

ROBERT KREUTZER

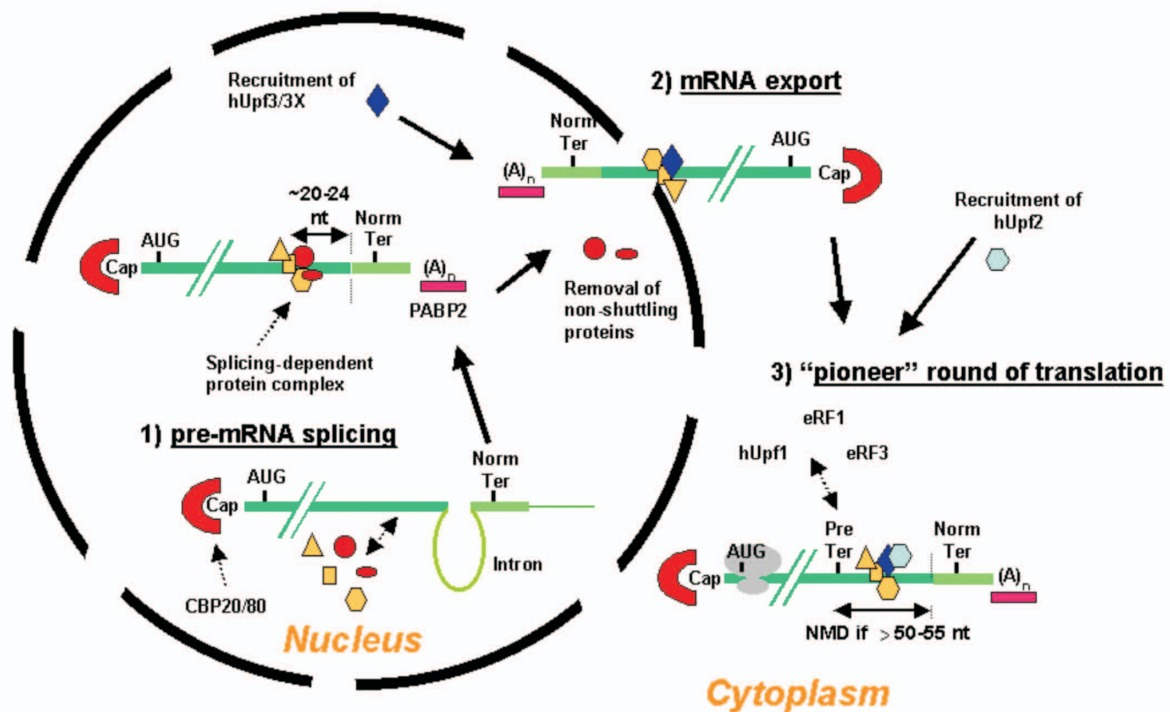
# Charakterisierung des genetischen Defektes der GM1-Gangliosidose beim Alaskan Husky

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie und der  
Klinik für Kleintiere, Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.  
HDoz Dr. A. Moritz

**Charakterisierung des genetischen Defektes der GM<sub>1</sub>-  
Gangliosidose beim Alaskan Husky**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**ROBERT KREUTZER**

Tierarzt aus Kronstadt/Rumänien

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

HDoz Dr. A. Moritz

Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D.

Prof. Dr. R. Gerstberger

Tag der Disputation: 31.01.2005

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

SOTIEI MELE  
MEINER FRAU

## INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen.....	I
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
2.1. Gangliosidosen.....	3
2.2. Biochemische Grundlagen der GM <sub>1</sub> –Gangliosidose.....	4
2.2.1. Struktur, Funktion und Lokalisation von Gangliosiden.....	5
2.2.2. Vorkommen der GM <sub>1</sub> - Gangliosidose bei verschiedenen Spezies.....	7
2.2.3. Klinik und Pathologie der GM <sub>1</sub> - Gangliosidose .....	8
2.2.3.1. Klinik der GM <sub>1</sub> - Gangliosidose.....	8
2.2.3.2. Zytologische und biochemische Veränderungen .....	10
2.2.3.3. Pathologisch-anatomische Veränderungen .....	11
2.2.4. Pathogenese der GM <sub>1</sub> -Gangliosidose.....	14
2.3. Methoden der molekulargenetischen Diagnostik.....	17
2.3.1. “Amplification Refractory Mutation System” (ARMS)-PCR .....	18
2.3.2. “Real-time”-PCR (Echtzeit-PCR).....	19
2.3.3. Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung (ASO) .....	19
2.3.4. “Single Strand Conformation Polymorphism“ ( Einzelstrang Konformations - SSCP)-Analyse.....	20
2.3.5. DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese)- und TGGE (Temperatur Gradientengelelektrophorese)-Analyse .....	20
2.3.6. Heteroduplexanalyse .....	20
2.3.7. DHPLC (Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) .....	21
2.3.8. Diagnostischer Restriktionsverdau.....	22
2.3.9. “Solid-phase minisequencing”-Methode.....	22
2.3.10. Sequenzenanalyse.....	22
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
3.1. Biologisches Material.....	24
3.2. Gewebe- und Zellkulturtechniken.....	25
3.3. DNS-Isolierung .....	26
3.3.1. Isolierung von DNS aus Zellkulturen und Zellhomogenaten durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion.....	26
3.3.2. Isolierung von DNS aus Zellkulturen und Zellhomogenaten mittels Puregene <sup>®</sup> DNS Isolierungskit.....	27
3.4. RNS-Isolierung.....	28
3.4.1. Etablierung und Optimierung der TRIzol <sup>®</sup> -Standard Methode.....	28
3.4.2. DNase Behandlung.....	28
3.5. Konzentrations- und Integritätsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
3.5.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	30

3.5.2. Elektrophoretische Integritätsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
3.6. Amplifikation der genomischen DNS.....	31
3.7. Oligonukleotide für die Durchführung molekularbiologischer Arbeiten.....	32
3.8. Amplifikation des Exon 15 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase-Gens mittels PCR (Polymerasenketten-Reaktion).....	34
3.8.1. Amplifikationskontrolle .....	35
3.9. Herstellung von cDNA mittels SMART <sup>TM</sup> RACE Amplification Kit .....	36
3.9.1. dscDNS-Aufreinigung mittels "QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit".....	39
3.9.2. "nested"-PCR mit spezifischen Primern für die kanine saure $\beta$ -Galaktosidase.....	40
3.9.2.1. Ergebniskontrolle .....	44
3.9.2.2. DNS-Extraktion aus dem Agarosegel .....	44
3.9.2.3. dATP „Tailing“ Reaktion der DNS.....	45
3.10. Klonierung von PCR-Produkten .....	46
3.10.1. Bakterienkultur.....	46
3.10.2. Verwendete Plasmide.....	47
3.10.3. TOPO TA-Klonierung.....	47
3.10.4. Herstellung von Copy –Kolonien und „colony“ –PCR.....	48
3.10.4.1. Herstellung von "copy"-Kolonien.....	48
3.10.4.2. Colony-PCR .....	49
3.10.5. Anzucht von <i>E.coli</i> -Flüssigkulturen und Plasmidpreparationen.....	50
3.10.5.1. Plasmidpreparationen durch alkalische Lyse (Sambrook et al., 2001).....	50
3.10.5.2 Plasmidpreparationen mit dem NucleoBond <sup>®</sup> PC100 Kit.....	51
3.11. Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse.....	52
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
4.1. RNS-Isolierung.....	54
4.1.1. DNase-Behandlung .....	54
4.2. SMART <sup>TM</sup> RACE-Technologie .....	55
4.2.1. Herstellung von cDNS mittels „SMART <sup>TM</sup> RACE Amplification Kit“.....	55
4.2.2. „Nested“-PCR mit saure $\beta$ -Galaktosidase-spezifischen Primern.....	55
4.3. DNS-Isolierung und Amplifikation.....	65
4.3.1. Vergleich der verschiedenen DNS-Isolierungsmethoden .....	65
4.3.1.1. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion.....	65
4.3.1.2. Die DNS-Isolierung mit Puregene <sup>®</sup> Kit.....	66
4.3.2. Amplifikation der genomischen DNS .....	66
4.4. Polymerasenketten-Reaktion (PCR) für die Amplifikation der DNS des Exon 15 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase-Gens .....	66
4.5. Klonierung von PCR-Produkten für Sequenzierung.....	69
4.5.1. Klonierung kaniner $\beta$ -Galaktosidase Amplikons .....	69
4.5.1.1. Klonierung des von mRNA ausgehenden Amplikons.....	69
4.5.1.2. Klonierung der von genomischer DNS abstammenden Amplikone.....	73
4.6. Sequenzierung der Plasmide und PCR-Produkte.....	75
4.6.1. Direkte Sequenzierung der PCR-Produkte.....	75
4.6.2. Eingrenzung des genetischen Defektes .....	76
4.6.3. Charakterisierung des 251bp Nukleotidenverlustes.....	82



4.6.4. Bestätigung der 19bp Duplikation auf DNS-Ebene .....	84
4.6.5. Auswirkungen auf der Protein-Ebene .....	86
4.6.5.1. Auswirkungen des Exon 15-Verlustes auf der Protein-Ebene .....	86
4.6.5.2. Auswirkungen der 19bp Duplikation auf der Protein-Ebene .....	88
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
5.1. RNS-Isolierung und DNase-Behandlung .....	91
5.2. Herstellung von cDNS mittels „SMART™ RACE Amplification Kit“ .....	91
5.3. „Nested“-PCR mit dscDNS unter Verwendung spezifischer Primer für die kanine sauren $\beta$ -Galaktosidase mRNA .....	92
5.4. DNS-Isolierung .....	93
5.5. Repräsentative Amplifikation der DNS mit der Phi29-Polymerase .....	94
5.6. PCR mit genomischer und Phi29 amplifizierter DNS unter Verwendung spezifischer Primer für das Exon 15 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase Gens .....	94
5.7. Sequenzierung von Plasmide und PCR-Produkte .....	95
5.7.1. Molekular-genetische Charakterisierung des genetischen Defektes .....	95
5.8. Vergleich der GM <sub>1</sub> -Gangliosidose bei Alaskan Husky mit lysosomalen Speicherkrankheiten in verschiedenen Tierspezies und Mensch .....	97
5.8.1. GM <sub>1</sub> -Gangliosidose in verschiedenen Tierspezies .....	97
5.8.2. GM <sub>1</sub> -Gangliosidose beim Menschen .....	98
5.8.3. Andere lysosomale Speicherkrankheiten .....	99
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>104</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>106</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>108</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>128</b>
9.1. Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Kits .....	128
9.2. Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel .....	129
9.3. Lösungen und Puffer .....	131
9.3.1. Gewebekultur .....	131
9.3.2. DNS-Isolierung .....	131
9.3.3. Elektrophorese .....	132
9.3.4. Klonierung .....	132
9.4. In der NCBI-Gendatenbank vorhandene Sequenzen der kaninen saure $\beta$ -Galaktosidase mRNA und DNS .....	134
9.5. Verwendete DNS- Basenleitern („DNA -molecular weight marker“).....	135

## Verzeichnis der Abkürzungen

a, A	Adenin
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ARMS-PCR	“amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction”
as, As	“antisense”
bp	Basenpaare
c, C	Cytosin
cDNS	„copy“ DNS
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleintriphosphat
del, Δ	Deletion
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DHPLC	Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleintriphosphat
ds	Doppelstrang
Dup	Duplikation
EDTA	“ethyldiaminetetraacetic acid” (Äthylendiaminotetraessigsäure)
FGF	“fibroblast growth factor”
FKS	fetales Kälberserum
g, G	Guanin
IVS	Inversion
LB	Luria-Bertani
MAG	“myelin associated glycoprotein”
MCB	“membranous cytoplasmic bodies”
MEME	Eagle’s minimal essential medium mit Earl’scher Salzlösung
mRNS	“messenger“ RNS
MW	Molekulargewicht
Na	Natrium
NGF	“nerve growth factor”
NMD	“nonsense mediated mRNA decay”
p.a.	per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	“phosphate buffered saline”
PPCA	Carboxypeptidase protektives Protein/Cathepsin A
q.s.	quantum satis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLB	“pleomorphic lipid bodies”
PTC	“premature termination codon”

RACE	“rapid amplification of cDNA ends”
RNS, RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s, S	“sense”
SDS	“sodium dodecyl sulfate”
SMART	“switch mechanism at 5’ end of RNA transcript”
ss	Einzelstrang
SSCP	“single strand conformation polymorphism”
SSS	“splice site score”
T, t	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEAA	Tetraethylammonium-Kation
Ter	Stoppkodon
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Trk	“tyrosine kinase type receptor”
TGGE	Temperatur Gradienten-Gelelektrophorese
Tm	Schmelztemperatur
Tris-Cl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid
ZNS	zentrales Nervensystem



## 1. EINLEITUNG

Auf dem Gebiet der lysosomalen Speicherkrankheiten haben sich in den letzten Jahren neue Entwicklungen abgezeichnet. Molekularbiologische Forschungen haben zur Charakterisierung genetischer Defekte beigetragen und die sichere Erkennung von Merkmalsträgern erblicher Erkrankungen ermöglicht (Suzuki, 1995; Jolly und Walkley, 1997; Lake, 1997; Matsuda et al, 1997). Durch genetische Defekte können in Zellen bestimmte Enzyme fehlen, die für den Abbau von Stoffwechselprodukten erforderlich sind. Diese nicht gespaltenen Stoffwechselprodukte sammeln sich in der Zelle an und beeinträchtigen den Zellstoffwechsel (Read et al., 1976).

Lysosomale Speicherkrankheiten (Thesaurismosen; Gr. thesaurizein = speichern) sind seltene, angeborene Störungen des Stoffwechsels bei Mensch und Tier, die aufgrund eines vollständigen oder teilweisen Enzymmangels mit einer übermäßigen Ansammlung unzureichend abgebauter Substanzen in den Lysosomen einhergehen.

Sie können in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

- Sphingolipidosen
- Mucopolysaccharidosen
- Glycoproteinosen
- Glycogenosen
- Ceroid-Lipofuszinosen

Allen lysosomalen Speicherkrankheiten gemeinsam ist der progrediente Krankheitsverlauf. Nach zunächst normaler Entwicklung zeigen sich spezifische Symptome wie zum Beispiel:

- Progressive Hepato- und Splenomegalie
- neurologische Symptome und insbesondere zerebelläre Ataxie und Intentionstremor
- rascher Rückschritt der mentalen Entwicklung bei Menschen
- Skelett-Veränderungen mit proportioniertem oder dysproportioniertem Minderwuchs (Saunders et al., 1988; Alroy et al., 1992)

Das innerhalb der Zelle gespeicherte Material zeigt bei der histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung charakteristische Muster, die häufig eine Verdachtsdiagnose erlauben.

Die meisten lysosomalen Speicherkrankheiten werden autosomal-rezessiv vererbt, lediglich die Mucopolysaccharidose Typ II (Morbus Hunter) und Morbus Fabry unterliegen einem heterosomal-dominanten Erbgang (Pasternak, 1999). Mit Hilfe molekularbiologischer Verfahren konnten Gene für eine Vielzahl von Speicherkrankheiten isoliert werden. So ist es möglich, unterschiedliche Mutationen eines Gens („allele Mutationen“) mit verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung in Verbindung zu bringen („Genotyp-Phänotyp-Korrelation“). Weiterhin erlauben diese Verfahren den sicheren Nachweis von Trägern des krankhaften Gens und dadurch

kann man die Ausbreitung „abnormaler“ Allele in der gesamten Population verhindern (O'Brien, 1989; Lake, 1997).

Die größten Erwartungen bezüglich einer Heilung von lysosomalen Speicherkrankheiten werden derzeit in die Gen-Therapie gesetzt. Die Voraussetzungen für den Einsatz dieses Verfahrens sind gegeben, weil die Gene von viele lysosomalen Enzymen isoliert werden konnten (Edwards et al., 1997; Clarke, 2002) und beim M. Gaucher die Übertragung des fehlenden Gens mittels rekombinierten Retroviren in die defekten hämatopoetischen Stammzellen gelungen ist (Dunbar, 1996; Winchester et al. 2000; Chen und Smith, 2003).

Einer Anwendung der Gen-Therapie stehen aber noch nicht abzuschätzende Risiken der Verwendung von Retroviren als Vektoren entgegen, da nicht mit Sicherheit auszuschließen ist, dass diese rekombinierten Retroviren eine onkogene Wirkung entfalten können.

Die Möglichkeiten einer somatischen Gen-Therapie werden derzeit sehr kontrovers in der Öffentlichkeit diskutiert und viele ethische und rechtliche Fragen sind noch ungeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des unbekanntes genomischen Defektes, welcher die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Alaskan Huskies verursacht sowie die Etablierung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für diese Krankheit, um sie frühzeitig detektieren zu können.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

Die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose ist eine selten vorkommende angeborene Erkrankung, die bei verschiedenen Tierarten sowie beim Menschen auftritt. Um die molekulargenetischen Veränderungen bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose zu verstehen, ist es notwendig, die biochemischen Grundlagen sowie die Pathogenese, die Klinik und die Pathologie dieser Krankheit zu erläutern.

### 2.1. Gangliosidosen

Im Jahre 1881 beschrieb der britische Ophthalmologe Warren Tay eine Erkrankung, die mit einer Fundusänderung in Form eines kirschroten Flecks in der Makula bei einem 12 Monate alten Säugling begann und mit schweren neurologischen Symptomen und anschließend dem Tod des Säuglings endete. 78 Jahre später, 1959, beschrieben Norman et al. erstmals beim Menschen eine spezifische Form der „amaurotischen Idiotie“, die mit einer Substratspeicherung in Histiozyten außerhalb des neuronalen Gewebes einherging, wobei sich das gespeicherte Substrat aus Gangliosiden zusammensetzte.

Der amaurotischen Idiotie, die von dem amerikanischen Neurologen Bernhard Sachs 1887 beschrieben wurde, konnten im Laufe des nächsten halben Jahrhunderts zahlreiche Krankheitsbilder zugeordnet werden, welche sich in klinischen Merkmalen und im Manifestationsalter unterschieden.

1964 etablierten Landing et al. den Begriff einer neuen Erkrankung, die sie „familial neurovisceral lipidosis“ nannten. Diese Krankheit ist durch massive Speicherung von GM<sub>1</sub>-Gangliosid im Gehirn und in anderen Organen (generalisierte Gangliosidose) charakterisiert.

Der Nachweis des  $\beta$ -Galaktosidase-Mangels als Ursache für die massive Speicherung von GM<sub>1</sub>-Gangliosid wurde von Okada und O'Brien 1968 geführt. In den folgenden Jahren wurden verschiedene Verlaufsformen der Gangliosidose beschrieben.

Für die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose wurde 1968 von Derry et al. eine Einteilung in Typ I (Norman-Landing Krankheit; systemische infantile GM<sub>1</sub>-Gangliosidose) und Typ II (Derry Krankheit; spätinfantile GM<sub>1</sub>-Gangliosidose, juvenile GM<sub>1</sub>-Gangliosidose) vorgesehen, die von Suzuki et al. (1977) um den Typ III, die Erwachsenenform (chronische GM<sub>1</sub>-Gangliosidose), erweitert wurde.

## 2.2. Biochemische Grundlagen der GM<sub>1</sub>–Gangliosidose

Die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose gehört zur Gruppe der Sphingolipidosen (Sphingolipid-Speicherkrankheiten) und wird durch einen autosomal-rezessiv vererbten genetischen Defekt hervorgerufen (van Hoof, 1973; O'Brien, 1989; Suzuki et al., 1995). Die Sphingolipide sind wichtige Bestandteile der Nervenzellmembran und besitzen einen komplexen chemischen Aufbau (Löffler und Petrides, 1997).

Grundbaustein der Sphingolipide ist der Aminoalkohol Sphingosin, dessen Aminogruppe mit einer langkettigen Fettsäure azetyliert ist, wodurch ein Ceramid entsteht. Mit Hinzutreten von Zuckermolekülen an den Ceramidanteil werden diese chemischen Verbindungen als Glykosphingolipide benannt. Hierzu gehören auch die Ganglioside, die eine N-azetylierte Neuraminsäure am komplexen Zuckeranteil tragen (Stryer, 1991; Löffler und Petrides, 1997).

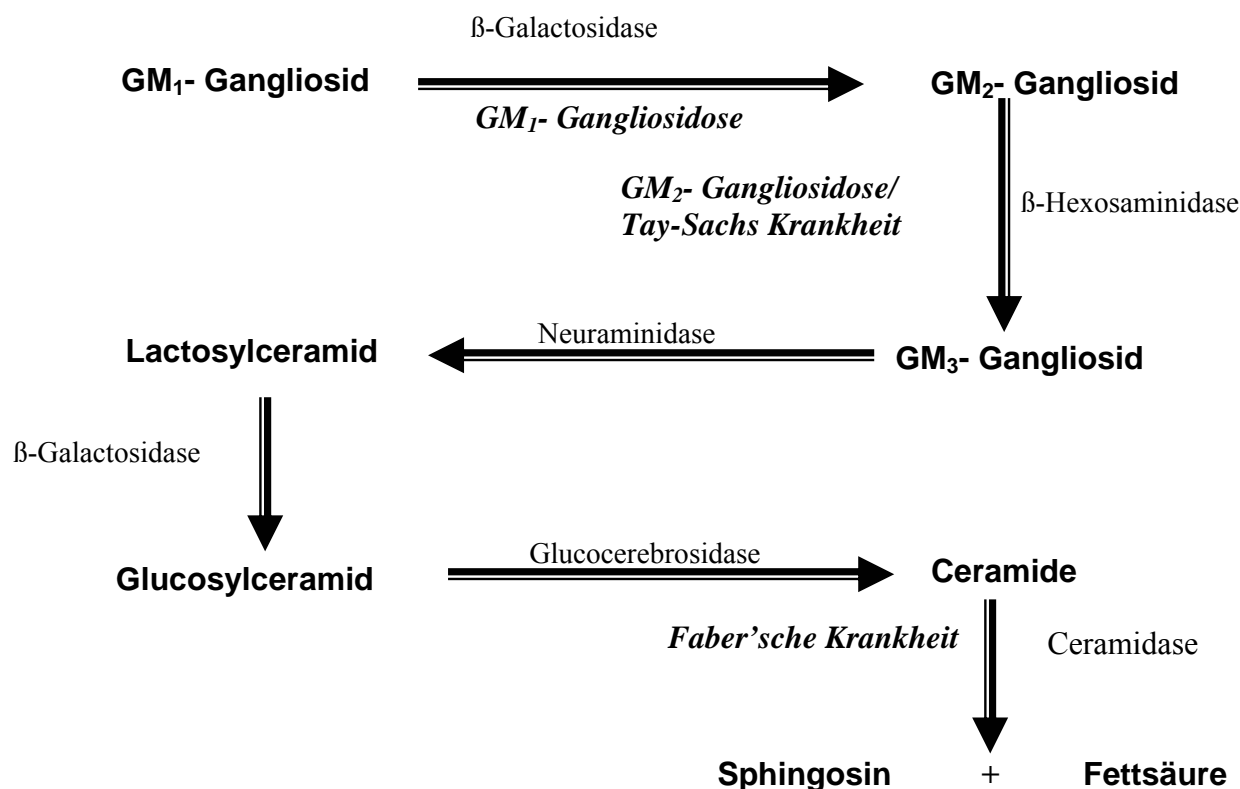
Die Ganglioside sind vor allem an der Membran der Nervenendigungen lokalisiert und können wie Glykoproteine Rezeptorfunktionen ausüben (Cervós-Navaro, 1991). Es werden drei Unterklassen von Sphingolipiden unterschieden: Sphingomyeline, neutrale Glykolipide und Ganglioside (Löffler und Petrides, 1997).

Die Ganglioside können auch als Mediatoren der MAG-Neuronen-Interaktionen („MAG-myelin associated glycoprotein“) agieren und somit eine Rolle in der Kontrolle des Wachstums von Neuriten und Myelinisationsabläufen spielen (Yang et al., 1996).

Der Abbau der Ganglioside erfolgt im sauren Milieu der Lysosomen durch hydrolytische Aktivität. Die Oligosaccharide werden schrittweise um das endständige Monosaccharid verkürzt (Jolly und Walkley, 1997).

GM<sub>1</sub>-Gangliosid ist das Stamm-Gangliosid, aus dem sich durch Abspaltung von Zuckerresten weitere Ganglioside (GM<sub>2</sub>-Gangliosid, GM<sub>3</sub>-Gangliosid) ableiten lassen. (siehe Abbildung 1). Zuletzt wird Ceramid in Sphingosin und Fettsäure abgebaut.



**Abbildung 1:** Abbau und Abbaustörungen der Ganglioside

Für die Spaltung der Enzyme sind außer den entsprechenden Enzymen auch Aktivatorproteine notwendig (Saunders et al., 1988; Suzuki et al., 1995).

Eine Störung im Abbau dieser Substanzen führt zu einem breiten Spektrum von Erkrankungen (GM<sub>1</sub>-Gangliosidosen, GM<sub>2</sub>-Gangliosidosen), wobei vor allem die Beteiligung des Zentralen Nervensystems (ZNS) im Vordergrund steht (Rodriguez, 1982; O'Brien, 1989).

### 2.2.1. Struktur, Funktion und Lokalisation von Gangliosiden

Die Ganglioside wurden von Ernst Klenk 1935 bei einem Morbus Niemann-Pick kranken Patienten entdeckt. Die Strukturaufklärung einzelner Ganglioside erfolgte Anfang der 60er Jahre durch Svennerholm (1964) und Wiegandt (1966). Svennerholm entwickelte 1962 eine Nomenklatur für die Subklassifikation der Ganglioside, die auch heute noch gültig ist. Alle Mitglieder der Gangliosid-Familie erhalten den Großbuchstaben G und werden über ihre charakteristische Zuckerkette definiert. Die Anzahl der Sialinsäure im Molekül wird durch die Großbuchstaben A (asialo = ohne Sialinsäure), M (monosialo = eine Sialinsäure), D (disialo = zwei Sialinsäuren) usw. gekennzeichnet. Es können bis zu sieben Sialinsäureresiduen hinzutreten. Aufgrund ihres dünn-schichtchromatographischen Verhaltens erfolgt die Kennzeichnung der Zuckerkette mit einer tiefer gestellten Nummer entsprechend der Formel n-5 (n ist die

Anzahl der neutralen Zuckerbestandteile). Die Oligosaccharidstruktur der einzelnen Gangliosiden erlaubt eine weitere Einteilung in 5 Hauptgruppen:

- Ganglio-Serie
- Gala-Serie
- Lakto-Serie
- Hämato-Serie
- Globo-Serie

Die Mehrzahl der Ganglioside des Gehirns gehören zur Ganglio-Serie (Yu und Saito, 1989).

Die Ganglioside sind hauptsächlich in der äußeren Schicht der Plasmamembran aller Vertebraten lokalisiert. Der hydrophobe Ceramidanteil der Ganglioside ist in der Zellmembran verankert und die hydrophile Oligosaccharidkette dehnt sich in den Extrazellularraum aus.

Bislang sind mehrere hundert Spezies von Gangliosiden bekannt, und die Verteilung der Ganglioside variiert mit der Hirnregion und innerhalb der einzelnen Zellpopulationen (Kolter und Sandhoff, 1996). So sind zum Beispiel die inneren Schichten des zerebellären Kortex der Ratte reich an  $GD_{1b}$ ,  $GD_2$ ,  $GT_{1b}$  und  $GQ_{1b}$ , wobei die äußeren Schichten besonders reich in  $GM_1$ ,  $GT_{1a}$  und  $GM_2$  sind (Schwarz und Futerman, 1996).

Die Ganglioside kommen in geringeren Mengen auch in extraneuronalen Geweben von Tieren vor.

Aufgrund der physiologischen Lage der Ganglioside als Bestandteil der Zellglykokalix wird für die Ganglioside eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Erkennungsvorgängen an der Zelloberfläche und als Modulatoren der Zellfunktion postuliert (Wiegandt, 1995). Sie können wie Glykoproteine Rezeptorfunktionen, zum Beispiel das "myelin associated glycoprotein" (MAG), ausüben. MAG ist ein Zelloberflächenadhäsionsmolekül der Gliazelle, welches die Bindung an die neuronalen Axonen vermittelt und das Wachstum der Neuriten im erwachsenen ZNS hemmt (Yang et al., 1996). Die Ganglioside können somit eine Rolle in der Kontrolle des Neuritenwachstums und der Myelinisationsabläufe spielen. Außerdem dient das  $GM_1$ -Gangliosid als Bindungsort für das Choleratoxin „Untereinheit B“ (Cervós-Navarro, 1991; Zeller und Marchase, 1992). Durch diese  $GM_1$ -Bindungsdomäne ist die mitotische Aktivität des "fibroblast growth factor" (FGF-2) gehemmt. Demgegenüber stimuliert in GM 7373 Zellen die exogene Zugabe von  $GM_1$ -Gangliosid bis zur Zellmembransättigung die mitotische Aktivität des FGF-2 (Rusnati et al., 2001).

Auch während der Embryogenese dienen die Ganglioside im Verlauf der neuronalen Differenzierung als selektive Erkennungsstellen für Zellmigration (Cervós-Navarro, 1991).

Die Ganglioside wirken infolge ihrer Lokalisation auch als Signalübertragungsmoleküle. So kann eine exogene Erhöhung der Gangliosidkonzentration eine regulative Funktion im Ionenfluss durch Stimulierung der Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>-ATP-ase Aktivität übernehmen (Leon et al., 1981).

Das GM<sub>1</sub>-Gangliosid ist auch mit dem "tyrosine kinase type receptor" (Trk) für den "nerve growth factor" (NGF) assoziiert. So konnte durch eine exogene GM<sub>1</sub>-Gangliosid Zugabe in PC12 Rattenzellen ein erhöhtes Neuritenwachstum erreicht werden (Mutoh et al., 1995).

*In vivo* konnte für das GM<sub>1</sub>-Gangliosid eine positive Wirkung auf neuronale Regeneration und Reparationsprozesse nachgewiesen werden (Garcia et al. 1996).

Neben neuronalen Wirkungen scheinen Ganglioside eine Steigerung apoptotischer Prozesse in Thymozyten zu bewirken (Cox et al., 1998).

### 2.2.2. Vorkommen der GM<sub>1</sub>- Gangliosidose bei verschiedenen Spezies

Beim **Menschen** wird die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose, entsprechend dem Alter des menschlichen Patienten zum Erkrankungszeitpunkt, in 3 Formen unterteilt (Baudet, 1981; Suzuki et al., 1995; Lake et al., 1997):

- Typ 1 (Norman-Landing Krankheit) systemische, infantile GM<sub>1</sub>-Gangliosidose
- Typ 2 (Derry Krankheit) spät-infantile, juvenile GM<sub>1</sub>-Gangliosidose
- Typ 3 adulte, chronische GM<sub>1</sub>-Gangliosidose

Bei Tieren wurde eine der humanen GM<sub>1</sub>-Gangliosidose vergleichbare Krankheit bei mehreren Tierspezies beschrieben.

1. Bei Katzen: Siamkatze, Europäische Kurzhaarkatze, Koratkatze und bei Katzen ohne Rassenangaben (Murray et al., 1977; Purpura et al., 1978; Wakley et al., 1979, 1980 und 1981; Baker, 1986; Dial et al., 1994; Castagnaro et al., 1998)
2. Bei Rindern: Deutsch Schwarzbunt (Donnelly, 1972; Baker, 1976; Johnson et al., 1977; Sheahan et al., 1974, 1977, 1978; Furie, 1982).
3. Bei Schafen: Suffolk Schaf (Ahern-Rindell et al. 1985 und 1988; Murane et al., 1989, 1991) und Coopworth Romney Schaf (Skelly et al., 1995)
4. Bei Hunden: Beagle Mischlinge (Warner und O'Brien, 1982; Rodriguez 1982), Englischer Springer Spaniel (Littlewood et al., 1983; Alroy et al., 1985; Alroy et al., 1992), Portugiesischer Wasserhund (Saunders et al., 1988; Alroy et al., 1992; Wang et al., 2000; Yamato et al., 2000), Shiba Inu (Yamato, 2000), Alaskan Husky (Müller et al., 1998, 2000, 2001).

Auch eine  $\beta$ -Galaktosidase defiziente „knock-out“ Maus, als Tiermodell für die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose wurde, 1997 von Hahn et al. und von Matsuda et al. beschrieben.

Ebenso konnte bei Vögeln eine lysosomale Speicherkrankheit bei einem ungefähr 6 Monate alten Emu (*Dromaius novaehollandiae*) festgestellt werden. Diese Krankheit ähnelt der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Säugetieren und geht mit einer signifikanten

Akkumulation aller drei Ganglioside (GM<sub>1</sub>-Gangliosid, GM<sub>2</sub>-Gangliosid und GM<sub>3</sub>-Gangliosid) im Gehirn einher.

### **2.2.3. Klinik und Pathologie der GM<sub>1</sub>- Gangliosidose**

#### **2.2.3.1. Klinik der GM<sub>1</sub>- Gangliosidose**

Bei **Menschen** manifestiert sich der Typ 1 (Norman-Landing Krankheit; infantile Form) der Erkrankung meistens im Säuglingsalter und ist von fortschreitenden psychomotorischen Störungen, verzögerter enchondraler Ossifikation und progressiver Leber- und Milzhypertrophie begleitet. Ein Teil der erkrankten Kinder weist bei der ophthalmoskopischen Untersuchung einen kirschroten Fleck am Augenhintergrund auf. Diese Form der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose führt gegen Ende des 2. Lebensjahres zum Tode (O'Brian, 1989; Cervos-Navarro, 1991; Morone et al., 2000).

Der Typ 2 (Derry Krankheit; spätinfantile/juvenile Form) tritt zwischen dem 7. Lebensmonat und dem 3. Lebensjahr auf. Diese Form der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose verläuft weniger progressiv als die infantile Form und beginnt nach zunächst normaler Entwicklung mit Ataxien und Muskelhypotonien. Allmählich treten Krampfanfälle auf. Die Knochenveränderungen sind auf die Wirbelsäule beschränkt (Lake, 1997). Die Patienten sterben nach einer Krankheitsdauer von 1 bis 5 Jahren (Suzuki et al., 1995).

Der Typ 3 (spätinfantile/adulte Form) wurde nur in wenigen Fällen beobachtet. Die Erkrankung manifestiert sich in der späten Kindheit beziehungsweise im jungen Erwachsenenalter und wird als eine fortschreitende Erkrankung mit Dystonien, Dysarthrien, Ataxien und Myoklonien beschrieben. Sie führt zum Tode der Patienten im Erwachsenenalter (Suzuki et al., 1995; Lake, 1997; Morone et al., 2000).

Gemäß der humanmedizinischen Unterteilung können Schafe, Englische Spaniels, Portugiesische Wasserhunde und Europäische Kurzhaarkatzen dem Typ 1, gemischtrassige Katzen, Koratkatzen, Siamkatzen und Schwarzbunte Rinder dem Typ 2 und Beagle Mischlinge, Alaskan Huskies sowie „knock-out“ Mäuse beiden Typen zugeordnet werden (Dial et al., 1994; Skelly et al., 1995; Matsuda et al., 1997; Castagnaro et al., 1998; De Maria, 1998; Müller et al., 1998, 2001).

Für den Typ 3 der GM<sub>1</sub>- Gangliosidose wurde noch kein Tiermodell beschrieben.

Obwohl alle Organsysteme des Körpers, in denen das fehlende Enzym vorkommt, betroffen sein können, manifestiert sich die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Tieren hauptsächlich als neurologische Störung, die zusätzlich (je nach Typ) von Korneatrübung, Blindheit und Hepatopathie begleitet ist (von der Hellen, 1990).

**Katzen** entwickeln die ersten neurologischen Symptome in Form eines feinschlägigen Kopftremors im Alter von 2 bis 5 Monaten (Baker et al., 1979; Barnes et al., 1981; Dial et al., 1994; Castagnao et al., 1998; De Maria et al., 1998). Im weiteren Verlauf

kann eine Korneatrübung und eine generalisierte Ataxie beobachtet werden. Die kranken Tiere sterben im Alter von 10 Monaten (Dial et al., 1994). Bei der Europäischen Kurzhaarkatze wurde eine Verlaufsform der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beobachtet, die im Absatzalter beginnt und neben neurologischen Ausfallserscheinungen mit Gesichtsdysmorphismus und Organvergrößerungen einhergeht. Die betroffenen Tiere sterben im Alter von 2 bis 3 Monaten (Gonzales-Licea et al., 1978; Barker et al., 1986).

Beim **Hund** beginnen erste Symptome schon im 2. Lebensmonat.

Bei Hunden der Rasse Portugiesischer Wasserhund dominieren, insbesondere im Alter von 4 Lebensmonaten, progressive Ataxie, Dysmetrie und Nystagmus (Shell et al., 1989; Alroy et al., 1992). Beim Englischen Springer Spaniel tritt im Gegensatz zum Portugiesischen Wasserhund ein proportionierter Zwergwuchs und Gesichtsdysmorphismus auf (Orgadt et al., 1989). Bei Alaskan Huskies dominieren die neurologischen Störungen mit Ataxien, Dysmetrien und Intentionstremor. Proportionaler Zwergwuchs und verzögerte enchondrale Ossifikation kommen ebenfalls vor (Müller et al., 1998, 2000).

Bei Hunden der Rasse Shiba Inu wurden progressive zerebelläre Dysfunktionen, begleitet von Ataxien, Dysmetrien und Intentionstremor des Kopfes, beobachtet. Im Alter von 10 Monaten tritt eine Trübung der Kornea mit Beeinträchtigung des Sehvermögens auf (Yamato et al., 2000).

Die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Beagle Mischlingen beginnt mit neuromotorischen Ausfallserscheinungen und insbesondere durch Ataxien im Bereich der Hintergliedmaßen. Bei allen betroffenen Hunderassen endet die Erkrankung nach ungefähr 10 Monaten mit dem Tod der betroffenen Tiere.

Bei **Rindern** treten die Symptome der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bereits in den ersten Lebenswochen auf. Die betroffenen Tiere zeigen ein leichtes Schwanken der Hintergliedmassen und schwerfällige Kau- und Schluckbewegungen (Sheahan, 1974; Leipold und Denis, 1980). Im Alter von 3 Monaten treten neben Erblindung durch Korneatrübung progressive neuromotorische Ausfallserscheinungen auf, welche zwischen dem 6. und 9. Lebensmonat zum Tod der Tiere führen (Jolly und Blackmore, 1973; Sheahan, 1978).

Bei **Schafen** der Rasse Suffolk konnte ein Enzymdefekt, charakterisiert durch den Verlust der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität zusammen mit dem Verlust der Neuraminidase Aktivität, nachgewiesen werden. Die Schafe erkrankten im Alter von 4 bis 6 Monaten und zeigten von Anfang an neurologische Ausfallserscheinungen insbesondere Ataxien und eine verzögerte Reflexantwort (Ahern-Rindell et al., 1988; Murnane, 1989). Wie bei Rindern wurde auch bei Suffolk Schafen Blindheit beobachtet (Murane et al., 1994). Bei Schafen der Rasse "Coopworth Romney" beginnen die

neurologischen Ausfallserscheinungen innerhalb der ersten 4 Lebenswochen. Die Tiere sterben im Laufe der ersten 4 Lebensmonate (Murnane et al., 1991).

$\beta$ -Galaktosidase-defiziente „knockout“-**Mäuse** zeigen wenige Monate nach der Geburt eine spastische Dysplegie; Knochenveränderungen werden nicht beobachtet (Matsuda et al., 1997).

### **2.2.3.2. Zytologische und biochemische Veränderungen**

In den Lymphozyten menschlicher Patienten mit  $GM_1$ -Gangliosidose werden zahlreiche Vakuolen nachgewiesen und die eosinophilen Granulozyten weisen abnormale Granula auf (Lake, 1997). Beim Typ 2 der Erkrankung tritt selten eine Vakuolisierung der Lymphozyten auf (Suzuki, 1995).

Zytologisch konnte auch bei erkrankten Tieren eine Vakuolisierung peripherer Blutzellen, welche die ganze Leukozytenpopulation umfasste, festgestellt werden (Müller et al., 1998; De Maria, 1998; Yamato et al., 2000). Nur bei Schafen tritt keine Vakuolisierung der Leukozyten auf (Murnane et al., 1989).

Durch biochemische Untersuchungen hat man eine deutliche Absenkung der Aktivität der sauren  $\beta$ -Galaktosidase bei erkrankten Individuen beobachtet.

Bei **Menschen** mit  $GM_1$ -Gangliosidose speichern sich  $GM_1$ -Ganglioside und Asialoderivate im Zentralen Nervensystem (ZNS) und zu einem geringeren Grad in den viszeralen Organen (Suzuki et al., 1995). Insbesondere bei der infantilen Form der  $GM_1$ -Gangliosidose tritt eine deutliche Abnahme der zerebralen Lipide wie Sulfatide, Cerebroside, Phospholipide oder Cholesterol auf (Kasama et al., 1986). Weiterhin sind auch Oligosaccharide, Glykopeptide und Keratansulfat-ähnliches Material infolge des Enzymdefekts im Urin (mittels Dünnschichtchromatographie) und der Leber nachweisbar (Suzuki et al., 1995). Neben der Speicherung von  $GM_1$ -Gangliosid wurde auch eine Zunahme von Glukosylceramiden und Laktosylceramiden beobachtet. Die weiße Substanz zeigte in mehreren Fällen Anzeichen eines Myelinabbaus und umfasst die Absenkung der Proteolipid-Proteine und der totalen Lipide (Suzuki et al., 1995).

Entsprechend der Akkumulation von Gangliosiden und Galaktose enthaltenden Substraten ist die Aktivität der sauren  $\beta$ -Galaktosidase in Gehirn, Rückenmark, Lunge, Milz und Niere reduziert. Bei Menschen ist eine Residualaktivität der sauren  $\beta$ -Galaktosidase von weniger als 1-5% der Kontrollaktivitäten in Leber und Gehirn beziehungsweise ein totaler Aktivitätsverlust in Leukozyten und Hautfibroblasten beschrieben worden (Suzuki et al., 1995).

Bei Tieren findet sich eine Ansammlung von  $GM_1$ -Gangliosid insbesondere im Gehirn aber auch in anderen Organen, wobei Unterschiede zwischen verschiedenen Tierarten feststellbar sind (Buddeke 1994; Dial et al., 1994; Hahn et al., 1997; Matsuda et al., 1997; De Maria, 1998; Morone et al., 2000). Häufig wurde sowohl bei Tieren als auch bei Menschen eine Zunahme des Ceramid-Tetraoxids und des Asialoderivates des  $GM_1$ -Gangliosids beobachtet. Bei **Hunden** der Rasse Shiba Inu

konnte eine Erhöhung des GM<sub>1</sub>-Gangliosid-Gehaltes um mehr als das 20fache im zerebralen Kortex beobachtet werden (Yamato et al., 2000). Bei allen erkrankten Hunderassen erreicht der Gesamt-Gangliosid-Neuraminsäuregehalt der Hirnrinde das 3-5fache der bei Kontrolltieren gemessenen Werte (Alroy et al., 1992). Bei erkrankten **Schafen** und bei „knockout“ **Mäusen** wurde eine bis zu 5fache Zunahme des GM<sub>1</sub>-Gangliosidgehaltes im Gehirn beobachtet. Bei **Katzen** ist der frühzeitige biochemische Nachweis der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose anhand der Enzymaktivitätsbestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase in bioptisch gewonnenen, kultivierten Konjunktivazellen möglich (Nowakowski et al., 1988)

Die Enzymaktivität in Leukozyten und /oder kultivierten Hautfibroblasten erreicht bei alle Tierarten Werte zwischen 1% und maximal 30% der normalen Aktivität der sauren  $\beta$ -Galaktosidase (Suzuki et al., 1995; Müller et al., 1998; Wang et al., 2000; siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Enzymaktivitäten bei kranken Tieren mit GM<sub>1</sub>- Gangliosidose.

Tierart	Enzymaktivität (%)
Katze (verschiedene Rassen)	1-10%
Hund (Al. Husky, Portugiesischer Wasserhund)	2-10%
Schaf (Suffolk Schaf)	5%
Rind (schwarzbunte Rinder)	20-30%

Als Folge der erniedrigten Enzymaktivität werden auch bei Tieren in den Leberzellen nichtvollständig katabolisierte Glykogenkonjugate nachgewiesen, welche für die Vakuolisierung der Leberzellen verantwortlich sind. (O'Brien 1982, Barker et al., 1986). Auch andere Oligosaccharide, die einen endständigen Galaktoserest enthalten und demzufolge nicht abgebaut werden können, werden vermehrt in Milz, Niere, ZNS sowie in Knorpel gespeichert (Rodriguez et al., 1982; Alroy et al., 1985; Alroy et al., 1992; Müller, 2000).

### 2.2.3.3. Pathologisch-anatomische Veränderungen

In Abhängigkeit vom Manifestationszeitpunkt der Erkrankung treten beim Menschen unterschiedliche pathologisch-anatomische Veränderungen auf. Die infantile Form der GM<sub>1</sub>- Gangliosidose geht mit einer hochgradigen Hepatosplenomegalie bis zum 2-3fachen des normalen Organgewichtes einher. Die histologischen Veränderungen sind vorwiegend beim infantilen Erkrankungstyp zu beobachten und sind dezent bzw. fehlen bei der spätinfantilen/juvenilen Verlaufsform. In Leber, Milz, Lymphknoten, Thymus, Lunge, Magen-Darmtrakt, Knochenmark und den interlobulären Septen des Pankreas werden Histiozyten mit einem feingranulären zytoplasmatischen Material beobachtet. Diese Histiozyten erinnern an Speicherzellen, wie sie im Rahmen des Morbus Gaucher auftreten (Suzuki, 1995).

Eine Vakuolisierung tritt auch in Parenchymzellen verschiedener Organe auf (Suzuki et al., 1995). Als Besonderheit dieser Krankheit wurde eine Schwellung der Glomerulazellen beschrieben (Suzuki, 1995).

Eine kortikale Atrophie und die erhöhte Festigkeit der weißen Substanz kann bei Typ 1 und Typ 2 der menschlichen GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beobachtet werden. Bei der adulten Form liegt eine geringgradige zerebrale Atrophie vor (Lake, 1997). Histologisch wurde bei der infantilen und spätinfantilen/juvenilen Erkrankung eine Hypertrophie des neuronalen Zytoplasmas durch die Speicherung eines feingranulären Materials und eine exzentrische Verlagerung der Zellkerne in den Neuronen und Gliazellen aller Zelllagen des zerebralen und zerebellären Kortex, der Basalganglien, des Hirnstamms, Rückenmarks und der autonomen Ganglien festgestellt. Bei Typ 3 der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose sind die Veränderungen geringgradig und nur in bestimmten Neuronengebieten feststellbar (Suzuki et al., 1995; Lake, 1997).

Speichermaterial wird auch in peripheren Nerven und in Neuronen der Retina beobachtet (Mihatsch et al., 1973). Neben einer Proliferation von Astrozyten und Mikrogliazellen findet bei Typ 1 der Erkrankung eine Myelinverarmung in der weißen Substanz des Groß- und Kleinhirnes und in den Pyramidenbahnen statt (Gonatas, 1965).

Der Typ 2 der humanen GM<sub>1</sub>-Gangliosidose geht mit einem Verlust von Körner- und Purkinjezellen sowie der Bildung aberranter Neuriten einher (Cervós-Navara, 1991). Die adulte Form der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose verläuft mit einer Atrophie des *Nucleus caudatus* und *Globus pallidus*, neuronalem Zelluntergang, Gliose und Bildung von Meganeuriten und mit einer minimalen Speicherung im zerebellären Kortex (Lake, 1997). Elektronenmikroskopisch können intraneuronal und intraglial Einschlusskörperchen, sogenannte "membranous cytoplasmic bodies" (MCB) nachgewiesen werden. Diese bestehen aus mehreren Schichten membranöser Lamellen mit runder oder ovaler Form und einem Durchmesser von 0,5 bis 3 µm (Suzuki et al., 1995). In den Gliazellen von Patienten mit dem spätinfantilen Erkrankungstyp finden sich pleomorphe membranbegrenzte Lipidkörper ("pleomorphic lipid bodies", PLB), bestehend aus vesikulären Myelinfiguren mit zirkulär angeordneten Membranen und großen, ovalen Ablagerungen aus unregelmäßig angeordneten Lamellen (O'Brien et al., 1972). Im extraneuronalen Gewebe sind zytoplasmatische, unregelmäßig geformte, multivakuoläre Körperchen oder elektronendichte Körperchen erkennbar (O'Brien et al., 1972). In Muskelfasern können diese Vakuolen mit feingranulärem Material gefüllt sein (Mihatsch, 1973).

Bis auf Hunde der Rasse Shiba Inu (Yamato et al., 2000) sind alle Tiere in der finalen Erkrankungsphase kachektisch.

Verschiedene neurale und extraneurale Zelltypen enthalten zytoplasmatisches Speichermaterial und weisen unterschiedliche Vakuolisierungsformen auf (Alroy,



1992; Dial et al., 1994). Aber bei allen erkrankten Tierarten finden sich die Hauptveränderungen besonders im zentralen Nervensystem. Durch die Ansammlung von Speichermaterial in Neuronen kommt es zur schaumigen Vakuolisierung und Zellhypertrophie mit Verlagerung des Zellkernes und der zytoplasmatischen Organellen in der Peripherie sowie zur Aggregation und Dissolution der Nissl-Substanz (Hahn et al., 1997; Castagnaro et al., 1998; De Maria, 1998; Yamato et al., 2000; Müller et al., 2000, 2001). Zusätzlich ist die Bildung zahlreicher Sphäroide nachweisbar (Murnane et al., 1991). Es kommt wie beim Menschen auch zur Meganeuritenbildung, welche mit ("spiny") oder ohne ("aspiny") Formation kleiner dornenartiger Zellausläufer erfolgen kann. Weiterhin werden kleine dendritenartige Ausläufer am Axonhügel oder an Meganeuriten und Mikroneuriten (aberrante Neuritenauswüchse) mit Synapsenbildung beobachtet (Ahern-Rindell et al., 1988; Prieur et al., 1991).

Neben Veränderungen in der grauen Substanz sind auch Alterationen in der weißen Substanz beschrieben. So wurde eine Abnahme und verminderte Anfärbbarkeit des Myelins dokumentiert (Alroy et al., 1992; Dial et al., 1994; Müller et al., 2001).

Auch bei Tieren sind „membranous cytoplasmic bodies“ (MCB) beschrieben (Skelly et al., 1995, Castagnaro et al., 1998; De Maria et al., 1998; Yamato et al., 2000; Müller et al., 2000, 2001). Ihr Durchmesser liegt zwischen 0,5 –1,5µm bei Katzen, 0,1-1,5 µm bei Hunden, 0,2-1,8µm bei Rindern und 0,4-1,5 µm bei Schafen (Blakmore, 1972; Sheahan und Donnely, 1974; Saunders et al., 1988; Murane et al., 1991). Neben diesen neuronalen Einschlusskörperchen treten bei einzelnen Spezies in Astrozyten und Mikroglia unterschiedliche „zytoplasmatische Körperchen“ mit vesikulären oder lamellären Strukturen auf (Murane et al., 1991; Alroy, 1992). Extraneuronal wurden MCB in der Dünndarmmukosa, in glatten Muskelzellen und in Schwannschen Zellen beobachtet (Gonzales-Licea et al., 1978). Auch in anderen Organen wurden Speicherungen bestehend aus Vesikeln mit fibrillärem oder elektronendichtem Material gefunden (Murane et al., 1991). Bei erkrankten Katzen sind im Durchschnitt 1-2 mm große, subkortikale Zysten erkennbar (Blakmore, 1972). Histologisch wurden neben Sphäroiden im Kleinhirn, bei Katzen auch bizarre strukturelle Veränderungen, die sich mit der Golgi-Silberimpregnationsmethode darstellen lassen, festgestellt (Purpura et al., 1981; Walkley, 1998). Auch ein Verlust an Oligodendrozyten, begleitet von einem Myelinmangel in der kortikalen weißen Substanz, wurde dokumentiert (Donnely et al., 1973).

Bei Hunden kann eine erhöhte Rigidität des Gehirnes festgestellt werden. Englische Springer Spaniel und Portugiesische Wasserhunde weisen eine Zunahme der grauen Substanz und Abnahme der weißen Substanz auf. Auch geringgradige, fokale Demyelinisierungsprozesse im Kleinhirn, *Corpus callosum* und der weißen Substanz des Rückenmarkes wurden beobachtet (Saunders et al., 1988). Zusätzlich zeigen

Englische Springer Spaniels und Portugiesische Wasserhunde eine reduzierte Anfärbbarkeit des Myelins der zerebralen und zerebellären weißen Substanz sowie Gliose (Kaye et al., 1992). Immunhistologische Studien konnten eine Persistenz des „stage-specific-embryonic antigen-1-glykolipids“ in der grauen Substanz nachweisen, welche zur Bildung fehlerhaften Myelins führte, so dass von einer Dysmyelogenese bei Englischen Springer Spaniern und Portugiesischen Wasserhunden ausgegangen werden kann. Die Hunde der Rasse Shiba Inu zeigen eine gelbliche Farbe des zerebralen und zerebellären Kortex (Alroy, 1992; Yamato et al., 2000).

Bei kranken Kälbern kann im ZNS zwischen weißer und grauer Substanz ein dunkler Saum festgestellt werden (Sheahan, 1977). Histologisch wurde eine mikrogliale und astrozytäre Gliose in der *Pons* und Teilen des Mittel- und Kleinhirnes beobachtet (Barnes et al., 1981).

Hepatosplenomegalie und Ossifikationsstörungen können je nach Tierart und in Abhängigkeit vom Typ festgestellt werden (Rodriguez et al., 1985; Alroy et al., 1992; Müller et al., 1998, 2001).

Am Auge kommt es zur Substratspeicherung in den Ganglienzellen und der inneren Körnerzellschicht der Retina. Auch hier sind Unterschiede hinsichtlich der Quantität und der Morphologie der Veränderungen bei verschiedenen Tierarten zu beobachten (Sheahan, 1981; Dial, 1994).

#### **2.2.4. Pathogenese der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose**

Durch diesen genetisch fixierten, vollständigen oder teilweisen Mangel an saurer  $\beta$ -Galaktosidase wird der Ablauf spezifischer Reaktionen im katabolen Stoffwechselschenkel verhindert (Suzuki et al., 1995). Als Folge kann der Abbau des jeweiligen Enzymsubstrates (z.B. GM<sub>1</sub>-Gangliosid) nicht vollständig erfolgen.

Die saure  $\beta$ -Galaktosidase besitzt ein pH-Optimum bei pH 4,5. Bei Menschen können verschiedene Formen der  $\beta$ -Galaktosidase mit Molekulargewichten zwischen 65 und 700 kDa unterschieden werden, welche wahrscheinlich monomerische und polymerische Aggregate darstellen.

Das menschliche saure  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (GLB1) ist auf dem Chromosom 3 (3.21.33) lokalisiert, besteht aus 16 Exons, hat eine Größe von 62,5 kb (Moreau et al. 1991; Morrone et al. 2000) und kodiert für ein 70 kDa Vorläuferprotein, welches während der Translation phosphoryliert wird. Es entsteht ein 85 kDa phosphoryliertes Vorläuferprotein, welches in die 64 kDa aktive  $\beta$ -Galaktosidase weiter prozessiert wird (d'Azzo et al., 1982; Morrone et al., 2000), wobei bei der menschlichen sauren  $\beta$ -Galaktosidase das 21 kDa kleine Fragment mit dem 64 kDa Polypeptid assoziiert bleibt, um die enzymatische Aktivität der sauren  $\beta$ -Galaktosidase zu ermöglichen (van der Spoel et al., 2000). Mit der intralysosomalen  $\beta$ -Galaktosidase assoziieren sich ein

54 kDa protektives Glykoprotein mit stabilisierender Wirkung, das Carboxipeptidase protektive Protein/Cathepsin A (PPCA) und die 46 kDa lysosomale Neuraminidase. Das PPCA reguliert den Intrazellulärtransport und stabilisiert die  $\beta$ -Galaktosidase und die Neuraminidase im sauren Milieu (Moreau et al., 1992).

Nach Hoovegeveen et al. (1986) werden dem Enzymdefekt ursächlich Mutationen des Strukturgens zugewiesen, die zu strukturellen Änderungen des 85 kDa Vorläuferproteins vor den posttranslationalen Modifikationsprozessen führen, so dass bestimmte Bindungsstellen für die Phosphorylierung nicht erkannt werden. So erfolgt keine Bindung an den Manose-6-Phosphatrezeptor, welcher für den lysosomalen Import notwendig ist. Auch bei Schafen konnte anhand genetischer Vergleichsstudien mittels interspezifischer somatischer Zellhybriden eine Homologie mit dem humanen Strukturgendefekt nachgewiesen werden (Ahern-Rindell et al., 1989).

Neben verschiedenen non-sense (welche ein frühzeitiges Stoppkodon herstellen) und missense Mutationen (die einen Aminosäureaustausch verursachen) sowie Duplikationen spielen Spleißvarianten der sauren  $\beta$ -Galaktosidase eine wichtige Rolle in der Entstehung der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose (Morone et al., 2000). Diese entstehen durch genetische Modifikationen, die den "RNA-Splicing"-Mechanismus beeinflussen können (Bruge, 2003).

In der Verschiedenheit der genetischen Veränderungen, die Enzyme mit unterschiedlichen Kinetiken und unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften hervorrufen, ist die phänotypische Vielfalt der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose begründet (Stansbury et al., 1983; Morone et al., 2000; siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2:**  $\beta$ -Gangliosidose Genveränderungen (DNS) bei humanen Patienten mit GM<sub>1</sub>-Gangliosidose**1. Infantile GM<sub>1</sub>-Gangliosidose**

Mutation/Veränderung	Exon/Intron	Aminosäure	Nukleotidaustausch
R <sup>1</sup> 49C <sup>2</sup>	Exon-2	<sup>49</sup> Arg <sup>1</sup> -Cys <sup>2</sup>	C***>T**
R59H <sup>3</sup>	Exon-2	<sup>59</sup> Arg-His <sup>3</sup>	G*****>A*
G <sup>4</sup> 123R	Exon-3	<sup>123</sup> Gly <sup>4</sup> -Arg	G>A
Dup <sup>5</sup>	Exon-3	Duplikation	288-310
Y <sup>6</sup> 316C	Exon-9	<sup>316</sup> Tyr <sup>6</sup> -Cys	A>G
Dup (11-12)	Exon-11-12	Duplikation	1103-1267
R482H	Exon 14	<sup>482</sup> Arg-His	G>A
G494C	Exon-15	<sup>494</sup> Gly-Cys	G>T
Y519C	Exon 16	<sup>519</sup> Tyr-Cys	A>G
Frame shift/stop codon	Intron 14	Acceptor splice site	VIS14-2A>G
Exon 8 skipping	Intron 8	Donor splice site	IVS8+2T>C

**2. Spätinfantile/Juvenile GM<sub>1</sub>-Gangliosidose und Adulte/Chronische  $\beta$ -Gangliosidase**

Mutation/Veränderung	Exon/Intron	Aminosäure	Nukleotiden
R49C	Exon 2	<sup>49</sup> Arg-Cys	T>C
Y591T <sup>7</sup>	Exon16	<sup>591</sup> Tyr-Thr <sup>7</sup>	T>A
R59H	Exon 2	<sup>59</sup> Arg-His	G>A

**3. Adulte/Chronische GM<sub>1</sub>-Gangliosidose**

Mutation/Veränderung	Exon/Intron	Aminosäure	Nukleotiden
R51C	Exon 2	<sup>51</sup> Arg-Cys	T>C
T82M <sup>8</sup>	Exon 2-3	<sup>82</sup> Thr-Met <sup>8</sup>	C>T
R457Q <sup>9</sup>	Exon 14	<sup>457</sup> Arg-Gln <sup>9</sup>	G>A

R<sup>1</sup>-Arg-Arginine; C<sup>2</sup>-Cys-Cystine; H<sup>3</sup>-His-Histidine; G<sup>4</sup>-Gly-Glycine; Dup<sup>5</sup>-Duplikation; Y<sup>6</sup>-Tyr-Tyrosine; T<sup>7</sup>-Thr-Threonine; M<sup>8</sup>-Met-Metionine; Q<sup>9</sup>-Gln-Glutamine; A\*-Adenine; T\*\*-Thymine; C\*\*\*-Cytosine; G\*\*\*\*\*-Guanine

Der Grad der Substratspeicherung und der Residualenzymaktivität steht im Einklang mit der Schwere des phänotypischen Erscheinungsbildes.

Bei Menschen und allen Tierarten spaltet die saure  $\beta$ -Galaktosidase die endständig  $\beta$ -glykosidisch gebundene Galaktose von Galaktokonjugaten in zahlreichen Organen ab. Deshalb werden im Falle eines Verlustes der enzymatischen Aktivität der sauren  $\beta$ -Galaktosidase neben GM<sub>1</sub>-Gangliosid auch andere Substanzen, die endständig  $\beta$ -glykosidisch gebundene Galaktose enthalten, gespeichert. So kommt es neben der GM<sub>1</sub>-Speicherung in Nervenzellen auch zur Ablagerung von Oligosacchariden, Glykopeptiden und Keratansulfat-ähnlichem Material in den inneren Organen. Folglich entstehen Milz- und Lebervergrößerung sowie Knochenveränderungen (Alroy

et.al., 1984). Gleichzeitig kann mit dem Urin eine Ausscheidung hochmolekularer Kohlenhydrate beobachtet werden (Alroy et al., 1992; Dial et al. 1994; Matsuda et al., 1997; Müller et al., 1998, 2000).

Die neuronale Ansammlung des nicht katabolisierbaren Substrates führt zu neuronalen Dysfunktionen. Verschiedene pränatale Studien haben insbesondere beim Schaf gezeigt, dass die Neuronenvakuolisierung bereits im vierten Trächtigkeitsmonat nachgewiesen werden kann, aber die erkrankten Schafe erst im Alter von 5 Monaten klinische Symptome entwickeln. Deshalb können die neurologischen Ausfallserscheinungen nicht unmittelbar der vermehrten lysosomalen Speicherung zugewiesen werden (Murnane et al., 1991). Als mögliche Ursachen hierfür sind die abnorme Morphologie der Neuronen, die reduzierte Rekrutierung von Neurotransmittern und die Veränderungen in der neuronalen Reizbildung und Erregungsleitung zu diskutieren (Lake, 1997; Steiss, 1997; Walkley, 1998). Bei Katzen mit GM<sub>1</sub>-Gangliosidose konnten Alterationen im Muster der Aktionspotentiale morphologisch veränderter pyramidaler Neuronen sowie eine verzögerte Aufnahme von Glutamat  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Noradrenalin in Synaptosomen beobachtet werden (Karabelas und Walkley, 1985; Koenig et al., 1987). Andere Studien zeigen eine Abnahme des Ca<sup>2+</sup>-Influxes, einen Anstieg der Acetylcholinsynthese und -freisetzung im Gehirn sowie eine Hemmung der Proteinkinase C (Jope et al., 1986; Hannun und Bell, 1987). Auch in den kortikalen Membranen des Gehirns von GM<sub>1</sub>- und GM<sub>2</sub>-Gangliosidose erkrankten Katzen wurden spezifische Alterationen der Phosphoinositid spezifischen Phospholipase C und Adenylatzyklase nachgewiesen (Claro et al., 1991).

Weiterhin kann die intralysosomale Anhäufung von Gangliosiden eine Abnahme der Membranfluidität verursachen, welche zu einer reduzierten Aufnahme von Neurotransmittern führt (Baker et al., 1982; Wood et al., 1985).

### **2.3. Methoden der molekulargenetischen Diagnostik**

Seit etwa hundert Jahren ist bekannt, dass Vererbung von Krankheiten, die auf ein Gen zurückgehen (monogene Erbkrankheiten), den Mendelschen Vererbungsregeln unterliegen (Pasternak, 1999). Seit etwa fünfzig Jahren weiß man, dass ein Gen ein Abschnitt auf dem DNS-Molekül ist, der die Information zur Bildung eines Proteins enthält. Ist das bei einer Erbkrankheit betroffene Gen in seiner Nukleotidsequenz bekannt, kann bei Patienten und Anlageträgern die Mutation in diesem Gen direkt identifiziert werden (direkte Diagnostik, Mutationsdiagnostik). Ist das Gen unbekannt, aber die Lokalisation des Gens im Genom beschrieben, oder ist die Mutation in einem Gen unbekannt, kann die Vererbung der genomischen Region, welche die vermutliche Mutation enthält, in einer Familie verfolgt werden (indirekte Diagnostik,

Kopplungsanalyse). Da jede Zelle von jedem autosomalen Gen zwei Allele enthält, ist das Genprodukt des nicht mutierten Allels häufig ausreichend für die normale Funktion und nur bei Mutationen beider Allele kommt es zu einer Erkrankung. Dieser autosomal-rezessive Erbgang liegt der Mehrheit der Erbkrankheiten zugrunde (Edwards et al., 1997; Clarke, 2002).

Wenn eine Mutation die Funktion des Genproduktes so verändert, dass die physiologische Funktion des Genproduktes durch das zweite nicht mutierte Gen nicht kompensiert werden kann, wird die Krankheit durch die Vererbung des mutierten Allels von nur einem Elternteil weitergegeben, welches in der Regel ebenfalls von der vererbten Erkrankung betroffen ist. Dadurch resultiert ein autosomal-dominanter Erbgang, wie zum Beispiel bei der Muskeldystrophie Typ Steinert. Während beide Geschlechter bei autosomal-rezessiv und autosomal-dominant vererbten Krankheiten gleich häufig auffällig sind, erkranken in X-chromosomal vererbten Fällen (z.B. Hämophilie A, Hämophilie B) fast nur männliche Individuen (Gelehrter et al., 1998). Verschiedene Mutationen im selben Gen können zu unterschiedlichen Phänotypen einer Krankheit führen, was die klinische Diagnose erschwert. Umgekehrt können Mutationen in verschiedenen Genen phänotypisch ähnliche oder gleiche Erkrankungen verursachen (genetische Heterogenität).

In all diesen genannten Fällen versucht man, die Ursache der Erkrankung durch eine Mutationsanalyse in den beteiligten Genen zu suchen (Gelehrter et al., 1998, Griffiths et al., 2002).

Drei methodische Prinzipien bilden die Grundlage der meisten molekular-genetischen Untersuchungen auf DNS-Ebene:

- die Vervielfältigung von DNS-Fragmenten durch Polymerase Kettenreaktion (Mullis, et al. 1986 ; Saiki et al., 1988)
- die Auftrennung von DNS-Fragmenten im elektrischen Feld aufgrund ihrer elektrischen Ladung (Jones, 1996).
- die Bindung von zwei einzelsträngigen DNS-Sequenzen nach dem Prinzip der Basenpaarung (Primrose, 1998)

Im Allgemeinen wird die amplifizierte DNS nach Änderungen ihres physikalischen und/oder biochemischen Verhaltens untersucht.

### **2.3.1. “Amplification Refractory Mutation System” (ARMS)-PCR**

Diese Methode beruht auf Polymerase Kettenreaktion, in die spezielle DNS-Fragmente (Primer), die am 3'Ende die Punktmutation enthalten, eingesetzt werden. Falls die Mutation vorhanden ist, erfolgt die Primeranlagerung und die anschließende Verlängerung durch thermostabile DNS-Polymerase (McPherson, 2000).

Mit der ARMS-PCR ist es möglich, verschiedene DNS-Polymorphismen und Mutationen selektiv zu amplifizieren und die heterozygoten Anlageträger in einer

Population zu finden. Die Detektion der dabei gebildeten Produkte erfolgt mit der Agarosegelelektrophorese (Jones, 1996; Little, 1997).

### **2.3.2. “Real-time”-PCR (Echtzeit-PCR)**

Die “Real-Time“ quantitative PCR stellt ein relativ neues, grundlegendes Werkzeug der modernen Molekularbiologie dar und erlaubt Sequenz- und Mutationsanalysen neben mehreren anderen Anwendungsmöglichkeiten. Sie ist eine sehr schnelle und sensitive Methode zur „in vitro“ Amplifizierung spezifischer DNS-Abschnitte und ermöglicht somit die Detektion kleinster DNS-Mengen. Bei der „Real-time“ PCR wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff verwendet, um die Reaktion verfolgen zu können. Dieser Reporter kann von nichtspezifischer Natur sein oder spezifisch mit der Ziel-DNS interagieren. In beiden Fällen steigt die Fluoreszenz mit der Produktmenge an (Pasternak, 1999).

Wie bereits erwähnt, kann man interkalierende Farbstoffe, vor allem „SYBR<sup>®</sup>-Green“, verwenden. Dieser Farbstoff lagert sich unspezifisch in Doppelstrang-DNS ein. Eine Mutationsanalyse ist im Anschluss des PCR-Laufes mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse möglich. Hierbei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNS-Doppelstränge in ihre Einzelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelzkurvenanalyse kann man dann zwischen normalen Allelen und Mutanten unterscheiden (Williams et al., 1999).

### **2.3.3. Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung (ASO)**

Diese Methode wird verwendet, wenn bereits bekannte Mutationen in einer größeren Anzahl von DNS-Proben nachgewiesen oder ausgeschlossen werden sollen. Kleine DNS-Fragmente (Oligonukleotide) der zu untersuchenden Sequenz werden auf einer Membran (z. B. Nylonmembran) fixiert. Diese Oligonukleotid-Proben können so gewählt werden, dass sie spezifisch der mutierenden oder der Wildtyp-Sequenz entsprechen. Durch Hybridisierung der Amplifikationsprodukte des untersuchten Gens an die Oligonukleotide kann bestimmt werden, ob in der Probe nur die Wildtyp-Sequenz, nur eine bestimmte mutierte Sequenz oder eine mutierte und eine Wildtypsequenz in heterozygoter Form vorliegen (Gassen und Schimpf, 1999). Durch Automatisierung und Miniaturisierung ist die Zahl der auf einem kleinen Chip fixierten Proben auf viele Tausend zu erhöhen (Wong et al., 2004).

#### **2.3.4. “Single Strand Conformation Polymorphism“ ( Einzelstrang Konformations - SSCP)-Analyse**

Durch diese Methode wird als erstes das gewünschte DNS-Fragment mittels PCR amplifiziert. Anschließend werden die DNS-Fragmente denaturiert und über eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ausgewertet (Jones, 1996).

Durch die Denaturierung entstehen einzelsträngige DNS-Moleküle, welche durch fehlende komplementäre Matrix unter Umständen mit sich selbst binden können. Durch diese Selbstbindung entstehen komplexe, kaum vorhersagbare Formen, welche von mehreren Faktoren wie Temperatur und Sequenz abhängig sind. Die Mutation einer einzigen Base kann eine Änderung der Sekundärstruktur nach sich ziehen und die Laufeigenschaften des Fragments im Gel verändern. Die optimale Größe der Fragmente liegt zwischen 150 bp und 250 bp, da es bei kleineren Fragmenten nicht zur Ausbildung einer Sekundärstruktur kommt und bei Fragmenten über 250 bp die Wahrscheinlichkeit eines SSCP-Nachweises stark abnimmt (Strachan und Read, 2003).

Amplifikationsprodukte mit einem erkennbar unterschiedlichen Bandenmuster einzelsträngiger DNS sind Kandidaten für eine Mutationsidentifikation mittels Sequenzanalyse.

#### **2.3.5. DGGE (Denaturierende Gradientengelelektrophorese)- und TGGE (Temperatur Gradientengelelektrophorese)-Analyse**

Mit den beiden Verfahren ist es möglich, kleine Sequenzunterschiede innerhalb von exakt gleich langen DNS-Fragmenten nachzuweisen. Die DGGE-Methode beruht auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von DNS-Fragmenten, die sich durch eine oder mehrere Basen während einer Elektrophorese innerhalb eines chemischen Gradienten unterscheiden. Die TGGE-Methode beruht auf demselben Prinzip, jedoch anstatt eines chemischen Gradienten wird ein Temperaturgradient verwendet (Muyzer und Smalla, 1998).

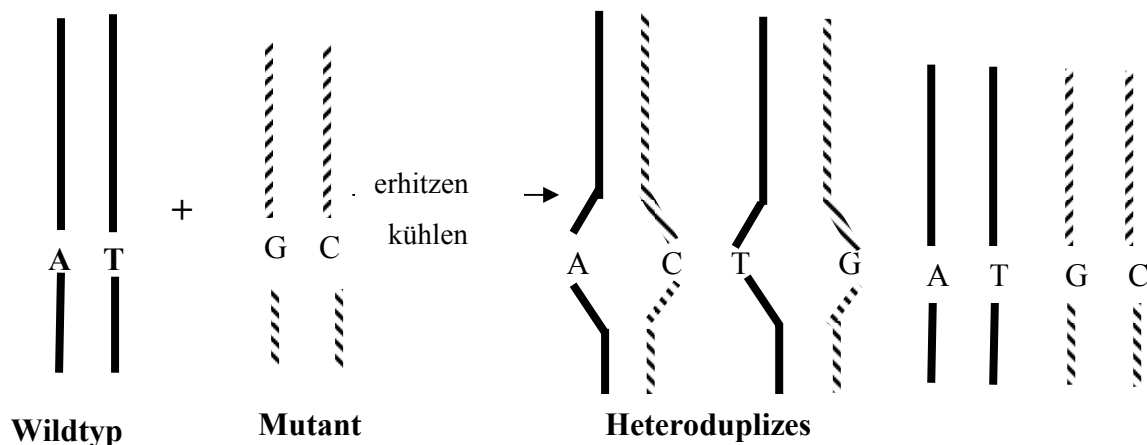
Diese beiden Methoden erscheinen besonders leistungsfähig, da selbst einzelne konservierte Basenaustausche zu sehen sind.

#### **2.3.6. Heteroduplexanalyse**

Das Auffinden von DNS-Mutationen mit dieser Methode beginnt mit der PCR-Amplifikation bestimmter, aus Wildtypen und den jeweiligen Mutanten bestehenden DNS-Fragmenten. Diese werden auf 95°C erhitzt und langsam abgekühlt. Dabei bilden sich zwei Paare von Homo- und Heteroduplexen (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Entstehung der Hetero- und Homoduplizies durch Erhitzung und Abkühlung der PCR-Fragmente



Auch hier ist ein abweichendes Bandenmuster nach der elektrophoretischen Auftrennung der hergestellten DNS Doppelstränge ein Hinweis auf das Vorliegen einer Sequenzänderung. Die Heteroduplexanalyse ist in den letzten Jahren durch die Einführung von DHPLC (denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)-Methoden zum Nachweis von Laufunterschieden zwischen Hetero- und Homoduplexen wesentlich verbessert worden (Prior et al., 1994; Pasternak, 1999).

### 2.3.7. DHPLC (Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)

Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, die bei erhöhter Temperatur (ca. 55-68°C) durchgeführt wird. Die DNS-Fragmente werden auf eine Säule aufgetragen. Die hydrophobe, neutrale Polymermatrix aus Polystyren-Divinylbenzol kann über Tetraethylammonium-Kation (TEAA) des Eluentensystems an die negativ geladene DNS binden. TEAA weist die Eigenschaften eines Brückenmoleküls auf, weil die hydrophilen Ammonium-Kationen an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNS binden, während Alkylgruppen an der hydrophoben Oberfläche der Polymermatrix binden (Sadek, 1999).

Die Trennung der DNS-Fragmente erfolgt mittels Ionenpaarumkehrphasenchromatographie. Die DNS-Fragmente werden von der Polymermatrix mit einer kontinuierlich steigenden Azetonitrilkonzentration eluiert. Längere Fragmente haften sich im Vergleich zu kürzeren Fragmenten stärker an die Säule (Lindsay, 1996).

Bei der Mutationsanalyse werden meistens Fragmente identischer Länge getrennt. Die erfolgreiche Trennung der Hetero- und Homoduplex-Paare hängt stark von der Temperatur ab. Werden die DNS-Fragmente bei nicht denaturierenden Bedingungen analysiert (z.B. 50-51°C), weisen die vier Spezies dieselbe Retentionszeit auf und nur ein „Peak“ wird erhalten. Bei erhöhter Analysetemperatur kommt es zur Trennung der Heteroduplizies von den Homoduplizies (Kapitel 2.3.6.), da die teilweise denaturierten

Heteroduplizen vor den nicht mutierten Doppelstrang-DNS (Homoduplizen) eluieren. Wird die Temperatur weiter erhöht, denaturieren die DNS-Fragmente völlig zu Einzelsträngen und weisen nur noch einen Peak auf. Wildtyp und Mutanten lassen sich anhand der unterschiedlichen Chromatogramme leicht unterscheiden.

Die unterschiedlichen Retentionszeiten der Hetero- und Homoduplizen ermöglichen eine hoch empfindliche und sehr schnelle Auffindung von DNS-Polymorphismen (Prior et al., 1994).

### **2.3.8. Diagnostischer Restriktionsverdau**

Häufig wird durch eine Mutation die charakteristische Erkennungssequenz eines Restriktionsenzymes entweder zerstört oder neu geschaffen. Nach der PCR-Amplifikation der zu suchenden Sequenz kann mit einem Verdau des PCR-Produktes durch das entsprechende Restriktionsenzym (Endonuklease) und anschließende Gelelektrophorese das Vorliegen oder die Abwesenheit der Mutation gezeigt werden.

Von einigen Autoren (Uitterlinden und Vijq, 1994) wird auf die Nachteile beim Einsatz eines Restriktionsverdau zum Nachweis einer Mutation hingewiesen. Durch die Enzyminkubationszeit und die Gelelektrophorese ist die Methode viel aufwendiger und bedeutet dadurch auch einen hohen finanziellen Aufwand bei Verwendung zahlreicher Restriktionsenzyme (Lewandonski et al. 1998). Außerdem kann durch mögliche stille Mutation die Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes ohne phänotypische Auswirkungen verloren gehen, da diese Mutation keinen Aminosäureaustausch verursacht.

### **2.3.9. "Solid-phase minisequencing"-Methode**

Diese Methode zum Nachweis einer Punktmutation wurde auch "single nucleotide primer extension" genannt (SnPE; Scheinert, 1998) und beruht auf der PCR-Methode. Hierbei wird während der PCR ein doppelsträngiges Amplikon hergestellt, das auch die Mutationsstelle beinhaltet. Dieses PCR-Produkt wird an eine feste Phase gebunden und denaturiert. In einem Reaktionsgefäß fügt man markierte Dideoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) und einen Primer, der mit seinem 3' Ende direkt vor der Mutation endet, hinzu und führt eine PCR durch. Nach Einbau eines ddNTP bricht die Polymerase-Kettenreaktion ab, weil die DNS-Polymerase keine weiteren Nukleotide an den vorhandenen DNS-Strang binden kann. Durch Auswahl verschiedener Markierungen lassen sich „minisequencing“-Produkte z.B. durch Fluoreszenzmessungen unterscheiden (Alphey, 1997). Der Nachteil der Methode liegt in den hohen Kosten für die Anschaffung markierter ddNTPs.

### **2.3.10. Sequenzanalyse**

Die oben erwähnten Methoden erlauben entweder den Nachweis bereits bekannter genetischer Modifikationen oder liefern Hinweise auf die Existenz von genetischen

Veränderungen auf einem bestimmten DNS-Abschnitt. Im Fall unbekannter genetischer Defekte, welche zu Erbkrankheiten führen, ist der endgültige Beweis für das Vorliegen einer Mutation durch Bestimmung der veränderten DNS-Sequenz zu erbringen.

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf der Verwendung von ddNTPS in einer PCR-Reaktion. Falls ein ddNTP eingebaut wird, bricht die Kettenreaktion ab, weil die Polymerase keine weiteren Nukleotide binden kann. Es entstehen so DNS-Fragmente, unterschiedlicher Länge, die anschließend elektrophoretisch getrennt werden. Durch Verwendung verschiedener Markierungen oder durch Zugabe nur eines bestimmten ddNTP in jedes Gefäß lassen sich die Sequenzierungsprodukte, welche immer mit einem bekannten ddNTP enden, unterscheiden (Alphey, 1997).

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des unbekannt genomschen Defektes welcher die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Alaskan Huskies verursacht und die Etablierung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für die frühzeitige Detektieren der heterozygoten Anlageträger.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Biologisches Material

Für die weitgehend molekularbiologischen Untersuchungen wurden kranke Tiere, heterozygote Anlageträger, gesunde Kontrolltiere und eine stabile Makrophagen ähnliche Zellkulturlinie (DH82) untersucht (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Geschlecht, Alter, Rasse der untersuchten Hunde.

Tier Nr.	Name	Rasse	Sex	Alter*/Herkunft
1.	Cocco (heterozygot Anlageträger)	AH	w	1985/Alaska, USA
2.	Kalli (heterozygot Anlageträger)	AH	w	1988/Alaska, USA
3.	Hias (homozygot GM <sub>1</sub> -Gangliosidose krank)	AH	m	01.06.1995/NZ
5.	K1 (Kontrolltier gesund)	D	m	1996/Deutschland
6.	K2 (Kontrolltier gesund)	AT	m	2002/Deutschland

\*-Geburtsdatum; AH= Alaskan Husky; D= Dackel; AT= Airedale Terrier; w = weiblich; m = männlich; NZ = bestandseigene Nachzucht; K1,2 = Kontrolltiere.

Als Kontrolltiere dienten ein klinisch gesunder Dackel, und ein Airedale Terrier welcher dem Sektionsgut des Institutes für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover entstammte und als Erkrankungs- und Todesursache eine akute Myokarditis als Folge einer Staupevirusinfektion aufwies.

Die Makrophagen ähnliche stabile Zelllinie (DH82) wurde von einem an maligner Histiozytose erkrankten 10 Jahre alten Golden Retriever gewonnen (Wellman et al. 1993; siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Biologische und morphologische Eigenschaften der DH82-Zelllinie (ATCC CRL-10389)

<b>Morphologie</b>		Makrophagen ähnlich und kann Latex-Partikeln phagozitieren. Diese Zellen stellen kein IL-1 her und sind positiv für die Fc $\gamma$ Rezeptoren und negativ für die C3b Rezeptoren.
<b>Spenderorganismus</b>	<b>Spezies</b>	Hund (Canis familiaris) „Golden Retriever“
	<b>Alter</b>	10 Jahre
	<b>Geschlecht</b>	männlich
	<b>Gewebe</b>	Maligne Histiozytose; Makrophagen; Monozyten
<b>Biologische Sicherheitseinstufung</b>		1
<b>Wachstumseigenschaften</b>		anhaftende Zellen

### 3.2. Gewebe- und Zellkulturtechniken

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden konfluente Fibroblasten und DH82-Zellkulturen verwendet, aus denen RNS beziehungsweise DNS gewonnen wurde.

Die tiefgefrorenen Zellkulturen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Der Überstand („Minimum Essential Medium Eagle“, MEME, mit „Earlescher“ Salzlösung und Glutamin ohne Natriumbikarbonat (ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim) mit einem Zusatz von 2g/l Natriumbikarbonat (Fluka AG, CH-Buchs), 10% fetalem Kälberserum (FKS, Seromed, München) und 5% DMSO wurde nach Zentrifugation der Zellen bei 700 x g und 4°C für 5 Minuten verworfen. Es folgte das Waschen der Zellen im frischen Wachstumsmedium (MEME, mit Earlescher Salzlösung und Glutamin ohne Natriumbikarbonat mit einem Zusatz von 2g/l Natriumbikarbonat und 10%igem fötalem Kälberserum) mit 1%igem Penicillin-Streptomycin (10000 µg/ml) durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 700 x g und 4°C. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml Wachstumsmedium mit Antibiotikum resuspendiert, gezählt, danach mit sterilem Wachstumsmedium auf 5 ml Endvolumen gebracht und in eine 30 ml Plastikzellkulturflasche (Corning®, Renner GmbH, Darmstadt) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in einem kupferbeschichteten Brutschrank (Begasungsbrutschrank Typ B 5060 EK CO<sub>2</sub>, Haereus, Hanau) bei 37°C mit 5%igem CO<sub>2</sub>. Nach 4 Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel gegen 5 ml neues Wachstumsmedium. Danach folgten alle 3-4 Tage ein vollständiger Mediumwechsel und die Beobachtung des Zellwachstums mit einem Umkehrmikroskop (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg). Ein konfluenter Zellrasen konnte in der Regel 1-3 Wochen nach Kulturbeginn beobachtet werden. Diese Zellen wurden direkt für die RNS-Isolierung verwendet oder geerntet, um DNS zu gewinnen.

Die Ernte der Fibroblasten erforderte eine zweimalige Waschung mit 5 ml Wachstumsmedium ohne fötalem Kälberserum und eine 5-minütige Inkubation bei 37°C mit 3 ml Trypsin-EDTA (ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim). Die abgelösten Zellen wurden in ein Reagenzglas mit 5 ml MEME plus 10%igem fetalem Kälberserum verbracht und 5 Minuten bei 700 x g und 4°C zentrifugiert. Verbleibende Fibroblasten wurden nach Zugabe von 5 ml MEME mit 10%igem FKS für eine spätere Ernte erneut kultiviert.

Eine Waschung der gewonnenen Fibroblasten erfolgte zweimal mit 5 ml 1x PBS pH 7,0 („phosphate buffered saline“, Sigma-Aldrich Biochemie, Taufkirchen). Für die DNS-Isolierung wurden die Zellen durch 3 bis 4maliges Einfrieren im flüssigen Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37°C homogenisiert und anschließend die DNS isoliert.

### 3.3. DNS-Isolierung

#### 3.3.1. Isolierung von DNS aus Zellkulturen und Zellhomogenaten durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Die mittels dieser Technik gewonnene DNS zeigte keine Degradationsanzeichen, ist aber aufgrund ihrer hohen Viskosität relativ schwer zu dosieren. Die Ernte der Zellen und die Herstellung von Zellhomogenaten erfolgten wie oben beschrieben.

Die DNS-Extraktion und Aufreinigung fand in mehreren Schritten statt.

1. Zellyse:

Resuspension des Zellpellets bzw. des Zellhomogenats in 5ml Lysispuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0,5% SDS, 0,1 % Proteinase K), Inkubation über Nacht bei 50°C auf einen Schüttelinkubator (Strauss, W., 1998).

2. DNS-Extraktion und Phasentrennung:

DNS-Extraktion durch Zugabe von 5ml Phenol /Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1). 10-minütige Zentrifugation bei 1700 x g zur Phasentrennung.

**Cave:** Die Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol Lösung muss vor dem Gebrauch auf 20-22°C (Raumtemperatur) gebracht werden. Die Verwendung kälterer Lösungen führt zum Phasenwechsel und DNS-Verlust.

Falls die Phasen sich nicht richtig trennten, wurde noch einmal 5 ml Lysispuffer ohne Proteinase K zugeben und erneut bei 1700 x g 10 Minuten zentrifugieren.

Sollte eine dicke weiße Schicht zwischen der wässrigen und der organischen Phase entstehen, ist die organische Extraktion zu wiederholen.

3. DNS-Fällung:

Abnahme der oberen (wässrigen) Phase und DNS-Fällung durch Zugabe von 5M NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M NaCl (das Volumen bezieht sich auf die Menge der gewonnenen wässrigen Phase) und von 2 Volumen 100% Äthanol. 2-minütige Zentrifugation bei 1700 x g.

4. DNS-Waschen:

1 ml 70% Äthanol. 10-minütige Zentrifugation bei 1700 x g.

5. Trocknung und Rehydrierung des DNS-Pellets :

DNS-Pellet 10 Minuten lang an der Luft bei offenem Deckel trocknen lassen. DNS-Rehydrierung in 100µl sterilem Wasser durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren.

Die Aufbewahrung der DNS erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C.

### 3.3.2. Isolierung von DNS aus Zellkulturen und Zellhomogenaten mittels Puregene® DNS Isolierungskit

Der Prinzip des Puregene® Kits (Biozym, Oldendorf) beruht auf der Lyse der Zellen mittels anionischen Detergenzien gefolgt von einer Salzpräzipitation der Proteine. Die DNS wurde mit Alkohol gefällt, gewaschen und in sterilem Wasser aufgenommen.

1. Zellyse:

Auf- und Abpipettieren des Zellpellets in 200 µl PBS (für Zellhomogenate ist dieser Schritt nicht notwendig). Zellyse durch Zugabe von 3 ml „Cell Lysis Solution“. Es entsteht eine visköse Lösung.

2. RNase Behandlung:

Versetzen der Zellysate mit 15 µl „RNase A Solution“. Inkubation bei 37°C für 60 Minuten.

3. Protein-Fällung:

Abkühlung der Proben bei Raumtemperatur. Zugabe von 1 ml „Protein Precipitation Solution“ und 20 minütiges Vortexen bei maximaler Geschwindigkeit. Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 x g zur Proteinfällung (es entsteht ein braunes Proteinpellet).

**Cave:** Falls kein Pellet sichtbar ist, müssen die Proben noch einmal gemischt werden, 5 Minuten auf Eis inkubieren und anschließend bei 2000 x g 10 Minuten erneut zentrifugieren.

**Cave:** Bei Überstandentnahme soll das braune Proteinpellet in dem alten Röhrchen bleiben.

4. DNS-Fällung:

Den Überstand in ein 15 ml steriles Röhrchen umpipettieren, DNS Fällung durch Zugabe von 3 ml Isopropanol (2-Propanol), vorsichtiges Mischen durch Invertieren und anschließende 3-minütige Zentrifugation bei 2000 x g zur DNS-Fällung.

5. DNS-Waschen:

Vorsichtiges Wegwerfen des Überstandes, DNS-Pellet mit 3 ml 70%igem Äthanol und ein minütiger Zentrifugation bei 2000 x g waschen.

6. Trocknung und Rehydrierung der DNS in sterilem Wasser:

Trocknung des DNS-Pellets bei offenem Deckel für 10 Minuten, DNS Rehydrierung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 250µl sterilem Wasser, über Nacht Inkubation bei Raumtemperatur.

Lagerung der DNS bei -20°C.

### 3.4. RNS-Isolierung

#### 3.4.1. Etablierung und Optimierung der TRIzol<sup>®</sup>-Standard Methode

Die Methode beruht auf dem Prinzip der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynsky und Sacchi, 1987). Für die RNS-Isolierung wurde neben dem TRIzol Reagenz, Chloroform, Isopropanol (2-Propanol), 75%iges Äthanol und DNase/RNase freies Wasser benötigt. Die einzelnen Arbeitsschritte zur Isolierung von RNS mit der TRIzol<sup>®</sup> Standard Methode und zur Optimierung der Methode sind im Folgenden beschrieben:

1. Versetzen der Probe mit TRIzol<sup>®</sup> und Homogenisierung:  
1 ml TRIzol<sup>®</sup> für jede 10 cm<sup>2</sup> Zellkultur zugeben und die Zellen mit einem Zellschaber lysieren, 10-minütige Inkubation des Zelllysats (gemäß Herstellerprotokoll: 5 Minuten) bei Raumtemperatur.
2. Phasentrennung:  
200 µl Chloroform/ml TRIzol<sup>®</sup> zugeben, 15 Sekunden schütteln und anschließend 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 x g und Raumtemperatur (im Herstellerprotokoll bei 4°C).
3. RNS-Fällung:  
Überführung der oberen Phase in ein neues Rörchen, Zugabe von 600 µl Isopropanol/ml Trizol, Inkubation für 12 Stunden bei -20°C (im Herstellerprotokoll 10 Minuten bei Raumtemperatur), Zentrifugation bei 12000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Waschen der RNS:  
Überstand verwerfen und das Pellet mit 1ml 75%ige Äthanol/ml TRIzol<sup>®</sup> durch 7-minütige Zentrifugation bei 7500 x g und Raumtemperatur waschen.
5. Trocknung und Rehydrierung der RNS:  
Lufttrocknung des RNS-Pellets bei offenem Deckel für 10 Minuten.  
Wiedergewinnung der RNS in 30µl DNase/RNase-freiem Wasser.

Die Aufbewahrung der RNS erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C.

#### 3.4.2. DNase Behandlung

Der DNase-Verdau erfolgte in der "RNeasy" Mini-Spinsäule mit dem RNase-Free „DNase Set“ (Qiagen, Hilden).

Diese Methode ermöglicht einen effizienten DNase-Verdau in der RNeasy<sup>®</sup>-Säule nach der RNS-Isolierung mit TRIzol<sup>®</sup>. Durch die nachfolgenden Waschschr



die DNase wieder effizient entfernt. Der DNase I –Verdau erlaubt die Entfernung letzter DNA Kontaminationen und ist dann notwendig, wenn die gewonnene RNS in weitere Applikationen eingesetzt wird. Die Durchführung der DNase-Behandlung erfolgt wie folgt:

1. Rekonstitution der DNase I:

Rekonstitution der DNase I (1500 Kunitz-Einheiten) in 550µl RNase-freiem Wasser.

**Cave:** Die rekonstituierte DNase I darf nicht auf einem Vortexer gemischt werden, da sie sehr anfällig für die physikalische Denaturierung ist.

2. Bindung der RNS an Silicagel-Membran:

Pipettierung der RNS-Lösung auf die Säule und 15 Sekunden Zentrifugation bei 8000 x g bei Raumtemperatur.

3. RNS-Waschen:

Durch Zugabe von 350 µl RW1-Puffer in die Säule und anschließende Zentrifugation bei 8000 x g für 15 Sekunden, der Durchfluss wird verworfen.

4. Vorbereitung der DNase I:

10 µl DNase I-Stammlösung wurde mit 70µl RDD-Puffer durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens gemischt.

5. Enzymatische Reaktion:

80 µl DNase I-Mischung direkt auf die RNeasy Silicagel-Membran pipettieren. Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

6. Entfernung der DNase I:

350 µl RW1-Puffer in die RNeasy Mini-Säule pipettieren und 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugieren.

7. RNS-Waschen:

500 µl RPE-Puffer auf die RNeasy-Säule pipettieren und 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugieren.

8. Trocknen der Silicagel-Membran:

2 Minuten Zentrifugation bei 8000 x g.

Es war wichtig, die Membran trocknen zu lassen, da durch Äthanolreste nachfolgende Reaktionen hätten beeinträchtigt werden können. Dieser Zentrifugationsschritt stellte sicher, dass kein kontaminierendes Äthanol zusammen mit der RNA eluiert wurde.

**Cave:** Beim Herausnehmen der Säule nach der Zentrifugation ist es wichtig, nicht in Kontakt mit dem Durchflussgerät zu kommen, weil es ansonsten zur Verschleppung von Äthanol kommen kann.

9. RNS Eluierung:

Die RNeasy Säule musste in ein neues Röhrchen überführt werden. Es folgte die RNS-Eluierung mit 30 µl RNase-freies Wasser pipettiert und eine Zentrifugation bei 8000 x g für 1 Minute.

Die Aufbewahrung der RNS erfolgte bei -80°C.

### **3.5. Konzentrations- und Integritätsbestimmung von Nukleinsäuren**

#### **3.5.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Die Extinktion der Nukleinsäuren wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd einer Konzentration von 50 µg DNS beziehungsweise 35 µg RNS in 1 ml Volumen. Die optische Dichte ist abhängig von dem GC Gehalt der Nukleinsäurelösung. Bei einer Konzentration von 50 µl/ml doppelsträngiger DNS mit einem 30%igem GC-Anteil beträgt die optische Dichte 0,94, während bei einem 72%igen GC-Anteil die optische Dichte 1,04 beträgt. Das Verhältnis der bei 260 und 280 nm gemessenen Extinktion zeigt den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäuren und soll ungefähr bei 1,8 für DNS und 2,0 für RNS liegen.

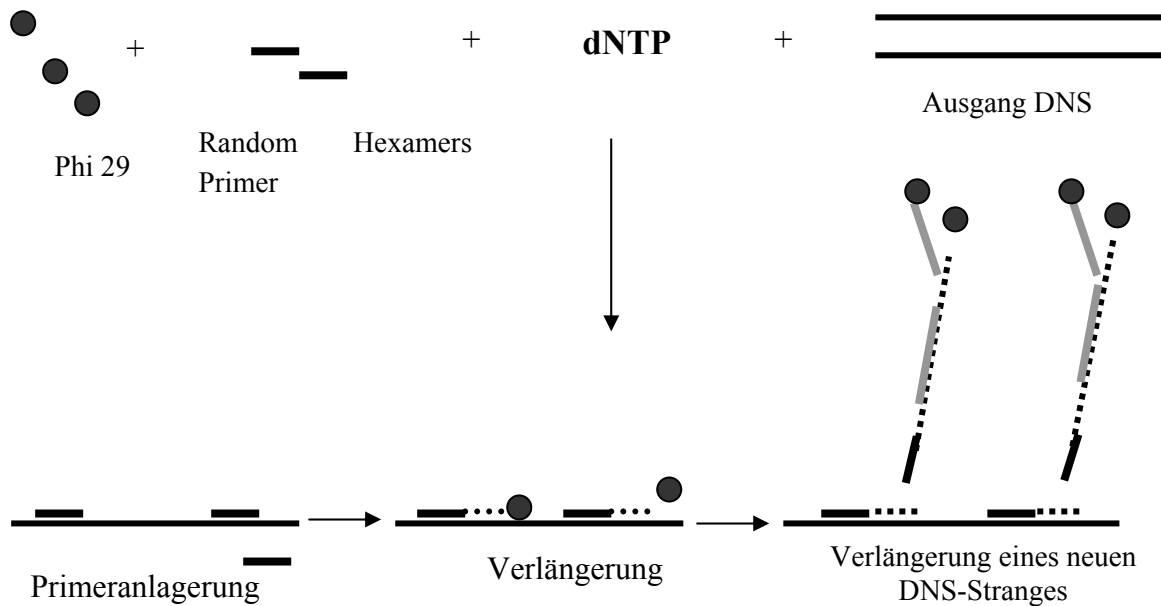
#### **3.5.2. Elektrophoretische Integritätsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Wanderung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld erlaubte die Abschätzung der Integrität sowie der Menge im Vergleich mit einer DNS bekannter Größe und Konzentration (Basenleitern). Die Nukleinsäuren-Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (254-320 nm), wobei die Fluoreszenz der DNS-Menge proportional ist (Heptinstall et al., 2000).

### 3.6. Amplifikation der genomischen DNS

Die durchgeführte Methode beruht auf den biochemischen Eigenschaften der Phi29-Polymerase, welche lineare und zirkuläre DNS Moleküle amplifizieren kann (siehe Abbildung 3).

**Abbildung 3:** Prinzip der DNS-Amplifikation mit dem GenomiPhi™ DNS-Amplifikationskit (Amersham Biosciences, Freiburg).



Durch diese Reaktion konnte hochmolekulare DNS gewonnen werden. Die vermehrte DNS beinhaltet alle SNP („single nucleotid polymorphism“) der ursprünglicher DNS und eignete sich dadurch für die Genotypisierung und Mikrosatellitenanalyse (Blanco, 1989; Nelson, 2002).

Die Reaktion wurde nach Herstelleranweisungen auf Eis durchgeführt, um unspezifische Amplifikation der Phi29 zu vermeiden. Alle Schritte zur isothermischen Amplifikation der genomischen DNS sind im Folgenden dargestellt:

1. Verdünnung der Ausgangs-DNS auf 10 ng/μl mit „PCR grade“ Wasser.
2. Mischen von 1μl (10 ng) genomischer DNS mit 9μl „GenomiPhi Sample Buffer™“.
3. DNS Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten und anschließende Kühlung auf Eis.
4. Mischen von 9 μl „GenomiPhi Sample Buffer™“ mit 1μl „GenomiPhi Enzyme Mix®“. Der zweite Mix wurde dem ersten zugefügt.
5. Inkubation für 16-18 Stunden bei 30°C.

6. Denaturierung des Reaktionsmixes bei 65°C für 10 Minuten und anschließende Abkühlung auf Eis.

Aufbewahrung der amplifzierten DNS bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C.

### **3.7. Oligonukleotide für die Durchführung molekularbiologischer Arbeiten**

Die Auswahl der spezifischen Oligonukleotide (Primer) für unterschiedliche Zielsetzungen wurde nach bestimmten Kriterien durchgeführt, wobei manche Primerpaare in der Literatur veröffentlicht wurden (Zhang et al., 1999; Yamato et al., 2002). Um die einzelnen Primer zu testen, wurde das Programm „GeneFisher“ verwendet.

Folgende Kriterien wurden beachtet (Rychlik, 1995):

- Durchschnittliche Länge von 16-24 Basenpaaren
- mittlere Schmelztemperatur, berechnet nach der Faustformel  
 $T_m = 2x(A+T) + 4x(G+C)$
- GC-Anteil 50-60%
- maximal 3 gleiche Basen hintereinander
- keine Haarnadelstrukturen von mehr als vier Basen
- keine Anlagerung der beiden im Paar verwendeten Primer von mehr als vier nebeneinander liegenden Basen
- keine Anlagerung der beiden Primer im Bereich der letzten 4 Basen am 3' Ende

Die Primersynthese wurde von mehreren Firmen durchgeführt:

- MWG-Biotech, Ebersberg
- GeneScan, Freiburg
- Hermann GbR, Synthetische Biomoleküle, Freiburg

Alle ausgewählten Primer wurden mit den in GenBank (NCBI, USA) und von Wang et al. (2000) publizierten kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase cDNS-Sequenzen unter Verwendung des Analyseprogramms BLAST von GenBank verglichen. Sequenzen, welche außer zur kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase (GenBank Accession No.: AF056084, Wang et al., 2000) auch Homologien zu anderen kaninen cDNS-Sequenzen aufwiesen, wurden nicht in weiteren Experimenten eingesetzt.

Neben den spezifischen saure  $\beta$ -Galaktosidase-Primerpaaren wurden Primer eingesetzt, die Abschnitte des Glutaraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Gens vervielfältigen können (Gröne et al., 1998). Diese ermöglichten die Optimierung der molekularbiologischen Arbeitsmethoden und dienten zusätzlich auch als positive Reaktionskontrolle („house keeping gene“).

Um den Einbau gewünschter DNS-Sequenzen in Plasmidvektoren zu ermöglichen und zu überprüfen sowie für Sequenzierungszwecke, wurden mehrere Primerpaare eingesetzt (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Sequenz, Position und Richtung der verwendeten Primer.

Primer	Basensequenz ( 5'-3')	Richtung	Position des Primers	Amplikonlänge
<b>Glutaraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase Gen Primer</b>				
<b>GAPDH S</b>	GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC	Sense	Exon 6-7	229 bp
<b>GAPDH AS</b>	GGC CAT CCA CAG TCT TCT	Antisense	Exon 8	
<b>Kanine saure <math>\beta</math>-Galaktosidase Gen Primer</b>				
<b>GM<sub>1</sub>-fwd P97</b>	TTC ACA ATT GAC TAC AGC CAC	Sense	79-100	326 bp
<b>GM<sub>1</sub>-rev P98</b>	TAA TAG CCA AGC AGG TAA TC	Antisense	385-405	
<b>GM<sub>1</sub>-fwd P99</b>	GAC TGC TGG TCA TCC TG	Sense	329-346	434 bp
<b>GM<sub>1</sub>-rev P100</b>	GCT CAC TCT TTC TCT GGA TTT G	Antisense	741-763	
<b>GM<sub>1</sub>-fwd P101</b>	GAC CAG GTG CCA ACA TCA CT	Sense	713-733	433 bp
<b>GM<sub>1</sub>-rev P102</b>	CTC CTC CAC CGT CTT TAA CT	Antisense	1126-1146	
<b>GM<sub>1</sub>-fwd P103</b>	GTT TTA TCC CTC CGT CTA CAC C	Sense	1073-1095	808 bp
<b>GM<sub>1</sub>-rev P104</b>	TTC TGG GCC ACT GTC ACC	Antisense	1863-1881	
<b>GM<sub>1</sub>-fwd P107*</b>	AGG GAC GTG GCG ACG GCG ATG	Sense	4-25	2022 bp
<b>GM<sub>1</sub>-rev P110*</b>	ACT CCA ACG GGT CAC AGT GTT TC	Antisense	2003-2026	
<b>GM<sub>1</sub>-fwd 297</b>	CCA GCC GGG ACA GTA CCA GTT TTC	Sense	258-2010	1752 bp
<b>GM<sub>1</sub>-rev 2048</b>	ACG GGT CAC AGT GTT TCA TCA TCA GA	Antisense		
<b>Exon 15 fwd</b>	AAC ACT GAG GAT GCA GTA CGC AGC	Sense	1528-1552	182 bp
<b>Exon 15 rev</b>	TCC AGG AAA CTG GAT AAA GGT GTC	Antisense	1686-1710	
<b>SMART™ RACE Methode (BD Biosciences, Heidelberg)</b>				
<b>SMART II</b>	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG	First Strand Adapter		
<b>5'-RACE CDS</b>	(T) <sub>25</sub> VN-	5'-RACE cDNA Synthesis Primer		
<b>SMART-CDS</b>	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CT (T) <sub>30</sub> VN	cDNA Synthesis Primer		
<b>SSS-PCR Primer</b>	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT	Second Strand Synthesis Primer		
<b>Primer für die Klonierung und für die Sequenzierung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)</b>				
<b>T7 fwd</b>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sense	863-882	pCDNA 3.1/V5-His TOPO Vektor
<b>BGH rev</b>	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	Antisense	1111-1128	

\*- die Primer wurden aufgrund der von Wang et al. in 2000 veröffentlichten Nukleotidensequenz der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-cDNS ausgesucht.

Alle anderen Primer wurden auf Basis der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-mRNS bzw. -cDNS Sequenz GenBank Accession No. AF056084 ausgesucht.

V- Adenin, Cytosin oder Guanin; N- Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin

A-Adenin; C-Cytosin; T-Thymin; G-Guanin; fwd-forward (vorwärts); rev-reverse (rückwärts)

Die oben erwähnten Primer wurden als Primerpaare verwendet und entsprechend benannt (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Primerpaare für die Amplifikation der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase.

Primer	Primerpaar
GAPDH S	<b>GAPDH</b>
GAPDH AS	
GM <sub>1</sub> -fwd P97	<b>Primerpaar 1</b>
GM <sub>1</sub> -rev P98	
GM <sub>1</sub> -fwd P99	<b>Primerpaar 2</b>
GM <sub>1</sub> -rev P100	
GM <sub>1</sub> -rev P101	<b>Primerpaar 3</b>
GM <sub>1</sub> -fwd P102	
GM <sub>1</sub> -rev P103	<b>Primerpaar 4</b>
GM <sub>1</sub> -fwd P104	
GM1-fwd 297	<b>Primerpaar 5</b>
GM1-rev 2048	
GM1-fwd 107	<b>Primerpaar 6</b>
GM1-rev 110	
Exon 15 fwd	<b>Primerpaar 7</b>
Exon 15 rev	
T7 fwd	<b>Primerpaar 8</b>
BGH rev	

### 3.8. Amplifikation des Exon 15 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase-Gens mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Für die enzymatische Amplifikation des Exon 15 wurden neben spezifischen Primern die KOD-Polymerase verwendet (Kapitel 3.7 und Kapitel 3.8.2). Die Verwendung einer Polymerase mit Lesekorrekturefunktion erwies sich als notwendig, um mögliche Amplifikationsfehler zu vermeiden. Die Zusammensetzung eines PCR-Master Mix wird in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7:** PCR-Master Mix für die Amplifikation des Exon 15 des kaninen sauen  $\beta$ -Galaktosidase-Gens.

Volumen	Reagenzien
5 $\mu$ l	10 x PCR-Puffer für KOD Hot Start DNS Polymerase
5 $\mu$ l	dNTPs (Endkonzentration 0,2 mM)
2 $\mu$ l	MgSO <sub>4</sub> (Endkonzentration 0,2 mM)
3 $\mu$ l	Primer Exon 15 fwd (Endkonzentration 0,3 $\mu$ M)
3 $\mu$ l	Primer Exon 15 rev (Endkonzentration 0,3 $\mu$ M)
	DNS (100 ng/Ansatz)
1 $\mu$ l	KOD Hot Start DNS-Polymerase (1U/ $\mu$ l)
q.s. ad 50 $\mu$ l	“PCR grade“ Wasser

Die Anlagerungstemperatur des verwendeten Primerpaares wurde mit der Gradienten-Option des Thermocycler Multicycler PTC 200 ermittelt (siehe Kapitel 3.8.2). Die höchste Temperatur (68.4°C), bei der spezifische Banden (182 bp) zu sehen waren, wurde als Anlagerungstemperatur für weitere Experimente verwendet.

Die Durchführung der Polymerasenkettenreaktion erfolgte unter Verwendung Primer spezifischer Anlagerungstemperaturen. Am Ende der Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf 4°C gekühlt und anschließend bei – 20°C gelagert.

### 3.8.1. Amplifikationskontrolle

Die Amplifikationskontrolle erfolgte auf 3,5 %igen und 4%igen Agarosegelen nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,25  $\mu$ g/ml) und unter Verwendung des “Superladder Low SSL-100™“ als Längstandard (Anhang 9.5)

Dafür wurden 5  $\mu$ l PCR-Produkt mit 3 $\mu$ l Ladepuffer (ABgene, Hamburg) gemischt und in die Taschen des Gels eingegeben. Zur späteren Beurteilung der Amplikonlänge wurde in die erste und die letzte Vertiefung des Gels ein 100 bp DNS-Längstandard (ABgene, Surrey, UK) gegeben. Als Laufpuffer wurde für die Agarosegele 1X TBE Puffer (Tris-Borat-EDTA) verwendet. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 6V/cm bei einer Stromstärke von 500 mA (Microcomputer, Electrophoresis, Power Supply, Consort, Belgien) für 60 Minuten für die Agarosegele angelegt. Die Visualisierung der DNS erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 312 nm. Die fotografische Dokumentation wurde mit Kodak 1.0 “Digital Imaging“ (Eastman Kodak Inc., USA) durchgeführt.

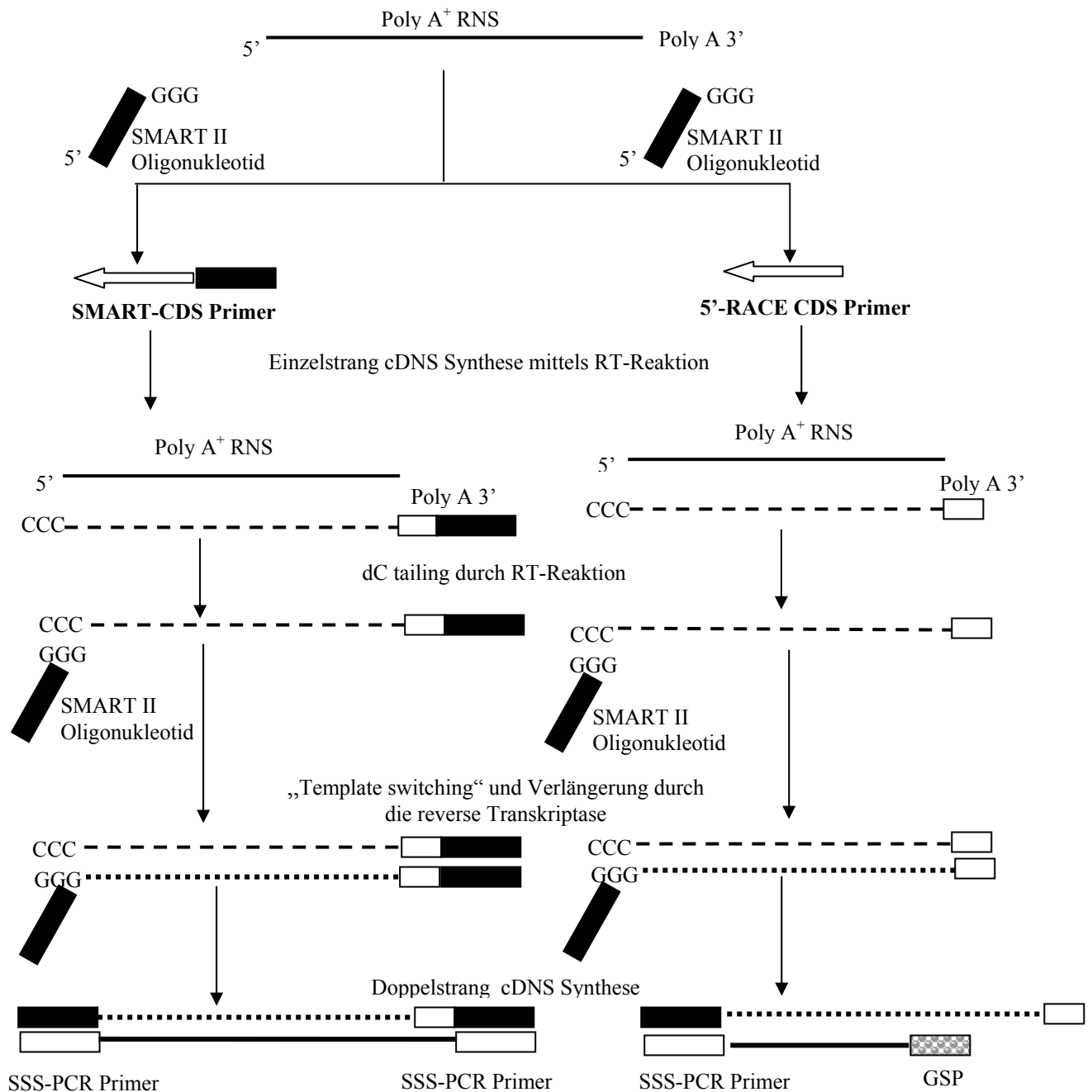
### 3.9. Herstellung von cDNA mittels SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit

Der SMART<sup>TM</sup>RACE Amplification Kit (BD Biosciences, Heidelberg) verbindet die Marathon<sup>TM</sup> cDNA Technologie (Chechnik et al. 1995) mit der SMART (Switch Mechanism At 5' End of RNA Transcript) Methode und erlaubt so die Herstellung hoch qualitativer cDNS aus geringsten Mengen Gesamt- oder PolyA<sup>+</sup> RNS inklusive 5' und 3' Ende des RNS Moleküls (Rapid Amplification of cDNA Ends = RACE) . Die Besonderheit des Systems liegt darin, dass in erster Linie lange cDNS Moleküle angereicht wurden. Alle Schritte zur Herstellung von dscDNS-Moleküle sind im Folgenden dargestellt:

1. Spezielle oligo(dT) Primer (SMART-CDS bzw. 5'-RACE-CDS) binden die mRNS-Moleküle. Wenn die "reverse" Transkriptase das 5' Ende der mRNA-Matrize erreicht hat, werden aufgrund ihrer "terminal transferase" Aktivität Cytosin-Reste hinzugefügt.
2. Ein spezielles Oligonukleotid (SMART II Oligonukleotid) hybridisiert an diese Cytosin-Reste. Dadurch kann die reverse Transkriptase weitere Nukleotide einbauen ("switching mechanism at 5'end") und das SMART II Oligonukleotid ("adapter") wird der mRNS-Matrize zugefügt.
3. In der SMART-Methode haben die cDNS-Moleküle an beiden Enden "adapters", wobei in der RACE-Methode nur am 5'-Ende das "adapter"-Oligonukleotid eingebaut werden kann.
4. Die Doppelstrangsynthese erfolgt in der SMART-Methode durch Verwendung eines SSS-Primers ("second strand synthesis" Primer), welcher sowohl als Vorwärts- als auch als Rückwärtsprimer agiert und an den "adapter" Sequenzen bindet. In der RACE-Methode, wo die "adapter"-Sequenz nur am 5'-Ende vorhanden ist, wird neben dem SSS-Primer ein genspezifischer Primer (GSP) eingesetzt, so dass gezielt mRNS-Moleküle amplifiziert werden können (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Darstellung der SMART/RACE Methode.



Für die Herstellung der sauren  $\beta$ -Galaktosidase-cDNS wurde das Protokoll des Herstellers in einigen Punkten geändert. Um eine vollständige Umschreibung der GC-reichen und 2 kb langen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-RNS zu erzielen, wurde das Experiment folgendermaßen durchgeführt. Für die Erststrang-Synthese wurde als Ausgangsmaterial Gesamt-RNS aus Hautfibroblasten gesunder Hunde bzw. eines kranken Hundes sowie Hautfibroblasten von heterozygoten Anlageträgern verwendet (Kapitel 3.2). Die RNS wurden dazu wie im Kapitel 3.2 beschrieben isoliert und aufgereinigt. Für die reverse Transkription wurden 100 ng Gesamt-RNS, der SMART-CDS-Primer (für SMART), der 5'-RACE-CDS Primer sowie das SMART II-Oligonukleotid eingesetzt. In einem 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden folgende

Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge zugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Zusammensetzung des ersten Master Mix für die SMART und RACE reverse Transkription.

SMART		RACE	
Menge	Reagenzien	Menge	Reagenzien
1-3 µl	RNS (100 ng/Ansatz)	1-3 µl	RNS (100 ng/Ansatz)
1 µl	SMART-CDS Primer	1 µl	5-'RACE-CDS Primer
1 µl	SMART II Oligonukleotid	1 µl	SMART II Oligonukleotid
q. s. ad 5 µl	DEPC Wasser	q.s. ad 5 µl	DEPC Wasser

Nach einer 2-minütigen Inkubation des Ansatzes bei 70°C wurden die Reaktionsgefäße sofort auf Eis gekühlt und erneut kurz abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die RT-Master Mix Zugabe (siehe Tabelle 9)

**Tabelle 9:** RT-Master-Mix

Menge	Reagenzien
2 µl	5 x First Strand Synthesis Buffer
1 µl	DTT (Dithiotreitol)
1 µl	dNTP Mix (10 µM jedes Nukleotid)
1 µl	Superscript II Reverse Transkriptase (200U/µl)
Gesamtvolumen: 5µl /Reaktionsgefäß	

Die „Superscript II“ reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) wurde anstelle der „PowerScript“ reversen Transkriptase (BD Biosciences, Heidelberg) für die reverse Transkription verwendet, weil im Vorversuch gezeigt werden konnte, dass die Umschreibung von kaniner β-Galaktosidase-RNS in cDNS nur ausgesprochen schwer mit anderen kommerziell erhältlichen reversen Transkriptasen durchzuführen war.

Die reverse Transkription erfolgte bei 42°C für 90 Minuten. Durch Kühlung der Reaktionsgefäße auf Eis wurde die Reaktion gestoppt.

Der Reaktionsansatz wurde mit 20 µl Tricine-EDTA-Puffer verdünnt und 2 Minuten bei 72°C inkubiert.

Die so erhaltene einzelsträngige cDNS konnte entweder sofort in die Doppelstrangsynthese-Reaktion eingesetzt werden oder wurde bei -20°C bis zu 3 Monaten aufbewahrt.

Für die Doppelstrangsynthese wurde nicht das im Kit mitgelieferte „Advantage™ 2 Polymerase PCR Enzyme System“ (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet, sondern

der „Advantage™-GC 2 PCR Polymerase Mix“ (BD Biosciences, Heidelberg), welcher besser für die Amplifikation GC-reicher cDNA-Abschnitte geeignet ist. Für die Amplifikation von SMART und RACE cDNS Moleküle wurden zwei getrennte Master-Mixe hergestellt (siehe Tabelle 10)

**Tabelle 10:** Doppelstrangsynthese Master-Mixe.

SMART		RACE	
Menge	Reagenzien	Menge	Reagenzien
54 µl	PCR-grade Wasser	54 µl	“PCR grade“ Wasser
10 µl	SMART sscDNA	10 µl	RACE sscDNA
20 µl	5 x GC 2 PCR Puffer	20 µl	5 x GC 2 PCR Puffer
10 µl	GC Melt (5M)	10 µl	GC Melt (5M)
2 µl	SSS-PCR Primer (10 mM)	1 µl	SSS-PCR Primer (10 mM)
-	-	1 µl	GSP rev. Primer
2 µl	50x dNTP Mix	2 µl	50x dNTP Mix
2 µl	Advantage – GC 2 Polymerase Mix	2 µl	Advantage – GC 2 Polymerase Mix
Gesamtvolumen 100 µl / Reaktionsgefäß		Gesamtvolumen 100 µl / Reaktionsgefäß	

Die Doppelstrangsynthese wurde in einen Thermocycler mit integriertem Heizdeckel und Peltiert-Joul Heiz-/Kühlsystem (Multicycler PTC 200, Biozym, Oldendorf) unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen durchgeführt (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Temperaturbedingungen zur Durchführung der Doppelstrangsynthese

SMART			RACE		
Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
94°C	3 Min.	1 x	94°C	3 Min.	1 x
94°C	0,5 Min.	40 x	94°C	0,5 Min.	40 x
65°C	1,5 Min.		59,7°C	1,5 Min.	
68°C	6 Min.		68°C	6 Min.	
68°C	3 Min.	1x	68°C	3 Min.	1 x

Die so erhaltenen doppelsträngigen dscDNS Moleküle wurden chromatographisch aufgereinigt und bis zur Verwendung bei - 20°C aufbewahrt.

### 3.9.1. dscDNS-Aufreinigung mittels “QIAquick® PCR Purification Kit“

Nach der dscDNS-Synthese wurden die Amplifikationsprodukte direkt aus dem Reaktionsansatz chromatographisch aufgereinigt und im DEPC-Wasser aufgelöst. So wurden alle Elemente (Primer, Nukleotide, verschiedene Ionen), welche weitere enzymatische Reaktionen negativ beeinflussen könnten, entfernt.

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll:

1. Mischen von 5 Volumen PB-Puffer mit 1 Volumen PCR Produkt
2. Auftragen der PB-Puffer – dscDNS-Mischung auf Qiagen-Säulen
3. Zentrifugation für 30 Sekunden bei 17900 x g
4. Überstand verwerfen und 750 µl PE Puffer auf die Säule pipettieren
5. Das Waschen der gebundenen dscDNS erfolgte durch eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 17900 x g;
6. Um den ganzen Waschpuffer zu entfernen, sollten die Qiagen<sup>®</sup> Säulen erneut für 1 Minute bei 17900x g zentrifugiert werden
7. Die Eluierung der an der Silicagelmembran gebundenen ds cDNA erfolgte mit 30 µl DEPC-Wasser und einer Zentrifugation von 1 Minute bei 17900 x g

Die Konzentration der eluierten ds cDNS wurde mittels Spektroskopie (GeneQuant 2, Phamacia Biociences) bei 260 nm gemessen und die ds cDNS Proben bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert.

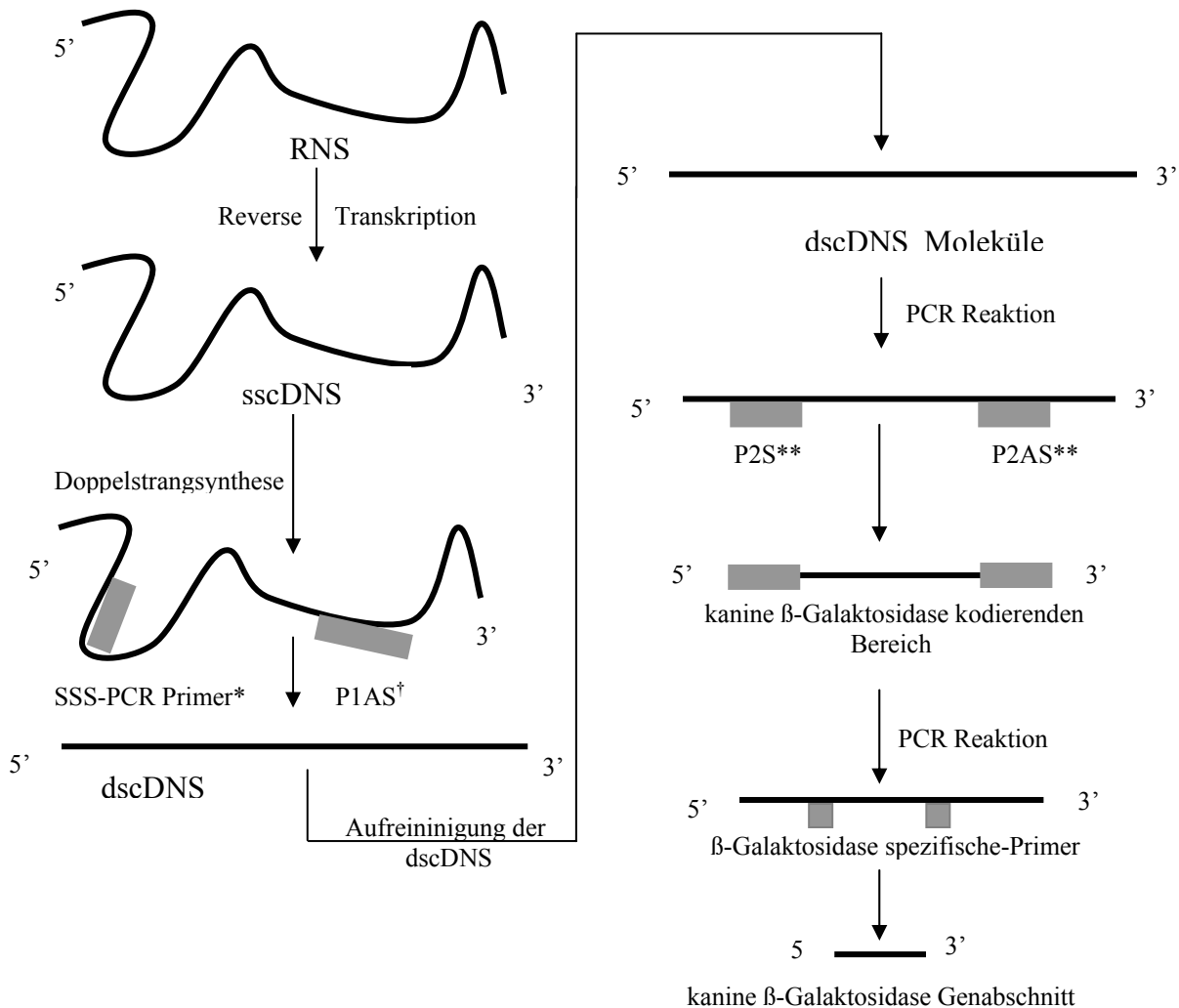
### **3.9.2. „nested“-PCR mit spezifischen Primern für die kanine saure β-Galaktosidase**

Die aufgereinigten dscDNS Moleküle (siehe 3.9.1.) wurden in eine „nested“-PCR eingesetzt.

Die „nested“-PCR ist eine enzymatische Amplifikation der DNS beziehungsweise cDNS, welche sich von der konventionellen PCR wie folgt unterscheidet:

- Als Matrize für die enzymatische Reaktion dienen im voraus amplifizierte DNS-Moleküle
- Die verwendeten Primerpaare müssen innerhalb der DNS-Matrize binden (siehe Abbildung 5)

**Abbildung 5:** Fließdiagramm der eingesetzten “nested“-PCR Methode zur Amplifikation des kodierenden Bereiches der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-mRNS.



SSS-PCR Primer – für die Doppelstrangsynthese; P1AS<sup>†</sup>-kanine saure  $\beta$ -Galaktosidase Primer unter Verwendung der RACE-Methode; P2S\*\* und P2AS\*\*- kanine saure  $\beta$ -Galaktosidase spezifische Primer.

Für die Durchführung der Nested-PCR wurde eine DNS-Polymerase mit Lesefehlerkorrektur (proofreading) gewählt. Am besten für die Amplifikation der sauren  $\beta$ -Galaktosidase cDNS war die KOD „hot start“ DNS-Polymerase (Novagen, Darmstadt) geeignet.

Die Verwendung dieser Polymerase hatte die mehrere Vorteile:

1. Die Polymerase ist mit Antikörpern gebunden und dadurch bei Raumtemperatur inaktiv, so dass Nested-PCR Master Mixe bei Raumtemperatur angesetzt werden können.

2. Die Entstehung unerwünschter Amplifikate durch falsche Primeranlagerung (misspriming) oder die Primer-Dimer Bildung bei niedrigen Temperaturen während des Reaktionsstartes wurden durch die Anwesenheit von Polymerase-Antikörper-Komplexen, welche nur bei 95°C (Hot Start) zerfallen und das aktive Enzym freisetzen, verhindert.

3. Die „KOD DNS-Polymerase“ (Novagen, Darmstadt) hat unter allen kommerziell verfügbaren DNS Polymerasen die niedrigste Fehlerrate (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Vergleich der „KOD DNS Polymerase“ mit anderen DNS Polymerasen (Novagen, 2002)

	<b>KOD Polymerase</b>	<b>Pfu Polymerasen</b>	<b>Taq Polymerase</b>
Spezies	Thermococcus kodokarensis	Pyrococcus furiosus	Thermus aquaticus
Lesekorrektur (proofreading)	Ja	Ja	Nein
Genauigkeit	$3,5 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	Nicht determiniert
Verlängerungsgeschwindigkeit (Nukleotiden/Sekunde)	106-138	25	61

Die „nested“-PCR wurde in einem Thermocycler mit integriertem Heizdeckel durchgeführt. Die Master Mix-Zusammensetzung ist in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13:** Master Mix für die Nested-PCR









































































<b>Volumen</b>	<b>Reagenzien</b>
30 µl	„PCR grade“ Wasser
5 µl	10 x PCR-Puffer für KOD Hot Start DNS Polymerase
5 µl	dNTPs (Endkonzentration 0,2 mM)
2 µl	MgSO <sub>4</sub> (Endkonzentration 0,2 mM)
3 µl	β-Galaktosidase-spezifische Primer sense (Endkonzentration 0,3 µM)
3 µl	β-Galaktosidase-spezifische Primer antisense (Endkonzentration 0,3 µM)
	ds cDNS (100 ng/Ansatz)
1 µl	KOD Hot Start DNS Polymerase (5U/µl)
q.s. ad 50 µl	„PCR grade“ Wasser

q.s. ad = so viel wie nötig (lat.: quantum satis ad)

Die richtigen Anlagerungstemperaturen für jedes verwendete Primerpaar wurden von den RT-PCR-Vorversuchen übernommen oder mit der Gradienten-Option des Thermocyclers ermittelt.

Die Gradienten-Option des Multicyclers PTC 200 ( Biozym, Oldendorf) ermöglichte es in einem Experiment, 12 unterschiedliche Anlagerungstemperaturen innerhalb eines Temperaturintervalls von maximal 20°C gleichzeitig zu testen (siehe Abbildung 6 beispielhaft für das Primerpaar 6).

**Abbildung 6:** Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur für Primerpaar 6 mit der Gradienten-Option des Multicyclers PTC 200 (Biozym, Oldendorf)

61°C	61,3°C	61,9°C	62,9°C	64,1	65,7°C	67,6°C	69,1°C	70,4°C	71,1°C	71,8°C	72°C
											
											
											
											
											
											

○ - Stellen auf dem Heizblock, dieselbe Farbe deutet auf die gleiche Temperatur hin.

Die Polymerasenkettenreaktion wurde mit unterschiedlichen Temperaturen in verschiedenen Abschnitten durchgeführt. Der erste Schritt bestand aus einer Aktivierung der KOD-Polymerase bei 94°C für 2 Minuten. Es folgte die vollständige Denaturierung der dscDNS bei 94°C für 15 Sekunden. Die DNS-Synthese erfolgte in 40 Zyklen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Anlagerungstemperatur wurde anhand der verwendeten Primer ausgewählt und auf 30 Sekunden eingestellt. Die Dauer der Verlängerung richtete sich nach der Länge des Amplifikates bei vorausgesetzter Syntheseleistung von 1 kbp/Minute bei 68°C und betrug 60-120 Sekunden. Die entstandenen Amplifikate wurden zu Beginn jedes Zyklus jeweils bei 94°C erneut denaturiert, um als Matrize (template) zu dienen.

Weil die KOD-Polymerase eine exonukleastische Aktivität hat, wurde gemäß des Herstellerprotokolls auf die Endverlängerung verzichtet und die Proben nach der Amplifikation auf 4°C gekühlt sowie danach bei -20°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

### **3.9.2.1. Ergebniskontrolle**

Die Amplifikationskontrolle erfolgte nach Auftrennung auf 0,7-1,5% Agarosegelen, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit und die Dichte mit einem geeigneten Marker (Anhang 9.5) kontrolliert wurden.

DNS-Fragmente wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Dabei hängt ihre Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der zu trennenden DNS-Moleküle sowie der jeweiligen Porengröße des Gels ab.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurde ein horizontales Agarosegel benutzt. Eine der gewünschten Konzentration entsprechende Menge der „Ultra Pure Agarose“ (Invitrogen, Karlsruhe) wurde in 100 ml 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA) Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,25 µg/ml) und Abkühlung auf ca. 65°C in eine an den Enden verschlossene Gelkammer gegossen.

12-20 µl PCR-Produkte wurden mit 4µl Ladepuffer (ABgene, Hamburg) gemischt und in die Taschen des Gels gegeben. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 6V/cm bei einer maximalen Stromstärke von 500 mA (Microcomputer Electrophoresis Power Supply, Consort, Belgien) für 30-90 Minuten angelegt. Die Visualisierung der DNS erfolgte durch UV-Transilluminator bei 254 oder 312 nm. Die fotografische Dokumentation wurde mittels eines Polaroid A 667-Tageslichtfilmes (Besier, Wiesbaden), eines BioDoc Analyse Gel Documentation System (Biometra, Göttingen) oder eines Kodak Gel Documentation System Version 1.0 (Eastman Kodak Inc., USA) durchgeführt.

### **3.9.2.2. DNS-Extraktion aus dem Agarosegel**

Die Extraktion der PCR-Produkte aus dem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Das Prinzip des Kits besteht in einer Affinitätsreinigung der DNS über einer Säulenmatrix.

Die PCR-Produkte wurden durch diese Extraktion aufgereinigt. Am Ende der Extraktion wird die aufgereinigte DNS in PCR-Grade-Wasser (Sigma, Taufkirchen) eluiert.

Die Extraktion wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt:

1. Herausschneiden des gewünschten DNS Fragments aus dem Agarosegel.



2. Wiegen der Gelscheibe, welche die DNS enthält, auf einer Präzisionswaage (Mettler GmbH, Gießen); für jeweils 100 mg Agarosegel mussten 300 µl QG-Puffer hinzugefügt werden.
3. Inkubation bei 50°C für 10 Minuten, um das Agarosegel vollständig aufzulösen.
4. Vergleich Mischungsfarbe mit der Farbe des QG-Puffers.  
Falls die Farbe sich verändert hatte wurden 10 µl 3M Natrium Azetat hinzugefügt, um den pH Wert der DNS- Agarose-QG-Puffer-Mischung wieder auf pH 5,0 zu bringen.
5. Bindung der DNS an Silicagelmembran durch Zugabe von 800 µl DNS-Agarose-QG-Puffer-Mischung und Zentrifugation bei 17900 x g für 1 Minute.
6. 500 µl QG-Puffer in die Qiagen-Säule pipettieren und 1 Minute bei 17900 x g zentrifugieren. Durch diesen Waschschrift wurden alle Agarosereste entfernt. Dies ist besonders wichtig, wenn die PCR-Produkte direkt sequenziert werden sollen.
7. DNS waschen durch Zugabe von 750 µl PE-Puffer auf die Säule und Zentrifugation für 1 Minute bei 17900 x g.
8. Durchfluss verwerfen und Zentrifugation für 1 Minute bei 17900 x g zur Trocknung der Silicagelmembran. Durch diesen Schritt werden alle Äthanolreste entfernt.
9. Elution der gebundenen DNS durch Zugabe von 30 µl PCR-Grade-Wasser (Sigma, Taufkirchen) und Zentrifugation bei 17900 x g für 1 Minute.

Die Konzentrationsbestimmung der eluierten DNS erfolgte spektrophotometrisch bei 260 nm im GeneQuant 2 Spektralphotometer (Pharmacia Biociences Europe GmbH, Freiburg) und die DNS-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert.

### **3.9.2.3. dATP „Tailing“ Reaktion der DNS**

Da die Taq-Polymerase während ihrer Amplifikationstätigkeit eine sehr hohe Fehlerrate aufweist, wurde für die PCR-Reaktionen die KOD-Polymerase eingesetzt. Diese Polymerase baut im Gegenteil zur Taq-Polymerase keine Adenin-Reste am 3' Ende eines PCR-Produktes ein, was zur Folge hätte, dass eine Klonierung in einen TOPO TA-Vektor nicht möglich ist. Um diesen Missstand zu umgehen, wurden die amplifizierten PCR-Fragmente in eine „tailing“-Reaktion eingesetzt. Dazu wurden die aufgereinigten PCR-Produkte mit PCR-Puffer, dATP und Taq-Polymerase (Roche, Mannheim) versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 72°C für eine Stunde (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14:** dATP „Tailing“ Master Mix

Volumen	Reagenzien	Endkonzentration
4µl	10 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	1x (10 mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1,5 mM, 50 mM MgCl <sub>2</sub> )
4 µl	dATP (10 mM)	1 mM
1µl	Taq Polymerase (5U/µl)	1,25 U
25 µl	PCR-Produkt	
6 µl	PCR –Grade-Wasser	
Endvolumen 40 µl		

Anschließend wurden auf diese Weise die mit Adenin-Resten versehenen DNS Moleküle direkt in eine TOPO TA Klonierungsreaktion eingesetzt.

### 3.10. Klonierung von PCR-Produkten

#### 3.10.1. Bakterienkultur

Für die Klonierung und Plasmid-Preparationen wurden der *Escherichia coli* Stamm Top 10F'<sup>TM</sup> und Stamm DH5α<sup>TM</sup> Library Efficiency (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), beide leiten sich vom Sicherheits-Stamm K12 ab, verwendet.

##### 1. *E. coli* Top 10F'<sup>TM</sup> Genotyp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

f<sup>+</sup>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74recA1deoRaraD139 Δ(ara-leu)7697 galU galKrspL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

##### 2. DH5α<sup>TM</sup> “Library Efficiency” Genotyp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

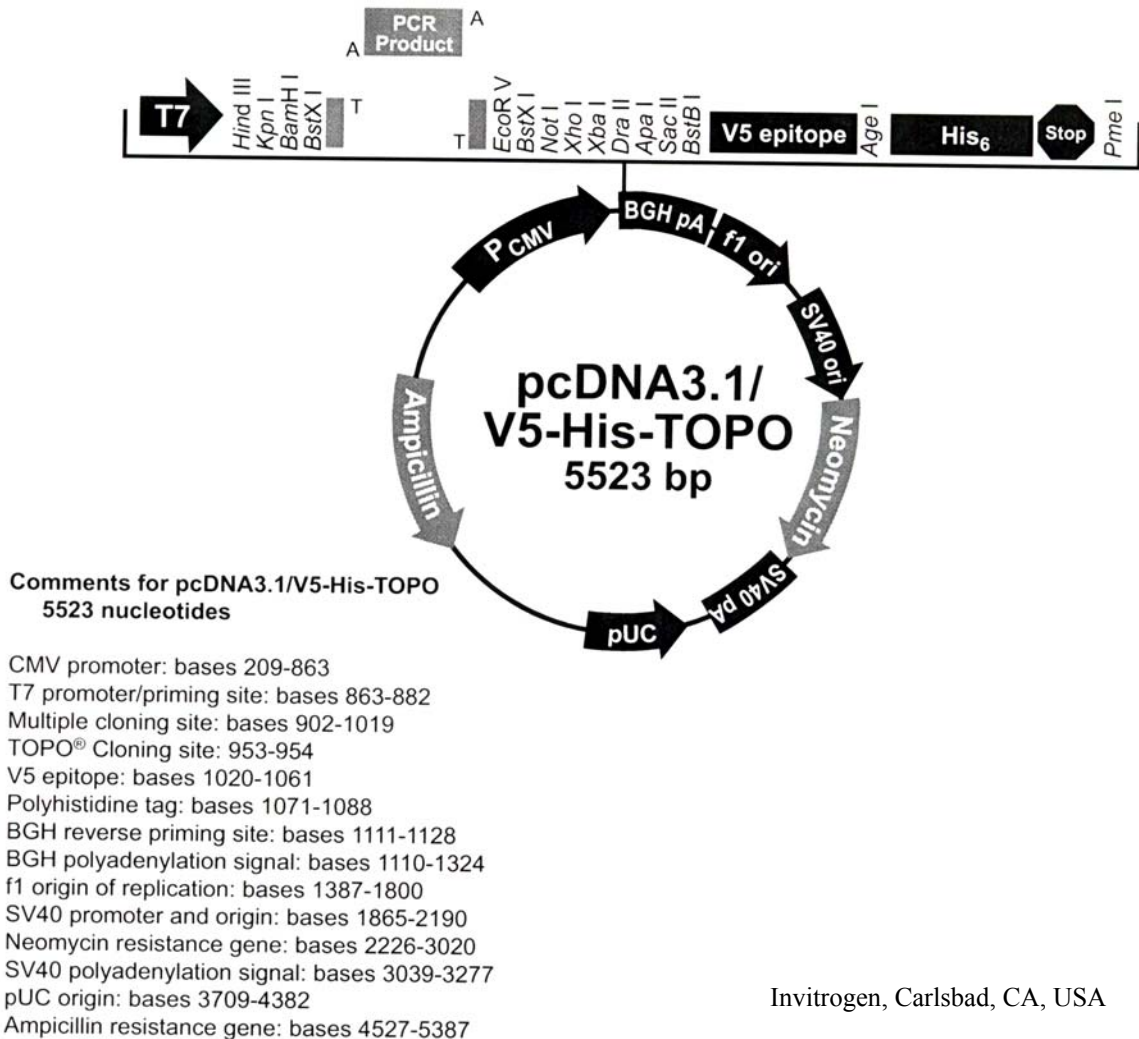
F'endA1 hsdR17(r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub><sup>+</sup>)supE44 thi recA1 gyrA (NaI<sup>r</sup>) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 (Φ80d lacΔ(lacZ)m15)

Die Anzucht von Flüssigkulturen, Herstellung von Agar-Nährböden und die Konservierung von Bakterienkolonien erfolgte nach Angaben des Herstellers bzw. nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 2001). Die Kulturmedien und die Agar-Nährböden wurden mit Ampicillin 100µl/ml (Sigma, Taufkirchen) und als zusätzliche Karbonquelle mit 50 ml/l einer 20%igen D-Glukose Lösung versetzt.

### 3.10.2. Verwendete Plasmide

Das **pcDNA3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup>-Plasmid** (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) wurde für Klonierungsarbeiten eingesetzt (siehe Abbildung 15).

**Abbildung 15:** pcDNA3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad CA, USA)



### 3.10.3. TOPO TA-Klonierung

Da eine direkte Klonierung von PCR-Produkten über Restriktionsnukleasen-Schnittstellen oft nur ineffizient funktioniert, wurde sie in den entsprechenden TOPO TA Vektoren (Kapitel 3.9.2.) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der TOPO TA “cloning kit“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eingesetzt. Das Prinzip dieses Vektorsystems beruht darauf, dass Adenin-Reste an die 3'Enden der Amplifikationsprodukte durch Taq-Polymerase angefügt werden. Die TOPO TA Vektoren besitzen einen überhängenden Thymidin-Rest, so dass eine Ligation zwischen Vektor und Insert unabhängig von den Schnittstellen erfolgen kann. Die Klonierungsreaktion und die anschließende Transformation in Top10 F'-Bakterien (Kapitel 3.9.1.) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

1. Als erstes wurde ein Reaktionsmix verwendet, welches Vektor, PCR-Produkt sowie 5M NaCl-Lösung und bidestilliertes Wasser enthielt (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16:** Reaktionsmix für die Klonierung

Menge	Reagenzien
1-4 µl	PCR-Produkt
1µl	Salzlösung
q.s. ad 5 µl	Steriles Wasser
1µl	TOPO Vektor

2. Reaktionsmix vorsichtig mischen, Inkubation bei Raumtemperatur (22-23°C) für 5 bis 30 Minuten.
3. Abkühlung des Reaktionsmixs auf Eis.
4. Auftauen der verwendeten *E.coli* auf Eis. Hinfügen von 2 µl des vorgekühlten Reaktionsmixes in jedes Gefäß welches, 100 µl *E.coli* Suspension enthält.
5. Inkubation auf Eis für 5 bis 30 Minuten.
6. Hitze-Behandlung der *E. coli* bei 42°C für 30 Sekunden.
7. Abkühlung der Gefäße auf Eis.
8. Zugabe 250 µl SOC-Medium in jedes Gefäß.
9. Aufbewahrung der *E. coli* für eine Stunde bei 37°C in einem Schüttelinkubator.
10. Ausplattieren von 25-200µl *E.coli*-Suspension aus jedem Gefäß Agar-Platten. Um gut distanzierte Kolonien zu bekommen, ist es empfehlenswert, zwei Volumina auf zwei Platten zu verteilen.
11. Inkubation der Agar-Platten bei 37°C über Nacht.

### 3.10.4. Herstellung von Copy –Kolonien und „colony“ –PCR

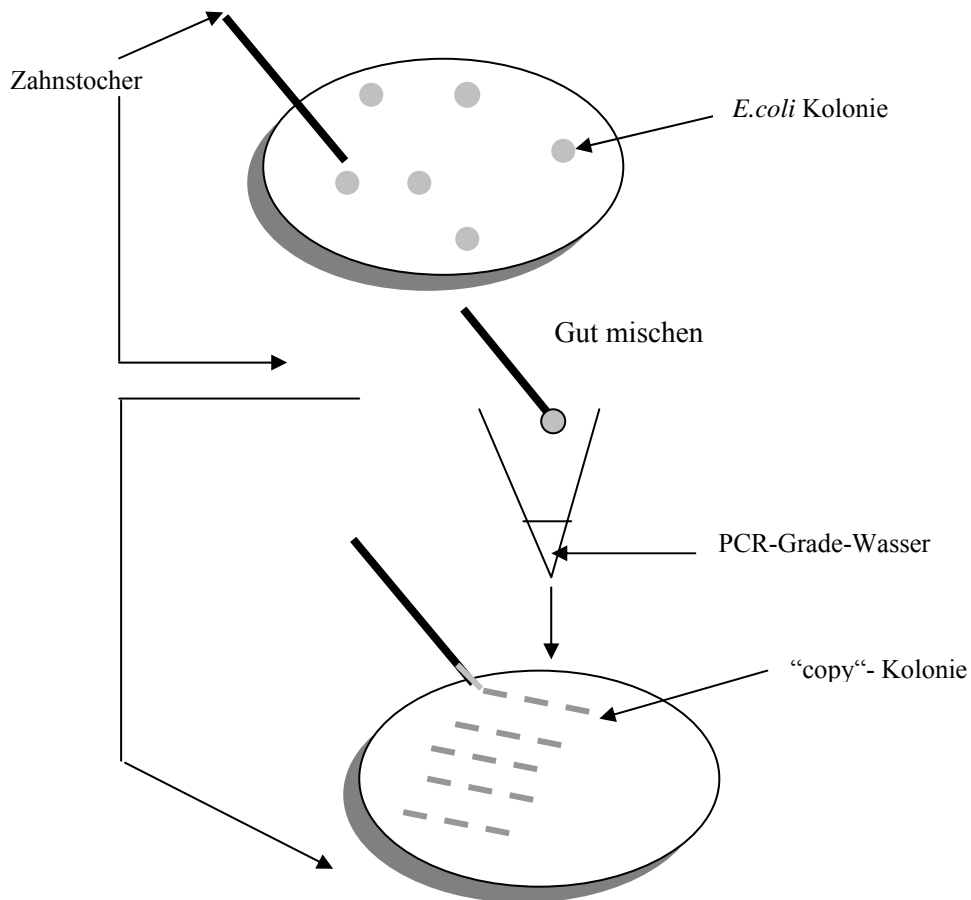
Die Herstellung von Copy-Platten und die anschließende „colony“-PCR ermöglichte die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 60 Kolonien in einem einzigen Experiment, um Kolonien, welche das Insert enthielten, herauszufinden. Hierfür wurden Agar-Platten und Reagenzien für die Durchführung einer konventionellen PCR verwendet.

#### 3.10.4.1. Herstellung von „copy“-Kolonien

Als erstes wurden gut abgegrenzte *E. coli*-Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher „gepickt“, in 10 µl „PCR-Grade“-Wasser (Sigma, Taufkirchen) getränkt und gut gemischt. Anschließend wurden „Kopien“ der jeweiligen entnommenen *E.coli*

Kolonien auf eine frische, 37° C warme Agar-Platte durch Kratzen angelegt (siehe Abbildung 7).

**Abbildung 7:** Herstellung von Copy-Kolonien



### 3.9.4.2. Colony-PCR

Die Polymerasenkettenreaktion erfolgte mit "REDTaq ReadyMix PCR Mix" (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Dieser Mix enthält einen roten Farbstoff, welcher die direkte Beladung von Agarosegelen nach dem Amplifikationsschritt erlaubt.

Als Matrize ("template") für die Amplifikation dienten 10 µl der Wasser – *E. coli* Mischung (Kapitel 3.9.4.1) für jede der zu untersuchenden *E. coli* Kolonien.

Die Zusammensetzung eines "colony"-PCR Master Mixes wird in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17:** “Colony”-PCR Master Mix.

Menge	Reagenzien	Endkonzentration
10 µl	Wasser – <i>E.coli</i> Mischung	
10µl	REDtaq Mix 2x	1x
0,4µl	T7™ sense Primer* 10 µM	0,2 µM
0,4µl	BGH™antisense Primer* 10µM	0,2 µM

\*T7™ sense Primer und BGH™ antisense Primer für den pcDNA3.1®/V5-His TOPO® Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Die Amplifikation wurde in einen Multicycler PTC 200 (Biozym, Oldendorf) durchgeführt.

Der erste Schritt der „colony“- PCR besteht aus einer Inkubation bei 94°C für 5 Minuten, um die Bakterien zu zerstören und die DNS freizusetzen. Die Amplifikation der Zielmoleküle erfolgte in 40 Zyklen bei unterschiedlichen Temperaturen. Die enzymatische Amplifikation begann mit der DNS-Denaturierung bei 94°C für 15 Sekunden. Die Anlagerungstemperatur wurde aufgrund der verwendeten Primer ( $T_m$ ) bei 50°C und 30 Sekunden eingestellt. Die Verlängerung wurde bei 72°C und 2,5 Minuten durchgeführt. Die entstandenen Amplifikate wurden zu Beginn jedes Zyklus jeweils bei 94°C erneut denaturiert, um als Matrize dienen zu können. Am Reaktionsende wurde eine Endverlängerung bei 72°C für 5 Minuten durchgeführt.

Die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte wurde unter Verwendung einer entsprechenden Basenleiter (Anhang 9.5) durch ihre Größe im Agarosegel verifiziert.

### 3.10.5. Anzucht von *E.coli*-Flüssigkulturen und Plasmidpreparationen

Vor der eigentlichen Präparation von Plasmid DNS in größeren Mengen erfolgte eine Vermehrung der positiven *E. coli*-Bakterien. Dazu wurden die “copy“-Kolonien (siehe Kapitel 3.9.4.2.) mit einem sterilen Zahnstocher aus der Agaroseplatte „gepickt“ und in Glasflaschen mit 50 ml LB-Medium (Kapitel 3.9.1.) überimpft. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 37°C und 200 rpm bebrütet.

Die Plasmid-Isolierung erfolgte durch alkalische Lyse (Sambrook et al., 2001) oder mit dem „NucleoBond® PC100 Plasmid DNA Purification“ Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Angaben des Herstellers.

#### 3.10.5.1. Plasmidpreparationen durch alkalische Lyse (Sambrook et al., 2001)

1. Abzentrifugation der Bakterien für 20 Minuten bei 6000 x g und 4°C.

2. Absaugen des Überstandes, Resuspension des Pellets in 5ml Lösung I (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) und anschließende Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur .
3. Bakterienlyse durch die Zugabe von 5 ml Lösung II ( 200 mM Natronlauge, 1 % SDS w/v) und einer 2-5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur.
4. Fällung von an Bakterienresten gebundener genomischer DNS durch Zugabe von Lösung III (3,0 M Kaliumazetat) und 5 Minuten Inkubation auf Eis. Die Plasmid-DNS verblieb im Überstand.
5. Filtration des Überstands zur Trennung von Bakterientrümmern.
6. Fällung der Plasmid-DNS durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol (0,7 Volumen) und Zentrifugation bei 15000 x g für 30 Minuten.
7. Plasmid-DNS Waschen in 70 %igem Äthanol und 10 Minuten Zentrifugation bei 15000 x g, Überstandentfernung und Trocknung des Pellets bei Raumtemperatur. Lösung der Plasmid-DNS in 100 µl PCR Grade Wasser.

Die Mengen der so isolierten DNS wurde photometrisch bestimmt und die Plasmid DNS und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### **3.10.5.2 Plasmidpreparationen mit dem NucleoBond® PC100 Kit**

Das Prinzip des “NucleoBond® PC100 Plasmid DNA Purification” Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) beruht auf einer Affinitätsreinigung der Plasmid DNS über einer Säulenmatrix. Die gebundene DNS wird bei pH 8,5 aus der Säulenmatrix eluiert und anschließend im alkoholischen Milieu gefällt.

1. Abzentrifugieren von Bakterien bei 6000 x g und 4°C für 15 Minuten und anschließende Überstandentfernung.
2. Resuspension von *E. coli* in 4 ml Puffer S1+ RNase A. Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
3. Die Bakterienlyse durch Zugabe von 4 ml Puffer S2 und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten.
4. Fällung von von Bakterienresten sowie an Zellwänden gebundener genomischer DNS durch Zugabe von Puffer S3 und eine Inkubation für 5 Minuten auf Eis.
5. Filtration zur Trennung von Plasmid-DNS, Zellresten und genomische DNS. In der Zwischenzeit wurden die Säulen mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibriert.
7. Überführung der Plasmid-DNS-Lösung in den voräquilibrierten Säulen.
8. Zugabe von 10 ml Puffer N3 in den Säulen zum Waschen der an Membran gebundenen Plasmid-DNS.

9. Elution von Plasmid-DNS mit 5 ml Puffer N5.
10. Plasmid-DNS-Fällung durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und anschließende Zentrifugation bei 15000 x g für 30 Minuten.
11. Überstand verwerfen, das Pellet mit 750 µl 70%igem Äthanol waschen und danach 10 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert.
12. Trocknung des Pellets.
13. Plasmid-DNS in 100 µl "PCR-Grade"-Wasser lösen.

Es folgte die photometrische Konzentrationsbestimmung bei  $\lambda=260$  nm und 280 nm und die Aufbewahrung der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.11. Sequenzierung und Auswertung der Ergebnisse**

Die Sequenzierung nach der "Chain-Termination" Methode (Sanger und Coulson, 1979), erfolgte teils im Plasmid, teils direkt an den PCR-Produkten mit Hilfe plasmid- und sequenzspezifischer Primer, wobei jeweils vom 5' und vom 3' her sequenziert wurde, um die Spezifität der Primerpaaren zu testen und um die der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose zu Grunde liegenden genetischen Defekte zu identifizieren.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden von MWG-Biotech GmbH Eberswald, Seqlab GmbH, Göttingen und im Institut für medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig Universität Giessen durchgeführt.

Die Computerauswertung der Sequenzierungsergebnisse und der Elektropherogramme erfolgte mit Chromas 1.4, TraceViewer und dem BLASTSearch Programm (NCBI, USA). Die Nukleotidsequenzen wurden in der NCBI-Gendatenbank unter den folgenden "accession numbers" hinterlegt (Anhang 9.4).

Zur Bestimmung der Exone 14, 15, 16 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens wurden die genomische Sequenzen der humanen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Exons 14, 15 und 16 (The Wellcome Trust, Sanger Institute, UK Ensembl Transcript ID ENST00000307363) mit „Shotgun“ DNS-Sequenzen, welche im Rahmen des kaninen Genom-Projektes sequenziert wurden, verglichen. Dadurch wurden Nukleotidsequenzen identifiziert, welche Teile des oben genannten kaninen Exons enthalten. Diese wurden mit der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-cDNS (GenBank Accession No. AF056084 und Wang et al., 2000) verglichen und mit dem ClustalW Programm (European Bioinformatics Institute – EBI, UK) wurden Konsensus-Sequenzen für alle drei Exons gebildet.

Um die Auswirkungen der genetischen Defekte auf der Protein-Ebene festzustellen, wurden die Sequenzen, welche genetische Modifikationen enthielten, „in silico“ translatiert mit dem „Expasy Translate Tool“ (Expert Protein Analysis System - Swiss



Institute of Bioinformatics, Schweiz) und Aminosäuresequenzen mit PredProt-Programm (Columbia University, USA) und PhosphoBase v.2.0 Programm (Technical University of Denmark) zur Ermittlung von Glykosilierung-Myristoylierung- und Phosphorylierungsstellen analysiert.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. RNS-Isolierung

#### 4.1.1. DNase-Behandlung

Da intronüberspannende Primer für die kanine saure  $\beta$ -Galaktosidase aufgrund fehlender DNS-Sequenzen nicht ausgesucht werden konnten, war eine DNase-Behandlung nach der RNS-Isolierung notwendig, um DNS-Kontaminationen auszuschließen. Der Unterschied zwischen der RNS-Menge vor und nach der DNase-Behandlung ist deutlich zu erkennen (siehe Tabelle 18) und, insbesondere bei unterregulierten Genen, können Probleme mit der Wiederholbarkeit der RT-PCR- oder SMART/RACE-PCR-Ergebnissen auftreten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde RNS aus mehreren Zellpassagen isoliert und mit DNase I verdaut, wobei nur die besten RNS-Erträge in weitere enzymatische Reaktionen eingesetzt wurden.

**Tabelle 18:** Beispiele für die Konzentrationsveränderungen der totalen RNS vor und nach der DNase Behandlung

Probe	Zellkultur- gefäß (cm <sup>2</sup> )	RNS-Konzentration vor der DNase-Behandlung	RNS-Konzentration nach der DNase-Behandlung
DH82 P*61	25	639 ng/ $\mu$ l	550 ng/ $\mu$ l
<b>DH82 P64</b>	<b>75</b>	<b>1408,4 ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>1235,8 ng/<math>\mu</math>l</b>
<b>Hias**P4</b>	<b>25</b>	<b>874,6 ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>288 ng/<math>\mu</math>l</b>
Hias P7	25	796 ng/ $\mu$ l	47 ng/ $\mu$ l
Hias P10	25	591 ng/ $\mu$ l	130 ng/ $\mu$ l
Hias P11	25	414 ng/ $\mu$ l	139 ng/ $\mu$ l
<b>Cocco***P3</b>	<b>75</b>	<b>1028,3 ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>225,3 ng/<math>\mu</math>l</b>
<b>K1**** (Dackel)</b>	<b>25</b>	<b>205 ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>129ng/<math>\mu</math>l</b>
<b>K2***** (A.Terrier) P1</b>	<b>75</b>	<b>2916 ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>994,2 ng/<math>\mu</math>l</b>

P\*-Passage; Hias\*\*-Al. Husky GM<sub>1</sub>-homozygot kranker Alaskan Husky (Hias); Cocco\*\*\*-heterozygoter Anlageträger (Cocco); K1\*\*\*\*- gesundes Kontrolltier (K1 Dackel) K2\*\*\*\*\*-gesundes Kontrolltier (K2 A. Terrier)

**Fett gedruckt**– in SMART/RACE-PCR eingesetzte RNS-Proben

## 4.2. SMART™ RACE-Technologie

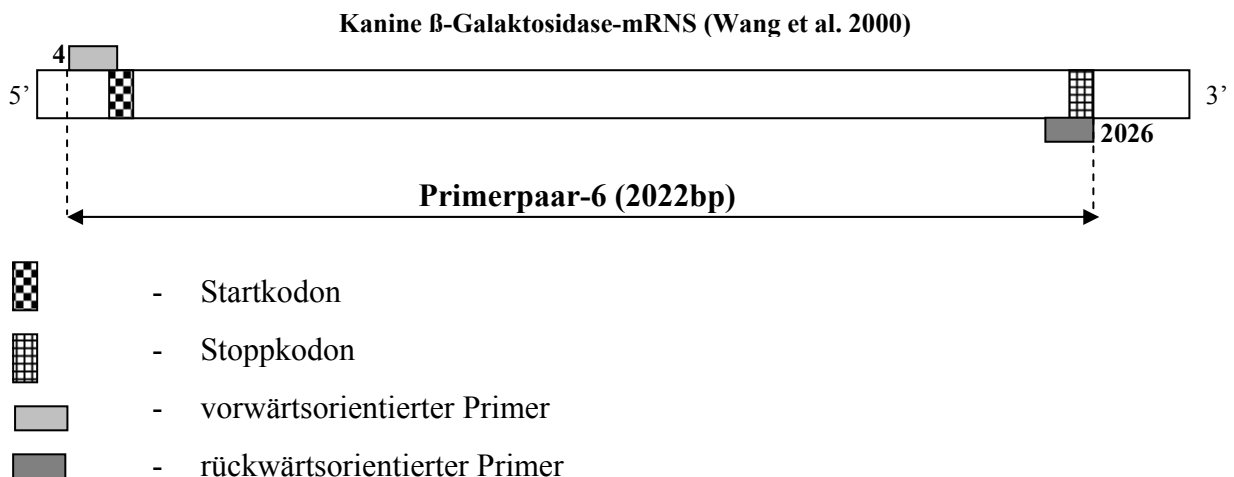
### 4.2.1. Herstellung von cDNS mittels „SMART™ RACE Amplification Kit“

Als Ausgangsmaterial dienten 100 ng Gesamt-RNS von gesunden, homozygot kranken und heterozygoten Anlageträgern/Ansatz. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Sequenz wurden die Superscript II und der Advantage™-GC Kit verwendet, um eine höhere Effizienz der Einzel- und Doppelstrangsynthese zu erreichen. Die anschließende chromatographische dscDNS-Aufreinigung erlaubte den vollständigen Pufferaustausch gegen 30  $\mu$ l „PCR-Grade“-Wasser und die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen dscDNS.

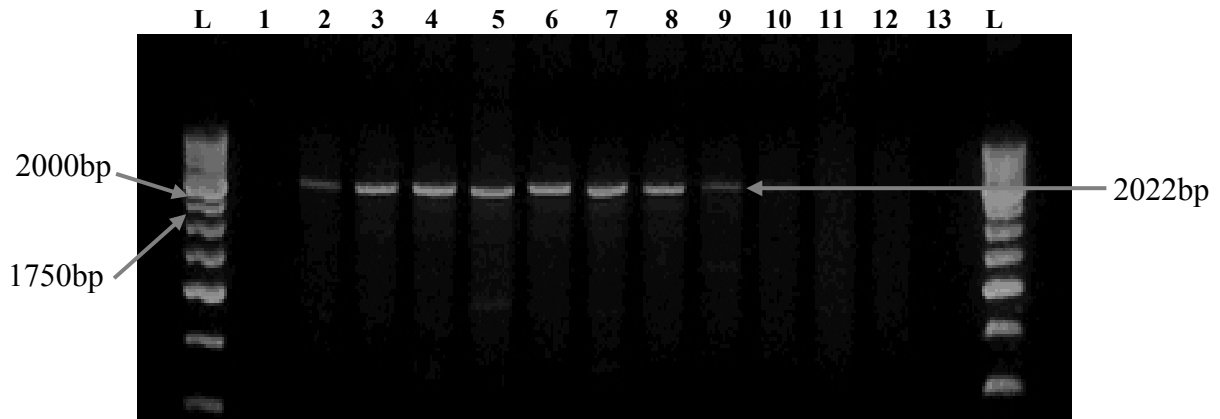
### 4.2.2. „Nested“-PCR mit saure $\beta$ -Galaktosidase-spezifischen Primern

Hierzu wurden 100 ng Probe dscDNS/Ansatz und das Primerpaar-6, welches den ganzen kodierenden Bereich des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens amplifiziert, in eine „nested“-PCR eingesetzt. Zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer wurden 12 verschiedene Temperaturen (von 61°C bis 72°C) mit der „Gradienten Option“ des „Multicyclers PTC 200“ gleichzeitig getestet. In diesem Optimierungsversuch wurden, neben den oben genannten Primern, 100 ng dscDNS von DH82-Zellen, einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und den homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) in jedem Reaktionsansatz eingesetzt (siehe Abbildung 8 A-D).

**Abbildung 8 A-D:** Optimale Anlagerungstemperatur für das Primerpaar-6 und dscDNS von DH82-Zellen, gesundem Kontrolltier (K2 A. Terrier) und homozygot krankem Alaskan Husky (Hias)



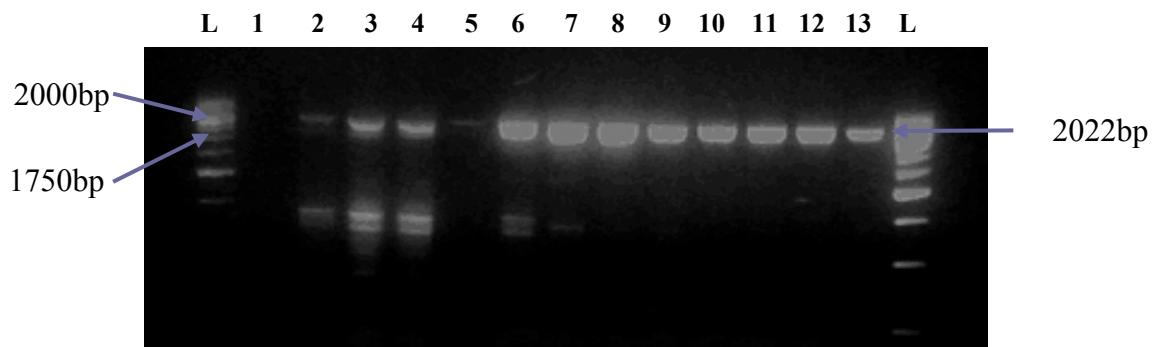
**8 A. Gradient von 61°C-72°C, mit dscDNS von DH82 –Zellen, zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur**



Spur	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Temperatur (°C)	61	61,3	61,9	62,9	64,1	65,7	67,6	69,1	70,4	71,1	71,8	72

- L** - 250bp XVI DNA Ladder;
- 1** - negative Kontrolle, ddH<sub>2</sub>O (T<sub>m</sub>=65,7°C)
- 2-13** - dscDNS von DH82-Zellen

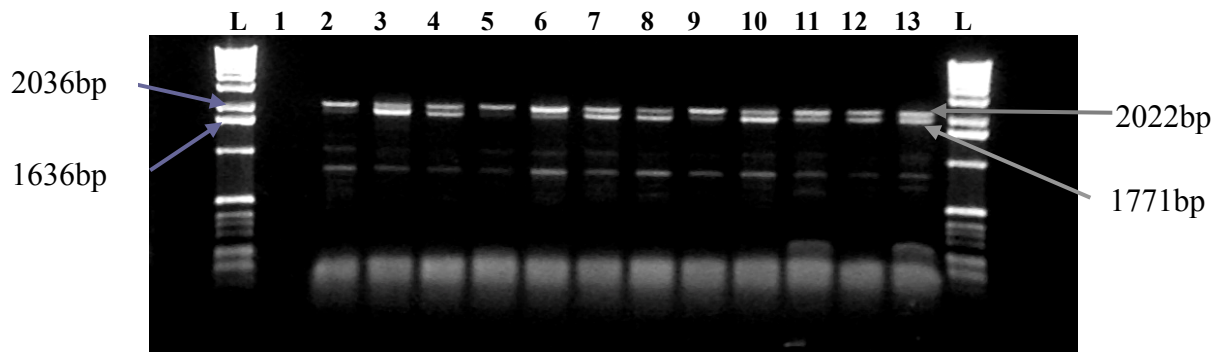
**8 B. Gradient von 61°C-72°C, mit dscDNS von gesundem Kontrolltier (K2 A. Terrier), zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur**



Spur	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Temperatur (°C)	61	61,3	61,9	62,9	64,1	65,7	67,6	69,1	70,4	71,1	71,8	72

- L** - 250bp XVI DNA Ladder
- 1** - negative Kontrolle, ddH<sub>2</sub>O (T<sub>m</sub>=65,7°C)
- 2-13** - dscDNS vom gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier)

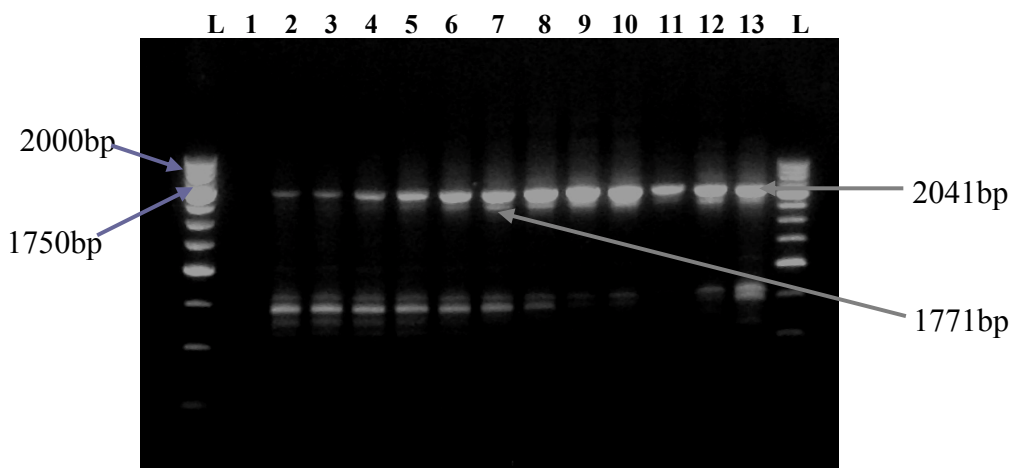
**8 C. Gradient von 61°C-72°C, mit dscDNS von heterozygotem Anlageträger (Cocco), zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur**



Spur	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Temperatur (°C)	61	61,3	61,9	62,9	64,1	65,7	67,6	69,1	70,4	71,1	71,8	72

- L - Ready Load™ 1kb DNA Ladder
- 1 - negative Kontrolle, ddH<sub>2</sub>O (T<sub>m</sub>=65,7°C)
- 2-13 - dscDNS vom heterozygoten Anlageträger (Cocco)

**8. D. Gradient von 61°C-72°, mit dscDNS von homozygotem kranken Alaskan Husky (Hias), zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur**



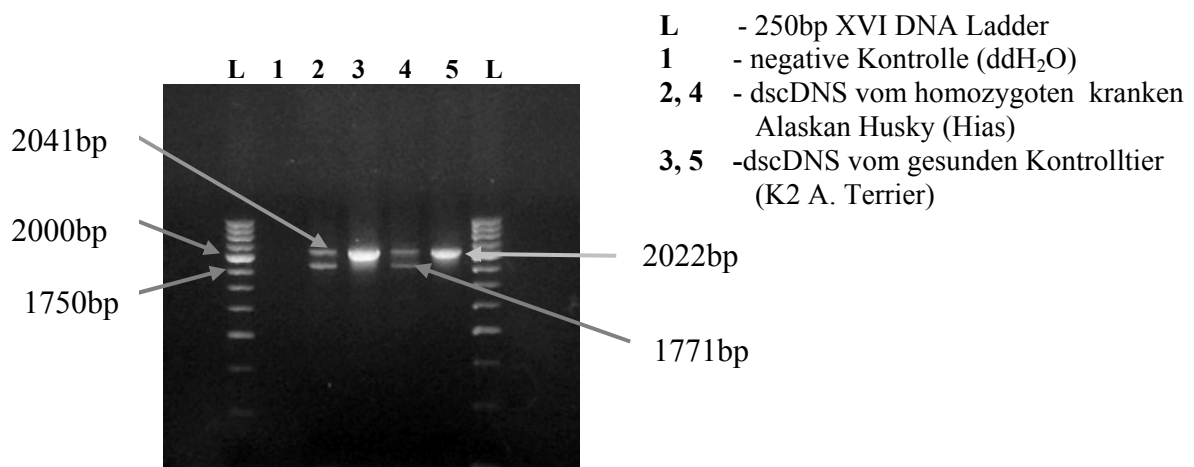
Spur	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Temperatur (°C)	61	61,3	61,9	62,9	64,1	65,7	67,6	69,1	70,4	71,1	71,8	72

- L - 250bp XVI DNA Ladder
- 1 - negative Kontrolle, ddH<sub>2</sub>O (T<sub>m</sub>=65,7°C)
- 2-13 - dscDNS von homozygotem krankem Alaskan Husky (Hias)

**Fett** - optimale Anlagerungstemperaturen

Zur Durchführung weiterer enzymatischer Reaktionen wurden 2 Anlagerungstemperaturen (65,7°C und 69,1°C) verwendet, um eventuelle Amplifikationsunterschiede rechtzeitig erkennen zu können. Schon während der Durchführung der Optimierungsversuche wurde beobachtet, dass mit dem Primerpaar-6, welches den ganzen kodierenden Bereich des kaninen  $\beta$ -Galaktosidase-Gens amplifiziert, bei heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem an GM<sub>1</sub>-Gangliosidose erkrankten, homozygoten Alaskan Husky (Hias) zwei Banden erschienen: eine in der Größe von 2022bp beim heterozygoten Anlageträger bzw. 2041bp beim homozygoten Hund und eine zweite 251bp bzw. 270bp (1771bp) kürzere Bande. Zur Ergebnisüberprüfung wurden die Versuche mit dscDNS des gesunden Kontrolltieres (K2 A. Terrier) und des homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) mehrmals wiederholt (siehe Abbildung 9).

**Abbildung 9:** Nested -PCR mit dscDNS eines gesunden Kontrolltieres (K2 A. Terrier) und homozygot kranken Alaskan Husky (Hias) mit dem Primerpaar-6 zum Nachweis von kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNS-Populationen.



Nach der PCR-Durchführung ergaben sich die gleichen Ergebnisse, die auch während der Optimierungsversuche festzustellen waren.

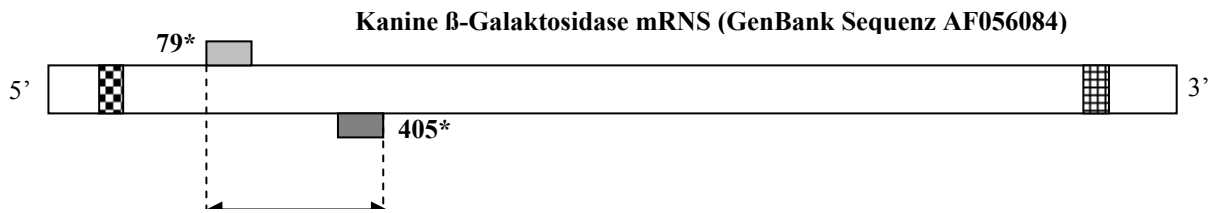
Um die genetischen Veränderungen einzugrenzen, wurden die Banden in der Größe von 2022bp, 2041bp und die 1771bp aus dem Agarosegel getrennt herausgeschnitten und die DNS isoliert (Kapitel 3.9.2.2). Die so gewonnene DNS wurde in eine weitere Nested-PCR mit 4 Primerpaaren (Primerpaar-1, 2, 3 und 4), welche den Bereich zwischen der Positionen 79-1881 der kaninen  $\beta$ -Galaktosidase-mRNS überspannten, eingesetzt.

Nach der Durchführung der „nested“-PCR mit Primerpaaren-1, -2, und -3 wurden bei gesunden Kontrolltieren, DH82-Zellen, einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) nur Banden in der erwarteten

Größe, von 326bp für Primerpaar-1, 434 bp für Primerpaar-2 und 433bp für Primerpaar-3, beobachtet (siehe Abbildung 10 A-C).

**Abbildung 10 A-C:** „Nested“-PCR mit Primerpaar-1, -2 und -3 unter Verwendung des 1771bp, 2022 bp und 2041bp Amplikons von DH82-Zellen, einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), heterozygotem Anlageträger (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) als Matrize

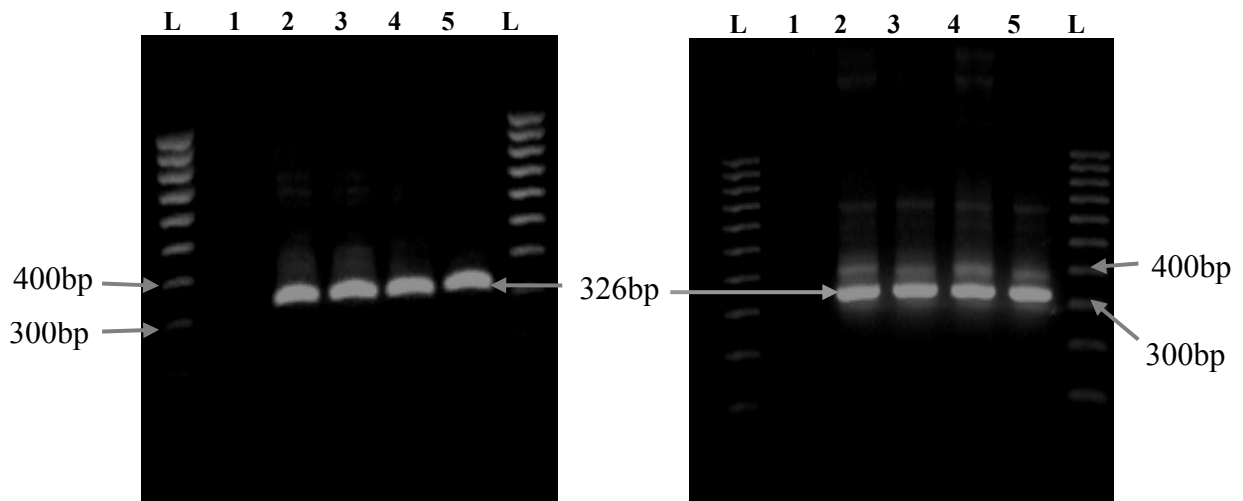
**10 A. „Nested“- PCR mit Primerpaar-1**



**Primerpaar-1 (326bp, Tm=54,5°C)**

- Startkodon
- Stoppkodon
- vorwärtsorientierter Primer (GenBank Sequenz AF056084)
- rückwärtsorientierter Primer (GenBank Sequenz AF056084)

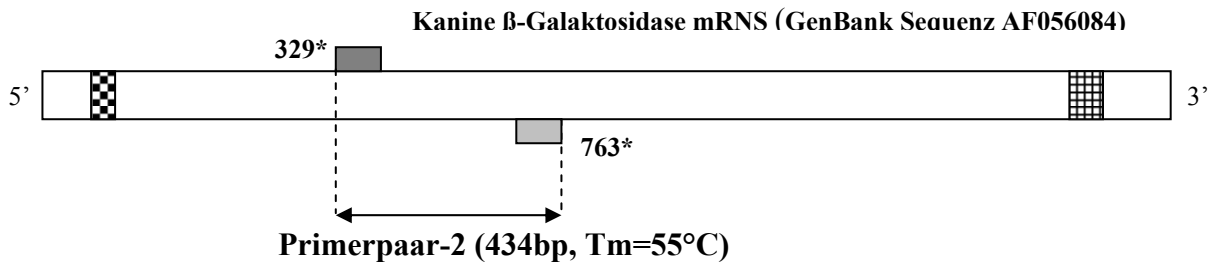
\* - die Primerpositionen wurden nach der GenBank Sequenz AF056084 bestimmt



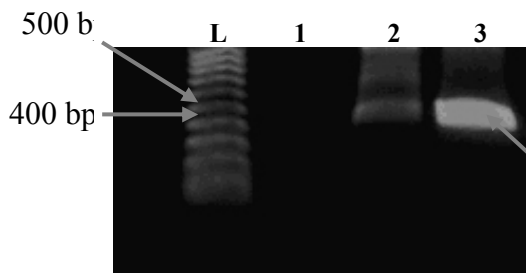
- L** - 100bp Supperladder Low SSL-100
- 1** - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)
- 2, 4** - heterozygoter Anlageträger (Cocco); Matrize: 1771bp Amplikon
- 3, 5** - heterozygoter Anlageträger (Cocco); Matrize: 2022bp Amplikon und 2041bp Amplikon

- L** - 100bp Supperladder Low SSL-100
- 1** - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)
- 2** - DH82-Zelllinie; Matrize: 2022 bp Amplikon
- 3** - gesundes Kontrolltier (K2 A. Terrier)
- 4** - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias); Matrize:1771bp Amplikon
- 5** - homozygoter kranker Alaskan Husky; Matrize: 2041bp Amplikon

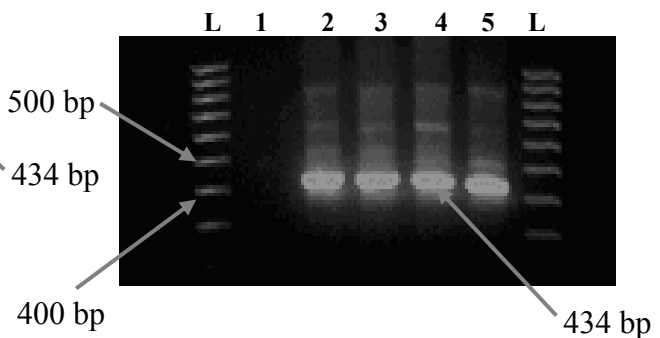
10 B. „Nested“- PCR mit Primerpaar-2



- Startkodon
- Stoppkodon
- Vorwärtsorientierter Primer (GenBank Sequenz AF056084)
- Rückwärtsorientierter Primer (GenBank Sequenz AF056084)
- \* - die Primerpositionen wurden nach der GenBank Sequenz AF056084 bestimmt



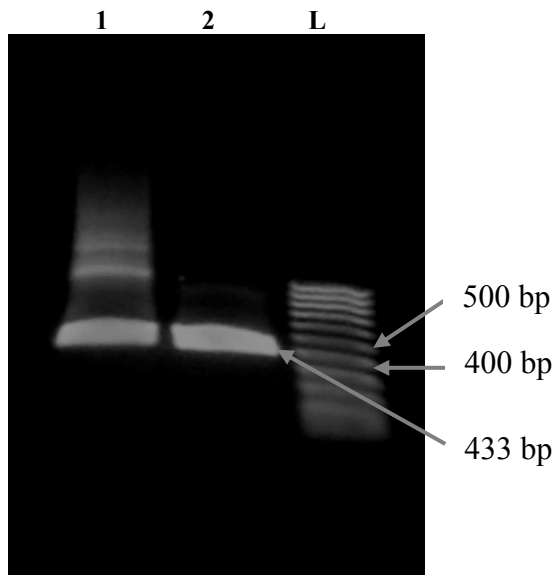
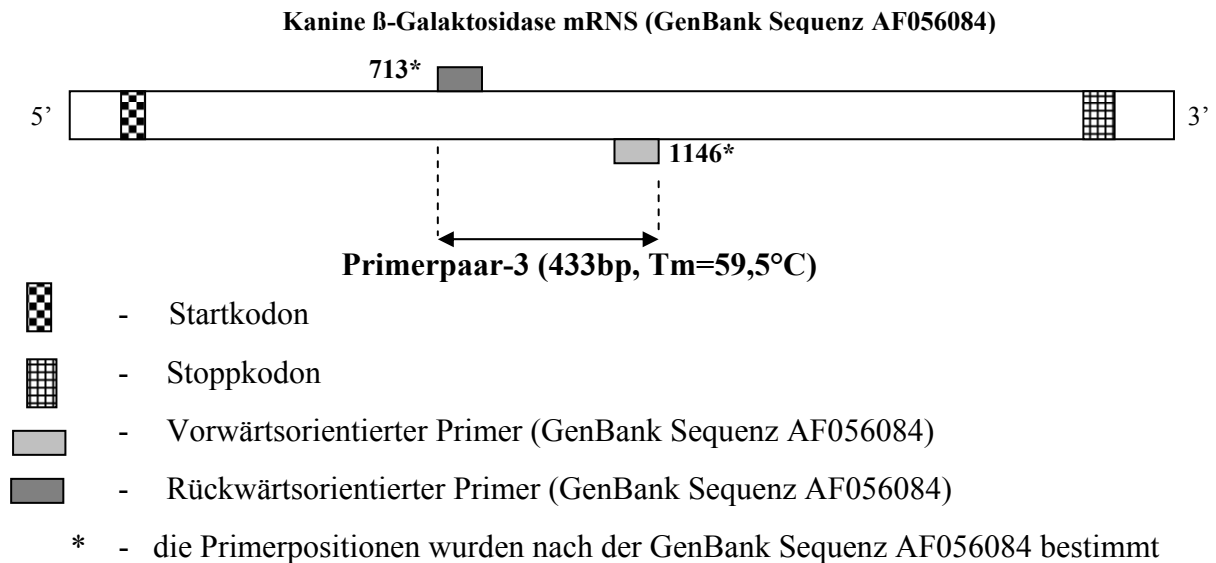
- L** -100bp Supperladder Low SSL-100
- 1** - negative Kontrolle (H<sub>2</sub>O)
- 2** - heterozygoter Anlageträger (Cocco); Matrize: 1771bp Amplikon
- 3** - heterozygoter Anlageträger (Cocco); Matrize: 2022bp und 2041bp Amplikon



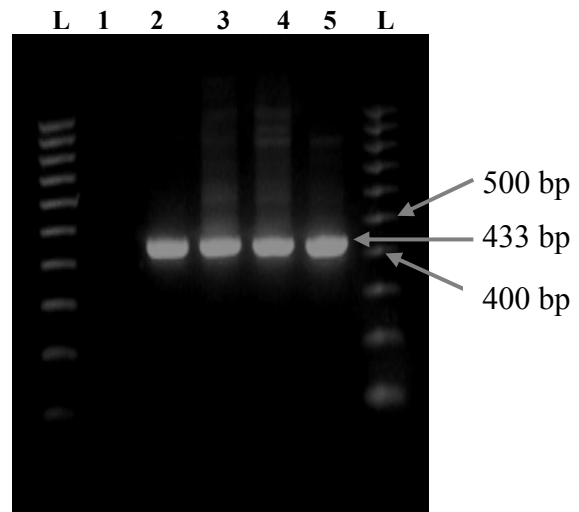
- L** -100bp Supperladder Low SSL-100
- 1** - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)
- 2** - DH82-Zellen
- 3** – gesundes Kontrolltier (K2 A. Terrier)
- 4** - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias); Matrize : 1771bp Amplikon
- 5** -homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias); Matrize: 2041bp Amplikon



10 C. „Nested“- PCR mit Primerpaar-3



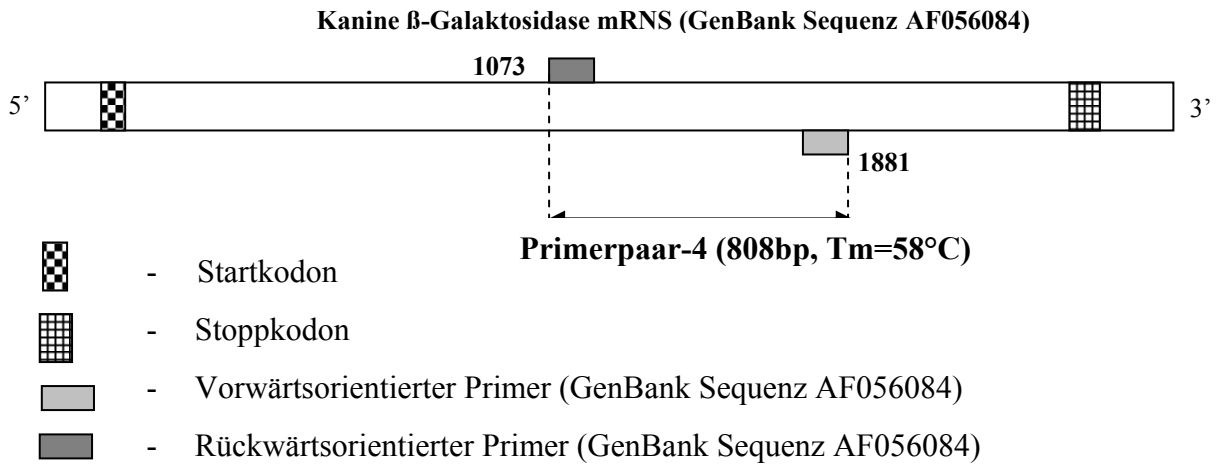
L – 100bp Supperladder Low SSL-100  
 1 – heterozygoter Anlageträger (Cocco)  
 Matrize: 1771bp Amplikon  
 2 - heterozygoter Anlageträger; Matrize:  
 2022bp und 2041bp Amplikon



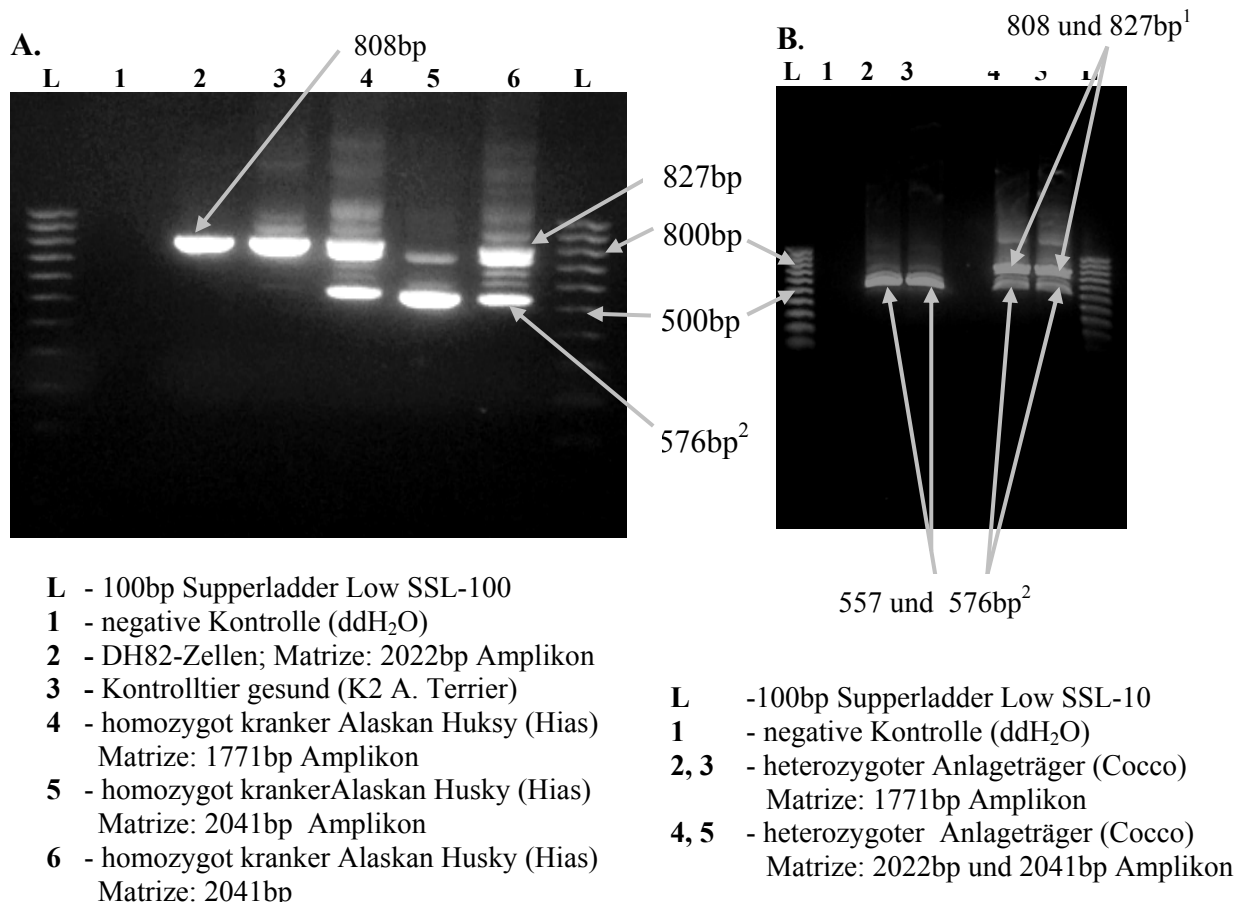
L – 100bp Supperladder Low SSL-100  
 1 – negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)  
 2 – DH82-Zelllinie; Matrize: 2022bp Amplikon  
 3 – Kontrolltier gesund (K2 A. Terrier)  
 Matrize: 2022bp Amplikon  
 4- homozygoter kranker Alaskan Husky  
 (Hias); Matrize: 1771bp Amplikon  
 5- homozygoter kranker Alaskan Husky  
 (Hias); Matrize: 2041bp Amplikon

Die bisher verwendeten 3 Primerpaare (1, 2, 3) deckten den Bereich zwischen den Positionen 79-1146 der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase cDNS bzw. mRNA ab. Um den 3' Endbereich der sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNS zu untersuchen, wurde das Primerpaar-4, welches den Bereich zwischen den Positionen 1073-1881 amplifiziert, eingesetzt (siehe Abbildung 11).

**Abbildung 11:** „Nested“-PCR mit Primerpaar-4 und 1771bp, 2022bp und 2041bp lange Amplikons von DH82-Zellen, einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), eines heterozygoten Anlageträger (Cocco), und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) als Matrize



\* - die Primerpositionen wurden nach der GenBank Sequenz AF056084 bestimmt



<sup>1</sup>- 557bp + 19bp Duplikation = 576bp

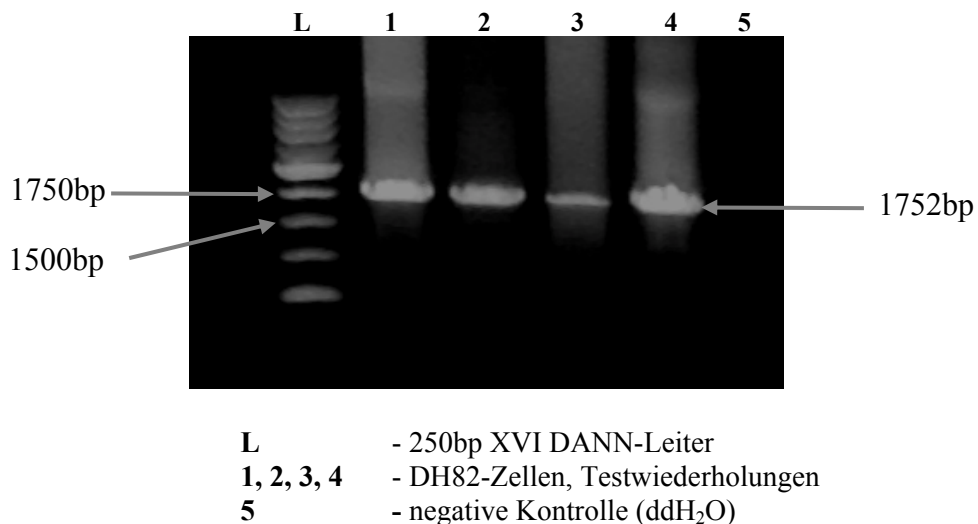
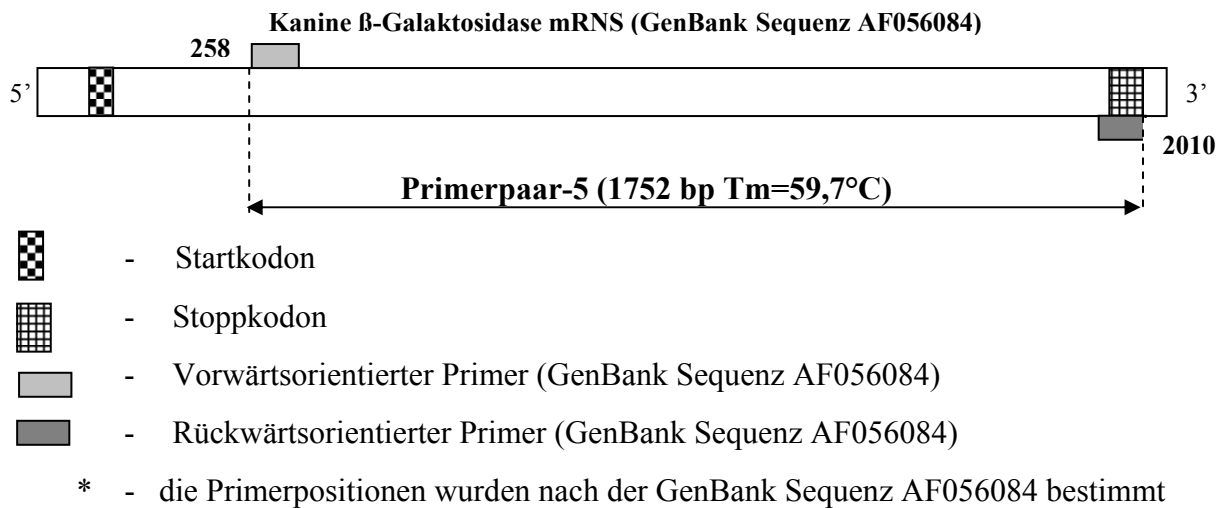
<sup>2</sup>- 808bp + 19bp Duplikation = 827bp

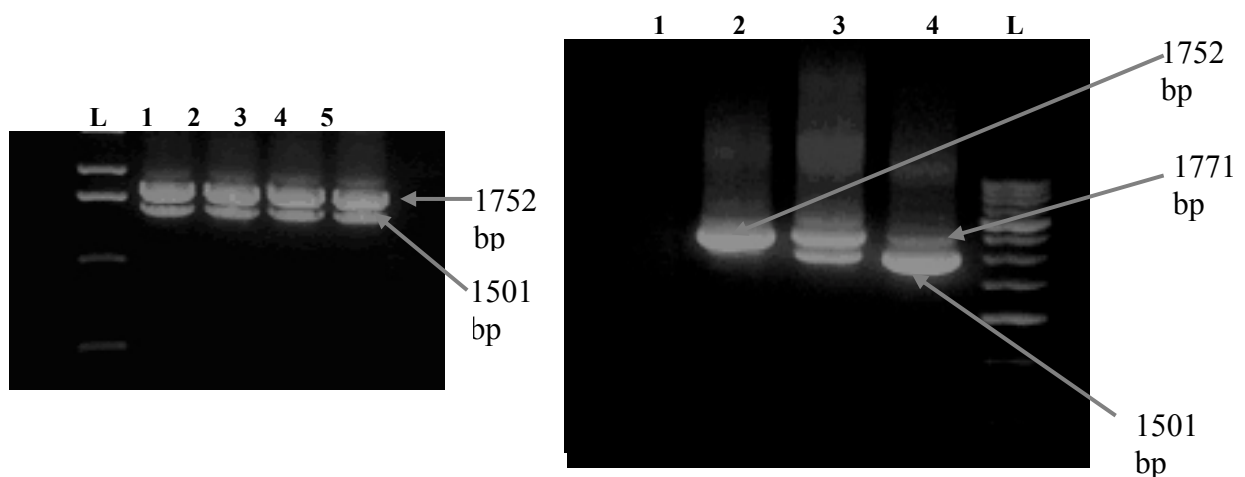
Nach Durchführung der „nested“-PCR mit dem Primerpaar-4 und verschiedenen Matrizen (1771bp und 2022bp bzw. 2041bp Amplikons) von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), DH82-Zellen, einem heterozygoten Anlageträger (Cocco)

und einem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) wurden 2 Banden beim heterozygoten Anlageträger (557bp-576bp und eine im Bereich von 808bp-827bp) und 2 Banden beim homozygoten kranken Alaskan Husky (576bp und 827bp) beobachtet.

Um die erzielten Ergebnisse zu überprüfen, wurden enzymatische Reaktionen mit dem Primerpaar-5, welches den Bereich zwischen den Positionen 258 – 2010 bei DH82-Zellen, einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) durchgeführt (siehe Abbildung 12).

**Abbildung 12:** „Nested“-PCR mit Primerpaar 5 und dscDNS von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), DH82-Zellen, einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias).





- L - "Ready Load"<sup>TM</sup> 1kb DNA-Leiter  
 1, 2, 3, 4 - heterozygoter Anlageträger (Cocco)  
 5 - Negative Kontrolle

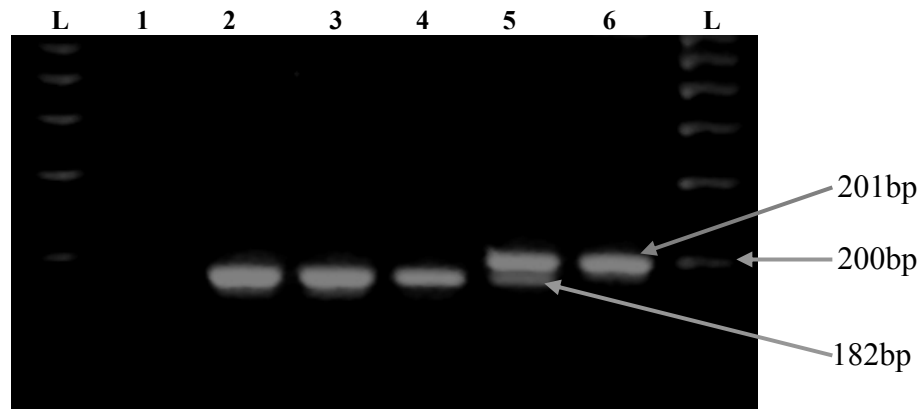
- L - 250bp XVI DANN-Leiter  
 1 - Negative Kontrolle  
 2 - gesundes Kontrolltier (K2 A.Terrier)  
 3 - Homozygot kranker Alaskan Husky (Hias)  
 4 - Homozygot kranker Alaskan Husky (Hias)

Mit dem Primerpaar-5 wurden erneut zwei Banden (1501bp und ca.1752bp) beim heterozygoten Anlageträger (Cocco) beobachtet, da in dem verwendeten 1%igen Agarosegel Banden mit einer Länge von 19bp nicht voneinander zu unterscheiden sind. Bei dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) wurden, wie erwartet, 2 Banden mit einem Längenunterschied von 270bp (1501bp und 1771bp) festgestellt. Beim gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier) und den DH82-Zellen erschien nur eine Bande (1752bp) in der errechneten Größe.

Durch die Untersuchungen auf RNS-Ebene mit Proben von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), heterozygoten Anlageträgern (Cocco und Kalli) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) konnte die Existenz zweier mRNS-Populationen des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens festgestellt werden. Diese mRNS-Populationen unterscheiden sich im Bereich des Exon 15 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens voneinander.

Um den ermittelten genetischen Defekt näher charakterisieren zu können, wurde eine „nested“-PCR mit dem ganzen kodierenden Bereich des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens unter Verwendung des Primerpaares-7, welches einen Teil des Exon 15 zwischen den Positionen 1528-1710 amplifiziert, und dscDNA von DH82-Zellen, den gesunden Kontrolltieren (K1 Dackel und K2 A. Terrier), einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) bei einer Anlagerungstemperatur von 68,4°C durchgeführt (siehe Abbildung 13).

**Abbildung 13:** „Nested“-PCR mit dem Primerpaar-7 und dscDNS von DH82-Zellen, gesunden Kontrolltieren (K1 Dackel und K2 A. Terrier), heterozygotem Anlageträger (Cocco) und homozygot krankem Alaskan Husky (Hias)



- L - 100 bp Superladder Low SSL-100
- 1 - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)
- 2 - DH82-Zellen
- 3 - gesundes Kontrolltier (K2 A. Terrier)
- 4 - gesundes Kontrolltier (K1 Dackel)
- 5 - heterozygoter Anlageträger (Cocco)
- 6 - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias)

Bei den DH82-Zellen und den Kontrolltieren (K1 Dackel und K2 A. Terrier) wurde eine Bande in der Größe von 182bp beobachtet, bei dem heterozygoten Anlageträger (Cocco) 2 Banden (182bp bzw. 201bp) und beim homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) eine Bande (201 bp) beobachtet. Die Ergebnisse deuten auf die gleichzeitige Anwesenheit von zwei Typen des Exon 15 hin, möglicherweise hervorgerufen durch die Existenz einer 19bp Duplikation. Die Beobachtung zweier anstatt einer Bande beim heterozygoten Anlageträger (Cocco) steht in Verbindung mit dem verwendeten 3,5%igen Agarosegel, welches die Trennung von Amplikons mit einem Längenunterschied von 19bp ermöglicht, was unter Verwendung eines 1%igen Agarosegels nicht möglich war.

### 4.3. DNS-Isolierung und Amplifikation

#### 4.3.1. Vergleich der verschiedenen DNS-Isolierungsmethoden

##### 4.3.1.1. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Die Modifikationen des Standardprotokolls führte zur Erhöhung der gewonnenen DNS-Menge. Als besonders günstig für die DNS-Fällung erwies sich die genaue Dosierung der 5M NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,2 M im Vergleich zu der Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natrium Azetat, pH 5,2.

#### **4.3.1.2. Die DNS-Isolierung mit Puregene<sup>®</sup> Kit**

Die DNS-Isolierung mit Puregene<sup>®</sup> Kit beruht auf der Lyse der Zellen mittels anionischer Detergenzien, gefolgt von einer Salzfällung der Proteine. Die DNS wird mit Isopropanol gefällt, gewaschen und in sterilem Wasser aufgenommen. Diese Methode ist zeitsparender als die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und eignet sich gut für die DNS-Isolierung aus Zellkulturen und aus Zellhomogenaten und ist auch nicht umweltbelastend.

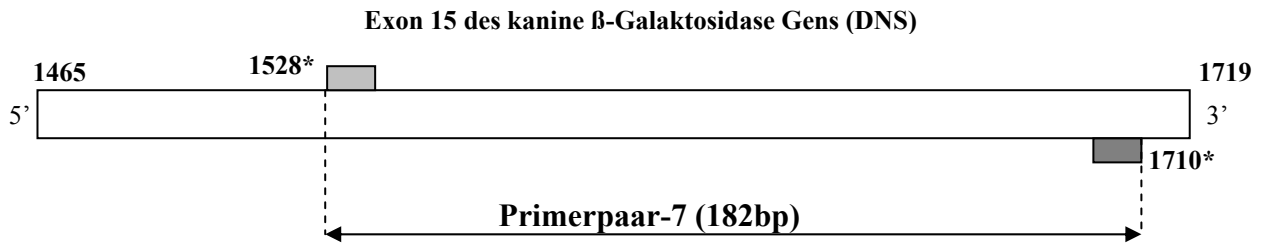
#### **4.3.2. Amplifikation der genomischen DNS**

Diese Methode beruht auf den biochemischen Eigenschaften der Phi29-Polymerase, welche in Anwesenheit der „random Hexamere“ als Primer lineare DNS-Moleküle amplifiziert. Die amplifizierte DNS weist die gleichen elektrophoretischen Eigenschaften auf wie die genomische DNS, welche als Ausgangsmaterial diente. Die amplifizierte DNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert und konnte ohne Aufreinigungen in weiteren enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden.

#### **4.4. Polymerasenketten-Reaktion (PCR) für die Amplifikation der DNS des Exon 15 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase-Gens**

Um die Anwesenheit der beobachteten 19bp Duplikation auf der DNS-Ebene untersuchen zu können, wurden PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar-7 durchgeführt. Die enzymatische Amplifikation erfolgte unter Verwendung der KOD „Hot Start“ DNS-Polymerase, 100ng genomischer DNS/Reaktionsansatz von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier) und dem Primerpaar-7, welches ein 182bp langes Fragment von Exon 15 zwischen den Positionen 1528-1710 amplifiziert. Die Gradienten-Option des Multicyclers PTC 200 ermöglicht die Überprüfung der optimalen Anlagerungstemperaturen für das Primerpaar-7, da aufgrund der Komplexität der genomischen DNS im Vergleich zur RNS Unterschiede zwischen den optimalen Anlagerungstemperaturen, die in einigen seltenen Fällen auftreten können (siehe Abbildung 14).

**Abbildung 14:** Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur für das Primerpaar-7 mittels Gradienten-Option des Multicyclers PTC 200 und DNS von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier)

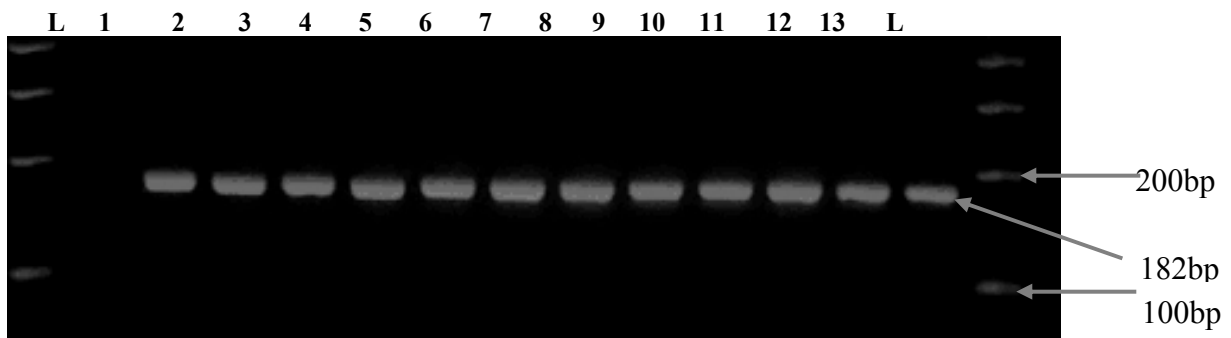


■ - Vorwärtsorientierter Primer (Yamato et al., 2000)

■ - Rückwärtsorientierter Primer (Yamato et al., 2000)

\* - die Primer wurden aufgrund der kaninen Shotgun-Sequenz (GenBank Accession No. gnl|ti|310209422 G630P514888RF1.T0) bestimmt

**Gradient von 55°C bis 72°C**



Spur	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Temperatur (°C)	58	58,4	59	59,1	60,4	61,9	64	66,4	68,4	69,9	71,7	72

**L** - 100 bp Superladder Low SSL-100

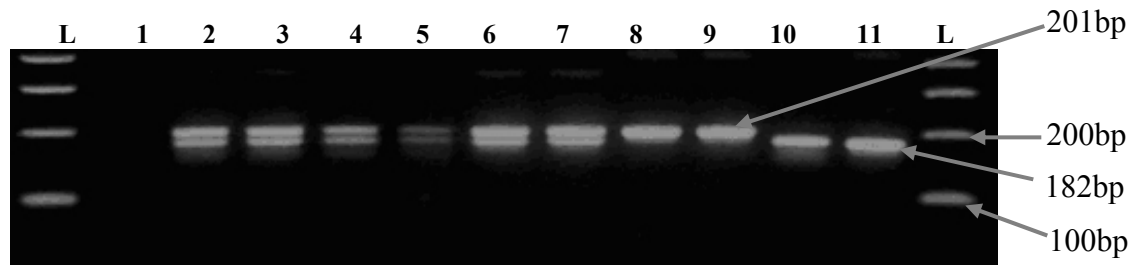
**1** - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)

**2-13** -DNS vom gesundem Kontrolltier (K2 A. Terrier)

**Fett** - die optimalen Anlagerungstemperaturen

Nach Abschluss dieses Versuches wurde für die PCR genomische DNS von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), heterozygoten Anlageträgern Alaskan Huskies (Cocco und Kalli) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur war die gleiche (68,4°C), wie sie für die Amplifikation auf RNS-Ebene verwendet wurde. Die Amplikons mit einer errechneten Größe von 182bp, wurden auf einem 3,5% Agarosegel aufgetrennt (siehe Abbildung 15).

**Abbildung 15:** PCR des Exon 15 mittels Primerpaar-7 und genomischer DNS des kaninensauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), heterozygoten Anlageträgern (Cocco und Kalli) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias)



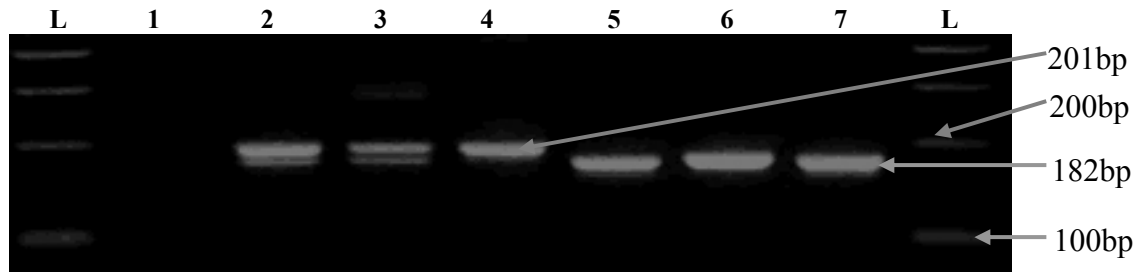
- L** - 100 bp Superladder Low SSL-100
- 1** - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)
- 2, 3, 4, 5** - heterozygoter Anlageträger (Cocco), mehrere Testwiederholungen
- 6, 7** - heterozygoter Anlageträger (Kalli), mehrere Testwiederholungen
- 8, 9** - homozygot kranker Alaskan Husky (Hias), mehrere Testwiederholungen
- 10, 11** - Kontrolltier gesund (K2 A. Terrier), mehrere Testwiederholungen

Bei dem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier) wurde eine Bande in der errechneten Größe (182bp) beobachtet. Dagegen wurden bei den heterozygoten Anlageträgern (Cocco und Kalli) 2 Banden (182bp bzw. 201bp) und beim homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) eine Bande (201bp) festgestellt.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine zweite PCR mit Phi29-DNS des gesunden Kontrolltieres (K2 A. Terrier), der heterozygoten Anlageträgern (Cocco und Kalli) sowie dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) und dem Primerpaar-7 durchgeführt (siehe Abbildung 16).



**Abbildung 16:** PCR für das Exon 15 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens mit Phi29 amplifizierte DNS von DH82-Zellen, gesundem Kontrolltier (K2 A. Terrier), heterozygoten Anlageträgern (Cocco und Kalli), homozygotem kranken Alaskan Husky (Hias) unter Verwendung des Primerpaar-7



- L - 100 bp Superladder Low SSL-100
- 1 - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)
- 2 - heterozygoter Anlageträger (Cocco)
- 3 - heterozygoter Anlageträger (Kalli)
- 4 - homozygot kranker Alaskan Husky (Hias)
- 5,6 - Kontrolltier gesund (K2 A. Terrier)
- 7 - DH82-Zellen

Es wurden die gleichen Ergebnisse erreicht. Bei dem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier) wurde eine Bande in der errechneten Größe (182bp) beobachtet, bei den heterozygoten Anlageträgern (Cocco und Kalli) 2 Banden (182bp bzw. 201bp) und bei dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) eine Bande (201bp) beobachtet.

#### 4.5. Klonierung von PCR-Produkten für Sequenzierung

Alle in den Klonierungsreaktionen eingesetzten PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel extrahiert und in eine dATP „Tailing“-Reaktion eingesetzt (Kapitel 3.9.2.2 und Kapitel 3.10.1). Anschließend wurden die so mit Adenin-Resten versehenen DNS-Moleküle direkt in einer TOPO TA-Klonierungsreaktion verwendet (Kapitel 3.10).

Der Einsatz von DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> „Library Efficiency“ *E. coli* erwies sich gegenüber den im Topo TA<sup>®</sup> Kit<sup>™</sup> mitgelieferten Top10 F' *E. coli* als vorteilhaft, da ein deutlich besserer Plasmid-DNS-Ertrag aus dem gleichen Mediumvolumen mit DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> erzielt wurde.

##### 4.5.1. Klonierung kaniner $\beta$ -Galaktosidase Amplikons

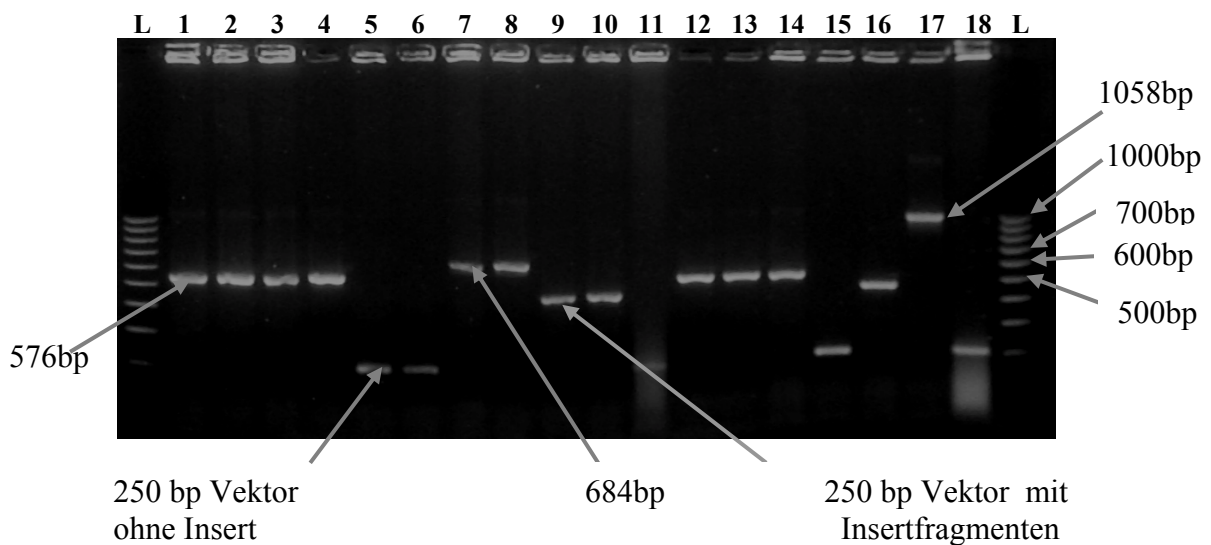
###### 4.5.1.1. Klonierung des von mRNA ausgehenden Amplikons

Für die Transformation der *E. coli* wurden PCR-Produkte von gesunden Kontrolltieren (K1 Dackel und K2 A. Terrier), einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem homozygot kranken Alaskan Husky (Hias) eingesetzt. Die transformierten *E. coli* wurden in „colony“-PCR-Reaktionen auf Inserts überprüft. Dafür wurde das Primerpaar-8 (T<sub>m</sub>=50°C), welches auf dem Vektor bindet und in Abwesenheit eines

Inserts ein 250bp Vektorfragment amplifiziert, verwendet. Dieses Primerpaar diente auch als interne Reaktionskontrolle. Falls ein Insert vorhanden ist, ergibt sich die Größe der erwarteten Bande aus der Summe der PCR-Produkt (Insert) Größe und des 250bp Vektorfragment. Zum Beispiel für ein 326bp Insert (Primerpaar-1) wird eine 576bp Bande (326+250bp) erwartet. Banden die andere Größen aufweisen enthalten entweder keinen Insert, oder Insertbruchteile (siehe Abbildung 17 A-F).

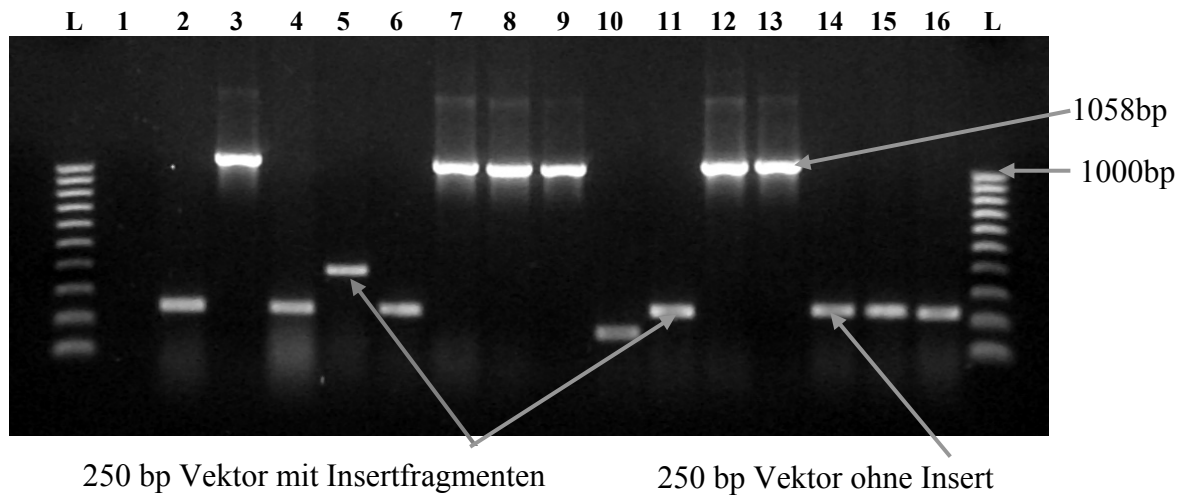
**Abbildung 17 A-F:** „Colony“ PCR mit dem Primerpaar-8 und Insert DNS von gesunden Kontrolltieren (K1 Dackel und K2 A. Terrier), heterozygoten Anlageträger (Cocco) und homozyot krank Alaskan Husky (Hias).

**17 A. Kontrolltier gesund (K1 Dackel) – Inserts hergestellt mit Primerpaar-1, 2, 3, 4**



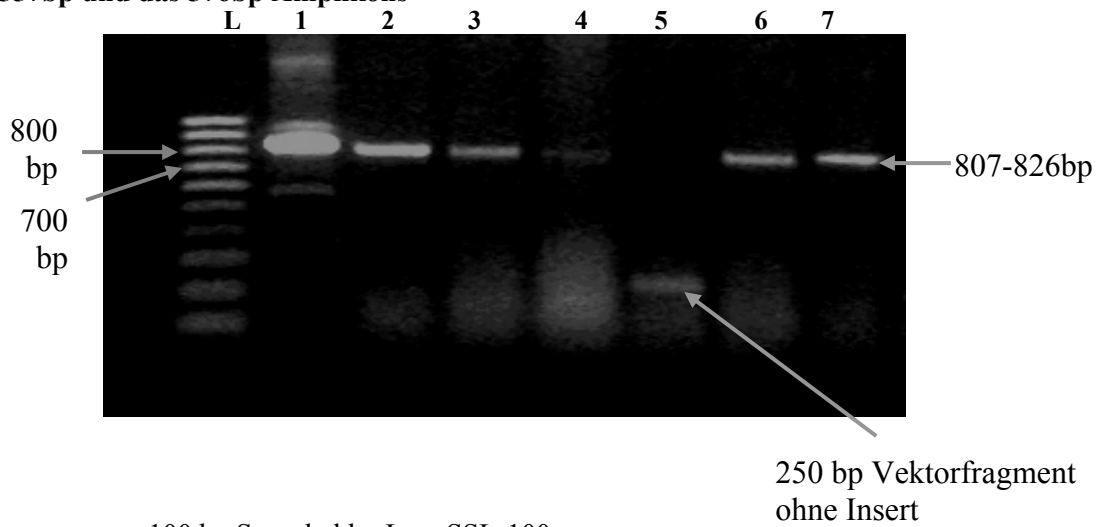
- L** - 100 bp Superladder Low SSL-100
- 1, 2, 3, 4, 12, 13, 15** - Kontrolltier gesund (K1 Dackel), Insert hergestellt mit Primerpaar-1 (326bp Insert + 250bp = 576bp)
- 5, 6, 7, 8** - Kontrolltier gesund (K1 Dackel), Insert hergestellt mit Primerpaar-2 (434bp Insert + 250bp = 654bp)
- 9, 10, 11, 16** - Kontrolltier gesund (K1 Dackel), Insert hergestellt mit Primerpaar-3 (433bp Insert + 250bp = 653bp)
- 17, 18** - Kontrolltier gesund (K1 Dackel), Insert hergestellt mit Primerpaar-4 (808bp Insert + 250bp = 1058bp)

**17 B. Kontrolltier gesund (K2 A. Terrier) – Inserts hergestellt mit Primerpaar-4**



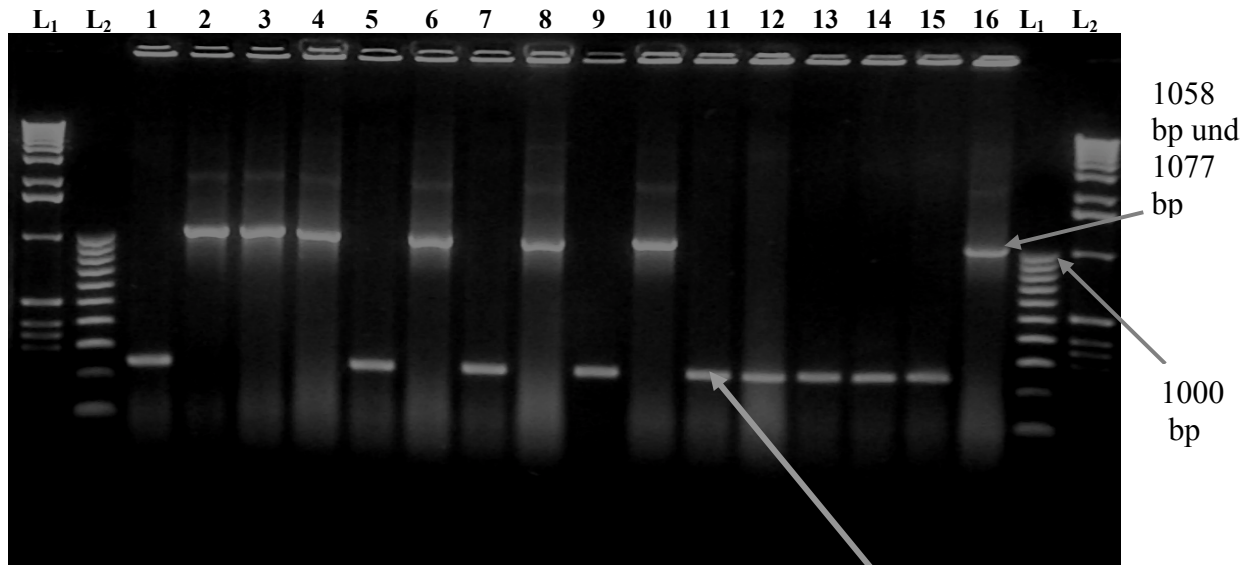
- L** - 100 bp Superladder Low SSL-100
- 1 bis 16** - Kontrolltier gesund (K2 A. Terrier), Insert hergestellt mit Primerpaar-4 (808bp Insert + 250bp=1058bp)

**17 C. Heterozygoter Anlageträger Alaskan Husky (Cocco), Insert hergestellt mit Primerpaar-4, die 557bp und das 576bp Amplikons**



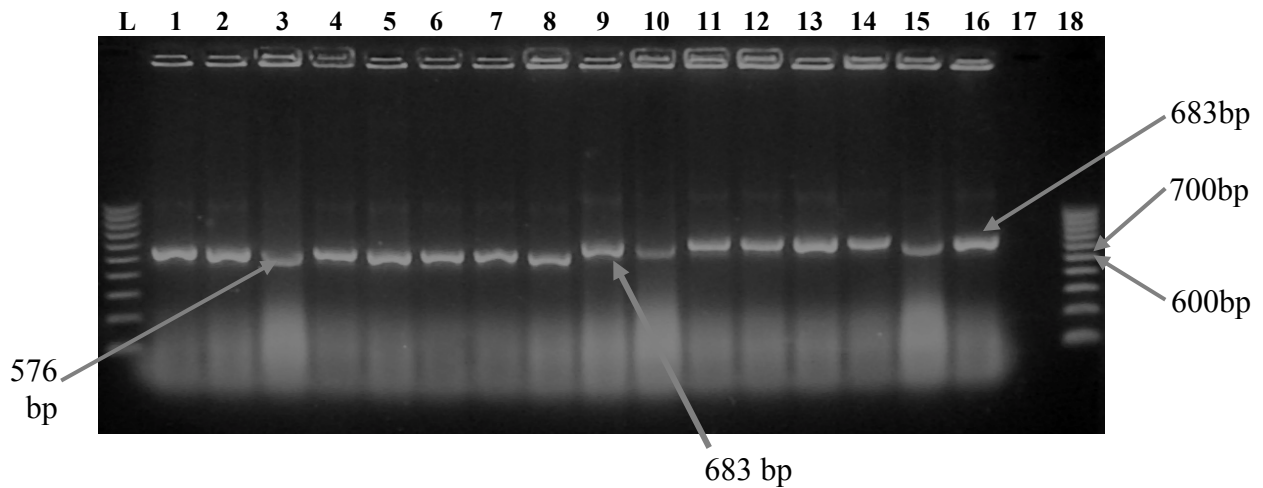
- L** - 100 bp Superladder Low SSL-100
- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7** - heterozygoter Anlageträger (Cocco), Insert hergestellt mit Primerpaar-4 (808bp Insert + 250bp=1058bp)

**17 D. Heterozygoter Anlageträger (Cocco), Insert hergestellt mit Primerpaar-4, die 808bp und 827bp Amplikons.**



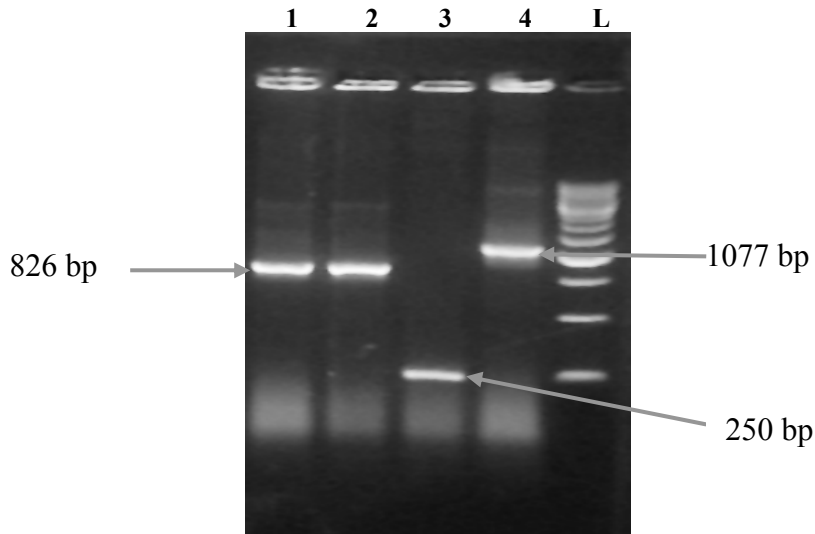
- L<sub>1</sub> - λ Hind III DNS DNS-Leiter
- L<sub>2</sub> - 100bp Superladder Low SSL-100
- 1 bis 16 - heterozygoter Anlageträger (Cocco), Insert hergestellt mit Primerpaar-4 (808bp Insert + 250bp=1058bp und 827bp Insert + 250bp=1077bp)

**17. E. Homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), Insert hergestellt mit Primerpaar-1, 2, 3**



- L - 100 bp Superladder Low SSL-100;
- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), Insert hergestellt mit Primerpaar-1 (326bp Insert + 250bp = 576bp)
- 9, 10, 11, 12 - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), Insert hergestellt mit Primerpaar-2 (434bp Insert + 250bp = 654bp)
- 13, 14, 15, 16 - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), Insert hergestellt mit Primerpaar-3 (434bp Insert + 250bp = 653bp)
- 17 - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)

**17. F. Homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), Insert hergestellt mit Primerpaar-4 das 576bp und das 827bp Amplikon.**



**L** -250 bp XVI DNS-Leiter

**1** - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), 576bp Insert hergestellt mit Primepaar-4 (576bp Insert + 250bp=826bp)

**2** - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), 576bp Insert hergestellt mit Primepaar-4 (576bp Insert + 250bp=826bp)

**3** - homozygot kranker Alaskan Husky (Hias), 827bp Insert hergestellt mit Primepaar-4 (827bp Insert + 250bp=1077bp)

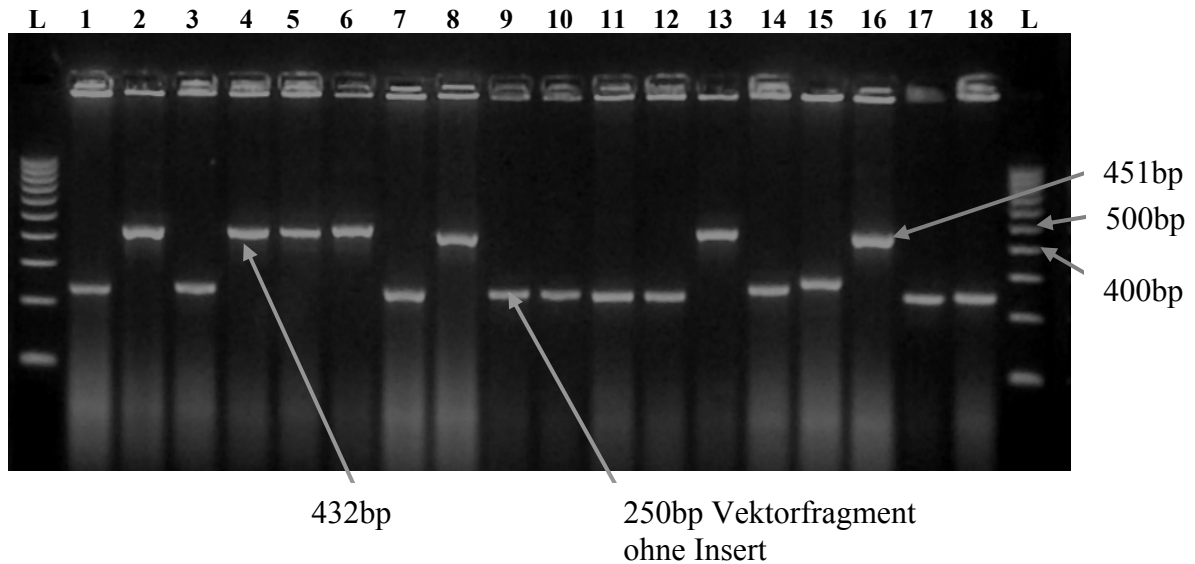
**4** - homozygoter kranker Alaskan Husky (Hias), 827bp Insert hergestellt mit Primepaar-4 (827bp Insert + 250bp=1077bp)

**4.5.1.2. Klonierung der von genomischer DNS abstammenden Amplikone**

Die amplifizierten Exon 15 Fragmente des gesunden Kontrolltieres K2 (A. Terrier), eines heterozygoten Anlageträgers Alaskan Husky (Cocco) und des homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) wurden in den Vektor pcDNA 3.1/V5-His TOPO<sup>®</sup> eingebaut und anschließend im *E.coli* Top10 kloniert. Die Überprüfung der Ergebnisse erfolgte mittels „colony“-PCR unter Verwendung von „REDTAQ PCR Mix“ und dem Primerpaar-8 (siehe Abbildung 18 A-B).

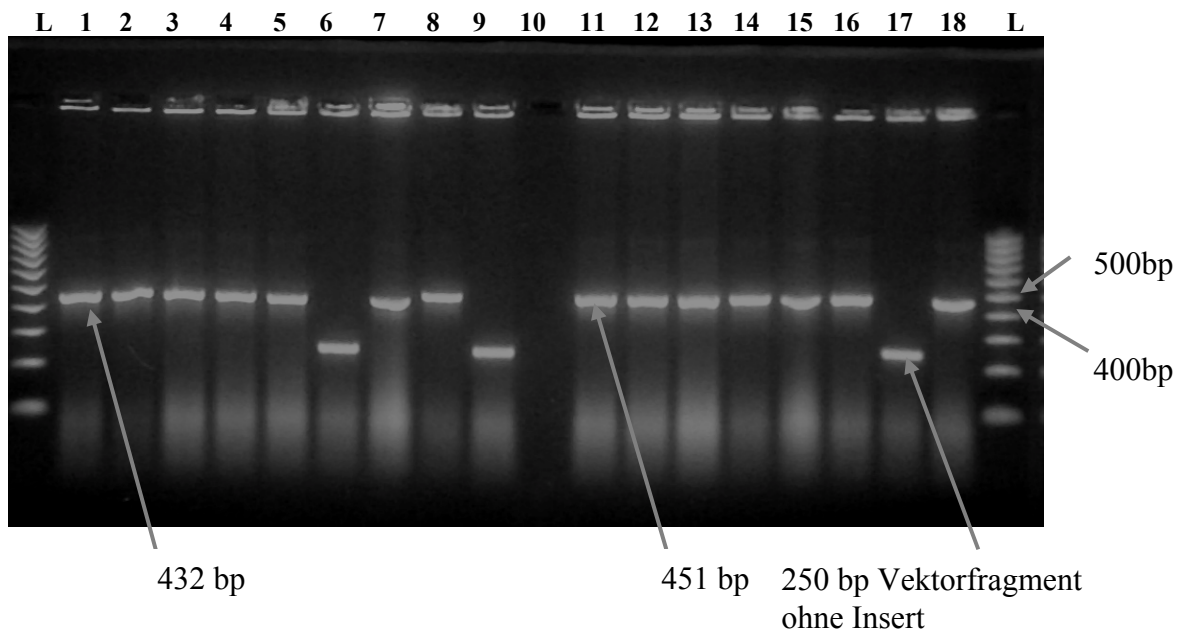
**Abbildung 18 A-B:** "Colony"-PCR, Insert des gesunden Kontrolltieres (K2 A.Terrier), heterozygoten Anlageträgers (Cocco) und homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias)

**18 A. 201bp (182bp+19bp Duplikation)Amplikon vom heterozygoten Anlageträger (Cocco) und 182bp Amplikon vom gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier)**



- L - 100bp Superladder Low SSL-100
- 1 bis 9 - Kontrolltier gesund (K2 A. Terrier) ;182bp Insert + 250bp=432bp
- 10 bis 18 - heterozygoter Anlageträger Alaskan Husky (Cocco); 201bp Insert + 250bp=451bp

**18 B. Heterozygoter Anlageträger Alaskan Husky (Cocco), als Insert diente das 182bp Amplikon, und homozygot kranker Alaskan Husky (Hias)**



- L -100 bp Superladder Low SSL-100
- 1 bis 9 - heterozygoter Anlageträger (Cocco); 182bp Insert + 250bp=432bp
- 10 - negative Kontrolle (ddH<sub>2</sub>O)
- 11 bis 18 - homozygot kranker Alaskan Husky (Hias); 201bp Insert + 250bp=451bp

## **4.6. Sequenzierung der Plasmide und PCR-Produkte**

Als Proben wurden entweder PCR-Produkte (direkte Sequenzierung) oder Plasmide, die die gewünschten DNS-Abschnitte enthielten, verwendet. Die Sequenzen wurden untereinander und mit bereits veröffentlichten Abschnitten des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens verglichen. Dafür wurde das BLAST-Programm (NCBI – National Center for Biotechnology Information, USA) verwendet. Die überprüften Nukleotidsequenzen wurden in der NCBI-Gendatenbank (GenBank, NCBI-National Center for Biotechnology Information, USA) unter mehreren “accession numbers” hinterlegt (Anhang 9.4).

### **4.6.1. Direkte Sequenzierung der PCR-Produkte**

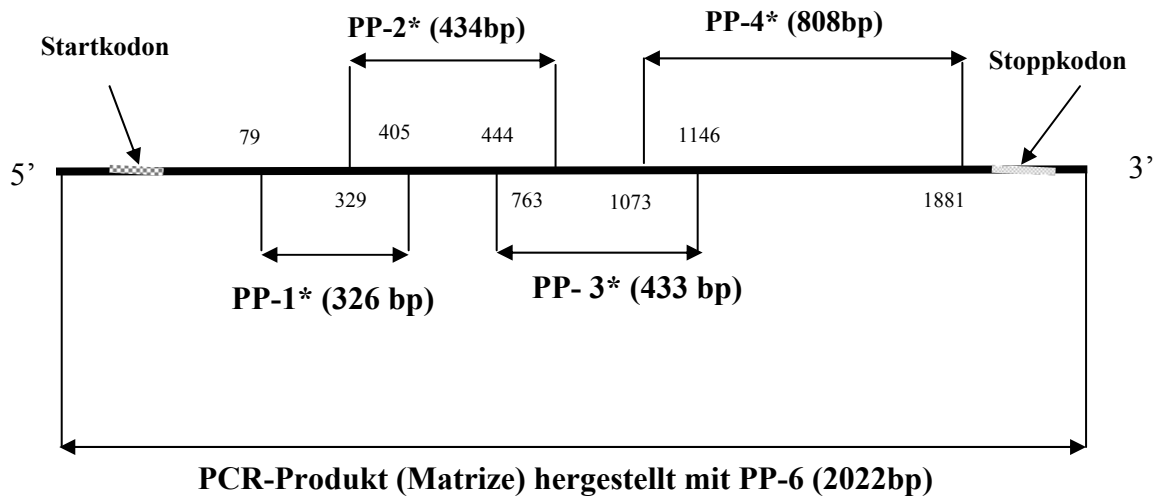
Zuerst wurde untersucht, ob die mit dem Primerpaar-6 amplifizierten cDNS bzw. mRNA dem kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gen entsprachen. Dafür wurden Proben von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier) und der DH82-Zelllinie in der Sequenzierungsreaktionen eingesetzt. Bei der DH82-Zelllinie und dem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier) wurde eine Bande (2022bp) in der erwarteten Größe beobachtet. Bei dem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) wurden zwei Banden (2022bp und 1771bp) beobachtet. Durch den Vergleich aller sequenzierten Amplifikate mit den bereits veröffentlichten Sequenzen (GenBank Accession No.: AF 056084 und Wang et al., 2000) wurde festgestellt, dass die Banden dem kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNS entsprechen. Die sequenzierten PCR-Produkte wurden als Matrizen in weiteren “nested“-PCR eingesetzt.

Zur Überprüfung der bisher erzielten Ergebnisse wurde das Primerpaar-5 verwendet, das einen 1752bp langen Nukleotidenabschnitt der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. ds cDNS amplifizieren soll. Neben Banden in der errechneten Größe [wie bei dem gesunden Kontrollhund (1752bp)] wurde bei dem homozygoten Alaskan Husky (Hias) und dem heterozygoten Anlageträger (Cocco) auch eine kürzere Bande (1501bp) beobachtet. Um die Spezifität der enzymatischen Reaktion zu überprüfen, wurden die Amplifikate direkt aus dem PCR-Ansatz sequenziert. Der Vergleich der Amplikate mit den bereits veröffentlichten Sequenzen der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase (GenBank Accession No.: AF056084, Wang et al., 2000) erlaubte die Feststellung, dass alle Sequenzen ebenfalls dem kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gen zugehörten. Da mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren die selben Ergebnisse erzielt wurden und zwar eine Bande in der errechneten Größe für die gesunde Kontrolltiere und die DH82-Zelllinie und zwei Banden mit einen 251bp Längeunterschied beim kranken und heterozygoten Alaskan Husky, war eine weitgehende Eingrenzung des genetischen Defektes notwendig.

#### 4.6.2. Eingrenzung des genetischen Defektes

Zur Charakterisierung des beobachteten Längenunterschiedes wurden in der „nested“-PCR mehrere Primerpaare eingesetzt. Als Matrize dienten Amplifikate von einem gesunden Kontrolltier (K2 A. Terrier), einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und einem homozygot kranken Alaskan Husky (Hias), welche mit dem Primerpaar-6 hergestellt wurden (siehe Abbildung 19).

**Abbildung 19:** Lokalisierung der Primer zur Durchführung der nested-PCR auf der kaninen  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNA.



PP-Primerpaar-1, -2, -3, -4, -6.; Startkodon – ATG; Stoppkodon – TGA

\*- Alle Primerpaare wurden aufgrund der in der GenBank vorhandene Sequenz des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens (AF056084) bestimmt.

Alle so erzielten Sequenzen wurden kloniert und anschließend sequenziert, um die Spezifität der eingesetzten Primer zu überprüfen.

Für das Primerpaar-1, welches den Bereich zwischen den Positionen 79-405 amplifiziert, wurden Proben von gesunden Kontrolltieren (K1 Dackel und K2 A. Terrier) und den DH82-Zellen sequenziert. Durch den Vergleich mit der publizierten Sequenz (GenBank Acession Number AF 056084) wurde nachgewiesen, dass die Amplikons der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNA entsprechen.

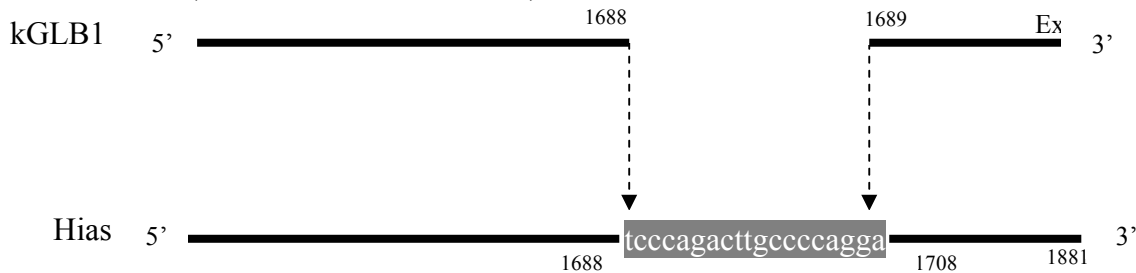
Auch für das Primerpaar-2, welches den Bereich zwischen den Positionen 329 und 763 auf der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNA abdeckt, wurden Proben von gesunden Kontrolltieren (K1-Dackel und K2 A. Terrier) sequenziert. Der Vergleich mit der publizierten Sequenz (GenBank Acession Number AF 056084) zeigte, dass alle untersuchten Sequenzen zu dem kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gen gehören. Das Primerpaar-3 amplifiziert den Bereich zwischen den Positionen 713-1146 auf der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNA. Für die Überprüfung der Spezifität dieses Primerpaares wurden Proben von gesunden Kontrolltieren (K1



Dackel und K2 A. Terrier) und dem homozygot kranken Alaskan Husky (Hias) sequenziert. Den Vergleich mit der publizierten Sequenz (GenBank Acession Number AF056084) zeigte, dass die Amplifikate zur kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNA gehören.

Mit dem Primerpaar-4 wurde der Endbereich des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens zwischen den Positionen 1073-1881 amplifiziert. Hierbei wurden eine einzige spezifische Bande in die errechneten Größe (808bp) beim gesunden Kontrolltier und 2 Banden (557 bzw. 808bp) beim heterozygoten Alaskan Husky (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) beobachtet. Um die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte zu überprüfen, wurden alle Nukleotidsequenzen mit der in der GenBank (NCBI, USA) vorhandenen Sequenz verglichen. Alle sequenzierten PCR-Produkte gehören zu der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA bzw. cDNA. Bei dem 827 bp Amplikon vom homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) wurde eine 19bp Duplikation (5'-tcccagactgccccagga-3') zwischen den Positionen 1688-1689 festgestellt (siehe Abbildung 20).

**Abbildung 20:** Vergleich zwischen der 827bp Bande vom homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) und die veröffentlichte kanine saure  $\beta$ -Galaktosidase cDNA (Accession No. AF056084)



kGLB1: 1317 tgtctctgtggatggggtgccccagggagtcaggagcgaagtaatgtcatcactctgaa 1376  
 |||

Hias: 1317 tgtctctgtggatggggtgccccagggagtcaggagcgaagtaatgtcatcactctgaa 1376

kGLB1: 1377 cataaccgggaaggctggagccactctggacctgctggtggagaacatgggacctgtgaa 1436  
 |||

Hias: 1377 cataaccgggaaggctggagccactctggacctgctggtggagaacatgggacctgtgaa 1436

kGLB1: 1437 ctatggcagatataatgattttaagggccttatttctaacctgacccttgggtccag 1496  
 |||

Hias: 1437 ctatggcagatataatgattttaagggccttatttctaacctgacccttgggtccag 1496

kGLB1: 1497 tatcctcaciaactggatgatcttcccgttgaacctgaggatgcagtacgcagccacct 1556  
 |||

Hias: 1497 tatcctcaciaactggatgatcttcccgttgaacctgaggatgcagtacgcagccacct 1556

kGLB1: 1557 gggaggctggcatggcctaacaatggccgcatgataaacctttgccaccgctcgtc 1616  
 |||  
 Hias: 1557 gggaggctggcatggcctaacaatggccgcatgataaacctttgccaccgctcgtc 1616

kGLB1: 1617 taactacacgtcccggcctttatatggggaacttctctattcccagtgggatcccagactgccccagga 1688  
 |||  
 Hias: 1617 taactacacgtcccggcctttatatggggaacttctctattcccagtgggatcccagactgccccagga 1688

kGLB1: 1689 -----cacctttatccagtttctctggatggaccaagggtcagg 1726  
 |||  
 Hias: 1689 tcccagactgccccaggacacctttatccagtttctctggatggaccaagggtcagg 1745

kGLB1 : 1727 tgtggattaatggctttaacctcggtcgatattggccagcacggggccccagatgactt 1786  
 |||  
 Hias: 1746 tgtggattaatggctttaacctcggtcgatattggccagcacggggccccagatgactt 1805

kGLB1: 1787 tgtttgccacggcacatcctggtgacatcaacccaaacaccatcatggtgctggaac 1846  
 |||  
 Hias: 1806 tgtttgccacggcacatcctggtgacatcaacccaaacaccatcatggtgctggaac 1865

kGLB1 : 1847 tggagcacgcgcctgtggtgacagtggcccagaa 1881  
 |||  
 Hias: 1866 tggagcacgcgcctgtggtgacagtggcccagaa 1900

grau unterlegt –die doppelte Nukleotidsequenzen (5’- tcccagactgccccagga-3’)

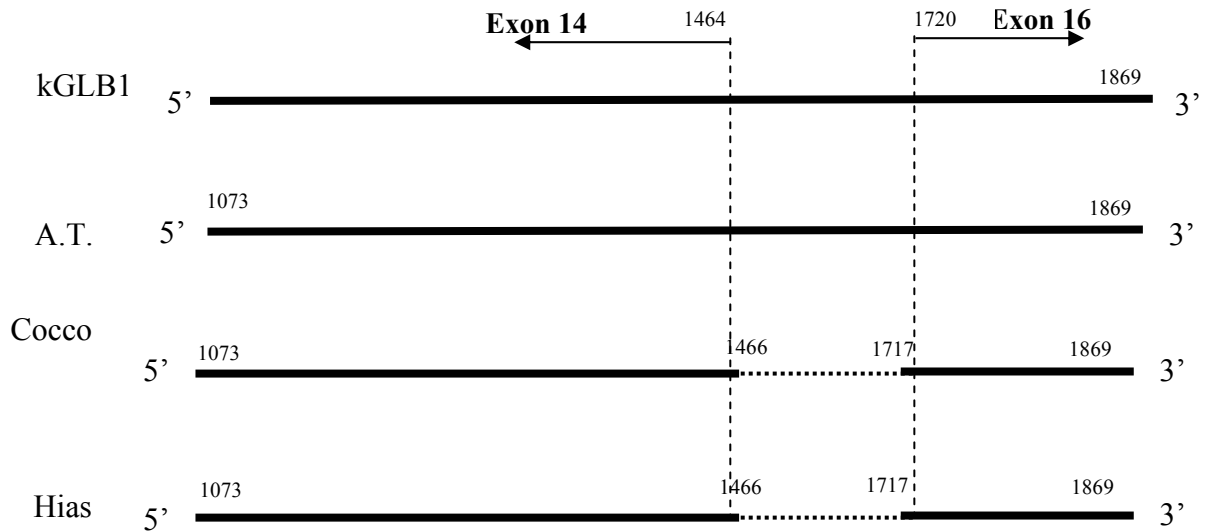
kGLB1 = kanine saure β-Galaktosidase cDNA (GenBank Accesssion No. AF 056084)

Hias = homozygot kranker Alaskan Husky (Hias) die 808bp, Bande hergestellt mit Primerpaar-4

a = Adenin; c = Cytosin; g = Guanin; t = Thymin; || = identisches Nukleotid; Leerzeichen = unterschiedliches Nukleotid; -- = fehlendes Nukleotid

Die 557bp langen Banden vom heterozygoten Anlageträger und von dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) wurden ebenfalls sequenziert. Durch Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse wurde bei dem heterozygoten und dem homozygoten kranken Tier der Verlust eines 251bp Nukleotidenfragments festgestellt (siehe Abbildung 21).

**Abbildung 21:** Gegenüberstellung der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase cDNS-Sequenz (GenBank Accession No. AF056084) und der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase klonierten PCR-Produkt, von einem gesunden Kontrolltier (A. Terrier K2), einem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und den homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias); das 557 bp lange Insert wurde mit dem Primerpaar-4 hergestellt.



kGLB1: 1073 gttttatccctccgtctacaccaagtttgcataatggaaaagttgctctgaagaagttaa 1132  
 |||  
 A.T.: 1073 gttttatccctccgtctacaccaagtttgcataatggaaaagttgctctgaagaagttaa 1132  
 |||  
 Cocco : 1073 gttttatccctccgtctacaccaagtttgcataatggaaaagttgctctgaagaagttaa 1132  
 |||  
 Hias: 1073 gttttatccctccgtctacaccaagtttgcataatggaaaagttgctctgaagaagttaa 1132

kGLB1: 1133 agacggtggaggaggcctgaatgttctgtgtccgcctgggccataaacagcctttatc 1192  
 |||  
 A.T.: 1133 agacggtggaggaggcctgaatgttctgtgtccgcctgggccataaacagcctttatc 1192  
 |||  
 Cocco : 1133 agacggtggaggaggcctgaatgttctgtgtccgcctgggccataaacagcctttatc 1192  
 |||  
 Hias: 1133 agacggtggaggaggcctgaatgttctgtgtccgcctgggccataaacagcctttatc 1192

kGLB1: 1193 ccttgacgtttatccaggtgaaacagtatttcggttttgatgtaccgaacaacacttc 1252  
 |||  
 A.T: 1193 ccttgacgtttatccaggtgaaacagtatttcggttttgatgtaccgaacaacacttc 1252  
 |||  
 Cocco : 1193 ccttgacgtttatccaggtgaaacagtatttcggttttgatgtaccgaacaacacttc 1252  
 |||  
 Hias: 1193 ccttgacgtttatccaggtgaaacagtatttcggttttgatgtaccgaacaacacttc 1252

kGLB1: 1253 ctcaagactgcagtgacccccacaccctgtcttcaccctcagtgaggatccatgaccgcg 1312  
 |||  
 A.T.: 1253 ctcaagactgcagtgacccccacaccctgtcttcaccctcagtgaggatccatgaccgcg 1312  
 |||  
 Cocco : 1253 ctcaagactgcagtgacccccacaccctgtcttcaccctcagtgaggatccangaccgng 1312  
 |||  
 Hias: 1253 ctcaagactgcagtgacccccacaccctgtcttcaccctcagtgaggatccangaccgcg 1312

kGLB1: 1313 cctatgtctctgtggatggggtgccccagggagtcagtgaggcgaagtaatgcatcactc 1372  
 |||  
 A.T.: 1313 cctatgtctctgtggatggggtgccccagggagtcagtgaggcgaagtaatgcatcactc 1372  
 |||  
 Cocco : 1313 cctatgtctctgtggatggggtgccccagggagtcagtgaggcgaagtaatgcatcactc 1372  
 |||  
 Hias: 1313 cctatgtctctgtggatggggtgccccagggagtcagtgaggcgaagtaatgcatcactc 1372

kGLB1:1373 tgaacataaccgggaaggctggagccactctggacctgctggtggagaacatgggacgtg 1432  
 |||  
 A.T.: 1373 tgaacataaccgggaaggctggagccactctggacctgctggtggagaacatgggacgtg 1432  
 |||  
 Cocco: 1373 tgaacataaccgggaaggctggagccactctggacctgctggtggagaacatgggacgtg 1432  
 |||  
 Hias: 1373 tgaacataaccgggaaggctggagccactctggacctgctggtggagaacatgggacgtg 1432

kGLB1 : 1433 tgaactatggcagatataatgattttaagggcctatttctaacctgaccctgggtccagtatcctca 1492  
 |||  
 A.T. : 1433 tgaactatggcagatataatgattttaagggcctatttctaacctgaccctgggtccagtatcctca 1492  
 |||  
 Cocco: 1433 tgaactatggcagatataatgattttaaggg ..... 1466  
 |||  
 Hias: 1433 tgaactatggcagatataatgattttaaggg ..... 1466

kGLB1: 1493 ccagatcctcacaactggatgatcttccggtgaacactgaggatgcagtacgcagccacctggg 1559  
 |||  
 A.T.: 1493 ccagatcctcacaactggatgatcttccggtgaacactgaggatgcagtacgcagccacctggg 1559  
 Cocco : .....  
 Hias: .....

kGLB1: 1560 aggctggcatggcctaacaatggccgcatgataaacctttgccaccgctcgtctaactac 1623  
 |||  
 A.T.: 1560 aggctggcatggcctaacaatggccgcatgataaacctttgccaccgctcgtctaactac 1623  
 Cocco : .....  
 Hias: .....

kGLB1 : 1624 acgctcccggccttttatatggggaacttctctattcccagtggggatcccagacttgccccaggaca 1690  
 |||  
 A.T. : 1624 acgctcccggccttttatatggggaacttctctattcccagtggggatcccagacttgccccaggaca 1690

Cocco : .....

Hias: .....

kGLB1 : 1691 cctttatccagtttctggatggaccaagggtcaggtgtggattaatggcttaacctcg 1750  
 |||  
 A.T. : 1691 cctttatccagtttctggatggaccaagggtcaggtgtggattaatggcttaacctcg 1750  
 1717 |||

Cocco: .....**aagggtcaggtgtggattaatggcttaacctcg** 1750  
 |||

Hias: .....1717.....**aagggtcaggtgtggattaatggcttaacctcg**1750

kGLB1: 1751 gtcgatattggccagcacggggccccagatgactttgtttgtgccacggcacatcctgg 1810  
 |||

A.T.: 1751 gtcgatattggccagcacggggccccagatgactttgtttgtgccacggcacatcctgg 1810  
 |||

Cocco : 1751 gtcgatattggccagcacggggccccagatgactttgtttgtgccacggcacatcctgg 1810  
 |||

Hias: 1751 gtcgatattggccagcacggggccccagatgactttgtttgtgccacggcacatcctgg 1810

kGLB1: 1811 tgacatcaagcccaaacaccatcatggtgctggaactggagcacgcgcctgtggtgac 1869  
 |||

A.T.: 1811 tgacatcaagcccaaacaccatcatggtgctggaactggagcacgcgcctgtggtgac 1869  
 |||

Cocco: 1811 tgacatcaagcccaaacaccatcatggtgctggaactggagcacgcgcctgtggtgac 1869  
 |||

Hias: 1811 tgacatcaagcccaaacaccatcatggtgctggaactggagcacgcgcctgtggtgac 1869

kGLB1 = kanine saure  $\beta$ -Galaktosidase cDNS (GenBank Accession No. AF 056084)

A.T. = Kontrolltier gesund K2 (A. Terrier)

Cocco = heterozygoter Anlageträger (Cocco) die 557bp Bande, hergestellt mit Primerpaar-4

Hias = homozygot kranker Alaskan Husky (Hias) das 557bp Insert wurde mit Primerpaar-4 hergestellt

..... 251bp Verlust

**gg** und **agg** = Restsequenzen aus dem Exon 15, welche die normale Spleißstellen enthalten

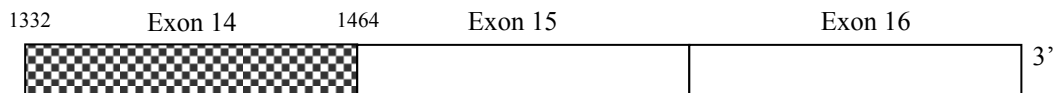
a = Adenin; c = Cytosin; g = Guanin; t = Thymin; || = identisches Nukleotid; Leerzeichen = unterschiedliches Nukleotid; .... = fehlendes Nukleotid

### 4.6.3. Charakterisierung des 251bp Nukleotidenverlustes

Da ein 251bp Verlust zwischen den Positionen 1466 und 1717 beobachtet wurde, musste die Zusammensetzung der Exone, welche die betroffenenen und flankierenden Bereiche abdecken, untersucht werden. Durch den Vergleich der in der GenBank publizierten, kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-cDNS-Sequenz (Accession No.: AF 056084) mit dem humanen  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (The Welcome Trust, Sanger Institute, UK Ensembl Transcript ID ENST00000307363) und den kaninen DNS Shotgun Sequenzen („Canine genome project-Whole Genome Sequencing“) wurden die Exone 14, 15 und ein Teil des Exon 16 ermittelt. Zur Ermittlung des gesamten Exon 16 wurden alle oben erwähnten Nukleotidsequenzen mit der von Wang et al. (2000) publizierten, cDNS Sequenz des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase verglichen. Hierdurch erfolgte die Identifikation des gesamten Exon 16, wobei das Stoppkodon der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNS, wie bei dem humanen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gen, auf dem Exon 16 festgestellt wurde (siehe Abbildung 22 A-C).

**Abbildung 22 A-C:** Positionen und Nukleotidensequenz des Exons 14, 15 und 16 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens.

#### 22 A. Exon 14 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase-Gens



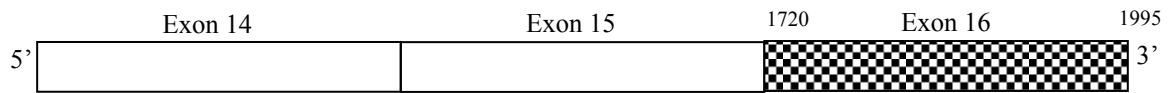
5'-gtgccccaggagtcacatggagcgaagtaatgtcatcactctgaacataaccgggaaggctggagccactctggacc  
tgctggtggagaacatgggacgtgtgaactatggcagatatatcaatgatttaag-3'

#### 22 B. Exon 15 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase-Gens



5 - ggccttatttctaacctgacccttgggtccagtatcctcacaactggatgatcttcccgttgaacactgaggatgcagtacgcagcc  
acctgggaggctggcatggcctaacaatggccgcatgataaaccttggccaccgctcgtctaactacacgctcccggcctttata  
tggggaacttctctattcccagtggtatcccagactgccccaggacacctttatccagtttcttgatggaccaag-3'

**22. C. Exon 16 des kaninen  $\beta$ -Galaktosidase-Gens und den nicht-translatierten 3' Bereich**



5'ggtcaggtgtggattaatggcttaacctggctgatattggccagcacggggccccagatgactttgtttgtccacggcacatcc  
 tggtgacatcaaccccaaacaccatcatggtgctggaactggagcacgcacctgtggtgacagtggccccagaagtgtgcaccgtgg  
 agtttggacaggccggttateggtgccctccaaccttggcatccccctccagacctgtcccatcgagactgagactggactatg  
 tctga tga *aaactgtgacctg gagtt*- 3'

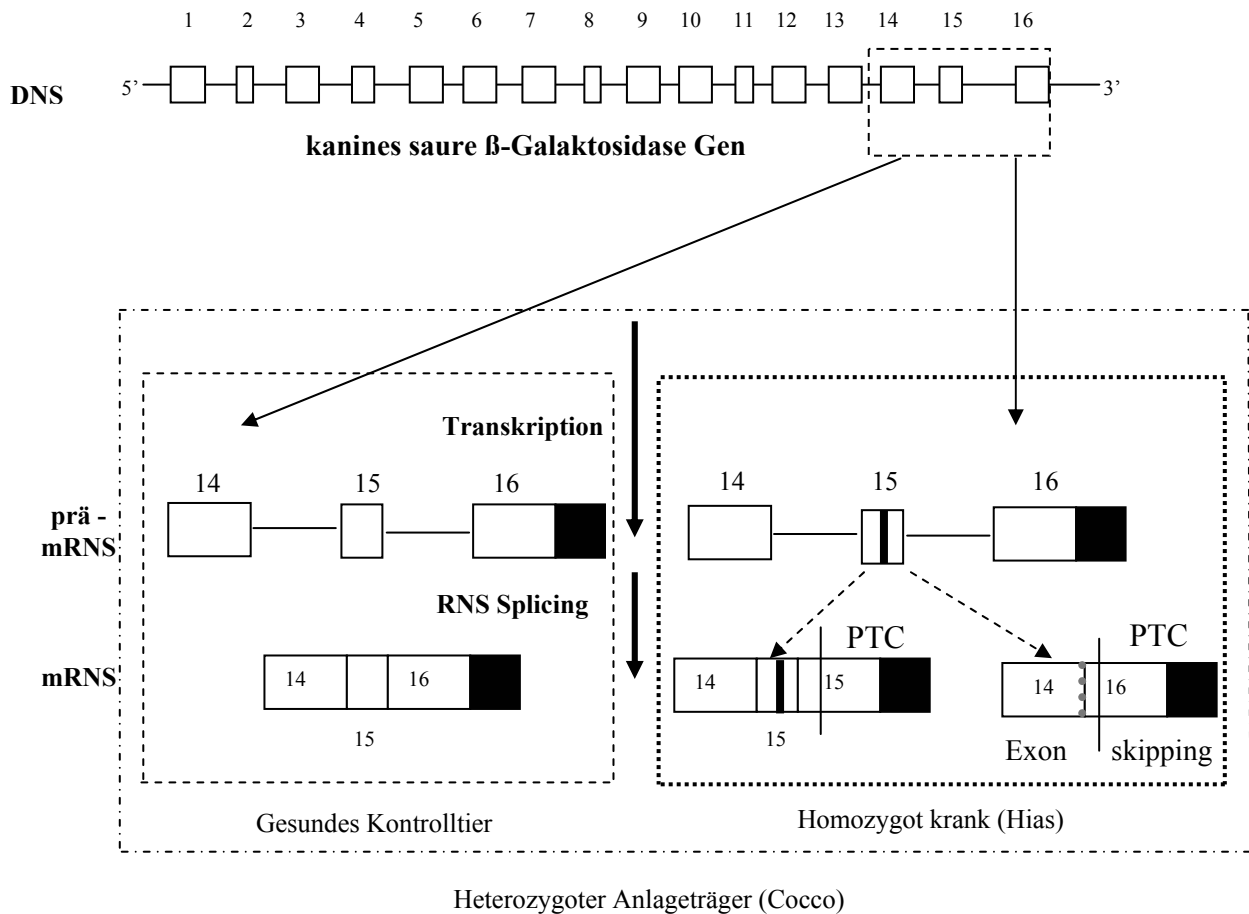
**grau unterlegt** - Stoppkodonen;

*kursiv* - den nicht-translatierte 3' Bereich

a- Adenin; c – Cytosin; g –Guanin; t – Thymin

Durch die Bestimmung der Exon 14, 15 und 16 konnte der Nukleotidverlust (siehe Abbildung 21) charakterisiert werden. Die 251 Nukleotiden, die zwischen den Positionen 1466-1717 bei dem heterozygoten Anlageträger (Cocco) und dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) fehlen, entsprechen dem Exon 15 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens. Die Anwesenheit kurzer Nukleotidsequenzen am 3' Ende des Exon 14 (5' GG 3') bzw. am 5' Ende des Exon 16 (5' AAG 3'), welche zu dem Exon 15 gehören und die richtige Spleißstellen enthalten, deuten auf eine falsche Erkennung der Spleißstellen hin. Dies führt zum alternativen Spleißen und dem sogenannten „Exon Skipping“ (siehe Abbildung 23).

**Abbildung 23:** Schematische Darstellung des normalen und „abnormalen“ mRNA-Spleißens des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase prä-mRNA Moleküle.



I ... XVI – Exons des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens

■ - nicht translatiertes Bereich

▤ - Exon 15 mit der 19 bp Duplikation

PTC - frühzeitiges Stoppkodon („premature termination codon“)

⋮ - Nukleotidenfragment von Exon 15 (3'-GGAAGG-5')

#### 4.6.4. Bestätigung der 19bp Duplikation auf DNS-Ebene

Durch den Vergleich zwischen dem Exon 15 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens und den Nukleotidsequenzen (182bp sowie die 201bp) eines heterozygoten Anlageträgers (Cocco) und eines homozygot kranken Alaskan Huskies (Hias) wurde die Anwesenheit einer 19bp Duplikation zwischen den Positionen 1688-1689, bestätigt (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Gegenüberstellung des Exon 15 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens und dem klonierten genomischen Amplifikat eines heterozygoten Anlageträgers (Cocco) unter Verwendung des 182 bp und 201 bp PCR-Produktes und dem homozygot kranken Alaskan Husky (Hias) unter Verwendung des 201 bp PCR-Produktes



```

kEx 15 : 1588 catgataaaacctttgccaccgctcgtctaactacacgctcccggccttttatatgggg 1647
           |||
A.T.   : 1588 catgataaaacctttgccaccgctcgtctaactacacgctcccggccttttatatgggg 1647
           |||
Cocco 1 : 1588 catgataaaacctttgccaccgctcgtctaactacacgctcccggccttttatatgggg 1647
           |||
Cocco 2 : 1588 catgataaaacctttgccaccgctcgtctaactacacgctcccggccttttatatgggg 1647
           |||
Hias   : 1588 catgataaaacctttgccaccgctcgtctaactacacgctcccggccttttatatgggg 1647
           |||
    
```

```

kEx 15: 1648 aacttctctattcccagtgggatcccagactgccccagga*.....
           |||
A.T.   : 1648 aacttctctattcccagtgggatcccagactgccccagga*.....
           |||
Cocco 1: 1648 aacttctctattcccagtgggatcccagactgccccagga*.....
           |||
Cocco 2: 1648 aacttctctattcccagtgggatcccagactgccccagga*tcccagactgccccagga
           |||
Hias   : 1648 aacttctctattcccagtgggatcccagactgccccagga*tcccagactgccccagga
           |||
    
```

```

kEx 15 : 1689 cacctttatccagtttctgga 1710
           |||
A.T.   : 1689 cacctttatccagtttctgga 1710
           |||
Cocco 1 : 1689 cacctttatccagtttctgga 1710
           |||
Cocco 2 : 1689 cacctttatccagtttctgga 1710
           |||
Hias   : 1689 cacctttatccagtttctgga 1710
           |||
    
```

- kEx 15 - Exon 15 des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens (GenBank Accession No. AF 056084)
- A.T. - Kontrolltier gesund (K2 A. Terrier), 182bp PCR-Produkt
- Cocco 1 - heterozygoter Anlageträger Alaskan Husky (Cocco), 182bp PCR-Produkt
- Cocco 2 - heterozygoter Anlageträger Alaskan Husky (Cocco), 201bp PCR-Produkt (182bp + 19bp Duplikation)
- Hias - homozygot kranker Alaskan Husky (Hias), 200bp PCR-Produkt
- Grau unterlegt - die 19 bp Duplikation
- a-Adenin ; t-Thymin ; c-Cytosin ; g – Guanin; \* - Position 1688

#### 4.6.5. Auswirkungen auf der Protein-Ebene

##### 4.6.5.1. Auswirkungen des Exon 15-Verlustes auf der Protein-Ebene

Durch den Verlust des Exon 15 entsteht nach der Translation ein 151 Aminosäure kürzeres Polypeptid (MW=7145g/mol, 66 Aminosäuren) im Vergleich zum normalen (MW=24145g/mol und 218 Aminosäuren) kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Vorläuferproteins (siehe Abbildung 25).

**Abbildung 25:** Vergleich zwischen den Polypeptidsequenzen, abgeleitet von dem normal und falsch gespleißten prä m-RNS Molekül des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens

```

nP: 445 VPQGV MERSNVITLNITGKAGATLDLLVENMG 476
      |||
aP: 445 VPQGV MERSNVITLNITGKAGATLDLLVENMG 476

nP: 477 RVNYGRYINDFKGLISNLT LGSSILT NWMIFP 508
      |||
aP: 477 RVNYGRYINDFKGRVRCGLMALT SVDI GQHGA 508

nP: 509 LNTEDAVRSHLGGWHGPNNGRHDKTFAHRSS 539
aP: 509 P R Stop 511.....

nP: 540 NYTLPAFYMGNF SIPS GIPDLPQDTFIQFPGW T 572
aP: .....

nP: 573 KGQVWINGFNLGRYWPARGPQMTL FVPRHILV 604
aP: .....

nP: 605 TSTPNTIMVLELEHAPCGD SGPEVCTVEFVDRP 637
aP: .....

nP: 638 VIGAPPTPGHPPDLSHRDLRLDYV Stop 662
aP: .....
```

**Stop – Stoppkodon**

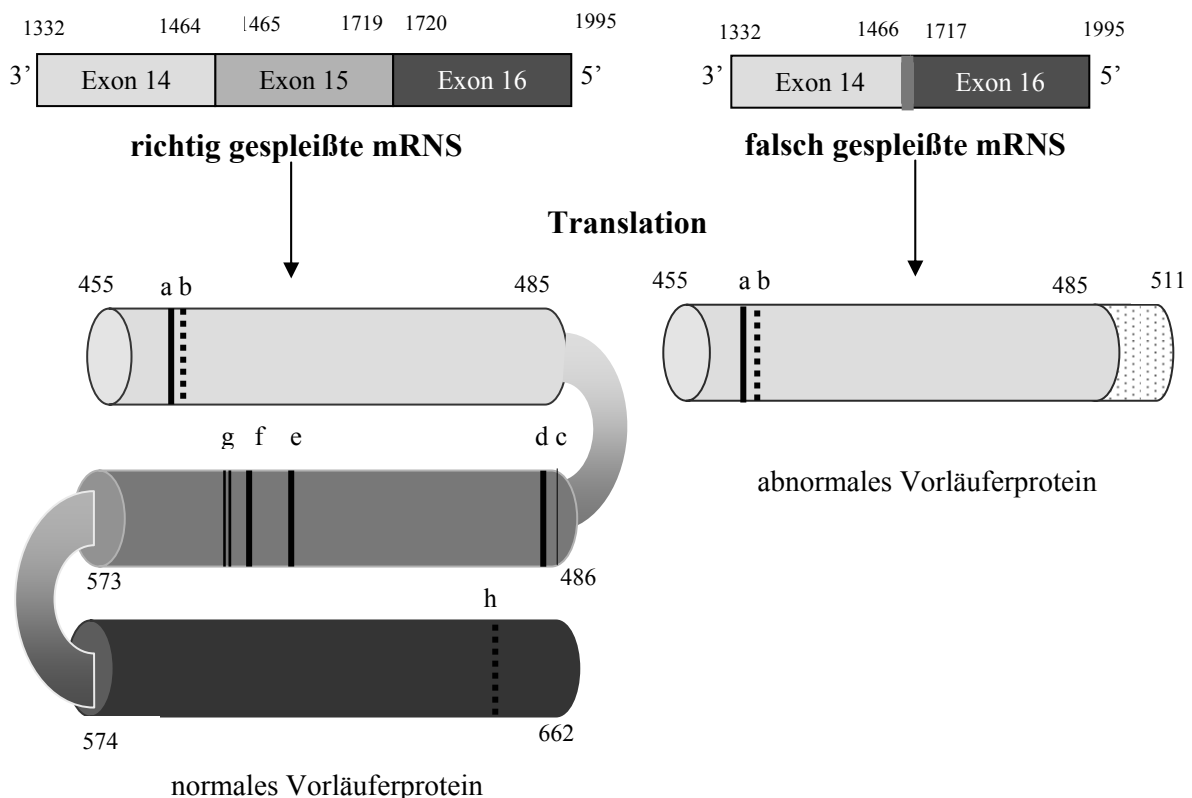
**nP** - normale Aminosäuresequenz (abgeleitet von Exon 14, 15 und 16) des gesunden Kontrolltieres (K2 A. Terrier) und des heterozygoten Anlageträgers (Cocco)

**aP** - abnormale Aminosäuresequenz (abgeleitet von Exon 14, 16 und des Nukleotidrestes von Exon 15 (5'-GGAAGG-3')) des heterozygoten Anlageträgers (Cocco) und des homozygoten kranken Alaskan Huskies (Hias)

**V P Q G V M E R** - Aminosäuresequenz abgeleitet von Exon 14  
**G L I S N L T L G** - Aminosäuresequenz abgeleitet von Exon 15  
**G Q V W I N G F** - Aminosäuresequenz abgeleitet von Exon 16

Durch die Leserasterverschiebung sind mehrere mögliche Glykosilierungsstellen, Myristoylierungsstellen und Phosphorylierungsstellen sowie eine Erkennungstelle für die Protease (van der Spoel et al., 2002), welche die Umwandlung des Vorläuferproteins in die aktive saure  $\beta$ -Galaktosidase bewirkt, auf dem falsch gespleißten  $\beta$ -Galaktosidase-mRNS nicht vorhanden (siehe Abbildung 26).

**Abbildung 26:** Schematische Darstellung der normalen Polypeptidsequenz (abgeleitet von Exon 14, 15 und 16) und der abnormalen Polypeptidsequenz (mit dem „Exon skipping“)



- Glykosylierungsstelle    
  - Phosphorylierungsstelle    
  - Myristoylierungsstelle

**a** - Glykosylierungsstelle  
**b** - Phosphorylierungsstelle

c- Myristoylierungsstelle

d, e, f - Glykosylierungsstellen

g- proteolytische Spaltstelle – 539 **RS** || **S N Y T L P A F Y M G N F S** 554

h- Phosphorilierungsstelle

Der Aminosäuren- und Erkennungsstellenverlust für verschiedene Enzyme kann zu einer unvollständigen posttranslationalen Prozessierung des kaninen  $\beta$ -Galaktosidase Vorläuferproteins und dadurch zu einer fehlenden enzymatischen Aktivität führen.

#### 4.6.5.2. Auswirkungen der 19bp Duplikation auf der Protein-Ebene

Bei dem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias) wurden neben falsch gespleißter mRNA auch mRNA-Moleküle, welche das Exon 15 mit einer 19bp Duplikation enthielten (5'-cccagactgccccagga-3'), beobachtet. Die Duplikation verursacht eine Leserasterverschiebung und dadurch die Entstehung eines frühzeitigen Stoppkodon. Durch den Vergleich der normalen (MW=24145g/mol und 218 Aminosäuren), abgeleitet von Exon 15 und 16, mit der abnormalen Aminosäuresequenz (11792g/mol und 151 Aminosäuren) wurde beobachtet, dass zwischen dem normalen und abnormalen Polypeptid ein 67 Aminosäuren Unterschied im carboxyterminalen Bereich liegt. Nur die vom Exon 15 abgeleitete Aminosäuresequenz war bis zur Position 563 in beiden Peptiden identisch (siehe Abbildung 27).

**Abbildung 27:** Vergleich der normalen Aminosäuresequenz, abgeleitet von Exon14, 15 und 16 mit der Aminosäuresequenz von einem homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias), abgeleitet von Exon14, 15 mit der Duplikation und Exon16.

```

nP: 445 VPQGV MERSNVITLNITGKAGATLDLLVENMG 476
      |||
aP: 445 VPQGV MERSNVITLNITGKAGATLDLLVENMG 476

nP: 477 RVNYGRYINDFKGLISNLT LGSSILT NWMIFP 508
      |||
aP: 477 RVNYGRYINDFKGLISNLT LGSSILT NWMIFP 508

nP: 509 LNTEDAVRSHLGGWHGPNNGRHDKTFAHRSS 539
      |||
aP: 509 LNTEDAVRSHLGGWHGPNNGRHDKTFAHRSS 539

nP: 540 NYTLPAFYMGNF SIPSGIPDLPQDTFIQFPGWT 572
      |||
aP: 540 NYTLPAFYMGNF SIPSGIPDLPQDPRLAPGHLY 572
    
```

**nP:** 573 **K G Q V W I N G F N L G R Y W P A R G P Q M T L F V P R H I L V** 604

**aP:** P V S W V R C G L M A L T S V D I G Q H G A P R Stop 596.....

**nP:** 605 **T S T P N T I M V L E L E H A P C G D S G P E V C T V E F V D R P** 637

**aP:** .....

**nP:** 638 **V I G A P P T P G H P P D L S H R D L R L D Y V** Stop 662

**aP:** .....

**Stop - Stoppkodon**

- nP** - normale Aminosäuresequenz (abgeleitet von Exon 14, 15 und 16) des gesunden Kontrolltieres (K2 A. Terrier) und des heterozygoten Anlageträgers (Cocco)
- aP** - abnormale Aminosäuresequenz (abgeleitet von Exon 14, 16 und der verbliebenen Nukleotide, 5'-GGAAGG-3' von Exon 15) des heterozygoten Anlageträgers (Cocco) und des homozygoten kranken Alaskan Husky (Hias)
- || - identische Aminosäuren
- ... - fehlende Aminosäuren
- Leerzeichen - nicht identische Aminosäuren

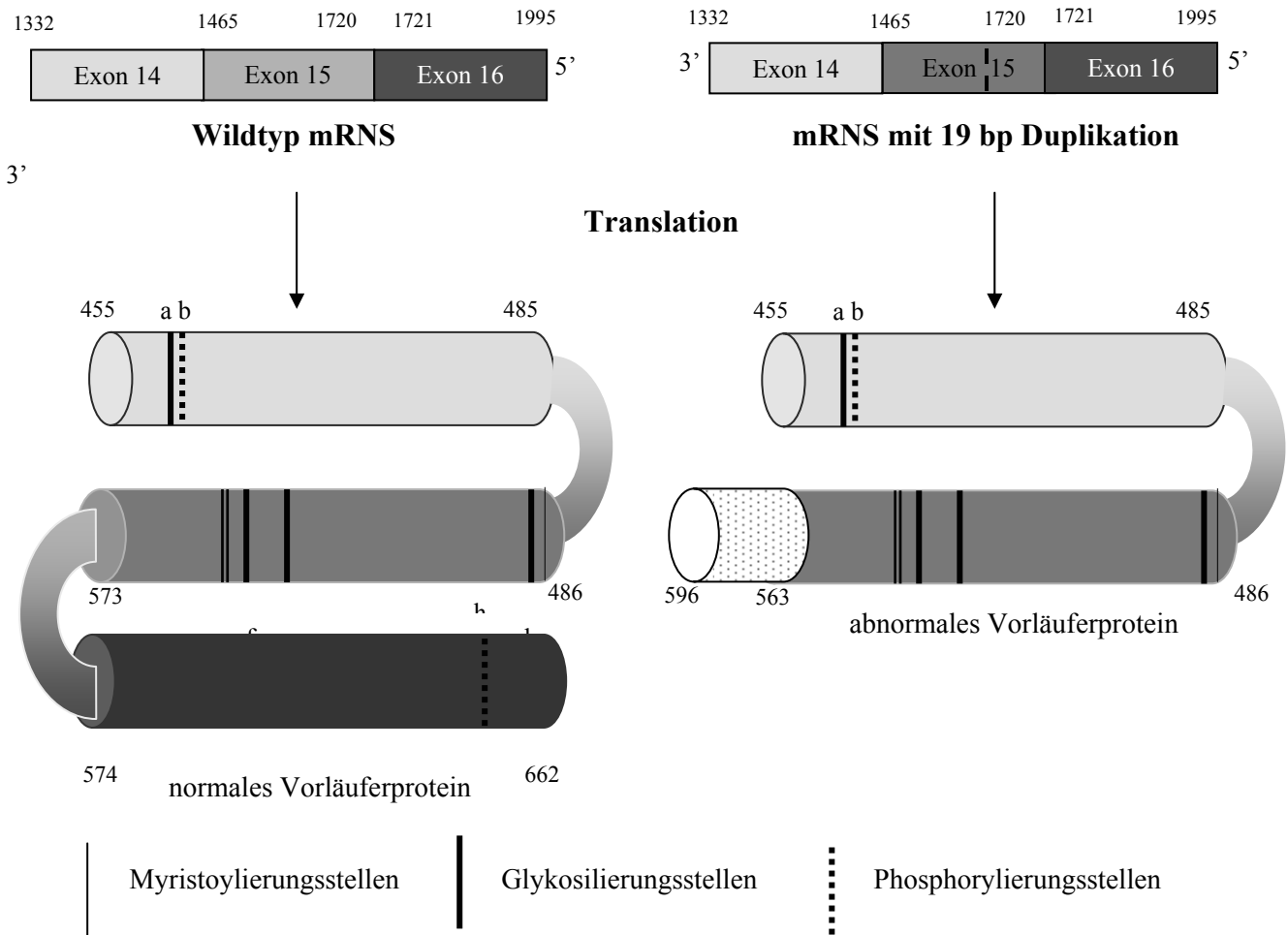
**V P Q G V M E R** - Aminosäuresequenz abgeleitet von Exon 14

**G L I S N L T L G** - Aminosäuresequenz abgeleitet von Exon 15

**G Q V W I N G F** - Aminosäuresequenz abgeleitet von Exon 16

Die Analyse der Aminosäuresequenzen in dem Abschnitt zwischen den Positionen 596 –662 zeigte bei dem abnormalen Vorläuferprotein den Verlust einer Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle, die zu einer Konformationsveränderung des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Vorläuferproteins führt (siehe Abbildung 28).

**Abbildung 28:** Posttranslationelle Prozessierungsstellen auf der normalen und der abnormalen Aminosäuresequenz des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Vorläuferproteins.



! - Duplikation zwischen den Positionen 1688 – 1689 (5' – cccagactgccccagga- 3')

**A) Polypeptidsequenz abgeleitet von Exon 15, Positionen 486-573**

a- Myristoylierungsstelle]

b, c, d - Glykosylierungsstelle

e- Protelytische Spaltstelle – 539 **R S** || **S N Y T L P A F Y M G N F S** 554

**B) Polypeptidsequenz abgeleitet von Exon 16, Positionen 574-662**

f- Phosphorylierungsstelle

## 5. DISKUSSION

Es war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, den genetischen Defekt bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky zu charakterisieren. Hierauf aufbauend sollte dann die Etablierung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens für die oben genannte Erbkrankheit erfolgen.

Zur Durchführung der Versuchsreihe wurden DH82-Zellen und primäre Hundehautfibroblasten von gesunden Kontrolltieren, von heterozygoten Anlageträgern und eines an GM<sub>1</sub>-Gangliosidose erkrankten Alaskan Husky verwendet.

### 5.1. RNS-Isolierung und DNase-Behandlung

Zur RNS-Isolierung wurde das TRIzol<sup>®</sup> Reagenz eingesetzt. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden im Vergleich zum Standardprotokoll verändert, um höhere RNS-Mengen aus den Zellen zu gewinnen. Aufgrund der RNS-Isolierungsmethode, die die Separation der Phasen anhand ihrer Dichte voraussetzt, ist eine Kontamination mit genomischer DNS während der einzelnen Arbeitsschritte möglich. Dies kann zur Amplifikation ungewollter Sequenzen führen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die RNS mit DNase I vorbehandelt. Da für das kanine saure  $\beta$ -Galaktosidase-Gen nur mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen veröffentlicht wurden, konnten die Primer nicht Intron-übergreifend ausgesucht werden, weshalb eine DNase-Behandlung erforderlich war (Gröne et al., 1998, Frisk et al., 1999). Die eingesetzte chromatographische Methode ermöglichte einen effizienten DNase-Verdau in der RNeasy<sup>®</sup> Säule nach der RNS-Isolierung mit TRIzol<sup>®</sup>. Durch nachfolgende Waschschritte gelang die vollständige Entfernung der DNase I. Die Verwendung von RNeasy<sup>®</sup>-Säulen für die DNase-Behandlung bietet den Vorteil, dass im Vergleich mit anderen DNase-Behandlungsmethoden die aufgereinigte RNS in RNase/DNase-freiem Wasser eluiert und anschließend quantifiziert werden kann.

### 5.2. Herstellung von cDNA mittels „SMART<sup>™</sup> RACE Amplification Kit“

Die Besonderheit dieses Systems liegt darin, dass eine Vollängen cDNA hergestellt werden kann. Dies ist für die Suche nach unbekanntem genetischen Veränderungen notwendig. Da der „SMART<sup>™</sup> RACE Amplification Kit“ die Marathon<sup>™</sup> cDNA Technologie (Chechnik et al., 1995) mit der SMART Methode (Switch Mechanism At 5' End of RNA Transcript) verbindet, ist es möglich, hochqualitative cDNA aus 100 ng Gesamt-RNS inklusive der 5' und 3' Enden (Rapid Amplification of cDNA Ends = RACE) zu amplifizieren (Frohman et al., 1988, Swanson, 1999).

Eine höhere Effizienz der Einzel- und Doppelstrangsynthese wurde durch Verwendung der „Superscript II“-reversen Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad CA,

USA) anstelle der "PowerScript"-reversen Transkriptase (BD Biosciences, Heidelberg) und von Advantage<sup>TM</sup>-GC 2 PCR-Polymerase Mix (BD Biosciences, Heidelberg) erzielt (CLONTECHniques, 1997; Matz et al., 1999; Invitrogen Technical Notes, 2004). Der in der Doppelstrangsynthese eingesetzte Kit ist für die Amplifikation von GC-reichen cDNA-Abschnitten besser als die im Kit mitgelieferte Advantage<sup>TM</sup> 2 Polymerase geeignet (Zhu et al., 2001; Zhumbayeva et al., 2001). Während der enzymatischen Doppelstrangsynthese erfolgte eine exponentielle Vermehrung der Ausgangs-cDNS ohne Sequenzveränderung. Dadurch können ursprünglich unterrepräsentierte cDNS-Moleküle in weiteren Reaktionen detektiert werden. Die anschließende chromatographische dscDNS-Aufreinigung erlaubte die Konzentrationsbestimmung der hergestellten dscDNS, um die Nachteile der „klassischen“ RT-PCR zu überwinden (Stählberg et al., 2004).

### **5.3. „Nested“-PCR mit dscDNS unter Verwendung spezifischer Primer für die kanine sauren $\beta$ -Galaktosidase mRNA**

Die „KOD Hot Start DNS-Polymerase“ wurde aufgrund ihrer Lesefehlerkorrektur („proofreading“) und ihrer Inaktivität bei niedrigen Temperaturen („Hot Start“) verwendet.

Während der Optimierungsversuche wurde herausgefunden, dass für die Amplifikation der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-cDNS mit dem Primerpaar-6 ein großer Temperaturbereich als optimal zu bezeichnen ist, wie dies auch von Breslauer et al. (1986) beschrieben wurde. Um eventuelle durch den „Thermal-Cycler“ verursachte Amplifikationsunterschiede auszuschließen, wurden unterschiedliche Anlagerungs-Temperaturen in der „nested“-PCR verwendet. Die Durchführung der „nested“-PCR geschah mit dscDNS von gesunden Kontrolltieren, DH82-Zellen sowie einem heterozygoten Anlageträger und homozygoten kranken Alaskan Husky. Bei dem heterozygoten Anlageträger und dem homozygoten kranken Alaskan Husky wurden zwei Banden (1771bp und 2022bp) und bei dem gesunden Kontrolltier oder den DH82-Zellen nur eine einzige Bande (2022bp) in der errechneten Größe beobachtet. Aufgrund der Amplikonlänge und der Geldichte (1%iges Agarosegel) ist bei dem heterozygoten Anlageträger die Wildtyp mRNA-Population (2022bp) von der abnormalen mRNA-Population mit der 19bp Duplikation (2041bp) nicht zu unterscheiden. Die Beobachtung einer zusätzlichen Bande (1771bp) beim heterozygoten Anlageträger und beim homozygoten kranken Alaskan Husky deutet auf eine Deletion oder auf einen prä-mRNA-Prozessierungsfehler hin. Durch Wiederholung der Untersuchungen mit dem Primerpaar-5, welches für den mRNA-bzw. cDNS-Bereich zwischen den Positionen 458-2010 kodiert, wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Zur Überprüfung der Befunde wurden weiterhin die Banden in der Größe von 2022bp bzw. 2041bp und in der Größe von 1771bp aus dem Agarosegel



herausgeschnitten und die PCR-Produkte gereinigt. Da die Banden auf dem Gel eng nebeneinander lagen, war eine Überlappung der PCR-Amplifikate nicht ganz auszuschließen. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden in weiteren „nested“-PCR-Reaktionen mit spezifischen Primern eingesetzt. Dies erlaubte die Überprüfung des gesamten kodierenden Bereiches des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens. Mit den Primerpaaren, die den 5'-Bereich der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-cDNS amplifizierten, wurden keine Unterschiede zwischen dem homozygoten kranken Alaskan Husky, dem heterozygoten Anlageträger und dem gesunden Kontrolltier beobachtet. Daher wurde vermutet, dass der 251bp lange Unterschied im 3'-Bereich der cDNS der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase liegt. Deswegen wurde das Primerpaar-4 verwendet, welches den 3'-Bereich zwischen den Positionen 1112-1920 amplifiziert. Die erhaltenen Banden folgten dem gleichen Muster wie nach der Amplifikation des gesamten kodierenden Bereiches des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens. Es wurden 2 Banden mit einem 251bp langen Unterschied bei kranken und heterozygoten Alaskan Huskies und nur eine Bande bei gesunden Kontrolltieren und den DH82-Zellen beobachtet. Die Verwendung des Primerpaar-4 erlaubte die Identifikation eines genetischen Defektes im Bereich des Exon15. Um das betroffene Exon untersuchen zu können, wurde das Primerpaar-7 eingesetzt. Die Länge des Amplikons (182bp) ermöglichte die Verwendung eines hochprozentigen Agarosegels (3,5% Agarose), das die elektrophoretische Trennung von Sequenzen mit einem 19bp Längenunterschied erlaubte. Nach der Durchführung der PCR wurde nur das Wildtyp Exon 15 (182bp) bei gesunden Kontrolltieren, beide Exons (182bp und 201bp) beim heterozygoten Anlageträger und nur das abnormale Exon (201bp) beim homozygoten Alaskan Husky beobachtet. Daher konnte vermutet werden, dass mindestens zwei mRNS-Populationen - eine mit dem Wildtyp und eine mit dem abnormalen Exon 15 bei dem heterozygoten Anlageträger - gleichzeitig vorhanden sind. Die durchgeführten Experimente liefern Hinweise dafür, dass bei DH82-Zellen und gesunden Kontrolltieren **eine**, bei heterozygoten Anlageträgern **drei** und bei homozygot kranken Alaskan Huskies **zwei**  $\beta$ -Galaktosidase mRNS-Populationen vorliegen.

#### 5.4. DNS-Isolierung

Zur DNS-Isolierung wurde die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Sambrook et al., 1989) und der Puregene<sup>®</sup> Kit (Biozym, Oldendorf) verwendet. Im Vergleich zur Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion ist die DNS-Isolierung mit dem oben erwähnten Kit zeitsparender und nicht als so umweltbelastend anzusehen, da die Methode auf der Zellyse mittels anionischen Detergenzien beruht. Die gewonnene DNS weist die gleiche Qualität wie nach der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion auf (Gentra TechNotes, 2004).

Da die Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion zeit- und arbeitintensiver als die Isolierung mit dem Puregene<sup>®</sup> Kit ist, wurden alle weiteren Extraktionen mit diesem Kit durchgeführt.

### **5.5. Repräsentative Amplifikation der DNS mit der Phi29-Polymerase**

Die repräsentative Amplifikation der genomischen DNS ermöglichte den Einsatz von Lösungen niedriger DNS-Konzentration und guter Qualität in mehreren PCR-Reaktionen. Die gewonnene DNS ist besonders gut für die Amplifikation kleiner Genabschnitte oder für die Mikrosatellitenanalyse (Janne et al., 2004; Shao et al., 2004; Zhao et al., 2004) geeignet. Im Vergleich zur klassischen Methode der Genanalyse erlaubt die Amplifikation der genomischen DNS mit der Phi29-Polymerase die anschließende Durchführung von mehreren enzymatischen Reaktionen mit vergleichbaren Ergebnissen, ohne dass neue DNS-Proben isoliert werden müssen. Aufgrund des einfachen Arbeitsprotokolls und der hohen Empfindlichkeit erwies sich diese Methode als vorteilhafter. Dies gilt besonders für den Einsatz in der klinischen Gendiagnostik (Estaban et al., 1993; Nelson et al., 2002; Lovmar et al., 2003; Mamone, 2003; Paez et al., 2004).

### **5.6. PCR mit genomischer und Phi29 amplifizierter DNS unter Verwendung spezifischer Primer für das Exon 15 des kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase Gens**

Da Punktmutationen auf dem Exon 15 für die Entstehung der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Hunden der Rasse Shiba beschrieben sind (Yamato et al., 2002), wurde auf genomischer Ebene und auf der mit Phi29 amplifizierten DNS ein Teil des Exon 15 zwischen den Positionen 1528-1710 amplifiziert.

Nach Durchführung der PCR mit DNS-Proben von einem gesunden Kontrolltier, heterozygoten Anlagetägern und einem homozygoten kranken Alaskan Husky wurden 2 Banden (182bp und 201bp) bei den heterozygoten, eine beim gesunden Kontrolltier (182bp) und dem homozygot kranken Alaskan Husky (201bp) beobachtet. Anhand dieser Ergebnisse wurde festgestellt, dass bei gesunden Kontrolltieren das Wildtyp Exon 15, bei heterozygoten Anlagetägern das Wildtyp und ein abnormales Exon 15 mit einer 19bp Duplikation und beim homozygot kranken Alaskan Husky nur das abnormale Exon 15 mit einer 19bp Duplikation vorhanden ist. Die Amplifikation auf genomischer Ebene eignet sich auch für das molekularbiologische Nachweisverfahren der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Hund, da diese Methode einfach durchführbar ist und die Ergebnisse direkt auf einem 3,5%igen Agarosegel auswertbar sind. Die Existenz zweier Varianten des Exon 15 erlaubte die Genotypisierung der untersuchten Hunde in Bezug auf das kanine saure  $\beta$ -Galaktosidase-Gen und die Identifikation des

genetischen Defektes, der für die Entstehung der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky verantwortlich ist.

### **5.7. Sequenzierung von Plasmide und PCR-Produkte**

Die Sequenzierung wurde durchgeführt, um die Spezifität des nachgewiesenen Amplikons zu überprüfen und um genetische Defekte näher zu bestimmen, die der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Alaskan Huskies zu Grunde liegen.

Das mit dem Primerpaar-6 hergestellte PCR-Produkt, welches den ganzen kodierenden Bereich der kaninen  $\beta$ -Galaktosidase beinhaltet (2022 bp), wurde mit dem entsprechenden vorwärts und rückwärts orientierten Primer direkt sequenziert. Alle erhaltenen Sequenzen wurden mit bereits veröffentlichten Abschnitten des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens verglichen. Die bei wiederholten Sequenzierungen der gleichen Proben unregelmäßig aufgetretenen kleinen Sequenzunterschiede wurden als Sequenzierungsfehler eingestuft (Dunning et al., 1988). Mit dem Primerpaar-6 wurden bei kranken und heterozygoten Tieren zwei Banden mit einem Längenunterschied von 251bp beobachtet. Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse wurde das Primerpaar-5 eingesetzt, das ein 1752 bp langes Fragment der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase amplifiziert. Hierbei fanden sich die gleichen Ergebnisse wie mit dem Primerpaar-6.

#### **5.7.1. Molekular-genetische Charakterisierung des genetischen Defektes**

Zur Eingrenzung des genetischen Defektes kamen 4 Primerpaare in der „nested“-PCR zur Anwendung. Hierzu wurde die TOPO-TA-Klonierung unter optimalen Bedingungen eingesetzt, wobei für die 808 bp langen PCR-Produkte eine Senkung der Transformationseffizienz im Vergleich zu PCR-Produkten mit einer Länge von maximal 434 bp zu beobachten war (Twieling und Löffert, 2000; Peist et al., 2002). Durch die Sequenzierungen des Amplikons nach dem Einsatz von Vor- und Rückwärtsprimern aus dem Primerpaar-1 wurde ein 251 bp Verlust auf diesem mRNS-Abschnitt ausgeschlossen. Das gleiche gilt für das Primerpaar-2, welches den Bereich zwischen den Positionen 392-763 amplifiziert. Auch für das Primerpaar-3 wurden keine signifikanten Sequenzunterschiede festgestellt. Alle beobachteten Sequenzunterschiede wurden als Amplifikation- oder Sequenzierungsfehler eingestuft, da diese in mehreren Sequenzierungen nicht wiederholbar waren. Dadurch konnte ein genetischer Defekt im 5' Bereich bis zur Position 1146 der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNS ausgeschlossen werden. Um den mRNS-Abschnitt zwischen den Positionen 1073-1881 der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNS sequenzieren zu können, wurde das Primerpaar-4 verwendet. Hierdurch wurden die Exone 14, 15 und 16, welches das Stoppkodon enthält, amplifiziert. Durch Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte eines gesunden Kontrolltieres, eines heterozygoten Anlageträgers und des homozygot kranken Alaskan Huskies wurde festgestellt, dass bei dem gesunden

Kontrolltier, wie erwartet, die vollständige Sequenz des Exon 15 zu sehen war. Bei dem heterozygoten Alaskan Husky wurden beide Banden, die sich um 251bp unterscheiden, aus dem Agarosegel isoliert, kloniert und anschließend sequenziert. Die Bande in der normalen Größe besteht aus Exon 14, 15 und 16 und die kürzere Bande aus Exon 14, einem 5bp Fragment (5'-GGAAG-3') des Exon 15 und dem Exon 16. Aufgrund der Tatsache, dass ein Exon mit einem Guaninrest („donor splice site“) beginnt und mit einem Adenin- und Guaninrest am 5' („acceptor splice site“) endet, wurde durch die Sequenzanalysen festgestellt, dass bei dem heterozygoten Anlageträger und bei dem homozygoten kranken Alaskan Husky die normalen 5' bzw. 3' Spleißstellen des Exon 15 nicht immer erkannt und verwendet werden, so dass neben dem Verlust des Exon 15 auch eine falsche Spleißstellenerkennung erfolgt (Nelson und Green, 1990; Konarska, 1998; Puig et al., 1999; Garland und Alberts, 2004).

Die Ursache für die Koexistenz von zwei alternativ gespleißten mRNA Populationen ist in der Anwesenheit einer Nukleotidensequenz, welche als „Exon skipping enhancer“ agiert, zu sehen (Chen et al., 1998; Blanchette und Chabot, 1999; Ozkara und Sandhoff, 2003). Die Untersuchung des Exon 15 auf der DNS-Ebene zeigte, dass die 19 bp Duplikation (TCCCAGACTTGCCCCAGGA), welche in dem abnormalen Exon 15 zu finden ist, mehrere Cytosin-Wiederholungen enthält und einen abnormalen „Exon Skipping Enhancer“ bildet, welcher den Verlust des 15 Exon (Exon skipping) durch „falsches“ mRNA-Splicing bedingt (Maquat, 2001; Lewis et al., 2002; Wang et al., 2002; Miriami et al., 2003). Da bei heterozygoten Anlageträgern neben normalen gespleißten mRNA-Molekülen des Exon 15 auch falsch gespleißte mRNA-Moleküle mit einer 19bp Duplikation gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass beide Allele gleichzeitig transkribiert werden. Bei den falsch gespleißten mRNA-Molekülen sowie bei den mRNA-Molekülen mit dem abnormalen Exon 15 findet auch eine Leserasterverschiebung („Frame Shift“) mit Entstehung eines frühzeitigen Stoppkodon statt. Durch die Lokalisierung des frühzeitigen Stoppkodons auf dem letzten Exon können abnormale mRNA-Moleküle den Überwachungsmechanismen entgehen (Henze und Kulozik, 1999; Pitts et al., 2001; Wagner und Andersen, 2002; Alonso und Akam, 2003; Singh und Lykke-Andersen, 2003; Zhang et al., 2003; Deneke et al., 2004). Falls die abnormalen mRNA-Moleküle translatiert werden, kommt es durch die Leserasterverschiebung zum Verlust von Phosphorylierungs-, Glykosylierungs- und Myristoylierungsstellen und einer Protease-Erkennungsstelle. Dadurch erfolgt eine unvollständige posttranslationelle Prozessierung des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Vorläuferproteins, so dass aus dem  $\beta$ -Galaktosidase-Vorläuferprotein kein 64 kDa reifes Protein entstehen kann (Hoogeveen et al., 1986; van der Spoel et al., 2000). Für heterozygote Anlageträger wird der Phänotyp durch die Anwesenheit des normalen Allels determiniert, was für den autosomal-rezessiven Erbgang dieser Erkrankung

spricht, wobei das abnormale Allels zu einer Senkung der enzymatischen Aktivität führt, was für die gleichzeitige Transkription und Translation beider Allele spricht.

## **5.8. Vergleich der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Alaskan Husky mit lysosomalen Speicherkrankheiten in verschiedenen Tierspezies und Mensch**

### **5.8.1. GM<sub>1</sub>-Gangliosidose in verschiedenen Tierspezies**

Die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose wurde bisher bei **5 Hunderassen** (Beagle Mischlinge, Englischer Springer Spaniel, Portugiesischer Wasserhund, Shiba Inu und Alaskan Husky) diagnostiziert. Obwohl die Erstbeschreibung der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Hund im Jahre 1982, erfolgte wurden molekulargenetische Studien nur beim Portugiesischen Wasserhund (Wang et al., 2000) und beim Hund der Rasse Shiba Inu (Yamato et al. 2004) durchgeführt. In beiden Fällen wurden genetische Defekte festgestellt, die einzelne Nukleotide betreffen. Beim Portugiesischen Wasserhund verursacht eine „missense“-Punktmutation auf dem zweiten Exon ( 200G>A) einen Aminosäureaustausch (R60H) und beim Shiba Inu eine Deletion eines Cytosin bei der Position 1668 (1668delC auf Exon 15) die Entstehung eines frühzeitigen Stoppkodons (PTC). Im Gegensatz dazu wurde beim Alaskan Husky eine Duplikation als Ursache für die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beschrieben. Wie beim Shiba Inu verursacht beim Alaskan Husky die Duplikation die Entstehung eines frühzeitigen Stoppkodons (PTC) durch Leserasterverschiebung. In den bisher durchgeführten molekulargenetischen Studien wurde die Anwesenheit des genetischen Defektes als Auslöser der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Hund untersucht, ohne die möglichen Auswirkungen des beobachteten genetischen Defektes auf der RNA-Ebene zu berücksichtigen. Die Vorbereitung der Translation im Sinne eines „pioneer round to translation“ ist aber entscheidend für die Entstehung eines Polypeptids, insbesondere wenn frühzeitige Stoppkodons (PTC) für die Translation abnormaler Polypeptide in Betracht gezogen werden müssen (Maquat, 2002). Die durchgeführten Untersuchungen beim Alaskan Husky zeigten, dass die Duplikation auch als „Exon Skipping Enhancer“ agiert und die Erkennung eine Rekrutierung der 5' bzw. 3' Spleißstellen beeinflusst, was den Verlust von Exon 15 verursacht. Da frühzeitige Stoppkodone, welche aufgrund der Anwesenheit der Duplikation und des abnormalen Spleißens entstehen, auf dem letzten Exon des kaninen sauren β-Galaktosidase-Gens bzw. Transkript lokalisiert sind, werden die abnormalen mRNS-Populationen von den zelleigenen Überwachungsmechanismen nicht erkannt (Thermann et al., 1998; Maquat, 2002). Durch Translation entstehen abnormale saure β-Galaktosidase-Vorläuferproteine, die nicht weiter in die aktive saure β-Galaktosidase umgewandelt werden können.

Bei der **GM<sub>1</sub>-Gangliosidose der Maus** wurden mehrere "missense" Punktmutationen beschrieben, die den Austausch von Aminosäuren hervorrufen (R201C, I51T, R201H, R475Q; Tominaga et al., 2001). Weitergehende molekulargenetische Untersuchungen, wie beim Alaskan Husky auf der RNA-Ebene, wurden aber nicht durchgeführt.

Bei **anderen Tierspezies** (Rind, Schaf, Katze) wurde die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beschrieben, wobei nur klinische und pathologische, jedoch keine molekulargenetischen Untersuchungen durchgeführt wurden.

### 5.8.2. GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Menschen

Bei Menschen wurden als Ursache für die **GM<sub>1</sub>-Gangliosidose** verschiedene "missense" Mutationen beobachtet (Yoshida et al., 1991; Mosna et al., 1992; Boustany et al., 1993; Chakraborty et al., 1994; Paschke et al., 2001; Caciotti et al., 2003). Durch Northern Blot-Analysen konnte eine Korrelation zwischen den einzelnen Mutationen und dem Verlauf der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose aufgezeigt werden (Nishimoto et al., 1991; Boustany et al., 1993). Bei Patienten mit der infantilen Form der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose, die mit der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky vergleichbar ist, wurde eine drastische Senkung der sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA-Menge festgestellt, wobei auch  $\beta$ -Galaktosidase mRNA-Moleküle mit einer "nonsense"-Mutation (R475Ter) nachweisbar waren (Nishimoto et al., 1991). Da die saure  $\beta$ -Galaktosidase-spezifische mRNA immer nachgewiesen wurde, bestand die Vermutung, dass die Mutation selbst eher als die mRNA-Menge die Ursache für die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose ist. Frühzeitige Stoppkodons (PTC) wurden auch bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose des Alaskan Husky beobachtet. Diese werden vermutlich aufgrund ihrer Lokalisation auf dem letzten Exon des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens von den zellulären Überwachungsmechanismen übersehen. Da die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky klinisch, biochemisch und pathologisch (Müller et al., 1998, 2001) diagnostiziert wurde, muss angenommen werden, dass die Leserasterverschiebung und der frühzeitige Abbruch der Translation die Ausfallerscheinungen verursachen. Bei heterozygoten Anlageträgern wurde eine Senkung der sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zu gesunden Tieren festgestellt, was auf die verminderte Menge an Wildtyp mRNA-Molekülen ("gene dosis" Effekt) zurückzuführen ist. Die vorliegenden Beobachtungen zeigen, dass beim Alaskan Husky beide Allele des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase Gens gleichzeitig transkribiert und translatiert werden. Dies wird durch den Nachweis von „complex allele“ als Ursache für die humane GM<sub>1</sub>-Gangliosidose unterstützt (Paschke et al., 2001; Caciotti et al., 2003). Bei der humanen GM<sub>1</sub>-Gangliosidose wurde festgestellt, dass Punktmutationen auch posttranskriptionelle Prozesse beeinflussen können. Zum Beispiel bewirkt die Insertion eines Thymins in der Nähe der Exon 2 5' Spleißstelle

die Verwendung einer kryptischen Spleißstelle und die Insertion eines 20bp Nukleotidenfragments des Intron 1 (Chakraborty et al. 1994; Morrone et al., 1994). Bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose des Alaskan Huskies wurde der Verlust des Exon 15 ohne eine Modifikation der Spleißstellen beobachtet. Als Ursache für die humane GM<sub>1</sub>-Gangliosidose wurden neben Punktmutationen auch andere genetische Defekte: eine 165bp DNS-Duplikation (Positionen 1173-1268), eine 23bp Duplikation auf dem Exon 3 des humanen  $\beta$ -Galaktosidase Gens und eine Deletion des kürzeren Armes der Chromosomen 3, del(3)(pter-p14.2:p11-qter) beschrieben (Hertz et al., 1988; Yoshida et al., 1991; Oshima et al., 1992). In allen diesen Fällen erfolgten keine Untersuchungen über mögliche posttranskriptionelle Auswirkungen der beobachteten genetischen Modifikationen. Im Gegensatz zur humanen GM<sub>1</sub>-Gangliosidose, wo eine Beeinflussung der posttranslationalen Prozesse nur durch eine Punktmutation in unmittelbarer Nähe der normalen 5' Spleißstelle nachgewiesen wurde, konnte der beim Alaskan Husky festgestellten 19bp Duplikation eine wichtige Rolle in der Erkennung und Rekrutierung sowohl der 5' als auch der 3' Spleißstelle zugewiesen werden. Die Duplikation agiert somit als Steuerelement für das mRNS-Spleißen und bevorzugt die Verwendung kryptischer Spleißstellen ohne eine direkte Modifikation der Nukleotidensequenz in der Nähe betroffener Spleißstellen.

### **5.8.3. Andere lysosomale Speicherkrankheiten**

Beim Alaskan Husky wurde festgestellt, dass beide Allele des sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens transkribiert werden. Bei gesunden Tieren, bei denen beide Allele dem Wildtyp entsprechen, ist das Niveau der enzymatischen Aktivität durch die Transkription und Translation beider Allelen aufrechterhalten, wobei die niedrigere enzymatische Aktivität bei heterozygoten Anlageträgern der Anwesenheit nur eines Wildtyp-Allels zugeschrieben wird. Da bei heterozygoten Anlageträgern die enzymatische Aktivität der sauren  $\beta$ -Galaktosidase zwischen normalen und pathologischen Werten liegt (Müller et al., 1998, 2001), wurde vermutet, dass "missense"-Mutationen eine Rolle in der Effizienz der Synthese von aktiven sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Molekülen spielen könnten. Diese Sichtweise wird durch Untersuchungen der molekular-genetischen Basis der **Morquio B Krankheit** (saure  $\beta$ -Galaktosidase-Gendefekt) unterstützt. Die Ursache dieser Krankheit liegt in Punktmutationen, die den Austausch einzelner Aminosäuren (W509C, W273L, R482H, N484K, T500A und G438E) bewirken (Oshima et al., 1991; Bagshaw et al., 2002), aber auch in der Beteiligung mehrere saure  $\beta$ -Galaktosidase-Allele. Die meisten der von der Morquio B Krankheit betroffenen Patienten sind heterozygot, wobei beide Allele dem Wildtyp ausweichen (Hinek et al., 2000; Paschke et al., 2001). Die Rolle einzelner Allele für den Krankheitsverlauf (entweder Morquio oder GM<sub>1</sub>-Gangliosidose) wurde dadurch belegt, dass man zeigen konnte, dass ein Aminosäureaustausch (R482H) zur infantilen Form der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose oder zur

Morquio B Krankheit in Abhängigkeit von der genetischen Modifikation (“second hit“) auf dem zweiten Allel führen kann (Suzuki und Oshima, 1993). Die beim Alaskan Husky erzielten Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zur Morquio B Krankheit, die enzymatische Aktivität bei heterozygoten Individuen durch die Anwesenheit der 19bp Duplikation und das Zusammenspiel beider Allelen bestimmt wird.

In der Pathogenese der **Sandhoff-Krankheit** (GM<sub>2</sub>-Gangliosidose) wurden “missense“-, “nonsense“-Mutationen sowie Deletionen und Inversionen beschrieben (Neote et al., 1990; Brown et al., 1992; Zhan et al., 1994; Gomez-Lira et al., 1998). Durch molekularbiologische Untersuchungen auf RNA-Ebene wurden genetische Modifikationen, welche die postranskriptionelle Prozessierung oder sogar die Stabilität der mRNA beeinflussen, festgestellt (Neote et al., 1990; Brown et al., 1992; Zhan et al., 1994; Gomez-Lira et al., 1998). Die abnormale posttranslationelle Prozessierung betrifft die Erkennung von Exon/Intron Grenzen und dadurch den Einbau von Intronensequenzen (37 Nukleotide von Intron 10) in die mRNA (Fujimaru et al., 1998). Ein Verlust von Exon 3 durch „exon skipping“ - verursacht durch eine Inversion (Yoshizawa et al., 2002) an der 3' Spleißstelle des 2 Intron (IVS -1 G>A) - wurde ebenfalls beschrieben, wobei für die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky eine Duplikation (als „exon skipping enhancer“) für den Exon Verlust (und nicht Mutationen an der Spleißstellen) verantwortlich ist .

Was die mRNA-Stabilität angeht, können im Gegensatz zur GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky die meisten bei der Sandhoff-Krankheit beobachteten frühzeitigen Stoppkodons den Zellüberwachungsmechanismen nicht entgehen und die abnormale mRNA wird abgebaut (Muldoon et al., 1994; Zhan et al., 1994). Hierfür gelten die allgemein gültigen Regeln für die Erkennung des frühzeitigen Stoppkodons (Thermann et al., 1998; Maquat, 2002).

Als genetische Ursache für die **Gaucher-Krankheit** (saure  $\beta$ -Glukosidase Gendefekt) wurden mehrere “missense“-Mutationen (1226Guanin, 1448Cytosin, 1504Thymin, 1604Thymin, 1342Cytosin and 1297Thymin) beschrieben. Genetische Defekte, die entweder das Leseraster verschieben (84 Guanin Guanin), wie dies auch bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky zu beobachten war oder das mRNA-Spleißen verursachen (+1IVS-2), wurden ebenfalls festgestellt (Le Coutre et al., 1997; Beutler et al., 2004). Ein Teil der Mutationen kann die posttranslationelle Prozessierung der mRNA beeinflussen und die Entstehung abnormaler mRNA bewirken [z. B. IVS 8 (-11delC) (-14T>A)] (Romano et al., 2000). Deletionen des ganzen Exon 2 ( $\Delta$ Ex2) und der Verlust von Exon 2 und 115 bp von Exon 3 ( $\Delta$ Ex2-3) wurden weiterhin beobachtet. Die Spleißdefekte sind auf eine Transition G+1-A+1 (IVS2 G+1-A+1) an der Grenze zwischen Exon2/Intron2, welche die „splice donor



consensus site“ zerstört, zurückzuführen (He und Grabowsky, 1992). Bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose des Alaskan Husky wurde der Verlust des Exon 15 beobachtet, verursacht aber durch das Spleißsteuerelement (die 19bp Duplikation innerhalb des betroffenen Exons) und nicht durch direkte Spleißstellenmodifikation wie bei der Gaucher-Krankheit.

Als Ursache für die **Niemann-Pick-Krankheit** (NPC1 Gendefekt) wurden “missense“-Mutationen (Q92R, C177Y, R518W, W942C, R978C, A1035V), Deletionen (2129delA, 3662delT) und Inversionen (IVS23+1 G>A und IVS 6-82 G>A) beschrieben (Greer et al., 1999; Ribeiro et al., 2000). Die Beobachtung einer 56bp Deletion auf Exon 22 der NPC1-mRNS konnte in diesem Fall auf der genomischen Ebene nicht nachgewiesen werden. Die Ursache für diese unerwartete Deletion lag in einer Thymin-Guanin-Transversion auf Exon 22, die als “missense“-Mutation angesehen wurde. Diese Mutation kreiert eine abnormale „donor splice site“, welche für den partiellen Verlust von Exon 22 zuständig ist (Tarugi et al., 2002). Punktmutationen, die das mRNS-Spleißen beeinflussen, wurden wiederholt beobachtet. Zwei davon (I1061T und A1035V) entsprechen dem „klassischen“ Allel, wobei andere (C177Y, R978C und P1007A, G1553A) als Allel „Varianten“ bezeichnen werden können (Yamamoto et al., 1999; Ribeiro et al., 2000). Die Beobachtung, dass Modifikationen auf der mRNS-Ebene nicht immer mit der Anwesenheit eines entsprechenden genetischen Defektes auf der DNS-Ebene übereinstimmen, betont die Notwendigkeit einer genaueren Untersuchung aller genetischen Modifikationen auf DNS- und RNS-Ebene. Auch bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky beeinflusst die beschriebene 19bp Duplikation das mRNS-Spleißen, wobei für die Niemann-Pick-Krankheit nur Punktmutationen, die abnormale Spleißstellen und keine Spleißsteuerelemente kreieren, beschrieben wurden.

Als Ursache für die **Fabry-Krankheit** (alpha-Galaktosidase-Gendefekt) konnten mehr als 200 genetische Defekte, darunter auch einige die das mRNS-Spleißen beeinflussen, identifiziert werden (Toplaoglu et al., 1999; Lai et al., 2003). Für genetische Modifikationen (IVS3 G(-1)> C, IVS4-919 G>A, IVS6-1G>A), welche direkt die Spleißstellen verändern, ist die Auswirkung auf RNS-Ebene leicht nachvollziehbar (Matsumura et al., 1998; Germain und Poenaru, 1999; Ishii et al., 2002). Um die Auswirkungen der Punktmutationen auf das mRNS-Spleißen vorhersagen zu können, werden “splice-site score“ (SSS)-Analysen durchgeführt. Mutationen, die einen niedrigeren “splice-site score“ als normale Spleißstellen erzielen, können während des mRNS-Spleißens bevorzugt werden (Lai et al., 2003). Die SSS-Analysen liefern Hinweise auf mögliche Spleißanomalien für Punktmutationen, die in unmittelbarer Nähe der Spleißstelle lokalisiert sind. Die Auswirkung anderer genetischer Modifikationen sowie von Punktmutationen, die anderswo positioniert sind, können

durch *in vitro* Untersuchungen (z.B. *in vitro* mRNA-Spleißen) nachgewiesen werden. Die Aufklärung eines seltenen alternativen mRNA-Spleißens, welches das Einfügen von 57 Nukleotiden von Intron 4 des alpha-Galaktosidase-Gens in der mRNA bewirkt, verlangte die Konstruktion von Minigenen, welche das ganze Intron 4 enthielten. Durch die Verwendung von Thymin, Cytosin und Guanin an der Mutationsstelle (IVS4-919 G>A) wurde beobachtet, dass Konstrukte mit Guanin oder Thymin vorwiegend normal gespleißt und solche mit Adenin oder Cytosin abnormal gespleißt wurden. Die Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Erkennung eines A/C-reichen Bereiches als "exonic splicing silencer" insbesondere, wenn dieser durch G>C oder G>A Mutation entsteht hin (Lin und Patton, 1995; Ishii et al., 2002). Die 19bp Duplikation, die als Ursache der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky festgestellt wurde, enthält ebenfalls mehrere Cytosin-Wiederholungen. Diese Cytosin/Adenin-Muster (...CCCA...CCCCA...) bilden zusammen mit den 5'- und 3'- benachbarten Nukleotidensequenzen einen "exonic splicing silencer" (ESS), welcher das alternative ohne die vollständige Abschaffung des konstitutiven Spleißens bevorzugt (Watakabe, 1993; Liu et al., 1998; Miriami et al., 2003).

Für die **Tay-Sachs-Krankheit** (alpha-Hexosaminidase-Gendefekt) wurden mehr als 50 "missense"-Mutationen beschrieben, wobei eine 4bp Insertion im Exon 11 (+TATC1278) häufiger auftrat. Diese Mutation verursacht eine Leserasterverschiebung und die Entstehung eines frühzeitigen Stoppkodons, welches die Stabilität der mRNA beeinflusst, da es von den zelleigenen Überwachungsmechanismen erkannt wird (Strasberg et al., 1997; Maquat, 2002). Die bei heterozygoten Anlageträgern und homozygot kranken Alaskan Huskies beobachtete 19bp Duplikation verursacht ebenfalls eine Leserasterverschiebung und die Entstehung eines frühzeitigen Stoppkodons, das aber aufgrund seiner Lokalisation auf dem letzten Exon den Überwachungsmechanismen entgehen kann (Zhan et al., 1994; Thermann et al., 1998). Auch „splice junction mutations“ am 5' Ende des Exon 3 (Guanin-Thymin-Austausch) und des 12 Intron (+1IVS-12) (Tanaka et al., 1999; Ozkara und Sandhoff, 2003) wurden beobachtet. Im Gegenteil zur GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky wird bei der **Tay-Sachs-Krankheit** das mRNA-Spleißgeschehen durch die direkte Veränderung der 5' Spleißstelle beeinflusst.

Weitere Speicherkrankheiten wie das **Goldberg Syndrom (Galaktosialidose)**, die **Faber-Krankheit (Faber Lipogranulomatose)**, die **Krabbe-Krankheit ("globoid-cell leukodystrophy")** werden meistens durch "missense"-Mutationen verursacht, wobei auch abnormales mRNA-Spleißen beschrieben wurde (Shimmoto et al., 1993; De Gasperi et al., 1996; Takiguchi et al., 2000; Bär et al., 2001). In allen Fällen wurde das alternative Spleißen durch Modifikationen der Spleißstellen und nicht wie bei der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose des Alaskan Huskies durch einen genetischer Defekt (19bp

Duplikation) verursacht, der die Erkennung und die Verwendung von Spleißstellen beeinflussen kann.

In der vorliegenden Studie gelang zum erstenmal in der Veterinär- und Humanmedizin die Identifikation und Charakterisierung einer genetischen Modifikation als Ursache für eine rezessiv-autosomal vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die direkt eine Leserasterverschiebung bewirkt, aber auch indirekt durch Beeinflussung des mRNS-Spleißens als "exon skipping enhancer"-Element agiert. Die identifizierte 19bp Duplikation (5' TCCCAGACTTGCCCCAGGA 3') verursacht eine Leserasterverschiebung und agiert gleichzeitig auch als "exon skipping enhancer". Dadurch bewirkt sie den Ausschluß von Exon 15 aus der reifen mRNS. In beiden Fällen treten frühzeitige Stoppkodons auf, welche aufgrund ihrer Lokalisierung auf dem letzten Exon des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens von den Zellüberwachungsmechanismen nicht erkannt werden können. Somit werden auch die abnormalen mRNS-Moleküle translatiert. Die Konsequenz dieser molekularen Ereignisse ist die frühzeitige Beendigung der Translation. Bei heterozygoten Anlageträgern stellt das Wildtyp Allel das aktive Enzym her und die Hunde sind klinisch gesund. Bei homozygoten kranken Alaskan Huskies, wo nur das abnormale Allel anwesend ist, kann keine aktive saure  $\beta$ -Galaktosidase produziert werden.

Die durchgeführten Untersuchungen haben die genetische Grundlage der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky aufgedeckt. Da genetische Veränderungen, die den Austausch einzelner Aminosäuren, die Länge eines Polypeptids oder Erkennungsstellen für posttranslationelle Modifikation bewirken, auch die Proteinfaltung und den intrazellulären Transport beeinflussen können, sollen weitere Untersuchungen zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisation des sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Vorläuferproteins und zur Bestimmung der Zusammensetzung des  $\beta$ -Galaktosidase-Proteinkomplexes durchgeführt werden. Ein weiteres Ziel künftiger Studien kann aber auch in der Suche nach alternativen Methoden zur Heilung von Erbkrankheiten oder zur Linderung deren Symptome liegen. Hierfür sollen in *in vitro* PNA "protein nucleic acid complexes" entwickelt werden, die den aberranten Spleißmechanismus korrigieren können. Diese Erkenntnisse können auch in der Humanmedizin von großer Bedeutung sein, da die kanine GM<sub>1</sub>-Gangliosidose als Model für die infantile Form der humanen GM<sub>1</sub>-Gangliosidose dient.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des genetischen Defektes der GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky und die Etablierung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens zur frühzeitigen Detektion heterozygoter Anlageträger.

Um den genetischen Defekt zu charakterisieren, wurden auf mRNA-Ebene eine PCR mit dscDNS von gesunden Kontrolltieren, heterozygoten Anlageträgern und einem homozygoten kranken Alaskan Husky durchgeführt. Dadurch wurde beim heterozygoten Anlageträger die Anwesenheit zweier mRNA-Populationen nachgewiesen: eine mit dem normalen und eine mit einem abnormalen Exon 15.

Um weitere genetische Defekte bzw. deren Auswirkungen zu untersuchen, wurden mehrere kanine sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Primer in der „nested“-PCR eingesetzt.

Unter Verwendung eines Primerpaares, das den ganzen kodierenden Bereich des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens amplifiziert, wurde bei gesunden Kontrolltieren eine Bande in der erwarteten Größe von 2022bp beobachtet. Bei heterozygoten Anlageträgern und beim kranken Alaskan Husky konnten 2 Banden mit einem 251bp bzw. 270bp Unterschied beobachtet werden. Mittels Sequenzierung wurde deren Zugehörigkeit zur kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA nachgewiesen. Zur Eingrenzung des genetischen Defektes wurden die erhaltenen PCR-Produkte als Matrize in einer „nested“-PCR mit kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase spezifischen Primerpaaren, die den Bereich zwischen den Positionen 79-1881 amplifizieren, eingesetzt. Die daraus resultierenden PCR-Produkte wurden in Plasmidvektoren eingebaut und anschließend in *E. coli* transformiert. Durch Sequenzierung der erhaltenen Plasmide wurde festgestellt, dass alle PCR-Produkte den kodierenden Bereich des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens enthalten. Es konnte ein Verlust von Exon 15 und die Anwesenheit einer 19 Basenpaaren langen Duplikation auf dem Exon 15 zwischen den Positionen 1688-1689 bei heterozygoten Anlageträgern und dem homozygot kranken Alaskan Husky detektiert werden.

Da Mutationen auf dem Exon 15 des sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens, welche die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose bei Hund und Mensch hervorrufen, bekannt sind, wurde eine PCR bei gesunden, heterozygoten Anlageträgern und dem homozygot kranken Hund mit einem Primerpaar durchgeführt, das einen Abschnitt des Exon 15 zwischen den Positionen 1528-1710 amplifiziert. Dadurch wurde auf DNS-Ebene die Anwesenheit eines „Wildtyp“ Exon 15 bei gesunden, eines abnormalen Exon 15 bei kranken und beider Exons bei heterozygoten Tieren nachgewiesen.

Durch die gefundene 19 bp Duplikation in dem kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gen kommt es bei heterozygoten Anlageträgern und dem homozygoten Alaskan Husky zu einer Leserasterverschiebung („frame shift“). Hierdurch entsteht ein frühzeitiges

Stoppkodon, das zur Translation eines abnormalen, 67 Aminosäuren kürzeren, Polypeptids führt, welches im Carboxy-Terminalen Bereich keine Homologie zur kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase aufweist. Die 19bp Duplikation enthält mehrere Cytosin-Wiederholungen. Dieses Cytosin/Adenin-Muster (...CCCA...CCCCA...) bildet zusammen mit den 5'- und 3'- benachbarten Nukleotidsequenzen einen "exonic splicing silencer", welcher das alternative Spleißen bevorzugt, ohne die vollständige Abschaffung des konstitutiven Spleißens. Das alternative Spleißen verursacht den Verlust von Exon 15, bis auf 5 Nukleotide (5'-GGAAG-3'), welche die normalen Spleißstellen enthalten. Dieses Nukleotidfragment verursacht eine Leserasterverschiebung und die Entstehung eines frühzeitiges Stoppkodons, das auf dem letzten Exon des kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Gens lokalisiert ist. Nach der Translation der falsch gespleißten mRNA entsteht ein 151 Aminosäure-verkürztes Polypeptid ohne Homologie mit der kaninen sauren  $\beta$ -Galaktosidase mRNA im Carboxy-Terminalen Bereich.

In der vorliegenden Studie gelang zum erstenmal in der Veterinär- und Humanmedizin die Identifikation und Charakterisierung einer genetischen Modifikation als Ursache für die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose, die direkt eine Leserasterverschiebung bewirkt, aber auch indirekt durch Beeinflussung des mRNA-Spleißens als "exon skipping enhancer"-Element agiert. Da die GM<sub>1</sub>-Gangliosidose beim Alaskan Husky klinisch, biochemisch und pathologisch (Müller et al., 1998, 2001) diagnostiziert wurde, ist die Hypothese aufzustellen, dass die Leserasterverschiebung und der frühzeitige Abbruch der Translation die Ausfallserscheinungen verursachen. Bei heterozygoten Anlageträgern hingegen wurde eine Reduzierung der sauren  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zu gesunden Tieren festgestellt, was auf die verminderte Menge an Wildtyp mRNA-Molekülen („gene dosis“ Effekt) zurückzuführen ist.

## 7. SUMMARY

The aim of the present study was to characterize the underlying genetic defect, in GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis of Alaskan Huskies, and to establish a molecular assay for the detection of heterozygous animals.

To identify the genetic defect which causes the GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis in the Alaskan Husky, PCR with dscDNA from healthy control dogs, heterozygous carrier, homozygous diseased Alaskan Husky and the exon 15 specific primer pair was performed. The presence of two RNA-populations containing the “wild type” and the abnormal exon 15 (with a 19bp duplication between the positions 1688-1698) was observed in heterozygous individuals. In healthy control dog the “wild type” Exon 15 and in homozygous diseased Alaskan Husky the abnormal exon 15 (with the 19bp duplication) was also observed.

The performed PCR allowed us to investigate only the exon 15 of canine *GLB1*. To investigate the presence of other genetic modifications “nested”-PCR with primer pairs covering the entire *GLB1* coding region was performed. For this purpose the SMART<sup>TM</sup>RACE method was used, which allows to obtain full-length cDNA. At first, a gene specific primer pair, to amplify the entire coding region of canine acid  $\beta$ -galactosidase gene was used. Sequencing of all obtained PCR products confirmed their identity with published canine acid  $\beta$ -galactosidase mRNA. The amplified coding region of canine acid  $\beta$ -galactosidase was used as a template, “nested”-PCR with gene specific primer was for amplifying cDNA regions between position 79-1881.

The performed experiments permitted to postulate the existence of one mRNA population in healthy control dogs, three mRNA populations in heterozygous carrier (a normal one, the second carrying the abnormal exon 15 with the duplication and the last one without exon 15) and two mRNA populations (one carrying the abnormal exon 15 and a second one without the exon 15) in homozygous diseased Alaskan Huskies.

PCR experiments using exon 15 specific primers and DNA from heterozygous carriers as well as diseased homozygous and healthy dogs were also carried out. In these experiments the presence of a “wild type” exon 15 in healthy dogs and an abnormal exon 15 (with 19bp duplication) in a diseased homozygous Alaskan Husky was detected. In heterozygous animals both exons were observed.

The 19 bp duplication can act also as “exon skipping enhancer”. Through loss exon 15 (exon skipping) a premature termination codon is generated, because 5 nucleotides (containing the normal 5' and 3' splice site of exon 15) remain attached to the mature mRNA after removing exon 15.

The mRNA molecules of both abnormal mRNA populations (with the abnormal exon 15 and with the exon skipping) are translated because of the frame shift and premature termination codons into shorter abnormal polypeptides. These polypeptides show at the carboxy-terminus (encoded by the exon 15, after the duplication, and by the exon 16) no homology to wild type canine acid beta-galactosidase. Homozygous diseased animals have only the abnormal acid beta-galactosidase gene and can not form an enzymatic active protein. In contrast, in heterozygous Alaskan Huskies the active canine acid  $\beta$ -galactosidase are produced from the wild type allele. Phenotypically the dogs are healthy, but the enzymatic activity is lower compared to normal because of the presence of the abnormal allele.

In the present study was achieved, for the first time in the veterinary and human medicine, the identification and characterization of a genetic modification, causing the GM1-Gangliosidosis, that directly determines a frame shift, but also indirectly act as an “exon skipping enhancer“ element influencing the mRNA-splicing.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abrahams, J.P., van den Berg, M., van Batenburg, E., Pleij, C. Prediction of RNA secondary structure, including pseudo-knotting by computer simulation. *Nucleic Acids. Res.* **18**: 3035-3044, 1990
- Ahern-Rindell, A.J., Kretz, K.A., O'Brien, J.S. Comparison of canine and human acid beta-galactosidase gene. *Am. J. Med. Genet.* **63**:340-345, 1996
- Ahern-Rindell, A.J., Murnane, R.D., Raghavan, S.S., Daniel, P.F., McCluer, R.H., Walkley, S.U., Parish, S.M. Inherited lysosomal storage disease associated with deficiencies of  $\beta$ -galactosidase and alpha-neuraminidase in sheep. *Somat. Cell Mol. Genet.* **15**: 525-533, 1989
- Ahern-Rindell, A.J., Prieur, D.J., Murnane, R.D., Raghavan, S.S., Daniel, P.F., McCluer, R.H., Walkley, S.U., Parish, S.M. Inherited lysosomal storage diseases associated with deficiencies of  $\beta$ -galactosidase and alpha-neuraminidase in sheep. *Am. J. Med. Genet.* **31**: 39-56, 1988
- Ahern-Rindell, A.J., Stone, D.M., Parish, S.M., Leathers, C.W., Orieur, D. J. A neuronal lysosomal storage disease in an sheep associated with a deficiency of  $\beta$ -galactosidase. *Fed. Proc.* **44**: 744, 1985
- Alonso, C., Akam, M. A Hox gene mutation that triggers nonsensemediated RNA decay and affects alternative splicing during Drosophila development. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3873-3880, 2003
- Alphey, L. S. DNA-Sequencing. Bios Scientific Publishers, 35-80, 1997
- Alroy, J, Orgad, U., Ucci, A.A., Schelling, S.H., Schunk, K.L., Warren, C.D., Raghavan, S. S., Kolodny, E.H. Neurovisceral and skeletal GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis in dogs with beta-galactosidase deficiency. *Science* **229**: 470-472, 1985
- Alroy, J., Orgad, U., DeGasperi R., Warren, C.D., Knowles, K., Thalhammer, J.G., Raghavan, S.S. Canine GM1-gangliosidosis. A clinical, morphological, histochemical comparison of two different models. *Am. J. Pathol.* **140**: 675-689, 1992
- Bagshaw, R.D., Zhang, S., Hinek, A., Skomorowski, M.A., Whelan, D., Clarke, J.T., Callahan, J.W. Novel mutations (Asn 484 Lys, Thr 500 Ala, Gly 438 Glu) in Morquio B disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1588**: 247-253, 2002



- Baker, H.J. The gangliosidoses. In: Andrews, E.J., Ward, B.C., Altman, N.N. (eds.) Spontaneous animal models of human diseases. Academic Press. New York, 125-132, 1979
- Baker, H.J., Lindsey, J.R., Creel, R.M. Animal models of human gangliosidose storage diseases. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. **35**:1193-2001, 1976
- Baker, H.J., Walkley, S.U., Rattazzi, M.C., Singer, H.S., Watson, H.L., Wood P.A. Feline gangliosidosis as models of human lysosomal storage diseases. In: Denick, R.J., Patterson, D.F., Scarpelli, D.G. (eds.) Animal models of inherited metabolic diseases. Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 94, Wiley-Liss, Lissabon, New York 203-211, 1982
- Bär, J., Linke, T., Ferlinz, K., Neumann, U., Schuchman, E., Sandhoff, K. Molecular analysis of acid ceramidase deficiency in patients with Farber Disease. Hum. Mut. **17**: 199-209, 2001
- Barker, C.G., Blakemore, W.F., Dell, A., Palmer, A.C., Tiller, P.R., Winchester, B.G. GM<sub>1</sub> gangliosidosis (type 1) in a cat. Biochem. J. **235**: 51-158, 1986
- Barnes, I.C., Kelly, D.F., Pennock, C.A., Randell, J.A.J. Hepatic beta galactosidase and feline GM<sub>1</sub> gangliosidosis. J. Neuropathol. Appl. Neurobiol. **7**: 436-476, 1981
- Baudet, A. Lysosomal storage diseases. In: Isselbacher, K., and Adams, R. (eds.) Harrison's principle of internal medicine. McGraw-Hill, Tokio, 578-528, 1981
- Beutler, E., Beutler, L., West, C. Mutations in the gene encoding cytosolic beta-glucosidase in Gaucher disease. J. Lab. Clin. Med. **144**: 65-68, 2004
- Blakmore, W.F. GM<sub>1</sub> gangliosidosis in a cat. J. Comp. Pathol. **82**:179-185, 1972
- Blanchette, M., Benoit, C. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. EMBO J. **18**:1939-1952, 1999
- Blanchette, M., Chabot, B. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. EMBO J. **18**: 1939-52, 1999
- Boustany, R.M., Qian, W.H., Suzuki, K. Mutations in acid beta-galactosidase cause GM<sub>1</sub> gangliosidosis in American patients. Am. J. Hum Genet. **53**:881-888, 1993

- Breen, M., Jouquand, S., Renier, C., Mellersh, C.S., Hitte, C., Holmes, N.G., Cheron, A., Suter, N., Vignaux, F., Bristow, A.E., Priat, C., McCann, E., Andre, C., Boundy, S., Gitsham, P., Thomas, R., Bridge, W.L., Spriggs, H.F., Ryder, E.J., Curson, A., Sampson, J., Ostrander, E.A., Binns, M.M., Galibert, F. Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes. *Genome Res.* **11**: 1784-95, 2001
- Breslauer, K., Franks, R., Blockers, H., Marky, L. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3746-3750, 1986
- Brown, C. A., McInnes, B., Dodelson de Kremer, R., Mahuran, D. J. Characterization of two HEXB gene mutations in Argentinian patients with Sandhoff disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1180**: 91-98, 1992.
- Burge, C.B., Tuschl A.H., Sharp, P.A. Splicing of precursor to messenger RNAs by the spliceosome. In: Gesteland, R.F., Cech, T.R. and Atkins, J.F (eds.). *The RNA World II*, Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 555-560, 1999
- Caciotti, A., Bardelli, T., Cunningham, J., d'Azzo, A., Zammarchi, E., Morrone A. Modulating action of the new polymorphism L436F detected in the GLB1 gene of a type-II GM1 gangliosidosis patient. *Hum Genet* **113**: 44–50, 2003
- Castagnaro, M., De Maria, R., Baker, H.J., Divari, S., Amedeo, S. A new form of GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis in two Korat cats. 16<sup>th</sup> Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Lillehammer, 23-26 September, 1998
- Cérvos-Navarro, J. Degenerative und metabolische Erkrankungen. In: Doerr, W., Seifert, G., Uehlinger, E. (eds.). *Spezielle pathologische Anatomie: Ein Lehr- und Nachschlagewerk. Band 13 Pathologie des Nervensystems V*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 125-147, 1991
- Chakraborty, S., Rafi, M.A., Wenger, D.A. Mutations in the lysosomal beta-galactosidase gene that cause the adult form of GM1 gangliosidosis. *Am. J. Hum. Genet.* **54**:1004-1013, 1994
- Chen, B., Rigat, B., Curry, C., Mahuran, D. Structure of the *GM2A* Gene: Identification of an exon 2 nonsense mutation and a naturally occurring transcript with an in-Frame deletion of exon 2. *Am. J. Hum. Genet.* **65**: 77–87, 1999
- Cheng, S.H., Smith, A.E. Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther.* **10**: 1275–1281, 2003

Clarke, J.T.R. A clinical guide to inherited metabolic diseases. 2<sup>nd</sup> ed., Cambridge University Press, 271-273, 2002

Claro, E., Wallace, M.A., Fain, J.N., Nair, B.G., Patel, T. B., Shanker, G., Baker, H.J. Altered phosphoinositol-specific phospholipase C and adenyl cyclase in brain cortical membranes of cats with GM<sub>1</sub>- and GM<sub>2</sub>-gangliosidosis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **11**: 265-271, 1991

CLONTECHniques, 1997 – BD Biosciences, Heidelberg:

<http://www.bdbiosciences.com/clontech/archive/JAN97UPD/PDF/Advantage-GC.pdf>

Cox, N.R., Ewald, S. J., Morrisson, N. E., Gentry, A. S., Schuler, M., Baker, H. J. Thymic alteration in feline with GM<sub>1</sub> Gangliosidosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **63**: 335-353, 1998

D'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, A.J., Robinson, D., Galjaard, H. Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4535-4539, 1982

De Maria, R., Divari, S., Bo, S., Sonnio, S., Lotti, D., Capucchio, M.T., Castagnaro, M. Beta-galactosidase deficiency in a Korat cat: a new form of feline GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. *Acta Neuropathol.* **96**: 307-14, 1998

Denecke, J., Kranz, C., Kemming, D., Koch, H.-G., Marquardt, T. An activated 50 cryptic splice site in the human ALG3 gene generates a premature termination codon insensitive to nonsense-mediated mRNA decay in a new case of congenital disorder of glycosylation type Id (CDG-Id). *Hum. Mut.* **23**: 477-486, 2004

Dial, S.M., Mitchell, T.W., LeCouteur, R.A., Wenger, A., Roberts, S.M., Gasper, P.W., Thrall, M.A. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis (type II) in three cats. *J. Anim. Hosp. Assoc.* **30**: 355-359, 1994

Donnelly, W.J.C., Sheahan, B.J., Kelly, M.  $\beta$ -Galactosidase deficiency in GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis of Fresian calves. *Res. Vet. Sci.* **15**: 139-141, 1973

Dunbar C. Gene transfer to hematopoietic stem cells: Implications for gene therapy of human diseases. *Annu. Rev. Med.* **47**: 11-20, 1996

Dunning, A.M., Talmud, P., Humphries, S.E. Errors in the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* **16**:10,393, 1988

- Edwards, H.J. Recessive Disease and Allelic Association. In: Edwards, H. J., Pawlowitzki, I.H., Thompson, E., A., (eds.). Genetic mapping of disease gene. Academic Press, 83-165, 1997
- Estaban, J.A., Salas, M., Blanco, L. Fidelity of Phi29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization. *J. Biol. Chem.* **268**: 2719-2726, 1993
- Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3634-3643, 1999
- Frohman M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002, 1988
- Furie, W.S. Inherent nervous system disorders in cattle: part 2 – lysosomal storage diseases. *Bovine Pract.* **3**: 17-19, 1982
- Garland, A., Aalberts, D. Thermodynamic modeling of donor splice site recognition in pre-mRNA. *Phys. Rev.* **69**: 1- 4, 2004
- De Gasperi, R., Gama Sosa, M.A., Sartorato, E.L., Battistini, S., MacFarlane, H., Gusella, J.F., Krivit, W., Kolodny, E.H. Molecular heterogeneity of late-onset forms of globoid-cell leukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **60**:1264, 1997
- Gentra-TechNotes - Gentra Systems Inc., Mineapolis, MN, USA:  
<http://www.gentra.com/pdf/PL-0113.pdf>
- Gelehrter, T., Collins, F.S., Ginsburg, D. Principles of medical genetics. 2<sup>nd</sup> ed., Lipincott Williams and Wilkins, 91-195, 1998
- Germain, D.P., Poenaru, L. Fabry disease: identification of novel alpha-galactosidase A mutations and molecular carrier detection by use of fluorescent chemical cleavage of mismatches. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**: 708-713, 1999
- Gomez-Lira, M., Perusi, C., Mottes, M., Pignatti, P.F., Rizzuto, N., Gatti, R., Salviati, A. Splicing mutation causes infantile Sandhoff disease. *Am. J. Med. Genet.* **75**:330–333, 1998
- Gonatas, N.K., Gonatas, J. Ultrastructural and biochemical observations on a case of systemic late infantile lipidosis and its relationship to Tay-Sachs disease and gangliosidosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **24**:318-340, 1965

- Gonzales-Licea, A., Carranza-Portocarrero, A., Escobedo, M. Duodenal gangliosidosis in a cat: ultrastructural study. *Am. J. Vet. Res.* **39**:1342-1347, 1978
- Greer, W.L., Dobson, M.J., Girouard, G.S., Byers, D.M., Riddell, D.C., Neumann, P.E. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am. J. Hum. Genet.* **65**:1252-1260, 1999
- Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Lewontin, R.C., Miller, J.H. *Modern genetic analysis*. 2<sup>nd</sup> ed., W.H. Freeman & Company, 313-344, 2002
- Gröne, A., Frisk, A.L., Baumgärtner, W. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **65**:11-27, 1998
- Hahn, C.N., del Pilar Martin, M., Schroder, M., Vanier, M.T., Hara, Y., Suzuki, K., d'Azzo, A. Generalized CNS disease and massive GM1 ganglioside accumulation in mice defective in lysosomal acid beta-galactosidase. *Hum. Mol. Genet.* **6**: 205-211, 1997
- Hannun, Y.A., Bell, R.M. Lysosphingolipids inhibits protein kinase C: implications for the sphingolipidosis. *Science* **235**: 670-674, 1987
- He, G.S., Grabowski, G.A. Gaucher disease: A G+1----A+1 IVS2 splice donor site mutation causing exon 2 skipping in the acid beta-glucosidase mRNA. *Am. J. Hum. Genet.* **51**: 810-820, 1992
- Henze, M., Kulozik, A. A perfect message: RNA surveillance and nonsense mediated decay. *Cell* **96**: 307-319, 1999
- Heptinstall, J, Rapley, R. Spectrophotometric analysis of nucleic acids. In: . Rapley, R. (eds.). *The Nucleic Acid Protocol Handbook*, Humana Press, Totowa USA, 57-63, 2000.
- Hertz, J.M., Coerdts, W., Hahnemann, N., Schwartz, M. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3. Fetal pathology and exclusion of the gene for beta-galactosidase-1 (GLB-1) from 3(p11----p14.2). *Hum. Genet.* **79**:389-391, 1988
- Hinek, A., Zhang, S., Smith, A.C., Callahan, J. W. Impaired elastic-fiber assembly by fibroblasts from patients with either Morquio B disease or infantile GM<sub>1</sub>-gangliosidosis is linked to deficiency in the 67-kD spliced variant of beta-galactosidase. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 23-36, 2000

Hoovegeveen, A.T., Reusser, A.J., Kroos, M., Galjaard, H. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis: defective recognition site on beta-galactosidase precursor. *J. Biol. Chem.* **261**: 5702-5704, 1986

Invitrogen – Technical Notes – Invitrogen Inc., Karlsruhe :  
[http://www.invitrogen.com/content/sfs/brochures/711\\_011003\\_SuperScript\\_bro.pdf](http://www.invitrogen.com/content/sfs/brochures/711_011003_SuperScript_bro.pdf)

Ishii, S., Nakao, S., Minamikawa-Tachino, R., Desnick, R.J., Fan, J.Q. Alternative splicing in the alpha-galactosidase A gene: increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* **70**: 994-1002, 2002

Janne, P.A., Li, C, Zhao, X., Girard, L., Chen, T.H., Minna, J., Christiani, D.C., Johnson, B.E., Meyerson, M. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene* **23**: 2716-2726, 2004

Jäger, J.A., Turner, D.H., Zuker, M. Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA. In: R.F. Doolittle (ed.) "Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences". *Methods in Enzymology* **183**: 281-306, 1990

Johns, P. Gel electrophoresis: Nucleic acids: Essential techniques. John Willey and Sons, 46-98, 1996

Johnson, A.H., Donnelly, W.J.C., Sheahan, B.J. The glycosaminoglycan content of the liver in bovine GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. *Res. Vet. Sci.* **22**: 256-266, 1977

Jolly, R.D., Blackmore, W.F. Inherited lysosomal storage diseases: an essay in comparative medicine. *Vet. Rec.* **92**: 391-400, 1973

Jolly, R.D., Walkley, S.U. Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. *Vet. Pathol.* **34**: 527-548, 1997

Jope, R.S., Baker, H.J., Connor, D.J. Increased acetylcholine synthesis and release in brains of cats with GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. *J. Neurochem.* **46**: 1567-1572, 1986

Karavelas, A.B., Walkley, S.U. Altered patterns of evoked synaptic activity in cortical pyramidal neurons in feline ganglioside storage disease. *Brain Res.* **339**: 329-336, 1985

Kasama, T., Taketomi, T. Abnormalities of cerebral lipids in GM<sub>1</sub> gangliosidosis, infantile, juvenile and chronic type. *Jpn. J. Exp. Med.* **56**: 1-11, 1986

Kaye, D.Y., Alroy, J., Raghavan, S.S., Schwarting, G.A., Adelman, L.S., Runge, V., Gelblum, D., Thalhammer, J.G., Zuniga, G. Dysmyelinogenesis in animal model of GM<sub>1</sub> Gangliosidosis. *Pediatr. Neurol.* **26**: 255-261, 1992

Kim, D.Y., Cho, D.Y., Taylor, H.W. Lysosomal storage disease in an emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.* **33**: 356-366, 1996

Klenk, E. Über die Natur der Phosphatide und anderer Lipoide des Gehirns und der Leber bei Niemann-Picksche Krankheit. *Hoppe-Zeller's Z. Physiol. Chem.* **235**: 24-36, 1935

Koenig, M.L., Jope, R.S., Baker, H.J., Lally, K.M. Reduced Ca<sup>2+</sup> flux in synaptosomes from cats with GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Brain Res.* **424**: 169-176, 1987

Konarska, M.M. Recognition of the 5' splice site by the spliceosome. *Acta Biochim Pol.* **45**: 869-81, 1998

Lai, L.-W., Whitehair, O., Wu, M.-J., O'Meara, M., Lien, Y.-H. Analysis of splice-site mutation of the alpha-galactosidase A gene in Fabry disease. *Clin. Genet.* **63**: 476-482, 2003.

Lake, B. D. Lysosomal and peroxisomal disorders. In: Adams, J. H., Duchen, L.W. (eds.) *Greenfield's Neuropathology*. 6<sup>th</sup> ed., Vol. I, Oxford University Press, New York 658-667, 1997

Le Coutre, P., Demina, A., Beutler, E., Beck, M., Petrides, P.E. Molecular analysis of Gaucher disease: distribution of eight mutations and the complete gene deletion in 27 patients from Germany. *Hum Genet* **99**: 816–821, 1997

Leipold, H. W., Dennis, S.M. Defects of central nervous system. In: Amtstutz, H.E. (ed.) *Bovine Medicine and Surgery*. Am. Vet. Publ., Santa Barbara 1021-1027, 1980

Leon, A., Facci, L., Toffano, S., Sonnino, S., Tettamanti, G. Activation of (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)ATPase by nanomolar concentration of GM<sub>1</sub> ganglioside. *J. Neurochem.* **37**: 350-357, 1981

Lewis, B., Green, R., Brenner, S. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 189–192, 2003

Lin, C.H., Patton, J.G. Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors, *RNA* **1**: 234-245, 1995.

Little, S. ARMS analysis of point mutations. In: Laboratory Methods for Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA. Taylor, G.R. (ed.), CRC Press, Boca Raton, New York, 45-51, 1997

Littlewood, J.D., Herrtage, M.E., Palmer, A.C. Neuronal storage disease in English Springer Spaniel. *Vet. Rec.* **112**: 86-87, 1983

Liu, H.-X., Zhang, M., Krainer, A.R. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* **12**: 1998-2012, 1998

Liu, H.-X., Cartegni, L., Zhang, M. Krainer, A. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in *BRCA1* and other genes. *Nat. genet.* **27**: 55-58, 2001

Löffler, G., Petrides, P.E. *Biochemie und Pathobiochemie*. 5. Auflage Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 461-463, 1997

Lovmar, L., Fredriksson, M., Liljedahl, U., Sigurdsson, S. Syvänen, A.C. Quantitative evaluation by minisequencing and microarrays reveals accurate multiplexed SNP genotyping of whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* **31**:129, 2003

Mamone, T.A. Method for Representatively Amplifying Genomic DNA. *Genomic/Proteomic Technology* April/May 21-24, 2003

Maquat, L.E. The power of point mutations. *Nat. genet.* **27**: 5-7, 2001

Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr. Biol.* **12**:196-197, 2002

Martinez-Contreras, R., Galindo, J.M., Aguilar-Rojas, A., Valdes, J. Two exonic elements in the flanking constitutive exons control the alternative splicing of the alpha exon of the ZO-1 pre-mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* **30**: 71-83, 2003

Matsuda, J., Suzuki, O., Oshima, A., Ogura, A., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Asano, T., Takimoto, K., Sukegawa, K., Suzuki, Y., Naiki, M. Beta-galactosidase-deficient mouse as an animal model for GM1-gangliosidosis. *Glycoconj J.* **14**: 729-36, 1997

Matsumura, T., Osaka, H., Sugiyama, N., Kawanishi, C., Maruyama, Y., Suzuki, K., Onishi, H., Yamada, Y., Morita, M., Aoki, M., Kosaka, K. Novel acceptor splice site mutation in the invariant AG of intron 6 of alpha-galactosidase A gene, causing Fabry disease. *Hum. Mutat.* **11**: 483, 1998



- Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L., Chenchik, A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1558-1560, 1999
- McCaskill, J.S. The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers*, **29**: 1105-19, 1990
- McPherson, M., Møller, S.G., Beynon, R., Howe, C. PCR (Basics: from background to bench), Springer Verlag Telos, 9-49, 2000
- Mihatsch, M.J., Ohnacker, H., Riede, U.N., Remagen, W., von Bassewitz, D.B., Schlupper, J., Meier-Ruge W. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis II. Morphological aspects and review of the literature. *Helv. Pediatr. Acta* **28**: 521-542, 1973
- Miriami, E., Margalit, H., Sperling, R. Conserved sequence elements associated with exon skipping. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1974-1983, 2003
- Morreau, H., Galjart, N.J., Gillemans, N., Willemsen, R., van der Horst, G.T., d'Azzo, A. Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. *J. Biol. Chem.* **264**: 20655-20663, 1989
- Morrone, A., Bardelli, T., Donati, M.A., Giorgi, M., Di Rocco, M., Gatti, R., Parini, R., Ricci, R., Taddeucci, G., D'Azzo, A., Zammarchi, E. Beta-galactosidase gene mutations affecting the lysosomal enzyme and the elastin-binding protein in GM<sub>1</sub>-gangliosidosis patients with cardiac involvement. *Hum. Mutat.* **15**: 354-366, 2000
- Morrone, A., Morreau, H., Zhou, X.Y., Zammarchi, E., Kleijer, W.J., Galjaard, H., d'Azzo, A. Insertion of a T next to the donor splice site of intron 1 causes aberrantly spliced mRNA in a case of infantile GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Hum. Mutat.* **13**:112-120, 1994
- Mosleley, C., Mullis, P., Prince, M., Phillips III, J. An exon splice enhancer mutation causes autosomal dominant GH deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 847-852, 2002
- Mosna, G., Fattore, S., Tubiello, G., Brocca, S., Trubia, M., Gianazza, E., Gatti, R., Danesino, C., Minelli, A., Piantanida, M. A homozygous missense arginine to histidine substitution at position 482 of the beta-galactosidase in an Italian infantile GM<sub>1</sub>-gangliosidosis patient. *Hum. Genet.* **90**: 247-250, 1992

- Muldoon, L.L., Neuwelt, E.A., Pagel, M.A., Weiss, D.L. Characterization of the molecular defect in a feline model for type II GM2 gangliosidosis (Sandhoff disease). *Am. J. Pathol.* **144**:1109-18 1994
- Müller, G., Baumgärtner, W., Sewell, A., Kustremann-Kuhn, B. Biochemical findings in a breeding colony of Alaskan Huskies suffering from GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**: 430-1, 1998
- Müller, G. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis beim Alaskan Huskies unter besonderer Berücksichtigung der neuropathologischen Veränderungen. *Vet. Med. Diss.*, Gießen, 2000
- Müller, G., Alldinger, S., Moritz, A., Zurbriggen, A., Kirchhof, N., Sewell, A., Baumgärtner, W. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis in Alaskan huskies: clinical and pathologic findings. *Vet. Pathol.* **38**: 281-290, 2001
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273, 1986
- Murnane, R.D., Ahern-Rindell, A.J., Prieur, D.J. Ultrastructural lesions of ovine GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis. *Mod. Pathol.* **4**: 755-762, 1991
- Murnane, R.D., Prieur, D.J., Ahern-Rindell, A.J., Parish, S.M., Collier, L.L. The lesions of an ovine with lysosomal storage disease. Initial characterization. *Am. J. Pathol.* **134**: 263-270, 1989
- Murray, J.A., Blakemore, W.F., Barnett, K.C. Ocular lesions in cats with GM<sub>1</sub>-gangliosidosis with visceral involvement. *J. Small Anim. Pract.* **18**: 1-10, 1977
- Mutoh, T., Tokuda, A., Toshiaki, M., Hamaguchi, M., Fujiki, N. Ganglioside GM<sub>1</sub> binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 5087-5091, 1995
- Muyzer, G., Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:127-141, 1998
- Nelson, J.R., Cai, Y.C., Giesler, T.L. TempliPhi, phi29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *Biotechniques Suppl.* 144–147, 2002.

- Nelson, K., Green, M. Mechanism for cryptic splice site activation during pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6253-6357, 1990
- Neote, K., Brown, C.A., Mahuran, D.J., Gravel, R.A. Translation initiation in the HEXB gene encoding the beta-subunit of human beta-hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **265**: 20799-20806, 1990
- Nishimoto, J., Nanba, E., Inui, K., Okada, S., Suzuki, K. GM<sub>1</sub> gangliosidosis (genetic beta-galactosidase deficiency): Identification of four mutations in different clinical phenotypes among Japanese patients. *Am. J. Hum. Genet.* **49**: 566-574, 1991
- Nowakowski, R.W., Thompson, J.N., Baker, H. J. Diagnosis of feline GM<sub>1</sub>-gangliosidosis by enzyme assay of cultured conjunctival cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**: 487-490, 1988
- O'Brien, J.S.  $\beta$ -galactosidase deficiency (GM<sub>1</sub>-gangliosidosis, galactosialidosis and Morquio Syndrome type B); Ganglioside sialidase deficiency (Mucopolidosis IV). In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W., Valle, D. (eds.). *The metabolic basis of inherited disease*. 6<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York, 1799-1806, 1989
- O'Brien, J.S. The gangliosidosis. In: Stanbury J.B., Wyngaarden, J.B, Frederickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (eds.). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 5<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York, 1799-1806, 1983
- Okada, S., O'Brien, J.S. Generalized gangliosidosis:  $\beta$ -galactosidase deficiency. *Science* **160**: 1002, 1968
- Orgad, U., Schelling, S., Alroy, J., Rosenberg, A., Schiller, A. Skeletal lesions in lysosomal storage diseases. *Lab. Invest.* **60**: 68, 1989
- Oshima, A., Yoshida, K., Ishizaki, A., Shimmoto, M., Fukuhara, Y., Sakuraba, H., Suzuki, Y. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis: tandem duplication within exon 3 of beta-galactosidase gene in an infantile patient. *Clin. Genet.* **41**:235-238, 1992
- Oshima, A., Yoshida, K., Shimmoto, M., Fukuhara, Y. Sakuraba, H., Suzuki, Y. Human beta-galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am. J. Hum. Genet.* **49**: 1091-1093, 1991
- Ozkara, H.A., Sandhoff, K. A new point mutation (G412 to A) at the last nucleotide of exon 3 of hexosaminidase alpha-subunit gene affects splicing. *Brain. Dev.* **25**: 203-206, 2003

- Paez, J.G., Lin, M., Beroukhim, R., Lee, J.C., Zhao, X., Richter, D.J., Gabriel, S., Herman, P., Sasaki, H., Altshuler, D., Li, C., Meyerson, M., Sellers, W.R. Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification. *Nucleic Acids Res.* **32**:e71, 2004
- Paschke, E., Milos, I., Kreimer-Erlacher, H., Hoefler, G., Beck, M., Hoeltzenbein, M., Kleijer, W., Levade, T., Michelakakis, H., Radeva, B. Mutation analyses in 17 patients with deficiency in acid beta-galactosidase: three novel point mutations and high correlation of mutation W273L with Morquio disease type B. *Hum. Genet.* **109**:159-166, 2001
- Pasternak, J.J. An introduction to human molecular genetics: mechanism of inherited diseases. Wiley-Liss, 41-76, 1999
- Peist, R., Hansel, D., Rütjes, T., Löffert, D. Increasing efficiency of cloning products. *Qiagen News* **3**, 2002
- Pitts, S., Harjit, K., Stancovic, T., Stewart, G., Last, J., Bedenham, T., Armstrong, S., Piane, M., Chessa, L., Taylor, M., Byrd, P. hMRE11: genomic structure and a null mutation identified in a transcript protected from nonsense-mediated mRNA decay. *Hum. Mol. Genetics* **10**: 1155-1162, 2001
- Prieur, D.J., Ahern-Rindell, A.J., Murnane, R.D. Ovine GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Am. J. Pathol.* **139**: 1511-1513, 1991
- Primrose, S.B. Principles of Genome Analysis: A guide to mapping and sequencing DNA from different organisms. 2<sup>nd</sup> ed., Blackwell Publishers, 45-67, 1998
- Prior, T.W., Papp, A.C., Snyder, P.J., Sedra, M.S., Western, L.M., Bartolo, C., Moxley, R.T., Mendell, J.R. Heteroduplex analysis of the dystrophin gene: application to point mutation and carrier detection. *Am. J. Med. Genet.* **50**: 68-73, 1994
- Puig, O., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Séraphin, B. Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection. *Genes Dev.* **13**: 569–580, 1999
- Purpura, D.P., Pappas, G.D., Baker, J.J. Fine structures of meganeurites and secondary growth process in feline GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. *Brain Res.* **143**: 1-12, 1981
- Read, D.H., Harrington, D., Keenan, T.W., Hinsman, E.J. Neuronal-visceral GM<sub>1</sub>-gangliosidosis in dog with beta-galactosidase deficiency. *Science* **194**: 442-445, 1976

- Ribeiro, I., Marcão, A., Amaral, O., Sá Miranda, M.C., Vanier, T.M., Millat, G. Niemann-Pick type C disease: NPC1 mutations associated with severe and mild cellular cholesterol trafficking alterations. *Hum. Genet.* **109** :24–32, 2001
- Richard, M.M., Erenberg, G, Triggs-Raine, B.L. An A-to-G mutation at the +3 position of intron 8 of the HEXA gene is associated with exon 8 skipping and Tay-Sachs disease. *Biochem. Mol. Med.* **55**: 74-76, 1995
- Rodriguez, M., O'Brien, J.S., Garret, R.S., Powell, H.C. Canine GM<sub>1</sub> gangliosidosis. an ultrastructural and biochemical study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **41**: 618-629, 1982
- Romano, M., Danek, G.M., Baralle, F.E., Mazzotti, R., Filocamo, M. Functional characterization of the novel mutation IVS 8 (-11delC) (-14T>A) in the intron 8 of the glucocerebrosidase gene of two Italian siblings with Gaucher disease type I. *Blood Cells Mol. Dis.* **26**: 171-176, 2000
- Rusnati, M., Urbinati, C., Tanghetti, E., Dell'era, P., Lortat-Jacob, H., Presta, M. Cell membrane GM<sub>1</sub> ganglioside is a functional coreceptor for fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Am. Sci. USA*, **99**: 4367-4372, 2002
- Rychlik, W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol. Biotechnol.* **3**: 129-134, 1995
- Sadek, C., P. Troubleshooting HPLC Systems: A Bench manual. Willey-Interscience, 71-100, 1999
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, J. T, Mullis, K. B. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Laboratory Press, 9.16-9.23, 1989
- Sambrook, J., Russel, D. Molecular cloning: A laboratory manual. 3<sup>th</sup> ed., Cold Spring Laboratory Press, 2-234, 1.31-1.38, 2001
- Saunders, G.K., Wood, P.A., Myers, R.K., Shell, L.G., Carithers, R. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis in Portuguese water dog: pathologic and biochemical findings. *Vet. Pathol.* **25**: 265-269, 1988
- Sazani, P., Kole, R. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J.Clin. Invest.***112**: 481-486, 2003

- Scheinert P. Nachweis von Mutationen: Nachweis bekannter Mutationen. *BioTec* **5/6**: 60-62, 1995
- Svennerholm L. The chemical structure of normal brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**: 436-441, 1962
- Svennerholm L. The gangliosides. *J. Lipid. Res.* **5**: 145-155, 1964
- Schwarz, A., Futterman, A.F. The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of antiglycoside antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1286**: 247-267, 1996
- Shao, W., Tang, J., Dorak, M.T., Song, W., Lobashevsky, E., Cobbs, C.S., Wrench, M.R., Kaslow, R.A. Molecular typing of human leukocyte antigen and related polymorphisms following whole genome amplification. *Tissue Antigens* **64**: 286, 2004
- Sheahan, B.J., Roche, E., Donnelly, W.J.C. Studies on cultured skin fibroblasts from calves with GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *J. Comp. Pathol.* **87**: 205-211, 1977
- Sheahan, B.J., Donnelly, W.J.C. Enzyme histochemical and ultrastructural alterations in brains of Friesian calves with GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Acta Neuropathol.* **30**: 73-84, 1974
- Sheahan, B.J., Donnelly, W.J.C., Grimes, T. D. Ocular pathology of bovine GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Acta Neuropathol.* **41**: 91-95, 1978
- Shimmoto, M., Funakara, Y., Itoh, K., Oshima, A., Sakuraba, H., Suzuki, Y. Protective protein gene mutations in galactosialidosis. *J. Clin. Invest.* **91**: 2393-2398, 1993
- Singh, G., Lykke-Andersen, J. New insights into the formation of active nonsense-mediated decay complexes. *TRENDS Biochem. Sci.* **28**: 464- 466, 2003
- Skelly, B.J., Jeffrey, M., Franklin, R.J.M., Winchester, B.G. A new form of ovine GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis. *Acta Neuropathol.* **89**: 374-379, 1995
- Ståhlberg, A., Håkansson, J., Xian, X., Semb, H., Kubista, M. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA quantification. *Clin. Chem.* **50**: 509-515, 2004
- Stansbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Frederickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S. The metabolic basis of inherited diseases. 5<sup>th</sup> Edition McGraw-Hill, New York, 345-420, 1983

Strasberg, P., Warren, I., Skomorowski, M.-A., Feigenbaum, A. Homozygosity for the Common Ashkenazi Jewish Tay-Sachs +1 IVS-12 Splice-Junction Mutation: First Report. *Hum. Mut.* **10**: 82–83, 1997

Steiss, J.E., Baker, H.J., Braund, K.G., Cox, N.R., Wright, J.C. Profile of electrodiagnostic abnormalities in cats with GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 706-709, 1997

Strachan, T., Read, P.A. *Human molecular genetics*. 3<sup>rd</sup> ed., Garland Science / Taylor and Francis Group, 401-422, 2003

Suzuki, Y. What we learned from beta-galactosidase deficient knockout mice? *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **43**: 2303-8, 1998

Suzuki, Y., Oshima, A. A beta-galactosidase gene mutation identified in both Morquio B disease and infantile G(M1) gangliosidosis. (Letter) *Hum. Genet.* **91**: 407, 1993

Suzuki, Y., Sakuraba, H., Oshima, A.  $\beta$ -galactosidase deficiency ( $\beta$ -gangliosidosis): GM<sub>1</sub> gangliosidosis and Morquio B disease. Scriver, C., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.) *The molecular basis of inherited disease*. 7<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York, 2785-2823, 1995

Swanson, D. Smart Race To The Finish: Clontech Enters Smart Race For cDNA Amplification. *The Scientist* **13**: 21, 1999

Takiguchi, K., Itoh, K., Shimamoto, M., Doi, H., Sakuraba, H. Structural and functional study of K453 mutant protective protein/cathepsin A causing the late infantile form of galactosialidosis. *J. Hum. Genet.* **45**: 200-206, 2000

Tanaka, A., Fujimaru, M., Choeh, K., Ishiki, G. Novel mutations, including the second most common in Japan, in the beta-hexosaminidase alpha subunit gene, and a simple screening of Japanese patients with Tay-Sachs disease. *J. Hum. Genet.* **44**: 91-95, 1999

Thermann, R., Neu-Yilik, G., Deters, A., Wehr, U.F.K., Hagemeyer, C., Hentze, M.W., Kulozik, A.E. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation, *EMBO J.* **17**: 3484–3494, 1998

Tominaga, L., Ogawa, Y., Taniguchi, M., Ohno, K., Matsuda, J., Oshima, A., Suzuki, Y., Nanba, E. Galactonojirimycin derivatives restore mutant human beta-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev.* **23**: 284-287, 2001

- Toplaoglu, A.K., Ashley, G.A., Tong, B., Shabbeer, J., Astrin, K.H., Eng, C.M., Desnick, R.J. Twenty novel mutations in the alpha-galactosidase A gene causing Fabry disease. *Mol. Med.* **5**:806-811, 1999
- Twieling, G., Löffert, D. Increased efficiency of PCR-product cloning using QIAquick® PCR Purification Kits. *Qiagen News* **4**, 2000
- Uitterlinden, A.G., Vijq, J. Two-Dimensional DNA Typing: A Parallel Approach to Genome Analysis (Ellis Horwood Series in Molecular Biology). CRC Press, 1-28, 1994
- Van der Spoel A., Bonten E, d'Azzo A. Processing of lysosomal beta-galactosidase. The C-terminal precursor fragment is an essential domain of the mature enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**: 10035-10040, 2000
- Van Hoof, F. GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. In: Hers, H.G., van Hoof. F. (eds) *Lysosomes and storage diseases*. Academic Press, New York, London, 217-259, 1973
- Vockley, J., Rogan, K. P, Anderson, D.B., Willard, J., Seelan, R.S., Smith, I. D., Wanguo, L. Exon skipping in IVD RNA processing in idoaleric acidemia caused by point mutation in the coding region of the IVD Gene. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 356-367, 2000
- Von der Hellen, C. *Lysosomale Speicherkrankheiten bei Tieren, eine Literaturübersicht*. Med. Vet. Diss., Hannover, 1990
- Wagner, E., Lykke-Andersen, J. mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell Sci.* **115**: 3033-3038, 2002
- Walkley, S.U. Cellular pathology of lysosomal storage disorders. *Brain. Pathol.* **8**: 175-193, 1998
- Walkley, S.U., Baker, H.J., Purpura, D.P. Morphological changes in feline GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis: a Golgi study. Ros, F.C., Behan, P.O. (eds.) *Animal Models of Neurological Diseases*. Pitman, London, 419-429, 1980
- Walkley, S.U., Purpura, D.P., Baker, H.J. Development of abnormal neuron morphology in feline gangliosidosis. *Soc. Neurosci. Abst.* **5**:520, 1979
- Walkley, S.U., Wurzelmann, S., Purpura, D.P. Ultrastructures of neurites and meganeurites of cortical pyramidal neurons in feline gangliosidosis revealed by the combined Golgi EM technique. *Brain Res.* **51**: 167-178, 1981



- Wang, J., Chang Y.F., Hamilton J., Wilkinson, M. Nonsense-associated altered Splicing: A frame dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol. Cell* **10**: 88-93, 2002
- Wang, Z.H., Zeng, B., Shibuya, H., Johnson, G.S., Alroy, J., Pastores, G.M., Raghavan, S., Kolodny, E.H. Isolation and characterization of the normal canine beta-galactosidase gene and its mutation in a dog model of GM1-Gangliosidosis. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**: 593-606, 2000
- Warner, T.G., O'Brien, J.S. Structure analysis of the major oligosaccharides accumulating in canine GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis in liver. *J. Biol. Chem.* **257**: 224-232, 1982
- Watakabe, A., Tanaka, K., Shimura, Y. The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* **7**: 407-418, 1993
- Wiegandt, H. Ganglioside. *Ergeb. Physiol.* **57**: 190-222, 1964
- Wiegandt, H. The chemical constitution of gangliosides of vertebrate nervous system. *Behav. Brain Res.* **66**: 85-97, 1995
- Williams, P.M., Ayly, L.T. Real time quantitative PCR: uses in discovery research. Innis, M.A. (ed.) *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*, Academic Press, 365-377, 1999
- Winchester, B., Vellodi A., Young E. The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 150–154, 2000
- Woerfel, G., Bindereif, A.. *In vitro* selection of exonic splicing enhancer sequences: Identification of novel CD44 enhancers. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3204-3211, 2001
- Wong, L.J., Wladyka, C., Mardach-Verdon, R. A mitochondrial DNA mutation in a patient with an extensive family history of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* **30**: 118-22, 2004
- Wood, P.A., McBride, M.R., Baker, H.J., Christian, S.T. Fluorescence polarization analysis, lipid composition, and Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase kinetics of synaptosomal membrane in GM<sub>1</sub> and GM<sub>2</sub> gangliosidosis. *J. Neurochem.* **44**: 947-956, 1985
- Yamamoto, T., Nanba, T., Ninomiya, H., Higaki, K., Taniguchi, M., Zhang, H., Akaboshi, S., Watanabe, Y., Takeshima, T., Inui, K., Okada, S., Tanaka, A., Sakuragawa, N, Millat, G., Vanier, M.T., Morris, J.A., Pentchev, P.G., Ohno, K. NPC1

gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Hum. Genet.* **105**: 10–16, 1999

Yamato, O., Kobayashi, A., Satoh, H., Endoh, D., Shoda, T., Masuoka, Y., Hatakeyama, A., Jo, E.O., Asano, T., Yonemura, M., Yamasaki, M., Maede, Y. Comparison of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay and enzyme assay for diagnosis of G(M1)-gangliosidosis in Shiba dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**: 299-304, 2004

Yamato, O., Masuoka, Y., Yonemura, M., Hatakeyama, A., Satoh, H., Kobayashi, A., Nakayama, M., Asano, T., Shoda, T., Yamasaki, M., Ochiai, K., Umemura, T., Maede, Y. Clinical and clinico-pathologic characteristics of Shiba dogs with a deficiency of lysosomal acid beta-galactosidase: a canine model of human GM<sub>1</sub> gangliosidosis. *J. Vet. Med. Sci.* **65**: 213-7, 2003

Yang, L. J.-S., Zeller, C.B., Shaper, N.L, Kiso, M., Hasegawa, A., Shapiro, R.E., Schnaar, R.L. Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 814-818, 1996

Yoshida, K., Oshima, A., Shimmoto, M., Fukuhara, Y., Sakuraba, H., Yanagisawa, N., Suzuki, Y. Human beta-galactosidase gene mutations in GM1-gangliosidosis: a common mutation among Japanese adult/chronic cases. *Am. J. Hum. Genet.* **49**: 435-442, 1991

Yu, R.K., Saito, M. Structure and localization of gangliosides. In: Margolis, R. U., Margolis, R. K. (eds.) *Neurobiology of glycoconjugates*. Raven Press, New York, 1-42, 1989

Zeller, C.B., Marchase, R.B. Gangliosides as modulators of cell function. *Am. J. Physiol.* **262**: C 1341-1355, 1992

Zhan, Z.X., Wakamatsu, N., Mules, E.H., Thomas, G.H., Gravel, R.A. Impact of premature stop codons on mRNA levels in infantile Sandhoff disease. *Hum. Mol. Genet.* **3**:139–145, 1994

Zhang, X., Lee, J., Chasin, L. The effect of nonsense codons of splicing: A genomic analysis. *RNA* **9**: 637-639, 2003

Zhao X., Li, C., Paez, J.G., Chin, K., Janne, P.A., Chen, T.H., Girard, L., Minna, J., Christiani, D., Leo, C., Gray, J.W., Sellers, W.R., Meyerson, M. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res.***64**: 3060-3071, 2004

Zhu, Y.Y., Machleder, E.M., Chenchik, A., Li, R., Siebert, P.D. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* **30**: 892-897, 2001

Zhumabayeva, B., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D. Use of SMART-generated cDNA for gene expression studies in multiple human tumors. *Biotechniques* **30**: 158-163, 2001

## 9. ANHANG

### 9.1. Bezugsquellen für Chemikalien, Enzyme und Kits

**- ABgene, Hamburg**

“Superladder Low SSL-100™ “(100 bp Längenstandard), SSL-100S  
 LAMBDA *HIND* III (DNS-Längestandard), AB-0200  
 “Typ II sample loading buffer” (6x) AB-0584

**- Amersham Biosciences Freiburg**

GenomiPhi™ DNS Amplifikationskit,

**- Biozym, Oldendorf (Verteter von Gentra Inc., Mineapolis MN, USA)**

Puregene® Kit Kat. Nr. 202005

**- BD Biosciences, Heidelberg, Palo Alto, CA., USA**

“SMART™ RACE Amplification Kit”, Kat.-Nr. 634914  
 Advantage™ -GC 2 PCR Polymerase Mix, Kat.-Nr. 639112

**- ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim**

“Minimum Essential Medium Eagle“ (MEME) mit Earlescher Salzlösung und  
 Glutamin ohne Natriumbikarbonat, Kat.-No. 10-101-22  
 Trypsin-EDTA, A 2081082

**- Invitrogen, Karlsruhe**

TRIZOL, Kat. Nr. 15596-026  
 Agarose 1000, Kat. No. 10975-035  
 “Superscript II“ reverse Transkriptase, Kat.-Nr. 18064-022  
 DH5α™ Library Efficiency, Kat. Nr. 18263-012  
 “pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Cloning Kit”, Kat.-Nr. K 4800-01  
 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) – Kat.-Nr. 10381-010

**- Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren**

NucleoBond® PC100 Plasmid DNA Purification Kit, Kat.-Nr. 740753

**- MBI Fermentas, St. Leon-Rot**

Proteinase K, Kat.-Nr. E00491

**- Merck KGaA, Darmstadt**

D-Glukose, Kat.-Nr. 7466354  
 Isoamylalkohol p.a., Art.-Nr. 100979

**- Novagen-Merck Biosciences GmbH, Darmstadt**

“KOD Hot Start DNS Polymerase”, Kat.-Nr. 71086-3

**- PAA, Cölbe**

FKS (fötales Kälberserum) Kat.-Nr. A11-346

**- Perkin Elmer, Weiterstadt**

„GeneAmp RNA PCR Core Kit“, Kat.-Nr. N808-0143

**- Roche Biosciences GmbH, Mannheim**

XVI 250 bp “DNA Ladder“, Kat.-Nr. 1855638

Taq-Polymerase, Kat. Nr. 1146165

**- Carl Roth GmbH & Co.**

Isopropanol (2-Propanol) p.a., Art.-Nr. 6752.4

Äthanol p.a., Art.-Nr. 9065.4

Tryptone, Kat.-Nr. 8952.2

NaCl p.a., Art.-Nr. 9265.2

Chloroform p.a., Art.-Nr. 7331.1

**- Serva, Heidelberg**

Hefenextrakt, Kat. No. 24540

**- Sigma-Aldrich, Taufkirchen**

Agar für die Mikrobiologie, Kat.-No. A 5306

EDTA-Na<sub>2</sub> dihydrate (“Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt“), Kat. Nr. E 5134

SDS („Sodium dodecyl sulfate“), Kat.-Nr. 1857

“REDTaq® ReadyMix“-PCR Mix, Kat.-Nr. 2523

“Trizma® hydrochloride“, Kat.-Nr. T 5941

“Ampicillin sodium salt“, Kat.-Nr. A 0166

“Water PCR-grade“ (DNase/RNase freies Wasser), Kat.-Nr. W 4502

Penicillin-Streptomycin, Kat.-Nr. P0781

Natriumbikarbonat, Kat.-Nr. 3817

**- Qiagen GmbH, Hilden**

QIAquick® PCR Purification Kit, Kat.-Nr. 28104

QIAquick Gel Extraction Kit, Kat.-Nr. 28704

RNase-Free „DNase Set“, Kat.-Nr. 79254

RNeasy Kit, Kat.-Nr. 74104

## **9.2. Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel**

**- Amersham Biosciences, Freiburg**

GeneQuant 2, Spektralphotometer

**- Besier, Wiesbaden**

Polaroid Film Noir&Blanc A 667 Tageslichtfilm

**- Biometra, Göttingen**

BioDoc Analyse Geldokumentation System

**- Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf**

Multicycler PTC 200

Reaktionsgefäße, ultradünn 0,5 ml , Kat.-Nr. 710910

Reaktionsgefäße, ultradünn 0,2 ml, Kat.-Nr. 710920

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 1000 µl, Kat.-Nr. 781002

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 200 µl, Kat.-Nr. 780202

Safeseal-Tips (gestopfte Pipettenspitzen) bis 100 µl, Kat.-Nr. 780027

**- Consort, Belgien**

“Microcomputer Electrophoresis Power Supply”

**- Eastman Kodak Inc. , USA**

“Kodak Gel-Dokumentation System Version 1.0“

**- Eppendorf GmbH, Hamburg**

Eppendorfszentrifuge 5415 C

**- Haereus, Hanau**

“Function line™“, Begasungsbrutschrank Typ B5060 EK CO<sub>2</sub>

Zentrifuge-Labofuge 400R

**- Keutz, Reiskirchen**

Flachgel-Elektrophoresekammer “Midi”, horizontal, 0030191-00

Gießvorrichtung, Kat. Nr. 0030191-03

**- Mettler GmbH, Gießen**

Präzisionswaage PM 4600 Delta Range

Präzisionswaage AE 100

**- Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg**

Umkehrmikroskop IX 70

**- Privileg, Quelle, Gießen**

Mikrowellengerät 7020

**- Renner GmbH, Darmstadt**

Corning® Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, Kat.-Nr. C6231

Corning® Zellkulturflaschen 75cm<sup>2</sup>, Kat.-Nr.C7106

Corning® Zellschaber, Kat.-Nr. 30100

**- Schleicher-Schuell GmbH, Dassel**

Einmal-Filterhalter, Rotrand, 0,2 µm, Kat.-Nr. FP 030/3

Papierfaltenfilter, Φ110 mm, Kat.-Nr. 311634

**- Carl Roth GmbH, Karlsruhe**

Nitrilhandschuhe N-Dex®, Kat.-Nr. H713.1  
Latexhandschue Rotiprotect®, Kat.-Nr. C270.1

**- TPP, Trasadingen, Schweiz**

Zentrifugen Röhrchen 15 ml, Kat.-Nr. 91015  
Zentrifugen Röhrchen 50 ml Kat.-Nr. 91050  
Petrischalen 60.1 cm<sup>2</sup> Ø 96 x 21 mm. Kat.-Nr. 93100

**- Vilber Lourmat, Torcy, Frankreich**

UV-Transilluminator 312 nm  
UV-Transilluminator 254 nm

### **9.3. Lösungen und Puffer**

#### **9.3.1. Gewebekultur**

**Wachstumsmedium mit Earlescher Salzlösung (MEME) :**

- 500 ml Minimum Essential Medium Eagle (MEME) mit Earlescher Salzlösung und Glutamin ohne Natriumbikarbonat (ICN Biochemicals GmbH, Meckenheim)
- 1g NaHCO<sub>3</sub>
- 5 ml Penicillin/Sterptomycin (10000 U/ml)
- 50 ml FKS

**0.36%ige Trypanblaulösung:**

- 360 mg Trypanblau mit 0,9%iger NaCl Lösung auf 100 ml auffüllen und lösen

**PBS (“phosphate buffered saline”) pH 7,4**

2,14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8 g NaCl  
0,2 g KCl  
in 500 ml Aqua bidest. lösen  
ad 1000 ml Aqua bidest.

#### **9.3.2. DNS-Isolierung**

**Lysispuffer pH 8:**

- 100 mM NaCl
  - 10 mM Tris-Cl
  - 25 mM EDTA
  - 0,5% SDS
  - steriles Wasser q. s. ad 100 ml
- Vor dem Gebrauch Proteinase K, 0,1mg /ml Lysispuffer hinzufügen.

### **Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1)**

25 ml Phenol  
24 ml Chloroform  
1 ml Isoamylalkohol

### **9.3.3. Elektrophorese**

#### **10X TBE**

108,8 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (MW 121,14)  
55,0 g Borsäure (MW 61,83)  
40,0 ml 0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub> (pH 8,0)  
ad 1000 ml Aqua dest., autoklavieren

#### **1%ige, 2%ige und 3,5% ige Agarosegele**

100 ml 1X TBE (10 ml 10X TBE und 90 ml bidest. Wasser)

1g, 2g bzw. 3,5g Agarose

Die Agarose in 1X TBE Puffer in der Mikrowelle aufkochen bis sie sich vollständig gelöst hat, auf ca. 65°C abkühlen lassen und 2 µl Ethidiumbromid hinzufügen. Gel blasenfrei in Gelträger mit einem Kamm (20 Zähne) ausgießen. Kämmen nach Erstarren des Gels entfernen.

#### **Ethidiumbromid**

0,2 g Ethidiumbromid (MW 394,3)  
ad 20 ml destilliertes Wasser, gut schütteln, bei 4°C lichtgeschützt lagern

### **9.3.4. Klonierung**

#### **LB Medium**

- 10 g Tryptone  
- 5 g Hefeextrakt  
- 10 g NaCl  
950 ml Aqua bidest.

pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen;  
20 Minuten bei 120°C und 15 psi autoklavieren.

Die autoklavierte Lösung auf 55°C abkühlen lassen und 100µg/ml Ampicillin hinzufügen.

Bis zur weiteren Verwendung bei 4°C lagern.

#### **LB Agar**

- 10 g Tryptone  
- 5 g Hefeextrakt  
- 10 g NaCl  
- 15 g Agar  
950 ml Aqua bidest.

pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen;  
20 Minuten bei 120°C und 15 psi autoklavieren.



Die autoklavierte Lösung auf 55°C abkühlen lassen und 100µg/ml Ampicillin hinzufügen.

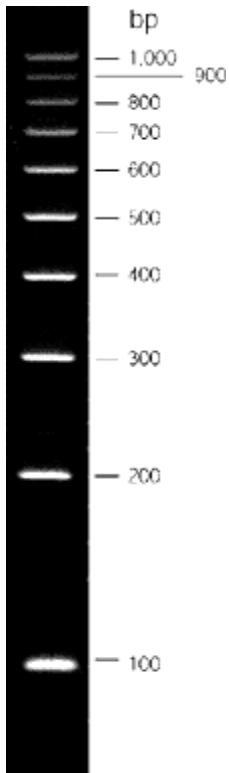
In sterile Petrischalen gießen, erstarren lassen und die Petrischalen anschließend bei 4°C lagern.

#### 9.4. In der NCBI-Gendatenbank vorhandene Sequenzen der kaninen sauren $\beta$ -Galaktosidase mRNA und DNS

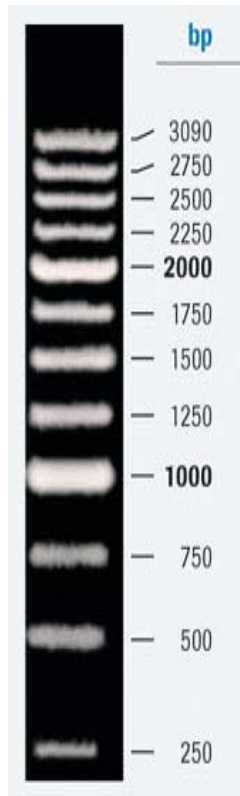
Autoren	GenBank Acc. No.	Veröffentlichungsjahr	Nukleotidzahl
Venta, P.J., Brouillette, J.A., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Brewer, G.J.	L77671	1996	51
Venta, P.J., Brouillette, J.A., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Brewer, G.J.	L77230	1996	20
Smith, B.F., Georgeson, M. and Baker, H.J.	AF056084	1998	2268
Wang, Z.-H., Zeng, B., Shibuya H., Johnson, G.S., Lark, G., Pastores, G.M., Raghavan, S., Kolodny, E.H.	AF170795	1999	771
Venta, P.J., Brouillette, J.A., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Brewer, G.J.	L77231	2001	22
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY695401	2004	259
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY695400	2004	277
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY695399	2004	327
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY695402	2004	435
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY695405	2004	434
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY695404	2004	233
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY695403	2004	329
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY789110	2004	809
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY756094	2004	753
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY756095	2004	594
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY639622	2004	902
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY633753	2004	778
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY789111	2004	183
Kreutzer, R., Moritz, A., Baumgärtner, W.	AY789112	2004	183

9.5. Verwendete DNS- Basenleitern („DNA -molecular weight marker“)

A)



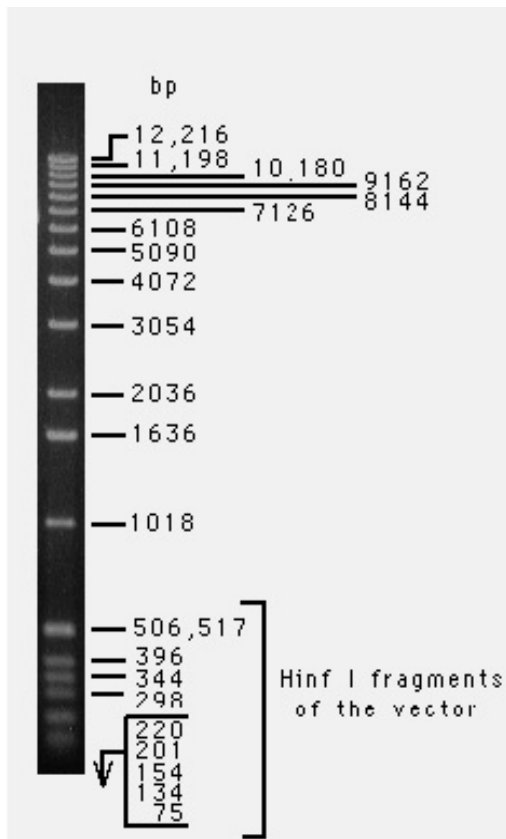
B)



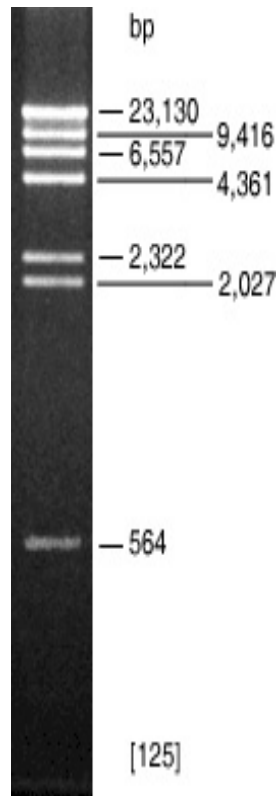
A- Superladder Low SSL-100™

B- XVI 250 bp "DNA Ladder"

C)



D)



C-1 kb DNA Ladder

D- LAMBDA *HIND* III

## **Danksagung**

Zum Abschluss möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D. und Herrn HDoz Dr. A. Moritz für die Überlassung des Themas, Korrektur des Manuskriptes und ihre freundliche Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Petzinger, Herrn Prof. Dr. R. Bauernfeind und Frau Jana Heber bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme im Graduiertenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ und für die sehr interessanten Praktika und Seminare.

Herrn Prof. Dr. M. Reinacher und Herrn Prof. Dr. E. Burkhardt danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für Veterinär-Pathologie und für die gute Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. T. Leeb danke ich für seine sehr hilfreichen Ratschläge auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Genetik.

Frau Dr. Gundi Müller, Frau Dr. Ute Kaim, Frau Dr. Sybille Gröters, Herrn Dr. A. Beineke, Herrn Dr. F. Seeliger und Herrn Dr. W. Hecht sei für ihre tatkräftige Hilfe und Unterstützung herzlich gedankt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Annette Artelt, Frau Silke Engel und Frau Danuta Waschke für die gute Zusammenarbeit und hervorragende labortechnische Unterstützung bedanken.

Allen namentlich nicht aufgeführten Freunden und Kollegen, insbesondere denjenigen, die mit mir auch die mit einer solchen Arbeit verbundenen Unannehmlichkeiten teilten, gilt meinen besonders herzlicher Dank.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie in Gießen und des Instituts für Pathologie der TiHo Hannover für ihr freundliches und entgegenkommendes Verhalten, welches mir die Arbeit in beiden Häusern angenehm gemacht hat

Meinen Eltern und meiner lieben Frau danke ich von ganzem Herzen für die unermüdliche psychologische und praktische Unterstützung die es mir möglich gemacht hat diese Arbeit fertig zu stellen.

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-426-8

