die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren, die zuvor durch den Sequenzvergleich zwischen Mensch und Maus entdeckt wurden, mit den Bindestellen der Transkriptionsfaktoren im putativen *Fugu Twist*-Promotor, so konnten - neben der bereits beschriebenen „TATA“-Box - weitere konservierte Elemente identifiziert werden.

Beispielsweise konnten im *Fugu-Twist*-Promotor ebenfalls eine Bindestelle für „NF- $\kappa$ B“, „XBP1“, „NKX-2.5“ sowie eine „CAAT“-Box detektiert werden. Vergleicht man bei den untersuchten Spezies die Position dieser Promotor-Elemente, so zeigt sich, dass weder Position noch Orientierung der Bindemotive bezüglich des Transkriptionsstarts einer Konservierung unterliegen. Lediglich konnte für zwei Elemente, deren Abstand zum Transkriptionsstart bei Eukaryoten fest definiert ist, gezeigt werden, dass ihre Position auch in den untersuchten Promotoren stark konserviert ist. Hierbei handelt es sich neben der „TATA“-Box, die in der Regel etwa 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert ist, um die sogenannte „CAAT“-Box. Die „CAAT“-Box befindet sich bei den meisten eukaryoten Gene an Position -75 (Ogbourne und Antalis, 1998). Diese konservierte Position konnte sowohl im *TWIST*-Promotor des Menschen bzw. der Maus (Position -76), als auch beim *Fugu Twist*-Promotor nachgewiesen werden (Position -70).

Weitere Hinweise auf die Funktionalität dieser identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen könnten Analysen der *Fugu-Twist*-Promotorregion erbringen. Durch Transfektionsexperimente mit Reporter-gen-Konstrukten, die diese Elemente des *Fugu-Twist*-Promotors beinhalten, könnte die Funktionalität der identifizierten Bindestellen überprüft werden.

Am Beispiel des *Fugu*-Promotors des *Tyrosinidase*-Gens konnte gezeigt werden, dass dieser über Elemente verfügt, die für eine gewebsspezifische Expression in Maus-Zellen notwendig sind, obwohl beim Vergleich mit den korrespondierenden murinen Promotorsequenzen ebenfalls nur kurze homologe Sequenzabschnitte detektiert wurden (Camacho-Hubner et al., 2002). Aufgrund der Resultate, die in funktionellen Promotoranalysen des humanen *TWIST*-Gens erzielt wurden, kann - neben der putativen Regulation über „Enhancer“-Elemente - auch eine repressorische Wirkung der untersuchten 5'-Region auf die Transkription angenommen werden.

---

Ebenfalls wäre ein kombinatorischer Effekt von aktivierenden Enhancer-Elementen und repressorischen Motiven - eine Unterdrückung der basalen Promotor-Aktivität konnte durch die Verwendung des „782 bp-Promotor-Konstruktes“ gezeigt werden - vorstellbar, um eine räumliche und zeitliche Expression des humanen *TWIST*-Gens zu ermöglichen.

#### **4.5 Regulatorische Wirkung von TWIST auf die Expression der Fibroblasten**

##### **Wachstumsfaktoren Rezeptoren (FGFRs)**

Neben den Analysen zur transkriptionellen Regulation von *TWIST* spielt auch die Regulation von Zielgenen durch den Transkriptionsfaktor TWIST eine wichtige Rolle bei der Entschlüsselung der molekularen Ursachen des frühen Verschlusses der Schädelnähte. Hierbei steht das Interesse an dem Zusammenspiel von *TWIST* und den *FGFRs* im Vordergrund, da Mutationen in diesen Genen ähnliche Phänotypen verursachen. Verantwortlich für die Ausprägung des Saethre-Chatzen Phänotyps ist eine Haploinsuffizienz des Transkriptionsfaktors *TWIST*. Durch Untersuchungen des murinen Twist-Proteins konnte gezeigt werden, dass dieser basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor eine reprimierende Wirkung auf seine Zielgene ausübt. Diese negative Expressionsregulation kann beispielsweise durch eine direkte Bindung an die DNA erfolgen oder durch eine Heterodimerisierung mit aktivierenden Faktoren bewirkt werden, die infolge der Bindung an Twist ihre Funktion nicht mehr ausüben können. Würde TWIST die Expression eines oder mehrerer *FGFR*-Gene reprimieren, könnte durch den Funktionsverlust einer Kopie von TWIST diese Repression zumindest teilweise aufgehoben und eine größere Anzahl der *FGFRs* exprimiert werden, was in einer gesteigerten Funktion dieser Rezeptoren resultieren würde. Ein weiterer Mechanismus, der ebenfalls auf einer Erhöhung der Rezeptoraktivität basiert und zu einem frühzeitigen Verschluss der Schädelnähte bei Patienten mit Craniosynostose Syndrom führt, wird durch aktivierende Mutationen („gain of function“) in *FGFR*-Genen repräsentiert. Yousfi und Mitarbeiter (2001) identifizierten an Osteoblastenzellen eines Patienten mit Saethre-Chatzen Syndrom Gene, die infolge einer reduzierten *TWIST*-Konzentration exprimiert werden konnten, was eine frühzeitige Differenzierung der Osteoblasten nach sich zog. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Gene für die *Alkalische Phosphatase* und das *Type I Collagen*, welche als Marker-Gene für die

Differenzierung angesehen werden, hochreguliert sind. Ähnliche Effekte wurden bei Preosteoblasten-Zellen eines Patienten mit Apert Syndrom, das durch Mutationen im *FGFR2*-Gen hervorgerufen wird, beobachtet. In diesen Geweben konnte ebenfalls eine erhöhte Expression der *Alkalischen Phosphatase* und des Gens für das *Typ I Collagen* nachgewiesen werden (Lomri et al., 1998). Da Mutationen in den *FGFR1*- und *FGFR3*-Genen ähnliche Phänotypen verursachen, liegt die Vermutung nahe, dass sie in der gleichen Signaltransduktionskaskade involviert sind. Folglich könnte die *TWIST*-Expression einen direkten Einfluss auf die Expression der *FGFRs* haben. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in einer nachweislich *TWIST*-negativen humanen Osteosarcoma-Zelllinie (U2-OS) das *TWIST*-Protein exogen unter konstanten Bedingungen überexprimiert. Da eine endogene *TWIST*-Expression nie vollständig ausgeschlossen werden kann, wurden zusätzliche Zelllinien generiert, die die *TWIST*-cDNA in „antisense“-Orientierung unter konstanten Bedingungen exprimieren. Somit sollte eine mögliche Translation des Proteins durch die Hybridisierung der „antisense“-RNA an die native „sense“-RNA verhindert werden. Anschließend wurde die Expression der *FGFRs 1-4* auf RNA-Ebene in nativen U2-OS-Zellen, in *TWIST* überexprimierenden Zellen sowie in den Zellen, die das „*TWIST*-antisense-Konstrukt“ exprimieren, überprüft und miteinander verglichen. Diese Analyse ergab, dass für keines der untersuchten *FGFR*-Gene ein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke in den untersuchten Zelllinien existiert. Da es sich bei dieser Analyse um eine halb-quantitative Methode handelt, bei der die eingesetzte cDNA-Menge durch eine Kontroll-PCR mit Oligonukleotiden für das ubiquitär exprimierte *GAPDH*-Gen überprüft wurde, hätten Ergebnisse über eine unterschiedliche Expressionsstärke der *FGFR*-Gene nur einen ersten Hinweis auf ein verändertes Expressionsmuster durch die Überexpression von *TWIST* liefern können. Wenn *TWIST* einen reprimierenden Einfluss auf die Expression der jeweiligen *FGFR*-Gene ausüben würde, wäre durch die Überexpression von *TWIST* eine deutlich verringerte Expressionstärke der *FGFRs* zu erwarten gewesen. Da aber für alle untersuchten *FGFR*-Gene in den analysierten Zelllinien ähnlich starke Signale detektiert wurden, konnte ein unmittelbarer Einfluss von *TWIST* auf die Expression der *FGFR 1-4* Gene hier nicht dargestellt werden. Es muss allerdings bedacht werden, dass auch durch Immunfluoreszenz-Analysen keine homogene *TWIST*-Überexpression beobachtet werden konnte. Folglich waren innerhalb der untersuchten Population auch Zellen vorhanden, die das exogen eingebracht *TWIST*-

Protein nicht exprimierten und somit möglicherweise eine native *FGFR*-Expression besaßen. Es besteht die Möglichkeit, dass einigen Zellen das Plasmid zwar integriert haben und aufgrund dessen eine G418-Resistenz aufweisen, aber das TWIST-Fusionsprotein selbst nicht gebildet haben. Diese „falsch-positiven“ Klone können zum einen dadurch entstehen, dass das *TWIST*-Gen oder regulatorische Sequenzen bei der Integration zerstört wurden. Zum anderen könnte das Plasmid in einen Locus inseriert worden sein, der durch seine Chromatinstruktur transkriptionell reprimiert wird.

Ein weiterer Faktor, der die regulatorische Wirkung von TWIST beeinflussen könnte, ist das Fehlen bzw. eine zu geringe Konzentration von Protein, die mit TWIST heterodimerisieren und so die DNA-Bindung erst ermöglichen. Eine Homodimerisierung von TWIST kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da von El Ghouzzi und Mitarbeitern (2000) gezeigt werden konnte, dass TWIST *in vitro* nicht in der Lage ist, Homodimere zu bilden und somit allein keine regulatorische Funktion aufweist. Als mögliche Heterodimerisierungspartner von TWIST kommen, neben E12, für das eine Heterodimerisierung *in vitro* gezeigt werden konnte (El Ghouzzi et al., 2001), auch andere Proteine mit einem HLH-Motiv in Frage. So könnten beispielsweise ID (engl.: Inhibition of DNA-Binding) oder DERMO-1, die ebenfalls in Osteoblasten exprimiert werden (Lee et al., 2000), gute Kandidaten für eine Heterodimerisierung sein. Mit Hilfe von Promotoranalysen der *FGFR*-Gene - wie z.B. mittels Generierung von Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukten - könnte die Frage beantwortet werden, ob TWIST an der Regulation eines oder mehrerer *FGFR*-Gene beteiligt ist. Die Analyse der Reporteraktivität in Transfektionsexperimenten bei den TWIST-überexprimierenden Zellen und der Zelle, die *TWIST* in „antisense“-Orientierung exprimieren, könnte Aufschluss über eine mögliche Regulation von TWIST auf die *FGFR*-Transkription bringen. Durch zusätzliche transiente Transfektionen mit putativen Heterodimerisierungspartnern von TWIST könnten mögliche Interaktionspartner identifiziert werden.

Allerdings bleibt die Frage offen, in wie weit TWIST an der Regulation der *FGFR*-Genexpression beteiligt ist. So konnte in kultivierten Osteoblasten von SCS-Patienten, die eine Stopp-Mutation (Y103X) in einer Kopie des *TWIST*-Gens aufwiesen, zwar eine gesteigerte Expression der *ALP* (*Alkalische Phosphatase*) und des *COL1A1*-Gens sowie eine reduzierte Expression von Osteocalzin (*OC*) gezeigt werden, jedoch wiesen diese Osteoblasten keine veränderte Expression des *FGFR1*-

Gens auf (Yousfi et al., 2001). Für die Gene der anderen *FGFRs* konnte bisher weder in Osteoblasten aus Patienten, noch in Zelle, die *TWIST* überexprimieren, ein direkter Zusammenhang gezeigt werden (Lee et al., 1999; Yousfi et al., 2001; Yousfi et al., 2002). Fraglich ist hierbei auch, ob die Auswirkungen einer *TWIST*-Mutation oder einer Überexpression von *TWIST* so stark sind, dass sie durch die gängigen Methoden der RNA-Analyse (Northern-Blot, RT-PCR) überhaupt erfasst werden können. Weitere Hinweise könnten hier durch die erwähnten Promotor-Analysen geliefert werden.

Da bisher wenig über die Interaktion zwischen *TWIST* und den Genen der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren bekannt ist, wäre auch ein anderer Regulationsmechanismus denkbar. So könnte die Expression von *TWIST* auch durch die gewebsspezifische Aktivierung der *FGFRs* gesteuert sein. Es könnten durch die gesteigerte Funktion der *FGFRs* bestimmte Gene aktiviert werden, die ihrerseits die transkriptionelle Aktivierung des *TWIST*-Gens unterdrücken, was einer Haploinsuffizienz von *TWIST* entspräche. Dass eine repressorische Regulation des *TWIST*-Gens prinzipiell möglich ist, wurde durch die Promotor-Analysen in dieser Arbeit bewiesen. Ein weiterer Punkt, der für diese Art der Interaktion spricht, ist die variable Ausprägung der phänotypischen Merkmale der einzelnen Acrocephalosyndactylien. So weisen Patienten mit dem Saethre-Chatzen Syndrom einen moderateren Phänotyp auf, als beispielsweise Patienten mit Apert-, Crouzon- oder Pfeiffer Syndrom.

#### **4.6 Identifizierung eines neuen Kandidatengens für das Mikrodeletionssyndrom 7p21 – *TWISTNB***

Durch Johnson und Mitarbeiter (1998) konnten innerhalb einer Patientengruppe mit den klinischen Merkmalen des Saethre-Chatzen Syndrom drei Betroffene identifiziert werden, die neben den typischen Merkmalen des Saethre-Chatzen Syndroms eine mentale Retardierung aufweisen. Bei allen drei Patienten konnten Deletionen in der *TWIST*-Gen-Region festgestellt werden, die in ihrer Größe von 3 Mb bis mehr als 11 Mb variieren. Der kleinste gemeinsame Überlappungsbereich (SRO: smallest region of overlap) dieser Deletionen wird von den genetischen Markern tel-D7S507 und D7S654-cen flankiert. Patienten, die kleinere Deletionen

von 2,9 kb - die das *TWIST*-Gen einschließen - aufweisen, zeigen keine signifikanten Lernstörungen.

Untersuchungen bei anderen Patientengruppen ergaben, dass dieser zusätzliche Phänotyp nur bei Patienten zu beobachten ist, die größere Deletionen der *TWIST*-Region aufweisen (Gripp et al., 2001; Chun et al., 2002). Da diese signifikante Lernbehinderung weder bei Patienten mit intragenischen Mutationen, Translokationen oder kleinen Deletionen beobachtet werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass dieser zusätzliche Phänotyp durch eine Haploinsuffizienz eines oder mehrerer Gene in der SRO verursacht wird.

Durch Datenbankanalysen wurde die genomische Region zwischen den beiden flankierenden genetischen Markern D7S507 und D7S654 auf weitere Gene bzw. putative Gene untersucht. Innerhalb einer physikalischen Strecke von 2,4 Mb konnten drei weitere Gene und ein offener Leserahmen (ORF) identifiziert werden. Im 3'-Bereich von *TWIST* befindet sich mit einem Abstand von etwa 500 kb die *Histon Deacetylase 9 (HDAC9)* und mit einem Abstand von 1,3 Mb das *Sorting Nexin 13-Gen (SNX13)*. Im 5'-Bereich konnte das *Nephew of Atonal 3-Gen (NATO3)* und das *TWISTNeighbor-Gen (TWISTNB)*, welches von uns durch den Sequenzvergleich zwischen Mensch, Maus und *Fugu* entdeckt wurde, identifiziert werden. Die Namensgebung erfolgte nach Absprache mit dem HUGO Nomenklaturkomitee und beruht auf der unmittelbaren Nähe zu *TWIST*.

Durch den Sequenzvergleich der korrespondierenden genomischen Regionen sowie der Aminosäuresequenz wurde eine starke Konservierung der „Splice“-Stellen sowie bestimmter Regionen der Proteinsequenz beobachtet. Durch Datenbankanalysen konnten jedoch weder funktionelle Domäne noch die Zugehörigkeit zu einer bekannten Genfamilie aufgezeigt werden. Die einzige Information, die anhand von Datenbankanalysen gewonnen werden konnte, bestand darin, dass das Protein – resultierend aus dem hohen Anteil an basischen Aminosäureresten – mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 80 % im Zellkern lokalisiert ist.

Durch Expressionsanalysen in adulten und fötalen humanen Geweben konnte ein etwa 4,3 kb großes Transkript in allen analysierte Geweben detektiert werden. Wobei durch die unterschiedliche Qualität der RNA-Proben aus den einzelnen Geweben keine Rückschlüsse auf die Expressionsstärke von *TWISTNB* in den jeweiligen Geweben gezogen werden kann. Durch RT-PCR war es ebenfalls möglich eine ubiquitäre Expression von *Twistnb* in allen analysierten Mausegeweben zu zeigen.

Die Charakterisierung der SRO bei Patienten mit dem Mikrodeletionssyndrom 7p21 zeigte, dass *TWISTNB*, *NATO3* im 5'-Bereich von *TWIST*, und *HDAC9* sowie *SNX13* im 3'-Bereich von *TWIST* in dieser Region lokalisiert sind und so als mögliche Kandidatengene für die Ausprägung der mentalen Retardierung in Frage kommen können. Durch die bisher charakterisierten Bruchpunkte bei Patienten mit Saethre-Chotzen Syndrom, die alle im 3'-Bereich von *TWIST* lokalisiert sind (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997), kann die Relevanz von *HDAC9* und *SNX13* als Kandidatengen für diesen Phänotyp nahezu ausgeschlossen werden. Im Fall des *Histone Deacetylase 9*-Gens, dessen codierender Bereich sich über eine genomische Strecke von ca. 500 kb erstreckt, könnte auch die genomische Struktur des Gens durch die von Rose und Mitarbeitern (1997) beschriebenen Translokationen zerstört werden. Um diese Frage zu klären, müssten die von Rose und Mitarbeitern (1997) beschriebenen Translokationsbruchpunkte genauer charakterisiert werden. Bei keinem der Patienten, bei dem das Saethre-Chotzen Syndrom durch eine Translokation verursacht wird, konnte eine mentale Retardierung festgestellt werden.

Inwieweit *TWISTNB* und/oder *NATO3* als Kandidatengene für die Entstehung der mentalen Retardierung bei Patienten mit dem Mikrodeletionssyndrom 7p21 verantwortlich sind, müssen weitere Untersuchungen an Patienten zeigen. So könnte durch weiterführende Untersuchungen bei Patienten mit kleineren Deletionen die relevante Region weiter eingegrenzt werden.

Für beide Gene konnte eine Expression im fötalen Gehirn nachgewiesen werden. Die *NATO3*-Genexpression konnte auf Bereiche des zentralen Nervensystems bei der Maus und *Drosophila* eingegrenzt werden (Segev et al., 2001).

Inwieweit Untersuchungen am Tiermodell durch Expressionsmuster hierbei wirklich hilfreich sind, ist fraglich, da der Prozess, der an der Ausprägung der mentalen Retardierung beteiligt ist, wenig verstanden ist. Ob pathologische Veränderungen des zentralen Nervensystems an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt sind, konnte durch die durchgeführten Untersuchungen nicht gezeigt werden. Sie sind jedoch vermutlich eher auszuschließen, da organische Veränderungen des Gehirns aller Voraussicht zu einem stärkeren mentalen Phänotyp führen würden.



#### 4.7 Ausblick

Durch die Untersuchung der *Fugu-Twist*-Region konnten neue Erkenntnisse über konservierte Sequenzabschnitte innerhalb der chromosomalen Region 7p21 gewonnen werden. Hierbei wurden nicht-codierende Sequenzabschnitte identifiziert, die zwischen Mensch und *Fugu* stark konserviert sind. Diese DNA-Motive können erste Anhaltspunkte im Hinblick auf das Vorhandensein von *cis*-regulatorischen Elementen im 3'-Bereich des humanen *TWIST*-Gens liefern. Inwieweit diese Elemente jedoch an der transkriptionellen Regulation des humanen *TWIST*-Gens beteiligt sind, muss durch weiterführende Experimente, wie beispielsweise durch die Identifizierung „*DNase*I Hypersensitiver Stellen“, geklärt werden. Durch eine Lokalisierung und Charakterisierung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen innerhalb dieser Elemente wird die Möglichkeit zur Identifizierung weitere Faktoren gegeben, die an der transkriptionellen Regulation von *TWIST* beteiligt sind. Solche Faktoren wiederum kämen als Kandidatengene für Craniosynostose Syndrome mit ungeklärter genetischer Ursache in Frage. Ebenfalls kann eine Untersuchung dieser konservierten Regionen zur Beantwortung der Frage beitragen, warum Translokationen im 3'-Bereich zu einer Haploinsuffizienz des *TWIST*-Gens und somit zur Ausprägung des Saethre-Chotzen Phänotyps führen (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997).

Neben diesen konservierten Sequenzabschnitten im 3'-Bereich wurden mittels Promotor-Analysen Sequenzabschnitte in der 5'-Region des *TWIST*-Gens identifiziert, die für die transkriptionelle Aktivierung des *TWIST*-Gens entscheidend, jedoch vermutlich nicht an seiner spezifischen Regulation beteiligt sind. Dieses zeigten die Analysen der Promotorgen-Konstrukte, die sowohl in den *TWIST* positiven (OHS), als auch in den *TWIST* negativen Zellen eine vergleichbare Aktivierung des Reportergens zeigen.

Aufgrund der Tatsache, dass „Enhancer“-Elemente spezifisch mit dem jeweiligen Promotor interagieren (Li und Noll, 1994; Merli et al., 1996; Ohtsuki et al., 1998) und positionsunabhängig wirken, kann die Funktionalität dieser putativen „Enhancer“-Elemente in Kombination mit dem spezifischen Promotor getestet werden. Hierzu könnten die ausfindig gemachten DNA-Elemente aus der 3'-Region von *TWIST* in die vorhandenen Promotor-Konstrukte inseriert und in Transfektionsexperimenten analysiert werden. Da diese Promotor-Konstrukte selbst

unterschiedlich große Bereiche der 5'-Region des *TWIST*-Gens repräsentieren (0,4 kb-3,8 kb), könnten zusätzlich – neben der funktionellen Untersuchung der konservierten Elemente aus der 3'-Region – eventuell auch Sequenzabschnitt innerhalb des Promotors identifiziert werden, die mit einem putativen „Enhancer“-Element in Wechselwirkung treten.

Da nicht alle Patienten mit dem SCS eine Mutation im codierenden Bereich des *TWIST*-Gens aufweisen (Howard et al., 1997), könnten Mutationsanalysen in der Promotor-Region des humanen *TWIST*-Gens Aufschluss über die genetische Ursache des SCS solcher Patienten geben.

Die Untersuchungen an *TWIST* überexprimierenden Zellen haben gezeigt, dass kein direkter Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der *FGFR1-4* Gene besteht. Jedoch können die generierten Zelllinien als Ausgangsmaterial für die Identifizierung weiterer Zielgenen des Transkriptionsfaktors *TWIST* eingesetzt werden. Hierzu sollten zunächst monoklonale Sublinien mit definierter, ubiquitärer Expression des „sense“- und „antisense“-*TWIST*-Konstrukts generiert werden. Die aus diesen Zelllinien gewonnene RNA könnte anschließend für „Micro-Array“-Analysen eingesetzt werden.

Neben den molekularen und funktionellen Analysen des humanen *TWIST*-Gens, konnte mit Hilfe der *Fugu*-Sequenzierung ein neues Kandidatengen für das Mikrodeletionssyndrom 7p21 identifiziert werden (Johnson et al., 1998). Inwieweit dieses Gen an der Entstehung der für Patienten mit dem Mikrodeletionssyndrom 7p21 charakteristischen mentalen Retardierung beteiligt ist, müssen weitere Patientenuntersuchungen klären. Hierzu sollten Patienten, die von dieser zusätzlichen Behinderung betroffen sind, bezüglich chromosomaler Deletionen untersucht werden. Durch eine größere Anzahl entsprechender Patienten könnte die genomische Region weiter eingegrenzt und Kandidatengene, die von diesen Deletionen betroffen sind, ausfindig gemacht werden.

## 5. Zusammenfassung

Das Saethre-Chotzen Syndrom (SCS) ist eine autosomal-dominant vererbte Entwicklungsstörung, die durch Fehlbildungen an Schädel und Extremitäten gekennzeichnet ist. Diese Fehlbildungen sind typische Merkmale der Acrocephalosyndactylien, zu denen auch das SCS gezählt wird. Die meisten Acrocephalosyndactylien sind auf Mutationen in den *Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren* Genen (*FGFR 1-3*) zurückzuführen (Muenke und Wilkie, 2001); lediglich für das SCS sind Mutationen im *TWIST*-Gen nachgewiesen worden (El Ghouzzi et al., 1997; Howard et al., 1997). Neben intragenischen Mutationen resultieren auch Translokationen im 3'-Bereich von *TWIST* (Krebs et al., 1997; Rose et al., 1997) und chromosomale Deletionen (Lewanda et al., 1994; Johnson et al., 1998) in der phänotypischen Ausprägung der genetisch bedingten Erkrankung. Zusätzlich weisen Patienten mit größeren Deletionen (Mikrodeletionssyndrom 7p21) eine mentale Retardierung auf (Johnson et al., 1998). Diese Behinderung kann jedoch nicht ausschließlich auf dem Fehlen des *TWIST*-Gens basieren, da Patienten mit kleineren Deletionen nicht an einer solchen mentalen Retardierung leiden (Johnson et al., 1998). Inwieweit Translokationen im 3'-Bereich die Expression des *TWIST*-Gens beeinflussen ist noch ungeklärt. Möglicherweise könnte der Verlust dort lokalisierter *cis*-regulatorischer Elemente, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind, ursächlich sein.

Zur Charakterisierung der genomischen Region 7p21, in der das humane *TWIST*-Gen lokalisiert ist, wurde das Homologe zum *TWIST*-Gen beim japanischen Kugelfisch *Fugu rubripes rubripes* identifiziert und die flankierenden genomischen Bereiche analysiert (Cosmid-Klon D1442). Mit Hilfe dieser Sequenzen konnten Oligonukleotide aus der 5'- bzw. 3'-Region des *Fugu-Twist*-Gens abgeleitet werden. Die Generierung *Fugu*-spezifischer PCR-Produkte ermöglichte die Identifizierung weiterer Klone aus der *Fugu-Twist*-Region. Es konnte ein Cosmid-Klon (J0836) durch die Hybridisierung mit dem PCR-Produkt aus der 3'-Region des *Twist*-Gens sowie drei *Fugu*-PAC-Klone aus einer genomischen PAC-PCR-Genbibliothek mit den Oligonukleotiden aus der 5'-Region identifiziert werden. Die Sequenzanalyse ergab eine genomische Strecke von ca. 60 kb, die sieben Gene beinhaltet. Die Gene *LOC168829*, *TWISTNB*, *NATO3*, *TWIST* und *SNX13* konnten beim Menschen auf Chromosom 7p21 in ähnlicher Abfolge identifiziert werden, lediglich ein aus dieser

Region stammendes, humanes Gen (*HDAC9*) konnte bei *Fugu* nicht nachgewiesen werden. Die Gene *KIAA0379* und *BTD* befinden sich beim Menschen in gleicher Abfolge und Orientierung auf Chromosom 3q25. Die Vergleiche der genomischen Regionen zwischen Mensch und *Fugu* ergaben stark verkürzte inter- und intragenische Abstände bei *Fugu*. Neben *NATO3*, *HDAC9* und *SNX13* wurde das bisher nicht charakterisierte Transkript *TWISTNB* in der kleinsten überlappenden Region (SRO) des Mikrodeletionssyndroms 7p21 (MDS 7p21) identifiziert. Durch Expressionsanalysen in unterschiedlichen Geweben von Mensch und Maus erfolgte der Nachweis für eine ubiquitäre Expression dieses Gens - unter anderem auch im Gehirn - so dass *TWISTNB* als potentielles Kandidatengen für den zusätzlichen Phänotyp des MDS 7p21 in Frage kommt.

Durch einen Sequenzvergleich der *Twist*-flankierenden genomischen Bereiche zwischen *Fugu* und Mensch wurden vier konservierte DNA-Elemente aus der 3'-Region des *TWIST*-Gens identifiziert, die als mögliche „Enhancer“-Elemente in Frage kommen. Innerhalb dieser Elemente konnten auch Transkriptionsfaktor-Bindestellen detektiert werden, die bei beiden Spezies konserviert sind.

Zur Charakterisierung der Promotorregion des humanen *TWIST*-Gens wurde ein genomischer Bereich von 3,8 kb bezüglich seiner regulatorischen Funktionalität untersucht. Hierzu wurden Transfektionsexperimente in humanen Zelllinien durchgeführt. Um eine spezifische Promotoraktivität nachzuweisen, wurden zwei Zelllinien verwendet. Während die eine Linie *TWIST* endogen exprimiert (OHS), zeigte die Andere keine endogene *TWIST*-Expression (CCL-136). Der aktivierende Bereich des *TWIST*-Promotors konnte auf 782 bp eingegrenzt werden. Durch Deletionsanalysen wurde innerhalb dieser Region ein aktivierender Bereich von 355 bp sowie ein basaler Promotorbereich von 461 bp charakterisiert. Allerdings zeigten diese Elemente nur in Kombination eine Aktivierung des Reportergens und führten in beiden Zelllinien zu vergleichbaren Ergebnissen, so dass diese letztendlich nicht für eine spezifische Regulation des *TWIST*-Gens verantwortlich sein können. Für die größeren Promotor-Konstrukte konnte keine zusätzliche aktivierende Wirkung auf die Transkription des Reportergens festgestellt werden. Allerdings zeigten die Untersuchungen in den CCL-136 Zellen, die keine endogene *TWIST*-Expression aufweisen, eine reduzierte Aktivierung des Reportergens im Vergleich zu den OHS Zellen (*TWIST* exprimierend). Der Bereich, der für die Repression verantwortlich ist, konnte auf 900 bp eingegrenzt werden. Durch Sequenzvergleiche

mit der Maus *Twist*-Promotorregion konnten innerhalb dieses Bereichs stark konservierte Sequenzabschnitte identifiziert und somit die, für die Regulation des *TWIST*-Gens essentiellen Regionen weiter eingegrenzt werden. Durch Datenbankanalysen (MatInspector) wurden in diesen konservierten Regionen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert, die an der transkriptionellen Regulation des *TWIST*-Gens beteiligt sein könnten.

Die Überprüfung des Einflusses einer *TWIST*-Überexpression in U2-OS-Zellen auf die Regulation der Expression der *Fibroblasten-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren 1 - 4* (*FGFR 1-4*) ergaben keinen messbaren Unterschied auf RNA-Ebene. Aufgrund der mittels RT-PCR erzielten Ergebnisse kann folglich postuliert werden, dass *TWIST* keine unmittelbare regulatorische Wirkung auf die Transkription der *FGFR 1-4* Gene ausübt.

## 6. Literaturverzeichnis

- Akimaru, H., Hou, D., X.Ishii, S. (1997). Drosophila CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression. *Nat Genet* 17: 211-4.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-4.
- Amar, M. J., Sutphen, R., Kousseff, B. G. (1997). Expanded phenotype of cranioectodermal dysplasia (Sensenbrenner syndrome). *Am J Med Genet* 70: 349-52.
- Anant, S., Roy, S., VijayRaghavan, K. (1998). Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in Drosophila. *Development* 125: 1361-9.
- Ang, S. L., Rossant, J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78: 561-74.
- Antes, T. J., Goodart, S. A., Huynh, C., Sullivan, M., Young, S. G., Levy-Wilson, B. (2000). Identification and characterization of a 315-base pair enhancer, located more than 55 kilobases 5' of the apolipoprotein B gene, that confers expression in the intestine. *J Biol Chem* 275: 26637-48.
- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J. M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M. D., Roach, J., Oh, T., Ho, I. Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S. F., Clark, M. S., Edwards, Y. J., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S. V., Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y. H., Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D., Brenner, S. (2002). Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of Fugu rubripes. *Science* 297: 1301-10.
- Aparicio, S., Morrison, A., Gould, A., Gilthorpe, J., Chaudhuri, C., Rigby, P., Krumlauf, R., Brenner, S. (1995). Detecting conserved regulatory elements with the model genome of the Japanese puffer fish, Fugu rubripes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1684-8.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., J.G., S., J.A., S.K., S. (1993). Current Protokols in Molecular Biology. New York, USA, John Wiley & Sons Inc.
- Bagheri-Fam, S., Ferraz, C., Demaille, J., Scherer, G., Pfeifer, D. (2001). Comparative genomics of the SOX9 region in human and Fugu rubripes: conservation of short regulatory sequence elements within large intergenic regions. *Genomics* 78: 73-82.
- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in Drosophila. *Development* 110: 791-804.
- Bate, M., Rushton, E., Currie, D. A. (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in Drosophila. *Development* 113: 79-89.
- Baylies, M., K.Bate, M. (1996). twist: a myogenic switch in Drosophila. *Science* 272: 1481-4.
- Bedell, M. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. (1996). Good genes in bad neighbourhoods. *Nat Genet* 12: 229-32.

- Bellus, G. A., Gaudenz, K., Zackai, E. H., Clarke, L. A., Szabo, J., Francomano, C. A., Muenke, M. (1996). Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet* 14: 174-6.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L., Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61: 49-59.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.
- Blank, C. E. (1960). Apert's syndrome (a type of acrocephalosyndactyly): observation on a British series of thirty-nine cases. *Ann Hum Genet* 24: 151-164.
- Bodmer, R., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (1990). A new homeobox-containing gene, *msh-2*, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*. *Development* 110: 661-9.
- Bonifaci, N., Moroianu, J., Radu, A., Blobel, G. (1997). Karyopherin beta2 mediates nuclear import of a mRNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5055-60.
- Boulikas, T. (1994). Putative nuclear localization signals (NLS) in protein transcription factors. *J Cell Biochem* 55: 32-58.
- Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A. L., Danse, J. M., Bloch-Zupan, A., Yoshida, K., Stoetzel, C., Perrin-Schmitt, F. (1998). The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet* 7: 945-57.
- Bourgeois, P., Stoetzel, C., Bolcato-Bellemin, A. L., Mattei, M. G., Perrin-Schmitt, F. (1996). The human H-twist gene is located at 7p21 and encodes a B-HLH protein that is 96% similar to its murine M-twist counterpart. *Mamm Genome* 7: 915-7.
- Bradford, C. S., Miller, A. E., Toumadje, A., Nishiyama, K., Shirahata, S., Barnes, D. W. (1997). Characterization of cell cultures derived from Fugu, the Japanese pufferfish. *Mol Mar Biol Biotechnol* 6: 279-88.
- Breitenbücher, F. (1998). Charakterisierung einer putativen Kontrollregion des humanen *TWIST*-Gens. Marburg, Diplomarbeit im Studiengang Biologie der Philipps-Universität Marburg.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., Aparicio, S. (1993). Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366: 265-8.
- Bresser, J., Gillespie, D. (1983). Quantitative binding of covalently closed circular DNA to nitrocellulose in NaI. *Anal Biochem* 129: 357-64.
- Brunner, B., Grutzner, F., Yaspo, M. L., Ropers, H. H., Haaf, T., Kalscheue, V. M. (2000). Molecular cloning and characterization of the Fugu rubripes MEST/COPG2 imprinting cluster and chromosomal localization in Fugu and *Tetraodon nigroviridis*. *Chromosome Res* 8: 465-76.
- Burke, T. W., Kadonaga, J. T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev* 10: 711-24.
- Burley, S. K., Roeder, R. G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65: 769-99.
- Camacho-Hubner, A., Richard, C., Beermann, F. (2002). Genomic structure and evolutionary conservation of the tyrosinase gene family from Fugu. *Gene* 285: 59-68.
- Carver, E. A., Oram, K. F., Gridley, T. (2002). Craniosynostosis in Twist heterozygous mice: A model for Saethre-Chotzen syndrome. *Anat Rec* 268: 90-2.

- Chen, C. Y., Schwartz, R. J. (1995). Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J Biol Chem* 270: 15628-33.
- Chen, Z. F., Behringer, R. R. (1995). twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 9: 686-99.
- Chotzen, F. (1932). Eine eigenartige familiaere Entwicklungsstoerung (Akrocephalosyndaktylie, Dysostosis craniofacialis und Hypertelorismus). *M Schr. Kinderheilk*: 97-122.
- Chu, G., Vollrath, D., Davis, R. W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234: 1582-5.
- Chun, K., Teebi, A. S., Jung, J. H., Kennedy, S., Laframboise, R., Meschino, W. S., Nakabayashi, K., Scherer, S. W., Ray, P. N., Teshima, I. (2002). Genetic analysis of patients with the Saethre-Chotzen phenotype. *Am J Med Genet* 110: 136-43.
- Clauss, I. M., Chu, M., Zhao, J. L., Glimcher, L. H. (1996). The basic domain/leucine zipper protein hXBP-1 preferentially binds to and transactivates CRE-like sequences containing an ACGT core. *Nucleic Acids Res* 24: 1855-64.
- Cohen, M. J., MacLean, R. (2000). Craniossynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management. New York, Oxford University Press.
- Collins, E. D., Marsh, J. L., Vannier, M. W., Gilula, L. A. (1995). Spatial dysmorphology of the foot in Apert syndrome: three-dimensional computed tomography. *Cleft Palate Craniofac J* 32: 255-61; discussion 262.
- Cossu, G., Kelly, R., Tajbakhsh, S., Di Donna, S., Vivarelli, E., Buckingham, M. (1996). Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development* 122: 429-37.
- Denny, P., Swift, S., Connor, F., Ashworth, A. (1992). An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Embo J* 11: 3705-12.
- Dracopoli, N. C., Haines, J. L., Krof, B. R., Moir, D. T., Morton, C. C., Seidman, C. F., Seidman, J. G., Smith, D. R. (1997). Current Protocols in Human Genetics. New York, USA, John Wiley & Sons Inc.
- Eissenberg, J. C. (1989). Position effect variegation in Drosophila: towards a genetics of chromatin assembly. *Bioessays* 11: 14-7.
- Elanko, N., Sibbring, J. S., Metcalfe, K. A., Clayton-Smith, J., Donnai, D., Temple, I. K., Wall, S. A., Wilkie, A. O. (2001). A survey of TWIST for mutations in craniosynostosis reveals a variable length polyglycine tract in asymptomatic individuals. *Hum Mutat* 18: 535-41.
- El Ghouzzi, V., Lajeunie, E., Le Merrer, M., Cormier-Daire, V., Renier, D., Munnich, A., Bonaventure, J. (1999). Mutations within or upstream of the basic helix-loop-helix domain of the TWIST gene are specific to Saethre-Chotzen syndrome. *Eur J Hum Genet* 7: 27-33.
- El Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A. L., Munnich, A., Bonaventure, J. (1997). Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15: 42-6.
- El Ghouzzi, V., Legeai-Mallet, L., Aresta, S., Benoist, C., Munnich, A., de Gunzburg, J., Bonaventure, J. (2000). Saethre-Chotzen mutations cause TWIST protein degradation or impaired nuclear location. *Hum Mol Genet* 9: 813-9.



- El Ghouzzi, V., Legeai-Mallet, L., Benoist-Lasselín, C., Lajeunie, E., Renier, D., Munnich, A., Bonaventure, J. (2001). Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of TWIST abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome. *FEBS Lett* 492: 112-8.
- Elgar, G., Sandford, R., Aparicio, S., Macrae, A., Venkatesh, B., Brenner, S. (1996). Small is beautiful: comparative genomics with the pufferfish (*Fugu rubripes*). *Trends Genet* 12: 145-50.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
- Feldman, G. J., Ward, D. E., Lajeunie-Renier, E., Saavedra, D., Robin, N. H., Proud, V., Robb, L. J., Der Kaloustian, V., Carey, J. C., Cohen, M. M., Jr., Cormier, V., Munnich, A., Zackai, E. H., Wilkie, A. O., Price, R. A., Muenke, M. (1997). A novel phenotypic pattern in X-linked inheritance: craniofrontonasal syndrome maps to Xp22. *Hum Mol Genet* 6: 1937-41.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7413-7.
- Fuchtbauer, E. M. (1995). Expression of M-twist during postimplantation development of the mouse. *Dev Dyn* 204: 316-22.
- Furlong, E. E., Andersen, E. C., Null, B., White, K. P., Scott, M. P. (2001). Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development. *Science* 293: 1629-33.
- Ghosh, S., Gifford, A. M., Riviere, L. R., Tempst, P., Nolan, G. P., Baltimore, D. (1990). Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. *Cell* 62: 1019-29.
- Gilley, J., Armes, N., Fried, M. (1997). *Fugu* genome is not a good mammalian model. *Nature* 385: 305-6.
- Gilley, J., Fried, M. (1999). Extensive gene order differences within regions of conserved synteny between the *Fugu* and human genomes: implications for chromosomal evolution and the cloning of disease genes. *Hum Mol Genet* 8: 1313-20.
- Godmann, M. (2001). Analyse zur Funktionalität der aminoterminalen Region des basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktor TWIST. Marburg, Diplomarbeit im Studiengang Biologie der Philipps-Universität Marburg.
- Gossett, L. A., Kelvin, D. J., Sternberg, E. A., 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.
- Gottesfeld, J. M., Forbes, D. J. (1997). Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem Sci* 22: 197-202.
- Gripp, K. W., Kasparcova, V., McDonald-McGinn, D. M., Bhatt, S., Bartlett, S. P., Storm, A. L., Drumheller, T. C., Emanuel, B. S., Zackai, E. H., Stolle, C. A. (2001). A diagnostic approach to identifying submicroscopic 7p21 deletions in Saethre-Chotzen syndrome: fluorescence in situ hybridization and dosage-sensitive Southern blot analysis. *Genet Med* 3: 102-8.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389: 349-52.
- Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P. A., Guarente, L. (1989). Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5718-22.

- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P. L., Wu, H. Y., Wang, J. Y., Nakatani, Y., Kedes, L. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 96: 405-13.
- Hamamori, Y., Wu, H. Y., Sartorelli, V., Kedes, L. (1997). The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist. *Mol Cell Biol* 17: 6563-73.
- Hardison, R. C., Oeltjen, J., Miller, W. (1997). Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome. *Genome Res* 7: 959-66.
- Hebrok, M., Wertz, K., Fuchtbauer, E. M. (1994). M-twist is an inhibitor of muscle differentiation. *Dev Biol* 165: 537-44.
- Henikoff, S. (1990). Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet* 6: 422-6.
- Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* 7: 1291-308.
- Hinegardner, R. (1968). Evolution of cellular DNA content in teleost fishes. *Am Nat* 102: 517-523.
- Horvath, C. M., Wen, Z., Darnell, J. E., Jr. (1995). A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9: 984-94.
- Howard, T. D., Paznekas, W. A., Green, E. D., Chiang, L. C., Ma, N., Ortiz de Luna, R. I., Garcia Delgado, C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A. D., Jabs, E. W. (1997). Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15: 36-41.
- Hunter, A. G., Rudd, N. L. (1976). Craniosynostosis. I. Sagittal synostosis: its genetics and associated clinical findings in 214 patients who lacked involvement of the coronal suture(s). *Teratology* 14: 185-93.
- Imbalzano, A. N., Kwon, H., Green, M. R., Kingston, R. E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370: 481-5.
- Jabs, E. W., Li, X., Scott, A. F., Meyers, G., Chen, W., Eccles, M., Mao, J. I., Charnas, L. R., Jackson, C. E., Jaye, M. (1994). Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2. *Nat Genet* 8: 275-9.
- Jiang, J., Rushlow, C. A., Zhou, Q., Small, S., Levine, M. (1992). Individual dorsal morphogen binding sites mediate activation and repression in the Drosophila embryo. *Embo J* 11: 3147-54.
- Johnson, D., Horsley, S. W., Moloney, D. M., Oldridge, M., Twigg, S. R., Walsh, S., Barrow, M., Njolstad, P. R., Kunz, J., Ashworth, G. J., Wall, S. A., Kearney, L., Wilkie, A. O. (1998). A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. *Am J Hum Genet* 63: 1282-93.
- Jones, N. (1990). Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell* 61: 9-11.
- Kieran, M., Blank, V., Logeat, F., Vandekerckhove, J., Lottspeich, F., Le Bail, O., Urban, M. B., Kourilsky, P., Baeuerle, P. A., Israel, A. (1990). The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* 62: 1007-18.
- Kim, T. K., Maniatis, T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell* 1: 119-29.
- Kingston, R. E., Bunker, C. A., Imbalzano, A. N. (1996). Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev* 10: 905-20.

- Kornberg, R. D., Lorch, Y. (1995). Interplay between chromatin structure and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 7: 371-5.
- Krebs, I., Weis, I., Hudler, M., Rommens, J. M., Roth, H., Scherer, S. W., Tsui, L. C., Fuchtbauer, E. M., Grzeschik, K. H., Tsuji, K., Kunz, J. (1997). Translocation breakpoint maps 5 kb 3' from TWIST in a patient affected with Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet* 6: 1079-86.
- Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., Goodman, R. H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370: 223-6.
- Lajeunie, E., Le Merrer, M., Bonaiti-Pellie, C., Marchac, D., Renier, D. (1995a). Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet* 55: 500-4.
- Lajeunie, E., Ma, H. W., Bonaventure, J., Munnich, A., Le Merrer, M., Renier, D. (1995b). FGFR2 mutations in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet* 9: 108.
- Landegent, J. E., Jansen in de Wal, N., Dirks, R. W., Baao, F., van der Ploeg, M. (1987). Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 77: 366-70.
- Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., Wilson, R. K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res* 20: 2471-83.
- Lee, M. S., Lowe, G., Flanagan, S., Kuchler, K., Glackin, C. A. (2000). Human Dermo-1 has attributes similar to twist in early bone development. *Bone* 27: 591-602.
- Lee, M. S., Lowe, G. N., Strong, D. D., Wergedal, J. E., Glackin, C. A. (1999). TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage. *J Cell Biochem* 75: 566-77.
- Lee, T. I., Young, R. A. (1998). Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev* 12: 1398-408.
- Lee, Y. M., Park, T., Schulz, R. A., Kim, Y. (1997). Twist-mediated activation of the NK-4 homeobox gene in the visceral mesoderm of Drosophila requires two distinct clusters of E-box regulatory elements. *J Biol Chem* 272: 17531-41.
- Lengauer, C., Riethman, H., Cremer, T. (1990). Painting of human chromosomes with probes generated from hybrid cell lines by PCR with Alu and L1 primers. *Hum Genet* 86: 1-6.
- Leptin, M. (1991). twist and snail as positive and negative regulators during Drosophila mesoderm development. *Genes Dev* 5: 1568-76.
- Lerman, L. S., Frisch, H. L. (1982). Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers* 21: 995-7.
- Lewanda, A. F., Green, E. D., Weissenbach, J., Jerald, H., Taylor, E., Summar, M. L., Phillips, J. A., 3rd, Cohen, M., Feingold, M., Mouradian, W., Clarren, S. K., Jabs, E. W. (1994). Evidence that the Saethre-Chotzen syndrome locus lies between D7S664 and D7S507, by genetic analysis and detection of a microdeletion in a patient. *Am J Hum Genet* 55: 1195-201.
- Li, Q., Hatju, S., Peterson, K. R. (1999). Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends Genet* 15: 403-8.
- Li, X., Noll, M. (1994). Compatibility between enhancers and promoters determines the transcriptional specificity of gooseberry and gooseberry neuro in the Drosophila embryo. *Embo J* 13: 400-6.

- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., Ward, D. C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80: 224-34.
- Lilly, B., Galewsky, S., Firulli, A. B., Schulz, R. A., Olson, E. N. (1994). D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5662-6.
- Lomri, A., Lemonnier, J., Hott, M., de Parseval, N., Lajeunie, E., Munnich, A., Renier, D., Marie, P. J. (1998). Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. *J Clin Invest* 101: 1310-7.
- Loots, G. G., Locksley, R. M., Blankespoor, C. M., Wang, Z. E., Miller, W., Rubin, E. M., Frazer, K. A. (2000). Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* 288: 136-40.
- Merli, C., Bergstrom, D. E., Cygan, J. A., Blackman, R. K. (1996). Promoter specificity mediates the independent regulation of neighboring genes. *Genes Dev* 10: 1260-70.
- Meyers, G. A., Orlow, S. J., Munro, I. R., Przylepa, K. A., Jabs, E. W. (1995). Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat Genet* 11: 462-4.
- Miles, C., Elgar, G., Coles, E., Kleinjan, D. J., van Heyningen, V., Hastie, N. (1998). Complete sequencing of the Fugu WAGR region from WT1 to PAX6: dramatic compaction and conservation of synteny with human chromosome 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13068-72.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- Mitchell, P. J., Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-8.
- Mount, S. M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10: 459-72.
- Muenke, M., Gripp, K. W., McDonald-McGinn, D. M., Gaudenz, K., Whitaker, L. A., Bartlett, S. P., Markowitz, R. I., Robin, N. H., Nwokoro, N., Mulvihill, J. J., Losken, H. W., Mulliken, J. B., Guttmacher, A. E., Wilroy, R. S., Clarke, L. A., Hollway, G., Ades, L. C., Haan, E. A., Mulley, J. C., Cohen, M. M., Jr., Bellus, G. A., Francomano, C. A., Moloney, D. M., Wall, S. A., Wilkie, A. O., Zackai, E. H. (1997). A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 60: 555-64.
- Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., Robin, N. H., Losken, H. W., Schinzel, A., Pulleyn, L. J., Rutland, P., Reardon, W., Malcolm, S., Winter, R. M. (1994). A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet* 8: 269-74.
- Muenke, M., Wilkie, A. (2001). Craniosynostosis syndromes. The metabolic and molecular bases of inherited disease. B. A. Scriver CR, Sly WS, Valle D (eds). New York, McGraw-Hill: 6117-6146.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-73.
- Nguyen, H. T., Bodmer, R., Abmayr, S. M., McDermott, J. C., Spoerel, N. A. (1994). D-mef2: a *Drosophila* mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7520-4.

- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193: 267-282.
- Ogbourne, S., Antalis, T. M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J* 331: 1-14.
- Ohtsuki, S., Levine, M., Cai, H. N. (1998). Different core promoters possess distinct regulatory activities in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 12: 547-56.
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111: 1097-107.
- Paranjape, S. M., Kamakaka, R. T., Kadonaga, J. T. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 63: 265-97.
- Petrij, F., Giles, R. H., Dauwerse, H. G., Saris, J. J., Hennekam, R. C., Masuno, M., Tommerup, N., van Ommen, G. J., Goodman, R. H., Peters, D. J., Breuning, M. H. (1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376: 348-51.
- Powers, D. A. (1991). Evolutionary genetics of fish. *Adv Genet* 29: 119-228.
- Pownall, M. E., Emerson, C. P., Jr. (1992). Sequential activation of three myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos. *Dev Biol* 151: 67-79.
- Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A. Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-41.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23: 4878-84.
- Qyang, Y., Luo, X., Lu, T., Ismail, P. M., Krylov, D., Vinson, C., Sawadogo, M. (1999). Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 19: 1508-17.
- Rachez, C., Freedman, L. P. (2001). Mediator complexes and transcription. *Curr Opin Cell Biol* 13: 274-80.
- Reardon, W., Winter, R. M., Rutland, P., Pulleyn, L. J., Jones, B. M., Malcolm, S. (1994). Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet* 8: 98-103.
- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-51.
- Roberts, S. G. (2000). Mechanisms of action of transcription activation and repression domains. *Cell Mol Life Sci* 57: 1149-60.
- Rose, C. S., Malcolm, S. (1997). A TWIST in development. *Trends Genet* 13: 384-7.
- Rose, C. S., Patel, P., Reardon, W., Malcolm, S., Winter, R. M. (1997). The TWIST gene, although not disrupted in Saethre-Chotzen patients with apparently balanced translocations of 7p21, is mutated in familial and sporadic cases. *Hum Mol Genet* 6: 1369-73.
- Roth, S., Stein, D., Nusslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 59: 1189-202.

- Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L., Levine, M. (1989a). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* 59: 1165-77.
- Rushlow, C. A., Hogan, A., Pinchin, S. M., Howe, K. M., Lardelli, M., Ish-Horowicz, D. (1989b). The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. *Embo J* 8: 3095-103.
- Rutland, P., Pulleyn, L. J., Reardon, W., Baraitser, M., Hayward, R., Jones, B., Malcolm, S., Winter, R. M., Oldridge, M., Slaney, S. F., Poole, M. D., Wilkie, A. O. M. (1995). Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat Genet* 9: 173-6.
- Saethre, M. (1931). Ein Beitrag zum Turmschaedelproblem (Pathogenese, Erbllichkeit und Symptomatologie). *Dtsch Z Nervenheilk.* 119: 533-555.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Sassoon, D. A. (1993). Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev Biol* 156: 11-23.
- Schell, U., Hehr, A., Feldman, G. J., Robin, N. H., Zackai, E. H., de Die-Smulders, C., Viskochil, D. H., Stewart, J. M., Wolff, G., Ohashi, H., Pierce, R. A., Cohen, M. M. jr., Muenke, M. (1995). Mutations in FGFR1 and FGFR2 cause familial and sporadic Pfeiffer syndrome. *Hum Mol Genet* 4: 323-8.
- Schwartz, D. C., Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Sealey, P. G., Whittaker, P. A., Southern, E. M. (1985). Removal of repeated sequences from hybridisation probes. *Nucleic Acids Res* 13: 1905-22.
- Segev, E., Halachmi, N., Salzberg, A., Ben-Arie, N. (2001). Nato3 is an evolutionarily conserved bHLH transcription factor expressed in the CNS of *Drosophila* and mouse. *Mech Dev* 106: 197-202.
- Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y., Saigo, K. (1993). Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 117: 751-61.
- Simpson, P. (1983). Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 105: 615-632.
- Singer, V. L., Wobbe, C. R., Struhl, K. (1990). A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev* 4: 636-45.
- Sirito, M., Lin, Q., Maity, T., Sawadogo, M. (1994). Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 22: 427-33.
- Slaney, S. F., Oldridge, M., Hurst, J. A., Moriss-Kay, G. M., Hall, C. M., Poole, M. D., Wilkie, A. O. (1996). Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 58: 923-32.

- Smale, S. T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* 1351: 73-88.
- Smith, S. B., Ee, H. C., Conners, J. R., German, M. S. (1999). Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Mol Cell Biol* 19: 8272-80.
- Smith, T. H., Kachinsky, A. M., Miller, J. B. (1994). Somite subdomains, muscle cell origins, and the four muscle regulatory factor proteins. *J Cell Biol* 127: 95-105.
- Smith, S. F., Metcalfe, J. A., Elgar, G. (2001). Characterisation of two topoisomerase 1 genes in the pufferfish (*Fugu rubripes*). *Gene* 265: 195-204.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17.
- Spicer, D. B., Rhee, J., Cheung, W. L., Lassar, A. B. (1996). Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 272: 1476-80.
- Spring, J., Yanze, N., Middel, A. M., Stierwald, M., Groger, H., Schmid, V. (2000). The mesoderm specification factor twist in the life cycle of jellyfish. *Dev Biol* 228: 363-75.
- Steward, R. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* 59: 1179-88.
- Struhl, K. (1995). Yeast transcriptional regulatory mechanisms. *Annu Rev Genet* 29: 651-74.
- Swirnoff, A. H., Milbrandt, J. (1995). DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 15: 2275-87.
- Taylor, M. V., Beatty, K. E., Hunter, H. K., Baylies, M. K. (1995). Drosophila MEF2 is regulated by twist and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature. *Mech Dev* 50: 29-41.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C., Perrin-Schmitt, F. (1988). Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos. *Embo J* 7: 2175-83.
- Trower, M. K., Orton, S. M., Purvis, I. J., Sanseau, P., Riley, J., Christodoulou, C., Burt, D., See, C. G., Elgar, G., Sherrington, R., Rogae, E. I., St George-Hyslop, P., Brenner, S., Dykes, C. W. (1996). Conservation of synteny between the genome of the pufferfish (*Fugu rubripes*) and the region on human chromosome 14 (14q24.3) associated with familial Alzheimer disease (AD3 locus). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1366-9.
- Upton, J. (1991). Apert syndrome. Classification and pathologic anatomy of limb anomalies. *Clin Plast Surg* 18: 321-55.
- Venkatesh, B., Gilligan, P., Brenner, S. (2000). Fugu: a compact vertebrate reference genome. *FEBS Lett* 476: 3-7.
- Venkatesh, B., Ning, Y., Brenner, S. (1999). Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10267-71.
- Wang, S. M., Coljee, V. W., Pignolo, R. J., Rotenberg, M. O., Cristofalo, V. J., Sierra, F. (1997). Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 187: 83-92.
- Wilkie, A. O., Slaney, S. F., Oldridge, M., Poole, M. D., Ashworth, G. J., Hockley, A. D., Hayward, R. D., David, D. J., Pulleyn, L. J., Rutland, P., Malcom, S., Winter, R.M., Reardon, W. (1995). Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat Genet* 9: 165-72.

- Winter, R. M., Baraitser, M. (1994). The London Dysmorphology Database. Oxford, Oxford University Press.
- Wobbe, C. R., Struhl, K. (1990). Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription in vitro. *Mol Cell Biol* 10: 3859-67.
- Wolf, C., Thisse, C., Stoetzel, C., Thisse, B., Gerlinger, P., Perrin-Schmitt, F. (1991). The M-twist gene of Mus is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the Xenopus X-twi and the Drosophila twist genes. *Dev Biol* 143: 363-73.
- Wolffe, A. P., Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84: 817-9.
- Yin, Z., Xu, X. L., Frasch, M. (1997). Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development* 124: 4971-82.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 273: 33741-9.
- Yousfi, M., Lasmoles, F., Kern, B., Marie, P. (2002). TWIST inactivation reduces CBFA1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 641.
- Yousfi, M., Lasmoles, F., Lomri, A., Delannoy, P., Marie, P. J. (2001). Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *J Clin Invest* 107: 1153-61.
- Zhang, X., Yang, H., Yu, J., Chen, C., Zhang, G., Bao, J., Du, Y., Kibukawa, M., Li, Z., Wang, J., Hu, S., Dong, W., Gregersen, N., Niebuhr, E., Bolund, L. (2002). Genomic organization, transcript variants and comparative analysis of the human nucleoporin 155 (NUP155) gene. *Gene* 288: 9-18.
- Zweidler-Mckay, P. A., Grimes, H. L., Flubacher, M. M., Tschlis, P. N. (1996). Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16: 4024-34.



## 7. Anhang

### 7.1 Anhang 1: Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung angegeben

<b>Allgemeine Oligonukleotide für verwendete Vektoren</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Bemerkung</b>
RV Primer 3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	pGL3-Vektoren, Promega
GL Primer 2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA	pGL3-Vektoren, Promega
M13	GTAAAACGACGGCCAG	
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
T7 Promotor-Pr.	TAATACGACTCACTATAGG	
Sp6 Promotor-Pr.	GATTTAGGTGACACTATAG	
T3-Primer	AATTAACCCTCACTAAAGGG	

<b>Oligonukleotide für menschliche Sequenzen</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Bemerkung</b>
TWIST 1F	GAGGCGCCCCGCTCTTCTCC	Howard et al., 1997
TWIST 1R	AGCTCCTCGTAAGACTGCGGAC	Howard et al., 1997
TWIST 2F	GCAAGCGCGGCAAGAAGTCT	El Ghouzzi et al., 1997
TWIST 2R	GGGGTGCAGCGGCGCGGTC	El Ghouzzi et al., 1997
FGFR1 F	AACCTGCCTTATGTCCAGATCT	
FGFR1 R	AGGGGCGAGGTCATCACTGC	
FGFR2 F	GGCTGCCCTACCTCAAGGTTT	
FGFR2 R	AGTCTGGGGAAGCTGTAATCTC	
FGFR3 F	GCACACCCTACGTTACCGTG	
FGFR3 R	GCCTCGTCAGCCTCCACCAG	
FGFR4 F	ATCAACGGCAGCAGCTTCGGAG	
FGFR4 R	AGGGAGCCCCGACGCGTACAG	
GAPDH F	CGTCTTCACCACCATGGAGA	
GAPDH R	CGGCCATCACGCCACAGTTT	
TWISTNB 1F	AGGGTCCTGGTCCTGAACTT	

TWISTNB 1R	GAAAATGGCACTGAGGAAGC	
TWISTNB 2F	GCATTTCAAAGGTGGGGTAA	
TWISTNB 2R	CTCCAATGGAAGAGTCAGCC	
TWISTNB 3F	GTAATGCAGCGAAAAGAGGG	
TWISTNB 3R	CGCGACTCTAGAAATCCAGG	
TWISTNB 4F	AGAGCAAGACCCTGTCTCCA	
TWISTNB 4R	TTGCCCTTAAAATCATTCTGC	
TWISTNB 5F	TTCCTTCTTCTTCCCAGGGT	
TWISTNB 5R	TGTAAAAACAAAGCAGGCCA	
TWISTNB 6F	TGTGTGGAAACAGTCTGGGA	
TWISTNB 6R	GCATTTCAAAGGTGGGGTAA	
TWISTNB 7F	ATGGCTGCAGGTTGCTCAGAG	
TWISTNB 7R	CTAAAGAAAATTACTTTTCC	
TWISTNB 8F	TGGCTGCAGGTTGCTCAGAG	
TWISTNB 8R	AAGAAAATTACTTTTCCCTT	

**Oligonukleotide für Sequenzen der Maus**

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
mTwistnb 1F	TGTAGCAGAAACTGTCGTTG	
mTwistnb 1R	ATGTCTGTTTCTZCCZGTGG	
mTwistnb 2F	GCCTTTTAGGTGTCCCTATT	
mTwistnb 2R	ACATCCATGGACTAGACAGC	
mtwistnb-3'-utr 1F	ATGTATGATGGGCAGAAAAC	
mtwistnb-3'-utr 1R	TGGTTAGGCATAACACATCA	
mtwistnb-3'-utr 2F	GCCAAAGCCTATAAAGTCAA	
mtwistnb-3'-utr 2R	GCTAGTCAGTGACAACAGCA	
mGAPDH F	TGTCTTCACCACCATGGAGA	
mGAPDH R	CGGCCATCACGCCACAGCTT	

<b>Oligonukleotide für Expressions- und Reportergen-Konstrukte</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>	<b>Bemerkung</b>
Promo R (BglII)	ATAGATCTGAGGTGTCTGGGAGTTGG	am 5'-Ende künstliche <i>BglII</i> Schnittstelle; für das 3,8 kb-pGL3-Basic Plasmid und das 1,7 kb-pGL3-Basic Plasmid
1,5 kb Promo (MluI) rev	AATACGCGTTCGAGTCCGTAAGCC	am 5'-Ende künstliche <i>MluI</i> Schnittstelle; für das 3,8 kb-pGL3-Basic Plasmid
3,5 kb Promo (MluI) rev	TCACGCGTGGAGCCAACAAACAGGTGAT	am 5'-Ende künstliche <i>MluI</i> Schnittstelle; für das 1,7 kb-pGL3-Basic Plasmid
355 bp Prom F	ATGGCAACAGCTTCTACACA	für das 355 bp-pGL3-Basic Plasmid
355 bp Prom R	GTAGTCCTTTGGATGTTGGG	für das 355 bp-pGL3-Basic Plasmid
Promo Seq 1F	AGACTGGGTCGTTGTAGAGG	
Promo Seq 1R	AGGAGGGACTTTTCGAAGTT	
Promo Seq 2F	AGGGGAATTCAAATGAACA	
Promo Seq 2R	GTTTGCAAAGCAGGGAGTAT	
Promo Seq 3F	AGAAGGAGGCAAATGACTG	
Promo Seq 3R	CCTTCTTTGGGAATGCTAGA	
Promo Seq 4F	ATGGCAACAGCTTCTACACA	
Promo Seq 4R	CACCCACTGTGTAGAAGCTG	
TWIST-cDNA 1F	TCGGACAAGCTGAGCAAGATT	
TWIST-cDNA 1R	TTGCATTTACCATGGGTCCT	
TWIST-cDNA 2F	GGGAGTCCGCAGTCTTACGA	
TWIST-cDNA 2R	GTTTTGCAGGCCAGTTTGAT	
TWIST cDNA 3R	GACACGTCCTGCATCATCTTC	
vecPrimer 1F	CGAAATTAATACGACTCACTAT	
vecPrimer 2F	TGGGAGGTCTATATAAGCAGA	

pCMV3C/twist F	GAGCAGAAACTCATCTCTGAAGAGG	
pCMV3C/twist R	ACACGTCCTGCATCATTCTTCGA	

<b>Oligonukleotide für <i>Fugu</i> Sequenzen</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>	<b>Bemerkung</b>
fugu 1F	CTGAGGAGGAAAGTCCCCAC	
fugu 1R	CCTGCAGACCTCTGTCCAAG	
fugu 2 F	TGGCCATCGTCTACATCTCC	
fugu 2R	TAACGAGCATTGCGTCTGTG	
fugu 3F	CTGTCCTTCTTGTCGAACGC	
fugu 3R	TTGTCGCTTTAATTGCCAACC	
fugu 4F	GGTGGCAATTAAGCGACAA	
fugu 4R	TTGTGCATTTTCCAACCACA	
fugu-tw 1F	AAGTCGCCTTTAACCCGTTT	
fugu-tw 1R	GTTCTCCTGCAAGTTCTCGG	
fugu-tw 2F	CAGACCGACACGCATAGAGA	
fugu-tw 2R	CATGCAGGCTCCTCTACACA	
fugu-tw 3F	TGTGCAGGAGTCAGAGGTTG	
fugu-tw 3R	TGTTTCAAGTCCTCGCCTCT	
fugu-tw 4F	TCACCTCTGAGGCTTTCATA	
fugu-tw 4R	TTGTGGAATGTGTTTTCCTC	
fugu-tw 5F	CTGTGACAACCTCCTGTGTT	
fugu-tw 5R	TGGCTACATCTCAATTTGCT	
fugu-twseq 1F	CTGAGGAGGAAAGTCCCCAC	
fugu-twseq 1R	ATCCTAAGCTTGGTCTCCCT	
fugu-twseq 2F	TTCTATTTGGTCTTCTCCCG	
fugu-twseq 2R	AAGGAGATGTAGACGATGGC	
fugu-twseq 3F	GTAAGGGGACACCAATACAA	
fugu-twseq 3R	TGTCACTATACACCATCGGC	
ftwist-cod. 1F	TCTGGGGTGATAACAGGAG	
ftwist-cod. 1R	CTCTTCCTGCATTTCTTCGT	
ftwist-cod. 2F	TCCCTCAACGAAGCTTTTAC	

ftwist-cod. 2R	AGAACCTGGCACAGAAAGTC	
fugu-seq 1F	TATCTGTTACGCACAAGACG	
fugu-seq 1R	GAAACACAAACACAGACACG	
fugu-seq 2F	TTGGTCTTAAAATTGCAGGT	
fugu-seq 3F	CACCACAAACTCCTATTGGT	
fugu-seq 3R	ATGCATCACAGCTTAACACA	
F21109 1F	GAATGTATCCGCCAGTATGT	
F21109 1R	CTGTGTGTGTGTCTCTCGAC	
F21109 2F	CGTTTTTCTTAATGTCTCG	
F21109 2R	AGAGAGAGAGAAATGATGTGGT	
F21109 3R	GAACTAGTGTTTTGGTGGCT	
F21109 4F	CAGCTTCAAGCCTCCTATTA	
F21109 4R	ACTGCAATAAGATGCTGGTT	
F21109 5F	TGGTTCTCATGAAGGAGTTC	
F21109 5R	TTATGGCCTTTATTTTTGGA	
F21109 6F	GTTTTACAGCCAAACTCCCT	
F21109 6R	AAATGCAACAAGAAAGACGA	
F21109 7F	CTGGAACCCTTAATGTGTGT	
F21109 7R	GAATGTATTGCTTCCTTTGC	
F21109 8F	CTTACTTACAGTCCAACCCG	
F21109 8R	CCCAACTGAACACCATTACT	
F21109 9F	GGAAGTTTTGTTTTCTCCT	
F21109 9R	CGTGTGTGTGTGTGTATGTG	
F21109 10F	GGTGACCTCAGTTGTCAGTT	
F21109 10R	GTGCTGAAATGTGTCACTTG	
F21109 11F	CTGTCCTATAATCCTGCCTG	
F21109 11R	TTAATACTGCGACGTGTTTG	
F21109 12F	TACTCCACTCCAAGATGTTG	
F21109 12R	CTCCTCAGAACCCTCAAAGA	
F21109 12.1R	CCACAGGCATATTCATCAA	
F21109 seq 1F	AAATAACTGTCCGTTCCCAT	
F21109 seq 1R	GCGTGATGATGCTCTTACTC	
F21109 sep 2F	GTGACACGTTAGCTCCTCTG	

Anhang

F21109 seq 2R	ATCACATTTGTGCTGGTTTC	
F21109 seq 3F	TGCATGAGAGGTGTATGTGA	
F21109 seq 3R	CTCATCCTGTTATTTTCGAG	
F21109 seq 4F	GTTTCTTAGTCAGCCAGGGT	
F21109 seq 4R	GTGGTGAAGGGTTCTATTCC	
F21109 seq 5F	AGGGAGAAGGACAGAGTGAG	
F21109seq 5R	CCCCAGATGATCCTATTCTC	
F21109 seq 6F	GAGGGAAAGGAAGAACAGAA	
F21109 seq 6R	TCAAATAAACGGAGACGAAA	
F21109 seq 7F	GAGAATAGGATCATCTGGGG	
F21109 seq 7R	CGCTAATGATGGATCAATGT	
twist-3' seq 1f	TCTCAGCGAGGTAGTTAAGC	
twist-3' seq 1R	GAGACAAGCAGGGTGTAGAG	
twist-3' seq 2f	TTTCCAACCTTGCCACTAAT	
twist-3' seq 2R	ATATTGCATTGCTTTTCGAGT	
twist-3' seq 3f	GTAAGGGGACACCAATACAA	
twist-3' seq 3r	ATTTGGGGATGGAAATTAGT	
twist-3' seq 4f	CACACACACACATCATCCTT	
twist-3' seq 4r	CAGATTTTTTCTAGCCCAATG	
twist-3 seq 5F	ACTGTGCTCGGAATTAGTGT	
twist-3 seq 5R	CTGTGGAATTATGGGACATT	
fugu PAC-seq 1F	GAGCACCAAGTCATCTAAGG	
fugu PAC-seq 1R	ATTGTAAGTGGCATTGCTTCT	
fugu PAC-seq 2F	CCATATTAGCGAGGATTGAG	
fugu PAC-seq 2R	TAAAGGAAGAATTGTCCGAA	
fugu PAC-seq 3F	TGTCCTTGATTTATTGGAGG	
fugu PAC-seq 3R	GTCAAAATGGGTTTTTACCA	
fugu PAC-seq 4F	TCTTGCTTAGTGACTCGGAT	
fugu PAC-seq 4R	CTCCCCTCCTTTCAGTAAAT	
fugu PAC-seq 5F	AGCGGAAACACTGTAAAAA	
fugu PAC-seq 5R	ACCATGTAAATCTGCCTCAC	
fugu PAC-seq 6F	CTTTACACACGCACAAGAGA	
fugu PAC-seq 6R	CAACAGTGGATGTTTGACTG	

fugu PAC-seq 7F	AGGTCATCAATAAAATGTGGC	
fugu PAC-seq 7R	GTGGAGAATAAGTGTGGGAA	
fugu PAC-seq 8F	CTCAAGGAGAAGAACCAGTG	
fugu PAC-seq 8R	GAGGAGCATTTGATTCTCTG	
fugu PAC-seq 9F	TTTATGCAGCAGCTTGTTTA	
fugu PAC-seq 9R	TCTACCTGAGGGAGCATAAA	
fugu PAC-seq 10F	TTGGCTCTTCTCTGTTTCAT	

<b>Sonstige Oligonukleotide</b>		
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5' - 3'</b>	<b>Bemerkung</b>
neo 1F	CTGTGCTCGACGTTGTCCT	
neo 1R	AGTACGTGCTCGCTCGATG	
neo 2F	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	
neo 2R	GCTCTTCGTCCAGATCATCC	

## 7.2 Anhang 2: Prozentuale Auswertung der durchgeführten Dual-Luciferase Assays in OHS- und CCL-136-Zellen

Angegeben sind die jeweiligen Experimente, die Gesamt-Auswertung und die ermittelte Standardabweichung (St.-abw.).

### Auswertung der Dual-Luciferase Assays mit OHS-Zellen (TWIST-exprimierend)

Konstrukte/Datum	11.09.00	21.12.00	31.01.01	01.02.01	23.02.01	01.03.01	16.02.01
pGL3-Basic	13,64	8,28	6,63	4,85	3,87	5,73	8,63
pGL3-Promotor	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3,8 kb-pGL3-Basic			117,68	56,64		78,10	83,06
3,5 kb-pGL3-Basic	88,79	133,62	106,39	74,99	53,64	47,49	76,97
3,0 kb-pGL3-Basic			157,33	57,68		175,23	47,56
2,5 kb-pGL3-Basic					43,05	57,26	
1,7 kb-pGL3-Basic		104,42	76,56	54,85		77,00	74,31
800bp-pGL3-Basic	136,23	208,09	97,24	108,60	97,99	138,85	97,49
478bp-pGL3-Basic			59,07	31,46			
355bp-pGL3-Basic							

Konstrukte/Datum	29.04.01	20.09.01	30.11.01	03.04.02	03.03.02	10.04.01	Gesamt	St.-abw.
pGL3-Basic	3,07	8,96	6,16	5,36	6,05	3,71	<b>6,53</b>	<b>2,83</b>
pGL3-Promotor	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	<b>100,00</b>	<b>0,00</b>
3,8 kb-pGL3-Basic							<b>83,87</b>	<b>25,29</b>
3,5 kb-pGL3-Basic		132,87					<b>89,35</b>	<b>32,80</b>
3,0 kb-pGL3-Basic							<b>109,45</b>	<b>66,15</b>
2,5 kb-pGL3-Basic		103,98					<b>68,10</b>	<b>31,88</b>
1,7 kb-pGL3-Basic	94,41			124,82			<b>86,63</b>	<b>23,06</b>
800bp-pGL3-Basic	61,38			105,57			<b>116,83</b>	<b>41,19</b>
478bp-pGL3-Basic				39,81	37,12	23,18	<b>38,13</b>	<b>13,33</b>
355bp-pGL3-Basic			5,79	7,42	8,06	6,07	<b>6,83</b>	<b>1,08</b>



### Auswertung der Dual-Luciferase Assays mit CCL136-Zellen (TWIST-nicht-exprimierend)

Konstrukte/Datum	11.09.01	21.12.01	31.01.01	01.02.01	23.02.01	01.03.01	16.02.01
pGL3-Basic	5,36	1,91	2,01	2,18	0,73	2,41	2,16
pGL3-Promotor	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
3,8 kb-pGL3-Basic			36,66	39,77		23,75	55,04
3,5 kb-pGL3-Basic	50,66	26,39	31,88	32,46	65,28	13,47	78,66
3,0 kb-pGL3-Basic			52,24	35,10		58,02	22,65
2,5 kb-pGL3-Basic					40,04	23,53	
1,7 kb-pGL3-Basic		28,06	49,72	30,89		59,29	96,43
800bp-pGL3-Basic	114,19	87,17	61,45	85,17	192,11	83,13	139,30
478bp-pGL3-Basic			17,43	11,52			
355bp-pGL3-Basic							

Konstrukte/Datum	29.04.0	20.09.01	30.11.0	03.04.02	03.04.0	10.04.02	Gesamt	St.-abw.
	1		1		2			
pGL3-Basic	2,23	2,87	2,02	2,24	1,91	9,12	<b>2,86</b>	<b>2,14</b>
pGL3-Promotor	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	<b>100,00</b>	<b>0,00</b>
3,8 kb-pGL3-Basic							<b>38,80</b>	<b>12,86</b>
3,5 kb-pGL3-Basic		66,02					<b>45,60</b>	<b>22,94</b>
3,0 kb-pGL3-Basic							<b>42,00</b>	<b>16,16</b>
2,5 kb-pGL3-Basic		78,34					<b>47,30</b>	<b>28,12</b>
1,7 kb-pGL3-Basic	38,50			47,04			<b>49,99</b>	<b>23,20</b>
800bp-pGL3-Basic	83,33			93,62			<b>104,39</b>	<b>39,58</b>
478bp-pGL3-Basic				26,72	26,15	20,32	<b>20,43</b>	<b>6,34</b>
355bp-pGL3-Basic			2,70	3,94	3,04	6,46	<b>4,04</b>	<b>1,70</b>

### 7.3 Anhang 3: Datenbankeinträge am NCBI

TWISTNB: BK000492

TWISTNB pseudogen: BK000493

genomische Fugu Sequenz: AF527754

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
Acc.No.	Identifikationsnummer der Genbank <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez</a>
ACS	Acrocephalosyndacylie
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (alkalische Phosphatase)
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidinophenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii (und andere)
EDTA	Ethylenamintetraacetat
EtBr	Etidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	forward (vorwärts)

FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FKS	fötales Kälberserum
F-Twist	Fugu Twist
G	Guanosin
HLH	Helix-Loop-Helix
H-DERMO-1	menschliches DERMO-1
H-TWIST	menschliches TWIST
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
LB	Wachstumsmedium nach Luria und Bertani
M	Molar
Mb	Megabasenpaar(e)
MCS	multiple cloning site (multiple Klonierungsstelle)
mRNA	messenger RNA
$\mu$ l/ $\mu$ g	Mikroliter / Mikrogramm
NLS	nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal)
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
poly A <sup>+</sup> -RNA	polyadenylierte RNA (= messenger RNA)
r	reverse (rückwärts)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNP	ribonucleo protein
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SCS	Seathre-Chotzen Syndrom
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec	second (Sekunde)
T	Thymidin

## Abkürzungsverzeichnis

---

Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tel	Telomer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
U	Units
UV	ultraviolettes Licht
% v / v	Volumenprozent
% w / v	Gewichtsprozent
WWW	World Wide Web

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und andere physikalischen Angaben wurden SI- oder gesetzliche Einheiten benutzt.

Aminosäuren wurden mit dem international anerkannten Einbuchstaben-Code dargestellt.

## 9. Publikationen

### 9.1 Originalarbeiten

Stegmann K, Boecker J, **Kosan C**, Ermert A, Kunz J, Koch MC. (1999). Human transcription factor SLUG: mutation analysis in patients with neural tube defects and identification of a missense mutation (D119E) in the Slug subfamily-defining region. *Mutat Res* 406: 63-9, 1999

Biederbick A\*, **Kosan C\***, Kunz J, Elsässer HP (2000). First apyrase splice variants have different enzymatic properties. *J Biol Chem* 275: 19018-19024

\* Both authors participated equally in this study

Boeck A, **Kosan C**, Ciznar P, Kunz J (2001). Saethre-Chotzen syndrome and hyper IgE syndrome in a patient with a novel 11 bp deletion of the TWIST gene. *Am J Med Genet* 104: 53-56, 2001.

**Kosan C**, Kunz J (2002). Identification and characterization of the gene *TWIST NEIGHBOR (TWISTNB)* located in the Microdeletion Syndrome 7p21 region. *Cytogenet Genome Res* (im Druck)

### 9.2 Poster

Stegmann K, Boecker J, **Kosan C**, Ermert A, Kunz J, Koch MC (1999). Genomic characterisation of human transcription factor SLUG and mutation analysis in neural tube defects. *Med Genet* 11: 179

Kunz J, **Kosan C**, Biederbick A, Elsässer HP (1999). Gene analysis of LALP70: Evidence of a first splice variant in the apyrase protein family. *Med Genet* 12: 71

Kunz J, Stegmann K, Boecker J, **Kosan C**, Ermert A, Koch MC (1999). Human transcription factor SLUG: genomic characterisation and mutation analysis in patients with neural tube defects. *Am J Human Genet* 65: A190

**Kosan C**, Biederbick A, Elsässer HP, Kunz J (1999). Genomic organization and chromosomal mapping of the human LALP70 gene. *Am J Hum Genet* 65, Suppl.: A190

Biederbick A, **Kosan C**, Kunz J, Elsässer HP (2000). Lalp70 and LALP70v: first splice variants of apyrases differing in enzymatic properties. *Eur J Cell Biol*, (Suppl) 79: 42

Kunz J, **Kosan C**, (2002). Comparative genomics of the TWIST region in human and Fugu rubripes. *Med Genet* 14: 339

### 9.3 Vorträge

**Kosan C**, Kunz J

Projektvorstellung, Arbeitsbericht und Vorstellung der Ziele

DFG Klausurtagungen Schwerpunktprogramm Molekulare Dysmorphogenese, Mainz (Oktober 1999 und April 2001)

## 10. Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	Name	Christian Jörg Kosan
	Anschrift	Robert-Koch-Str. 1 45147 Essen
	Geburtsdatum	08. April 1971
	Geburtsort	Bonn
<b>Schule</b>	1981-1991	Gymnasium am Löhrtor in Siegen Abschluss: Abitur
<b>Zivildienst</b>		1991-1992 Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz in Siegen
<b>Universität</b>	1992-1997	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
	05/1997-05/1998	Diplomarbeit am Medizinischen Zentrum für Humangenetik
	Thema:	„Identifizierung und Charakterisierung des menschlichen HSLUG Gens und Überprüfung seiner Relevanz für das Saethre-Chatzen Syndrom“
	Juni 1998	Abschluss: Diplom
	06/1998-05/2002	Praktischer Teil der Promotion am Medizinischen Zentrum für Humangenetik der Philipps- Universität Marburg, Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik, HD Dr. J. Kunz Gefördert durch die Deutsche Forschungs- gemeinschaft (DFG) im Schwerpunktprogramm Molekulare Dysmorphogenese

seit Juni 2002      wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für  
Zellbiologie Essen, Arbeitsgruppe, Prof. Dr. T.  
Möröy

## 11. Danksagung

Herrn HD Dr. Jürgen Kunz danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens, die anregenden Diskussionen und für die produktive Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich Jürgen ich neben der Betreuung meiner Dissertation auch für sein Vertrauen in meine Arbeit und seine Unterstützung - auch in schwierigen Phasen.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl für die gute Betreuung am Fachbereich Biologie und die Übernahme des Hauptreferats.

Dr. Frank Grützner und Dr. Thomas Haaf (MPI, Berlin) möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung im Rahmen der Untersuchungen bei *Fugu* durchgeführt wurden danken.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung sowie für das angenehme Arbeitsklima.

Melanie, Daniela und Ulrike danke ich für ihre Unterstützung sowie für das angenehmen Arbeitsklima im Labor.

Bei Anja bedanke ich mich für ihre wertvollen fachlichen Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frank und Lars für die gute Zusammenarbeit in der gemeinsamen Zeit im Labor, die auch nach der Arbeitszeit das eine oder andere Mal ausgedehnt wurde.

Hartmut danke ich für die Hilfe bei allen Fragen, die Computer und Sequenzierung betreffen. Dies gilt im besonderen bei einigen „ausweglosen Situationen“, für die er doch eine Lösung finden konnte.

Mein Dank gilt auch Dorothea, für ihre vielen technischen und organisatorischen Hilfestellungen.



Frau Dr. Martha Kalff-Suske möchte ich für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion danken. Martha war trotz ihrer knapp bemessenen Zeit immer bereit, meine Fragen zu beantworten.

Bei Martina bedanke ich mich für die fachlichen Unterstützung, im Besonderen bei allen proteinbiochemien Fragestellungen.

Prof. Dr. H.P. Elsässer danke ich für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie seine kreativen Denkanstöße.

Dr. Anne Holz danke ich für ihre Tipps, die zu einem besseren Verständnis der *Drosophila*-Genetik beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Maren, die mir vor allem in den anstrengenden Zeiten immer zur Seite stand.

Danken möchte ich auch meiner Familie für ihre Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft.

## 12. Ehrenwörtliche Erklärung

### Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Charakterisierung der humanen *TWIST*-Region - strukturelle und funktionelle Analysen**

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 20.11.2002

(Christian Kosan)