

Identifizierung und Charakterisierung des
krankheitsauslösenden Gens in einem Mausmodell
für humane Motoneuronenerkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Carsten Drepper

April 2005

meiner Tochter Zoe gewidmet

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Abteilung für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie (Prof. Dr. Harald Jockusch) unter der Anleitung von PD Dr. Thomas Schmitt-John, dem ich hiermit für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danken möchte. Der *NRW Graduate School in Bioinformatics and Genome Research* möchte ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums und die Möglichkeit einer intensiven Weiterbildung, auch über den eigenen „Tellerrand“ hinaus, danken. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für seine Bereitschaft das Zweitgutachten für diese Arbeit zu übernehmen.

Für die Herstellung der BAC-transgenen Tiere möchte ich der Gruppe um Prof. Dr. Miriam Meisler, Ann Arbor, Michigan danken. Für die Durchführung der Microarray-Experimente möchte ich Marion Horsch und Dr. Johannes Beckers von der GSF in München danken. Dr. Andreas Lengeling von der GBF in Braunschweig möchte ich für seine Arbeit an der *Vps54*-Gene-Trap-Zelllinie danken.

Weiterhin möchte ich allen aktuellen und „alten“ Mitgliedern der Abteilung für Entwicklungsbiologie danken, insbesondere Melanie, Anke, Timo, Phillip, Ralf, Jana, Volker, Minne, Daniel, Silvia, Peter, Sandra, Björn, Es war eine sehr schöne Zeit in dieser Abteilung und eine tolle Arbeitsatmosphäre.

Einen ganz besonderen Dank möchte Robert und Cora aussprechen, die es immer mit ihrer lockeren und leichten Art geschafft haben, mich sowohl in fachlichen, als auch nichtwissenschaftlichen Dingen zu unterstützen und zu motivieren. Vielen Dank. Zusätzlich möchte ich mich auch für ihre fachkompetente Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Meinen Eltern und meiner eigenen Familie, Ramona und Zoe, gebührt aber der größte Dank. Ohne ihre Geduld und Nachsicht wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Zusammenfassung

1	Einleitung	1
1.1	Humane neurodegenerative Erkrankungen	1
1.1.1	Alzheimer-Syndrom	3
1.1.2	Parkinson-Syndrom	6
1.1.3	Huntington- und andere Polyglutamin-Erkrankungen	9
1.1.4	Motoneuronerkrankungen	13
1.1.4.1	Spinale Muskelatrophie	13
1.1.4.2	Amyotrophe Lateralsklerose	17
1.2	Die Wobbler-Maus	19
1.3	Ziele der Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Bakterienstämme	24
2.1.2	Hefestämme	24
2.1.3	Mausstämme und Embryonale Stammzellen	25
2.1.4	DNA-Vektoren	25
2.1.5	Oligonukleotide	26
2.1.6	Enzyme	29
2.1.7	Fragmentlängenstandards	30
2.1.8	Nährmedien	30
2.1.8.1	Bakterienkulturmedien	30
2.1.8.2	Hefekulturmedien	31
2.1.8.3	Zellkulturmedien	32
2.1.9	Antibiotika	33
2.1.10	Verwendete Kits	33
2.1.11	<i>In silico</i> -Ressourcen	34
2.2	DNA-Methoden	35
2.2.1	Handhabung rekombinanter Bakterien	35
2.2.2	Transformation von Bakterien	35
2.2.3	Plasmidisolierung aus Bakterien	36
2.2.3.1	Easy-Präp	36
2.2.3.2	Alkalische Lyse	37
2.2.3.3	DNA-Plasmid Präparation mittels Ionenaustauschersäulen	38
2.2.4	Plasmidisolierung aus Hefen	39
2.2.5	DNA-Isolierung aus Gewebe	39
2.2.6	Schnellpräparation von DNA aus Mausschwanzspitzen	40
2.2.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	40
2.2.8	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	41
2.2.9	Restriktionsspaltungen von DNA	41
2.2.10	DNA-Ligationen	42
2.2.11	Fällung der DNA	43
2.2.12	Agarosegelelektrophorese	43
2.2.13	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	44
2.2.14	Elektroelution	44
2.2.15	Transfer von DNA auf Membranen (Southern-Blot)	45
2.2.16	Herstellung von radioaktiven Sonden (Random Priming)	45
2.2.17	Hybridisierung und Detektion	46
2.2.18	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.18.1	Standard-PCR	47
2.2.18.2	Gradienten-PCR	48
2.2.18.3	Kolonie-PCR	49

2.2.18.4	Verwendung einer Proofreading-Polymerase	49
2.2.18.5	Klonierung von PCR-Produkten	49
2.3	RNA-Methoden	50
2.3.1	RNA-Isolierung (total-RNA Präparation).....	50
2.3.2	Präparation von mRNA mittels Dynabeads	50
2.3.3	RNA-Agarosegele	51
2.3.4	Transfer von RNA auf Membranen (Northern-Blot), Hybridisierung und Detektion	52
2.3.5	Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).....	52
2.3.6	RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	53
2.3.7	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)	54
2.4	Proteinbiochemische Methoden	55
2.4.1	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	55
2.4.2	Präparationen von Zellmembranen	56
2.4.3	Proteinbestimmung	56
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.4.5	Färben von Proteingelen	58
2.4.6	Immunblot (Semidry-Elektroblot, Westernblot).....	58
2.4.7	Enzym-vermittelte Chemilumineszenz (ECL)	59
2.5	Zellkultur-Methoden	59
2.5.1	ES-Zellkultur	60
2.5.1.1	Auftauen von Feeder-Zellen.....	60
2.5.1.2	Kultur von ES-Zellen	60
2.5.1.3	Vorbereitung des Targeting-Vektors	61
2.5.1.4	Elektroporation von ES-Zellen	61
2.5.1.5	Selektion und picken Antibiotika-resistenter Klone	62
2.5.1.6	Splitten und Einfrieren von ES-Zellen auf einer 96er-Well-Platte.....	62
2.5.1.7	DNA-Isolierung aus ES-Zellen	63
2.5.1.8	Southern-Blot und Hybridisierung	64
2.5.2	Kultur von COS7- und CHO-Zellen	64
2.5.2.1	Ablösen adhärenter Zellen	64
2.5.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	65
2.5.2.3	Transfektion von Plasmid-DNA in kultivierten Zellen	65
2.5.2.4	Immunfluoreszenz.....	65
2.6	Hefe-Methoden	66
2.6.1	Vorbereitungen und Kontrollmating	67
2.6.2	Schnelltransformation von Hefen	68
2.6.3	Vortests und 3-AT-Test	68
2.6.4	Screenen der Bibliothek	68
2.6.5	β -Gal Test.....	69
2.6.6	Plasmidisolierung aus Hefen.....	70
2.6.7	Transformation von <i>E. coli</i> JQ101	70
2.6.8	Interaktionsassay	71
3	Ergebnisse	72
3.1	<i>wr</i>-Kandidatengenregion	72
3.1.1	<i>Tmem17</i>	74
3.1.1.1	Genstruktur	74
3.1.1.2	Expressionsmuster von <i>Tmem17</i>	77
3.1.1.3	Evaluierung von <i>Tmem17</i> als Kandidat für <i>wobbler</i>	78
3.1.1.4	Subzelluläre Lokalisation von <i>Tmem17</i>	78
3.1.1.5	Interaktionspartner von <i>Tmem17</i>	80
3.1.2	<i>NM_172792</i>	84
3.1.2.1	Genstruktur	84
3.1.2.2	Evaluierung von <i>NM_172792</i> als Kandidat für <i>wobbler</i>	88
3.1.2.3	Gene-Targeting von <i>NM_172792</i>	91

3.1.3	Einengung des <i>wr</i> -kritischen Bereichs	95
3.2	<i>Vps54</i>.....	98
3.2.1	Expression von <i>Vps54</i>	98
3.2.2	Transgenic Rescue	101
3.2.2.1	Genomische Sequenzvergleiche des <i>Vps54</i> -Lokus	101
3.2.2.2	Charakterisierung des BAC115F6	103
3.2.2.3	Rettung des Wobbler-Phänotyps	105
3.2.3	Charakterisierung der BayGenomics <i>Vps54</i> -Trap-Linie	106
3.2.4	Interaktionspartner von <i>Vps54</i>	108
3.2.4.1	Yeast Two-Hybrid Screening	109
3.2.4.2	Kartierungen der Bindedomäne in <i>Vps54</i>	111
3.2.4.3	Vergleich der Bindungsstärke von Wobbler- und Wildtyp- <i>Vps54</i>	113
3.3	Vergleichende Transkriptomanalyse zwischen Wildtyp- und Wobbler-Tieren	116
3.3.1	Expressionsuntersuchungen mittels Microarray	116
3.3.2	qRT-PCR Untersuchungen differentiell regulierter Gene	119
3.3.3	Northern-Blot-Experimente.....	121
4	Diskussion	124
4.1	Das <i>wr</i>-kritische Intervall.....	124
4.1.1	Identifizierung von neuen Genen.....	125
4.1.2	<i>Tmem17</i>	126
4.1.3	<i>NM_172792</i>	127
4.1.4	Reduktion des <i>wr</i> -kritischen Intervalls	128
4.2	Mutation in <i>Vps54</i> verursacht die Wobbler-Erkrankung	129
4.3	Hinweise auf zelluläre Funktionen von <i>Vps54</i>.....	130
4.4	Differentielle Transkriptomanalyse spiegelt die Wobbler-Pathologie wieder	134
4.5	Pathomechanismus der Wobbler-Erkrankung	138
4.6	VPS54: Ein Kandidat für humane neurodegenerative Erkrankungen?.....	139
4.7	Ausblick	140
5	Literatur.....	142
6	Anhang.....	153
6.1	Sequenzen: <i>Tmem17</i> Interaktionspartner	153
6.2	Sequenzierungen <i>NM_172792</i>.....	154
6.2.1	Sequenzierung des 1,8kb RT-PCR Produktes	154
6.2.2	Sequenzierungen einzelner Exons von <i>NM_172792</i>	160
6.2.3	Sequenz des pBS-LacZ-neo-link Vektors.....	162
6.3	Sequenz <i>Homint14</i>	165
6.4	Sequenz der Trap Insertionsstelle	165
6.5	Sequenzen: <i>Vps54</i> Interaktionspartner.....	166
6.6	Kartierung der Bindedomänen und Vergleiche der Interaktionsstärken	172
6.7	Expressionsuntersuchungen: Microarray	175
6.8	Expressionsuntersuchungen: qRT-PCR.....	177
6.9	Abkürzungsverzeichnis	180
6.10	Erklärung.....	182

Zusammenfassung

Humane Motoneuronerkrankungen kann man aufgrund ihrer Ätiologie (sporadisch, familiär), dem Auftreten von klinischen Zeichen und Progressivität der jeweiligen Erkrankung klassifizieren. Je nach den beobachtbaren Krankheitsbildern unterscheidet man Erkrankungen des ersten Motoneurons (z.B. Spastische Spinalparalysen), des zweiten Motoneurons (z.B. Spinale Muskelatrophien) und Erkrankungen unter Beteiligung beider Systeme (z.B. Amyotrophe Lateralsklerose). Einen Einblick in die beteiligten Pathomechanismen dieser Erkrankungen hat man durch die Identifizierung von krankheitsauslösenden Genen in eher seltenen vererbaren Formen gewonnen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Motoneuronerkrankungen zu leisten und das krankheitsverursachende Gen in einem Mausmodell für humane Spinale Muskelatrophien und der Amyotrophen Lateralsklerose zu identifizieren.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Mausmodell handelt es sich um die rezessive Wobbler-Mutation (Gensymbol: *wr*), die 1956 zuerst beschrieben und 1992 auf Chromosom 11 kartiert worden ist. Homozygote Wobbler-Mäuse zeigen einen Tremor in den vorderen Extremitäten und einen wackligen Gang. In Rückenmark und Hirnstamm ist eine Degeneration der Motoneurone zu beobachten, die zu einer Muskelatrophie im Schulter- und Halsbereich dieser Tiere führt. Bedingt durch den progressiven Charakter dieser Erkrankung können Wobbler-Tiere spätestens im Alter von sechs Wochen nicht mehr greifen. Weiter weisen Wobbler-Männchen einen Spermatogenese-Defekt auf und sind steril.

Durch die detaillierte Analyse des *wr*-kritischen Intervalls konnten neue Kandidaten für *wr* identifiziert und charakterisiert werden. *Tmem17* kodiert für ein intrazellulär lokalisiertes Transmembranprotein, das evolutionär hoch konserviert ist. *NM_172792* ist eine putative Serin/Threonin-Kinase ohne humanes Ortholog. Beide Gene konnten aufgrund von Sequenz- und Expressionsanalysen als Kandidaten ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte in dieser Arbeit der *wr*-kritische Bereich reduziert werden, so dass sechs Gene in der Kandidatenregion verblieben sind. Die Entdeckung einer Punktmutation in *Vps54* führte schließlich zum Durchbruch. Durch das Einkreuzen eines *Vps54*-tragenden BACs konnte der Wobbler-Phänotyp kompensiert werden. Das Ergebnis dieses Versuches hat die Identität von *wr* bewiesen. Mittels des Yeast Two-Hybrid Systems konnten mögliche Interaktionspartner für *Vps54* identifiziert werden, die mehrheitlich Funktionen beim intrazellulären Vesikeltransport ausüben können. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Punktmutation in *Vps54* die Bindung der Interaktionspartner negativ beeinflusst. Genomweite Transkriptomanalysen konnten viele Gene identifizieren, die in diesem Mausmodell an der Ausprägung der Erkrankung beteiligt sind.

Die Identifizierung von *Vps54* als das krankheitsverursachende Wobbler-Gen verbindet einen möglichen gestörten intrazellulären Vesikeltransport mit Motoneuronerkrankungen und könnte zur Aufklärung der beteiligten Pathomechanismen in humanen Erkrankungen beitragen.

1 Einleitung

1.1 Humane neurodegenerative Erkrankungen

Viele neurodegenerative Erkrankungen manifestieren sich erst in einem erhöhten Alter der Patienten, meist jenseits des sechzigsten Lebensjahrs. Aufgrund der allgemein zunehmenden Lebenserwartung steigt somit der Anteil der Patienten mit neurologischen Erkrankungen an der Gesamtbevölkerung ständig an. Für die meisten dieser Erkrankungen sind die zellulären Prozesse, die für die fortschreitenden Symptome verantwortlich sind, weitgehend unbekannt. Einteilen lassen sich neurodegenerative Erkrankungen in drei große Gruppen. Zum einen der immer wichtiger werdende Komplex der Demenz-Erkrankungen, wie etwa Morbus Alzheimer (Alzheimer-Syndrom, engl. *Alzheimer's disease*, AD), zum anderen bilden entzündliche Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie zum Beispiel Multiple Sklerose (MS) eine zweite Gruppe. Die dritte große Gruppe der Neurodegenerationen beschreibt Erkrankungen, die den Verfall des motorischen Systems umfassen. Hierzu gehören Degenerationen von verschiedenen Strukturen des zentralen Nervensystems, wie sie zum Beispiel bei Morbus Parkinson (Parkinson-Syndrom, engl. *Parkinson's disease*, PD) beobachtet werden können, oder aber die Gruppe der Motoneuronerkrankungen, wie etwa die Spinale Muskelatrophie (engl. *Spinal muscular atrophy*, SMA) oder die Amyotrophe Lateralsklerose (engl. *Amyotrophic lateral sclerosis*, ALS). Teilweise sind Krankheitsbilder beschrieben, die durch einen fließenden Übergang zwischen den einzelnen Gruppen gekennzeichnet sind. So können zum Beispiel Degenerationen des motorischen Systems mit Demenz-Erkrankungen kombiniert auftreten.

Insgesamt ist das Gebiet der neurodegenerativen Erkrankungen ein stark beforschtes Feld in der modernen Biomedizin. Vergleicht man die die Anzahl der Publikationen in der Literatur-Datenbank PubMed (*National Library of Medicine*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>), die sich mit neurodegenerativen Erkrankungen beschäftigen untereinander, so fällt auf, dass die Gruppe der Demenz-Erkrankungen, wie etwa AD, den größten Anteil ausmachen (Abb. 1.1). Aber auch Erkrankungen des motorischen Systems, wie etwa PD, und die Motoneuronerkrankungen, wie ALS und SMA, werden intensiv untersucht.

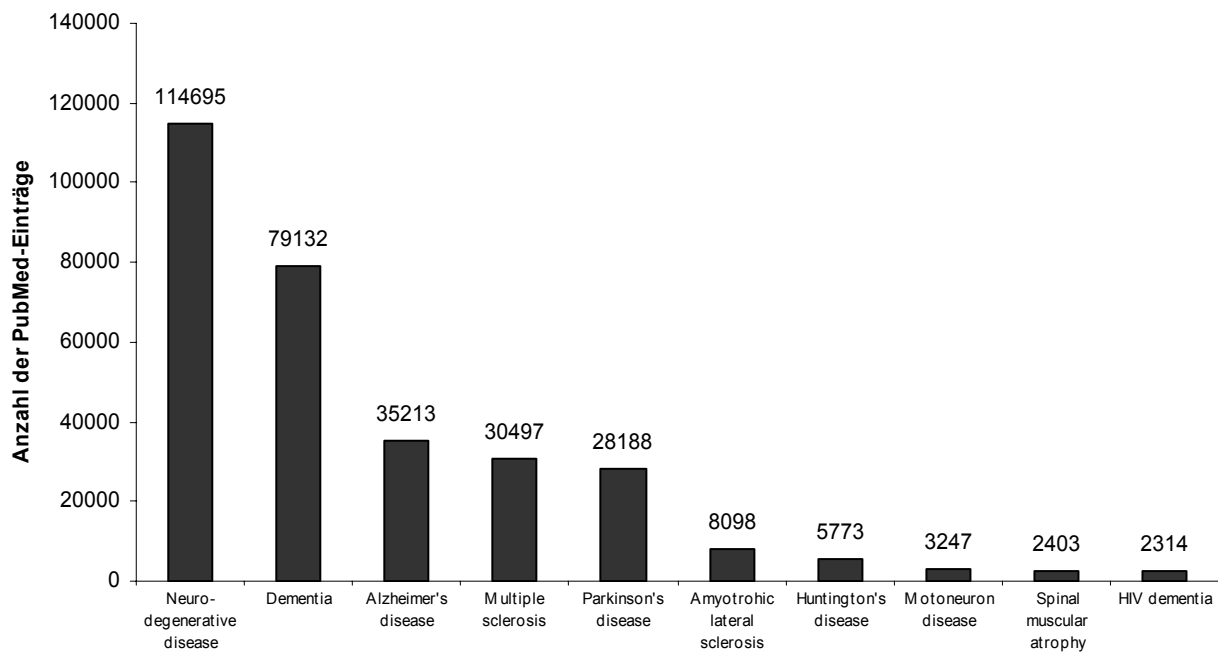


Abb. 1.1: Anzahl der PubMed-Einträge, die ausgewählte Stichwörter neurodegenerativer Erkrankungen enthalten (Stand: März 2005).

Trotz der immensen Ressourcen, die pro Jahr für die Forschung an den neurodegenerativen Erkrankungen aufgewendet werden, fehlen für die meisten dieser Erkrankungen noch immer wirkungsvolle, klinisch anwendbare Therapien (Ley und Herdegen, 2004). Diese Diskrepanz liegt wahrscheinlich an der Heterogenität der Pathomechanismen der unterschiedlichen Erkrankungen. So beschränken sich moderne Therapien hauptsächlich auf eine Medikation mit neuroprotektiven Substanzen, die bestenfalls die Lebenserwartung nur geringfügig positiv beeinflussen können. Um bessere Therapieformen entwickeln zu können ist es daher unablässig die genauen Pathomechanismen einzelner neurodegenerativer Erkrankungen genau zu definieren (Ley und Herdegen, 2004).

Derzeit diskutierte Theorien zu den Ursachen verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen umfassen unter anderem Entzündungsreaktionen, Exzitotoxizität, Fehlfaltungen von Proteinen die in Proteinakkumulationen münden, mitochondriale Fehlfunktionen, Apoptose, oxidativer Stress und Depletion von trophischen Faktoren. Im Folgenden werden die derzeit diskutierten molekularen Pathomechanismen von ausgewählten Beispielen einiger neurodegenerativer Erkrankungen exemplarisch besprochen. So hat die Identifizierung von krankheitsauslösenden Mutationen, bei eher seltenen vererbaren Formen, einen Einblick in die gestörten zellulären Vorgänge geliefert, die bei einer Vielzahl von neurodegenerativen Krankheiten involviert sind.

1.1.1 Alzheimer-Syndrom

Mit einer Prävalenz von 3% bei der Altersgruppe der 64- bis 74-jährigen und 50% bei über 85-jährigen ist das Alzheimer-Syndrom (OMIM-Nummer: 104300) die häufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit (Ley und Herdegen, 2004). Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika leiden derzeit über 4,5 Millionen Menschen an dieser progressiven Demenzerkrankung (Bossy-Wetzel et al., 2004). AD ist histologisch einerseits durch die Ausbildung von sogenannten NFTs (engl. *neurofibrillary tangle*), die hauptsächlich aus Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein in den Perikaria und Axonen der betroffenen Neuronen bestehen, und andererseits durch die extrazellulären fibrillären Ablagerungen des A β -Peptids innerhalb der senilen oder amyloiden Plaques (SPs) in pathologischen Regionen im zerebralen Kortex gekennzeichnet. Das A β -Peptid entsteht durch endoproteolytische Spaltung des *Amyloid Precursor Proteins* (APP). Die durch NFTs und SPs verursachten neuronalen Schäden führen zu einem massiven Verlust von Nervenzellen im zerebralen Kortex und zu einer zerebralen Atrophie (Zekanowski et al., 2004). Der Verlust von höheren kognitiven Fähigkeiten und Gedächtnis während des Verlaufs der Demenzerkrankung, wird dieser zunehmenden Atrophierung des Gehirns zugeschrieben und führt bei AD-Patienten nach etwa zehn Jahren zum Tode (Bertoli-Avella et al., 2004).

Kopplungsanalysen in Familien mit eher seltenen autosomal dominant vererbaren Formen von AD, führten zur Entdeckung von ursächlichen Mutationen in drei unterschiedlichen Genen. Diese drei Gene umfassen das Amyloid Precursor Protein (APP), Presenilin1 (PSEN1) und Presenilin2 (PSEN2). Mutationen in diesen drei Genen wurden bei etwa 30 bis 50% aller vererbaren Formen der AD gefunden (Tabelle 1.1 und Campion et al., 1999).

Grundlegend für die Entdeckung des ersten Alzheimer-Gens war die Beobachtung, dass ältere Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) gewöhnlich an AD leiden. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass ein Gen auf Chromosom 21 in die AD-Pathologie involviert sein könnte. Später wurde durch Kopplungsanalysen ein AD-Lokus (AD1, Tabelle 1.1) in die Nähe des APP Gens auf Chromosom 21q kartiert (St George-Hyslop et al., 1987). Kurze Zeit später wurden dann die ersten Punktmutationen im APP Gen identifiziert (Goate et al., 1991 und Chartier-Harlin et al., 1991). APP ist ein Typ-I Transmembranprotein unbekannter Funktion, mit einer großen extrazellulären Region und einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz. Es wird im Verlauf seiner Prozessierung mehrfach endoproteolytisch geschnitten. So schneidet die plasmamembranassoziierte

α -Sekretase APP zwischen den Positionen 687 und 688 in der Mitte der A β -Domäne, so dass die Bildung des pathogenen A β -Peptids verhindert wird. Die β -Sekretase dagegen schneidet APP zwischen den Positionen 671 und 672, so dass das N-terminale Ende des A β -Peptids entsteht. Der γ -Sekretase Proteinkomplex schneidet APP innerhalb der Transmembranregion. So entstehen zusammen mit der Spaltung durch β -Sekretase die pathogenen und neurotoxischen A β -Peptide A β_{1-40} A β_{1-42} A β_{1-43} (Zekowski et al., 2004). Einige der detektierten pathogenen Mutationen im *Amyloid Precursor Protein* befinden sich in der Nähe der β -Sekretase Schnittstelle und führen zu einer erhöhten A β -Peptid-Produktion (Bossy-Wetzel et al., 2004). Die genaue Zusammensetzung des γ -Sekretase Komplexes ist noch nicht vollständig verstanden, aber Presenilin1, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 scheinen involviert zu sein. Presenilin1 ist eine Aspartylprotease, die höchstwahrscheinlich das APP schneidet und somit für die A β -Peptid Produktion verantwortlich ist. Mehr als 150 Mutationen hat man bislang in den Presenilin-Genen identifiziert (AD Mutation Database, <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>).

Es ist immer noch nicht vollständig verstanden, wie die A β -Fibrillen Neurodegeneration verursachen. Die Theorien reichen von der Aktivierung von Mikroglia, die eine inflammatorische Reaktion und Freisetzung von neurotoxischen Substanzen bewirken, über Exzitotoxizität durch A β -Fibrill-stimulierte Freisetzung von Glutamat in Gliazellen und daraus resultierendem oxidativen Stress, bis zu gestörten axonalen Transportprozessen (Bossy-Wetzel et al., 2004). So wurde gezeigt, dass APP und Presenilin an Kinesin I binden können und somit den vesikulären Transport regulieren (Kamal et al., 2000, Kamal et al., 2001). Mutationen im Presenilin1-Gen ziehen eine Erhöhung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β nach sich, die den Kinesin-vermittelten anterograden axonalen Transport beeinträchtigt (Pigino et al., 2003). Denkbar wäre auch eine physikalische Barriere der A β -Fibrillen in Axonen, die dann zu einem blockierten Transport führen könnten (Bossy-Wetzel et al., 2004).

Neben den drei Genen mit ursächlichen Mutationen wurde ein Allel eines Gens identifiziert, das als Risikofaktor für die Entwicklung einer frühen Form der sporadischen AD gilt. Es handelt sich hierbei um das Apolipoprotein E (Tabelle 1.1). Der ApoE4 Haplotyp lässt sich signifikant öfter in sporadischen AD-Patienten finden, als in der Kontrollgruppe (Zekowski et al., 2004). ApoE ist ein Serumprotein, das mit dem Cholesteroltransport assoziiert ist. Im Zentralen Nervensystem wird ApoE von Astrozyten und Mikroglia produziert und könnte in Neurone eindringen oder wird selbst von diesen produziert (Beffert et al., 1998). Im Gehirn ist ApoE mit der Entwicklung des

Nervensystems und regenerativen Prozessen nach einem Trauma assoziiert (Seitz et al., 2003). Die Ausbildung der pathologischen A β -Fibrillen findet in Gegenwart von ApoE4 schneller statt, als in Gegenwart von ApoE3 (Esler et al., 2002).

Obwohl die NFTs, die aus Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen, ein deutliches histologisches Merkmal der AD sind, wurden bei AD-Patienten bislang noch keine Mutationen in dem MAPT-Gen gefunden, welches das Tau-Protein kodiert. Dagegen wurden bei Patienten mit FTDP (Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus) einige Mutation im MAPT-Gen identifiziert (Hutton et al., 1998 und Tabelle 1.1). Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches die Mikrotubuli stabilisiert, die Polymerisierung der Untereinheiten fördert und somit wichtige Funktionen beim axonalen Transport wahrnimmt (Billingsley und Kincaid, 1997).

OMIM-Nummer	Lokus	Chromosomale Position	Betroffenes Protein	Vererbungsmuster
104760	AD1	21q21	APP	autosomal dominant
104310	AD2*	19q13.2	APOE	autosomal dominant
607822	AD3	14q24.3	PSEN1	autosomal dominant
606889	AD4	1q31-q42	PSEN2	autosomal dominant
602096	AD5	12p11.23-q13.12	?	-
605526	AD6	10q24	?	-
606187	AD7	10p13	?	-
607116	AD8	20p	?	-
608907	AD9	19p13.2	?	-
600274	FTD**	17q21.1	MAPT	autosomal dominant

Tabelle 1.1: Identifizierte Loci, die in vererbaren Formen der Demenzerkrankungen involviert sind. AD = Alzheimer-Disease Lokus, *AD2 repräsentiert ein bestimmtes Allel (APOE4), das als Prädisposition für früh auftretende Formen der AD identifiziert worden ist. **Zumindest einige Formen der erblichen FTD können auf Punktmutation im TAU-Protein (MAPT) zurückgeführt werden. - Hierbei ist der Erbgang unbekannt. Teilweise wurden Patienten mit familiärer Häufung für Kopplungsanalysen eingesetzt. (Tabelle verändert nach Bertoli-Avella et al., 2004).

Neben den vier identifizierten Genen, die in die Alzheimer Pathologie involviert sind, existieren noch weitere AD-Loci (Tabelle 1.1), bei denen die Entdeckung des verursachenden Gens noch aussteht (AD5-9, *Online Mendelian Inheritance in Man*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>). Durch die Identifizierung weiterer AD-Gene könnte mehr Licht in die Pathomechanismen der AD gebracht werden.

1.1.2 Parkinson-Syndrom

Nach dem Alzheimer-Syndrom ist das Parkinson-Syndrom (engl. *Parkinson's disease*, PD) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von 60 bis 340 und einer jährlichen Inzidenz von 5 bis 25 pro 100000 Einwohner. Sie betrifft überwiegend ältere Menschen, meist zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr. Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit dem Lebensalter deutlich zu (Forman et al., 2004). Als Faustregel kann man sagen, dass etwa 1% der über 60-jährigen, 2% der über 70-jährigen und bis zu 5% der über 85-jährigen am Parkinson-Syndrom leiden. Bis zu 10% der Patienten sind bei Erstdiagnose jünger als 40 Jahre.

Für PD ist ein fortschreitender Verlust von dopaminergen Nervenzellen in der *Substantia nigra* (schwarze Substanz), einer der Kernkomplexe des Hirnstamms, charakteristisch. Weiterhin sind aber auch in anderen Hirnarealen Nervenzellverluste zu beobachten. Von der *Substantia nigra* ziehen Nervenfasern zum *Striatum* (Streifenkörper), wo Bewegungsimpulse über den Neurotransmitter Dopamin weitergeleitet werden. Bei Dopaminmangel werden die Nervenzellen im *Striatum* nicht ausreichend stimuliert. Die daraus resultierende *Hypokinese* (Bewegungsverlangsamung) kann bis zu einer *Akinese* (Bewegungslosigkeit) der Parkinson-Patienten führen. Der Dopaminmangel hat weiterhin zur Folge, dass ein Übergewicht von anderen Neurotransmittern entsteht. So werden der Tremor und die Muskelsteifheit (Rigor) der Patienten auf cholinerges Übergewicht zurückgeführt. Das Parkinson-Syndrom ist eine Multisystemerkrankung, die auch adrenerge, serotonerge und cholinerge Neurone betreffen kann. Histologisch lassen sich bei Parkinson-Patienten in betroffenen Hirnarealen häufig Nervenzellen mit sogenannten Lewy-Körperchen identifizieren. Hierbei handelt es sich um kugelförmige cytoplasmatische Einschlüsse, die oft in der Nähe des Nukleus von Nervenzellen lokalisiert sind und hauptsächlich aus Protein-Aggregaten des α -Synuklein-Proteins bestehen. Weitere Bestandteile der Ablagerungen sind Parkin, Synphilin, Neurofilamente und synaptische Vesikelproteine (Polymeropoulos et al., 1996, Ross und Poirier, 2004, Ley und Herdegen, 2004, Bossy-Wetzel et al., 2004). Moderne Therapieformen, wie etwa die Medikation mit L-DOPA, behandeln nur die Symptome und können den progressiven Verlust von Neuronen bestenfalls verzögern, nicht aber aufhalten (Bossy-Wetzel et al., 2004).

Häufig tritt PD als spontane Erkrankung auf. Ungefähr 15-20% der Patienten haben eine positive Familienanamnese, so dass hier genetische Faktoren ursächlich sein können. Bis heute sind insgesamt 11 Loci identifiziert worden (PARK1-11, *Online Mendelian Inheritance in Man*), die krankheitsverursachende oder Prädispositions-Gene für die

Parkinson-Erkrankung repräsentieren (Tabelle 1.2). Die Identifizierungen und Charakterisierungen von sechs dieser Gene, welche die seltenen vererbaren Parkinson-Erkrankungen auslösen können, haben in den letzten Jahren neue Einsichten in die generellen Pathomechanismen von Morbus Parkinson gebracht (Krüger 2004).

OMIM-Nummer	Lokus	Chromosomale Position	Betroffenes Protein	Vererbungsmuster
168601	PARK1	4q21	α -Synuklein	autosomal dominant
600116	PARK2	6q25-q27	Parkin	autosomal rezessiv
602404	PARK3	2p13	?	autosomal dominant
605543	PARK4*	4p15	Triplikation des α -Synukleins	autosomal dominant
191342	PARK5	4p14	UCH-L1	autosomal dominant
605909	PARK6	1p36	PINK1	autosomal rezessiv
606324	PARK7	1p36	DJ-1	autosomal rezessiv
607060	PARK8	12q12	Dardarin	autosomal dominant
606693	PARK9	1p36	?	autosomal rezessiv
606852	PARK10**	1p32	?	autosomal dominant
607688	PARK11	2q36-q37	?	autosomal dominant

Tabelle 1.2: Identifizierte Loci, die in die Pathogenese der Parkinson-Erkrankungen involviert sind. *Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine PARK1-Variante (Triplikation), für die eine falsche Kartierung erstellt worden ist (Singleton et al., 2003). **PARK10 ist ein Prädispositionslokus für die gemeine idiopathische Parkinson-Erkrankung (Hicks et al., 2002). Genkopplungen aller anderen aufgeführten Loci wurden bei frühen Formen der familiären Erkrankung gefunden (Tabelle verändert nach Vila und Przedborski, 2004).

Das erste identifizierte Gen, welches das Parkinson-Syndrom auslösen kann, ist das α -Synuklein (PARK1, Polymeropoulos et al., 1997). Durch Kopplungsanalysen in großen italienischen Familien mit autosomal dominant vererbter PD, wurde eine A53T Mutation im α -Synuklein-Protein gefunden. Später wurden zwei weitere Punktmutationen im α -Synuklein-Gen (A30P, Krüger et al., 1998; E46K, Zarranz et al., 2004) identifiziert, die ebenfalls zu einer idiopathischen Parkinson-Erkrankung führen. Die Variabilität des Krankheitsbildes ist relativ groß. So entwickeln Träger der A53T Mutation eine früh ausbrechende, rapid-progressive Form der PD. Patienten mit der E46K Mutation dagegen entwickeln eher eine PD mit früher Demenz und ausgeprägter Akkumulation von Lewy-Körperchen (Zarranz et al., 2004). Bei sporadischen Formen der PD wurden keinerlei Mutationen im α -Synuklein-Gen gefunden (Vaughan et al., 1998). Allerdings konnte ein

Dinukleotid-*repeat* Polymorphismus in der Promoterregion des α -Synuklein-Gens detektiert werden, der mit der Ausprägung der sporadischen PD assoziiert ist und somit einen Risikofaktor darstellt (Krüger 2004). Weiterhin fand man in Patienten mit einer Triplikation des Wildtyp α -Synuklein-Gens ein zweifach erhöhtes Expressionsniveau. Diese Überexpression von α -Synuklein löst ein klinisch heterogenes Krankheitsbild von idiopathischer PD bis Demenz mit Lewy-Körperchen aus (Miller et al., 2004). Somit scheint die Überexpression von Wildtyp α -Synuklein oder die Expression von mutiertem α -Synuklein einen toxischen Effekt auf die dopaminergen Nervenzellen zu haben. Die Frage, warum mutiertes α -Synuklein toxisch ist, kann zurzeit noch nicht befriedigend beantwortet werden, da die biologische Funktion des Proteins noch nicht vollständig verstanden ist (Vila und Przedborski, 2004).

Mutationen im Parkin-Gen (PARK2, Lücking et al., 2000) sind die häufigste Ursache für, sowohl 49% der familiären, als auch 19% der sporadischen früh ausbrechenden Parkinson-Fälle (Ausbruch der Krankheit unter 45 Jahren). Das Parkin-Gen kodiert für eine Ubiquitin E3 Ligase mit zwei RING-Domänen (Shimura et al., 2000) und liefert so eine Verbindung zwischen Neurodegeneration und gestörtem Protein-Abbau, bzw. Akkumulation von defekten Proteinen.

Weiterhin konnte in einer deutschen Familie eine I93M Substitution in dem Protein der Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1) identifiziert werden (PARK5). Phänotypisch resultiert diese Mutation in eine idiopathische Parkinson-Erkrankung mit Lewy-Körperchen (Leroy et al., 1998). Funktionale Studien konnten zeigen, dass UCH-L1 sowohl als Ubiquitin-Hydrolase, als auch als Ubiquitin-Ligase funktionieren kann. Die I93M Mutation verändert die Funktion des Wildtyp-UCH-L1 von der durch die Hydrolase-Aktivität vermittelten vorherrschenden Rolle im Proteinabbau, zu einer erhöhten Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die zu einer Proteinakkumulation führt (Liu et al., 2002).

Mutationen im PARK6-Gen, die für die Serin-Threonin-Kinase PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) kodiert, konnten im Jahre 2004 von Valente et al. identifiziert werden. Die detektierten Mutationen scheinen die Kinase-Aktivität des Enzyms zu zerstören. Erste funktionale Untersuchungen lassen vermuten, dass das PINK1-Protein Zellen vor oxidativem Stress schützt (Valente et al., 2004).

DJ-1 (PARK7, Bonifati et al., 2003) ist ein multifunktionales ubiquitär exprimiertes Protein, das mit autosomal rezessiven Formen der PD in Verbindung gebracht wird. Bei Parkinson-Patienten entdeckte Mutationen im DJ-1-Gen beinhalten Punktmutationen, Spleißstellen-Mutationen, größere Deletionen innerhalb des Gens und Mutationen, die zu einem

vorzeitigen Translationsstopp führen (Abou-Sleiman et al., 2003). Funktionen, die DJ-1 in der Zelle übernehmen kann, umfassen unter anderem die Vermittlung von Antworten auf oxidativen Stress, Antioxidation, Chaperone-Aktivitäten und die Sortierung von mRNA. Welche dieser Funktionen von DJ-1 in Parkinson-Patienten beeinträchtigt ist, ist derzeit Gegenstand der aktuellen Forschung (Vila und Przedborski, 2004, Bossy-Wetzler et al., 2004).

Dardarin (PARK8, Paisan-Ruiz et al., 2004), auch LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*) genannt, ist das derzeit letzte Gen, in dem Punktmutationen bei Parkinson-Patienten gefunden worden sind (Kachergus et al., 2005). Allerdings sind noch keine funktionalen Untersuchungen zu Dardarin publiziert.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Untersuchungen der mutierten Gene bei der PD einen Einblick in mögliche Pathomechanismen gebracht haben. So könnten die gefundenen Mutationen im α -Synuklein- und DJ-1-Protein abnormale Proteinkonformationen bedingen, welche die zellulären Proteindegradationsmechanismen, sowohl die proteasomalen, als auch die lysosomalen Mechanismen, überfordern, und so zu Akkumulationen führen. Mutationen im Parkin- und UCH-L1-Protein scheinen die Möglichkeit der Zelle fehlgefaltete oder degradierte Proteine zu erkennen, stark zu beeinträchtigen und führt so zur ungewollten Proteinakkumulation. Mitochondriale Fehlfunktionen und oxidativer Stress könnten durch DJ-1- oder PINK1-Mutationen ausgelöst werden, die ebenfalls über Proteinakkumulationen letztendlich zum Neuronentod führen könnten (Vila und Przedborski, 2004).

1.1.3 Huntington- und andere Polyglutamin-Erkrankungen

Die bekannteste Polyglutamin-Erkrankung ist Chorea Huntington (CH). Die Prävalenz der Huntington-Krankheit wird mit 5 bis 10 auf 100000 Menschen angegeben. Sie gehört damit zu den weltweit häufigsten genetisch bedingten neurologischen Erkrankungen und führt zu einem progressiven Verlust der motorischen Kontrolle, den charakteristischen hyperkinetisch-hypotonen Bewegungstörungen („Veitztanz“), zu allgemeinen Demenz-Erscheinungen, psychischen Auffälligkeiten und Depression. CH tritt meist in der vierten und fünften Lebensdekade auf und führt in der Regel nach 10 bis 15 Jahren zum Tode. Sie ist gekennzeichnet durch die Degeneration von Nervenzellen, insbesondere in den Stammganglien und der Hirnrinde (Ley und Herdegen, 2004).

OMIM-Nummer	Krankheit	Chromosomale Position	Betroffenes Protein	Vererbungsmuster
143100	Chorea Huntington	4p16.3	Huntingtin	autosomal dominant
606438	HDL2	16q24.3	Junctophilin-3	autosomal dominant
164400	Sca1	6p23	Ataxin-1	autosomal dominant
183090	Sca2	12q24	Ataxin-2	autosomal dominant
109150	Sca3/Machado-Joseph	14q24.3-q31	Ataxin-3	autosomal dominant
183086	Sca6	19p13	CACNA1A/ Calcium Kanal α1A Untereinheit	autosomal dominant
164500	Sca7	3p21.1-p12	Ataxin-7	autosomal dominant
607136	Sca17	6q27	TBP, TATA-Box Bindeprotein	autosomal dominant
125370	DRPLA/Haw-River	12p13.31	DRPLA/ Atrophin-1	autosomal dominant
313200	SBMA/Kennedy	Xq11-q12	Androgen Rezeptor	X-chromosomal rezessiv

Tabelle 1.3: Krankheiten, die durch überlange Polyglutaminbereiche ausgelöst werden. Andere Trinukleotid-Erkrankungen, die nicht die kodierenden Bereiche von Genen betreffen, sind nicht betrachtet. HDL2 = Huntington disease-like 2; Sca = Spinocerebelläre Ataxien; DRPLA = Dentatorubrale-Pallidolysiane Atrophie; SBMA = Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (Tabelle verändert nach Taroni und DiDonato, 2004).

Verursacht wird die CH durch die Ausdehnung von CAG-Trinukleotid Wiederholungen im HD-Gen auf Chromosom 4 (Tabelle 1.3), die zu langen Polyglutaminbereichen im N-terminalen Bereich des Huntingtin-Proteins führen. Die Länge der Wiederholungen korreliert mit der Stärke des Krankheitsbildes und dem Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs (Andrew et al., 1993). In der Regel haben Huntington-Patienten zwischen 40 und 60 CAG-Wiederholungen in der kodierenden Sequenz von Exon 1 des HD-Gens. Im Gegensatz dazu sind weniger als 35 CAG-Wiederholungen, meist zwischen 11 und 34 bei gesunden Individuen, nicht pathologisch (Ross und Poirier, 2004). Huntingtin ist ein großes Protein von 3141 Aminosäuren, das ubiquitär exprimiert wird. Es wurde in Membranen, Cytosol, Nukleus und den Mitochondrien nachgewiesen. Die ausgedehnten Polyglutamin-Bereiche scheinen eine Konformationsänderung von Huntingtin zu bewirken, die dann zu Proteinaggregaten in den Dendriten und dem Nukleus führen (Cornett et al., 2005). Studien mit unterschiedlichen Modellen zeigten einen gestörten axonalen Transport für pathologische Polyglutamin-Proteine (Feany und La Spada, 2003).

Die Funktion des Wildtyp Huntingtin-Proteins ist noch nicht vollständig verstanden (Bossy-Wetzel et al., 2004). Die Suchen nach Interaktionspartnern für das Huntingtin-Protein identifizierten eine Vielzahl von Proteinen, die in die Pathologie involviert sein könnten. So wurden sieben Proteine als Bindepartner identifiziert, die Funktionen in der transkriptionalen Regulation ausüben. Weitere sechs Interaktionspartner nehmen eine Rolle in der Endocytose, dem intrazellulären Transport oder der Organisation des Cytoskeletts ein (Singaraja et al., 2002, La Spada und Taylor, 2003). Bei funktionalen Untersuchungen der identifizierten Interaktionspartner, wurden Unterschiede in der Bindungsstärke von mutiertem Huntingtin- zu nicht pathologischem Huntingtin-Protein detektiert (Singaraja et al., 2002). Ob der Mechanismus der Neurodegeneration in CH mehr ein toxischer *gain of function* des aggregierenden Polyglutamin-reichen Huntingtin-Proteins im Nukleus und in den Dendriten ist, oder mehr ein *loss of function* der normalen Funktion des Proteins in der Ausprägung der Erkrankung im Vordergrund steht, wird noch immer scharf diskutiert (Li und Li, 2004).

Neben der CH sind noch weitere Erkrankungen beschrieben, die auf einer Expansion von Polyglutaminbereichen in unterschiedlichen Proteinen beruhen. So wurden erhöhte CAG-Wiederholungen innerhalb eines alternativen Exons des Junctophilin-3 Gens in einer afrikanischen Subpopulation identifiziert, die einen Huntington-ähnlichen Phänotyp (HDL2, Tabelle 1.3) bei den betroffenen Patienten verursacht (Holmes et al., 2001).

Autosomal dominante Spinocerebelläre Ataxien, die zum Teil ebenfalls durch Triplett-Wiederholungen verursacht werden können, kommen mit einer Prävalenz von etwa 1 auf 100000 Menschen vor und sind durch charakteristische Koordinationsstörungen des Bewegungsapparates (Gangataxie) gekennzeichnet, die durch den selektiven Untergang von Nervenzellen, einer Rückbildung und Verkleinerung (Atrophie), vor allem im Kleinhirn (Cerebellum) oder Rückenmark (Medulla spinalis), verursacht werden. Unter den 25 pathologisch unterscheidbaren Spinocerebellären Ataxien (SCA) wurden sieben identifiziert, die auf Expansionen von Polyglutaminbereichen beruhen. So wurden CAG-Expansionen sowohl bei Ataxin-Proteinen (Sca1, Sca2, Sca3, Sca7), einer Protein-Familie unbekannter Funktion, als auch im TBP (TATA-Box Bindeprotein) und in einer Untereinheit eines Calciumkanals (CACNA1A) gefunden (Everett und Wood, 2004, Tabelle 1.3). Bei den autosomal dominanten SCAs lassen sich sogenannte neuronale intranukleäre Einschlüsse (engl. *neuronal intranuclear inclusions*, NII) nachweisen, die auf einen toxischen *gain of function* der mutierten Proteine zurückgeführt werden. Interessanterweise wurden SCAs identifiziert, die auf anderen Trinukleotid-Expansionen

beruhen. So wird SCA12 zum Beispiel durch eine Expansion von CAG-Wiederholungen im 5'UTR einer regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2 verursacht (SCA12, OMIM: 604326, PPP2R2B, Holmes et al., 1999). Hierbei scheinen andere krankheitsauslösende Mechanismen eine Rolle zu spielen. Es wird vermutet, dass die CAG-Expansions die Expression des PPP2R2D-Gens in SCA12-Patienten beeinflussen, und so die charakteristische SCA12-Erkrankung auslösen (Holmes et al., 2003).

Bei autosomal rezessiven Formen der SCA, wie zum Beispiel die Friedreich Ataxie (FRDA), die durch intronische GAA-Expansions verursacht wird, oder der Spinocerebellären Ataxie mit axonaler Neuropathie (SCAN), verursacht durch Punktmutationen im TDP1-Protein (Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase1), scheinen eher *loss of function* Effekte der mutierten Proteine eine Rolle zu spielen (Taroni und DiDonato, 2004).

Die Dentatorubrale-Pallidolysiane Atrophie (DRPLA, Tabelle 1.3) ist durch Polyglutamin-Expansions im Atrophin-1 Gen molekular charakterisiert, die ebenfalls, wie bei anderen Polyglutamin-Krankheiten, zu intranukleären Einschlüssen in degenerierenden Neuronen führen (Everett und Wood, 2004). Als Bindepartner für das Atrophin-1-Protein wurde unter anderem die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase identifiziert, die auch Huntingtin binden kann (Burke et al., 1996).

Das Krankheitsbild bei der Spinobulbären Muskelatrophie Typ Kennedy (SBMA, Tabelle 1.3) unterscheidet sich deutlich von den Ataxien oder CH. Hierbei kommt es zu einem selektiven Verlust von Motoneuronen im Hirnstamm und Rückenmark. Verursacht wird SBMA durch eine Polyglutamin-Expansion im Androgen Rezeptor (Tabelle 1.3, La Spada et al., 1991).

Zusammenfassend lassen sich die CH und einige der SCAs und DRPLA als Krankheiten klassifizieren, die zu neuronalen intranukleären und oder cytoplasmatischen Einschlüssen in den betroffenen Zellen führen. Die deutlich heterogenen Krankheitsbilder könnten sich auf zelltypspezifische Expression der mutierten Proteine und dem damit verbundenen sekundären Funktionsverlust von normalen Zellfunktionen durch die Akkumulationen zurückführen lassen, oder aber durch einen partiellen *loss of function* der mutierten Proteine bei ihren normalen zellulären Aufgaben bedingt werden (Forman et al., 2004).

1.1.4 Motoneuronerkrankungen

Die Motoneuronerkrankungen beinhalten sowohl spontane als auch hereditäre Krankheitsbilder, bei denen das erste und oder das zweite Motoneuron in die Pathologie involviert ist. Diese Erkrankungen sind meist durch eine selektive Degeneration dieser beiden neuronalen Systeme gekennzeichnet. Klinische Klassifikationen orientieren sich an der Progression der Erkrankung, an den Hinweisen auf die Ätiologie (sporadisch, familiär), an molekulargenetischen Befunden, sowie an den neuropathologischen und klinischen Zeichen für die Degenerationen des ersten bzw. zweiten Motoneurons.

Einteilen lassen sich die Motoneuronerkrankungen aufgrund des Untergangs des ersten bzw. zweiten Motoneurons in drei Untergruppen. Zum einen die spinalen Muskelatrophien (SMAs), die eine klinisch heterogene, oftmals autosomal-rezessiv auftretende Gruppe von Motoneuronerkrankungen, mit sehr unterschiedlichen Progressionsraten umfasst. Bei den spinalen Muskelatrophien bleibt der selektive Untergang motorischer Neurone auf das Vorderhorn des Rückenmarks und den Hirnstamm beschränkt und ist somit eine Erkrankung des zweiten Motoneurons. Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) sind beide Motoneurone betroffen. So kommt es zu einer rasch fortschreitenden Degeneration der Axone der Betz-Riesenzellen in Motorkortex, Pyramidenbahn („Lateralsklerose“), bulbären Hirnnervenkernen sowie motorischen Vorderhornzellen mit anschließender Atrophie der Zielmuskeln („Amyotrophie“). Zur dritten Gruppe gehören spastische Spinalparalysen. Bei diesen zumeist autosomal-dominant vererbten Erkrankungen (hereditäre spastische Paraparese, HSP) kommt es zum alleinigen Untergang der Zellen des ersten Motoneurons (Motorkortex und Pyramidenbahn) mit anschließender deutlicher Spastik der Beine. Das klinische Bild ist symmetrisch ausgeprägt (Winter und Ludolph, 2004). Neben diesen deutlich zu unterscheidenden Entitäten, existiert eine Vielzahl von klinischen Bildern, die Überschneidungen dieser Gruppen darstellen, oder kombiniert mit Demenz oder Parkinson-ähnlichen Symptomen auftreten (Rowland und Shneider, 2001, Suter und Scherer, 2003, Winter und Ludolph, 2004).

1.1.4.1 Spinale Muskelatrophie

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist mit einem Fall pro 10000 Lebendgeburten eine der häufigsten autosomal rezessiven Erkrankungen (Ogino und Wilson, 2002). Die Krankheit ist charakterisiert durch den selektiven Untergang von Motoneuronen in Hirnstamm und Rückenmark (Gendron und MacKenzie, 1999). Verursacht wird die spinale Muskelatrophie

durch Mutationen oder Deletionen der telomeren Kopie des *survival motor neuron*-Gens (SMN), die zu einem fast vollständigen Verlust des SMN-Proteins führen. Aufgrund von klinischen Befunden und Erkrankungsalter werden autosomal rezessive Formen der proximalen SMA im Wesentlichen in vier Typen klassifiziert (Tabelle 1.4, Winter und Ludolph, 2004). So ist SMA TypI (OMIM: 253300), auch als Werdnig-Hoffmann Syndrom bekannt, die aggressivste SMA Variante mit einem Erkrankungsbeginn in den ersten Lebensmonaten Neugeborener. Der Tod tritt in Regel nach etwa zwei Jahren ein, bedingt durch respiratorische Insuffizienz. Immerhin 8% der Patienten erreichen aber das zehnte Lebensjahr. Patienten mit der intermediären SMA TypII Form (OMIM: 253550), zeigen einen Krankheitsbeginn bis zum 18. Monat. Fast 90% der Patienten überleben das zehnte Lebensjahr. Die TypIII SMA, oder Kugelberg-Welander Erkrankung (OMIM: 253400), ist durch einen Krankheitsbeginn bis zum zweiten Lebensjahr charakterisiert und verläuft weniger aggressiv als TypI und TypII. Die Lebenserwartung ist allenfalls minimal reduziert. Deutlich gutartiger verläuft die SMA TypIV Variante (OMIM: 271150). Der Krankheitsbeginn liegt nach dem 30. Lebensjahr, die Lebenserwartung ist nicht reduziert und verläuft weniger progredient (Ogino und Wilson, 2004).

Molekulargenetisch sind die rezessiven SMAs durch homozygote Deletionen oder Mutationen in einer Region auf Chromosom 5q13 charakterisiert. Innerhalb eines etwa 500kb großen invertierten *repeats* befinden sich die telomere und zentromere Kopie des SMN-Gens (SMN1 und SMN2). Es zeigte sich, dass sich bei nahezu allen SMA-Patienten (TypI - III) Deletionen oder Mutation im SMN1-Gen finden lassen (Lefebvre et al., 1995, Ogino und Wilson, 2004). Die kodierende Sequenz des aus neun Exons bestehenden SMN2-Gens unterscheidet sich von der SMN1-Sequenz durch eine Transversion an der Position 840 im Exon 7 (Burglen et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass die Transversion in SMN2, obwohl translational still, nicht zu einer vollständigen Kompensation des SMN1-Gens führt. Zurückgeführt wird dieses Ergebnis auf eine durch die Transversion verminderte Aktivität eines exonischen Spleiß-Enhancers, die zu einer reduzierten Bildung von *full length* Transkripten und somit zu einer geringeren Menge des funktionalen SMN-Proteins führt (Lorson et al., 1999). SMN ist ein ubiquitär exprimiertes 38kDa Protein mit 294 Aminosäuren. Es nimmt Funktionen beim Spleißen der prä-mRNA wahr (Paushkin et al., 2002). Außer den beiden SMN-Genen befinden sich noch weitere Gene in der SMA-kritischen Region. Das *neuronal apoptosis inhibitory protein* (NAIP)-Gen und das *small edrk-rich factor 1A* (Serf1)-Gen werden als modifizierende (*modifier*) Gene diskutiert. Es ist noch nicht ganz klar, ob der Verlust beider Gene mit der Aggressivität des Verlaufs der

SMA assoziiert ist (Scharf et al., 1998), oder ob der Verlust beider SMN-Gene ursächlich für den Krankheitsverlauf ist. Es scheint aber gesichert, dass die Größe der 5q13 Deletionen mit der klinischen Einteilung der SMA in die Typen I - III direkt korreliert (Ogino und Wilson, 2004). Bei den Typ IV SMAs stellt sich die molekulargenetische Charakterisierung schwieriger dar. So kann man Patienten identifizieren, die keine offensichtlichen homozygoten Deletionen im SMN1-Gen aufweisen (Zerres et al., 1995). Bei diesen Patienten könnte es sich entweder um nicht detektierte intronische Mutationen im SMN1 Gen handeln, oder um andere von 5q13 unabhängige Mutationen (Ogino und Wilson, 2004).

Neben den SMAs Typ I - IV, existieren noch so genannte SMA-plus-Formen (Winter und Ludolph, 2004), die zum Teil molekular charakterisiert worden sind und von der SMN-Genregion unabhängig sind. So wurden bei der SMA mit initialer respiratorischer Insuffizienz (engl. *spinal muscular atrophy with respiratory distress*, SMARD1, OMIM:604320) Mutationen im *immunoglobulin mu-binding protein 2* (IGHMBP2)-Gen identifiziert (Tabelle 1.4, Grohmann et al., 2001). In dem Mausmodell für SMARD1, der *neuromuscular degeneration (nmd)*-Maus (Cox et al., 1998), lässt sich eine deutlich reduzierte IGHMBP-2 Expression nachweisen (Grohmann et al., 2004). Bei der X-chromosomal gekoppelten spinalen und bulbären Muskelatrophie (SBMA, auch als Kennedy Erkrankung bekannt, OMIM: 313200) lassen sich CAG-Expansionen im Androgen-Rezeptor finden (siehe 1.1.3 und LaSpada et al., 1991). Nishimura et al. (2004) konnten bei Patienten mit einer autosomal dominanten spinalen Muskelatrophie (Finkel-Typ, OMIM: 182980) Mutationen im VAPB-Gen identifizieren (Tabelle 1.4). Hierbei handelt es sich um ein Vesikel-assoziiertes Membranprotein. Die gleiche Mutation wurde auch bei Patienten mit einer atypischen Form der Amyotrophen Lateralsklerose identifiziert (Lokus ALS8). Somit scheinen zumindest diese Formen der Motoneuronenerkrankungen mit einem gestörten Vesikeltransport zusammenzuhängen (Nishimura et al., 2004).

Die Identifizierung von Mutationen im Dynactin-1-Gen in einer Familie mit einer autosomal dominanten Form einer Motoneuronenerkrankung, rückte den gestörten axonalen Transport als mögliche primäre Ursache der Muskelatrophie in den Vordergrund (Puls et al., 2003). Dieses wurde durch die Entdeckung von Mausmutanten mit Mutationen im Gen für die cytoplasmatische schwere Kette von Dynein (*Dnchc1*) noch unterstützt. Diese Tiere zeigen eine progressive Motoneurondegeneration mit Lewy-Körperchen (Hafezparast et al., 2003). Auch die Überexpression des Dynamitin-Gens, welches den Dynein/Dynactin-Komplex inhibiert, verursacht eine progressive Motoneurondegeneration (LaMonte et al.,

2002). Ebenso scheint die Überexpression von mutiertem SOD1 (*superoxide dismutase 1*) den Dynein/Dynactin-Komplex zu behindern. Hierbei lässt sich Dynein mit SOD1 in Proteinaggregaten nachweisen (Ligon et al., 2005).

OMIM-Nummer	Krankheit	Chromosomale Position	Betroffenes Protein	Vererbungsmuster
253300	SMA TypI (Werdnig-Hoffmann)	5q13	SMN*	autosomal rezessiv
253550	SMA TypII (intermediäre Form)	5q13	SMN*	autosomal rezessiv
253400	SMA TypIII (Kugelberg-Welander)	5q13	SMN*	autosomal rezessiv
271150	SMA TypIV	5q13, +	SMN*, ?	autosomal rezessiv
604320	SMARD1	11q13	IGHMBP-2	autosomal rezessiv
313200	SBMA/Kennedy	Xq11-q12	Androgen Rezeptor	X-chromosomal rezessiv
182980	SMA (Finkel-Typ)	20q13.2	VABP	autosomal dominant
600794	distale SMA TypV	11p13 7p15	Seipin (BSCL2) GARS	autosomal dominant
158590	dHMN2	12q24	HSPB8	autosomal dominant
607088	distale SMA**	11q13	?	autosomal rezessiv

Tabelle 1.4: Ausgewählte spinale Muskelatrophien (SMAs). SMARD = Spinal muscular atrophy with respiratory distress; SBMA = Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy; dHMN2 = Distale hereditäre Motorneuropathie Typ2. + Bei einigen Patienten konnten keine Mutationen in der SMN Region gefunden werden, so dass wahrscheinlich eine andere chromosomale Region involviert ist. *Neben dem SMN Protein könnten noch mehrere andere Gene in der Region involviert sein. **Bei dieser distalen SMA wurden Mutationen im IGHMBP-2-Gen (siehe SMARD1) ausgeschlossen.

Bei den phänotypisch mehr distalen spinalen Muskelatrophien (TypV, OMIM: 600794) wurden Mutationen in Genen, die für eine Glycyl-tRNA-Synthetase (GARS, Antonellis et al., 2003) und integrale ER-Membranproteine kodieren (BSCL2, Windpassinger et al., 2004), entdeckt. Eine andere distale SMA, ist die autosomal dominante TypII hereditäre Motor Neuropathie (dHMN2, OMIM: 158590), bei der Mutationen in einem 22kDa Hitzeschock-Protein identifiziert (HSPB8, Irobi et al., 2004) worden sind. Weitere Loci wurden identifiziert, die zu distalen spinalen Muskelatrophien führen können. So wurde zum Beispiel die Kopplung einer autosomal rezessiven Form mit dem 11q13-Lokus

identifiziert (Tabelle 1.4, OMIM: 607088). Neben den distalen spinalen Muskelatrophien existieren noch weitere klinisch heterogene Gruppen von peripheren Neuropathien, darunter die Charcot-Marie-Tooth (CMT) Erkrankungen, für die zum Teil die krankheitsauslösenden Gene identifiziert worden sind (Suter und Scherer, 2003). Eine aktuelle Zusammenstellung von Mutationen lässt sich im Internet abrufen (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations>).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Vielzahl von Genen und Mechanismen in die Pathologie der spinalen Muskelatrophien involviert sein können. Neben Fehlfunktionen beim Spleißen und axonalem Transport (Bassell und Kelic, 2004, Holzbaur, 2004), werden Proteinakkumulation, wie bei der SBMA, und defekter intrazellulärer Vesikeltransport, wie zum Beispiel bei der SMA vom Finkel-Typ, sowie diversen anderen Pathomechanismen mit SMAs in Verbindung gebracht.

1.1.4.2 Amyotrophe Lateralsklerose

Die häufigste Motoneuronerkrankung bei erwachsenen Patienten ist die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) mit einer Inzidenz von etwa 2,5 in 100000 Einwohnern (Piemonte und Valle d'Aosta, 2001). Bei der ALS kommt es zu einer rasch fortschreitenden Degeneration der Axone der Betz-Riesenzellen in Motorkortex (erstes Motoneuron), Pyramidenbahn, bulbären Hirnnervenkernen sowie motorischen Vorderhornzellen (zweites Motoneuron) mit anschließender Atrophie der Zielmuskeln (Winter und Ludolph, 2004). Histologisch lassen sich häufig Ubiquitin-positive Einschlüsse und Ablagerungen aus Neurofilamenten, SOD1 und Hitzeschock-Proteinen in Neuronen beobachten (Bossy-Wetzel et al., 2004, Forman et al., 2004). Bis zu 10% der ALS-Patienten weisen eine positive Familienanamnese auf (fALS), während 90% der Patienten an der sporadischen Form leiden (sALS). Das Haupterkrankungsalter der sALS-Patienten liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, im Mittel bei 56 bis 58 Jahren. Die jüngsten Patienten erkranken im Alter von 15 bis 30 Jahren. Bei der fALS liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 46 Jahren. Die durchschnittliche Lebenserwartung beider Formen wird mit etwa 5 Jahren nach Diagnosestellung angegeben. Die Patienten sterben in der Regel an respiratorischer Insuffizienz (Winter und Ludolph, 2004).

Ein Meilenstein für das Verständnis der ALS war die Entdeckung von Mutationen im Gen der Superoxid Dismutase 1 (SOD1) als krankheitsauslösendes Gen bei der familiären ALS (Rosen et al., 1993). Etwa 20% der fALS Fälle mit autosomal dominantem Erbgang

beruhen auf Punktmutationen im SOD1-Gen. Bis heute sind über 100 Mutationen im SOD1-Gen beschrieben (*ALS online database*, <http://alsod1.iop.kcl.ac.uk>). Der genaue pathogene Mechanismus bei SOD1-Mutationen ist immer noch Gegenstand aktueller Forschung. Es scheint aber gesichert, dass wahrscheinlich ein toxischer *gain of function* von mutiertem SOD1 zu Fehlfaltungen und Proteinaggregaten, sowie sekundär zu defektem axonalem Transport, mitochondrialen Dysfunktionen und Exzitotoxizität durch verminderte Aufnahme von Glutamat durch Gliazellen, führt (Bossy-Wetzel et al., 2004). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Motoneurondegeneration in mutierten SOD1 exprimierenden Neuronen durch umliegende nicht neuronale Wildtypzellen gerettet werden können, so dass die SOD1-Toxizität durch umliegende Gliazellen mitvermittelt wird (Clement et al., 2003).

Kopplungsanalysen und Sequenzierungen in einer großen tunesischen Familie mit einer juvenilen langsam progredienten ALS-Form (ALS2, Tabelle 1.5), haben Mutationen im Alsin-Gen identifiziert (Yang et al., 2001, Hadano et al., 2001). Hierbei handelt es sich um ein 184kDa Protein mit drei *guanine-nucleotide-exchange factor* (GEF)-Domänen, darunter eine VPS9-Domäne, das peripher an endosomalen Membranen gebunden und hauptsächlich in Neuronen exprimiert ist. GEF-Domänen katalysieren die Dissoziation von GDP von kleinen G-Proteinen, die wiederum als Schalter in der Zelle fungieren. Topp et al. (2004) konnten zeigen, dass Alsin als GEF für Rab5 und Rac1 wirkt und mit kleinen punktierten Membranvesikeln assoziiert ist. Somit könnte Alsin an endocytotischen Prozessen in Neuronen beteiligt sein.

Eine andere juvenile autosomal dominante Form der ALS (ALS4, Tabelle 1.5) wird durch Mutationen im Senataxin-Gen verursacht. Hierbei handelt es sich um ein 302kDa Protein mit einer DNA/RNA Helikase-Domäne, die hohe Homologien zum IGHMBP2-Gen (siehe 1.1.4.1, SMARD1) aufweist. Die genaue Funktion von Senataxin ist noch nicht untersucht. In einer großen brasilianischen Familie mit 28 betroffenen Mitgliedern, die an einer langsam progredienten autosomal dominanten ALS leiden (ALS8, Tabelle 1.5), wurde eine Punktmutationen im Gen für das (*VAMP*)/*synaptobrevin-associated membrane protein B* (VAPB) identifiziert (Nishimura et al., 2004). Funktionale Daten zu VAPB fehlen noch, allerdings scheint die Punktmutation die normale zelluläre Lokalisation des Proteins zu beeinflussen und führt zu Proteinaggregaten (Nishimura et al., 2004).

Neben den klassischen ALS-Erkrankungen, existieren noch eine Vielzahl von Erkrankungen, die in Kombination mit anderen klinischen Zeichen auftreten. So kann zum

Beispiel ALS mit Frontotemporaler Demenz zusammen auftreten. Auch hier wurde eine genetische Kopplung zu einem Locus festgestellt (ALS/FTD, Tabelle 1.5).

Aufgrund der Beobachtung, dass in Neuronen von ALS-Patienten häufig Neurofilament Ablagerungen zu beobachten sind, wurden auch die Neurofilament-Gene bei ALS-Patienten untersucht. Hierbei zeigten sich mehrere Mutationen, die als Risikofaktoren für sALS diskutiert werden (Cleveland und Rothstein, 2001). Interessant ist auch die Tatsache, dass Mutationen im Neurofilament-Gen NFL autosomal dominante periphere Neuropathie vom Charcot-Marie-Tooth Typ2 auslösen können (De Jonghe et al., 2001).

Zusammenfassend lassen sich die involvierten Pathomechanismen bei ALS-Erkrankungen entweder auf gestörten axonalen Transport, defekten intrazellulären Vesikeltransport, oder auf Proteinaggregationen mit sekundären Defekten, wie zum Beispiel mitochondriale Dysfunktionen oder oxidativen Stress zurückführen (Cleveland und Rothstein, 2001, Bruijn et al., 2004).

OMIM-Nummer	Lokus	Chromosomale Position	Betroffenes Protein	Vererbungsmuster
105400	ALS1	21q22.1	SOD1	autosomal dominant
205100	ALS2	2p33	Alsin	autosomal rezessiv
606640	ALS3	18q21	?	autosomal dominant
602433	ALS4	9q34	Senataxin	autosomal dominant
602099	ALS5	15q15.1-q21.1	?	autosomal rezessiv
608030	ALS6	16q12	?	autosomal dominant
608031	ALS7	20p13	?	autosomal dominant
608627	ALS8	20q13.33	VAPB	autosomal dominant
105550	ALS-FTD	9q21-q22	?	autosomal dominant

Tabelle 1.5: Identifizierte Loci, die in die Pathogenese der ALS involviert sind. ALS-FTD = ALS mit einer frontotemporalen Demenz.

1.2 Die Wobbler-Maus

Im Jahre 1955 trat spontan in der Zucht eines C57BL/Fa Mausstammes am *Institute of Animal Genetics* in Edingburgh eine autosomal rezessive Mutante auf, die von Falconer (1956) erstmals beschrieben worden ist (Tabelle 1.6). Von der Mutation betroffene Tiere zeigen einen Tremor in den vorderen Extremitäten und einen wackligen Gang, der namensgebend für die Mutante war (engl. *to wobble* = wackeln; Gensymbol *wr*). Später

wurden die Ursachen dieses Phänotyps näher erforscht. Es zeigte sich, dass im Rückenmark und Hirnstamm dieser Tiere eine Degeneration der Motoneurone zu beobachten ist, die zu einer Muskelatrophie im Schulter- und Halsbereich führt (Duchen und Strich, 1968). Bedingt durch den progressiven Charakter dieser Erkrankung können betroffene Tiere spätestens im Alter von sechs Wochen nicht mehr mit den Vorderpfoten greifen und zeigen ein deutlich reduziertes Gewicht gegenüber den Wurfgeschwistern. Im höheren Alter der Tiere sind die Hinterläufe ebenfalls betroffen. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten eine deutliche Vakuolisierung degenerierender Motoneurone im Rückenmark (Andrews und Maxwell, 1967, Duchen und Strich, 1968, Mitsumoto und Bradley, 1982, Rathke-Hartlieb et al., 1999), die von einer massiven Astrogliose begleitet wird (Laage et al., 1988). Es wird allgemein angenommen, dass die primäre Ursache der Wobbler-Erkrankung in der Motoneurondegeneration zu suchen ist, und daher die beobachtete Astro- und Mikrogliose als sekundäre Zeichen zu werten sind (Rathke-Hartlieb et al., 1999, Boillee et al., 2003). So kann man im Verlauf der Wobbler-Erkrankung die ersten morphologischen Veränderungen in den Perikarien der Motoneurone erkennen (Andrew und Maxwell, 1967, Duchen 1978, Mitsumoto und Bradley, 1982, Boillee et al., 2003), so dass die Wobbler-Erkrankung eher als Neuronopathie eingestuft wird, und die beobachteten axonalen Transportdefekte (Axonopathie) sekundär gewertet werden (Mitsumoto und Bradley, 1982, Boillee et al., 2003). Ausführliche Beweise hierfür stehen allerdings noch aus.

Die Wobbler-Maus ist aufgrund ihres neurologischen Phänotyps ein gut untersuchtes Modell für humane neurodegenerative Erkrankungen. So wird in der Wobbler-Maus durch die selektive Motoneurondegeneration im Hirnstamm und Rückenmark das klinische Bild der humanen spinalen Muskelatrophie gut abgebildet. Neuere Untersuchungen lassen aber auch Abnormalitäten in Bereichen des ersten Motoneurons erkennen, so dass die Wobbler-Maus auch als Modell für konkrete Fragestellungen bezüglich der Amyotrophen Lateralsklerose heran gezogen wird (Boillee et al., 2003).

Theorien zu den in der Wobbler-Erkrankung beteiligten Pathomechanismen gibt es viele. So lassen sich, ähnlich wie bei humanen ALS-Patienten, Ubiquitin-positive Einschlüsse in betroffenen Neuronen nachweisen, die auf Defekte des proteasomalen Proteinabbau-Systems, Defekte von Chaperonen oder auf Proteinakkumulation hindeuten (Andrews 1975, Mitsumoto und Bradley, 1982, Boillee et al., 2003). Auch lassen sich bei Wobbler-Tieren vielfach Ablagerungen von Neurofilamenten beobachten, die ebenfalls bei einigen ALS-Patienten gefunden werden können (Boillee et al., 2003). Mitochondriale Defekte, die

im Motorkortex und Rückenmark von Wobbler-Tieren gefunden worden sind, deuten auf oxidativen Stress als eine mögliche Ursache für den Untergang von Motoneuronen hin (Dave et al., 2003, Dave et al., 2005). Exzitotoxizität scheint dagegen eine eher unwahrscheinliche Ursache der Wobbler-Erkrankung zu sein (Boillee et al., 2003).

Jahr	Entdeckung	Referenz
1955	Entdeckt als autosomal rezessive Spontanmutante	(Falconer, 1956)
1968	Detaillierte Beschreibung des neurologischen Phänotyps	(Duchen und Strich, 1968)
1980	Aberante Spermien Morphologie: Mikrotubuli-Defekt	(Leetsma und Szepsenwol, 1980)
1982	Wobbler ist primär eine Erkrankung der Perikarien von degenerierenden Motoneuronen	(Mitsumoto und Bradley, 1982)
1988	Massive Astrogliose im Rückenmark	(Laage et al., 1988)
1991	Defekte Akrosomfusion	(Heimann et al., 1991)
1992	Wobbler-Gen Kartierung auf Mauschromosom 11	(Kaupmann et al., 1992)
1997	Zellautonome Wirkung des Wobbler-Gens	(Augustin et al., 1997)
2002	Detaillierte physikalische Karte des Kandidatengenbereichs	(Fuchs et al., 2002)

Tabelle 1.6: Die Geschichte der Wobbler-Maus: Willkürliche Auswahl von wichtigen Veröffentlichungen.

Neben dem neurologischen Phänotyp zeigen Wobbler-Männchen noch eine abnormale Spermienmorphologie. Im Gegensatz zu den sichelförmigen Köpfen der Spermien von Wildtyp-Mäusen, sind Wobbler-Spermien deutlich abgerundet. Ultrastrukturell lassen sich bei Wobbler-Spermatozoen keine funktionalen Akrosomstrukturen feststellen, die gewöhnlich als Kappe am Nukleus lokalisiert sind. Es lassen sich nur einzelne akrosomale Vesikel finden, die nicht fusioniert sind (Heimann et al., 1991). Leetsma und Szepsenwol (1980) konnten einen weiteren Spermien-Defekt beobachten. So fehlen ein bis vier der äußeren Mikrotubuli-Doublets der Flagellen. Wobbler-Männchen sind durch die Spermatogenesedefekte nicht fertil. Durch eine Reihe von Experimenten mit chimären Tieren konnten Augustin et al. (1997) die gewebeautonome Wirkung der Wobbler-Mutation, sowohl im Testis, als auch im Rückenmark zeigen. Weiterhin konnten durch Untersuchungen an in Kultur genommenen Rückenmarksschnitten Hinweise auf eine zellautonome Wirkung der Wobbler-Mutation im Rückenmark erhalten werden (Boillee et al., 2003). Somit scheint die Wobbler-Mutation direkt auf die betroffenen Zelltypen zu wirken.

Im Jahre 1992 konnten Kaupmann et al. durch interspezies Rückkreuzungen zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und SEG, die Wobbler Mutation auf das proximale Mauschromosom 11 kartieren. Bei weiteren Rückkreuzungen wurde das Kandidatengenintervall sukzessive durch neue Rekombinationsereignisse reduziert. Um alle Gene in der Kandidatengenregion zu identifizieren wurde eine physikalische Karte mit genomischen Klonen generiert, die nahezu den gesamten *wr*-kritischen Bereich überspannte (Resch et al., 1998, Fuchs 2001, Fuchs et al., 2002). So konnte der *wr*-kritische Bereich zwischen dem Marker *BAC147N22rev* und dem Gen *Murr1* kartiert werden (Fuchs 2001). In dieser Kandidatengenregion wurden insgesamt acht Gene (*Peli1*, *Hcc8*, *Ugp2*, *Mor2*, *Homoloc13*, *Otx1*, *Homoloc2* und *Kiaa0903*) identifiziert. Sequenzierungen und Expressionsuntersuchungen zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren zeigten keinerlei Unterschiede (Fuchs et al., 2002). Weiterhin wurde eine Inversion gegenüber der syntänen humanen Region auf Chromosom 2p13-14 detektiert, die genau dem *wr*-kritischen Bereich entsprach (Fuchs et al., 2002).

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen Beitrag zum Verständnis der Wobbler-Erkrankung zu leisten und das verursachende Gen zu identifizieren. Man kann sich von der Identifizierung der krankheitsverursachenden Mutation einen weiteren Einblick in die generellen Pathomechanismen der Motoneuronerkrankungen erhoffen. Durch die Aufdeckung der Mutation könnten auch Gene, beziehungsweise zelluläre Mechanismen in den Fokus der Forschung gerückt werden, die bei humanen neurodegenerativen Krankheiten bislang noch nicht betrachtet worden sind, diesen aber ursächlich zugrunde liegen könnten.

Zu Beginn meiner Arbeit sind neue Mausgenomsequenzen in öffentlichen Sequenzdatenbanken abgelegt worden. Meine Aufgabe bestand am Anfang des Projektes darin, in diesen neuen, den *wr*-kritischen Bereich überspannenden Sequenzcontigs, neue Gene zu identifizieren und zu charakterisieren.

Eine weitere Aufgabe umfasste die Suche nach neuen genetischen Markern, die helfen sollten, das *wr*-kritische Intervall durch Auswertung von Rekombinationsereignissen, die während des Rekombinations-Screenings detektiert worden sind, zu verkleinern.

Die Entdeckung einer Punktmutation in einem der Kandidatengene führte schließlich zum Durchbruch. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die molekulargenetische

Charakterisierung vorangetrieben werden und erste Hinweise auf eine Funktion durch Interaktionsuntersuchungen mittels des Yeast Two-Hybrid Systems gewonnen werden. Unter Verwendung der Microarray-Technologie wurden in einer Kooperation genomweite Transkriptomanalysen der Wobbler-Tiere durchgeführt, die in dieser Arbeit evaluiert werden sollten. Diese Experimente sollten Gene identifizieren, die während der Wobbler-Erkrankung differentiell exprimiert werden, und so einen tieferen Einblick in die ursächlichen Pathomechanismen der Motoneuronerkrankung bei der Wobbler-Maus geben sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

***Escherichia coli* XL1-Blue** (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacZ Δ M15 Tn10(Tet^R))) Sambrock et al., 1989

***Escherichia coli* TOP10F'** (F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG), TOPO Manual, 2002, Invitrogen

***Escherichia coli* JQ101** (F-, thi-1, hsdS20 (rB-, mB-), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Str^R), (Rif^R), xyl-5, mtl-1)

***Escherichia coli* JM109** (endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) relA1 supE44 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZ Δ M15]), Chemisch kompetente Zellen, Promega

***Escherichia coli* DH10B** (F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80dlacZ Δ M15, Δ lacX74, endA1, recA1, deoR, Δ (ara, leu)7697, araD139, galU, galK, nupG, rpsL, λ _{lys})

***Escherichia coli* BI21** (F⁻ ompT HsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3))

***Escherichia coli* DH5 α** (F⁻ end A1 hsd R17 (r_k⁻, m_k⁻) sup E44 thi-1 λ ⁻ rec A1 gyr A96 rel A1 Δ (arg F⁻ lac ZYA) U 169 ψ 80d lacZ Δ M15)

2.1.2 Hefestämme

***Saccharomyces cerevisiae* AH109** (MAT_a, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4D, gal80D, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1) BD Bioscience Clontech, Palo Alto, USA

***Saccharomyces cerevisiae* Y187** (MAT_a, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4D, gal80D, met-, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1) BD Bioscience Clontech, Palo Alto, USA

2.1.3 Mausstämme und Embryonale Stammzellen

Mus musculus laboratorius C57Bl/6J: Labor-Inzuchtstamm, ursprünglich am Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA etabliert.

Mus musculus laboratorius C57/Bl6-wr: Labor-Inzuchtstamm, der die Wobbler-Mutation trägt. Zuerst beschrieben von Falconer (1956).

Mus musculus castaneus: Labor-Inzuchtstamm, im Jackson Laboratory etabliert und seit 1971 als Inzuchtstamm Cast/Ei gezüchtet. Von dort wurden 1996 einige Tiere bezogen und eine eigene Zucht am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie und Molekulare Pathologie in Bielefeld aufgebaut. Von Zeit zu Zeit werden Tiere kommerziell bezogen und eingekreuzt. Dieser Stamm wurde für die Rekombinationskreuzung zur Einengung des Kandidatengenbereichs für die Wobbler-Mutation verwendet.

Mus musculus laboratorius 129SVJ: ES-Zelllinie in der die Versuche zur homologen Rekombination mittels Targeting-Vektoren („gene targeting“) durchgeführt worden sind.

2.1.4 DNA-Vektoren

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
pCR4-TOPO	Klonierungen	Invitrogen, Karlsruhe (D)
pBluescript SK	Klonierungen	Stratagene, Heidelberg (D)
pTV-O	Neomycin-Kassette	Birchmeier, MDC Berlin (D)
pTarget	Expressionsvektor	Promega, Mannheim (D)
pGBT9	Yeast-2-Hybrid	BD Bioscience Clontech, Palo Alto (USA)
pACT2	Yeast-2-Hybrid	BD Bioscience Clontech, Palo Alto (USA)
pGEX-4T1	GST-Fusion Expression	Amersham Bioscience, Freiburg (D)

2.1.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt	T _A °C	Referenz
<u>Tmem17</u>				
Y2H-N-Tmem17_a	GAATTCGGGCATGGAGCTGCCGGA CCCTGTT	162bp	62°C	diese Arbeit
Y2H-N-Tmem17_b	GTCGACTTCATAAAGGGACATCTG CAAGG			
Y2H-C-Tmem17_a	GAATTCACCCTAAAGAAAATGGTC AAC	129bp	62°C	diese Arbeit
Y2H-C-Tmem17_b	GTCGACTTAGAGCTCTTCCGTGCA TTGTCTTAC			
LC1-Tmem17_a	TCATTGTGGTACTGTGCGTC	139bp	60°C	diese Arbeit
LC1-Tmem17_b	AAAGGCAACTGCAGTAGAAG			
LC2-Tmem17_a	CCGATAATGAAATGGTCTCC	156bp	60°C	diese Arbeit
LC2-Tmem17_b	TGACGACAGTAACCACAATG			
Seq-Tmem17-5'UTR_a	TGGTGTGAGAGCTCCTTGTG	502bp	60°C	diese Arbeit
Seq-Tmem17-5'UTR_b	GGAGCAGCCATCTTTACC			
Seq-Tmem17-3'UTR_a	CCTCCAGGACTTTGATCAGC	704bp	60°C	diese Arbeit
Seq-Tmem17-3'UTR_a	CCCAAACAATCCCATAAACCC GGCATGGAGCTGCCGGACCCTGT T			
Exp-Tmem17_a	ATCAGATCTCCTGAGGCTTAAACT	631bp	62°C	diese Arbeit
Exp-Tmem17_bipro_b	GAGGGAAGGAGAGCTCTTCCGTG CATTGTCTTAC			
Gal4-BD_a	TCATCGGAAGAGAGTAG	Variabel	64°C	BD Bioscience Clontech
Gal4-BD_b	CGTTTTAAAACCTAAGAGTCAC			
5'AD_LD_ins	CTATTCGATGATGAAGATACCCCA CCAAACC	Variabel	66°C	BD Bioscience Clontech
3'AD_LD_ins	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTA TCTACGA			
Gal4_AD_seq	TAATACCACTACAATGGATGA	Seq.	60°C	BD Bioscience Clontech
pGAD5'sh	CACTACAATGGATGATGTATATAA C	Seq	60°C	Christiane Siligan, pers. Mitteilung
<u>NM_172792</u>				
LC_Kinase11_a	GGAGCCTCATCATCTTGGTC	141bp	61°C	diese Arbeit
LC_Kinase11_b	GCCTGGCAAGGTCTTCTTAAT			
LC_Kinase17_a	GTGACGCTGATTGAGTCTGG	154bp	61°C	diese Arbeit
LC_Kinase17_b	GGAGTGTCATTTTCAGGGATG			
RT_Kinase_1_8_a	ACTTATACGGGTGGCTGTCAAG	1803bp	59°C	diese Arbeit
RT_Kinase_1_8_b	GGCAAGGTCTTCTTAATTTTCC			
KinseqA	CACTGGGCTGTCTGAAAGAGGA	Seq.	60°C	diese Arbeit
KinseqC	CATGGACTGGTTGCCACAAAAG	Seq.	60°C	diese Arbeit
KinseqE	TGCCCTATTCAGATGACCCAGT	Seq.	60°C	diese Arbeit
KinseqF	CAAAGGGCGAAAGAGACACAGA	Seq.	60°C	diese Arbeit
North_Kin1_a	CTATGGGGACAGCCATCAAC	408bp	66°C	diese Arbeit
North_Kin1_b	CGCTTCCAAACTGTGAGTGA			
kinase_ex1_a	GGGTTTTGCAGAGCTGTCAT	261bp	60°C	diese Arbeit
kinase_ex1_b	CCACCAAATGCCAAAAGTCT			
kinase_ex2_a	GGAGCATCATTGGGTTGTTT	419bp	63°C	diese Arbeit
kinase_ex2_b	TCCTCTCCTGCCACATTCTC			
kinase_ex4_a	TGTAGAGGCCCTGCTCTGAT	461	60°C	diese Arbeit
kinase_ex4_b	ACCTGGAATGTGTCTGGAA			
kinase_ex9_a	CGTGCATTGTGTAGCGATCT	571bp	66°C	diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt	T _A °C	Referenz
kinase_ex9_b	TCCCACAGCATCTGGGTATC			
Neoseq1	CGCAGGCCTCTCTAGACCTC	Seq.	60°C	diese Arbeit
Neoseq2	TGAATGAACTGCAGGACGAG	Seq.	60°C	diese Arbeit
Neoseq3	CATACGCTTGATCCGGCTAC	Seq.	60°C	diese Arbeit
Neoseq4	AGCCAACGCTATGTCCTGAT	Seq.	60°C	diese Arbeit
Linker_P_a	AGCTTATAACTTCGTATAGCATACA TTATACGAAGTTATGCTAGCACTA GTGTTTAAACGGGCC	56bp	Hyb.	diese Arbeit
Linker_P_b	CGTTTAAACACTAGTGCTAGCATA ACTTCGTATAATGTATGCTATACGA AGTTATA			
Kin_up_a	GGGCCAGTTTGTGGTGGGAGA GCATTT			
Kin_up_b	GCTAGCCCCGTATAAGTGTGGGAA GATGG	3509bp	66°C	diese Arbeit
Kin_down_a	GCGGCCGCTGGGTTGGAAGAGAC CAAGTACA			
Kin_down_b	CCGCGGCCAGGATGAACAAGTTT CTGTGG	3501bp	66°C	diese Arbeit
Kin_S2_a	ATCCCATGAAGGAATGGACA			
KIn_S2_b	CCTCTGGGCATCAATTCTG	448bp	58°C	diese Arbeit
<u>Polymorphe Marker</u>				
BAC147N22rev_a	GAAGCTGCTGTGTCCTTGTCG	513bp/	65°C	Ullbrich, pers
BAC147N22rev_b	CAGGTCAGAATGAGCAAGTAC	AluI		Mitteilung
Mor_int2_a	GAACAGCCTCTCCCTTCTCA	1533bp/	66°C	diese Arbeit
Mor_Int2_b	GTGAGCCAAAAGGTGGACT	XbaI		
BAC123J24for_a	AGCTGCCTAGTGGCTTTAGAGAT	1518bp/	68°C	Ullbrich, pers.
BAC123J24for_b	GCTGGCTGAATGCTTAGCTAGTA	HaeIII		Mitteilung
KiaaS5_a	AGAAGGCGGCAAAAATTACA	436bp	60°C	Switek, pers.
KiaaS3_b	AAATGGAGCCAAAGGAGACA			Mitteilung
Murr1_d	ACCATGGGTGGCAAGTCCCTGA	630bp/	60°C	Fuchs 2001
Murr1_e	ACAAGGGTCTCACCACATT	HaeIII		
Homint10_a	TCCCTGCCACTTCTTACCTG	1481bp/	68°C	diese Arbeit
Homint10_b	TTGCCTACACTGCCCTCTCT	AluI		
Homint14_e	CCCTGATACTGTCTCTGCTC	304bp	64°C	diese Arbeit
Homint14_f	CACTGGTCATCCCTTCTCTG			
Homint17_a	GTGACAGTAGCCCAAATCCA	1524bp/	66°C	diese Arbeit
Homint17_b	CATTACCTCCCAAGTGCTGA	AluI		
<u>Vps54</u>				
Vps54_Sonde_Ex24_a	TTCACTACCACTGTTATGTCACTG GGTAA			
Vps54_Sonde_Ex24_b	CCACAAGATTAGGCACTCTGACAG G	545bp	66°C	Hahn 2004
Vps54_LC1_a	TCACATCACAAAGGATTACCA			
Vps54_LC1_b	GAAGGAACAGGAGCTTTTAC	120bp	60°C	diese Arbeit
Vps54_LC2_a	ATACTGCTGGTGGGAAAGG			
Vps54_LC2_b	CCTGGGTAGTTTTCTTGAGG	185bp	60°C	diese Arbeit
Vps54_LC3_a	ACATTCGACCTGTGCAGTCA			
Vps54_LC3_b	CACAAAGTCCAATCCCCAAG	211bp	60°C	diese Arbeit
Vps54_LC4_a	GCTTGCAGATCAAATGAGAA			
Vps54_LC4_b	GTCTGTGTCCAAGGAGCTGT	219bp	60°C	diese Arbeit
T7	TAATACGACTCACTATAGGG			
BAC115_T7	AGAAAATGAAGCAAAGTGATGTG	394bp	58°C	diese Arbeit
SP6	CCGTCGACATTTAGGTGACA			
BAC115_SP6	TCATTTTCTCCAGGCAAAC	490bp	58°C	diese Arbeit
lacZ-F2	GAATTATTTTTGATGGCGTT	854bp	56°C	Böse, pers.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt	T _A °C	Referenz
lacZ-R1	ATTCATTGGCACCATGCC			Mitteilung
PCR_TrapWT_Allel_a	TCCTTAGAGAGTGATCGTGAGAA			
PCR_WT_Allel_b	CTCCCAGTAGAGCCAACAAG	413bp	60°C	diese Arbeit
PCR_Trap_Allel_b	GCCTGCTCAAACCTGAACC	324bp		
Trap_Neu_2a	ATGGTCTTGGTCCTTGGTG	974bp	66°C	diese Arbeit
PCR_Mut_5b	GCTCTGCTCCTCCAGTCTCCT			
Trap_S1_a	GAGGATTGCCCACTGAAAGA	505bp	63°C	diese Arbeit
Trap_S2_b	CAACAAAGCAGACCCAACAG			
Y2H-C-Vps54_a	<u>GAATTC</u> AAAAACTTGGCCCTCTCT TCAC	526bp	68°C	diese Arbeit
Y2H-C-Vps54_b	<u>GTCGAC</u> CTGTCATCACCTCTTCTG TTCC			
Vps54_C_t_2	<u>GAATTC</u> CCCCGAAGAACAACACAG A	238bp	63°C	diese Arbeit
Vps54_C_t_3	<u>GAATTC</u> CCTCAAATGGGTTGGTC AC	135bp	63°C	diese Arbeit
<u>qRT-PCR</u>				
beta-actin_a	AGATTACTGCTCTGGCTCCT	149bp	60	diese Arbeit
beta-actin_b	GGACTCATCGTACTCCTGCT			
App_a	CTTTTGGGGTGGACTCTGT	128bp	60	diese Arbeit
App_b	CTCTTCCGTCTTGATGTTTGT			
iNOS_a	GAACTTGAGCGAGGAGCA	162bp	60	diese Arbeit
iNOS_b	GCTGGAActCTGGGCTGT			
Vimentin_a	AAGACGGTTGAGACCAGAGA	162bp	60	diese Arbeit
Vimentin_b	TGCAGTAAAGGCACTTGAAA			
CD_68_a	TCTGCTGTGGAATGCAAG	154bp	60	diese Arbeit
CD_68_b	ATGATGAGAGGCAGCAAGAG			
Nfm_a	GTCATTTGCGAGAATACCAG	164bp	60	diese Arbeit
Nfm_b	TATTGTGACTGAGGGCTGTC			
Ppp2r5d_a	CGCCCTCTACTACTGGAACA	179bp	60	diese Arbeit
Ppp2r5d_b	ACAGCTTCTGGTTCATCTCC			
Serf2_a	CAAACGAGAAGAAGGAGGAA	127bp	60	diese Arbeit
Serf2_b	TGGGACCTGTGAGCACTAC			
Comp2_C3_a	CTGATGAACAACTGGAGGAAC	142bp	60	diese Arbeit
Comp2_C3_b	AGGAGGGCGTAGGATGTG			
Nfl_a	GGACGAGGTGTCGGAAAG	167bp	60	diese Arbeit
Nfl_b	GCTCATTCTCCAGTTTGTG			
Pkp_4_a	CCTCGCTCTGAATACGATAGC	197bp	60°C	diese Arbeit
Pkp_4_b	TTCCTGGTGGAGTCATCTTG			
Prss11_a	CAAAGCCAAAGAGCTGAAGG	140bp	60°C	diese Arbeit
Prss11_b	GTCCGTTGATGCTGATGATG			
Cntn2_a	CCATCCCTACACACCCTTTG	170bp	60°C	diese Arbeit
Cntn2_b	GCTCCCAGCTTACGTTTCATC			
Plp1_a	GAATCGCCTCCTTTTTCTTC	160bp	60°C	diese Arbeit
Plp1_b	GCCACTCCCAGCACATAG			
Mpz_a	CGGACATAGTGGGCAAGAC	130bp	60°C	diese Arbeit
Mpz_b	AAGAGCAACAGCAGCAACAG			
ApoE_a	TGCGAAGATGAAGGCTCTG	115bp	60°C	diese Arbeit
ApoE_b	CCAGGGTTGGTTGCTTTG			
Ctsd_a	CTGGCTCCTCTAACCTGTGG	218bp	60°C	diese Arbeit
Ctsd_b	GATACCTCTTGCCCTTGACTGG			
Sparc_a	CGACTCTTCCCTGCCACTTCT	203bp	60°C	diese Arbeit
Sparc_b	GGTTGTTGCCCTCATCTCTC			
NM_146247_a	GCCGAAGTGTTCTACGATGATG	176bp	60°C	diese Arbeit
NM_146247_b	AGGGAGGCACGGAAGTGA			
CD63_a	TGGAAGGAGGAATGAAGTGTG	149bp	60°C	diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Produkt	T _A °C	Referenz
CD63_b	CAGCGAGCCAGCAGTAGTC			
Snag1_a	CTATGCGACTTTGTGCCTTTAGT	158bp	60°C	diese Arbeit
Snag1_3b	GTGGCGAAGGAAATAGTGT			
Prdx6_a	TATCCTCTACCCTGCCACCA	135bp	60°C	diese Arbeit
Prdx6_b	GGAACCTACCATCACGCTCTC			
Mea1_a	TGGAGAGTGAGGATGAAGATGA	197bp	60°C	diese Arbeit
Mea1_b	GGCTTGGAGGGCTTTCTGT			
Prdx5_a	AAGCAGGTTGGGAGTGTG	157bp	60°C	diese Arbeit
Prdx5_b	CCTTCTTGCCCTTGAAC			
Itih2_3a	CCAGCCATCCACATCTTC	123bp	60°C	diese Arbeit
Itih2_3b	ATCCGTCTGTAGTCCTTCT			
Nfh_a	CATTGAGATTGCCGCTTAC	129bp	60°C	diese Arbeit
Nfh_b	TTGACTTTTATGTGCGTGGA			
Tnfr1_a	TACGGCTTCCCAGAATTACC	125bp	60°C	diese Arbeit
Tnfr1_b	GGTTCTCCTTACAGCCACAC			
Gap43_a	AGCCTAAACAAGCCGATGT	190bp	60°C	diese Arbeit
Gap43_b	TCTTTACCCTCATCCTGTGCG			
Gpd1_a	ACCCAACCTTTCGCATCAC	105bp	60°C	diese Arbeit
Gpd1_b	CCAAGCCCATCACAGAAG			
Northern-Blots				
Mea1_Ppp5r2d_Sond_a	GACTGCTTTCCCTTGTGCTC	431bp	56°C	diese Arbeit
Mea1_Ppp5r2d_Sond_b	GCTGCCTTACCTCCCTACATT			
b_actin_North_a	AGGGTGTGATGGTGGGAATG	406bp	66°C	diese Arbeit
b_actin_North_b	AGGATGGCGTGAGGGAGAG			
Vim_North_a	CAGATGCGTGAGATGGAAGA	486bp	60°C	diese Arbeit
Vim_North_b	TCTTGCGCTCCTGAAAACT			
Nefm_North_a	CACACGCCATAGTCAAGGAA	506bp	68°C	diese Arbeit
Nefm_North_b	TGAGCAAGGACTGCTGTGAC			
Mplp_North_a	ACTCTGCCTTTGCCACTGAT	499bp	63°C	diese Arbeit
Mplp_North_b	TCCTTGCTTTGACACCCTTC			
Snag1_North_a	GCAACTTCCTCTCTTGGATT	512bp	62°C	diese Arbeit
Snag1_North_b	TGCTTCAATAGGACCGAGAAC			
ApoE_North_a	CAGAAGCGCCTAGCTGTGT	484bp	62°C	diese Arbeit
ApoE_North_b	CCTGGCTGGATATGGATGTT			
Prdx6_North_a	TCCACATCTGCTCTCTGGTG	520bp	62°C	diese Arbeit
Prdx6_North_b	CCTTCCTAATGTTGCGGTGA			
Mpz_North_a	ACAGCCGAAGCACCAAAG	429bp	62°C	diese Arbeit
Mpz_North_b	GGCGAAGGAGGAGTACAAGA			

2.1.6 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D), New England Biolabs, Schwalbach (D)
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D), Invitrogen, Karlsruhe (D)
Taq-DNA Polymerase	Qiagen, Hilden (D)
Proof-Start DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden (D)
Omniscript RT-Polymerase	Qiagen, Hilden (D)
Expand Long-Template Kit	Roche, Mannheim (D)
Transcriptor RT-Polymerase	Roche, Mannheim (D)

Superscript III RT-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Sybr Green PCR-Kit	Qiagen, Hilden (D)
Shrimp Alkaline Phosphatase	Amersham Pharmacia; Freiburg
Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Klenow-Fragment DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D), Ambion, Austin (USA)
RNase A	Roth, Karlsruhe (D)
Lysozym	Roth, Karlsruhe (D)
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen (D)
Trypsin/EDTA	PAA, Linz (A)

2.1.7 Fragmentlängenstandards

Bezeichnung	Fragmentlängen	Bezugsquelle
Gene Ruler DNA Ladder Mix	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 (bp)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
DNA 100bp- Leiter	100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 (bp)	MBBL, Bielefeld (D)
DNA 100bp- Leiter (erweitert)	100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000 (bp)	MBBL, Bielefeld (D)
DNA Low-range PFGE ladder	0.13, 0.56, 2.03, 2.32, 4.36, 6.55, 9.42, 23.1, 48.5, 97.0 145.5, 194.0 (kb)	New England Biolabs, Schwalbach (D)
RNA ladder high-range	1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 (bp)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (D)
Mark12 Protein- ladder	200, 116.3, 97.4, 66.3, 55.4, 36.5, 31.0, 21.5, 14.4, 6.0, 3.5, 2.5 (kDa)	Invitrogen, Karlsruhe (D)

2.1.8 Nährmedien

3.1.8.1 Bakterienkulturmedien

Luria-Bertani (LB):	10 g/l Bactotrypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
Terrific Broth (TB):	12 g/l Trypton 24 g/l Hefeextrakt 4 ml/l Glycerin

nach dem Autoklavieren zusetzen:
 100 ml 0,17 M KH_2PO_4 / 0,72 M K_2HPO_4 (steril)

SOC: 20 g/l Bactotrypton
 5 g/l Hefeextrakt
 0,5 g/l NaCl
 10 ml/l 250 mM KCl
 nach dem Autoklavieren zusetzen:
 5 ml/l 2 M MgCl_2 (steril), 20 ml/l 1 M Glucose (steril)

Für das Gießen von Petri-Schalen wurden 15g/l Agar zugesetzt. Antibiotika wurden erst nach Abkühlen auf ca. 50°C hinzugefügt. Für Blau/Weiß Selektion wurde 0,16ml 1M IPTG und 1,6ml X-gal (20mg/ml) zugesetzt.

M9-Minimalmedium (Speziell für JQ101): 20 g Agar in 600 ml H_2O autoklavieren,
 nach Abkühlung auf 55°C steril zusetzen:
 200 ml 5x M9 Salz*
 100 ml –Leu Dropout (siehe Hefekulturmedien)
 10 ml 40% Glucose
 1 ml 1 M Thiamine HCl
 4 ml Prolin (10 mg/ml)
 2 ml 1 M MgSO_4
 0,1 ml 1 M CaCl_2
 1 ml Ampicillin (50 mg/ml)

* **5x M9 Salz:** 64 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
 15 g/l KH_2PO_4
 2,5 g/l NaCl
 5,0 g/l NH_4Cl

2.1.8.2 Hefekulturmedien

YPD: 20 g Pepton
 10 g Hefeextrakt

YPDA: 20 g Pepton
 10 g Hefeextrakt
 15 ml 0,2% Adeninhemisulfat
 (Nach Abkühlung auf 55°C zusetzen)

SD 6,7 g Hefestickstoffbasis (ohne AS)
 nach dem Autoklavieren zusetzen:

	50 ml 40% Glucose (steril)
	100 ml 10x DO* (steril)
*10x Dropout (DO) Lösung:	200 mg/l L-Adeninhemisulfat
	200 mg/l L-Arginin HCl
	200 mg/l L-Histidin HCl
	300 mg/l L-Isoleucin
	1000 mg/l L-Leucin
	300 mg/l L-Lysin HCl
	200 mg/l L-Methionin
	500 mg/l L-Phenylalanin
	2000 mg/l L-Threonin
	200 mg/l L-Tryptophan
	300 mg/l L-Tyrosin
	200 mg/l L-Uracil
	1500 mg/l L-Valin

Für die Herstellung der Dropout-Lösungen wurden die entsprechenden Aminosäuren nicht zugesetzt.

Für die Herstellung von Platten wurden den Medien jeweils 20 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

2.1.8.3 Zellkulturmedien

Feeder Medium (FM):	50 ml FCS
	5 ml 100 x Penstrep (10000 U)
	5 ml L-Glutamin
	5 ml β -Mercaptoethanol*
	400 ml DMEM
Complete Medium (CM):	75 ml FCS
	5 ml 100 x Penstrep (10000 U)
	5 ml L-Glutamin
	5 ml Na-Pyruvat
	5 ml Nicht essentielle Aminosäuren
	5 ml β -Mercaptoethanol*
	400 ml DMEM
	1000U/ml LIF (Leukemia inhibitory factor)

*Verdünnung von 7 μ l Stammlösung in 10 ml Wasser

2x Freezing Medium:	20% FCS
	20% DMSO
	60% DMEM

Medium für COS7-Zellen	DMEM 1x High Glucose (E15-810, PAA, Pasching) 1% Nicht essentielle Aminosäuren (M11-003, PAA, Pasching) 1% N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine (200mM, Biochrom AG, Berlin) 10% FCS (Biochrom AG, Berlin)
Medium für CHO-Zellen	DMEM 1x High Glucose (E15-810, PAA, Pasching (D)) 1% Nicht essentielle Aminosäuren (M11-003, PAA, Pasching (D)) 1% N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine (200mM, Biochrom AG, Berlin (D)) 10% FCS (Biochrom AG, Berlin (D)) HT-Supp. (50x, 20ml/l, F0493, Biochrom AG, Berlin (D)) Prolin (50x, 15mM, 20ml/l)

2.1.9 Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	150mg/ml in Wasser	25-150µg/ml
Tetracyclin	50mg/ml in Ethanol	10-15µg/ml
Kanamycin	20mg/ml in Wasser	20µg/ml
Geneticin (G418)	50mg/ml in Wasser	100-800µg/ml

2.1.10 Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
QIAGEN Plasmid Purification Kits (div. Größen)	Qiagen, Hilden (D)
Nucleobond Plasmid Purification Kits	Macherey-Nagel, Düren (D)
Nucleo-Spin Extract Kits	Macherey-Nagel, Düren (D)
QIAquick Gel Extraction Kits	Qiagen, Hilden (D)
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Expand Long-Template Kit	Roche, Mannheim (D)
Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Heidelberg (D)
Pretransformed MATCHMAKER Library	BD Bioscience, Palo Alto (USA)
Taq-PCR Mastermix	Qiagen, Hilden (D)

2.1.11 *In silico*-Ressourcen

Name	Adresse
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/
Golden Path Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
NCBI Geo	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=GEO
BCM Searchlauncher	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/
RepeatMasker	http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/
Protein Tools	http://www.expasy.org/tools/
VISTA	http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml
Webcutter	http://www.ccsi.com/firstmarket/firstmarket/cutter/cut2.html
Primer3	http://cbr-rbc.nrc-cnrc.gc.ca/cgi-bin/primer3_www.cgi

2.2 DNA-Methoden

2.2.1 Handhabung rekombinanter Bakterien

Für die Anzucht von Bakterien wurde in der Regel Luria-Bertani Medium (LB-Medium) verwendet. Sollte eine größere Plasmidausbeute erreicht werden, ist Terrific-Broth (TB-Medium) verwendet worden. In Flüssigkultur wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Um eine Reinkultur zu gewährleisten, wurden bei Bedarf die Kolonien auf Platte zur Vereinzelnung ausgestrichen. Für Platten wurden dem Medium 15g/l Agar zugesetzt. Medien wurden generell autoklaviert, um eine Verunreinigung mit anderen Mikroorganismen zu vermeiden. Für die Blau-Weiß Selektion wurden dem Agar-Medium X-gal und IPTG zugesetzt. Rekombinante Klone wurden auf Platten bis zu vier Wochen gehalten. Für längere Lagerungen wurden Agar-stabs verwendet. Hierzu wurde ein 1,5ml Plastikgefäß mit Schraubverschluss zu zwei Dritteln mit sterilem *stab*-Agar (LB-Medium mit 0,6% (w/v) Agar, optional kann 10mg Cystein pro Liter zugegeben werden) gefüllt. Die gewünschte Kolonie wurde mit einem Zahnstocher gepickt und durch stoßen in den Agar angeimpft. Der *stab* wurde für 8h bei 37°C inkubiert und trocken bei Raumtemperatur fest verschlossen gelagert. Für längerfristige Lagerung (bis zu mehreren Jahren) wurden Glycerinkulturen (Kultur in 20% Glycerin) angelegt. Hierzu wurden 200µl 100% Glycerin in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und 800µl frische Bakterienkultur dazugegeben. Nach Vortexen wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden One Shot™ Zellen (Top10F') der Firma Invitrogen, JM109 der Firma Promega, JQ101 oder DH5α verwendet. Hierzu wurden die Zellen auf Eis angetaut, und 2µl Ligationsansatz oder Plasmidlösung (5ng/µl oder mehr) zugegeben und mit der Pipettenspitze umgerührt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde das Gefäß mit den Zellen 30-50 Sekunden lang in ein 42°C Wasserbad überführt und danach sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 250-800µl SOC-Medium zugefügt. Die Zellen erholten sich bei 37°C für eine

Stunde im Schüttler. Von diesem Ansatz wurden 50 und 200 μ l auf Selektionsplatten (Ampicillin) ausplattiert.

Für die Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurde der Gene Pulser™ der Firma BIO-RAD verwendet. Hierzu wurden am Gerät eine Spannung von 2,5kV, ein Widerstand von 400 Ω und eine Kapazität von 25 μ F eingestellt. Die elektrokompenten XL1-Blue Zellen wurden auf Eis angetaut. 2-5 μ l des zu transformierenden Ligationsansatzes wurde zu den Zellen pipettiert und für eine Minute auf Eis inkubiert. Eine vorgekühlte Elektroküvette wurde mit dem Ansatz beladen und in den Schlitten gestellt. Dabei war darauf zu achten, dass die Küvette von außen keine Restfeuchtigkeit aufweist. Nach dem Einschieben des Kontaktgebers wurden die beiden Knöpfe am Gene Pulser™ solange gleichzeitig gedrückt bis ein Signal ertönte. Sofort danach wurden 0,8ml SOC-Medium zu den Zellen pipettiert und der Ansatz in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 90minütiger Erholung der Zellen in dem 37°C Schüttler wurden die Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.3 Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Plasmidisolierung aus Bakterien stehen verschiedene Präparationsmethoden zur Verfügung, die sich hinsichtlich der Reinheit der DNA und des Arbeitsaufwandes unterscheiden.

2.2.3.1 Easy-Präp

Eine sehr einfache und schnelle Methode, um Plasmid-DNA zu gewinnen, ist die von Berghammer und Auer (1993) beschriebene Methode "Easy-Präp". Diese Methode eignet sich gut, um eine größere Anzahl von Bakterienklonen auf eine erfolgreiche Transformation zu testen. Ein Nachteil ist die geringe Reinheit, da hier auf den Phenolisierungsschritt verzichtet wird. Die Reinheit ist aber für schnelle Tests durchaus ausreichend. Durchführbar ist die Easy-Präp allerdings nur für *endA*⁻-Stämme, da die Endonuklease A nicht durch Hitze inaktivierbar ist und die DNA abbauen würde.

Hierzu füllt man 1ml Medium (LB- bzw. TB-Medium) in ein Eppendorfgefäß, sticht mehrere Löcher in den Deckel, und inkubiert die Kultur über Nacht bei 37°C im Schüttler. Nach 30-60 Sekunden in der Eppifuge (13000rpm, RT) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 50 μ l Lysispuffer (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, 15% Sucrose, 0,4mg/ml RNase A, 2mg/ml Lysozym, 0,1mg/ml BSA) gelöst. Nach 5 Minuten im Schüttler bei

Raumtemperatur wurde das Eppendorfgefäß in ein 100°C Wasserbad für 30 Sekunden gegeben, was zur Lyse der Bakterien führte. Anschließend wurde für 60 Sekunden auf Eis inkubiert. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Eppifuge, wurden bis zu 5µl des Überstandes für eine Testspaltung und anschließender Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

2.2.3.2 Alkalische Lyse

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich high-copy wie auch low-copy Plasmide, die nur in einer geringeren Anzahl in der Zelle vorliegen, in einer höheren Konzentration isolieren.

Eine 1ml Übernachtskultur wurde in einem Eppendorfgefäß (mit Löchern versehen) angeimpft. Das Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 300µl eiskalter Lösung 1 gelöst (50mM Glucose, 25mM Tris-Cl (pH8.0), 10mM EDTA (pH8), 100µg/ml RNase A). Die Zugabe von 300µl Lösung 2 (0,2N NaOH, 1% SDS, frisch ansetzen) bewirkt durch die Erhöhung des pH-Wertes ein denaturieren der chromosomalen DNA. Das SDS ermöglicht das Ablösen DNA-assoziiertes Proteine. Das Eppendorfgefäß wurde 5-9mal invertiert, und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Mit 300µl Lösung 3 (3M Kaliumacetat mit Eisessig pH4.8 einstellen) wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt. Das Eppendorfgefäß wurde solange invertiert, bis sich eine homogene Suspension gebildet hat und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach 5minütiger Zentrifugation (13000rpm in der Eppifuge 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch wurden letzte in Lösung befindliche Proteine extrahiert. Dazu wurden 600µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und vorsichtig invertiert. Nach kurzem Zentrifugieren (für 2 Minuten) wurde von den sich bildenden Phasen die obere (wässrige) Phase vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden zu dieser Lösung 700µl Isopropanol gegeben und vorsichtig invertiert. Nach 2minütiger Inkubation wurde anschließend 6 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes, wurde das Pellet mit 300µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nachdem der Alkohol komplett abgesaugt wurde, wurde das Pellet in 30-50µl TE pH8.0 oder H₂O_{bidest} aufgenommen. Bis zu 3µl wurden für Testspaltungen eingesetzt.

2.2.3.3 DNA-Plasmid Präparation mittels Ionenaustauschersäulen

Für die Präparation von hochreiner Plasmid-DNA oder von Plasmiden mit geringer Kopienzahl empfiehlt sich die Verwendung eines Kits. Diese basieren ebenfalls auf der alkalischen Lyse, nur wird hier keine Aufreinigung der DNA mit Phenol/Chloroform vorgenommen. Durch die Herstellung optimaler Salzkonzentrationen und pH-Werte wird die Plasmid-DNA in einer equilibrierten Ionenaustauscher-Säule gebunden, gereinigt und anschließend von ihr eluiert. Auf diese Weise können degradierte RNA, zelluläre und nukleinsäureassoziierte Proteine von der Plasmid-DNA entfernt werden. Die Fällung erfolgt mit Isopropanol.

Nachfolgend ist ein Protokoll zur Verwendung der Nucleobond AX Säulen exemplarisch angegeben. Protokolle anderer Anbieter (z.B. Qiagen) unterscheiden sich nur geringfügig. Bei Verwendung anderer Säulen (AX100 oder AX500) ändern sich die eingesetzten Lösungsmengen.

Die Zellen wurden geerntet, indem sie bei 4°C für 5-10 Minuten zentrifugiert wurden (Rotor GSA 6000rpm). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 12ml S1 Puffer resuspendiert. Wenn alles gelöst war, wurde 12ml S2 Puffer zugeben, achtmal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 12ml Puffer S3 zugeben, 8mal invertiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer mindestens 40minütigen Zentrifugation bei 12000g, wurde der Überstand über einen angefeuchteten Faltenfilter in ein 50ml Röhrchen (Greiner „Bluecap“) filtriert. Eine Nucleobond AX 500 Säule wurde mit 6ml N2 Lösung equilibriert. Der filtrierte Überstand wurde zweimal über die Säule gegeben und anschließend dreimal mit 12ml N3 Lösung gewaschen. Die so gereinigte Säule wurde mit 7ml Elutionspuffer N5 (vorgewärmt auf 50°C) in ein Greiner Röhrchen eluiert. Pro Röhrchen wurde 0,7-faches Volumen (5ml) an Isopropanol zugegeben und mit Parafilm abgedeckt, invertiert und für 30 Minuten zentrifugiert (SS34 Rotor 12000rpm). Die entstehenden Pellets wurden mit einem Filzstift markiert, der Überstand verworfen und ca. 3ml 70% Ethanol (-20°C) vorsichtig auf den gegenüberliegenden Rand pipettiert. Nach 15minütiger Zentrifugation im SS34 Rotor bei 12000rpm wurde der Überstand verworfen. Verbleibende Tropfen wurden mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Röhrchen für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um restliches Ethanol abzdampfen. Das Pellet wurde sorgfältig in 50-200µl Wasser (pH 8.0 mit NaOH eingestellt) resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und bei 37°C in den Schüttler für mindestens 5 Minuten gestellt, um restliche Plasmide zu lösen.

2.2.4 Plasmidisolierung aus Hefen

1ml einer über Nacht Kultur wurde für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200µl Breaking-buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA) resuspendiert. Dann wurden etwa gleiches Volumen (ca. 200µl) 0,25-0,5 mm Glasperlen (Roth, Karlsruhe) zugegeben, die zuvor in konzentrierter HCl gewaschen und solange mit Wasser gespült worden waren, bis der pH-Wert 7 erreicht war. 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zugesetzt. Die Suspension wurde 2 Minuten gevortext und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte mit Natriumacetat und Ethanol. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in 10µl Wasser resuspendiert.

2.2.5 DNA-Isolierung aus Gewebe

Nach der Präparation des Gewebes (maximal 400mg pro Ansatz) aus der Maus wurde die Gewebeprobe schnell in flüssigem N₂ schockgefroren, um eine Degradierung der DNA durch nukleolytischen Abbau der Enzyme zu verhindern. Anschließend wurde das Gewebe in einer vorgekühlten Reibschale in flüssigem N₂ zu feinem Pulver gemahlen, in 12ml Greinerröhrchen überführt und in 4ml DNA-Gewebe-Extraktionspuffer (100mM NaCl, 25mM EDTA, 0,5% SDS, 10mM Tris-Cl pH 8,0, 0,1mg/ml Proteinase K (kurz vor Gebrauch zusetzen)) resuspendiert und über Nacht bei 55°C geschüttelt. Dem Ansatz wurden 3ml Phenol zugegeben, um dann 2 Stunden bei 4°C zu schütteln und anschließend 10 Minuten zu zentrifugieren (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%). Hiernach wurde ausschließlich die obere wässrige Phase entnommen und mit 4ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und 1,5 Stunden bei 4°C invertiert. Der Ansatz wurde erneut für 10 Minuten zentrifugiert (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%), die obere wässrige Phase wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt und mit 4ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 30 Minuten bei 4°C invertiert. Es erfolgte ein weiterer 10minütiger Zentrifugationsschritt (Hettich Rotanta/S Tuttlingen 75%), und die obere wässrige Phase wurde mit 2ml Ammoniumacetat (7,5M) und 10ml 100% Ethanol (bei -20°C vorgekühlt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 4°C gefällt. Nach dem Pelletieren wurde noch mit 2ml 70% Ethanol (bei -20°C vorgekühlt) gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation und das Pellet wurde unter dem Abzug getrocknet.

Hiernach wurde die DNA in 2ml TE-Puffer resuspendiert, und die Konzentration durch UV-Absorptionsspektrometrie bestimmt.

2.2.6 Schnellpräparation von DNA aus Mausschwanzspitzen

Für eine Diagnostik der zu untersuchenden Maus-Genotypen wurde eine DNA-Probe der einzelnen Tiere benötigt. Diese wurde aus einem ca. 3mm langen Stück Schwanzspitze gewonnen, die den Mäusen nach dem Entwöhnen vom Muttertier abgenommen wurde. Die Spitze wurde in 300µl Pufferlösung (10mM Tris pH 8, 50mM KCl, 0,045% Tween20 und 0,045% NP40) zerkleinert und nach Zusatz von Proteinase K in einer Endkonzentration von 10µg/ml für mindestens 2 Stunden bei 55°C im Schüttler inkubiert. Das Enzym wurde anschließend für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und der Überstand nach einer kurzen Zentrifugation in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für eine PCR-Diagnostik wurden 1-2 µl dieser Präparation eingesetzt.

2.2.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Wird zum Beispiel nach einer Restriktionsspaltung nur ein bestimmtes Fragment für weitere Arbeiten benötigt, so ist es möglich, die verdaute DNA über ein Agarosegel aufzutrennen. Nach dem Färben mit Ethidiumbromid werden auf einem Transilluminator die Größen der einzelnen Banden bestimmt und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die DNA-Extraktion aus Agarose wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN oder das Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Beispielhaft ist das Protokoll der Firma QIAGEN angegeben. Hierbei wurde das isolierte Agaroseblöckchen gewogen und in dem 3fachen Volumen QG Puffer bei 50°C ca. 10 Minuten gelöst. Der Ansatz wurde anschließend auf eine mitgelieferte Minisäule gegeben und durch Zentrifugation für 1 Minute in einer Tischzentrifuge an das Säulenmaterial gebunden. Nach dem Waschen mit 750µl PE-Puffer wurde die Säule durch wiederholtes Zentrifugieren getrocknet und die DNA mit 30µl Elutionspuffer (10mM Tris-Cl pH 8.0) eluiert. Die Konzentration wurde anschließend in einem Agarosegel abgeschätzt, oder photometrisch bestimmt.

2.2.8 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Da die DNA meist nur in sehr kleinen Mengen und Volumina zur Verfügung steht, wurde die Konzentration in einer Verdünnungen festgestellt. 2µl DNA wurden mit 58µl 10mmol Tris pH 8.0 versetzt und die Absorption bei 260nm gemessen. Eine A_{260} von 1,0 entspricht dabei 50µg/ml dsDNA bzw. 40µg/ml ssDNA. Die Messung der A_{280} und das Errechnen des Quotienten von A_{260} und A_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Wird dabei ein Verhältnis von 1,8-2,0 erreicht, so nimmt man eine reine Präparation an.

Eine weitere Methode der Konzentrationsbestimmung ist das Abschätzen der Fluoreszenz von gebundenen Ethidiumbromid. Dazu wird die DNA-Probe gegen einen Fragmentlängenstandard bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen, im elektrischen Feld aufgetrennt und anschließend im Ethidiumbromidbad gefärbt. Dabei interkaliert der Farbstoff in die DNA. Beim Bestrahlen mit UV-Licht fluoresziert Ethidiumbromid orange. Hierbei kann ein Mengenverhältnis zwischen eingesetztem Marker (bekannter Konzentration) und Probe abgeschätzt werden.

2.2.9 Restriktionsspaltungen von DNA

Je nach Menge der zu spaltenden DNA wurde das Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes bestimmt. Für Testspaltungen wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes mit 20µl angesetzt. Hierbei wurden 0,5µg DNA, ca. 0,5µl Restriktionsenzyme (Menge ist abhängig von der Konzentration, bzw. der spezifischen Aktivität der Enzyme) und 2µl 10-fach Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit Wasser auf 20µl aufgefüllt. Bei Restriktionsspaltungen größerer DNA-Mengen, z.B. für nachfolgende Ligationen, wurde ein Volumen von 50-100µl eingesetzt. Hierbei wurden 5-10µg DNA, 2µl Restriktionsenzym, 5µl (10)µl 10-fach Puffer mit Wasser bis auf 50µl (100µl) aufgefüllt, angesetzt.

Optional wurde BSA (Rinderserumalbumin) in einer Endkonzentration von 0,1µg/µl dem Spaltungsansatz zugegeben. BSA kann bei schwierigen Restriktionsspaltungen die Spaltungsrate durch eine Stabilisierung der Restriktionsenzyme erhöhen. Weiterhin war noch darauf zu achten, dass das Volumen der Restriktionsenzyme nicht höher als 10% des Gesamtvolumens lag, da diese in einem glycerinhaltigen Puffer vorgelegt werden und viele Enzyme bei zu hohen Glycerinkonzentrationen Staraktivität zeigen. Die Ansätze wurden bei 37°C (oder einer anderen für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur) 3 Stunden bis über Nacht inkubiert (je nach Verwendung).

2.2.10 DNA-Ligationen

Führt man Ligationen mit einem Vektor durch, der nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten ist, kann man die Rate der Religierungen des linearen Vektors ohne Insert durch den Einsatz von alkalischer Shrimp Phosphatase verringern. Dazu werden in den Restriktionsansatz des Vektors zusätzlich 1µl Shrimp Phosphatase gegeben und diese nach 37°C Inkubation durch kurzes Erhitzen (15 Minuten bei 65°C) inaktiviert. Die Wirkung ist eine Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden. Beim Einsatz mit zwei Restriktionsenzymen kann auf den Dephosphorylierungsschritt verzichtet werden. Die T4-Ligase (Gibco BRL oder MBI Fermentas) wird mit einem 5-fachen Reaktionspuffer geliefert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 20µl, das Mengenverhältnis zwischen Vektor und Insert beträgt 1:5. Setzt man standardmäßig 25ng Vektor ein, so kann man nach folgender Formel die Fragmentmenge für die Ligation berechnen (Mühlhardt, 2000):

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]$$

Für eine Ligation mit kohäsiven Enden wurden 0,5 bis 1 Weiss-Unit (entspricht 0,5-1µl) an T4 Ligase eingesetzt. Die Ligationstemperatur beträgt 16°C und erfolgte über Nacht. Der Ligationsansatz enthält 4µl 5-fach Puffer, der Rest des Volumens wurde mit autoklaviertem Aqua_{bidest} aufgefüllt.

Will man in einen Vektor eine kurze DNA-Sequenz integrieren, um z.B. Restriktionsschnittstellen einzufügen, kann ein Adapter hergestellt werden, indem zwei Oligonukleotide konstruiert werden, die diese Schnittstellen beinhalten und zu sich selbst komplementär sind. Diese werden dann zusammen hybridisiert und anschließend durch eine Ligation in den gewünschten Vektor integriert. Zunächst mussten die Oligonukleotide durch eine Kinase phosphoryliert werden, um eine spätere Ligation durchführen zu können. Der Reaktionsansatz stellte sich für jedes Oligonukleotid wie folgt dar: 2µl des Oligonukleotides (1pmol/µl), 2µl 5x Forward Reaction Buffer (Gibco BRL), 1µl ATP (10mM), 1µl T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl; Gibco BRL) und 4µl H₂O_{bidest}. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 37°C durchgeführt, anschließend wurden beide phosphorylierten Oligonukleotide vermischt. Danach wurde die Suspension in einem Wasserbad oder Thermoschüttler auf 95°C erhitzt und die Kinase durch eine 15minütige Inkubation bei dieser Temperatur deaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz langsam auf RT abgekühlt, wodurch die beiden komplementären Nukleinsäuren spezifisch hybridisierten und ein doppelsträngiger Adapter entstand. Danach konnte der Adapter mit einem entsprechend

geöffneten und dephosphorylierten Vektor ligiert werden (70ng Vektor und 1,5µl der Oligohybridisierungsreaktion).

2.2.11 Fällung der DNA

Um den bei der Ligation eingesetzten Puffer aus dem Ansatz zu entfernen oder DNA anzukonzentrieren, bietet sich eine Fällung an. Zu mindestens 100µl Ligationsansatz (bei Bedarf mit Wasser auffüllen) wurde 1/10 Volumen (10µl) 3M Natriumacetat pH5.2, und 2,5 Volumen (250µl) 100% Ethanol -20°C gegeben. Die Lösung wurde mehrmals invertiert und bei -80°C für 10-20 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten zentrifugieren bei 13000rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 0,5ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und für 10-15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Aqua_{bidest} (autoklaviert) resuspendiert (5µl). Falls die Menge der DNA gering ist (< 250ng/µl), so kann noch ein *carrier*, wie etwa t-RNA oder Glykogen, zugegeben werden, um die Fällung zu unterstützen und eine bessere Ausbeute zu erhalten.

2.2.12 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, die DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennt und durch die Einlagerung eines Farbstoffs, wie z.B. Ethidiumbromid, sichtbar macht. In einem Gleichspannungsfeld wandert die DNA in Richtung der Anode. Zur Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose (0,8 - 4,0%) in 1x TBE-Puffer (0,089M TrisCl pH 8.0; 0,089M Borsäure; 20mM EDTA), oder 1x TAE-Puffer (0,04M TrisAcetat; 1mM EDTA pH 8.0), eingewogen und in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und auf einen Rührer gestellt (um Luftbläschen aus der Lösung zu bekommen). Daraufhin wurde das Gel in der gewünschten Größe (Minigel 7 x 10cm; Großes Gel 13 x 15cm) gegossen und ein Gelkamm eingesteckt. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit 1 x TBE (bzw. TAE) überschichtet und der Kamm gezogen. In die Geltaschen wurde die zu analysierende Nukleinsäure pipettiert, nachdem diese mit Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenxanol und 30% Glycerin) gemischt worden ist. Als Vergleich wurde ein Fragmentlängenstandard aufgetragen. Mit einer Spannung von 5V/cm bis 10V/cm wurden die Fragmente aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad (1µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE, bzw. TAE) für 15-20 Minuten geschüttelt. Durch UV-Bestrahlung auf einem Transilluminator (302nm) fluoresziert der

interkalierte Farbstoff orange und gibt somit die Lage der einzelnen DNA- bzw. RNA-Fragmente wieder. Mithilfe einer fotografischen Dokumentationsanlage (Digitalkamera und Thermoprinter) wurde das Ergebnis festgehalten.

2.2.13 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Zur Größenbestimmung von BACs und deren Restriktionsfragmenten wurde die PFGE eingesetzt. Diese Methode beruht auf dem Wechsel der Polarität der elektrischen Felder zwischen unterschiedlichen Elektroden, so dass sich die aufzutrennende DNA im Gel nach jedem Wechsel neu ausrichten muss. Kürzere Fragmente richten sich schneller in dem veränderten Feld aus als längere DNA-Moleküle. Diese Methode erlaubt so die Auftrennung von Fragmenten, die in einer normalen Agarosegelelektrophorese nicht zu erreichen wäre. So kann man DNA-Moleküle bis zu einer Größe von ganzen Chromosomen auftrennen. Verwendet wurde die BIO-RAD Apparatur, die eine hexagonale Elektrodenanordnung aufweist.

Für ein Gel wurden rund 100ml 1% „fast lane“ Agarose (in 0,5x TBE) benötigt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Der Puffer wurde durch eine Kühlvorrichtung auf einer Temperatur von 14°C gehalten. Die Parameter des Laufes wurden den jeweiligen Versuchen, bzw. den aufzutrennenden Größen angepasst. Hier beispielhaft zwei häufig verwendete Programme:

Auftrennungsbereich	3-250kb	3-55kb
runtime	8,3h	7,5h
initial switch	0,2s	0,2s
final switch	21,8s	2,5s
V/cm	6,0V	6,0V

2.2.14 Elektroelution

Wenn man größere Fragmente (z.B. BACs) aus einer Gelmatrix schonend herauslösen möchte, bietet sich das Verfahren der Elektroelution an. Hierzu wurde die Elutionskammer Biotrap (Schleicher & Schuell) mit den jeweils zwei unterschiedlichen Membranen BT1 (undurchlässig für Makromoleküle) und BT2 (durchlässig für Makromoleküle) zusammengesetzt und der kleinste Abstand zwischen den Membranen in der Falle eingestellt, was einem Volumen von 200µl entsprach. Anschließend wurde die Apparatur in eine mit 1x TAE Puffer gefüllte große horizontale Elektrophoresekammer gestellt. Das

Gelstück wurde in die Zentralkammer kurz vor die BT2 Membran gelegt und die Kammer ebenfalls mit 1x TAE gefüllt. Eine Spannung von 40V wurde für 20 Stunden angelegt und die DNA wanderte auf der Anodenseite in die Falle zwischen der BT1 und der BT2 Membran. Um die an der BT1 Membran haftende DNA abzulösen wurden anschließend die Pole der Kammer getauscht und für 30 Sekunden eine Spannung von 80V angelegt. Das Eluat wurde nun mit einer Pipette zwischen der BT1 und BT2 Membran abgesaugt.

2.2.15 Transfer von DNA auf Membranen (Southern-Blot)

Für den Transfer wurden verschiedene Membranen, z.B. von Pall, Millipore oder Schleicher und Schuell, mit Porengrößen von 0,45µm verwendet. Hierzu wurden die DNA-Fragmente im Gel durch Inkubation mit 0,25N HCl für 20 Minuten partiell depurinieren. Die so generierten Strangbrüche sollten den Transfer auf die Membran erleichtern. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gespült, um die restliche Säure zu entfernen. Die Denaturierung wurde mit 0,5N NaOH und 1,5M NaCl für 30 Minuten durchgeführt.

Für den Blot-Aufbau wurde eine Schale zur Hälfte mit 20x SSC gefüllt und eine Glasplatte quer darüber gelegt. Eine Flüssigkeitsbrücke wurde erzeugt, indem man 3MM-Whatman Papier über die Glasplatte gelegt und die überstehenden Enden in die SSC Lösung eintauchen ließ. Das Gel wurde umgekehrt auf die Flüssigkeitsbrücke positioniert. Ein zurechtgeschnittenes passendes Stück Membran und drei weitere Lagen Whatman Papier wurden luftblasenfrei darüber gelegt. Anschließend wurde ein Stapel saugfähiges Papier (mindestens 10cm) aufgelegt. Eine kleine Glasplatte und ein mindestens 300g schweres Gewicht komplettierten den Aufbau. Zusätzlich wurde zwischen dem unteren Whatman Papier und den saugfähigen oberen Papieren an überstehenden Enden Parafilm gelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Die Membran wurde für 60 Minuten im 80°C Schrank getrocknet und die DNA somit fixiert. Zusätzlich wurde eine UV-Fixierung (0,8J/cm²) durchgeführt. Die Membran wurde anschließend trocken bis zur Verwendung gelagert.

2.2.16 Herstellung von radioaktiven Sonden (Random Priming)

Die verwendeten zu markierenden DNA-Sonden wurden entweder durch eine PCR-Reaktion oder durch Restriktionsspaltungen und Gelaufreinigung von klonierten Fragmenten hergestellt und anschließend mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt und mit dem *Prime-It[®] RmT Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) oder mit Klenow-Polymerase (MBI Fermentas) markiert. Beide Labeling-Reaktionen sind sehr

ähnlich. Beim Stratagene Kit wurden die mitgelieferten Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert, um den Inhalt am Boden des Gefäßes zu konzentrieren (Microspheres mit random Primer (Nonamere), Nukleotide, Puffer und Kofaktoren). Ungefähr 50ng Aufgereinigtes PCR-Produkt wurden zugegeben und das Volumen mit Aqua_{bidest} auf 42µl aufgefüllt. Um die DNA zu denaturieren, wurde für 5 Minuten in kochendem Wasser erhitzt und das Reaktionsgefäß kurz anzentrifugiert. Bei Raumtemperatur wurden 5µl des Radionukleotids ([α -³²P]dCTP mit 3000Ci/mmol) zugegeben. Mit der Pipette wurde die Probe gut durchmischt. Anschließend wurden 3µl der Magenta DNA Polymerase (4U/µl) in den Ansatz gegeben und wieder mit der Pipette durchmischt. Nach Inkubation in einem Wasserbad bei 37°C für 10 Minuten und Zugabe von 2µl Stop-Solution ist die Labeling-Reaktion abgeschlossen. Bei der Markierung mit Klenow-Polymerase wurden zunächst 25ng der Sonde mit Aqua_{bidest} auf ein Gesamtvolumen von 9µl aufgefüllt, 10 Minuten gekocht und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden dann 2µl Hexanukleotide in 10x Reaktionspuffer (Roche), 1µl Klenow-Enzym (MBI Fermentas), 5µl [α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol) und 3µl einer ATG-Lösung (je Nukleotid 0,5mM; MBI Fermentas) zugegeben. Nachdem der Ansatz gut gemischt und kurz anzentrifugiert worden war, erfolgte die Labeling-Reaktion für 30-40 Minuten bei 37°C.

Um die nicht eingebauten Nukleotide aus dem Ansatz zu entfernen wurden die ProbeQuant[™] G-50 Micro Columns (Amersham) verwendet. Diese wurden kurz gevortext und für eine Minute bei 735g (2500rpm) zentrifugiert um die Equilibrierungslösung aus der Säule zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gestellt und die Labeling-Reaktion tropfenweise auf die Säule gegeben. Eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 735g konzentrierte die markierte Sonde am Boden des Eppendorfgefäßes, die nicht eingebauten Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten. Um Einzelstränge zu erhalten wurde die so aufgereinigte Sonde für 5 Minuten aufgekocht, kurz anzentrifugiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

2.2.17 Hybridisierung und Detektion

Die zu hybridisierenden Blots wurden in eine Hybridisierungsröhre passender Größe überführt. Vorgewärmter (60°C) Hybridisierungspuffer Perfecthyb[™] Plus (Sigma) wurde in die Röhre gegeben (0,125ml/cm²). Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde denaturierte Heringssperma-DNA, in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 30 Minuten bei 68°C wurde die frisch markierte

Sonde in die Prähybridisierungslösung gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass man nicht die Membran berührt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Um eine hohe Stringenz zu erreichen, wurde die Membran einmal für 20 Minuten in *Low Stringency*-Puffer (2x SSC, 0,1% SDS) und einmal in *Ultra-high Stringency*-Puffer (0,1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die gewaschenen Blots wurden nun in Haushaltsfolie verpackt und mit einem Röntgenfilm in einer Expositionskassette bei -70°C über Nacht inkubiert. Der Röntgenfilm wurde anschließend in der Dunkelkammer wie folgt entwickelt: Inkubation für 5 Minuten in Röntgenentwickler (1:5 Verdünnung), 1 Minute im Stoppbad (H₂O mit wenigen Tropfen Essigsäure) und anschließender fünfminütiger Fixierung (1:5 Verdünnung der Fixierungslösung). Nachdem der Film gewässert wurde, ist er an der Luft getrocknet worden.

2.2.18 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine einfach zu handhabende Methode, um DNA selektiv zu amplifizieren. Hierbei muss man allerdings über Sequenzinformationen der flankierenden Bereiche des zu vervielfältigen Stückes verfügen. Für diese Bereiche werden Oligonukleotid-Primer synthetisiert, so dass sie in gegenläufiger Richtung an den komplementären DNA-Strang binden können und so die Ziel-DNA einrahmen. Nach einer Hitze-Denaturierung werden die angelagerten Primer (Annealing) von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Dieser Vorgang (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird bis zu 35-mal wiederholt. Das bei jedem Zyklus entstehende Fragment dient im nächsten als Matrize, so dass eine exponentielle Amplifikation stattfindet.

Essentiell für diese Reaktion ist eine hitzestabile Polymerase, da die Denaturierung der Template-DNA bei 92-94°C stattfindet. Verwendung findet in der Regel die *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, die ein Temperaturoptimum von 72°C besitzt. Nach Beenden der Reaktionen werden die PCR-Ergebnisse in der Regel auf ein Agarosegel aufgetragen (5-10µl).

2.2.18.1 Standard-PCR

Bei der Auswahl eines Primerpaares haben sich folgende Regeln bewährt (QIAGEN, *Critical Factors for Successful PCR*): Folgen von 3 oder mehr G oder C am 3' Ende wurden genau wie ein T am 3' Ende vermieden. Außerdem wurden komplementäre Sequenzen innerhalb des Primers oder zwischen den eingesetzten Primern nicht

zugelassen. Die Länge des Primers lag zwischen 18-30 Nukleotiden, da kleinere Primer zu unspezifischen Nebenreaktionen führen könnten. Der GC-Gehalt lag zwischen 40-60%. Die Annealing Temperatur T_m wurde nach der 2 + 4-Regel abgeschätzt. Hierbei rechnet man für jede A+T Paarung 2°C und für G+C 4°C. Als Ausgangspunkt für Optimierungsversuche wurde die Annealing Temperatur 5°C unter dem abgeschätzten T_m Wert gewählt. Die Primer-Konzentration sollte im Bereich von 0,1 bis 0,5µM liegen. Bei hoher Primer-Konzentration ist die Gefahr einer unspezifischen Reaktion größer. Die Anzahl der PCR-Zyklen überstieg in der Regel nicht die 35-Zyklen Grenze, da sonst eventuell zunehmende unspezifische Reaktionen überbewertet würden. Die Aktivität der DNA-Polymerase nimmt mit jedem weiteren Zyklus ab. Je nach Primerpaar und Template muss das Thermocycler-Programm angepasst werden. Hier ein Standard-Programm als Ausgangspunkt für Optimierungen: Initiale Denaturierung 94°C für 2 Minuten. Anschließend für 35 Zyklen je 94°C für 30 Sekunden, primerspezifische Annealing-Temperatur für 30 Sekunden und Elongation für 1 Minute/kb Produktgröße bei 72°C. Die finale Elongation bei 72°C und 10 Minuten komplettiert das Programm. Die Zeiten für die Denaturierung sind generell so gering wie möglich zu halten, um die Polymerase nicht unnötig zu beanspruchen. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des Amplifikates. Die finale Elongation diente der eventuell notwendigen Vervollständigung der Produkte. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes variiert mit der Verwendung von *Taq*-Polymerasen unterschiedlicher Anbieter. Hier ein Beispiel für einen 20µl Ansatz unter der Verwendung von *Taq*-Polymerase („MasterMix“) der Firma QIAGEN:

	Ausgangskonzentration	Einsatz µl
MasterMix	2x	10
upstream-Primer	50pmol/µl	0,4
downstream-Primer	50pmol/µl	0,4
Wasser		8,2
DNA-Template	10-100ng/µl	1

2.2.18.2 Gradienten-PCR

Um unterschiedliche Annealing Temperaturen für ein Primerpaar zu testen, besitzt der Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf eine Zusatzfunktion, mit der es möglich ist, PCRs verschiedener Temperaturen mit einer Spanne von bis zu 20°C gleichzeitig

durchzuführen. Auf diese Weise lässt sich leicht die optimale Temperatur für eine möglichst hohe Spezifität eines Primerpaares feststellen. Hierzu wurden 8 oder 12 identische Ansätze pipettiert und der gewünschte Gradient eingestellt. Nach der PCR konnte im Agarosegel die beste Annealing-Temperatur abgeschätzt werden.

2.2.18.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, mit der eine schnelle Analyse rekombinanter Bakterien möglich ist. Hierbei wurde ein Ansatz wie bei einer Standard-PCR zusammengestellt (siehe oben), nur wurde auf die Zugabe von Template-DNA verzichtet. Das fehlende Volumen wurde durch Wasser ersetzt. Mit einer Pipettenspitze wurde dann die zu untersuchende Bakterienkolonie vorsichtig auf der Platte angepickt, auf einer zweiten Platte kurz ausgestrichen und in den PCR-Ansatz unter leichten Drehungen abgestreift. Hierbei war darauf zu achten, dass kein Medium von der Platte mitgenommen wird. Die Parameter der PCR wurden, bis auf eine längere initiale Denaturierung (10 Minuten), gegenüber einer Standardreaktion nicht geändert.

2.2.18.4 Verwendung einer Proofreading-Polymerase

Um ein Produkt zu erhalten, das keine oder nur wenige Punktmutationen enthält, kann man eine Polymerase mit einer Proofreading Aktivität (3'-5' Exonuklease Aktivität) verwenden. Die bei einer Standard-PCR verwendete *Taq*-Polymerase besitzt keine Korrekturaktivität und ist daher für bestimmte Anwendungen, bei denen es auf eine korrekte Sequenz ankommt (z.B. Klonierungen von Genen oder Promotoren), ungeeignet. Verwendet wurden: Proof-Start-Polymerase (QIAGEN), *Pwo*-Polymerase (Roche), ThermoZyme Polymerase (Mix aus *Taq* und einer nicht näher bezeichneten Proofreading Polymerase, Invitrogen) oder, um besonders lange Fragmente zu erzeugen, Expand Long-Template Polymerase (Mix aus *Taq* und *Tgo*, Roche). Die Polymerasen wurden nach den Anleitungen der Hersteller verwendet.

2.2.18.5 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) verwendet. Der linearisierte TOPO TA Vektor besitzt die Topoisomerasel, die kovalent an einen Thymin Überhang gebunden ist, was eine effizientere Klonierung von Fragmenten

mit Adenosin Überhängen, die von der *Taq* Polymerase erzeugt werden, erlaubt. Die Effizienz der A-Addition hängt von der 5'-Base des komplementären Primers ab. So sollte man hier ein Adenosin oder Guanin wählen (Mühlhardt, 2000).

Möchte man PCR-Produkte klonieren, die mit einer Proofreading Polymerase hergestellt worden sind, so wurden durch Inkubation des Fragmentes mit *Taq* Polymerase und dATP für 10 Minuten bei 72°C die gewünschten A-Überhänge erzeugt. Anschließend wurden die in den Vektor pCR4-TOPO-ligierten Produkte in OneShot® TOP10-Zellen transformiert (Handbuch TOPO-Cloning, Invitrogen).

2.3 RNA-Methoden

2.3.1 RNA-Isolierung (total-RNA Präparation)

200 bis 400mg Gewebe wurden mit Flüssigstickstoff in einer vorgekühlten Reibschale zerrieben und in 4ml Denaturierungslösung (4M Guanidium-Thiocyanat, 25mM Na-Citrat pH7.0, 0,5% Na-Sarcosyl (v/v), 0,1M β -Mercaptoethanol) in ein 12ml Greinerröhrchen überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurden 4ml Phenol, 0,8ml CHCl_3 /Isoamylalkohol (49:1) und 0,4ml 2M Na-Acetat pH4.0 zugegeben und kurz geschüttelt. Bei 10000rpm wurde 20 Minuten in der Sorvall RC5b Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Greinerröhrchen überführt. Um die RNA zu fällen, wurde ein Volumen Isopropanol hinzugegeben und für mindestens 20 Minuten (bei -80°C) inkubiert. Die RNA wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Denaturierungslösung aufgenommen, in Eppendorfgefäße überführt und durch Zugabe von Isopropanol gefällt. Bei Raumtemperatur wurde die RNA in der Eppendor fzentrifuge (13000rpm) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 0,5ml 70% Ethanol gewaschen. Nachdem der Überstand vollständig abgesaugt worden ist, wurde das Sediment luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 200 μ l DEPC-H₂O (0,1% DEPC in H₂O, über Nacht inkubieren und zweimal autoklavieren) aufgenommen und für 10min bei 65°C im Thermoschüttler resuspendiert.

2.3.2 Präparation von mRNA mittels Dynabeads

75 μ g total-RNA wurden in 100 μ l DEPC-H₂O für mindestens 2 Minuten im Thermoschüttler bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. 200 μ l der Dynabeadssuspension

(hierbei handelte es sich um superparamagnetische Polystyrol-Kügelchen mit 25-meren polyT-Ketten) wurden in ein 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben und in den Magnetständer gestellt. Nach 30 Sekunden wurde der Überstand abgezogen, und mit 100µl Binding Buffer (20mM Tris-Cl pH7.5, 1M LiCl und 2mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurden die Dynabeads in 100µl 2x Binding Buffer aufgenommen. Das gleiche Volumen RNA-Lösung wurde hinzugegeben und unter Schütteln für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Dynabeads mit dem magnetischen Ständer vom Puffer getrennt und zweimal mit Washing Buffer (10mM Tris-Cl pH 7.5, 0.15M LiCl, 1mM EDTA) gewaschen. Eluiert wurde mit 10 bis 20µl Elution Buffer (10mM Tris-Cl pH7.5) oder DEPC-H₂O durch Inkubation bei 65°C für mindestens 2 Minuten. Das Eppendorfgefäß wurde wieder in den magnetischen Ständer gestellt und das Eluat abgenommen. Die mRNA konnte bei -70°C gelagert werden. Die Konzentration wurde mit dem Photometer und durch Vergleich mit einer bekannten Konzentration im RNA-Minigel bestimmt.

2.3.3 RNA-Agarosegele

Um RNAsen zu entfernen, wurden die Gelkammern für mindestens eine halbe Stunde mit 3% H₂O₂ behandelt und mit DEPC-H₂O gespült. Anschließend wurde für ein 1%-Minigel 0,3g Agarose in 3ml 10x MOPS Buffer (0,2M 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure pH7.0, 50mM Natriumacetat, 10mM EDTA pH7.0) und 27ml DEPC-H₂O kurz aufgeköcht. Für ein großes denaturierendes Gel wurden 1,25g Agarose in 12,5ml 10x MOPS und 106ml DEPC-H₂O eingewogen und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 50°C wurden 6,5ml Formaldehyd hinzugegeben. Nach ca. 30 Minuten wurde das erstarrte Gel mit 1x MOPS Buffer überschichtet. Je nach Anwendung wurden 1-30µg lyophilisierte RNA in 9 oder 18µl RNA-Probenpuffer (50% Formamid, 10% 10x MOPS, 0,45% Formaldehyd, 7% Glycerin, 0,5% (w/v) Bromphenolblau) und 1 oder 2µl Ethidiumbromid (1mg/ml) gegeben und für mindestens 15 Minuten bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Nach 5 Minuten auf Eis wurde die Probe direkt aufgetragen. Nach dem Lauf (bei 10V/cm) wurde das Gel direkt dokumentiert, oder weiterprozessiert.

2.3.4 Transfer von RNA auf Membranen (Northern-Blot), Hybridisierung und Detektion

Für das Northern-Blotting wurde ein Kapillarblot-Verfahren durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel für eine halbe Stunde in RNase-freiem Wasser gespült und danach der Blot (siehe 2.2.15) aufgebaut. Nach dem Transfer über Nacht erfolgte die Fixierung für eine halbe Stunde bei 80°C und anschließender UV-Fixierung. Der Blot konnte trocken gelagert werden. Die Labeling-Reaktion erfolgte wie in Kapitel 2.2.16 beschrieben. Gewaschen wurde der Blot für 20min bei der Hybridisierungstemperatur von 65°C in Low Stringency Buffer (2x SSC, 0,1% SDS in RNase freiem H₂O_{bidest}), 20 Minuten bei 65°C in High Stringency (0,5x SSC, 0,1% SDS in RNase freiem H₂O_{bidest}) und bei Bedarf bei Raumtemperatur in Ultra High Stringency Buffer (0,1x SSC, 0,1% SDS in RNase-freiem Aqua_{bidest}). Anschließend wurden die Blots in Haushaltsfolie eingewickelt und entweder ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt, wie unter 2.2.17 beschrieben, oder über den Phosphor-Imager Typhoon (Amersham) die Banden detektiert.

2.3.5 Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

Bei der Reversen Transkription (RT) stellt man mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) aus RNA copy-DNA (cDNA) her. Diese wurde in einer nachfolgenden PCR-Reaktion auf bestimmte Transkripte qualitativ untersucht oder durch qRT-PCR im Lightcycler (siehe 2.3.7) quantitativ betrachtet. Für die RT-Reaktion wurden verschiedene Reverse Transkriptasen verwendet. Neben der Transcriptor RT (Roche) und der AMV RT (Invitrogen), fand das Omniscript RT Kit (Qiagen) häufig Verwendung. Die verschiedenen Reversen Transkriptasen unterscheiden sich in der Reaktionstemperatur. So kann man z.B. die Transcriptor RT bei 55°C inkubieren, was im Falle von sehr GC-reichen mRNAs große Vorteile hat, da weniger Sekundärstrukturen die Reaktion behindern. Beispielhaft sei hier die Reaktion für die QIAGEN Omniscript RT angegeben. Für eine Reaktion nimmt man 2µg Gesamt-RNA in 10µl DEPC-H₂O und gibt 10µl des folgenden Mastermixes hinzu: 1µl RNasin, 1:4 verdünnt (Promega), 0,5µl polyT-Primer (0,5µg/µl), 2µl RT-Puffer, 2µl dNTPs (5µM), 1µl Omniscript RT, und 3,5µl DEPC-H₂O. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 60 bis 90 Minuten. Anschließend wurde eine Hitzedenaturierung der RT bei 95°C für 15 Minuten durchgeführt. Falls sehr lange Produkte erwünscht waren, wurde dieser Schritt übersprungen. Für qualitative

Betrachtungen wurde in der Regel 1µl des RT-Reaktionsgemisches für eine nachfolgende PCR eingesetzt.

2.3.6 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Wenn man an dem genauen Transkriptionsstart eines Gens interessiert ist, bietet sich die Methode der 5'RACE an, wobei spezifisch das 5'-Ende einer bestimmten mRNA amplifiziert wird. Verwendet wurde das GeneRacer™ Kit (Invitrogen). Hierbei wurde entweder mit 5µg total-RNA (siehe 2.3.1) oder 250ng aufgereinigter mRNA (siehe 2.3.2) als Ausgangsmaterial begonnen.

In einem ersten Schritt wurden die 5'-Enden der rRNA und unvollständigen mRNA dephosphoryliert, was diese von den weiteren Reaktionen ausschloss. Diese Reaktion hatte keinen Effekt auf vollständige mRNA, da diese durch die 5'-Cap Struktur geschützt waren. Hierzu wurden mRNA (oder total-RNA) in einem 1,5ml Eppendorfgefäß zu 1µl 10x CIP Buffer (0,5M Tris-HCl, pH8.5 (20°C) und 1mM EDTA), 1µl RNaseOut™, 1µl Calf Intestinal Phosphatase gegeben und mit DEPC-H₂O auf 10µl aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen und Anzentrifugieren wurde für 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA Lösung mit 100µl Phenol:Chloroform und 90µl DEPC-H₂O versetzt, für 30 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 13000rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gegeben. 2µl 10mg/ml Muschel Glykogen, 10µl 3M Na-Acetat, pH5.2 wurden in den Ansatz gegeben, gevortext und 220µl 95% Ethanol zugesetzt. Die Fällung erfolgte bei -80°C für 10min. Durch Zentrifugation für 20min bei 4°C in der Eppifuge wurde die RNA pelletiert, der Überstand abgezogen und mit 500µl 70% Ethanol gewaschen. Nach 2 Minuten Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft für 1 bis 2 Minuten getrocknet und in 7µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Der zweite Reaktionsschritt entfernte die 5'-Cap Struktur der intakten mRNA. Hierzu wurde zu der in DEPC-H₂O suspendierten RNA 1µl 10x TAP Buffer (0,5M Na-Acetat, pH6.0, 10mM EDTA, 1% β-Mercaptoethanol und 0,1% Triton X-100), 1µl RNaseOut™ und 1µl Tobacco Acid Pyrophosphatase gegeben und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die RNA wie oben angegeben gefällt.

Anschließend wurde der mitgelieferte RNA-Oligo an das verbleibende 5'-Phosphat der vollständigen mRNAs ligiert. Die 7µl der resuspendierten Fällung wurden in das Gefäß mit

den lyophilisierten GeneRacer™ RNA Oligos (250ng) gegeben und 1µl 10x Ligase Buffer (330mM Tris-Acetat, pH7.8 (25°C), 660mM K-Acetat, 100mM Mg-Acetat, 5mM DTT), 1µl 10mM ATP, 1µl RNaseOut™ und 1µl T4 RNA-Ligase zugesetzt. Nach Inkubation bei 37°C für 1 Stunde erfolgte die Fällung der RNA wie oben beschrieben, und das Pellet wurde in 10µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Für die Reverse Transkription der mRNA wurden nun zu den 10µl mRNA 2µl 10x RT Buffer (250mM Tris-HCl, pH8.3 (25°C), 50mM MgCl₂, 500mM KCl, 20mM DTT), 1µl AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase) 4µl steriles H₂O, und 1µl RNaseOut™, 1µl dNTP Mix (25mM je dNTP) und 1µl des Random-Primers gegeben. Der Reaktionsansatz wurde gemischt, für 10 Minuten bei 25°C inkubiert, damit die Primer hybridisieren konnten und für 1 Stunde bei 42°C die Reverse Transkription durchgeführt. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde für 15 Minuten bei 85°C inkubiert, kurz zentrifugiert und die RT Reaktion bei -20°C gelagert.

Es folgte die Amplifizierung der cDNA-Enden mit einer Polymerase mit Proofreading Aktivität. Hierzu wurde der GeneRacer™ 5'Primer und ein genspezifischer *reverse*-Primer verwendet. Für die PCR wurden 1µl einer 1:5 Verdünnung der RT-Reaktion eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde über ein Gel aufgereinigt und über die S.N.A.P.™ Säulen aus dem Gel befreit. Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur für 1 Minute und 13000rpm. Das Eluat wurde in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Nach Identifizierung von *insert*-tragenden Klonen wurden diese Angezogen und die DNA zur Sequenzierung vorbereitet.

2.3.7 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe des LightCycler-Systems (Roche) wurde eine Quantifizierung von Transkriptmengen in der online-PCR von Transkriptmengen unter Verwendung des Farbstoffs SYBR Green I (QIAGEN) durchgeführt. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und die Menge des PCR-Produktes konnte über die Fluoreszenzzunahme bei 521nm bestimmt werden. Hierzu wurde der Wendepunkt (crossing point) in der log-Phase der sigmoiden Fluoreszenzkurve jeder Probe bestimmt. Die ideale Produktgröße in der online-PCR liegt zwischen 150 und 200bp. Beim Primerdesign ist, wenn möglich, auf dieses Kriterium geachtet worden. Die Ansätze wurden immer als Doppelbestimmung (Technisches Replikat) durchgeführt um Pipettierfehler und andere Schwankungen zu minimieren. Der verwendete Standard-

Ansatz sah folgendermaßen aus: 20µl Sybr Green MasterMix, je 0,4µl Primer (50µmol/µl), 17,2µl H₂O und 2µl Template (Standard RT-Ansatz, siehe 2.3.5). Von diesen 40µl sind je 18,5µl in eine für den Lightcycler vorgesehene Glaskapillare (Roche) gegeben worden. Nach schließen und zentrifugieren bei 1000g für 1 Minute wurde das Gerät (bis zu 32 Proben) beladen und gestartet. LightCycler-PCRs wurden nach folgendem Standard-Programm durchgeführt. Während einer initialen Denaturierung von 95°C für 15 Minuten wurde die Polymerase aktiviert. Es schlossen sich bis zu 70 Zyklen mit 20 Sekunden und 94°C Denaturierung, 20 Sekunden 58°C Annealing und 15 Sekunden 72°C Elongation an. Im Anschluß an die letzte Elongationsphase führte das Gerät eine Schmelzkurvenanalyse durch, so dass Ergebnisse ohne Nebenprodukte identifiziert und ausgewertet werden konnten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte gegenüber einem internen Standard. Verwendet wurde ein Primerpaar spezifisch für β-actin. Hiermit wurde die Transkriptmenge normalisiert. Es wurden generell Ansätze von drei biologischen mit je zwei technischen Replikaten gemessen. Zur Berechnung der normalisierten Transkriptmenge von Wildtyp und Mutante wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Gen A in Gewebe X}) - C_T (\text{Gen N in Gewebe X})$$

Die ΔC_T Werte (*certain threshold level*) wurden so aus den Messungen für β-actin (Gen N) und das zu untersuchende Gen (Gen A) ermittelt. Die drei Messwerte für den Wildtyp wurden gemittelt und genau wie die drei Wobbler Messwerte nach folgender Formel in relative Transkriptmengen (X) umgerechnet:

$$X = 2^{-\Delta C_T}$$

Die relativen Transkriptmengen der Mutante wurden anschließend durch die Werte des Wildtyps geteilt und so zueinander in Verhältnis gesetzt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Kultivierung von mit Expressionsplasmiden transfizierten *E. coli* BL21 erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Induktion der Expression des Fusionsproteins wurde mit 0,1mM bis 1mM IPTG durchgeführt. Die pelletierten Kulturen wurden in MicroSpin PBS

(Amersham) resuspendiert und durch Einfrieren und Auftauen in Flüssigstickstoff die Zellen aufgebrochen. Nicht aufgeschlossene Zellen wurden mit einem Zentrifugierschritt für 30 Sekunden bei 13000rpm pelletiert. Der Überstand wurde auf eine MicroSpin Säule (Amersham) geladen und für mindestens 1 Stunde bei 4°C geschwenkt. Ein anschließender Zentrifugierschritt und Waschschrift mit PBS trennte nicht gebundene Proteine ab. Eluiert wurde von der Säule mit reduziertem Glutathion (Amersham). Eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennte die eluierten Proteine auf.

2.4.2 Präparationen von Zellmembranen

Die Präparationen von Zellmembranen erfolgten mit kleinen Änderungen wie in Wang und Brautigan (2002) beschrieben. Mit Expressionsplasmiden transfizierte COS7-Zellen (10cm Schalen) wurden für 24 Stunden inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml eiskaltem Puffer (10mM Tris/Cl, pH 8,0, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM Dithiothreitol und einer gelösten Protease-Inhibitor Cocktail Tablette (Roche)) durch kratzen mit einem Zellschaber überführt. Durch ca. zwanzig Stöße mit einem Dounce-Homogenisator wurden die Zellen homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 1000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um größeren Zelldebris und nicht zerstörte Zellen zu pelletieren. Die Pellets wurden noch mal mit dem Dounce-Homogenisator behandelt und ebenfalls zentrifugiert. Die gepoolten Überstände wurden anschließend bei 4000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden mit dem gleichen Volumen des oben genannten Puffers, der allerdings zusätzlich noch 0,25M Sukrose enthielt, versetzt und bei 100000g und 4°C für 1 Stunde zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Röhrchen überführt und mit Centricon Säulchen (Millipore) ankonzentriert. Die Membranpellets wurden durch den oben genannten Puffer, versetzt mit 1% Nonidet P-40, gelöst. Proben der einzelnen Fraktionen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt.

2.4.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung eines Zellextraktes wurde mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode bestimmt. 20µl des Zellextraktes wurden mit 30µl H₂O verdünnt und mit 1ml BCA-Reagenz (1 Teil CuSO₄ x 5H₂O, 50 Teile BCA-Lösung, Pierce) für 30min bei 37°C inkubiert (Komplexbildung). Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von

562nm am Spektralphotometer gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz mit H₂O und BCA-Reagenz.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Hierzu wurden die Zellextrakte oder Lysate mit einem SDS-haltigem diskontinuierlichen HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach Lämmli (1970) aufgetrennt. Über dem Trenngel mit pH 8,8 befand sich ein Sammelgel mit pH 6,8. Die Trenn- und Sammelgele setzten sich wie folgt zusammen:

	Trenngel		Sammelgel
	10%	15%	3,75%
Acrylamid-Mix mit 30% AA, 0,8% BisAA (Rotiphorese Gel 30, Roth)	675µl	1ml	250µl
3M Tris, pH 8,8	500µl	500µl	-
1M Tris, pH 6,8	-	-	190µl
H ₂ O _{bidest}	2,7ml	2,4ml	650µl
60% Saccharose	-	-	375µl
10% SDS	40µl	40µl	15µl
10% APS	40µl	40µl	15µl
TEMED	4µl	4µl	1,5µl

Die Polymerisation startet durch Zugabe von TEMED und dem Katalysator APS, welche deshalb unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben worden sind. Zur Ausbildung einer glatten Gelkante wurden die Trenngele bei der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Erst nach der Polymerisation der Trenngele wurden die Sammelgele gegossen. In die Sammelgele wurden vor der Polymerisation die Gelkämme hineingesteckt. Nach Zusammenbau der Gelkammer wurde die Apparatur mit 1 x SDS-Laufpuffer (10 x SDS-Laufpuffer: 250mM Tris, 2,5M Glycin, pH 8,3, 1% SDS) gefüllt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die aufzutragenden Proben mit SDS-Probenpuffer (5 x Probenpuffer: 250mM Tris-HCl, pH6,8, 50mM Dithiothreitol, 50% Glycerin, 10% SDS, 0,5% Bromphenolblau) versetzt und für mindestens 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Proteinproben liefen nach beladen der Gele bei einer konstanten Spannung von 80V in die Sammelgele ein. Anschließend wurde die Spannung auf 100V erhöht. Als Molekulargewichtsstandard wurde Mark12 (Invitrogen) mitgeführt.

2.4.5 Färben von Proteingelen

Proteine wurden entweder mit Coomassie-Blue oder durch eine Silberfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht. Bei der Coomassie-Blue-Färbung wurden Gele mit Wasser kurz gespült und anschließend für 15 Minuten in Coomassie-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Gele durch Inkubation in Essigsäure entfärbt. Die Zurückbleibenden blauen Banden geben die Molekulargewichte der Proteine an. Dieses Verfahren ist weniger sensitiv als die Silberfärbung. Die Silberfärbung ist nur in Fällen eingesetzt worden, bei denen auch kleinste Proteinmengen in den Gelen detektiert werden sollten.

2.4.6 Immunblot (Semidry-Elektroblot, Westernblot)

Möchte man Proteine durch Antikörper detektieren, so müssen diese vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen werden. Hierzu wurde das Semidry-Elektroblot Verfahren durchgeführt, bei dem zwei Graphitplatten als Anode und Kathode dienen. Zuerst wurden zwei Filterpapiere (GB002, 190g/cm², Schleicher und Schuell) in 300mM Tris, 20% Methanol getränkt und auf die Anode gelegt. Ein weiteres Filterpapier, getränkt in 30mM Tris, 20% Methanol, wurde darüber platziert. Anschließend wurde eine in Aqua_{dest} angefeuchte Membran (Protran BA85, Porengröße 0,45µm, Schleicher und Schuell) gelegt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde luftblasenfrei, dass durch vorsichtiges Rollen mit einer Glaspipette erreicht wurde, auf die Membran gelegt und mit drei Filterpapieren, die in 25mM Tris, 20% Methanol und 40mM β-Aminocapronsäure getränkt worden sind, abgedeckt. Die als Kathode dienende Graphitplatte komplettierte den Aufbau. Zur Kühlung und als Gewicht wurden ein 5l Plastikgefäß mit Eis gefüllt und auf die Apparatur gestellt. Generell war darauf zu achten, dass die Membran und das Gel gleich groß waren und so möglichst gleich übereinander lagen. Das Übertragen der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 60 Minuten mit einer Stromstärke von 100mA je Gel. Nach dem Blotten wurde eine Kontrollfärbung mit PonceauS durchgeführt. Hierzu wurde die Membran in eine Schale mit PonceauS-Lösung (0,1% PonceauS (Sigma), 5% Essigsäure) gegeben. Die so sichtbar gemachten Marker-Banden wurden mit Bleistift markiert und durch Schütteln in TBS-Puffer (10x TBS: 100mM Tris-Cl, pH 7,3, 1,37M NaCl) wieder entfärbt.

2.4.7 Enzym-vermittelte Chemilumineszenz (ECL)

Um freie Bindungsstellen der Proteine auf der Nitrocellulosemembran abzusättigen, wurde der Blot für 4 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C in Blocking-Solution (5% Magermilchpulver in TBS oder 3% BSA in PBS) geschüttelt. Es folgte die Inkubation der Erstantikörperverdünnung bei Raumtemperatur für 4 Stunden. Nach dreimaligem Waschen mit TTBS (0,05% Tween20 in TBS) für 10min wurde der Peroxidase-markierte Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde noch dreimal mit TTBS gewaschen und die ECL-Detektion wurde durchgeführt.

Die Durchführung der ECL-Reaktion erfolgte in der Dunkelkammer. Die Membran wurde auf eine Klarsichtfolie gelegt und das LumiLightPLUS-Reagenz (Roche, 1:1 Gemisch beider Lösungen) gleichmäßig auf der Membran verteilt und eine zweite Klarsichtfolie aufgelegt. Nach einminütiger Inkubationszeit wurde das Reagenz seitlich mit einem Papiertuch abgesaugt und ein Röntgenfilm (X-OMAT, Kodak) in einer Expositionskassette über der Membran platziert. Je nach Intensität der Reaktion wurden die Filme nach unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und entwickelt. Zur Entwicklung wurde der Film in ein Entwicklerbad für mindestens 1 Minute gelegt, die Reaktion in Essigsäurehaltigem H₂O abgestoppt und anschließend der Film in einem separaten Bad fixiert. Nach mindestens 3 Minuten wässern ließen sich die Filme trocknen.

2.5 Zellkultur-Methoden

Glasflaschen und Puffer wurden vor Gebrauch autoklaviert. Gestopfte Pipetten wurden im Sterilisator für 4 Stunden bei 160°C hitzsterilisiert. Zellkulturschalen, Kryoröhrchen und andere Plastikware, sowie Pipettenspitzen wurden als sterile Einmalplastikware verwendet. Alle Medienzusätze (FCS, nichtessentielle Aminosäuren, Glutamin, Trypsin/EDTA) wurden als sterile Flüssigprodukte vom Hersteller bezogen. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Klassell-Reinraumwerkbank durchgeführt.

2.5.1 ES-Zellkultur

2.5.1.1 Auftauen von Feeder-Zellen

In der Regel wurden für die Arbeiten mit murinen ES-Zellen Feeder-Zellen ausgesät. Hierzu wurde ein Kryoröhrchen mit Feeder-Zellen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und schnell mit 9ml ES-Zellmedium in einem 15ml Falcon-Röhrchen verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für 3 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die Zellen in 3ml Medium resuspendiert. Zum Aussäen der Zellen wurden drei 100mm Zellkulturschalen mit 9 ml Complete Zellkulturmedium vorbereitet, dann träufelte man 1ml der Fibroblastensuspension in die Schalen und schwenkte diese vorsichtig ca. 10-mal kreuzförmig, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 1h bei 37°C hatten sich die Zellen auf den Schalenboden festgesetzt und konnten so eingesetzt werden.

Um Feeder-Zellen auf 96-well Schalen auszusäen, wurde das Kryoröhrchen wie oben aufgetaut und zentrifugiert. Das Resuspendieren erfolgte in 5ml Complete Medium. Anschließend wurde mit einer 8-Kanal Pipette jedes Well mit 50µl dieser Suspension befüllt und wieder mindestens für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Rahmen dieser Arbeit mussten keine neuen Feeder-Zellen präpariert werden, da diese in ausreichender Zahl in Flüssigstickstoff tiefgefroren vorlagen.

2.5.1.2 Kultur von ES-Zellen

Beim Auftauen von ES-Zellen wurde ähnlich verfahren wie beim Auftauen von Feeder-Zellen. Hier wurden die Zellen nach der Zentrifugation jedoch nur in 1ml Medium resuspendiert und diese dann auf mit Feeder-Zellen vorbereitete 100mm Zellkulturschalen geträufelt. Anschließend wurden die Zellen einen Tag bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen trypsinisiert, indem zunächst das Medium abgesaugt, dann mit 10ml PBS/EDTA gewaschen und die Zellen mit 3ml Trypsin (PAA) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Hiernach wurde die Reaktion gestoppt, indem 5ml Medium dazugegeben wurden. Danach wurden die Zellen geerntet, indem die Schalen mehrmals mit dem Medium gespült wurden (Glaspipette). Anschließend wurde die Suspension in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt und 3 Minuten bei 1800rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit einer 5ml Glaspipette in 4ml Medium resuspendiert und vereinzelt, indem die Suspension 20-mal auf und ab pipettiert wurde. Anschließend

wurde je 1ml der Zellen auf eine mit Feeder-Zellen vorbereitete 100mm Zellkulturschale geträufelt, diese ca. 10mal kreuzförmig geschwenkt, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen und die Zellen für 1-2 Tage bei 37°C inkubiert, wobei täglich das Medium gewechselt wurde. Die Zellen sind so dicht genug angewachsen und konnten für eine Elektroporation eingesetzt werden.

2.5.1.3 Vorbereitung des Targeting-Vektors

3x30µg des Targeting-Vektors wurden über Nacht mit mindestens je 20U des entsprechenden Enzyms verdaut. Die Reinigung der DNA erfolgte über eine Phenol/Chloroform- und eine Chloroform-Extraktion. Nach einer Fällung der DNA mit 3M NaAcetat und dem 2,5-fachen Volumen 100%igem Ethanol, sowie zwei Waschschritten mit 70%igem Ethanol (je Waschschriff: 10 Minuten Zentrifugation bei 13000rpm in der Tischzentrifuge), wurde die DNA unter der Sterilbank luftgetrocknet und in je 20µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA-Konzentration verschiedener Verdünnungen wurde im Agarosegel abgeschätzt. Optimal war eine DNA-Konzentration von 1µg/µl.

2.5.1.4 Elektroporation von ES-Zellen

Eine mit ES-Zellen dicht aber nicht konfluent bewachsene 100mm Schale wurde mit Trypsin wie oben beschrieben behandelt, wobei großer Wert darauf gelegt wurde, dass die Zellen vollständig vereinzelt vorlagen. Das Resuspendieren der abzentrifugierten Zellen erfolgte in 10ml ES-Medium. Für die Bestimmung des Zelltiters wurden 20µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mehrmals Blöcke von 4x4 Feldern gezählt. Anschließend wurde das arithmetische Mittel solcher 16er-Blöcke ermittelt und mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um den Zelltiter (Anzahl Zellen/ml) zu bestimmen. Für Elektroporationen sollten $1,2 \times 10^7$ Zellen eingesetzt werden. Ein diese Anzahl an Zellen enthaltendes Volumen der Suspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 3 Minuten bei 1800rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 800µl PBS resuspendiert und mit 20µg des linearisierten Vektors versetzt. Die Zellen und der Vektor wurden in eine Elektroporationsküvette mit 4mm Elektrodenabstand (Biorad) gegeben und die Elektroporation wurde im Gene Pulser (Biorad) bei einer Spannung von 230V, einer Kapazität von 500µFD und einem Parallelwiderstand von 400Ω durchgeführt. Je 200µl der elektroporierten Zellen wurden auf eine 100mm Zellkulturschale mit Feeder-Zellen gegeben, durch kreuzförmiges schwenken verteilt und bei 37°C inkubiert.

2.5.1.5 Selektion und picken Antibiotika-resistenter Klone

Nach der Elektroporation wurde den Zellen eine Regeneration für 24 Stunden ermöglicht. Zudem konnten die Zellen in dieser Zeit mit der Expression des Gens für die Neomycinresistenz beginnen. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und das Antibiotikum Neomycin zugesetzt (Endkonzentration= 400µg/ml, Sigma). Diese Selektion wurde für 4 Tage durchgeführt, wobei täglich das Medium mit zugesetztem Antibiotikum gewechselt wurde. Anschließend wurden resistente ES-Zellklone gepickt.

Zunächst wurden die Zellkulturschalen mit 10ml PBS/EDTA gewaschen und mit 15ml PBS/EDTA gefüllt. Anschließend wurde unter dem Stereomikroskop nach geeigneten ES-Zellklonen gesucht und diese mit 15µl PBS/EDTA mithilfe einer Pippette in ein Well einer 96er-Well-Platte transferiert. Bei der Auswahl der Klone war darauf zu achten, dass diese eine kugelige Form hatten und hell, mit einem scharfen Rand, erschienen. Klone mit unregelmäßiger Randstruktur, die zudem eher dunkel erschienen und flach waren, fanden bei der Isolierung keine Beachtung, da diese Eigenschaften Merkmale für eine beginnende Differenzierung sind. Nach dem Picken von 96 Klonen wurde jedes Well auf einen vorliegenden Klon kontrolliert und gegebenenfalls ein neuer Klon gepickt. Diese Kontrolle war nötig, da es möglich war, dass ein Klon in der Pipettenspitze verblieb, und somit nicht in das Well transferiert wurde. Anschließend wurden zu jedem Klon 25µl Trypsin gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Trypsinisierung wurde durch die Zugabe von 90µl Complete Medium gestoppt und die Zellen danach vereinzelt, indem die Suspension in jedem Well 20-mal auf und ab pipettiert wurde. Es erfolgte ein Transfer der Suspensionen auf eine mit Feeder-Zellen vorinkubierte 96er-Well-Platte. Die Proliferation der Zellen erfolgte bis zu ca. 4 Tagen, bis die Zellen gut, jedoch nicht konfluent angewachsen waren, wobei täglich 150µl Complete Medium gewechselt wurde. Für eine weitere Anreicherung der Klone wurden die Klone anschließend auf zwei neue Feeder-96-well-Platten aufgesplittet, wobei die Zellen der einen Platte der späteren DNA-Isolierung dienen sollte (DNA-Platte) und die Zellen der anderen Platte für spätere Experimente gedacht waren (Master-Platte).

2.5.1.6 Splitten und Einfrieren von ES-Zellen auf einer 96er-Well-Platte

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und nachfolgend mit 150µl PBS/EDTA gewaschen. Die Klone wurden durch eine Zugabe 30µl Trypsin/Well, eine 10minütige Inkubation bei 37°C und einem Abbruch der Reaktion mit 100µl Complete Medium

trypsinisiert. Anschließend wurden die Zellen durch 30-maligem auf und ab pipettieren der Suspension vereinzelt. Die Aufteilung der Zellen erfolgte in zwei 96er-Well-Platten mit Feeder-Zellen. In jedes Well der Master-Platte wurden 55µl der Suspension gegeben, das verbleibende Volumen wurde in ein Well der DNA-Platte gegeben. Die Zellen der Masterplatte wurden für ca. 2-4 Tage inkubiert, wobei täglich das Medium gewechselt wurde. Danach konnten die Zellen zur Lagerung weggefroren werden. Die Zellen der DNA-Platte wurden solange inkubiert, bis die Zellen konfluent gewachsen waren (ca. 1 Woche), wobei das täglich gewechselte Medium kein LIF enthielt. Danach konnten die DNA aus den Zellen isoliert werden.

Zum Einfrieren wurde das Medium der Master-Platte abgesaugt, um die Zellen mit 150µl PBS/EDTA zu waschen, und anschließend durch eine Trypsinisierung zu vereinzeln (25µl Trypsin/well; 10min 37°C; 30-mal auf und ab pipettieren). Nachfolgend wurden die Zellen für 2-3 Minuten auf Eis gekühlt und mit 75µl Freezing-Medium (12,5% Vol DMSO, 62,5% Vol FCS und 25% Vol Feeder oder Complete Medium) versetzt. Die 96er-Well-Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und in 2-3 Lagen Zellstoff für 10-30 Minuten auf -20°C inkubiert, und anschließend bei -80°C für ca. 6-12 Monate gelagert.

2.5.1.7 DNA-Isolierung aus ES-Zellen

Für die DNA-Isolierung in der 96er-Well-Platte wurde zunächst das Medium abgesaugt, um die Zellen anschließend zweimal mit 150µl PBS zu waschen. Danach wurde in jedes Well 50µl Lysispuffer (10mM Tris, pH 7,5, 10mM EDTA, pH8,0, 10mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosine, 1mg/ml Proteinase K) gegeben, die Platte mit Parafilm abgedichtet und über Nacht bei 60°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden 100µl eiskalter Ethanol-Mix (1,5µl 5M NaCl; 100µl 100% Ethanol) in jedes Well hinzugegeben und die Reaktion für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5810; 4000rpm) wurde der Überstand durch vorsichtiges Invertieren auf einem Zellstofftuch verworfen. Es erfolgte ein Waschschriff mit 100µl 70% Ethanol (bei -20°C vorgekühlt), wonach die Platten erneut für 5 Minuten bei 4000rpm zentrifugiert wurden. Letztlich wurde der Ethanol abgegossen und die DNA für ca. 20 Minuten luftgetrocknet und dann bei -20°C gelagert.

Bei der Isolierung von DNA aus ES-Zellen in 100mm Schalen wurde zunächst der gewünschten ES-Zell-Klon auf einer 100 mm Schale ausgesät (ohne Feeder-Zellen) und solange inkubiert, bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Anschließend wurde das

Medium abgesaugt, die Schalen einmal mit ca. 10ml PBS gewaschen und die Zellen für 10 Minuten mit 3ml Trypsin (PAA) behandelt. Anschließend wurden die Zellen in ein 12ml Falconröhrchen überführt, die Zellen bei 1800rpm abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810) und diese mit 5ml Lysispuffer (10mM Tris, pH7,5, 10mM EDTA, pH8,0, 10mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosine, 1mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 60°C inkubiert. Es erfolgte zweimal eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- (25:24:1) und eine Chloroform-Extraktion mit jeweils dem einfachen Volumen der Suspension. Anschließend wurde die DNA mit 2,5 Vol 70% eiskaltem Ethanol gemischt, so dass die DNA in sichtbaren Fäden ausfiel. Die DNA konnte dann mit einem gebogenen Glasstäbchen entnommen werden und wurde für ca. 10 min luftgetrocknet. Zur Lagerung wurde die chromosomale DNA in ca. 500µl TE-Puffer resuspendiert, mit 5µl RNase A-Lösung (20mg/ml) versetzt um evtl. vorliegende RNA zu degradieren und anschließend bei 4°C gelagert.

2.5.1.8 Southern-Blot und Hybridisierung

Nachdem die DNA isoliert wurde, konnte eine Restriktionsspaltung in einem Gesamtvolumen von 35µl durchgeführt werden. Hierzu wurden 3,5µl 10x Restriktionspuffer, 10 Units von dem entsprechenden Enzym, 50µg/ml RNase A und ein entsprechendes Volumen H₂O_{bidest} eingesetzt. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und mit angefeuchtetem Zellstoffpapier eingewickelt und in einer Tüte verschweißt, anschließend über Nacht bei einer für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Nach der Spaltung wurden 4µl 6x Probenpuffer in jedes Well gegeben und die Probenaschen eines 1%igen Agarosegels (1 x TAE; große Gelkammer) wurden mit dem maximal möglichen Volumen (ca. 30µl) befüllt. Für die Elektrophorese wurde für ca. 14 Stunden eine Spannung von 2-3 V/cm angelegt, und das Gel anschließend gefärbt, mit einem Lineal dokumentiert. Es folgte der Southern-Blot und die Hybridisierung wie oben beschrieben (2.2.15, 2.2.16, 2.2.17).

2.5.2 Kultur von COS7- und CHO-Zellen

2.5.2.1 Ablösen adhärenter Zellen

Um adhärenente Zellen in neue Kulturgefäße zu überführen und die Zelldichte zu bestimmen, wurden diese in Suspension gebracht. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde, je nach Kulturgefäß 0,5 – 3ml

Trypsin/EDTA in PBS hinzugegeben und bei 37°C 5 Minuten inkubiert. Nach erfolgter Trypsinierung wurden die Zellen in dem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert.

2.5.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Lagerung von Zellen in Flüssigstickstoff, wurden diese zunächst resuspendiert und abzentrifugiert. Das hierbei entstehende Pellet wurde auf Eis in Cell Culture Freezing Medium (Invitrogen) oder dem jeweiligen Zellkulturmedium, versetzt mit 10% DMSO, resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen zu 1ml Portionen (1×10^6 Zellen/ml) abgefüllt. Die Kryoröhrchen wurden in einem Metallblock zunächst bei -20°C gelagert und anschließend nach 24 Stunden in den Flüssigstickstofftank überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstoff in ein 37°C Wasserbad gegeben und in 10ml des entsprechenden vorgewärmten Kulturmediums überführt. Nach Abzentrifugieren bei 500g, wurde das Zellpellet in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät.

2.5.2.3 Transfektion von Plasmid-DNA in kultivierten Zellen

Die zu transfizierenden Zellen wurde je nach Anwendung auf 30mm, 60mm oder 100mm Zellkulturschalen ausgesät. Sind die Zellen für die Immunfluoreszenz eingesetzt worden, sind zusätzlich runde Deckgläschen mit Kollagen beschichtet worden und die Zellen darauf ausgesät worden. Zur Transfektion wurde Lipofectamine und Plus Reagenz (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die transient transfizierten Zellen wurden 24 bzw. 48 Stunden nach Transfektion weiter analysiert.

2.5.2.4 Immunfluoreszenz

Möchte man Proteine in einer Zelle lokalisieren, bietet sich die Immunfluoreszenz an. Hierbei ist es allerdings notwendig, dass ein passender Antikörper gegen das gewünschte Protein verfügbar ist. Alternativ kann man ein Protein über ein Expressionsplasmid rekombinant und mit einer kurzen Aminosäuresequenz, gegen die ein Antikörper verfügbar ist, in den Zellen exprimieren und nachweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden COS7- und CHO-Zellen verwendet. Es wurden je drei kollagenisierte Deckgläser in einer 30mm Kulturschale vorgelegt. Die Anzahl der ausgesäten Zellen variierte zwischen 2×10^5 und 4×10^5 Zellen. In der Regel wurde ein

Expressionsplasmid transient in die Zellen eingebracht (siehe 2.5.2.3). Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit CMF-PBS (10 x CMF-PBS: 136mM NaCl, 3mM KCl, 8mM Na₂HPO₄x 2H₂O, 1,5mM KH₂PO₄) gewaschen. Die einzelnen Deckgläser wurden in Wells von 6er-Well-Platten gelegt und die weiteren Schritte hierin ausgeführt. Die Zellen wurden fixiert durch eine Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 3,7% Paraformaldehyd in CMF-PBS. Nach zweimaligen Spülen mit CMF-PBS folgte die Permeabilisierung mit 0,2% TritonX100 für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Spülen mit CMF-PBS wurde in einigen Fällen mit 2% BSA in CMF-PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur ein Blocking-Step durchgeführt. Es folgte die Inkubation von 200µl der Erstantikörperverdünnung in 0,5% BSA in CMF-PBS für bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dreimaligen waschen mit CMF-PBS für 5 Minuten wurde die fluoreszenzmarkierte Zweitantikörperverdünnung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Deckgläschen gegeben. Nach weiteren Waschschritten wurden die Deckgläschen mit Elvanol auf Objektträgern eingedeckt (10g Mowiol 4-88 wurden unter Rühren in 40ml 50mM Tris gelöst (24 Stunden, Raumtemperatur). Nach Hinzufügen von 20ml Glycerol, wurde die Lösung weitere 24 Stunden bei 4°C gerührt und anschließend für 1 Stunde bei 15000rpm zentrifugiert. Das Eindeckmittel konnte bei 4°C gelagert werden. Anschließend konnten die Deckgläschen im Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) oder mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (TCS SP2, Leica) betrachtet werden.

2.6 Hefe-Methoden

Mit dem Yeast Two-Hybrid System ist es möglich, Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu untersuchen. In einem auf Gal4 basierenden Yeast Two-Hybrid System wird ein „Köder“ (bait)-Protein mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (DNA-BD) fusioniert, während ein anderes Protein in Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) vorliegt. Das Gal4-Protein ist ein Transkriptionsfaktor in Hefen, der normalerweise die Transkription von Genen des Galaktose-Metabolismus kontrolliert. Im Fall einer Interaktion der beiden Proteine werden DNA-BD und AD in räumliche Nähe zueinander gebracht und können an einer *upstream activating sequence* (UAS) binden, so dass sie die Transkription von vier Reportergenen initiieren können. Als Folge verändert sich der Phänotyp des verwendeten Hefestammes. Obwohl die DNA-BD allein an der UAS binden kann, ist es nicht möglich, dass dadurch die Transkription aktiviert wird, dafür bedarf es erst der Gal4-AD. Als

Reportergene werden in den Hefestämmen AH109 und Y187, die für das *mating* benutzt wurden, ADE2, HIS3, lacZ und MEL1 verwendet. LacZ und MEL1 kodieren für die α - bzw. die β -Galaktosidase.

Für das Auffinden von Interaktionspartnern der N- und C-terminalen Fragmente von Tmem17, sowie die C-terminale Domäne von Vps54, wurde eine prätransformierte MATCHMAKER Bibliothek (BD Bioscience Clontech) verwendet. Es handelte sich dabei um klonierte cDNAs aus adulten Mausgroßhirnen, die in das Plasmid pACT2 gebracht wurden und in den Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* Y187 transformiert worden sind.

2.6.1 Vorbereitungen und Kontrollmating

Bevor die einzelnen Hefestämme für die jeweiligen Versuche eingesetzt wurden, ist ihr Phänotyp kontrolliert worden. Dazu wurden die Stämme AH109, AH109[pGBKT7-53], Y187[pTD1-1] und ein diploider Kontrollstamm auf SD-Selektionsmedien ausgestrichen, bei 30°C inkubiert und das Wachstum nach 3-5 Tagen kontrolliert.

Vor dem Screening der cDNA-Bibliothek wurde ein Mating der mitgelieferten Kontrollstämme AH109[pGBKT7-53] und Y187[pTD1-1] durchgeführt. pGBKT7-53 kodiert die GAL4 DNA-Bindedomäne (BD), die mit dem murinen p53 fusioniert ist. pTD1-1 kodiert die GAL4 DNA-Aktivierungsdomäne, die mit dem SV40 T-Antigen fusioniert ist. Die beiden Proteine sind bekannt dafür im Yeast Two-Hybrid Assay zu interagieren (Li und Fields, 1993; Iwabuchi et al, 1993). Für das Kontrollmating wurde von jedem Hefestamm eine große, frische Kolonie gepickt und in ein 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 0,5ml 2x YPDA überführt. Um die Zellen komplett zu resuspendieren, wurden sie für eine Minute gevortext. Um die Mating-Effizienz bestimmen zu können, wurden auf dieselbe Weise Kulturen von den Einzelstämmen angelegt. Nach einer Inkubation bei 30°C mit 200rpm über Nacht wurden 100 μ l Aliquots einer 1:10 und 1:100 Verdünnung mit 0,5x YPDA der Mating-Kultur auf folgende Selektionsplatten ausgebracht: SD/-Leu/-Trp; SD/-His/-Leu/-Trp; SD/-Ade/-Leu/-Trp und SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (für die Berechnung der Effizienz auch auf SD/-Leu oder SD/-Trp). 100 μ l Aliquots einer 1:100 und 1:1000 Verdünnung der Kontrollkulturen wurden auf SD/-Leu und SD/-Trp ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert. Die diploiden Zellkolonien wurden ausgezählt und die Mating-Effizienz berechnet.

2.6.2 Schnelltransformation von Hefen

Eine Kultur des zu transformierenden Hefestammes wurde über Nacht angezogen. 1ml dieser Kultur wurde bei 6000rpm 3 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgezogen. Die Zellen wurden mit sterilem Wasser gewaschen und erneut pelletiert. Nach dem Resuspendieren in 10µl einzelsträngiger Heringssperma-DNA-Lösung (10mg/ml) wurden 5µl Plasmid-DNA (ca. 1-5µg) und 100µl Transformationspuffer (2ml-Ansatz: 1,3ml 60% PEG4000, 0,4ml 1M Liciumacetat, 0,3ml Wasser) zugesetzt. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 Minuten bei 45°C. Die transformierten Hefen wurden auf Selektionsplatten ausgebracht und für ca. 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.6.3 Vortests und 3-AT-Test

Bevor das „Köder“-Plasmid für das Screening der cDNA-Bibliothek verwendet werden konnte, musste die Transkriptionsaktivität des „Köder“-Proteins überprüft werden. Eine Transkription der Reportergene darf erst im Fall einer Interaktion erfolgen, nicht autonom durch das „Köder“-Protein. Deshalb wurde der Stamm AH109[pGBT9-Köder] auf folgenden Selektionsplatten ausgestrichen: SD/-His/-Trp und SD/-Ade/-Trp. Sie wurden für ca. 5 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend das Wachstum kontrolliert. Außerdem wurde ein β-Gal-Test durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden stets eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Hefen des Stammes AH109 zeigen eine grundlegende schwache HIS3-Expression, die auf den Aufbau des Promotors zurückzuführen ist. Durch die Zugabe von 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol) zum Medium, einem kompetitiven Inhibitor des HIS3 Proteins in Hefen, lässt sich ein Hintergrundwachstum auf SD-Medium ohne Histidin unterbinden. Um die optimale 3-AT-Konzentration zu ermitteln, wurde der mit dem jeweiligen „Köder“-Plasmid transformierte AH109 Stamm auf SD/-Trp/-His Platten ausgebracht, die eine unterschiedliche Menge an 3-AT enthielten. Es wurde die Konzentration gewählt, bei der nach einer Woche Inkubation bei 30°C gerade kein Hintergrundwachstum zu erkennen war.

2.6.4 Screenen der Bibliothek

Eine große, frische Kolonie des „Köder“-Stammes AH109 wurde in 50ml SD/-Trp bei 30°C und ca. 250rpm über Nacht (16-24 Stunden) angezogen. Am nächsten Tag wurde der OD₆₀₀-Wert bestimmt, der über 0,8 liegen sollte. Die Zellen wurden bei 1000g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Rückfluß (ca. 5ml)

resuspendiert. Ein Aliquot der gefrorenen Bibliothekskultur wurde im Wasserbad auf Raumtemperatur erwärmt und vorsichtig gemixt. 10µl der Kultur wurden in ein separates Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und auf Eis bis zur späteren Titerbestimmung gelagert. Beide Hefekulturen wurden in einem sterilen 5l-Erlenmeyerkolben vereint und 45ml 2x YPDA/Kan hinzugefügt. Dieser Mating-Ansatz wurde über Nacht (20-24 Stunden) bei 30°C mit maximal 50rpm vorsichtig geschüttelt. Höhere Geschwindigkeiten hätten die Mating-Effizienz drastisch reduziert. Zum Abzentrifugieren bei 1000g für 10 Minuten wurde der Ansatz in ein 50ml Greiner-Röhrchen überführt. Der Erlenmeyerkolben wurde zweimal mit 2x YPDA/Kan (je ca. 25ml) gereinigt und dieses Medium zum Resuspendieren des Hefepellets verwendet. Die Zellen wurden ein weiteres Mal bei 1000g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in 10ml 0,5x YPDA/Kan resuspendiert. Die Gesamtmenge an Zellen und Medium wurden gemessen. Der Mating-Ansatz wurde wie folgt ausplattiert: 100µl einer 1:10.000, 1:1.000, 1:100 und 1:10 Verdünnung wurden auf SD/-Leu, SD/-Trp und SD/-Leu/-Trp für die Bestimmung der Mating-Effizienz ausgebracht. Die verbleibenden Zellen wurden in 200µl Aliquots auf 150mm Platten ausplattiert. Es empfahl sich, die einen Teil des Ansatzes auf ein stringentes Selektionsmedium, SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (QDO), und die andere Hälfte auf ein weniger stringentes Selektionsmedium, SD/-His/-Leu/-Trp (TDO), auszuplattieren. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. Nach 8 Tagen wurden die Kolonien auf dem TDO-Medium, nach bis zu 21 Tagen die Kolonien auf dem QDO Medium ausgezählt und auf eine frische Platte umgeimpft.

Berechnung des Bibliothek-Titers, der Mating-Effizienz und der Anzahl der getesteten Klone wurde durch das Auszählen der Kolonien auf den SD/-Leu, SD/-Trp und SD/-Leu/-Trp Platten durchgeführt. Dafür wurden die Platten verwendet, auf denen zwischen 30 und 300 Kolonien wuchsen. Die Berechnungen erfolgten nach den Angaben der MATCHMAKER Bedienungsanleitung der Firma BD Bioscience Clontech.

2.6.5 β -Gal Test

Um zu verifizieren, ob es sich bei den diploiden Klonen, um tatsächlich positive Klone handelte, wurde die Transkription eines weiteren Reportergens, *lacZ*, überprüft. Dafür wurden die diploiden Kolonien auf SD/-Leu/-Trp/-His Platten ausgestrichen und für ca. 2 Tage bei 30°C inkubiert. Steriles 3mm Whatman-Papier wurde angefeuchtet und die angezogenen Hefekolonien wurden anschließend mit einem sterilen Zahnstocher ausgestrichen oder durch Abrollen des Filterpapiers übertragen und einem dreimaligen

Einfrier-/Auftauzyklus in flüssigem Stickstoff unterzogen, um die Hefen aufzuschließen. Danach wurde der Filter in eine entsprechend große Petrischale mit 2,5ml Z-Puffer (16,1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5,5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, pH7,0, autoklavieren) + X-Gal (10ml Z-Puffer, 27 μl β -Mercaptoethanol, 167 μl X-Gal (20mg/ml)) für maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer positiven Interaktion stellte sich in dieser Zeit eine Blaufärbung ein. Der Filter konnte anschließend getrocknet und gelagert werden.

2.6.6 Plasmidisolierung aus Hefen

1ml einer über Nacht angewachsenen Kultur wurde für 30 Sekunden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 μl Breaking Buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA) resuspendiert. Dann wurden etwa das gleiche Volumen 0,25-0,5mm Glasperlen (Roth) zugegeben, die zuvor in konzentrierter HCl gewaschen und solange mit Wasser gespült worden waren, bis der pH-Wert 7 erreicht war. Anschließend wurden 200 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt. Die Suspension wurde 2 Minuten gevortext und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte mit Natriumacetat und Ethanol. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in 10 μl Wasser resuspendiert und konnte für die Transformation von *E. coli* eingesetzt werden.

2.6.7 Transformation von *E. coli* JQ101

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurden 35ml einer Kultur JQ101-Zellen mit einer OD_{600} von 0,5-0,6 für ca. 30 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend 6 Minuten bei 6000rpm in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml 100mM CaCl_2 gelöst und die Suspension für 20 Minuten auf Eis gelagert. Die Zellen wurden nach einer weiteren Zentrifugation in 1,7ml 100mM CaCl_2 resuspendiert und in Aliquots von 70-100 μl für ca. 36 Stunden auf Eis gekühlt. Nach dieser Zeit wurden sie direkt für eine Transformation verwendet.

Hierzu wurde zu einem Aliquot chemisch kompetenter Zellen 5 μl resuspendierte Plasmid-DNA aus Hefe gegeben. Dieses Gemisch wurde für 30-60 Minuten auf Eis gelagert und anschließend für 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Die Zellen wurden danach sofort mit 500 μl SOC-Medium bei 37°C für 45-60 Minuten geschüttelt.

Ausplattiert wurde der gesamte Ansatz auf M9-Medium ohne die Aminosäure Leucin und für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Aus den so gewonnenen Kolonien konnten die Bibliotheks-Plasmide isoliert werden und in XL1-Blue-Zellen gebracht und sequenziert werden.

2.6.8 Interaktionsassay

Um positive Interaktionen näher zu charakterisieren, wurden Kotransformationen in AH109 durchgeführt. Hierzu wurde das zu testende „Köder“-Plasmid zusammen mit dem Bibliotheks-Plasmid gemischt und mittels Schnelltransformation (siehe 2.6.2) in den Hefe-Stamm AH109 gebracht. Der Transformationsansatz wurde auf SD-Leu/-Trp ausplattiert. Bis zu drei unabhängige Kolonien wurden pro Transformation gepickt und Flüssigkulturen, die über Nacht inkubiert worden sind, angelegt. 15µl dieser Kulturen wurden auf SD-Leu/-Trp, SD-Leu/-Trp/-His und SD-Leu/-Trp/-His/-Ade aufgetropft. Nach bis zu drei Tagen Inkubationszeit bei 30°C wurden die Wachstumseigenschaften der kotransformierten Hefen bewertet.

Um die Bindestärke zweier Konstrukte miteinander zu vergleichen, wurden je drei unabhängige Kolonien pro Konstrukt über Nacht in 5ml Flüssigmedium (SD-Leu/-Trp) angezogen und mittels dem künstlichen Substrat ONPG die Interaktion, wie in der BD Bioscience Clontech Benutzungsanleitung angegeben, quantifiziert. Es wurden pro Kolonie drei technische Replikate gemessen und die Werte gemittelt.

3 Ergebnisse

3.1 *wr*-Kandidatengenregion

Zu Beginn meiner Arbeit standen mir die Informationen über die Kandidatengenregion, wie in Fuchs et al. (2002) beschrieben, zur Verfügung. Der *wr*-kritische Bereich war durch die beiden polymorphen Marker *BAC147N22rev* und *Murr1* definiert und überspannte zu der Zeit einen genomischen Bereich von etwa $0,41\text{cM} \pm 0,23\text{cM}$, was ca. 0,8Mb entsprach (Fuchs, 2001). Durch die fortschreitenden Sequenzierungen des Mausgenomprojektes (Gregory et al., 2002) wurden in der Zwischenzeit mehr genomische Sequenzen generiert und in öffentlichen Datenbanken abgelegt (<http://www.ensembl.org>). Durch das Annotieren des *wr*-kritischen Bereichs, und flankierender Regionen (pos. 20597539-23402347 des Mauschromosoms 11, NCBI Build 30, MGSC Version3, www.pre.ensembl.org, später als Feb 2003 Freeze annotiert) wurde festgestellt, dass die Annahme alle Gene im fraglichen Intervall identifiziert zu haben (Fuchs et al., 2002) nicht zutraf. Auch stellte sich der Bereich deutlich größer als vermutet dar. So wurde der *wr*-kritische Bereich zwischen den beiden oben genannten Markern mit 2,02Mb bestimmt. Weiterhin konnten mehrere BAC-Klone identifiziert werden (Daten nicht gezeigt), die sowohl den Marker *BAC147N22rev*, als auch *Peli1* überspannen, so dass die zuvor angenommene Inversion gegenüber der humanen Sequenz (Fuchs et al., 2002) ausgeschlossen werden konnte.

Um alle Gene in diesem neuen Kandidatengenintervall zu identifizieren, wurde die genomischen Sequenz mit ESTs und cDNAs aus den öffentlichen Datenbanken verglichen. Hierzu wurden die Programme *Gene2EST* (<http://woody.embl-heidelberg.de/gene2est/>), *E2G* (Krüger et al., 2004) und *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) verwendet. So konnten zwei bisher unbekannte und ein bekanntes Gen, das zuvor nicht in den *wr*-kritischen Bereich kartiert worden ist, identifiziert werden (Abb. 3.1A). Bei dem bekannten Gen handelt es sich um *B3Gnt*, welches für eine 397 Aminosäuren große Beta1,3-Galactosyltransferase kodiert, die am Golgi-Apparat lokalisiert ist (Egan et al., 2000). Somit stellte sich sowohl der Geninhalt als auch die Genabfolge in der *wr*-kritischen Region gegenüber dem humanen Bereich als konserviert dar. Zuerst ist mit der Charakterisierung der beiden unbekannt Genen in der *wr*-kritischen Region begonnen worden.

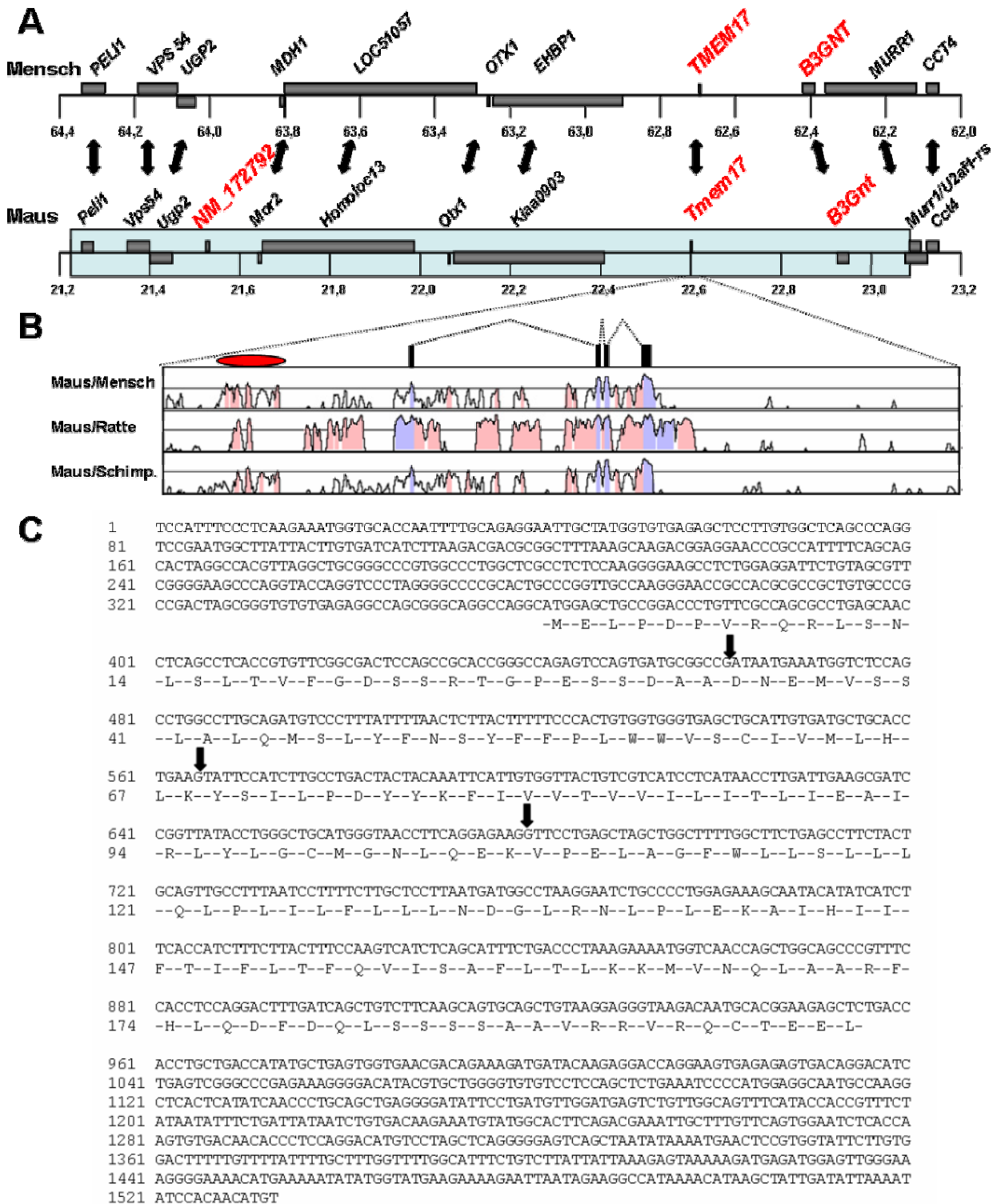


Abbildung 3.1: Identifizierung von neuen Genen im wr-kritischen Intervall. A) Vergleich des Geninhaltes und der Genabfolge zwischen Mensch auf Chromosom 2p14-15 und Maus auf Chromosom 11A3. Der wr-kritische Bereich zwischen den Markern *BAC147N22* und *Murr1* ist türkis eingefärbt. Die drei neu identifizierten Gene sind rot markiert. **B)** Genstruktur von *Tmem17* und Sequenzähnlichkeiten zwischen Maus, Mensch, Ratte und Schimpanse. Exons sind blau, konservierte nichtkodierende Bereiche dargestellt. Rotes Oval: Bereich hoher Konservierung stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Visualisierung des Alignments durch *Vista*. **C)** Assemblierte cDNA aus ESTs für Maus *Tmem17*. Spleißstellen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Die Übersetzung der cDNA in eine Aminosäuresequenz ergab eine hypothetische Größe von 198 Aminosäuren für *Tmem17*.

3.1.1 *Tmem17*

3.1.1.1 Genstruktur

In der intergenischen Region zwischen *B3Gnt* und *Kiaa0903* (jetzt umbenannt in *Ehbp1*, Guilherme et al., 2004) konnten mehrere einander überlappende ESTs identifiziert werden (Abb. 3.1A). Detaillierte Untersuchungen mittels BLAST ergaben, dass 23 Maus ESTs Treffer in einem Bereich von etwa 7kb ergaben. Die Gruppierung der ESTs zeigte die Genstruktur des neuen Gens (Abb. 3.1B). Die 4 zugehörigen proteinkodierenden Exons, inklusive des 5'UTRs und 3'UTRs, ergaben eine Länge von 1533bp (Abb. 3.1C). Das Übersetzen der cDNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz ergab ein Protein von 198 Aminosäuren Länge. Aus der Sequenz lassen sich ein Molekulargewicht von 22,6kDa und ein isoelektrischer Punkt von 5,89 ableiten. Später wurde eben diese cDNA durch eine automatisierte Computervorhersage assembliert, in der Genbank abgelegt und bekam den Namen *Tmem17*.

Um mehr Informationen über diesen genomischen Bereich zu erhalten, wurden noch zusätzliche Sequenzen in die Analyse miteinbezogen. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich noch genomische Schimpansen- und Ratten-Sequenzen in öffentlichen Datenbanken

Spezies	Exon Nr.	Spleiß-Akzeptor	Exonlänge	Spleiß-Donor
Maus	1	-	100bp	CGGCCGgtgagtgccg
Ratte	1	-	100bp	CCGCCGgtgagtgcca
Mensch	1	-	100bp	GTCCGGgtgagtgacc
Schimpanse	1	-	100bp	GTCCGGgtgagtgacc
Maus	2	gtccctgcagATAATG	104bp	CTGAAGgtgagtcctc
Ratte	2	gtccctgcagATAACG	104bp	CTGAAGgtgagtcctc
Mensch	2	ccttctgtagAAAATG	104bp	ATGAAGgtaaaatctaa
Schimpanse	2	ccttctgtagAAAATG	104bp	ATGAAGgtaaaatcta
Maus	3	ttcttttagTATTCC	114bp	GAGAAGgtgggttctc
Ratte	3	ttcttttagTATTCC	114bp	GAGAAGgtgggttctc
Mensch	3	ttcttttagTATTCA	114bp	GAGAAGgttaagctctt
Schimpanse	3	ttcttttagTATTCA	114bp	GAGAAGgttaagctctt
Maus	4	gtcactgcagGTTCC	276bp	-
Ratte	4	gtgtctgcagGTTCC	276bp	-
Mensch	4	gtcattgcagGTTCC	276bp	-
Schimpanse	4	gtcattgcagGTTCC	276bp	-

Tabelle 3.1: Konservierte Spleißstellen für *Tmem17*. Im Vergleich der vier betrachteten Spezies zeigen sich die Spleißstellen sowohl der Donor- als auch der Akzeptor-Spleißstellen sehr konserviert. Die Exonlänge ist für die proteinkodierenden Bereiche angegeben, UTRs sind nicht betrachtet.

(<http://www.ensembl.org>) aus diesem Bereich finden. Die Sequenzvergleiche der vier Organismen wurden mittels *Vista* (Mayor et al., 2002, <http://www-gsd.lbl.gov/vista/index.shtml>), einem Alignment-Programm basierend auf dem *AVID*-Algorithmus (Bray et al., 2003), durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1B zu sehen. Zwischen den Organismen zeigen sich die höchsten Sequenzkonservierungen in den blau markierten Bereichen, in denen die Exons annotiert sind. Interessanterweise befindet sich etwa 4kb stromaufwärts des ersten Exons ein Bereich, markiert durch ein rotes Oval, der bei den hier betrachteten Organismen eine erhöhte Konservierung und keine EST-Treffer aufweist. Zudem existiert noch ein weiterer hoch konservierter Bereich etwa 14kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Daten nicht gezeigt). Diese evolutionär konservierten Bereiche könnten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren oder andere regulatorische Faktoren darstellen (Loots et al., 2000).

Die Spleißstellen und flankierenden Bereiche sind bei den vier betrachteten Organismen hoch konserviert und folgen ausnahmslos der GT/AG-Regel. Auch die Länge der Exons in den vier betrachteten Organismen ist gleich (Tab. 3.1). Übersetzt man die vorhergesagten Gene in die zugehörige Aminosäuresequenz, so lässt sich eine hohe Homologie feststellen (Abb. 3.2). So ergab ein Sequenzvergleich mittels *BLASTP* für Maus und Ratte 91% Sequenzidentität und 96% Sequenzähnlichkeit (hier bezieht man konservative Aminosäureaustausche mit ein). Bei den Sequenzvergleichen Maus zu Mensch bzw. Schimpanse ergeben sich jeweils 79% Sequenzidentität und 89% bzw. 90% Sequenzähnlichkeit. Durch fortschreitende Genomsequenzierungen sind immer mehr Speziessequenzen in Datenbanken abgelegt worden und *Tmem17*-Orthologe können eindeutig über *BLAST* identifiziert werden. So lässt sich *Tmem17* noch bei *Gallus gallus*, *Fugu rubripes*, *Danio rerio* und *Canis familiaris* finden. Auch in diesen Organismen kann man hohe Sequenzhomologien feststellen (Abb. 3.2). Diese hohe Sequenzähnlichkeit und weite Speziesverbreitung spricht für eine wichtige Funktion dieses Gens zumindest für die hier genannten Organismen. Auch kann man durch die konservierte Verbreitung auf eine korrekte Identifizierung der Genstruktur schließen.

```

Homo_sapiens      MELPDPVRQRLGNFSRAVFSDSNRTGPES-----NEGPENEMVSSLALQMSLYFNTYYFP 55
Pan_troglotydes  MELPDPVRQRLGNFSRAVFSDSNRTGPES-----NEGPENEMVSSLALQMSLYFNTYYFP 55
Canis_familiaris MELPDPVRQRLGNFSRTVFSDSNRTGPEY-----SDGPDNEMVSSLALQMSLYFNTYFFP 55
Rattus_norvegicus MELPDPVRQRLSNLSLTMFGDSSRTGPES-----SEAADNEMVSSLPLQMSLYFNSYFFP 55
Mus_musculus     MELPDPVRQRLSNLSLTMFGDSSRTGPES-----SDAADNEMVSSLALQMSLYFNSYFFP 55
Gallus_gallus    MSLPEPLRRRLGFSFRTVFTDSRRAGPQYP----SERADNEILSSLPLQMSLYFNVYFFP 56
Danio_rerio      MDLPEPIRRRLGDFSRTVFDQSRTPQPSFEEHANFLDQNKDQVSSSLPLQMSLYFNMWFFP 60
Fugu_rubripes    MELPETFRKPLEYISRNVLFDQAR--PFIPENDTLMPHDKRVHSSSLKLQMSLYFNTWYFP 58
*.**:..*: *  :*  :: * . * * *                :: : *** ***** ::**

Homo_sapiens      LWWVSSIMMLHMKYSILPDYKFIIVITVIIILITLIEAIRLYLGIVGNLQEK----- 106
Pan_troglotydes  LWWVSSIMMLHMKYSILPDYKFIIVITVIIILITLIEAIRLYLGIVGNLQEK----- 106
Canis_familiaris LWWISSVVMLQMKYSILPDYKFIIVVTVIIILITLIEGIRLYLGYMGNLQEK----- 106
Rattus_norvegicus LWWVSCIVMLHLKYSVLPDYKFIIVITVVILITLIEAIRLYLGCMGNLQEK----- 106
Mus_musculus     LWWVSCIVMLHLKYSILPDYKFIIVVTVIIILITLIEAIRLYLGCMGNLQEK----- 106
Gallus_gallus    FWWLSTVFMQLKYPVLSDYKFIIVTVMILTSLEIVIRLYLGYMGNLQEK----- 107
Danio_rerio      FWWISEVVMLDLKYSALADYKFIIVITLIVMTLIEAIRLYLGAGNLQEK----- 111
Fugu_rubripes    FWWISEVVMLHVYPALSDPYKFIIVITLILMTLIEIRLFLGYSGNLQEKVLRHSHKQL 118
:***:*  .**.:**.* *.* *****:***: :*** ***:** *****

Homo_sapiens      --VPELAGFWLLSLLLQLPLILFLLFNEGLTNLPLEKAIHIIFTLFLAFQVVA AFLTLRK 164
Pan_troglotydes  --VPELAGFWLLSLLLQLPLILFLLFNEGLTNLPLEKAIHIIFTLFLAFQVVA AFLTLRK 164
Canis_familiaris --VPELAGFWLLSLLLQLPLILFLLFNEGLTNLPLEKAIHIIFTLFLTFQVVS AFLTLRK 164
Rattus_norvegicus --VPELAGFWLLSLLLQLPLLLFLLFNEGLKLNPLEKAIHSIFTVFLTFQVISA AFLTLKK 164
Mus_musculus     --VPELAGFWLLSLLLQLPLILFLLFNDGLRNLPLEKAIHIIFTIFLTFQVISA AFLTLKK 164
Gallus_gallus    --VPELAGFWLLTLLLQLPVILFLLFNEGLNIQPLERSVNIIFALFLVFQVIA AFLVTLKR 165
Danio_rerio      --VPELAGFWLLTFLQLPPLILFQLFNEAVLVQPLERGVHIIALALFIFA EVLFGFVALRT 169
Fugu_rubripes    SYVPELAGFWLLT-ILQLAIIILFQLFYEA FIIQPLERGVHIVLALFILTQAFFGFVALRE 177
*****: :***:*** * : .. *****: :***: :***: :***: :***: :***: :***:

Homo_sapiens      MVNQLAVRFHLQDFDRLSANRGMRRMRSCIEEI 198
Pan_troglotydes  MVNQLAVRFHLQDFDRLSAKRGDMRRMRSCIEEI 198
Canis_familiaris MVNQLATHFHLQDFDRLSAYRGGVRRMRSCIEEI 198
Rattus_norvegicus MVNQLAARFHLQDFDQLSASSATGRRARQSSEEL 198
Mus_musculus     MVNQLAARFHLQDFDQLSSSSAAVRRVRQCTEEL 198
Gallus_gallus    MVNKLATHFHLNEFDRL----- 182
Danio_rerio      MVRHTESRFHLRQF----- 183
Fugu_rubripes    MVRQTQSQFRLRQFEF----- 193
**.:  :***:***

```

Abbildung 3.2: Alignment der Aminosäuresequenzen für Tmem17. ClustalW-Alignment der Tmem17-Sequenzen. Genomische Sequenzen der verschiedenen Organismen wurden durch BLAST identifiziert und in Aminosäuresequenzen übersetzt und zeigen eine hohe Konservierung.

3.1.1.2 Expressionsmuster von *Tmem17*

Um die Expression von *Tmem17* zu untersuchen, wurde total-RNA aus verschiedenen adulten (5 Monate alten) und embryonalen (E13,5) CD1-Mausgeweben isoliert. Die total-RNA wurde mit Standardmethoden in cDNA umgeschrieben und mit intronüberspannenden Primern (Primerpaar: Y2H-N-*Tmem17*_a/Y2H-N-*Tmem17*_b) semiquantitativ getestet. Hierbei zeigte sich das Vorhandensein des *Tmem17*-Transkripts in allen getesteten Geweben (Abb. 3.3A). Die intensivsten Signale zeigen sich im Rückenmark, dem Testis, sowie den embryonalen Geweben Kopf und Rumpf. Durch ein Northern-Blot-Experiment ließ sich eine einzelne Bande von etwa 1,5kb nachweisen, was gut zu der assemblierten cDNA-Sequenz von *Tmem17* entspricht (Abb. 3.3B). Schaut man sich die Herkunft der für die Assemblierung des Gens verwendeten ESTs an, so findet man verschiedenste Gewebe, aus denen diese ESTs generiert worden sind. Zwei ESTs stammen aus einer fötalen Bibliothek, andere stammen aus dem Herzen, Gehirn, Auge

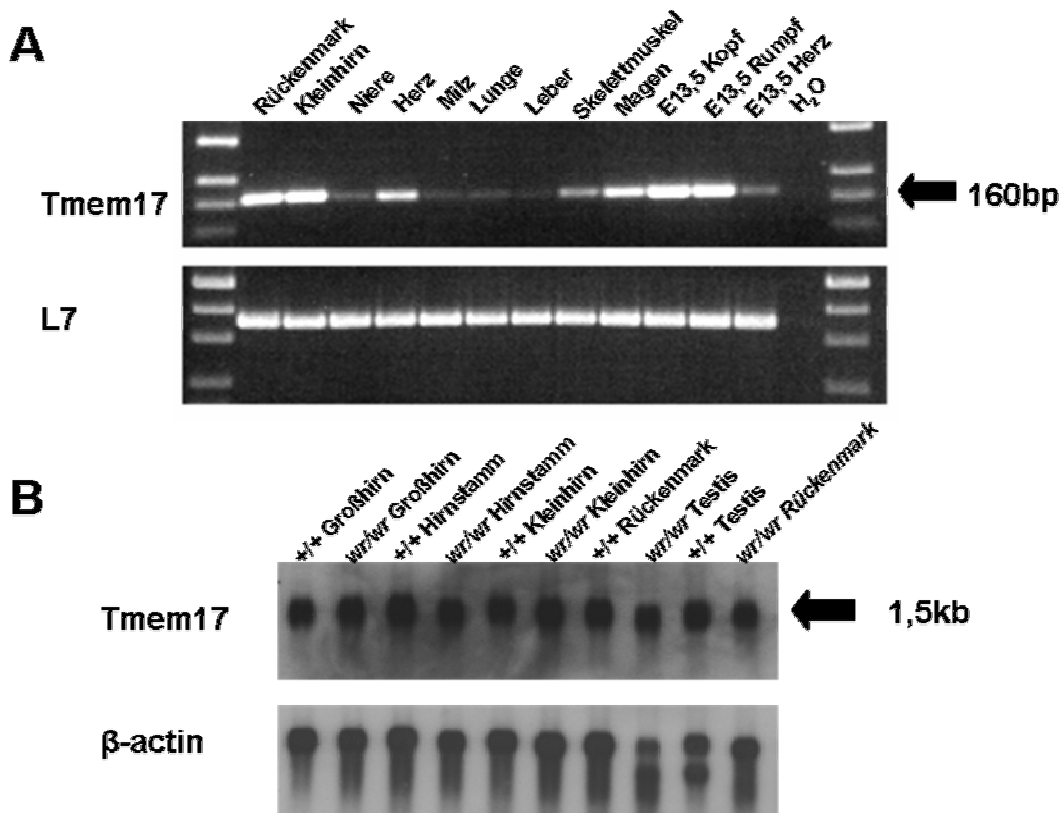


Abbildung 3.3: Expressionsmuster von *Tmem17*. **A)** RT-PCR-Experimente mit Erststrang-cDNA generiert aus verschiedenen Mausgeweben. Das Primerpaar für *Tmem17* liefert ein Produkt von 160bp. Das L7-Primerpaar dient als Ladekontrolle. **B)** Der Northern-Blot von verschiedenen Wobbler- und Wildtypgeweben wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, die spezifisch für den proteinkodierenden Bereich für *Tmem17* war, hybridisiert. Als Ladekontrolle wurde der Blot ein zweites Mal mit einer β -actin-spezifischen Sonde hybridisiert.

und Magen. Interessanterweise wurde ein EST gefunden, der während eines EST-Projektes kloniert worden ist, das differentiell exprimierte Transkripte in PC12-Zellen nach NGF-Behandlung identifizierte (Lee et al., 1995).

3.1.1.3 Evaluierung von *Tmem17* als Kandidat für *wobbler*

Aufgrund der genomischen Lage im *wr*-kritischen Intervall und der deutlichen Expression in Testis und Rückenmark, den pathologischen Geweben der Wobbler-Maus, wurde *Tmem17* hinsichtlich der Detektion von Unterschieden in der genomischen Sequenz und im Expressionsniveau untersucht.

Es wurden sowohl die proteinkodierenden Bereiche von der cDNA (Primerpaar: Y2H-N-*Tmem17_a*/Y2H-C-*Tmem17_b*), als auch die untranslatierten Bereiche von genomischer DNA (Primerpaare: Seq-*Tmem17_5'UTR_a*/Seq-*Tmem17_5'UTR_b* und Seq-*Tmem17_3'UTR_a*/Seq-*Tmem17_3'UTR_b*) von C57Bl6 (*wr/wr*) und C57Bl6 (+/+) Tieren amplifiziert und sequenziert. Hierbei wurden keinerlei Unterschiede festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Quantitative-RT-PCRs mit dem Roche-Lightcycler-System (Primerpaare: LC1-*Tmem17_a*/LC1-*Tmem17_b* und LC2-*Tmem17_a*/LC2-*Tmem17_b*) zeigten keinerlei Unterschiede in der Expressionshöhe im Testis und Rückenmark zwischen Wildtyp- und Wobbler-Tieren (Daten nicht gezeigt). Beim Hybridisieren eines Northern-Blots mit der proteinkodierenden Sequenz als Sonde (*insert* ausgeschnitten und aufgereinigt aus *Tmem17*-Expressionsvektor, siehe unten), zeigten sich weder in der Intensität noch in der Transkriptgröße Unterschiede zwischen Wobbler- und Wildtyp-Mäusen (Abb. 3.3B).

3.1.1.4 Subzelluläre Lokalisation von *Tmem17*

Untersucht man die Aminosäuresequenz von *Tmem17* auf bekannte Domänen bzw. Motive (InterProScan, <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>), so lassen sich bis auf vier Transmembranregionen, die mit sehr guten Signifikanzwerten prognostiziert werden (Abb. 3.4A), keine identifizieren. Dieses lässt sich auch für *Tmem17* aus anderen Organismen zeigen (Daten nicht gezeigt).

Zur Herstellung von rekombinantem *Tmem17* ist dieses zusammen mit einer kurzen C-terminalen Aminosäuresequenz (Sequenzfragment aus Birkenpollen-Profilin), gegen die ein monoklonaler Antikörper vorlag, mittels PCR amplifiziert (Primerpaare: Exp-*Tmem17_a*/Exp-*Tmem17_bipro_b*) und in einen Expressionsvektor (pTarget, Promega)

kloniert worden. CHO-Zellen sind mit diesem Bipro-Tmem17-Plasmid transfiziert worden und total-Proteinextrakte über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt worden. Hierbei ließen sich in einem Western-Blot-Experiment mit dem Anti-Bipro-Erstantikörper (1:25 Verdünnung in 0,5% BSA/PBS) und Anti-Maus-Zweitantikörper (1:4000 Verdünnung in 0,5% BSA/PBS) vier Banden nachweisen (Abb. 3.4B). Das theoretische Molekulargewicht von Maus Tmem17 von 22,6kDa wird durch die 10 Aminosäuren der Bipro-Tag-Sequenz auf 23,8kDa erhöht. Es zeigte sich eine deutliche Doppelbande bei etwa 24-25kDa und eine weitere schwächere bei etwa 27kDa. Die beiden zusätzlichen Banden könnten durch posttranslationale Modifikationen verursacht werden. Die schwache Bande bei etwa 17kDa könnte von einer beginnenden Degradation des in der Zelle hochexprimierten Proteins herrühren (Abb. 3.4B).

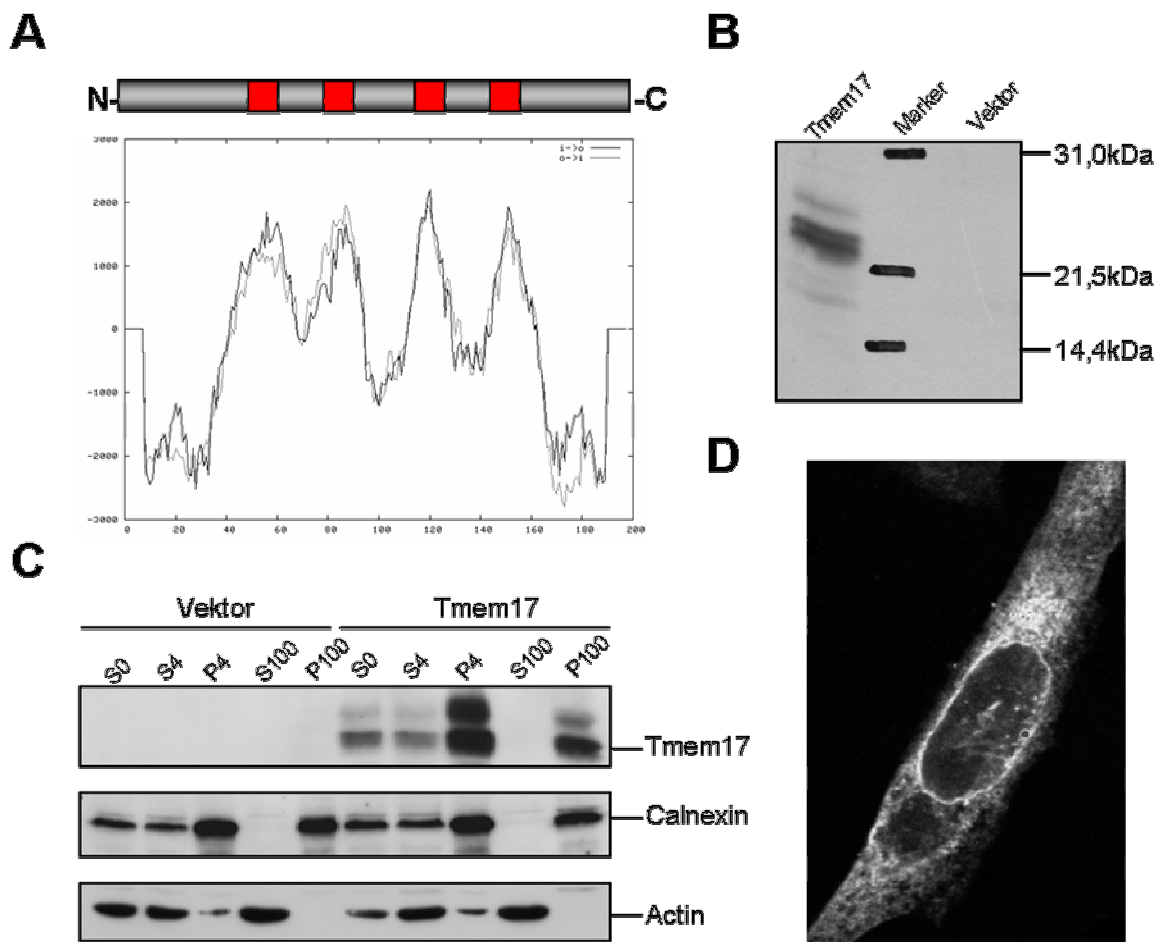


Abbildung 3.4: Intrazelluläre Lokalisation von Tmem17. **A)** Topologievorhersage für Maus-Tmem17. Vorhersage mit TM -Pred (Hofmann und Stoffel, 1993). Die Transmembranregionen sind durch rote Kästchen in der Schemadarstellung markiert. **B)** Western-Blot von total-Zelllysaten aus CHO-Zellen wurden mit Tmem17-Expressionsvektor und Leervektor als Kontrolle transfiziert. **C)** Western-Blot der Fraktionierung von Lysaten aus COS7-Zellen, transfiziert mit Tmem17-Expressionsvektor und Leervektor als Kontrolle. Zur Überprüfung der Qualität der Fraktionierung wurde der Western-Blot mit Anti-Calnexin-Antikörper (ER-Marker) und Anti-Actin-Antikörper (cytosolischer Marker) inkubiert. **D)** Immunfluoreszenzaufnahme von CHO-Zellen, transfiziert mit Tmem17-Expressionsvektor. Mit Anti-Bipro-Erstantikörper und anti-Maus-Cy3-Zweitantikörper inkubiert. Aufnahme von Dr. Ralf Palmisano, Universität Bielefeld.

Um die Computervorhersage der Transmembranregionen zu überprüfen wurde eine Fraktionierung von Tmem17 exprimierenden Zellen durchgeführt. Hierzu wurden COS7-Zellen mit dem Bipro-Tmem17-Konstrukt transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubationsdauer wurden die Zellen geerntet und die Fraktionierung, wie in Wang und Brautigam (2002) beschrieben, durchgeführt. Als Kontrolle diente der Leervektor. Tmem17 ließ sich hierbei im Western-Blot-Experiment nicht in der löslichen S100 Fraktion nachweisen, wohl aber in der P100 Membranfraktion (Abb. 3.4C). Als Kontrollen für die Qualität der Fraktionierung wurde mit Anti-Calnexin-Antikörper (ER-Marker, 1:2000 Verdünnung in 5% Milch/PBS) und Anti-Actin-Antikörper (cytosolischer Marker, 1:2000 Verdünnung in 5% Milch/PBS) gearbeitet. Durch diesen Versuch wurde nachgewiesen, dass Tmem17 membranassoziiert ist.

Um festzustellen, ob Tmem17 in der Plasmamembran lokalisiert ist, wurden CHO-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, und mit dem Bipro-Tmem17-Konstrukt transfiziert. Nach Fixieren mit Paraformaldehyd und Inkubation mit Anti-Bipro-Antikörper (Serum unverdünnt) und Cy3-Anti-Maus-Zweitantikörper (1:500 Verdünnung in 0,5% BSA/PBS), zeigten sich im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica) keinerlei Signale an der Plasmamembran. Ein starkes Signal konnte dagegen intrazellulär erhalten werden (Abb. 3.4D).

3.1.1.5 Interaktionspartner von Tmem17

Um nach Interaktionspartnern von Tmem17 zu suchen, ist ein Yeast Two-Hybrid Screening durchgeführt worden. Hierzu ist die proteinkodierende cDNA-Sequenz von Tmem17 mit chimären Primern, die am 5'-Ende Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen besaßen (Primerpaar: Y2H-N-Tmem17_a/Y2H-C-Tmem17_b), mittels PCR amplifiziert worden und in den Vektor pGBT9 (BD Bioscience Clontech) kloniert worden. Das korrekte Vektorkonstrukt ist durch Sequenzieren verifiziert worden (Primer: Gal4-BD_a und Gal4-BD_b). Von diesem Vektor konnte somit ein Fusionsprotein exprimiert werden, das aus der Gal4-Bindedomäne und Tmem17 bestand. Der Hefestamm AH109 ist mit diesem Plasmid transformiert worden und mit dem prätransformierten Stamm Y187, der eine adulte Maushirn Matchmaker cDNA Bibliothek trug (BD Bioscience Clontech), basierend auf dem pACT2-Plasmid mit Gal4-Aktivierungsdomäne, fusioniert worden. Weder auf SD-Leu/-Trp/-His-, noch auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ade-Selektionsplatten sind diploide Kolonien gewachsen (Daten nicht gezeigt).

Dieses negative Ergebnis könnte an den hydrophoben Transmembranregionen in Tmem17 liegen, da diese den Import in den Kern verhindern und somit die Aktivierung der Reportergene unterbinden könnten.

Für den nächsten Ansatz sind daher nur Fragmente von Tmem17 ohne die Transmembrandomänen für den Yeast Two-Hybrid Screen eingesetzt worden. Sowohl das N-terminale Fragment (Aminosäuren 1 bis 40, Primerpaar Y2H-N-Tmem17_a/Y2H-N-Tmem17_b), als auch das C-terminale Fragment (Aminosäuren 160 bis 198, Primerpaar: Y2H-C-Tmem17_a/Y2H-C-Tmem17_b) sind mittels PCR amplifiziert, in den pGBT9-Vektor kloniert und in zwei separaten Screening-Ansätzen analysiert worden (Abb. 3.5A). Für das N-terminale Fragment sind 47 Kolonien erhalten worden, für das C-terminale Fragment insgesamt 210. Nach α -Gal und β -Gal Filter Lift Assays (Hefe Protokoll Handbuch, BD Bioscience Clontech) sind 14 C-terminale und 18 N-terminale positive Interaktionen festgestellt worden (Daten nicht gezeigt). Plasmide sind aus den diploiden Kolonien isoliert, der *E. coli* Stamm JQ101 (auxotroph für Leucin) mit den Plasmidextrakten transformiert und auf Selektionsplatten ausgebracht worden. Restriktionsspaltungen und Kolonie-PCRs (Primerpaar: 5'AD_LD_ins/3'AD_LD_ins) identifizierten Bibliotheksplasmid tragende Kolonien. Aus den Bakterien wurden die Bibliotheksplasmide isoliert und sequenziert (Primer: Gal4_AD_seq). Sequenzen sind aus insgesamt 14 Kolonien erhalten worden (Abb. 3.5B).

Es handelte sich dabei um vier unabhängig festgestellte Interaktionen mit Ppm1e, vier Interaktionen mit Cops5, drei Interaktionen mit Ranbp9 und je eine festgestellte Interaktion mit Fem1b, Abcd4 und einem Fragment einer unbekanntes viralen Transkriptase, die wahrscheinlich durch ein exprimiertes LINE (engl. *long interspersed nuclear elements*) in die Bibliothek gelangt ist (Sequenzen repräsentativer Klone im Anhang).

Um die Interaktionen näher zu untersuchen, wurden im Hefestamm AH109 Kotransformationen der Interaktionspartner zusammen mit pGBT9-Konstrukten mit entweder dem N-terminalen Fragment, dem C-terminalen Fragment, der gesamten Tmem17-Sequenz oder dem Leervektor pGBT9 durchgeführt. Alle Kotransformanden, die mit dem pGBT9-Tmem17-Gesamtsequenz-Konstrukt erhalten worden sind, zeigten kein Wachstum auf SD-Leu/-Trp/-His/-Ade-Selektionsplatten (Daten nicht gezeigt), wahrscheinlich aufgrund der hydrophoben Bereiche des Proteins (siehe oben). Im Falle von Ppm1e zeigte sich eine Interaktion nur für das C-terminalen Fragment, genauso für Fem1b (Abb. 3.5C). Hier erschien die Interaktion im direkten Vergleich deutlich schwächer. Ranbp9 zeigte Interaktionen sowohl für den N-Terminus und den C-Terminus,

als auch deutlich schwächer für den Leervektor pGBT9. Für Cops5 und Abcd4 zeigten sich starke Signale für das N-terminale Fragment.

Zusätzlich wurde mit Hefezellen von der DDO-Kontrollplatte (SD-Leu/-Trp) ein β -gal Filter lift assay (Hefe Protokoll Handbuch, BD Biosciences Clontech) durchgeführt. Hierbei

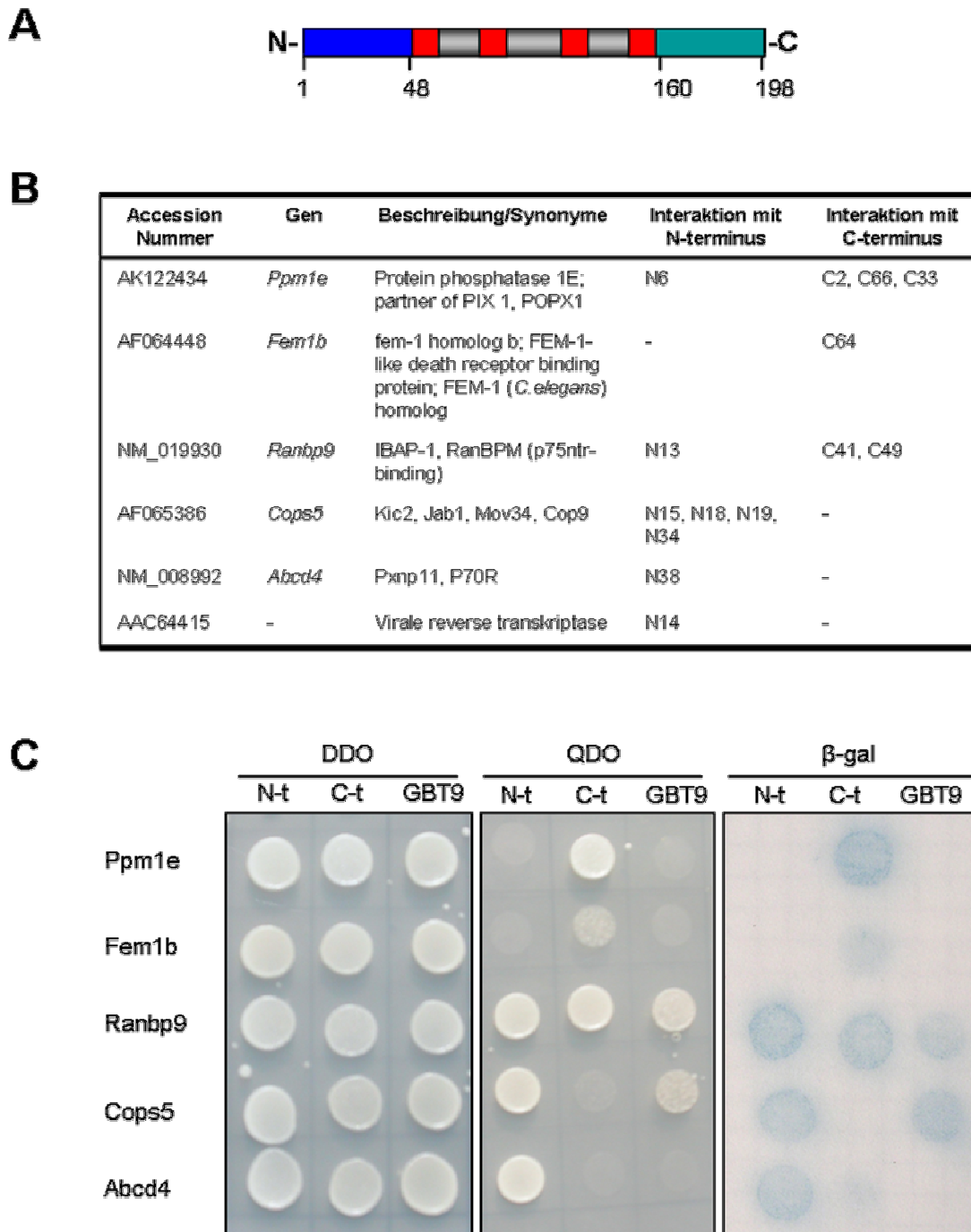


Abbildung 3.5: Interaktionsscreening für Tmem17. A) Schema der Domänenstruktur von Tmem17. DNA-Sequenzen für die N-terminalen (1-40), blau markiert, und C-terminalen Aminosäuren (160-198), rot markiert, sind in den pGBT9-Vektor kloniert worden und zwei separate Yeast Two-Hybrid Screens durchgeführt worden. **B)** Klonliste der Interaktionspartner. Insgesamt konnten Sequenzen von sechs verschiedenen Interaktionspartnern erhalten werden. **C)** Interaktionsassay. Kotransformanten wurden auf Selektionsplatten ausgebracht und β -gal Filter lift assays durchgeführt. (DDO = SD-Leu/-Trp, QDO = SD-Leu/-Trp/-His/-Ade).

zeigte sich ein deutliches Signal in der Negativkontrolle für Ranbp9 und Cops5, so dass es sich bei den festgestellten Interaktionen um falsch positive Signale handeln könnte (Abb. 3.5C). Ppm1e und Abcd4 sind somit gute Kandidaten für eine starke Interaktion mit Tmem17 *in vivo*.

3.1.2 NM_172792

Durch die Suche nach weiteren kodierenden Sequenzen in der *wr*-kritischen Region, wurde in der intergenischen Region zwischen *Ugp2* und *Mdh1* ein weiteres neues Gen identifiziert (Abb. 3.6A). Später wurde dieses Gen fälschlicherweise als Ein-Exon-Gen in der Ensembl-Datenbank annotiert und erhielt den Namen *NM_172792*. Diese Bezeichnung wurde im Folgenden beibehalten.

3.1.2.1 Genstruktur

Es ließen sich über *BLAST*-Sequenzvergleiche zwei cDNA-Klone finden, die einen signifikanten Treffer in der Mausequenz erzielten. Es handelte sich dabei um den Klon AK030001 (3062bp), der zu 100% identisch zur genomischen Sequenz war, und den Klon AK030017 (3064bp), der zu 91% sequenzidentisch zur *wr*-kritischen Region war. Diese beiden Sequenzen erzielten keine Treffer in der humanen Sequenz (Abb. 3.6A). Der Klon AK030017 erzielte mittels *BLAST* bessere Treffer (99-100%) auf Mauschromosom 17. Sequenzvergleiche beider Klone untereinander zeigten bis auf kleinere Insertionen und Deletionen eine sehr große Übereinstimmung. Um mehr Informationen über diese cDNAs zu bekommen, wurden Sequenzsuchen in öffentlichen Datenbanken durchgeführt. Hierdurch ließ sich noch eine hypothetische Sequenz aus der Ratte mit hoher Homologie identifizieren (XM_236813). *BLAST*-Analysen dieser Sequenz auf genomischer Ebene (www.ensembl.org) zeigten, dass die Sequenz auf dem Rattenchromosom 9 lokalisiert ist. Das Rattenchromosom lag allerdings noch nicht als fertige Sequenz, sondern als „draft“ Sequenz vor, in der noch Lücken in der genomischen Sequenz existierten. Es wurden die relevanten genomischen Regionen des Mauschromosoms 17 (ebenfalls „draft“) und Rattenchromosoms 9 heruntergeladen und mit der *wr*-kritischen Region auf Mauschromosom 11 mittels *Vista* verglichen (Abb. 3.6B). Hierbei zeigte sich die Genstruktur des neuen Gens. Es handelt sich um neun Exons, wobei die Spleißstellen, analysiert mit *SIM4* (Florea et al., 1998), der GT/AG Regel folgen (Daten nicht gezeigt). Interessant ist hierbei die Anordnung und Abfolge der Repeats, die in der Visualisierung der Sequenzvergleiche als kleine farbige Kästchen dargestellt sind (Abb. 3.6B). Direkt stromaufwärts des ersten Exons und stromabwärts des letzten Exons befinden sich lange ausgedehnte Bereiche von LINE (engl. *long interspersed nuclear elements*) Repeats (rote

Pfeile Abb. 3.6B). Desweiteren lassen sich noch viele LTRs (engl. *long terminal repeats*) vor und hinter dem Gen identifizieren (rosa Balken).

Das Übersetzen der Nukleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz (blaue Balken, Abb. 3.6C) ergab 226 Aminosäuren für die Chromosom11- und 405 Aminosäuren für die

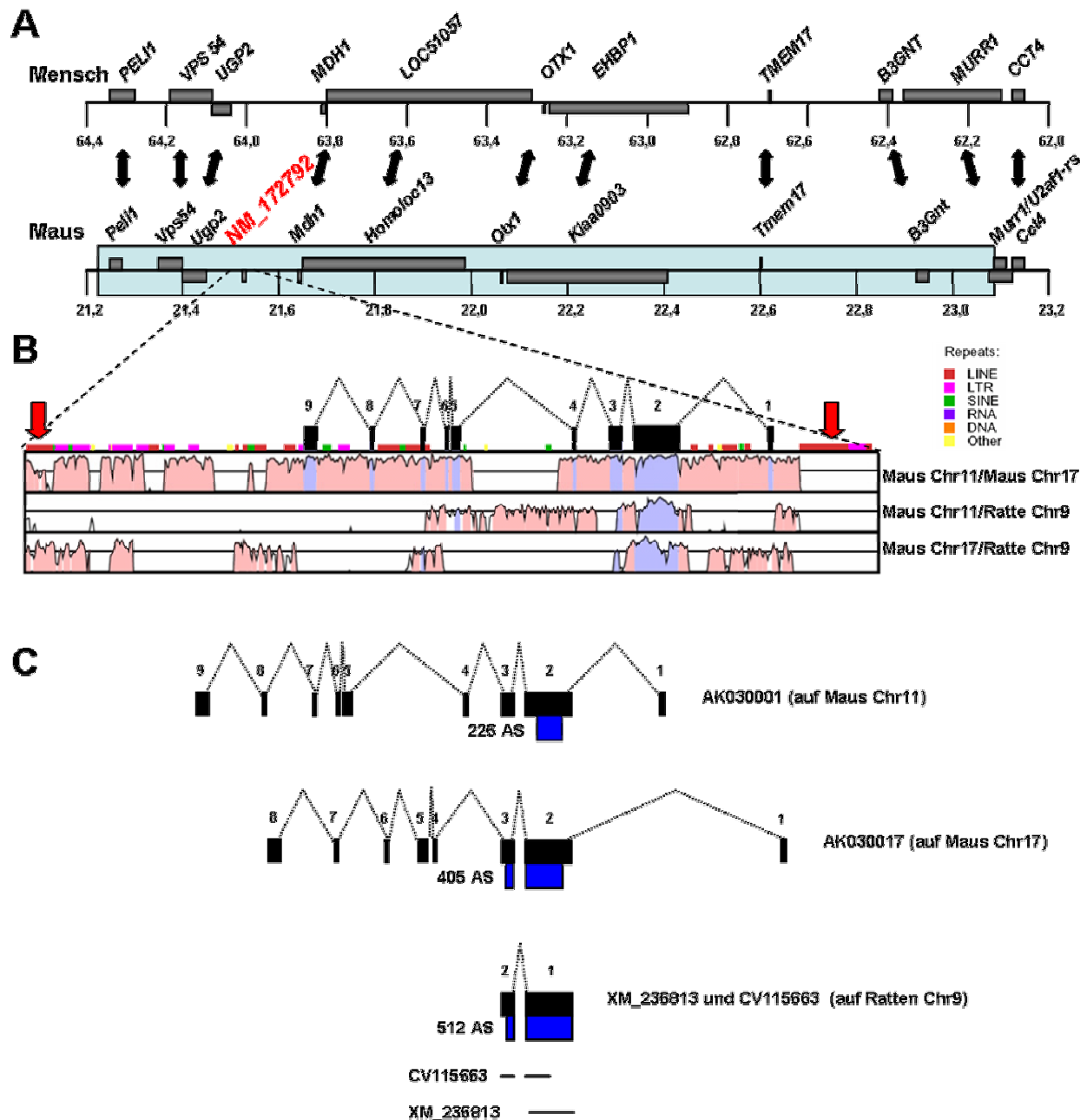


Abbildung 3.6: Identifizierung und Lokalisation von NM_172792. **A)** Lokalisation der anonymen cDNA AK030001 (rot markiert) im wr-kritischen Bereich der Maus. Das Gen fehlt in der humanen Sequenz. **B)** Genstruktur von NM_172792 und Sequenzvergleiche der genomischen Sequenzen. Genomische Sequenzen wurden mittels *Vista* verglichen. Identifizierte Repeats sind über den Alignments angegeben. Konservierte nichtkodierende Bereiche sind durch rosa, Exons durch blaue Schattierungen markiert. Positionen von zwei ausgedehnten LINE-Bereichen sind durch rote Pfeile markiert. **C)** Vergleich der Genstrukturen. Die cDNA wurden mittels *SIM4* mit der genomischen Sequenz aligniert. Die proteinkodierenden Bereiche sind durch blaue Balken markiert.

Chromosom17-Variante. Es zeigte sich, dass die Chromosom11-Variante, im Vergleich zur Chromosom17-Variante, durch eine Punktmutation ein frühzeitiges Stopp-Codon enthält, welches zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation und somit zu einem C-terminal trunkeierten Protein führt. Im Falle der Rattensequenz ließen sich die hypothetische Sequenz XM_236813 durch einen gespleißten EST CV115663 verlängern und lieferte eine Aminosäuresequenz von 512 Aminosäuren (Abb. 3.6C).

Vergleicht man die flankierenden Gene für das Mauschromosom 17 und Rattenchromosom 9 so fällt auf, dass es sich in beiden Fällen um die jeweils orthologen Gene handelt. So findet man stromaufwärts eine noch uncharakterisierte Sulfotransferase (Sult1c2) und stromabwärts das Shugoshin-1-like Gen (Daten nicht gezeigt), ein Kinetochorprotein mit Funktionen in der Mitose (Salic et al., 2004) und der Meiose (Kitajima et al., 2004). Weiterhin handelt es sich bei den Mauschromosom17- und Rattenchromosom 9-Regionen um größere syntäne Bereiche (Daten nicht gezeigt). Wenn man die cDNA-Sequenzen mit der jeweiligen genomischen Sequenz vergleicht, findet man deutliche Übereinstimmungen in der Genstruktur zwischen der Mauschromosom11- und 17-Variante (Abb. 3.6C). Zur Ratten-Variante kann man aufgrund geringer Sequenzabdeckungen in den 5'- und 3'UTR Bereichen nicht viel über die weitere Genstruktur aussagen.

Übersetzt und aligniert man die Aminosäuresequenzen der drei Varianten, so findet man deutliche Übereinstimmungen (Abb. 3.7). Eine Überprüfung der Sequenzen auf Kinase-Domänen mittels *KinG* (Krupa et al., 2004) lieferte hohe Homologien zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen (SMART: e-value = 2,5e-80). Der Bereich der Homologie zur katalytischen Domäne ist in der Abbildung 3.7 rot dargestellt. Hierbei fällt auf, dass bei den Maus-Varianten N-terminal Sequenzen im Vergleich zur Ratten-Variante fehlen. Auch lässt sich für die Ratten-Variante ein glyzinreicher Loop (blau, Abb. 3.7) identifizieren. glyzinreiche Loops binden ATP und sind somit eine wichtige Komponente für eine katalytisch aktive Kinase (Krupa et al., 2004). Die beiden Maus-Varianten besitzen diesen Loop nicht. Die für eine katalytisch aktive Kinase charakteristische Aminosäure ist ein Aspartatrest, welches meist mit einem Arginin zusammen als RD-Motiv vorkommt. Über diese Motive wird die katalytische Aktivität der RD-Kinasen reguliert (Johnson et al., 1996). Die beiden Maus-Varianten besitzen dieses Motiv, im Gegensatz zur Ratten-Variante, nicht (Abb. 3.7). In der Sequenz, die sich an die Kinase-Domäne anschließt, ließen sich keine bekannten Domänen identifizieren (Daten nicht gezeigt).

```

Maus_AK030001 -----
Maus_AK030017 -----
Ratte_XM_236813+ MAGRTEVNILEKDFRILLSLGSSGTYGEVKLACHLPTGTRVAVKVLQKNIN 50

Maus_AK030001 -----MIDTLITTTTYVIMENVAGEDLEKYLR 25
Maus_AK030017 -----MIDTLITTTTYVIMEYVPGEDLEKYLR 25
Ratte_XM_236813+ SVADITLEVELLQSLLEHRNIVRFFHMIDTLITASFIMEYVAGEDLESCLR 100
                    *****:;:*** *_*****_ **

Maus_AK030001 ALGCLKEEEEARPVFQQVVS AVHFLHQRIAHNRNIKLESILVDAAGNAKLC 75
Maus_AK030017 ALGCLKEEEEARPVFQQVVS AVYFLQQRHIAHRNIKLENILVDAARNAKLS 75
Ratte_XM_236813+ SLGCMKEEEEARPIFQQVVS AVHFLHQRIAHRIKLENILVDAAGNAKLC 150
                    :***:*****:*****:***:***:*****:*****_*****_****_

Maus_AK030001 DFGMAIKTTEGQMLEETCGSLLYRAPEILARKPYDGLAVDMWSLGLVLY 125
Maus_AK030017 DFGMAIKTTEGQMLEETCD SLLYRAPEILARKPYDGLAVDMWSLGLVLY 125
Ratte_XM_236813+ DFGMAIKITEGQMLEEICG SLLYWAPEILARKPYDGLAGDMWSLGLVLY 200
                    ***** ***** *_***** *****

Maus_AK030001 LVTGHPYVEATIEDMHRVITTTVCPIPYHLSFPCHIIIIAMLLGVPTWHR 175
Maus_AK030017 LVTGHPYVEATIEDMHRITTTMCP IPYHLSFPCHIIIIARLLGVPTWFR 175
Ratte_XM_236813+ LVTGHPYLEATIEDMHR LITTTMCP IPYHLSKPCHIIIIARLLGVPTWYR 250
                    *****:*** *****:*****:***** ***** ** *****_*

Maus_AK030001 MTHQLVERPMLGHIQDHGLVATKEILFRIVNTMCTIGYTCEEIVSSLTN 225
Maus_AK030017 MTHQLVERPMLGHIQDHGLVATKEILPRIINTMCTIGYTCEEIVSSLTN 225
Ratte_XM_236813+ LTTYQLVERPMLGPIQEHRL LATKGI LFRIVNTMCTIGYTCEEIVSSLTH 300
                    :**:* ***** **:* *:**** *****:*****

Maus_AK030001 R----- 226
Maus_AK030017 RRLKDEVMAFENILKYQLS YGDSHQOVERPWANNSLSGVLIPFPHLKRRR 275
Ratte_XM_236813+ RQVRGEVMAFENILKYQLN CGDSHQOVERPWANNSSEAGALSLLPALKRRR 350
                    *

Maus_AK030001 -----
Maus_AK030017 SESTFSTCIARKSHFQDENIERRSKSCINS PILTON-CFERMENSDDPV 324
Ratte_XM_236813+ SEPVPSTRIEAGKSHFQEDGVEERGESCRRYEMLTKYSSVDLMPCCSDDPV 400

Maus_AK030001 -----
Maus_AK030017 EESDALTADVINSATGDIVVNI DSTCNPGEFVSPVSDY----- 363
Ratte_XM_236813+ EEGYSLAVNITNTATEDI AVNRNSMDSL RGEHFSPLSAQDGTATGFVNMG 450

Maus_AK030001 -----
Maus_AK030017 -----VGPTASKSRSLTVWRRIS PALK--ALCCCCC 393
Ratte_XM_236813+ EEEEEPELDISRDQPVGF IASASRPLRGMKLMKKRIERFLEACCCCC 500

Maus_AK030001 -----
Maus_AK030017 CLPSPRGETEMD 405
Ratte_XM_236813+ CLPSPCGETEMN 512

```

Abbildung 3.7: Alignment der Mauschromosom 11- und 17-, sowie der Ratten-Variante von NM_172792. Bereich der Homologie zur katalytischen Kinase-Domäne ist rot dargestellt. Der ATP-bindende glyzinreiche Loop ist blau, das RD-Motiv ist grün markiert. Die hypothetische Rattensequenz XM_236813 konnte durch einen gespleißten EST (CV115663) um neun Aminosäuren verlängert werden, hier braun dargestellt.

Aus diesen Daten lässt sich eine Hypothese zur Evolution der Chromosom11-Variante erstellen. So dürfte der gemeinsame Vorfahre von Ratte und Maus ein aktives Kinasegen zwischen Shugoshin1-like und der Sulfotransferase besessen haben. Durch Punktmutationen in der Mauslinie wurde die noch aktive Kinase N-terminal trunkiert und

das RD-Motiv ging verloren. Durch die flankierenden LINE-ähnlichen Elemente könnte die Mauschromosom 17-Variante mobil geworden sein und in den *wr*-kritischen Bereich integriert sein. In einer genomweiten Untersuchung von Kinasen wurden ähnliche LINEs flankierend von MARKs (engl. *microtubule affinity regulating kinases*) gefunden, einer Familie von schnell evolvierenden Kinasen, deren Mitglieder sich in der Mauslinie sehr weit verbreitet haben (Caenepeel et al., 2004). In der Maus haben sich noch weitere kleinere Insertionen, Deletionen und Punktmutation angehäuft, inklusive des vorzeitigen Stopp-Codons in der Chromosom11-Variante, die zur heutigen Struktur des Gens beitragen.

3.1.2.2 Evaluierung von NM_172792 als Kandidat für *wobbler*

Ein Teil der cDNA von NM_172792 wurde von (*wr/wr*)-Testis-Erststrang-cDNA amplifiziert (Primerpaar: RT_Kinase_1_8_a/RT_Kinase_1_8_b, Abb. 3.8A, rot markiert). Der Rückprimer (RT_Kinase_1_8b) ist so gewählt worden, dass dieser in einer kleinen Insertionsregion im Vergleich zur Chromosom17-Variante bindet (Position 2035-2056 in AK030001) und somit nur die Chromosom11-Variante spezifisch amplifiziert wurde. Das erwartete PCR-Produkt von 1,8kb konnte weder von Rückenmark noch von Hirnstamm Erststrang-cDNA amplifiziert werden. Das Testis-Produkt, generiert von (*wr/wr*) und (+/+) Tieren, ist in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert und je ein Klon mittels Primerwalking (Primer: M13uni, M13rev, KinseqA, KinseqC, KinseqE und KinseqF) komplett sequenziert worden. Bei festgestellten Abweichungen in der Sequenz wurde ein zweiter unabhängiger (*wr/wr*) und (+/+) Klon sequenziert und die Sequenz mit CAP3 (Huang und Madan, 1999) assembliert (Assemblierung im Anhang 6.2.1). Hierbei ließen sich keinerlei Mutationen in dem 226 Aminosäuren großen offenen Leseraster feststellen. Im 3'UTR der Wildtyp-Kontrolle konnten zwei Transversionen Adenin→Guanin an den Positionen 1414 und 1691 (Referenz cDNA AK030001) festgestellt werden (Positionen markiert mit einem Sternchen in Abb. 3.8A und Anhang 6.2.1, grauer Kasten). Da weder in der genomischen Sequenz, noch in der cDNA AK030001 ein Guanin an den entsprechenden Positionen gefunden werden konnte, sind die festgestellten Transversionen offensichtlich spezifisch für den in unserer Arbeitsgruppe verwendeten C57/BL6-Substamm und daher für die weitere Betrachtung irrelevant.

Weiterhin wurden die mit der ersten Amplifikation nicht abgedeckten Exons amplifiziert und sequenziert. Es wurden Primer generiert, die flankierend zu den Exons lagen und so

mittels PCR von (*wr/wr*) und (*+/+*) genomischer DNA PCR-Produkte amplifiziert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese mit den gleichen Primern sequenziert. So konnten für Exon 1 (Primerpaar: *kinase_ex1_a/kinase_ex1_b*), Exon 2 (Primerpaar: *kinase_ex2_a/kinase_ex2_b*), Exon 4 (Primerpaar: *kinase_ex4_a/kinase_ex4_b*) und Exon 9 (Primerpaar: *kinase_ex9_a/kinase_ex9_b*) spezifische Sequenzen generiert werden, die keinerlei Mutationen aufwiesen (Sequenzen im Anhang 6.2.2). Diese Strategie konnte nicht für die verbleibenden Exons 5, 6, 7 und 8 angewandt werden. Hier ist es nicht gelungen, trotz mehrmaliger Sequenziersuche und Klonierungen der PCR-Produkte, auswertbare Sequenzen zu erhalten. Dieses lässt sich zum Teil auf die stark repetitiven genomischen Abschnitte in diesem Teil des Genoms zurückführen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwischen (*wr/wr*)- und (*+/+*)-Tieren in den untersuchten Exons (grüne Balken, Abb. 3.8A), bis auf zwei unbedeutende Transversionen in Kontrolltieren, keine Mutationen festgestellt werden konnten.

Um zu überprüfen, ob das Expressionsniveau oder die Transkriptgröße von NM_172792 in (*wr/wr*) Tieren verändert ist, wurde ein Northern-Blot-Experiment mit Testis und Rückenmark total-RNA von (*wr/wr*)- und (*+/+*)-Tieren durchgeführt. Die verwendete Sonde wurde mittels PCR amplifiziert (Primerpaar: *North_Kin1_a/ North_Kin1_b*, Position 1103-1510 in AK030001, Abb. 3.8A oranger Balken) und radioaktiv markiert. Hierbei ließen sich nur im Testis Signale erhalten (Abb. 3.8B). Es zeigte sich eine intensive Bande bei etwa 3kb, die gut mit der Größe der beiden cDNA-Klone (AK030001 und AK030017) korreliert. Weiterhin konnte eine deutlich schwächere Bande von etwa 4,5kb detektiert werden. BLAST-Sequenzsuchen mit der SONDENSEQUENZ lieferte keinerlei Hinweise auf ein mögliches alternatives Transkript, welches mit dieser Sonde kreuzhybridisieren könnte.

Da mit dieser Sonde aufgrund von Sequenzhomologien im Northern-Blot-Experiment nicht zwischen der Mauschromosom 11- und 17-Variante diskriminiert werden konnte, wurde ein NM_172792 spezifisches Primerpaar für ein RT-PCR-Experiment generiert. Hierbei befand sich einer der beiden Primer in einer Insertionsregion im Vergleich zur Chromosom 17-Variante (Primerpaar: *LC_Kinase11_a/LC_Kinase11_b*, Abb. 3.8A braune Pfeile). Es zeigte sich ein schwaches aber deutliches Signal in der RT-PCR für die Testis-Gewebe von (*wr/wr*)- und (*+/+*)-Tieren (Abb.3.8C).

Um die Transkriptmengen relativ zueinander zu quantifizieren, wurde ein qRT-PCR-Experiment mit dem gleichen Primerpaar durchgeführt. Hierbei wurden Testis-Erststrang-cDNAs verwendet, die aus einem Pool von je drei (*wr/wr*)- und drei (*+/+*)-Tieren generiert

worden sind. In diesem Versuch zeigte sich nach Normalisierung mit β -actin eine um $1,94 \pm 0,17$ ($n=3$) erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.8D).

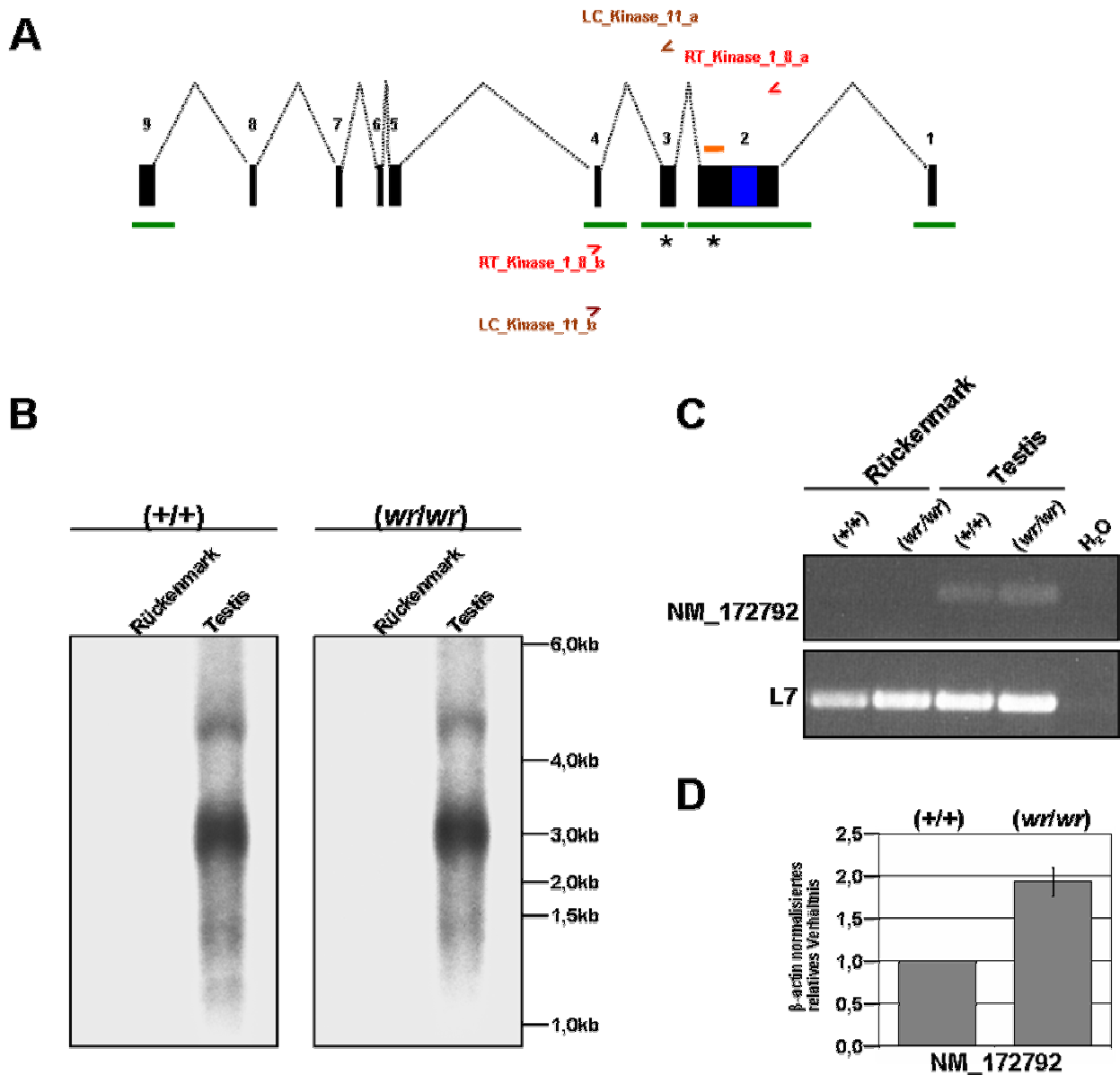


Abbildung 3.8: Vergleichende Sequenzierung und Detektion von erhöhtem Expressionsniveau für NM_172792. **A)** Genstruktur von NM_172792. Grün unterlegte Bereiche sind vergleichend sequenziert worden. Sternchen markieren die beiden, in den Kontrolltieren gefundenen, Transversion A→G (Position 1414 und 1691 in AK030001). Der orange Balken bezeichnet die Position der für die Northern-Blots eingesetzten Sonde (Position 1103-1510 in AK030001). Bindestellen für die RT_Kinase-Primer sind rot, LC_Kinase-Primer braun dargestellt. **B)** Northern-Blot-Experiment. 20 μ g total-RNA wurden über ein 1% Agarose/Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Das DNA-Fragment wurde über PCR generiert und mit 32 P markiert. Die Detektion erfolgte über Röntgenfilm. **C)** RT-PCR Experiment mit NM_172792 spezifischen Primern (LC_Kinase_11_a/LC_Kinase_11_b). Der L7-Ansatz diente als Ladekontrolle. **D)** qRT-PCR-Experiment mit Testis-Erststrang-cDNA von (wr/wr)- und (+/+)-Tieren (gleiches Primerpaar wie in C) verwendet). Mit β -actin normalisierter Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen ($1,94 \pm 0,17$).

3.1.2.3 Gene-Targeting von *NM_172792*

Die hier vorliegenden Ergebnisse der Sequenzierungen und Expressionstudien können *NM_172792* nicht als Wobbler-Kandidat ausschließen. Die fehlende Detektion der Expression im Rückenmark, dem pathologischen Gewebe des neuronalen Phänotyps, könnte ein Problem der in diesem Gewebe zu geringen Transkriptabundanz sein, oder der pleiotrope Wobbler-Phänotyp könnte durch zwei unterschiedliche Gene verursacht werden, wobei *NM_172792* für den Testis-Phänotyp verantwortlich sein könnte.

3.1.2.3.1 Vektorkonstruktion

Um aufzuklären, ob *NM_172792* an der Wobbler-Pathogenese beteiligt ist, wurde ein Vektor für ein Gene-Targeting-Experiment konstruiert, mit dem Ziel, *NM_172792*-defiziente Mäuse zu erzeugen. Mit der hier gewählten Strategie soll gleichzeitig eine *LacZ*-Reporter-kassette das offene Leseraster ersetzen, um einen Monitor für die Expression von *NM_172792* in Geweben von (+/*NM_172792*^{*LacZ*}) oder (*NM_172792*^{*LacZ*} /*NM_172792*^{*LacZ*}) Mäusen zu haben. Es wurde ein kombinierter Ansatz aus drei loxP-Elementen, einer Resistenzkassette und dem *LacZ*-Reportergen gewählt. Die loxP-Elemente können von der lokusspezifischen Cre-Rekombinase erkannt werden. Die 34bp langen loxP-Elemente bestehen aus zwei 13bp langen *inverted repeats*, die durch eine 8bp lange *spacer* Sequenz voneinander getrennt werden. Der *spacer* gibt die Orientierung des loxP-Elementes an. Sind nun zwei loxP-Elemente gleicher Orientierung chromosomal lokalisiert, so katalysiert Cre den Rekombinationsprozess zwischen den beiden Elementen und das Ergebnis ist die Deletion der zwischen den beiden loxP-Elementen liegenden Sequenz. Durch die Kombination von drei Elementen in der Reihenfolge loxP-*LacZ*-loxP-*neo*-loxP können so drei verschiedene Allele erzeugt werden: loxP-*LacZ*-loxP, loxP und loxP-*neo*-loxP. Hierbei kann man entweder in ES-Zellen transient die Cre-Rekombinase exprimieren lassen und detektiert den gewünschten Allelstatus, oder man kreuzt die aus den ES-Zellen resultierende Maus mit einer Cre-exprimierenden Maus und überprüft die Nachkommen auf ihren Allelstatus und verwendet die gewünschte Kombination für weitere Experimente.

Da kein geeignetes Vektorrückgrat für dieses Experiment zur Verfügung stand, wurde dieses zuerst hergestellt. Zunächst wurde aus dem pRSV-*LacZ*II-Vektor (Hall et al., 1983) das *LacZ*-Gen über die Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Bam*HI ausgeschnitten und in den zuvor mit den gleichen Enzymen geöffneten Kloniervektor pBluescript (Stratagene)

ligiert. Hierbei entstand der als pBS-*LacZ* bezeichnete Vektor. Aus dem pTV-0 Vektor (C. Birchmeier, MDC Berlin) wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I die Neomycin-Resistenzkassette, die von zwei loxP-Elementen flankiert war, ausgeschnitten und in den zuvor mit den gleichen Enzymen geöffneten pBS-*LacZ* ligiert. Die Neomycin-Resistenzkassette wurde komplett sequenziert (Primer: Neoseq1, Neoseq2, Neoseq3 und Neoseq4) und wies keinerlei Mutationen auf (Daten nicht gezeigt). Um das dritte loxP-Element einzufügen ist ein Oligonukleotidlinker verwendet worden. Es wurden zwei komplementäre Oligonukleotide konstruiert, die sowohl das loxP-Element, als auch zusätzliche Schnittstellen, die spätere Klonierungen erleichtern sollten, enthielten (Linker_P_a/Linker_P_b). Nach Hybridisierung beider Oligonukleotide und Inkubation mit der Polynukleotidkinase entstanden passende Überhänge, die die Klonierung in den pBS-*LacZ-neo*-Vektor erlaubten. So konnte dieser über *Apa*I und *Hind*III geöffnet werden und der Linker in den Vektor ligiert werden. Durch Sequenzieren wurde das korrekte Ligationereignis verifiziert (Abb. 3.9A). Die komplette Sequenz des entstandenen pBS-*LacZ-neo*-link-Vektors befindet sich im Anhang 6.2.3.

Um den Targeting-Vektor fertig zu stellen, wurden die beiden flankierenden homologen Arme eingefügt. Hierzu wurde zunächst stromaufwärts und stromabwärts des Exon2 mit chimären Primern, die Restriktionsschnittstellen enthielten, zwei genomische Bereiche mittels PCR amplifiziert und in den pCR4-TOPO Vektor kloniert. Das stromaufwärts gelegene Fragment besaß eine Länge von 3509bp und enthielt flankierend die Schnittstellen für *Apa*I und *Nhe*I (Primerpaar: Kin_up_a/Kin_up_b). Das stromabwärts gelegene Fragment erstreckte sich über 3501bp (Primerpaar: Kin_down_a/Kin_down_b) und enthielt die Schnittstellen für *Not*I und *Sac*II (Abb. 3.9b, oben). Da auch in den zu Exon2 homologen Bereichen auf Mausechromosom 17 eine hohe Sequenzübereinstimmung zu den hier amplifizierten Sequenzen zu beobachten war, und die verwendeten Primer auch Chromosom17 Fragmente amplifizieren konnten, wurden Chromosom 11 tragende Klone über Restriktionsschnittstellen identifiziert. Sequenzanalysen mit dem *Webcutter* (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>) zeigten Unterschiede in der Abfolge der Restriktionsschnittstellen gegenüber der Chromosom 17-Sequenz, so dass eine Identifikation über das Spaltmuster möglich war (Daten nicht gezeigt). Die zur Chromosom 11-Region homologen Klone wurden über die mitgebrachten Restriktionsschnittstellen aus dem pCR4-TOPO Vektor ausgeschnitten und nacheinander in das oben beschriebene Vektorrückgrat kloniert. Somit ergab sich der fertige Targeting-Vektor wie in Abbildung 3.9B Mitte beschrieben.

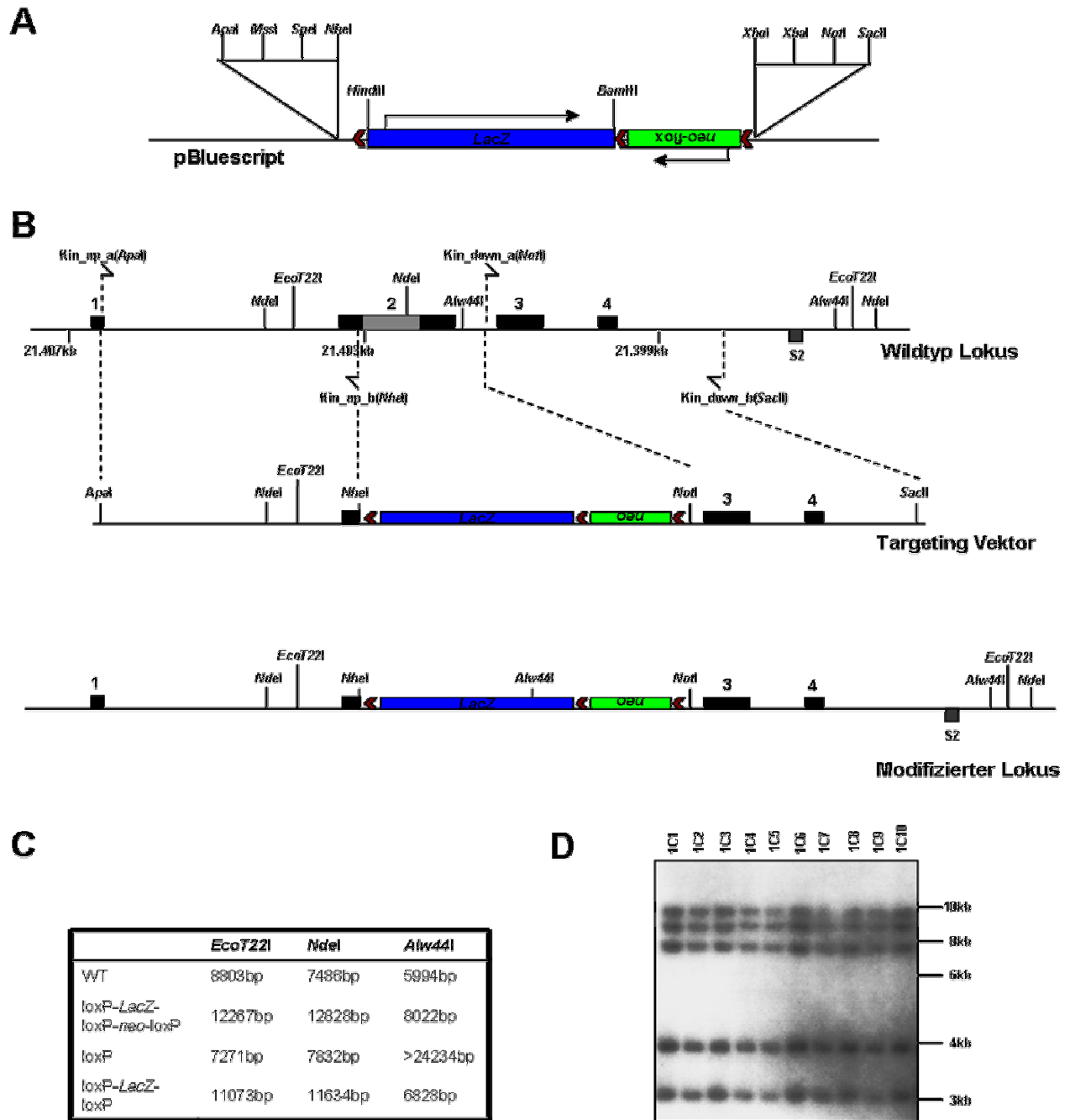


Abbildung 3.9: Vektorkonstruktion und Targeting-Strategie für *NM_172792* in ES-Zellen. A) Konstruktion des Vektorrückgrates. Die *LacZ*-Kassette ist blau, die *Neomycin*-Resistenzkassette grün dargestellt. Braune Pfeile markieren Position und Orientierung der loxP-Elemente. Die Richtung der offenen Leseraster der Kassetten ist durch schwarze Pfeile dargestellt. **B)** Der Wildtyp-Lokus ist oben, der Targeting-Vektor in der Mitte und der modifizierte Locus ist unten dargestellt. Lage und Orientierung der verwendeten Primer sind durch schwarze Pfeile markiert. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Der schwarze Kasten unterhalb der Region gibt die Lage der als Sonde S2 verwendeten DNA-Sequenz an. **C)** Entstehende Fragmentgrößen bei Verwendung der Sonde S2 und unterschiedlicher Restriktionsenzyme für die Detektion des Allelstatus. **D)** Repräsentatives Southern-Blot-Experiment mit *NdeI* gespaltener genomischer DNA aus ES-Zellen nach Elektroporation des Targeting-Vektors und Selektion auf G418. Neben der Wildtyp-Bande von 7,5kb sind noch Nebenbanden zu beobachten. Das gewünschte Targeting-Ereignis konnte nicht detektiert werden.

Um später im Southern-Blot-Experiment das richtige Rekombinationsereignis detektieren zu können, musste noch eine spezifische Sonde etabliert werden. Mit der DNA-Sonde S2 (schwarzer Kasten, Abb. 3.9B, unten) konnte eine Sequenz identifiziert werden, die im Southern-Blot-Experiment nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym *NdeI* die Wildtyp-Bande von 7,5kb (Abb. 3.9C) detektieren konnte. Die beobachteten Nebenbanden (Abb. 3.9d) von etwa 10kb, 9kb 4kb und 3kb konnten durch Sequenz- und Restriktionsschnittstellenvergleiche repetitiven Sequenzen auf dem Mauschromosom 17 (NCBI Build33, May 2004 Assembly) zugeordnet werden. Für diesen Versuch ließ sich keine spezifischere Sondensequenz oder Schnittstellenkombination finden, so dass bei Hybridisierungen stets auch die Nebenbanden entstehen. Dennoch kann man davon ausgehen ein positives Integrationsereignis aufgrund des Bandenmusters detektieren zu können.

3.1.2.3.2 Einbringen des Targeting Vektors in ES-Zellen

Der Targeting-Vektor wurde über die Restriktionsschnittstellen *Apal* und *SacII* gespalten und je 20µg aufgereinigter Spaltungsansatz mehrfach in $1-2 \times 10^7$ ES-Zellen (TBV 129) elektroporiert. Nach Selektion mit dem Antibiotikum G418 wurden insgesamt 768 Klone gepickt. Nach dem Splitten wurde die DNA aus den ES-Zellen extrahiert und mit dem Restriktionsenzym *NdeI* gespalten. Die gespaltene DNA wurde über ein 1% Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente mit dem Kapillarblot-Verfahren auf eine Membran übertragen. Die Southern-Blots wurden mit der radioaktiv markierten S2-Sonde inkubiert und anschließend gewaschen. Nach Exposition auf einem Röntgenfilm konnten die markierten Banden sichtbar gemacht werden. Unter den 768 getesteten Klonen konnte kein Rekombinationsereignis, was einer Bandengröße von 12,8kb entspricht, detektiert werden (Abb. 3.9D).

3.1.3 Einengung des *wr*-kritischen Bereichs

Durch das in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Rekombinations-Screening konnte der *wr*-kritische Bereich zwischen den beiden Markern *147N22rev* und *Murr1* lokalisiert werden (Fuchs 2001). Hierfür wurden heterozygote C57BL6/J (*wr/+*)-Mäuse mit *Mus musculus castaneus* Wildtyp-Tieren verpaart. Heterozygote Träger des *wr*-Allels wurden durch Diagnostik und Testverpaarungen für das weitere Screening ausgesucht und miteinander verpaart. Die F2-Nachkommen wurden anschließend mittels polymorphen genetischen Markern auf ihren Allelstatus getestet und der Phänotyp bezüglich der *wobbler*-Mutation ausgewertet und gegebenenfalls mit F1- oder F2-Tieren gekreuzt. So konnten sowohl phänotypisch gesunde, als auch kranke Tiere analysiert werden. Durch diese als F2F3-Rekombinations-Screening bezeichnete Strategie, können bei verhältnismässig geringem Tierverbrauch Rekombinationsereignisse identifiziert werden, die den *wr*-kritischen Bereich weiter einengen können (Schmitt-John et al., 1999).

In der von Melanie Kuhlmann betreuten Rekombinations-Zucht sind mehrere rekombinante Tiere auffällig geworden. Im Rahmen dieser Arbeit sind neue polymorphe Marker zwischen dem Stamm *Mus musculus* C57BL6/J und *Mus musculus castaneus* generiert und rekombinante Tiere ausgewertet worden.

Durch den Einsatz von etablierten und neu identifizierten polymorphen Markern, wurden die DNAs rekombinanter Tiere untersucht. Es konnten zwei Rekombinationsbruchpunkte zwischen den Markern *BAC147N22rev* und *D11Ing53* (Martin Augustin, Ingenium Pharmaceuticals, pers. Mitteilung) bestimmt werden (Abb. 3.10D, grau schattiert). Trotz mehrerer Versuche ließen sich die Bruchpunkte nicht genauer auflösen. Der Marker *BAC147N22rev* bleibt deshalb als proximal flankierender Marker für das *wr*-kritische Intervall bestehen (Abb. 3.10D).

Auf der distalen Seite konnten mehrere rekombinante Tiere für den Marker *Murr1* identifiziert werden. So konnten für sechs Tiere die Rekombinationsbruchpunkte zwischen den Markern *KiaaS3/S5* und *Murr1* bestimmt werden. Ein Tier wurde gefunden dessen Rekombinationsbruchpunkt zwischen den Markern *Mor_int2* und *BAC123J24for* lag. Um den Bruchpunkt höher aufzulösen mussten neue polymorphe Marker etabliert werden.

Hierzu wurden Primerpaare in intronischen Bereichen flankierend von Repeatregionen gelegt und DNA-Fragmente von C57BL6/J und Cast/Ei amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen inkubiert und die

Spaltmuster beider Produkte verglichen. So konnte im Intron10 von *Homoloc13* ein 1481bp großes Fragment (Position: 21611010-21612489, NCBI33 Assembly, May2004; Primerpaar: Homint10_a/Homint10_b) von beiden Stämmen amplifiziert werden, das nach einer Spaltung mit dem Restriktionsenzym *AluI* Unterschiede im Spaltmuster aufwies. So ließen sich im Agarosegel Banden von ca. 500bp, 400bp und eine weitere kleinere Bande, die im Falle des Cast/Ei Stammes eine Größe von 270bp und im C57Bl6 Stamm 240bp aufwies, detektieren (Abb. 3.10A). Ein weiterer Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) konnte im Intron17 von *Homoloc13* gefunden werden (Position: 21791726-21793249, NCBI33 Assembly, May2004; Primerpaar: Homint17_a/Homint17_b). Das 1524bp große PCR-Produkt ließ sich mit dem Restriktionsenzym *AluI* in ein ca. 800bp, 400bp und weitere kleinere Fragmente spalten. Das von Cast/Ei amplifizierte und *AluI*-gespaltene PCR-Produkt zeigte im Vergleich zur C57Bl6/J Bande von 400bp ein um etwa 30bp längeres Fragment (Abb. 3.10B). Im Intron14 von *Homoloc13* konnte ein 304bp Fragment amplifiziert werden (Position: 21720649-21720952, NCBI33 Assembly, May2004; Primerpaar: Homint14_e/Homint14_f), welches nach Sequenzierung amplifizierter Fragmente von beiden Stämmen Unterschiede aufwies. So ließen sich zwei Transversionen (137T→C und 244A→G) durch den Vergleich beider Sequenzen identifizieren (Abb. 3.10C).

Durch die drei hier etablierten polymorphen Markern konnte der distale Bruchpunkt zwischen Intron10 und 14 im Gen *Homoloc13* kartiert werden (Abb. 3.10D, grau schattiert). Somit ergibt sich ein neues *wr*-kritisches Intervall für die flankierenden Marker *BAC147N22rev* und *Homint14* von 867651bp (NCBI33 Assembly, May2004), gegenüber der zuvor festgestellten Kandidatengenregion von 2024505bp (siehe 3.1 und Fuchs 2001). Die neu generierten Marker wurden unter den Namen D11HJK26-30 in der Mouse Genome Database abgelegt (<http://www.informatics.jax.org/mgihome//submissions/submit.shtml>).

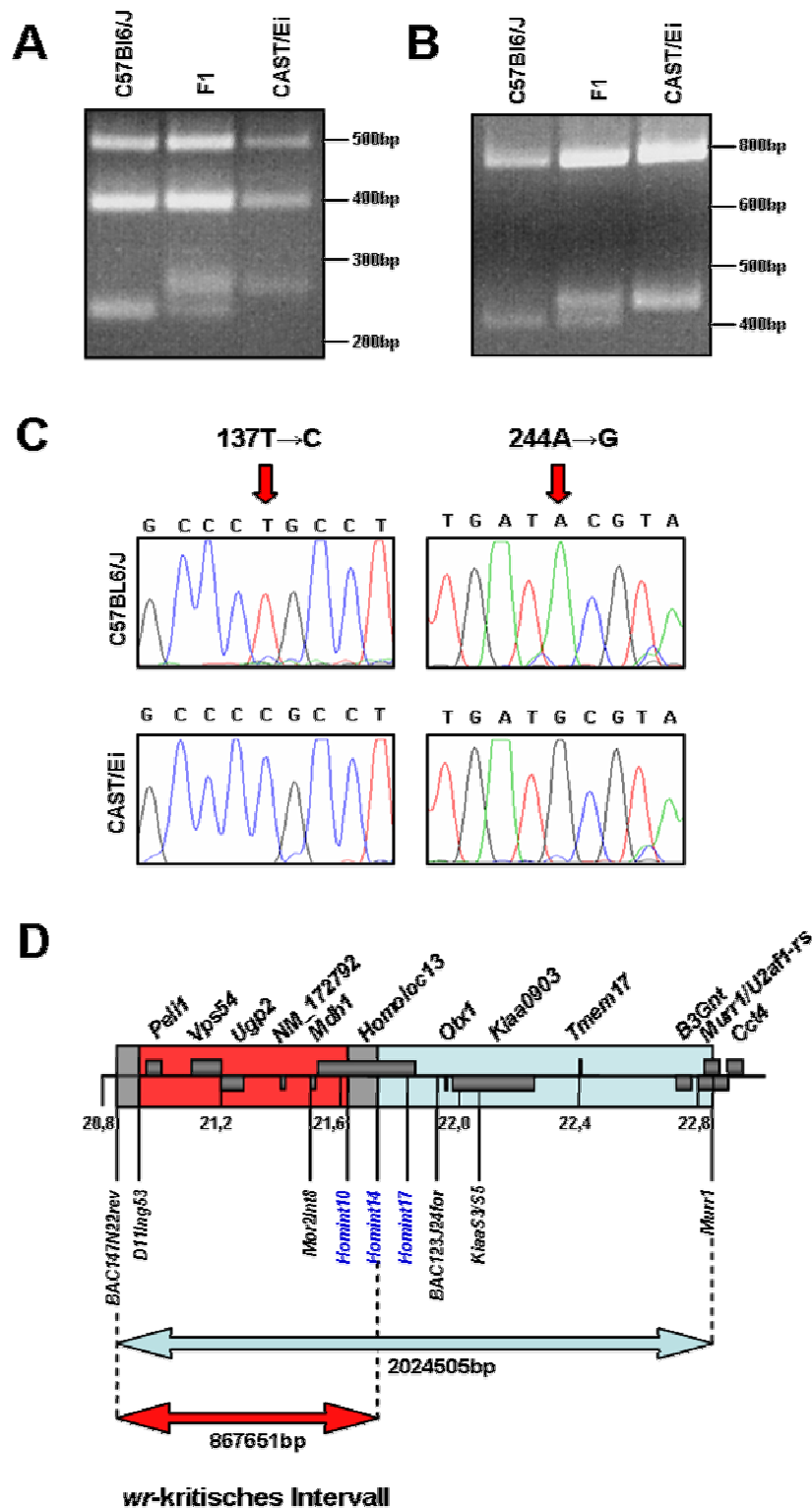


Abbildung 3.10: Neue polymorphe Marker und Einengung des wr-kritischen Intervalls. **A)** RFLP in Intron10 von *Homoloc13*. Ein PCR-Produkt von 1481bp wurde mit dem Primerpaar Homint10_a/Homint10_b generiert. Nach *AluI* Spaltung ergab sich zwischen beiden Stämmen für ein Fragment eine Differenz von ca. 30bp. **B)** RFLP in Intron17 von *Homoloc13*. Ein PCR-Produkt von 1524bp wurde mit dem Primerpaar Homint17_a/Homint17_b generiert. Nach *AluI* Spaltung ergab sich zwischen beiden Stämmen für ein Fragment eine Differenz von ca. 30bp. **C)** SNPs in Intron14 von *Homoloc13*. Ein PCR-Produkt von 304bp wurde mit dem Primerpaar Homint14_e/Homint14_f generiert. Nach Sequenzieren ließen sich zwei Transversionen (137T→C und 244A→G) zwischen beiden Stämmen detektieren. **D)** Einengung des wr-kritischen Intervalls. Durch die Auswertung der rekombinanten Tiere konnte der wr-kritische Bereich auf 867651bp reduziert werden. Graue Schattierungen geben die Lokalisation von nicht weiter aufgelösten Rekombinationsbruchpunkten an, der hellblaue Pfeil gibt die Kandidatenregion vor dieser Arbeit an, der rote Pfeil den Bereich nach dieser Arbeit.

3.2 *Vps54*

In einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Diplomarbeit wurde eine Punktmutation in der kodierenden Region von *Vps54* durch vergleichende Sequenzierungen detektiert (Hahn 2004). Es handelt sich hierbei um einen *wobbler*-spezifischen Aminosäureaustausch von Glutamin zu Leucin (Abb. 3.11B) im letzten Exon (Exon24, Stern in Abb. 3.11A) der längsten Spleißisoform (*Vps54-1*). Betrachtet man Sequenzen von *Vps54* aus verschiedenen Organismen, so fällt auf dass das Leucin an der entsprechenden Position evolutionär bis zu *Caenorhabditis elegans* hochkonserviert vorliegt (Hahn 2004). In der Hefe fehlt der C-terminale Teil, in dem sich die bei der *Wobbler*-Maus mutierte Aminosäure befindet. *Vps54* ist zumindest in der Hefe für Funktionen im retrograden Vesikeltransport beteiligt ist (Conibear und Stevens, 2000). Es liegt im sogenannten Garp-Komplex mit *Vps53*, und *Vps52*, sowie assoziiert mit *Vps51* und dem t-SNARE *Tlg1* vor (Conibear et al., 2003). Dieser Komplex ist in höheren Organismen noch völlig uncharakterisiert. *Vps54* ist bisher in der Ratte lediglich chromosomal lokalisiert und die cDNA-Sequenz bestimmt worden (Walter et al., 2002). Im weiteren Verlauf sind Untersuchungen durchgeführt worden, um die Punktmutation in *Vps54* als Ursache für den *Wobbler*-Phänotyp zu evaluieren.

3.2.1 Expression von *Vps54*

In der oben genannten Diplomarbeit ist die Genstruktur von *Vps54* bestimmt worden. Das Gen besitzt 24 Exons, wobei 22 proteinkodierend sind (Abb. 3.11A). Es sind mehrere Spleißisoformen detektiert worden. So kann das untranslatierte Exon2 alternativ eingespleißt werden und ein alternativer Spleißakzeptor im Exon4 benutzt werden, der zu einem geringfügig kürzeren Protein führt (965 Aminosäuren, *Vps54-2*, Abb. 3.11B). Weiterhin wurden alternative Transkriptionsstarts gefunden, die mit Exon 20b, entspricht der Spleißisoform *Vps54-3*, bzw. 20c, entspricht der Spleißisoform *Vps54-4*, beginnen (Abb. 3.11B und Hahn 2004). Mittels RT-PCR konnten alle vier *Vps54*-Transkripte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden (Hahn 2004).

Um das Expressionsniveau von *Vps54* zwischen (*wr/wr*) und (+/+) C57BL6-Tieren zu vergleichen, sind Northern-Blot-Experimente durchgeführt worden. Hierzu wurde total-RNA von je drei Tieren aus dem Rückenmark und dem Testis isoliert, vereinigt, über ein Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Membran

übertragen. Mittels PCR ist aus dem 3'UTR von *Vps54* (blauer Balken in Abb. 3.11A) eine 545bp große Sonde amplifiziert (Primerpaar: *Vps54_Sonde_Ex24_a/Vps54_Sonde_Ex24_b*) und mit ^{32}P -radioaktiv markiert worden. Nach Hybridisierung und Detektion ließ sich eine Bande von etwa 4,5kb feststellen (Abb. 3.11C). Diese Größe entspricht den beiden größten Spleißisoformen *Vps54-1* und *Vps54-2*. Die kleineren Banden wurden nicht detektiert. Auch zeigten sich in den Bandenintensitäten deutliche Unterschiede zwischen (+/+)- und (*wr/wr*)-Tieren. So ließen sich deutlich höhere Signalstärken für *Vps54*, sowohl im Rückenmark, als auch im Testis aus Wobbler-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhalten (Abb. 3.11C). Trotz mehrerer Versuche mit unterschiedlicher RNA-Konzentration ließ sich im Northern-Blot-Experiment die kleineren Spleißisoformen in keinem untersuchten Gewebe nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Um weitere Informationen über Expressionsunterschiede von *Vps54* zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren zu bekommen, wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt. Es konnten keine für die Spleißisoformen *Vps54-3* und *Vps54-4* spezifischen Primer generiert werden, so dass mit dem Primerpaar *Vps54_LC1a_b* alle Isoformen und mit den Primerpaaren *Vps54_LC2a_b*, *Vps54_LC3a_b* und *Vps54_LC4a_b* nur spezifisch die langen Spleißisoformen detektiert werden konnten. Generell ließ sich im Vergleich zur Normalisierungskontrolle β -actin ein deutlich höherer Δct -Wert feststellen (Daten nicht gezeigt), was auf ein sehr niedrig exprimiertes Transkript hindeutet. Es zeigte sich mit dem Primerpaar *Vps54_LC1a_b* im Rückenmark (β -actin normalisiert und relativ zum Wildtyp-Expressionsniveau) eine Erhöhung für alle Spleißisoformen um einen Faktor von $2,14 \pm 0,23$ (Abb. 3.11D). Auch die Experimente mit den für die langen Spleißisoformen spezifischen Primerpaaren ließen eine deutliche Erhöhung feststellen (*Vps54_LC2a_b*: $1,96 \pm 0,28$; *Vps54_LC3a_b*: $1,15 \pm 0,07$ und *Vps54_LC4a_b*: $2,24 \pm 0,75$). Aus diesen Ergebnissen lässt sich der Schluß ziehen, dass die gemessene Gesamterhöhung für alle Transkripte offensichtlich auf einer Erhöhung der langen Spleißisoformen zurückzuführen ist, da zumindest mit den Primerpaaren *Vps54_LC2* und *Vps54_LC4* ein ähnlich hohes Expressionsniveau wie für *Vps54_LC1a_b* bestimmt worden ist. Die gleichen Experimente wurden auch mit Testis-Erststrang-cDNA durchgeführt. Hierbei ließen sich auswertbare Signale nur für die Primerpaare *Vps54_LC3a_b* und *Vps54_LC4a_b* erhalten. Für die Primerpaare, die spezifisch für die langen Isoformen waren, konnten so Erhöhungen von $1,15 \pm 0,16$ (*Vps54_LC3a_b*) und $1,44 \pm 0,045$ (*Vps54_LC4a_b*) gemessen werden (Abb. 3.11D). Durch die fehlenden Daten lassen sich hier keinerlei Aussagen über die kurzen Spleißisoformen machen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass zumindest für die langen Spleißisoformen eine Erhöhung der Transkriptmenge in den pathologisch interessanten Geweben der Wobbler-Maus mit zwei unabhängigen Methoden festgestellt worden ist.

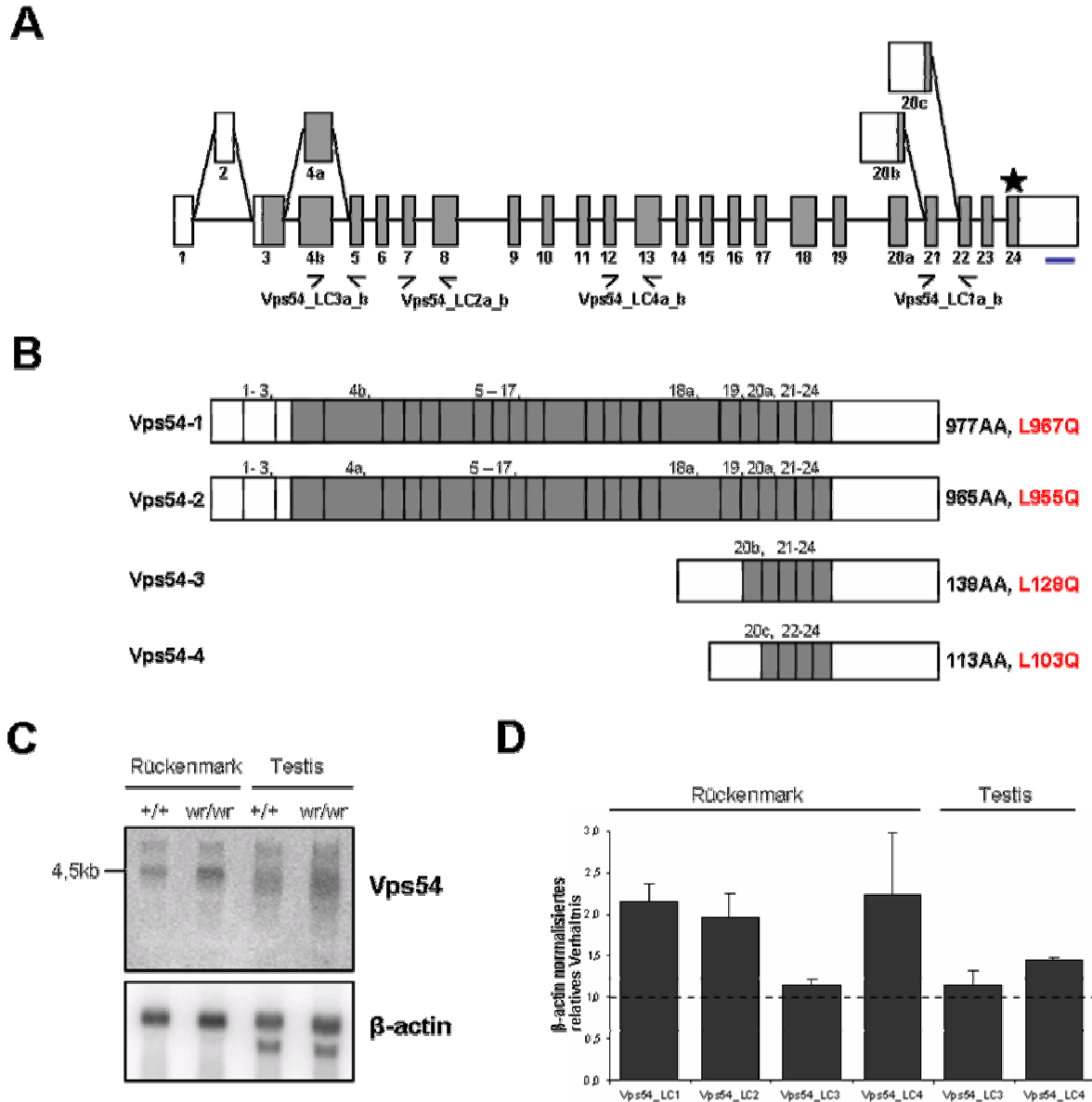


Abbildung 3.11: Genstruktur, Spleißisoformen und Expressionsunterschiede. **A)** Schematische Darstellung der Genstruktur von *Vps54*. Kodierende Bereiche sind grau, untranslatierte Bereiche sind durch helle Kästen symbolisiert. Ein Stern markiert die Position der in Hahn (2004) gefundenen Punktmutation, ein blauer Balken zeigt die Lokalisation der für die Northern-Blot-Experimente verwendeten DNA-Sonde. Kleine schwarze Pfeile geben die Lage und Orientierung der verwendeten Primerpaare an. **B)** Schematische Darstellung der vier möglichen Spleißisoformen. In rot ist die jeweilige Position der Punktmutation für jede Isoform angegeben. **C)** Northern-Blot-Experiment mit den pathologischen Geweben der Wobbler-Maus. 15µg total-RNA aus Rückenmark- und Testis-Geweben von je drei (*wr/wr*)- und drei (*+/+*)-Tieren wurden über ein 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit einer 32 P-markierten für *Vps54*-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung mit einer β -actin-spezifischen Sonde dient als Ladekontrolle. **D)** qRT-PCR-Experiment mit Erststrang-cDNA von je drei (*wr/wr*)- und drei (*+/+*)-Tieren aus Rückenmark und Testis. Der β -actin-normalisierte Mittelwert aus je drei unabhängigen Versuchsreihen ist relativ zum Wildtyp angegeben.

3.2.2 Transgenic Rescue

Um den Nachweis zu erbringen, dass *Vps54* in der Wobbler-Pathologie eine Rolle spielt, kann man in (*wr/wr*)-Tieren die Wildtyp *Vps54*-Variante exprimieren. Bei einer Rettung des Wobbler-Phänotyps könnte man so den Beweis liefern, dass *wr* und *Vps54* allelisch sind. Diese Strategie ist in der Literatur häufig angewendet worden. Erst kürzlich konnte so im Falle der *mnd2*-Maus (*motoneuron degeneration 2*) die Allelie von *Omi*, einer mitochondrialen Protease, und *mnd2* gezeigt werden (Jones et al., 2003). Hierbei sind mittels eines *Omi*-tragenden BACs (*bacterial artificial chromosome*) transgene Tiere erzeugt worden, die in den *mnd2*-Stamm eingekreuzt worden sind und so der Phänotyp der *mnd2*-Tiere kompensiert werden konnte. Für diese Art von Versuchen benutzt man größere genomische Klone, in der Regel BACs, da die Wahrscheinlichkeit, dass alle für die Regulation des untersuchten Gens nötigen Elemente vorhanden sind wesentlich größer ist, als bei kleineren genomischen Klonen oder cDNAs mit einem definiertem Promotor (Heintz 2001). Da es sich bei *Vps54* um ein Gen handelt, bei dem die Regulation unbekannt ist, wurde hier ebenfalls die Strategie der BAC-transgenen Tiere zur Rettung des Wobbler-Phänotyps gewählt.

3.2.2.1 Genomische Sequenzvergleiche des *Vps54*-Lokus

Um die genomische Region, die für dieses Experiment eingesetzt werden sollte näher zu charakterisieren, wurden zuerst Sequenzvergleiche durchgeführt. Es wurden genomische Sequenzen von Maus (NCBI Assembly33, Assembly May 2004, Chr11 Position 21037648-21313905), Mensch (NCBI Assembly35, Assembly May 2004, Chr2 Position 63952223-64236958), Opossum (monDom1 Broad Institute assembly, scaffold15175 Position 1700811-1964183), Hund (canFam1 Broad Institute whole genome shotgun (WGS) assembly v1.0, Assembly July 2004, Chr10 Position 66944245-67130333), Huhn (galGal2 draft assembly Genome Sequencing Center at Washington University School of Medicine, Assembly February 2004, Chr3 Position 7548087-7653130), und Frosch (xenTro1 DOE Joint Genome Institute (JGI) whole genome shotgun october 2004 Assembly version 3.0, scaffold321 Position 797045-943969) mittels VISTA (Mayor et al., 2000) verglichen (Abb. 3.12B). Diese genomischen Bereiche enthielten jeweils die Sequenzen zwischen *Peli1* und *Ugp2*. Die annotierten Exons (hellblaue Bereiche in Abb. 3.12B) stellten sich in den hier untersuchten Organismen als sehr konserviert dar. Stromaufwärts des ersten *Vps54*-Exons gibt es einen Bereich erhöhter Konservierung von etwa 10kb (blaues Oval, Abb.

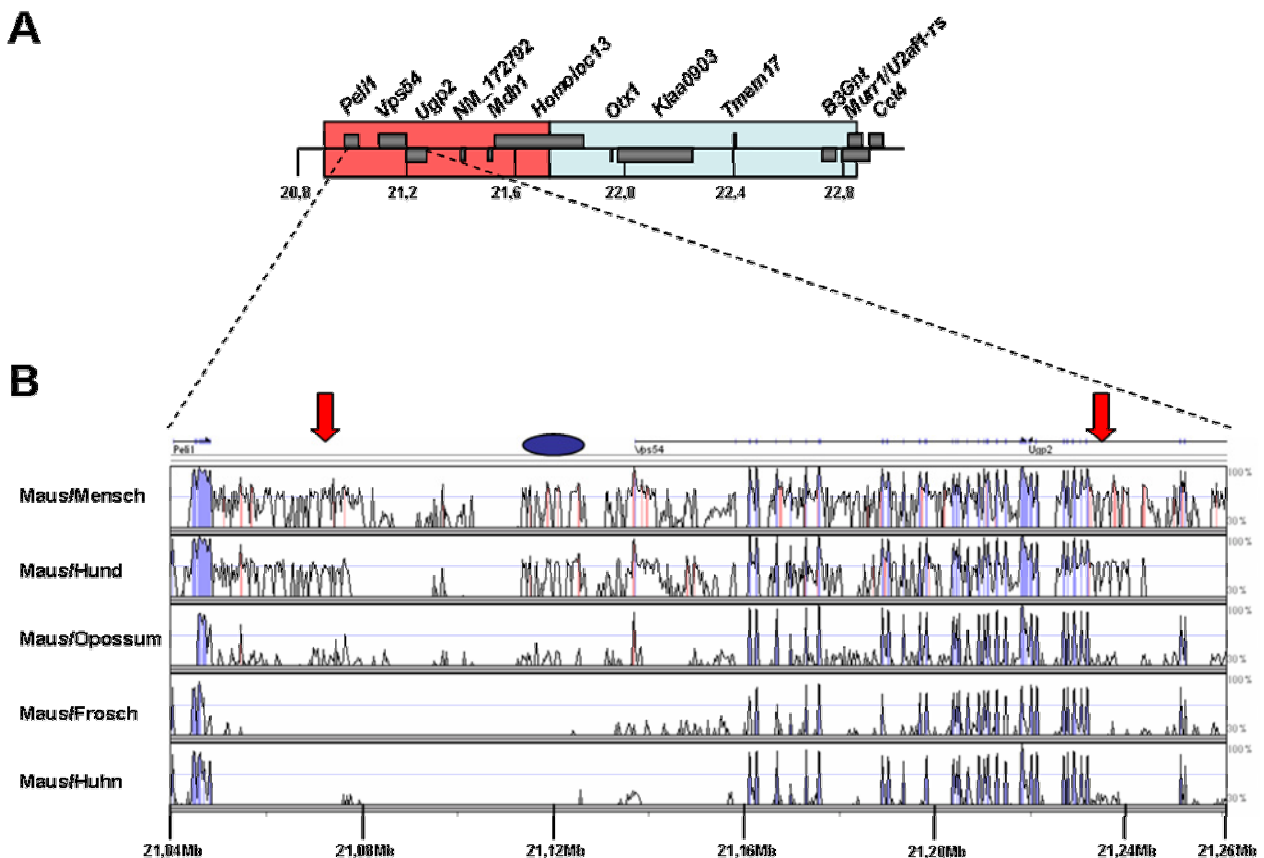


Abbildung 3.12: Genomische Sequenzvergleiche der *Vps54*-Region. **A)** Schematische Darstellung der Kandidatengenregion. Sechs Gene befinden sich im *wr*-kritischen Intervall (rot dargestellt). **B)** Interspezies-Vergleiche von genomischen Sequenzen der Region zwischen *Peli1* und *Ugp2*. VISTA-Alignment-Darstellungen der Vergleiche zwischen Maus (*Mus musculus*) und je Mensch (*Homo sapiens*), Hund (*Canis familiaris*), Opossum (*Monodelphis domestica*), Frosch (*Xenopus tropicalis*) und Huhn (*Gallus gallus*). Sequenzähnlichkeiten zwischen 30 und 100% sind dargestellt. Exonische Bereiche sind hellblau, konservierte nichtkodierende Bereiche rosa eingefärbt. Das blaue Oval gibt die Region mit erhöhter Konservierung stromaufwärts des ersten Exons von *Vps54* an. Die beiden roten Pfeile geben die Positionen der BAC-End-Sequenzen an.

3.11B). Neben den Regionen direkt stromaufwärts des ersten Exons, die wahrscheinlich dem Kernpromotor entsprechen, ist dieser Bereich ein guter Kandidatenbereich für etwaige regulative Elemente. Man kann häufig in solchen nicht-proteinkodierenden konservierten Regionen regulatorische Elemente identifizieren (Loots et al., 2000, Hardison et al., 1997).

Um einen geeigneten genomischen BAC-Klon zu identifizieren, sind BLAST-Sequenzsuchen in öffentlichen Datenbanken durchgeführt worden. Hierbei ließen sich zwei BAC-End-Sequenzen für den RPCI24-BAC115F6 identifizieren, die einen entsprechenden genomischen Bereich überspannten. Das T7-Ende (Genbank Accession AZ750172) ergab einen Treffer in der genomischen Mausechromosom11-Sequenz zwischen den Positionen 21071322bp und 21072060bp, das SP6-Ende (Genbank Accession AZ750166) entsprach der Sequenz zwischen den Positionen 21233942bp und 21234526bp (Abb. 3.12B, rote Pfeile). Der genomische Klon RPCI24-BAC115F6 sollte

daher einen Bereich von 163204bp überspannen und die vollständige genomische Sequenz von *Vps54* enthalten.

3.2.2.2 Charakterisierung des BAC115F6

Der oben beschriebene genomische Klon RPCI24-BAC115F6 ist über das *Children's Hospital Oakland Research Institute*, USA bezogen worden. Kolonien wurden vereinzelt und die BAC-DNA aus zwei unabhängigen Bakterienkolonien isoliert. Die BAC-End-Sequenzen sind bestimmt worden und zeigten eine vollständige Übereinstimmung zu den in den öffentlichen Datenbanken befindlichen Sequenzen AZ750172 und AZ750166 (Daten nicht gezeigt). Zur Herstellung von transgenen Tieren verwendet man in der Regel linearisierte DNA-Fragmente. Um Restriktionsenzyme zu identifizieren, die für die Linearisierung geeignet sind, wurde die Sequenz des Vektorrückgrates pTARBAC (Accession AY487252) und der genomischen Sequenz zwischen den beiden Enden zusammengesetzt, und die Restriktionsschnittstellen virtuell mit `WEBCUTTER` (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>) bestimmt. Hierbei konnte ein Restriktionsenzym (*PvuI*) identifiziert werden, das ausschließlich im Vektorrückgrat an den Positionen 4055 und 8560 schneidet (3.13A) und nicht im genomischen *insert*. Dieses Enzym eignete sich für die Linearisierung des BAC115F6. Um festzustellen, ob das BAC115F6 vollständig ist, oder vielleicht größere interne Deletionen trägt, wurde es mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen inkubiert und die resultierenden Fragmente über ein Pulsfeldgel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei zeigten sich die erwarteten Größen (Abb. 3.13B). So ließ sich bei einer Spaltung mit dem Restriktionsenzym *PvuI* eine Fragmentgröße von ca. 170kb für das genomische *insert* sowie ein Fragment von etwa 4,5kb, welches dem Vektorrückgrat-Fragment entspricht, ermitteln (Abb. 3.13B Pfeil). Spaltungen mit den Enzymen *NotI*, *EcoRI* und *BamHI* ergaben die erwarteten Bandengrößen, so dass man davon ausgehen kann, dass das BAC115F6 vollständig und ohne größere Deletionen den *Vps54*-Lokus beinhaltet.

Um später transgene Tiere identifizieren zu können, musste eine PCR-Diagnostik etabliert werden. Hierzu wurde jeweils ein Primer in die Vektorsequenz gelegt, der entsprechende Rückprimer war komplementär zu der genomischen Sequenz im *insert* (Abb. 3.13A). So konnte für die SP6-Seite des BAC115F6 ein Primerpaar (SP6/BAC115_SP6) etabliert werden, das in Gegenwart des BAC115F6 eine Fragmentgröße von 490bp ergab (Abb. 3.13C, oben).

Ebenso konnte für das zweite BAC-Ende eine Diagnostik etabliert werden. Das T7-Ende konnte mit dem Primerpaar T7/BAC115_T7 detektiert werden (Abb. 3.13C, unten). Hier gab es keine Kreuzreaktionen mit genomischer DNA. Da nun eine PCR-Diagnostik zu Verfügung stand, und mit *PvuII* eine Restriktionsendonuklease gefunden werden konnte, die das BAC115F6 nur im Vektorrückgrat schneidet und somit der *Vps54*-Lokus vollständig erhalten bleibt, konnte dieser genomische Klon für die Erzeugung von transgenen Tieren eingesetzt werden.

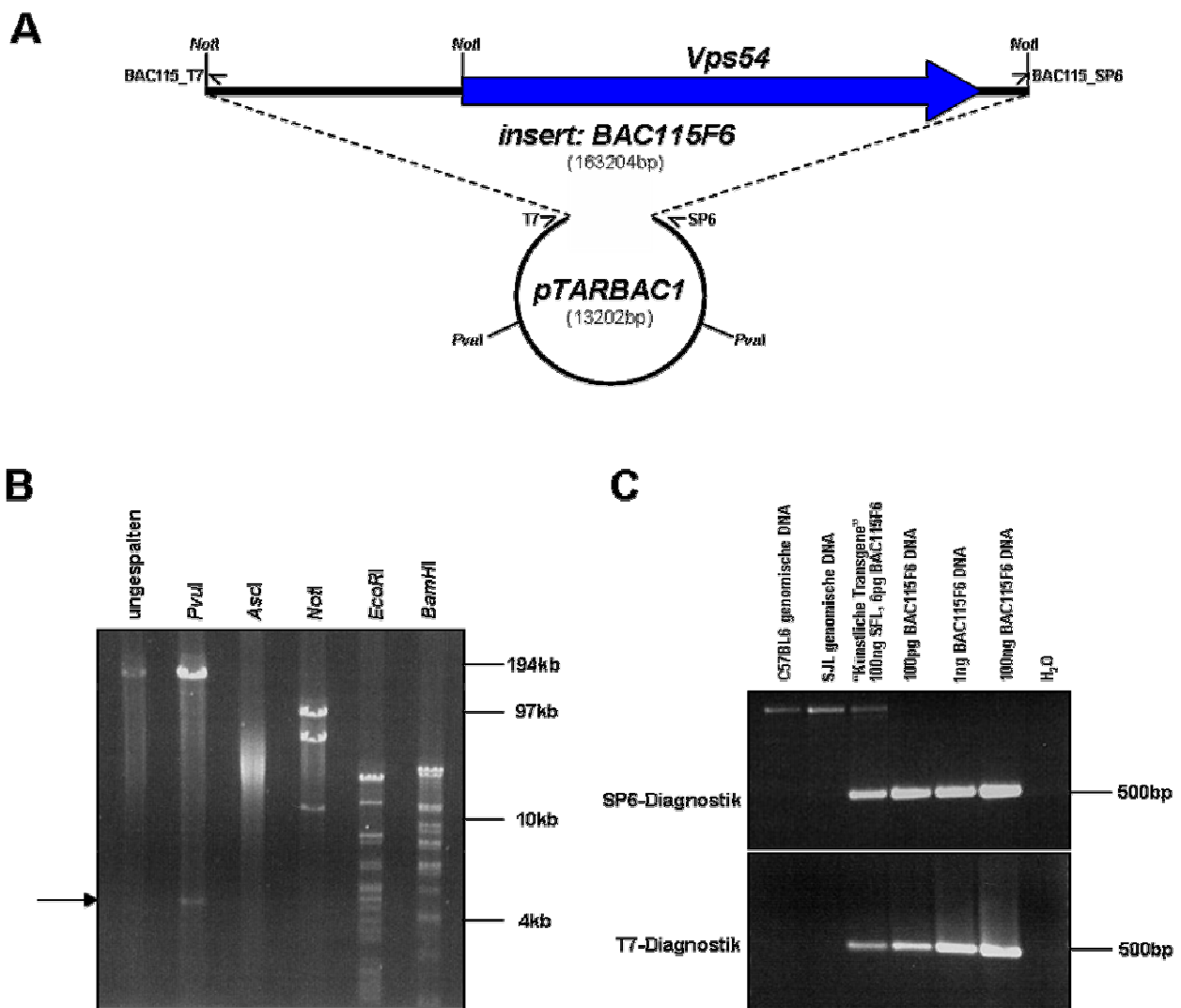


Abbildung 3.13: Charakterisierung des BAC115F6. **A)** Schematische Darstellung des BAC115F6. Der *Vps54*-Lokus ist mit 163kb repräsentiert, davon 63kb stromaufwärts- und 18kb stromabwärts-Sequenzen. Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Kleine schwarze Pfeile geben die Positionen der verwendeten Primer an. **B)** Gelelektrophoretische Auftrennung von BAC115F6-Fragmenten. 5µg BAC-DNA wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym über Nacht inkubiert und die Fragmente über ein 1%FastLane Agarose/0,5xTBE Gel in der Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt. Der Pfeil gibt das Vektorrückgrat-Fragment bei einer Spaltung mit *PvuII* an. **C)** PCR-Diagnostik für die BAC-Enden des BAC115F6. PCRs wurden bei 58°C Annealing-Temperatur unter Standardbedingungen durchgeführt. SP6-Diagnostik (Primerpaar: SP6/BAC115_SP6) und T7-Diagnostik (Primerpaar: T7/BAC115_T7) zeigten nur in Gegenwart des BAC115F6 die gewünschte Bande. Die „Künstliche Transgene“ ist eine Mischung von 100ng SJL-genomischer DNA und 6pg BAC115F6 DNA, was einem *single-copy* transgen entspricht.

3.2.2.3 Rettung des Wobbler-Phänotyps

Das BAC115F6 ist zu unseren Kooperationspartnern (Dr. M. Meisler, Institute of Human Genetics, Ann Arbor, Michigan, USA) geschickt worden. Dort wurde die DNA aus den Bakterien isoliert, mit *PvuII* gespalten und nach Gelaufreinigung in die Vorkerne befruchteter Eizellen von miteinander verpaarten Mäusen der Stämme SJL und C57BL6 injiziert. Die Nachkommen wurden mit der unter 3.2.2.2 etablierten Diagnostik getestet und fünf Männchen wurden ausgewählt, die positiv für beide BAC-Enden waren. Die anschließenden Verpaarungen der Tiere erfolgten in Bielefeld. Die BAC115F6-transgenen Tiere wurden mit heterozygoten (*wr/+*)-Weibchen verpaart. Unter den F1-Nachkommen wurden die Tiere ausgesucht, die sowohl beide BAC-Enden trugen, als auch heterozygot für das *wr*-Allel waren. Diese wurden anschließend miteinander verpaart. In der F2-Generation wurde dann nach BAC115F6-tragenden (*wr/wr*)-Tieren gesucht und im Vergleich zu den Wurfgeschwistern und Wildtypen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die BAC115F6-transgenen Wobbler-Tiere phänotypisch dem Wildtyp entsprachen (Abb. 3.14). Es zeigten sich weder die Wobbler-typischen neurologischen Defekte, noch die Rundkopfspermien (Mussmann, laufende Dissertation). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der BAC115F6 beide Phänotypen der Wobbler-Maus kompensieren kann und

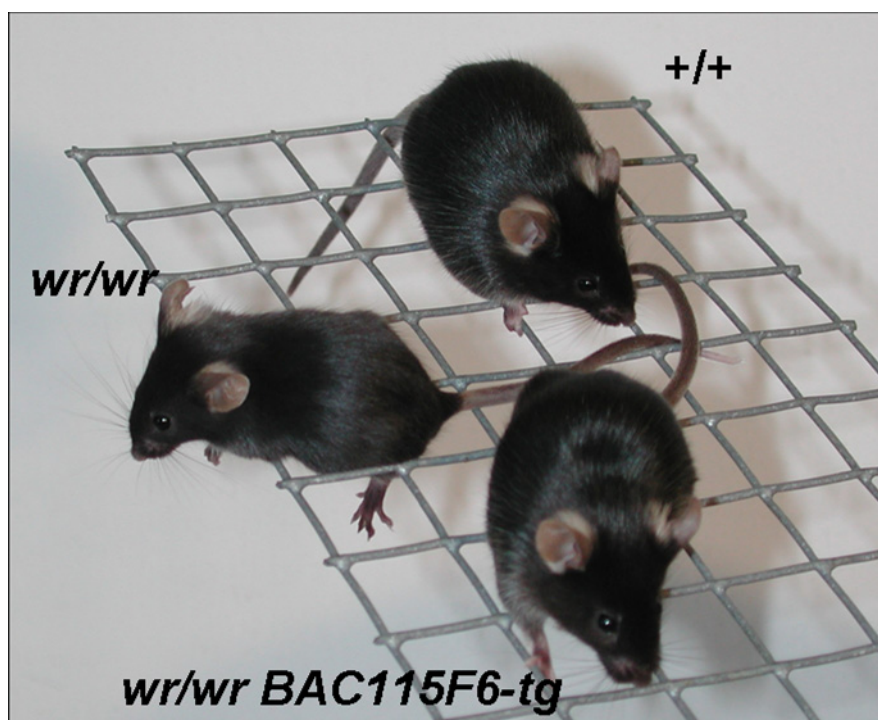


Abbildung 3.14: BAC-transgene Rettung des Wobbler-Phänotyps Das (*wr/wr*)-Tier ohne den *Vps54*-BAC115F6 (links) zeigt die Wobbler-typischen Symptome und kann sich nicht auf dem Gitter halten. Das (*wr/wr*)-Tier mit dem BAC115F6 (unten) ist phänotypisch ein Wildtyp (oben).

somit der formale Beweis erbracht worden ist, dass der Wobbler-*Vps54*-Lokus ursächlich für die Wobbler-Pathologie ist.

3.2.3 Charakterisierung der BayGenomics *Vps54*-Trap-Linie

Einer unserer Kooperationspartner (Dr. Andreas Lengeling, Abteilung für Infektionsgenetik, GBF Braunschweig) konnte die ES-Zelllinie RRI497 (Stamm129/Ola) in der BayGenomics Datenbank (BayGenomics, San Francisco, USA; (Stryke et al. 2003)) mittels der vollen cDNA Sequenz von *Vps54* identifizieren. Diese Zelllinie trägt einen β -geo *gene-trap* Vektor, der in den *Vps54*-Lokus (*Vps54*^{gt(pGT10)2841Ucd}) in das Intron5, zwischen Exon5 und 6 integriert ist. Die RRI497-ES-Zelllinie wurde von BayGenomics bezogen und an der GBF expandiert. Durch Mikroinjektion von diesen ES-Zellen in CB20-Blastozysten und Transfer in pseudo-schwangere Tiere, wurden chimäre Mäuse erzeugt. Nur Mäuse mit einem hohen Chimäritätsgrad, identifiziert durch die Fellfarbe, wurden in Bielefeld weiter bearbeitet. In Bielefeld wurde mit der Zucht dieser chimären Tiere mit C57BL/6J und (*wr/+*) Weibchen begonnen (Mußmann, laufende Dissertation). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Insertionsstelle der Trap-Kassette kloniert und eine Diagnostik für die laufende Mauszucht etabliert.

Mittels LacZ-spezifischer Primer (Primerpaar lacZ-F2/lacZ-R1) wurde aus der laufenden Zucht ein Tier ausgewählt, welches den integrierten *gene-trap* Vektor trug. Aus diesem Tier wurde genomische DNA extrahiert. Da von BayGenomics die genaue Insertionsstelle generell nicht charakterisiert wird, sondern über eine RACE-Reaktion die korrekten Spleißereignisse und die stromaufwärts gelegenden Exon-Sequenzen bestimmt werden, wurde versucht die Insertionsstelle in der genomischen Sequenz über PCR-Produkte zu klonieren. Mit den Primern Trap_Neu_2a/PCR_Mut_5b (Abb. 3.15A, schwarze Pfeile) konnte ein Primerpaar etabliert werden, welches ein ca. 950bp großes Fragment amplifizierte, das die Insertionsstelle überspannte. Das PCR-Produkt wurde in den pCR4-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Eine Analyse der resultierenden Sequenzen zeigte die genaue Insertionsstelle. 369bp stromabwärts des fünften Exons ist der Trap-Vektor pGT0lxf integriert. Die ersten 21bp der von BayGenomics gelieferten Vektor-Sequenz fehlen im *Vps54*-Lokus (genaue Sequenz des Insertionsereignisses im Anhang).

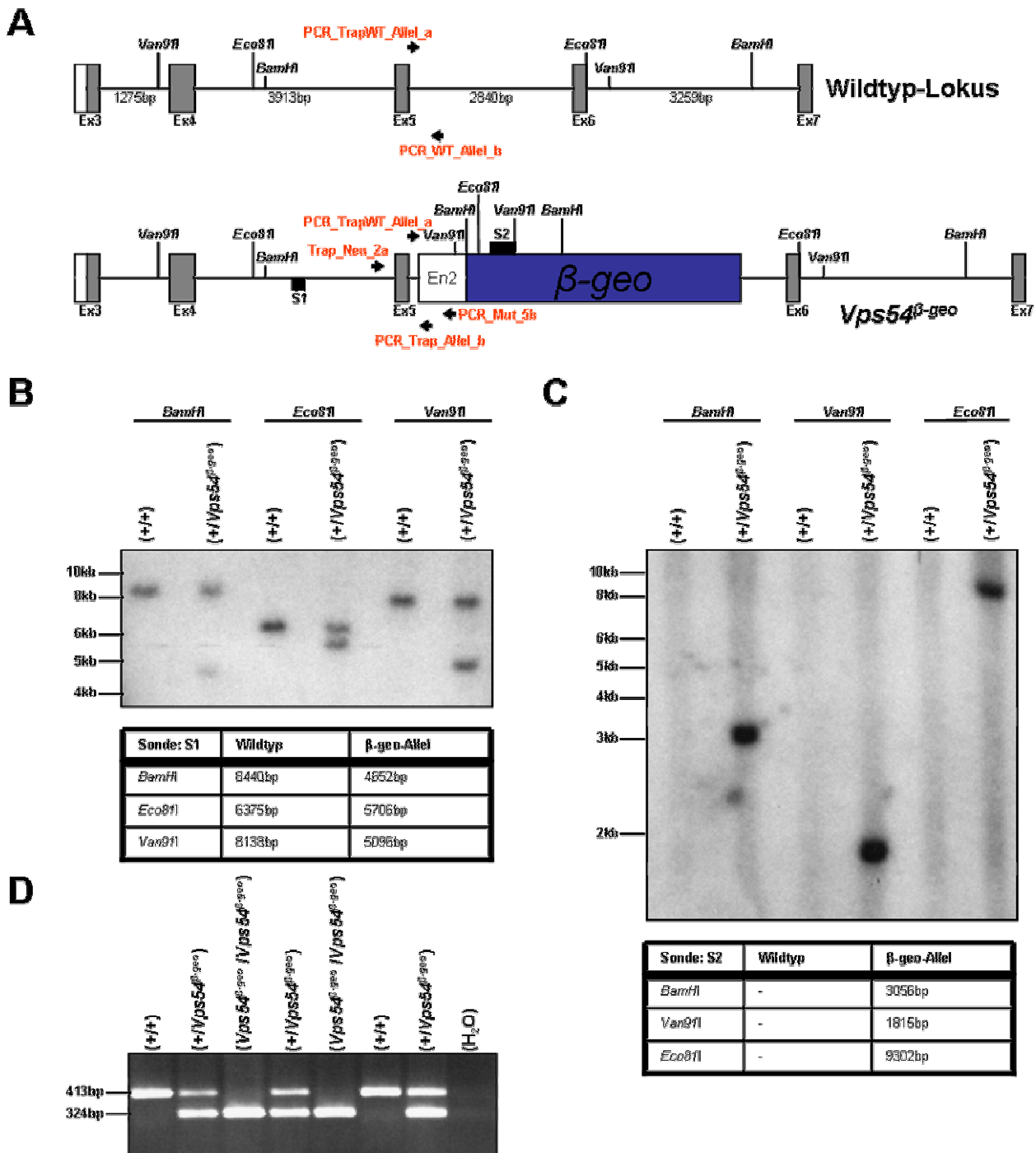


Abbildung 3.15: Charakterisierung des BayGenomics $Vps54^{\beta-geo}$ -Allels und Entwicklung einer Diagnostik. A) Der Wildtyp ist oben und der $Vps54^{\beta-geo}$ -Lokus ist unten dargestellt. Die Regionen zwischen Exon3 und Exon7 (graue Kästen) sind schematisch gezeigt. Die Positionen von verwendeten Primern sind durch schwarze Pfeile, die Positionen der DNA-Sonden durch schwarze Kästen markiert. Die β -geo-Kassette (ca. 8650bp) und die Exons sind nicht maßstabsgetreu dargestellt (En2 entspricht Enolase Intron). **B)** Southern-Blot-Diagnostik zur Detektion des $Vps54^{\beta-geo}$ -Allels. 10 μ g genomische DNA sind mit dem entsprechenden Restriktionsenzym über Nacht inkubiert und über ein 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt worden. Nach Transfer auf eine Membran wurde mit der 32 P radioaktiv markierten Sonde S1 inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen Röntgenfilm. Unten sind die erwarteten Fragmentgrößen aufgelistet. **C)** Die pGT01x-Trap-Kassette ist nur einmal im Genom vorhanden. Gleicher Southern-Blot wie unter B), inkubiert mit der radioaktiv markierten Sonde S2. Unten sind die erwarteten Fragmentgrößen aufgelistet. **D)** PCR-Diagnostik des Wildtyp- und $Vps54^{\beta-geo}$ -Allels unter Verwendung der Primer PCR_TrapWT_Allel_a/PCR_WT_Allel_b/PCR_Trap_Allel_b aus der laufenden Zucht.

Die genomischen Sequenzen wurden mit dem `WEBCUTTER` (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>) auf Restriktionsschnittstellen untersucht. Drei Restriktionsendonukleasen konnten identifiziert werden, die bei Verwendung der DNA-Sonde S1 (Primerpaar: Trap_S1_a/Trap_S1_b) im Southern-Blot-Experiment deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Vps54* ^{β -geo}-Allel ergaben (Abb. 3.15B). So eignen sich sowohl *Bam*HI und *Eco*81I, als auch *Van*91I zu Diagnose des *Vps54* ^{β -geo}-Allels im Southern-Blot-Experiment.

Da es möglich war, dass mehr als eine Trap-Vektor-Kassette in das Genom integriert war, wurde ein Southern-Blot-Experiment mit der Sonde S2 (Primerpaar: lacZ-F2/lacZ-R1) durchgeführt. Diese DNA-Sonde war spezifisch für die LacZ-Kassette des Trap-Vektors. Hierbei zeigten sich die erwarteten Fragmentgrößen (Abb. 3.15C, unten) für das *Vps54* ^{β -geo}-Allel. Da jeweils nur eine Fragmentgröße in allen drei Restriktionspaltungsansätzen detektiert worden ist, kann man davon ausgehen, dass nur eine Trap-Kassette ins Genom der RRI497-Zelllinie integriert ist.

Desweiteren konnte eine PCR mit drei Primern etabliert werden, die zwischen beiden Allelen diskriminieren kann. Der erste Primer (PCR_TrapWT_Allel_a) ist stromaufwärts des Exon5 im Intron4 lokalisiert. Der Rückprimer für das Wildtyp-Allel (PCR_WT_Allel_b) liegt im Intron5, der für das Trap-Allel spezifische Rückprimer (PCR_Trap_Allel_b) bindet am Anfang des Trap-Vektors (Abb. 3.15A, unten). So amplifiziert das Paar PCR_TrapWT_Allel_a/PCR_WT_Allel_b ein 413bp großes Fragment in Gegenwart des Wildtyp-Allels. Die Kombination PCR_TrapWT_Allel_a/PCR_Trap_Allel_b amplifiziert dagegen ein 324bp großes Fragment. In der Abbildung 3.15D ist als Beispiel der Einsatz dieser Diagnostik in der laufenden Zucht gezeigt. Die detaillierte Charakterisierung der resultierenden Mäuse wird in der laufenden Dissertation von Anke Mussmann bearbeitet.

3.2.4 Interaktionspartner von Vps54

Um die Richtung einer funktionalen Analyse der detektierten Punktmutation einzuschlagen, bietet es sich an nach Interaktionspartnern zu suchen, die eventuell an der Wobbler-Pathogenese beteiligt sein könnten. Es wäre denkbar, dass der Aminosäureaustausch ein noch unbekanntes Bindemotiv beeinflusst oder zerstört, so dass *in vivo* eine in der Spermiogenese oder in neuronalen Geweben wichtige Interaktion von *Vps54* mit einem Interaktionspartner mit einer geringeren Effizienz im Vergleich zum Wildtyp-Fall stattfindet.

3.2.4.1 Yeast Two-Hybrid Screening

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zuerst nach möglichen Interaktionspartnern von Vps54 gesucht. Interspezies Sequenzanalysen der Aminosäuresequenz von Vps54 zeigten eine konservierte *coiled-coil*-Domäne (Abb. 3.16A, grüner Kasten) und ein *Dileucin*-Motiv (Abb.3.16A, schwarzer Balken). Neben diesen beiden Charakteristika konnten keine weiteren konservierten Domänen oder Motive mit SMART und PFAM bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Für ein Yeast Two-Hybrid Screening ist die vollständige cDNA-Sequenz von Vps54 zu lang. Außerdem würde man durch die *coiled-coil*-Domäne, als Proteininteraktionsdomäne, eine Vielzahl von Proteinen identifizieren, die ebenfalls eine *coiled-coil* Domäne besitzen, aber wahrscheinlich in der Wobbler-Pathologie keine Rolle spielen. Es wurde daher nur der für die Wobbler-Mutation relevante C-terminale Teil von Vps54 für den Yeast Two-Hybrid Screen eingesetzt.

Hierzu ist ein Teil der proteinkodierenden Wildtyp-cDNA-Sequenz von Vps54, welcher den Aminosäureposition 805-977 entspricht, mit chimären Primern, die am 5'-Ende Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen besaßen (Primerpaar: Y2H-C-Vps54_a/Y2H-C-Vps54_b), mittels PCR amplifiziert und über die mitgebrachten Schnittstellen in den Vektor pGBT9 (BD Bioscience Clontech) kloniert worden. Das korrekte Vektorkonstrukt ist durch Sequenzieren verifiziert worden (Primer: Gal4-BD_a und Gal4-BD_b). Von diesem Vektor konnte somit ein Fusionsprotein exprimiert werden, das aus der Gal4-Bindedomäne und dem C-terminalen Teil von Vps54 bestand. Der Hefestamm AH109 ist mit diesem Plasmid transformiert worden und mit dem prätransformierten Stamm Y187, der eine adulte Maushirn Matchmaker cDNA Bibliothek trug (BD Bioscience Clontech), basierend auf dem pACT2-Plasmid mit Gal4-Aktivierungsdomäne, fusioniert worden. Ein Teil des Fusionsansatzes wurde auf QDO-Selektionsplatten (je 200µl pro Platte), der Rest auf TDO-Selektionsplatten ausplattiert. 11 Kolonien konnten auf QDO-Platten und mehrere hundert Kolonien auf TDO-Platten erhalten werden. Nach Überimpfen der 11 auf QDO- und 122 der größten TDO-Kolonien auf frische QDO-Platten, wurden β -Gal Filter Lift Assays (Hefe Protokoll Handbuch, BD Bioscience Clontech) durchgeführt. Von den 11 QDO-Kolonien zeigten 10 eine positive Interaktion, für die 122 TDO-Kolonien konnten 56 deutlich positive Interaktionen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Plasmide wurden aus den diploiden Kolonien isoliert, anschließend der *E. coli* Stamm JQ101 (auxotroph für Leucin) mit den Plasmidextrakten transformiert und auf Selektionsplatten ausgebracht. Restriktionsspaltungen und Kolonie-PCRs (Primerpaar: 5'AD_LD_ins/3'AD_LD_ins)

identifizierten Kolonien, die ein Bibliotheksplasmid trugen. Aus den Bakterien wurden die Bibliotheksplasmide isoliert und sequenziert (Primer: Gal4_AD_seq). Sequenzen sind aus insgesamt 41 Kolonien erhalten worden (Abb. 3.16B).

Die Sequenzierungen identifizierten 17 unabhängige Gene als mögliche Interaktionspartner für Vps54 (Abb. 3.16B). Von den 17 Interaktionspartnern sind elf

A



B

Accession Nummer	Gen	Beschreibung/Synonyme	Chr. Position	Klon-Nummern
BC004592	<i>Pksp4</i>	Plakophilin4	2 / 59.2	1
BC058623	<i>Dnm</i>	Dynamin1	2 / 32.2	7, 107
BC068172	<i>Blsp2</i>	Phakinin, intermediate filament	9 / 108.3	116
BC048718	<i>Q80ZM0</i>	AAI107703, weakly similar to heavy chain myosin nonmuscle	9 / 102.5	80, 117
AF408398	<i>Zf</i>	zhangfei transcriptionfactor, HCF-1	7 / 77.7	q5, q6, q8, 4, 5, 20, 22, 25, 35, 47, 74, 90, 92, 112, 119, 120
XM_142154	<i>Q8BUY8</i>	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2	X / 125.8	12
BC053000	<i>Golga4</i>	tGolgin-1, Golgin-245	9 / 118.5	2
BC016687	<i>Dab2</i>	Disabled homolog 2 (DOC-2)	15 / 6.1	29
AK082817	<i>NM_175245</i>	hypothetical 79aa arginine-rich protein	14 / 91.3	q1, q9, 31, 46, 104, 111
NM_013790	<i>Abcc5</i>	ATP binding cassette CFTR sub-family C (CFTRMRP)	16 / 20.1	4
NM_021494	<i>Rab6ip1</i>	Rab6 interacting protein 1	7 / 97.2	6
AK012085	<i>Dmap1</i>	DNA methyltransferase 1-associated protein 1	4 / 116.0	q11
NM_011245	<i>Rasgff1</i>	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor	9 / 89.7	q2
NM_015814	<i>Dkk3</i>	Dickkopf related protein-3 precursor	7 / 99.4	q7
NM_011991	<i>Cops3</i>	COP3 (constitutive photomorphogenic), subunit 3	11 / 59.4	81, 113
L27220	<i>ina</i>	Alpha-internexin (Alpha-Inx) [86 kDa neurofilament protein]	19 / 46.4	105, 110
NM_024225	<i>Sm5</i>	Sorting nexin 5	2 / 144.0	23

Abbildung 3.16: Yeast Two-Hybrid Screening für den C-terminalen Teil von Vps54. **A)** Domänenstruktur der längsten Spleißisoform von Vps54 (Vps54-1). In grün ist die Position der *coiled-coil* Domäne, in schwarz die Position des *Dileucin*-Motivs dargestellt. In rot ist die Domäne mit den letzten 173 Aminosäuren markiert, die für den Yeast Two-Hybrid Screen eingesetzt worden ist. **B)** Klonliste der Interaktionspartner. Neben der Genbank Accession Nummer, der offiziellen Ensembl Gen-Bezeichnung und einer Kurzbeschreibung aus Ensembl- oder Genbank-Einträgen, ist die chromosomale Lokalisation im Mausgenom im Format Chromosom/Position in Mb, angegeben.

(*Pkp4*, *Bfsp2*, *Q8BUY8*, *Golga4*, *Dab2*, *Abcc5*, *Rab6ip1*, *Dmap1*, *Rasgrf1*, *Dkk3*, *Snx5*) nur einmal gefunden worden. Zweimal sind *Dnm*, *Q80ZM0*, *Cops3* und *Ina* als Bindepertner identifiziert worden. Deutlich öfter sind Interaktionen mit *NM_175245* (sechs) und *Zf* (16) festgestellt worden (Sequenzen repräsentativer Klone im Anhang 6.5).

3.2.4.2 Kartierungen der Bindedomäne in Vps54

Um festzustellen in welchem Bereich der jeweilige Interaktionspartner in der C-terminalen Domäne des Vps54-Proteins bindet, wurde eine Strategie mit Deletionskonstrukten gewählt. Hierzu wurden DNA-Fragmente kloniert, die den letzten 72 Aminosäuren (Primerpaar: *Vps54_C_t_2/Y2H-C-Vps54_b*) und den letzten 38 Aminosäuren (Primerpaar: *Vps54_C_t_3/Y2H-C-Vps54_b*) des Vps54-Proteins entsprachen (Abb. 3.17A). Die Fragmente wurden von Erstrang-cDNA aus (+/+)- und (*wr/wr*)-Tieren amplifiziert und über die mitgebrachten Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Sall* in den pGBT9-Vektor (BD Bioscience Clontech) kloniert. Die Vektorkonstrukte wurden über Sequenzierungen verifiziert. Von den entsprechenden Plasmiden konnten so Fusionsproteine bestehend aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und den Wildtyp-, beziehungsweise den Wobbler-Vps54-Fragmenten exprimiert werden.

Die Plasmidsuspensionen (ca. 5µg Gesamtplasmid) aus dem jeweiligen Vps54-Konstrukt (173WT, 173WR, 72WT, 72WR, 38WT, 38WR und pGBT9-Leervektor) und je einem Interaktionspartner (siehe 3.2.4.1) wurden in den Hefestamm AH109 kotransformiert und auf SD-Leu/-Trp-Selektionsplatten (DDO) ausgebracht. Einzelkolonien wurden in DDO-Flüssigmedium über Nacht inkubiert und je 15µl der Kultur auf DDO-, TDO- und QDO-Selektionsplatten aufgetropft. Nach zwei Tagen Inkubationsdauer bei 30°C wurde das Wachstum der Hefen bewertet (Abb. 3.17B). Das Bibliotheksplasmid komplementiert die Leucin-Auxotrophie, das Köderplasmid die Tryptophan-Auxotrophie des AH109-Stamms. Bei Interaktionen der beiden Fusionsproteine, dem Köder- und dem Bibliotheksprotein, konnte, je nach Interaktionsstärke der beiden Fusionsproteine, Wachstum auf TDO (SD-Leu/-Trp/-His) und QDO (SD-Leu/-Trp/-His/-Ade) beobachtet werden.

Hierbei zeigte sich auf den DDO-Kontrollplatten (Abb. 3.17B) deutliches Wachstum bei allen Kombinationen, so dass man davon ausgehen konnte, dass alle für diesen Versuch eingesetzten Kolonien beide Plasmide trugen (Rohdaten im Anhang 6.6).

Starke Interaktionen konnten für alle Bindepartner mit dem 173WT-Konstrukt festgestellt werden. Hier ließ sich Wachstum sowohl auf TDO-, als auch auf QDO-Selektionsplatten für alle Interaktionspartner, bis auf Dnm, feststellen. Die Kombination 173WT/Dnm konnte nicht auf QDO-Selektionsplatten wachsen (Abb. 3.17B).

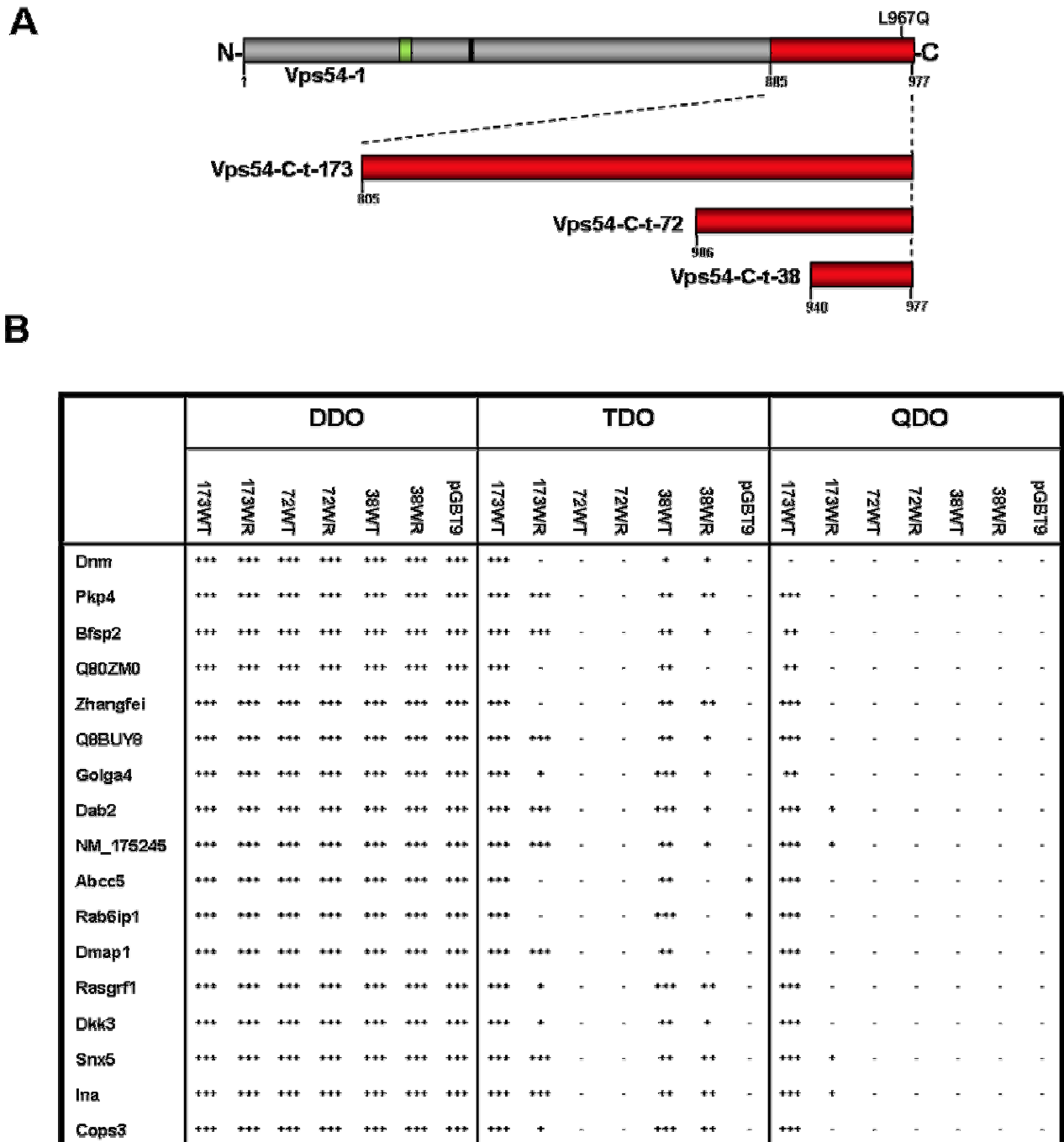


Abbildung 3.17: Kartierung der Bindedomäne in Vps54 für die identifizierten Interaktionspartner. A) Domänenstruktur der längsten Spleißisoform von Vps54 (Vps54-1). In grün ist die Position der *coiled-coil* Domäne, in schwarz die Position des *Dileucin*-Motivs dargestellt. In rot sind die C-terminalen Deletionskonstrukte dargestellt. **B)** Interaktionsstärke der Vps54-Deletionskonstrukte mit den identifizierten Interaktionspartnern. Kotransformationen der Vps54-Deletionskonstrukte und der Interaktionspartner wurden auf Selektionsplatten ausgebracht und das Wachstum bewertet. (+++ sehr starke Interaktion, ++ starke Interaktion, + geringe Interaktion, - keine Interaktion)

Acht Kombinationen der Kotransformationen des 173-WR-Konstruktes mit den jeweiligen Interaktionspartnern konnten auf TDO-Selektionsplatten wachsen (Pkp4, Bfsp2, Q8BUY8, Dab2, NM_175245, Dmap1, Snx5 und Ina). Vier Kombinationen mit 173WR zeigten auf TDO-Selektionsplatten schwächere Interaktionen (Golga4, Rasgrf1, Dkk3, Cops3), und für fünf weitere Bindepartner konnte kein Wachstum festgestellt werden (Dnm, Q80ZM0, Zhangfei, Abbc5, Rab6ip1). Auf QDO-Selektionsplatten war ein schwaches Wachstum für Hefen mit 173WR und je Dab2, NM_175245, Snx5 und Ina zu beobachten. Alle anderen 173WR Kotransformanten zeigten kein Wachstum auf den stringenten QDO-Selektionsplatten (Abb. 3.17B).

Für die Kombinationen 72WT- bzw. 72WR-Köderplasmid mit allen Interaktionspartnern konnte kein Wachstum auf TDO- oder QDO-Selektionsplatten festgestellt werden. Für die kleinsten Fragmente, 38WT bzw. 38WR ließ sich Wachstum nur auf TDO-Selektionsplatten feststellen. Je nach Bindepartner ergab sich eine unterschiedliche Stärke in der Interaktion der 38WT- und 38WR-Konstrukte. Generell war die Interaktion im Fall des 38WR-Konstruktes auf TDO-Selektionsplatten deutlich schlechter im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt (Abb. 3.17B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass offensichtlich für eine starke Interaktion das komplette C-terminale Fragment von 173 Aminosäuren nötig ist, da kein Wachstum der 38 Aminosäuren-Deletionskonstrukte auf QDO-Selektionsplatten beobachtet worden ist. Das fehlende Wachstum der 72WT- und 72WR-Konstrukte könnte an einer möglichen Fehlfaltung des Fusionsproteins liegen.

3.2.4.3 Vergleich der Bindungsstärke von Wobbler- und Wildtyp-Vps54

Um die deutlich schwächere Interaktionsstärke der Wobbler-Vps54-Variante mit den potentiellen Bindepartnern gegenüber dem Wildtyp zu quantifizieren, wurden Flüssig- β -Galactosidase Assays mit dem künstlichen Substrat ONPG (o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) durchgeführt (Hefe Protokoll Handbuch, BD Bioscience Clontech). Hierbei misst man den Umsatz des Substrats ONPGs zu o-nitrophenol (gelb) und D-galactose photometrisch bei 420nm und kalkuliert die Miller-Einheit, die als die β -Galactosidase-Aktivität definiert ist, welche 1 μ mol ONPG zu o-nitrophenol und D-galactose pro Minute und pro Zelle umsetzt (Hefe Protokoll Handbuch, BD Bioscience Clontech). Diese Reaktion wird durch die β -Galactosidase katalysiert, deren Expression

nur bei Interaktionen der beiden Bindepartner im Yeast Two-Hybrid Versuch stattfindet. Die Miller-Einheiten stellen somit ein Maß der Interaktionsstärke dar.

Für diesen Versuch wurden sechs Interaktionspartner ausgewählt (Snx5, Dnm, Ina, Zhangfei, Golga4 und Q8BUY8). Kostransformationen wurden in dem Hefestamm AH109 mit je der Wobbler- und Wildtyp-Variante (173WR und 173WT) durchgeführt und auf DDO-Selektionsplatten ausgebracht. Je drei Einzelkolonien wurden pro Ansatz über Nacht in SD-Leu/-Trp Flüssigmedium inkubiert und auf Selektionsplatten aufgetropft und das Wachstum bewertet (Abb. 3.18A). Pro Flüssigkulturansatz wurden drei technische Replikate, wie beschrieben (Hefe Protokoll Handbuch, BD Bioscience Clontech), für das Flüssig- β -Galactosidase Assay prozessiert. Nach Messung der OD_{420} wurden die Miller-Einheiten für jeden Ansatz bestimmt und die Mittelwerte der Replikate ermittelt (Abb. 3.18B). Hierbei liessen sich die beobachteten Tendenzen aus den Wachstumstests (Abb. 3.18A) reproduzieren. Die Wobbler-Vps54-Variante mit den jeweiligen Interaktionspartnern zeigte gegenüber der Wildtyp-Variante deutlich schwächere Werte (Abb. 3.18B). Unter den sechs hier getesteten Interaktionen ergaben sich die deutlichsten Unterschiede für Ina (ca. 3,75-fach höhere Werte für 173WT im Vergleich zu 173WR), Zhangfei (ca. 3,00-fach), und Snx5 (ca. 2,20-fach). Weniger deutliche Unterschiede ergaben sich für Golga4 (ca. 1,66-fach), Q8BUY8 (ca. 1,50-fach) und Dnm (ca. 1,35-fach).

Durch die hier durchgeführte Versuchsreihe konnten mögliche Interaktionspartner von Vps54 identifiziert werden, die zumindest im Yeast Two-Hybrid System, durch Auswertung von Wachstumstests und kolorimetrischer Quantifizierung, deutliche Unterschiede in der Interaktionsstärke der Wobbler- und der Wildtyp-Variante des C-terminalen Teils von Vps54 mit den jeweiligen Bindepartnern gezeigt haben.

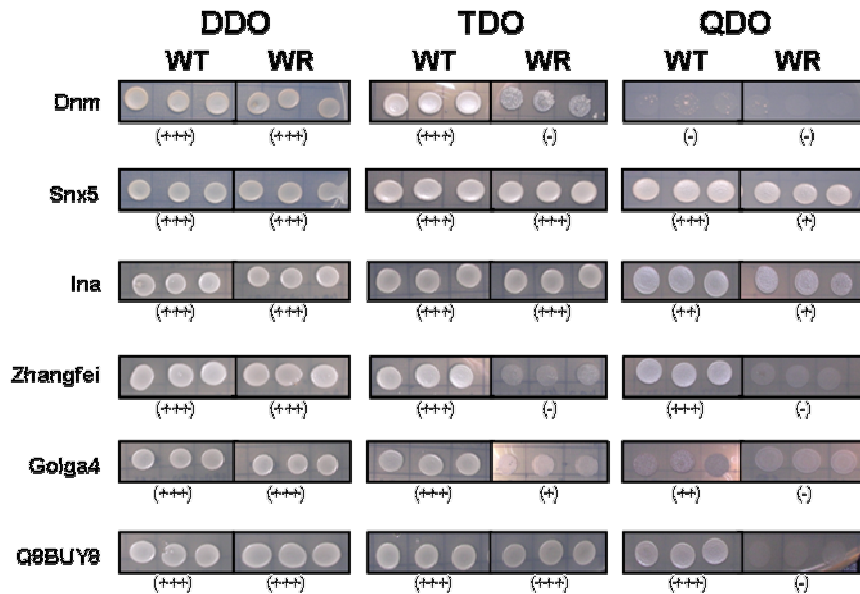
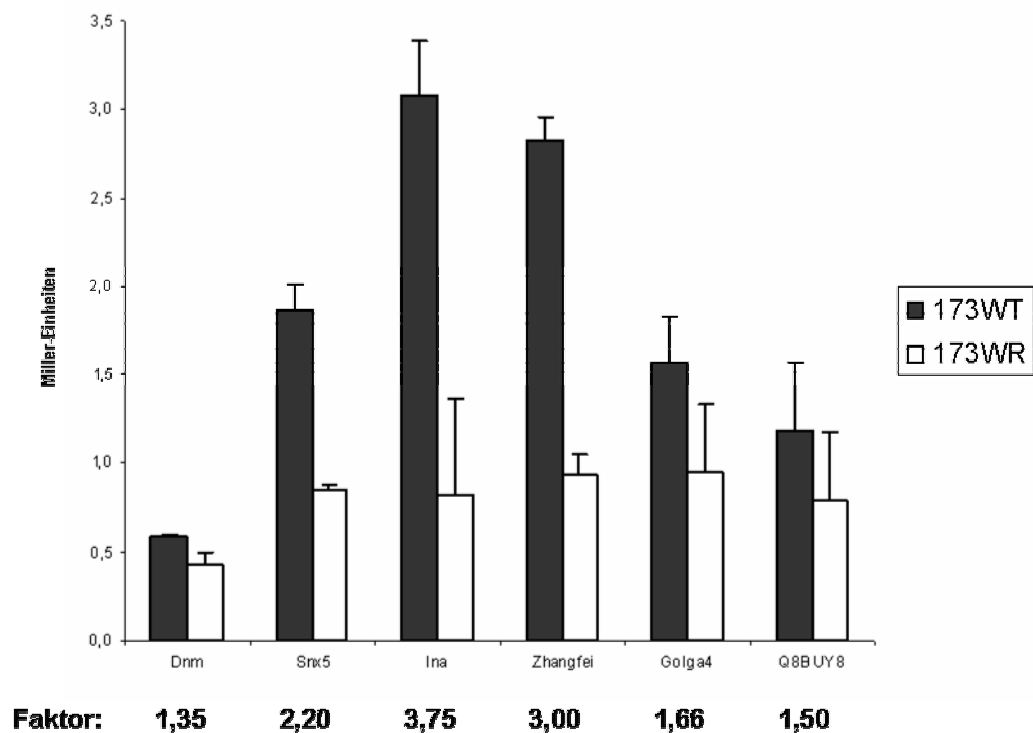
A**B**

Abbildung 3.18: Vergleich der Interaktionsstärke des Wobbler- und Wildtyp-Vps54-C-terminalen Fragmentes mit ausgewählten potentiellen Interaktionspartnern. A) Wachstum der Hefen mit Vps54 und den potentiellen Interaktionspartnern im Yeast Two-Hybrid System. Der AH109 Hefestamm wurde mit den 173WT- oder 173WR-Konstrukten und den Interaktionspartnern kotransformiert, auf Selektionsplatten ausgebracht und das Wachstum bewertet. (+++ sehr starke Interaktion, ++ starke Interaktion, + geringe Interaktion, - keine Interaktion). **B)** Quantifizierung der Interaktionsstärke im Yeast Two-Hybrid System. ONPG Flüssig-Assays wurden für je drei unabhängige Klone und je drei technische Replikate durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt. Messwerte sind in Miller-Einheiten (β -Galactosidase-Aktivität pro Minute und Zelle) angegeben. Die Faktoren geben das Verhältnis der Miller-Einheiten der 173WT- zu den 173WR-Konstrukten für die gemessenen Interaktionsstärken an.

3.3 Vergleichende Transkriptomanalyse zwischen Wildtyp- und Wobbler-Tieren

Um mehr über die molekularen Ursachen der Neurodegeneration bei Wobbler-Tieren zu lernen, wurden Expressionsuntersuchungen durchgeführt. Hierbei können Gene identifiziert werden, die in der Wobbler-Pathologie eventuell eine Rolle spielen. Diese Untersuchungen können helfen den Einfluss der in *Vps54* detektierten Punktmutation auf die progressiv verlaufende Erkrankung des Nervensystems zu verstehen.

3.3.1 Expressionsuntersuchungen mittels Microarray

In einem ersten Ansatz wurden Microarray-Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde Rückenmark aus je zehn ca. 49 Tage alten (± 3 Tage) (*wr/wr*)- und (*+/+*)-Tieren präpariert. Die total-RNA wurde aus dem Rückenmark extrahiert und lyophilisiert. Die Proben wurden anschließend an unseren Kooperationspartner für die Durchführung des Microarray-Experimentes geschickt.

An der GSF am Institut für Experimentelle Genetik in Neuherberg, wurden diese Versuche in der Gruppe von Dr. Johannes Beckers durch Marion Horsch durchgeführt. Hierbei wurden die Hybridisierungen auf einem in der Arbeitsgruppe entwickelten Chip durchgeführt. Es handelte sich um ein Microarray, das die gespotteten PCR-Produkte des *arrayTAG 20k clone sets* (Lion Bioscience) enthielt (Drobyshev et al., 2003). Von den Proben sind Mischungen der zehn (*+/+*)-total-RNAs, was dem Referenz-Ansatz entspricht, und je vier total-RNAs aus (*wr/wr*)-Tieren, was den beiden Proben-Ansätzen (*wr-pool1* und *wr-pool2*) entspricht, hergestellt worden. Je 20 μ g der Mischungen wurden für die Reverse Transkription und Markierung mit Cy3 und Cy5 Fluoreszenz-Farbstoff nach dem TIGR-Protokoll (*The Institute for Genomic Research*, Hedge et al., 2000) für ein *dual-colour*-Experiment eingesetzt. Hybridisierungen, Waschschritte und Datenaufnahme wurden wie in Beckers et al. (2005) beschrieben, durchgeführt.

Es wurden zwei Hybridisierungen mit dem *wr-pool1* und zwei mit dem *wr-pool2* gegen den Referenz-Ansatz, sowie Wiederholungen mit vertauschten Fluoreszenz-Farbstoffen durchgeführt. Insgesamt konnten so acht Hybridisierungen ausgewertet werden. Unter den acht Hybridisierungen wurden 4627 Gene detektiert, die in allen Hybridisierungen auswertbare Signale (über einer Schwelle von 500 *scanner*-definierten Einheiten) lieferten. Die so erhaltenen Werte wurden auf signifikante Unterschiede zwischen (*wr/wr*)- und

(+/+)-Tieren untersucht. Hierbei wurden 54 hoch- und 42 herunterregulierte Gene ($p_{(\text{chance})} < 1\%$) identifiziert (Beckers, persönliche Mitteilung).

Durch die Hinzunahme einer stringenteren statistischen Methode (siehe Anhang 6.7, Beckers et al., 2005 und Seltmann et al., 2005), wurde die Anzahl der als reguliert detektierten Gene reduziert. Die Auswertung des Microarray-Experiments für den Vergleich von (*wr/wr*)- zu (+/+)-Tieren ergab, dass von den 38 signifikantesten differentiell exprimierten Genen, 26 hoch- und 12 herunterreguliert waren (Rangfolge im Anhang 6.7). Anhand der Sequenzen der von Lion Bioscience sequenzierten und in Datenbanken abgelegten Klone, konnten den meisten regulierten Spots des Microarrays durch BLAST-Sequenzsuchen Gene zugeordnet werden (Anhang 6.7). Unter den hochregulierten Genen wurden so zum Beispiel je zwei Spots für die Gene *ApoE* (Rang 7 und 8) und *Sparc* (Rang 20 und 26) identifiziert. Drei Spots konnten dem Gen *Prdx6*, beziehungsweise dem Paralog *Prdx5* (Rang 13, 15 und 16) zugeordnet werden. Drei weiteren Spots konnten keine Gene zugeordnet werden (Rang 4, 22 und 24); hierbei ergaben die Sequenzsuchen Treffer für kleinere Fragmente der Spotsequenz auf unterschiedlichen genomischen Loci, jedoch befand sich unter diesen keine proteinkodierende Sequenz. Ein Spot (Rang 1) erzielte einen deutlichen Treffer auf Chromosom 3, allerdings sind in dieser Region keine Gene annotiert. Für einen Spot (Rang 6) gab es einen Treffer auf Chromosom 17. Es zeigte sich, dass die Spotsequenz zu zwei unterschiedlichen Genen gehört (*Mea1* und *Ppp2r5d*), deren 3'UTR teilweise überlappt (Ohinata et al., 2002). Somit wäre es möglich, dass nur eines oder beide Gene differentiell in (*wr/wr*)-Tieren reguliert sind. Insgesamt ergab sich so eine bereinigte Liste, der in (*wr/wr*)-Tieren im Vergleich zu (+/+)-Tieren regulierten Gene, von 19 hoch- und 11 herunterregulierten Genen (Tabelle 3.2).

Hochregulierte Gene

Spot	Accession	Gen	Name, Beschreibung	Chr. Position	Verhältnis
MG-8-17110	M26251	<i>Vim</i>	Vimentin	2 / 13.53Mb	3.1
MG-8-11n18	BC034341	<i>Itih2</i>	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	2 / 10.04Mb	3.2
MG-8-118d15	AF354051	<i>Atp5h</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	11 / 115.08Mb	2.6
MG-6-92j19	BC010716	<i>Ppp2r5d</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoform	17 / 44.08Mb	2.1
MG-6-92j19	BC013344	<i>Mea1</i>	male enhanced antigen 1	17 / 44.08Mb	2.1
MG-8-46e22	NP_033826	<i>ApoE</i>	apolipoprotein E	7 / 41.14Mb	1.8
MG-14-120f7	AK028745	<i>2310043N10Rik</i>	mKiaa0256, ribosomal L7 similar	19 / 5.63Mb	2.1
MG-13-128j16	D16432	<i>Cd63</i>	Cd63 antigen, Lamp-3 (Lysosome-associated membrane glycoprotein 3), (Ocular melanoma-associated antigen) (OMA81H) (Granulophysin)	10 / 129.04Mb	1.8
MG-15-2p22	M86736	<i>Grn</i>	granulin	11 / 102.11Mb	1.6
MG-3-53o16	BC003930	<i>Dhrs1</i>	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	14 / 47.71Mb	1.7
MG-6-88g23	BC061181	<i>Prdx5/6</i>	peroxiredoxin 5 oder 6	1 / 161.25Mb	1.5
MG-6-27j9	BC054758	<i>Ctsd</i>	cathepsin D	7 / 130.08Mb	1.6
MG-8-96d13	AK008900	<i>2210411K11Rik</i>	RIKEN cDNA 2210411K11, unbekanntes Prolinreiches Protein	7 / 10.55Mb	1.8
MG-6-3a5	BC028288	<i>Gap43</i>	Growth associated protein 43, Neuromodulin (Axonal membrane protein GAP-43) (PP46) (B-50) (Protein F1) (Calmodulin-binding protein P-57).	16 / 42.12Mb	1.4
MG-6-43d9	AK032170	<i>Lxn</i>	latexin	3 / 67.77Mb	1.5
MG-15-79e15	BC004638	<i>Sparc</i>	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	11 / 55.03Mb	1.4
MG-14-54i3	S70244	<i>Clu</i>	clusterin, ApoJ, Apolipoprotein J, Cli, complement lysis inhibitor, D14Ucla3, Sgp-2, Sgp2, sgp2, SP-40, Sugg-2, testosterone repressed prostate message	14 / 57.67Mb	1.4
MG-8-79a16	AF408408	<i>Snag1</i>	sorting nexin associated golgi protein 1, mouse sorting nexin 18	13 / 110.54Mb	1.8
MG-15-261m9	AK089212	<i>NM_146247</i>	cDNA sequence BC024814, S-adenosyl-L-methionine-dep methyltransferase	16 / 8.18Mb	1.4

Herunterregulierte Gene

Spot	Accession	Gen	Name, Beschreibung	Chr. Position	Verhältnis
MG-6-46o19	BC027010	<i>Plp1</i>	proteolipid protein (myelin) 1	X / 126.84Mb	0.6
MG-15-109f19	NM_008623	<i>Mpz</i>	myelin protein zero	1 / 171.23Mb	0.5
MG-12-168p11	NM_010271	<i>Gpd1</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	15 / 100.19Mb	0.6
MG-6-75h19	AK028057	<i>Mobp</i>	myelin-associated oligodendrocytic basic protein	9 / 120.16Mb	0.7
MG-8-11o7	AK007422	<i>LOC328023</i>	RIKEN cDNA 1810010H24 gene, unbekanntes Protein	11 / 106.70Mb	0.7
MG-6-55b9	BC053033	<i>Cntn2</i>	contactin 2	1 / 132.39Mb	0.7
MG-3-18m8	BC022919	<i>Tbb2</i>	RIKEN cDNA 4930542G03 gene	2 / 25.18Mb	0.7
MG-15-163m24	Probe liegt im Intron des Gens	<i>Trp53inp2</i>	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2,	2 / 155.45Mb	0.7
MG-12-217a7	BC018275	<i>Rhob</i>	ras homolog gene family, member B	12 / 8.53Mb	0.7
MG-12-222e9	AF172994	<i>Prss11</i>	protease, serine, 11 (Igf binding), Serine protease HTRA1 precursor, Htra1, insulin-like growth factor binding protein 5 protease, L56, RSPP11	7 / 118.55Mb	0.7
MG-12-3d23	XM_130277	<i>Pkp4</i>	plakophilin 4, Neural PLAKOPHILIN-related ARM repeat protein (Fragment), p0071	2 / 59.27Mb	0.7

Tabelle 3.2: Liste der differentiell regulierten Gene in (*wr/wr*)-Tieren. Analyse der Microarray-Daten für den Vergleich der Expression von Genen im Rückenmark von (*wr/wr*)- und (+/+)-Tieren. Neben der Identifikationsnummer der Spots (nach der Lion Bioscience Datenbank), ist die zugehörige Accession-Nummer des besten BLAST-Treffers für die zugehörige cDNA und ihre chromosomale Lokalisation angegeben. Die Bezeichnung des Gens ist nach Ensembl.org vergeben. Angegeben ist das relative Verhältnis der Expressionshöhen von (*wr/wr*)- zu (+/+)-Tieren.

3.3.2 qRT-PCR Untersuchungen differentiell regulierter Gene

Um die im Microarray-Experiment als differentiell reguliert identifizierten Gene zu validieren, wurden qRT-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde total-RNA aus Rückenmark von je drei 49 Tagen alten (*wr/wr*)- und (+/+)-Tieren isoliert. Erststrang-cDNA wurde aus den Mischungen der drei (*wr/wr*)-, beziehungsweise der drei (+/+)-Tiere, hergestellt. Verwendung fand das Lightcycler-System von Roche. Generell wurden im Lightcycler pro Gen zwei technische Replikate von drei unabhängigen Ansätzen von (*wr/wr*)- und (+/+)-Erststrang-cDNA gemessen. Die resultierenden C_T -Werte wurden gegen die Expression von β -actin normalisiert und das Verhältnis der normalisierten Expression zwischen Wobbler und Wildtyp bestimmt.

Von den 19 als hochreguliert identifizierten Gene im Microarray-Experiment, wurden 13 für die Lightcycler-Validierung ausgesucht. Für *Vim* (Primerpaar: Vimentin_a/Vimentin_b), *ApoE* (Primerpaar: ApoE_a/ApoE_b), *CD63* (Primerpaar: CD63_a/CD63_b), *GAP43* (Primerpaar: Gap43_a/Gap43_b) und *NM_146247* (Primerpaar: NM_146247_a/NM_146247_b) ließen sich die im Microarray-Experiment bestimmten Zahlenwerte fast exakt reproduzieren (Abb. 3.19A). Die Tendenz der Regulation von *Itih2* (Primerpaar: Itih2_a/Itih2_b) war auch im qRT-PCR-Experiment gleich, der gemessene Zahlenwert von $1,45 \pm 0,06$ wich aber deutlich von den im Microarray-Experiment ($3,2$ siehe Tabelle 3.2) gefundenen Werten ab. Für die Gene *Ctsd* (Primerpaar: Ctsd_a/Ctsd_b) und *Sparc* (Primerpaar: Sparc_a/Sparc_b) konnten mit $2,06 \pm 0,08$, bzw. $2,11 \pm 0,02$ deutlich höhere Werte der Expressionserhöhung gemessen werden als im Microarray-Experiment ($1,6$, bzw. $1,4$). Die Expressionserhöhung von *Snag1* konnte trotz Verwendung von unterschiedlichen Primerpaaren für verschiedene Spleißisoformen nicht im qRT-PCR-Experiment verifiziert werden. Da die Spotsequenz MG-6-88g23 nicht nur *Prdx6*, sondern auch das paraloge Gen *Peroxiredoxin5* repräsentiert, wurden spezifische qRT-PCR Untersuchungen mit beiden Genen durchgeführt. Es zeigte sich, dass *Prdx6* in (*wr/wr*)-Tieren (Primerpaar: Prdx6_a/Prdx6_b) mit einem Wert von $2,65 \pm 0,6$ deutlich hoch und *Prdx5* (Primerpaar: Prdx5_a/Prdx5_b) mit einem Wert von $0,49 \pm 0,19$ deutlich herunterreguliert ist. Der im Microarray-Experiment gemessene Wert von $1,5$ stellt damit wahrscheinlich die Summe der Regulation dieser beiden paralogen Gene dar. Da die Spotsequenz MG-6-92j19 zu zwei Genen gehört, deren 3'UTR einander überlappt (Ohinata et al., 2002), wurden die beiden Gene ebenfalls im qRT-PCR-Experiment getestet. Für *Mea1* (Primerpaar: Mea1_a/Mea1_b) ergab sich keine Regulation, für *Ppp2r5d* eine Herunterregulierung auf einen Wert von $0,57 \pm 0,05$. Auch hier wurden

verschiedene Primerpaare für unterschiedliche Spleißisoformen getestet, allerdings konnte der im Microarray-Experiment gemessene Wert von 2,1 nicht bestätigt werden.

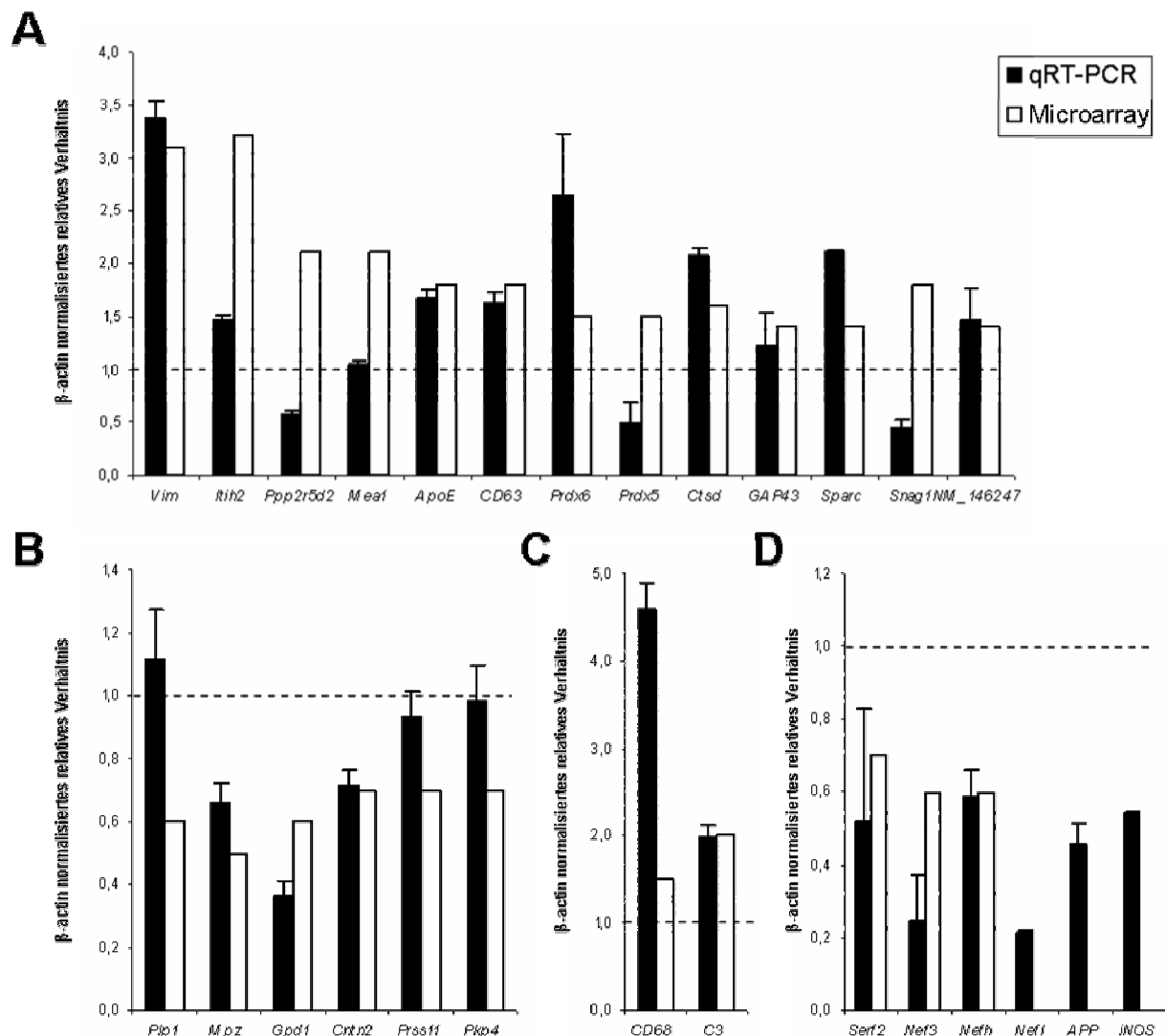


Abbildung 3.19: qRT-PCR-Experimente zur Validierung der Microarray-Experimente. A) qRT-PCR-Analysen der hochregulierten Gene aus den Microarray-Daten für den Vergleich der Expression im Rückenmark von (*wr/wr*)-Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Angegeben ist das relative Verhältnis der Expressionshöhen von (*wr/wr*)- zu (*+/+*)-Tieren. **B)** qRT-PCR-Analysen der herunterregulierten Gene. **C)** qRT-PCR-Analysen von zwei hochregulierten Genen, die nicht unter den signifikanten Treffern waren (siehe Text). **D)** Drei der herunterregulierten, und weitere für die Wobbler-Pathologie potentiell interessante Gene, wurden für Expressionsuntersuchungen ausgewählt. Gestrichelte Linien geben das Wildtyp-Expressionsniveau an.

Aus den elf herunterregulierten Genen sind sechs für die Validierung im qRT-PCR-Experiment ausgesucht worden. Für die Gene *Plp1* (Primerpaar: *Plp1_a/Plp1_b*), *Prss11* (Primerpaar: *Prss11_a/Prss11_b*) und *Pkp4* (Primerpaar: *Pkp_4_a/Pkp_4_b*) konnten die im Microarray-Experiment bestimmten Werte nicht reproduziert werden. Es fand sich keine Regulation dieser Gene in Wobbler-Tieren im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.19B). In beiden Experimenten herunterreguliert konnten *Mpz* (Primerpaar: *Mpz_a/Mpz_b*), *Gpd1*

(Primerpaar: Gpd1_a/Gpd1_b) und *Cntn2* (Primerpaar: Cntn2_a/Cntn2_b) identifiziert werden.

Von den 96 in der ersten Microarray-Analyse in (*wr/wr*)-Tieren differentiell regulierten Gene (Daten nicht gezeigt), wurden fünf für die qRT-PCR-Analyse ausgewählt. Die Complement Komponente *C3* (Primerpaar: Comp2_C3_a/Comp2_C3_b) und *CD68* (Primerpaar: CD68_a/CD68_b) wurden in beiden Versuchen als hochreguliert identifiziert (Abb. 3.19C). Eine deutlich niedrigere Expression wurde für *Serf2* (Primerpaar: Serf2_a/Serf2_b) und die beiden Neurofilamente *Nef3* (Primerpaar: Nfm_a/Nfm_b) und *Nefh* (Nfh_a/Nfh_b) bestimmt (Abb. 3.19D). Zusätzlich wurden noch drei weitere für die Wobbler-Pathologie interessante Gene quantitativ analysiert (*Nfl*, Ulbrich 2003; *App*, Schitek 2005; *Nos2*, Vodovotz et al., 1996). Hierbei wurde die dritte Neurofilament-Komponente (Primerpaar: Nfl_a/Nfl_b), sowie das *APP*-Gen (Primerpaar: App_a/App_b) und das *Nos2*-Gen (*inducible nitric oxide synthase*, Primerpaar: iNOS_a/iNOS_b) getestet. Diese Gene werden ebenfalls in (*wr/wr*)-Tieren herunterreguliert (Abb. 3.19D).

3.3.3 Northern-Blot-Experimente

Zusätzlich zu den qRT-PCR-Experimenten, sind noch Expressionsuntersuchungen mit Northern-Blots durchgeführt worden. Total-RNA aus Rückenmark und Testis von je drei (*wr/wr*)- und (+/+)-Tieren wurde mit Standardmethoden hergestellt. 15µg der Mischungen wurden über ein 1% Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Membran mittels des Kapillarblot-Verfahrens übertragen. 3'UTR-PCR-Fragmente von etwa 500bp Länge wurden radioaktiv mit ³²P markiert und der Blot über Nacht mit dieser Sonde inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Membran zwischen 30 Minuten und mehreren Stunden mit einem *storage phosphor screen* (Amersham) inkubiert. Die *Screens* wurden mit dem *Typhoon Phosphor Imager* ausgelesen (Amersham) und die detektierten Banden mit der *Image Quant* Software (Amersham) relativ zur Expression des β-actin-Gens quantifiziert.

Experimente mit den DNA-Sonden für *ApoE* (Primerpaar: ApoE_North_a/ApoE_North_b), *Vim* (Primerpaar: Vim_North_a/Vim_North_b) und *Prdx6* (Primerpaar: Prdx6_North_a/Prdx6_North_b) lieferten im Northern-Blot (Abb. 3.20A) nach Quantifizierung (Abb. 3.20C) der Rückenmarks-Spuren ähnliche Werte, wie in den Microarray- und qRT-PCR-Experimenten (siehe 3.3.2). Mit der *Snag1*-spezifischen DNA-Sonde (Primerpaar: Snag1_North_a/Snag1_North_b) konnte keine Regulation in (*wr/wr*)-Tieren detektiert

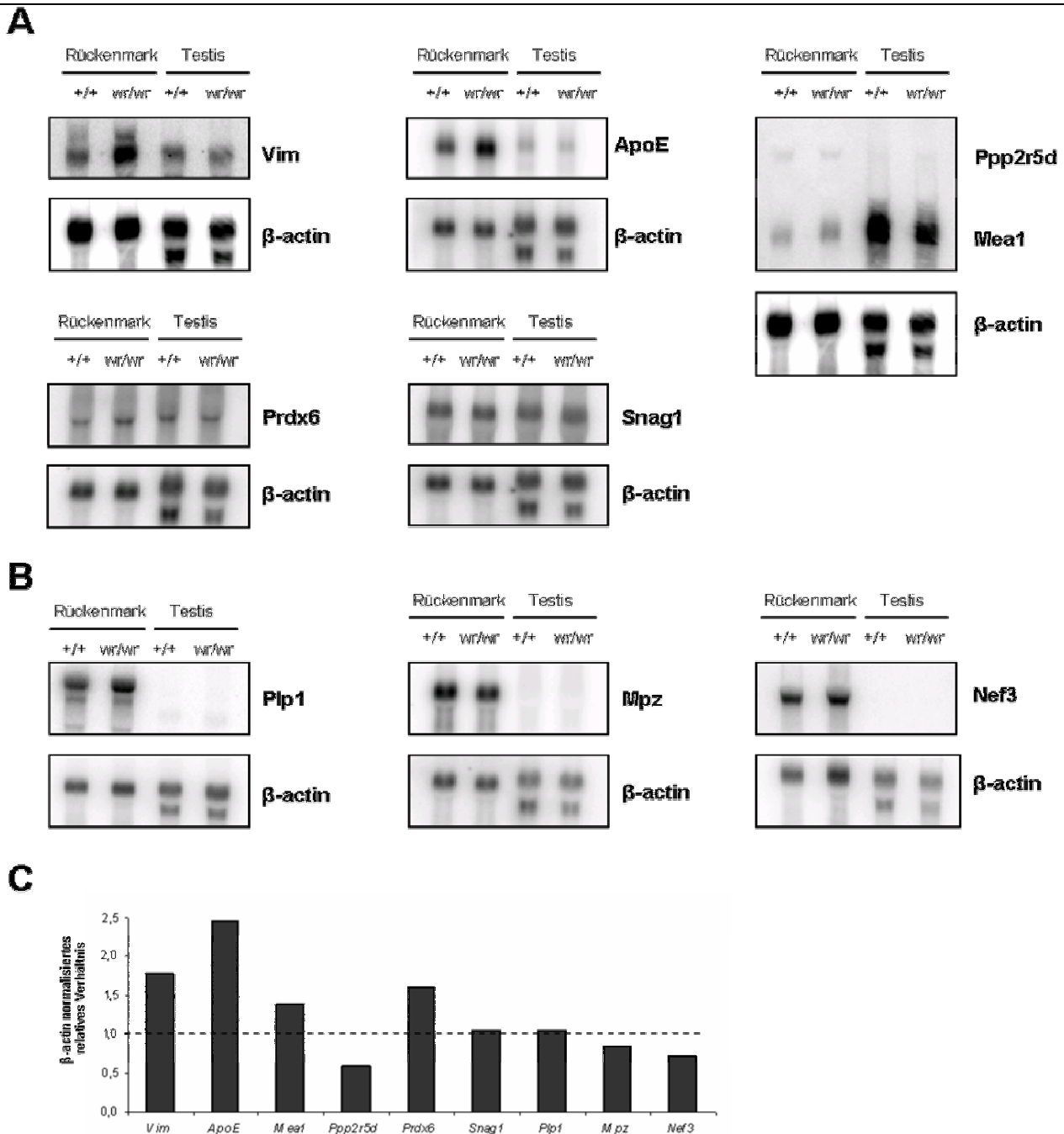


Abbildung 3.20: Northern-Blot-Experimente zur Validierung der Microarray-Daten. A) Northern-Blot-Analysen der hochregulierten Gene aus den Microarray-Daten für den Vergleich der Expression im Rückenmark von (*wr/wr*)-Tieren im Vergleich zum Wildtyp. 15µg total-RNA-Mischungen aus je drei (*wr/wr*)- und (+/+)-Tieren wurden über ein 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und nach Übertragen auf eine Membran mit einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde inkubiert. Nach Detektion wurde der Blot mit einer β-actin-spezifischen Sonde als Normalisierungskontrolle inkubiert. **B)** Northern-Blot-Analysen von ausgewählten runterregulierten Genen. **C)** Quantifizierungen der Blots für das Rückenmark unter A) und B). Verwendung fand die Image Quant Software (Amersham). Werte wurden β-actin normalisiert und sind relativ zum Wildtyp angegeben. Die gestrichelte Linie gibt das Wildtyp-Expressionsniveau an.

werden. Die Hybridisierung mit der *Mea1/Ppp2r5d*-DNA-Sonde (Primerpaar: *Mea1_Ppp2r5d_Sond_a/Mea1_Ppp2r5d_Sond_b*) zeigte ähnliche Tendenzen, wie in den qRT_PCR-Experimenten (Abb. 3.20A). Das *Ppp2r5*-Transkript fand sich deutlich herunter- und das *Mea1*-Transkript leicht hochreguliert (Abb. 3.20C).

Von den herunterregulierten Genen wurden drei für eine Northern-Blot-Untersuchung ausgesucht (Abb. 3.20B). Die Transkripte für das *Mpz*-Gen (Primerpaar: *Mpz_North_a*/*Mpz_North_b*) und das *Nef3*-Gen (Primerpaar: *Nefm_North_a*/*Nefm_North_b*) liessen sich als herunterreguliert identifizieren (Abb. 3.20C). Dagegen wurde *Plp1* in (*wr/wr*)-Tieren als nicht differentiell reguliert identifiziert und widerspricht somit den Microarray-Daten. Zusätzlich zu der total-RNA aus Rückenmark wurde Testis total-RNA für die Northern-Blot-Experimente mitgeführt. Wie erwartet ließen sich keine Signale für das *Mpz*-, *Plp1*- und *Nef3*-Transkript erhalten (Abb. 3.19B). Dagegen konnten im Testis die *Vim*-, *ApoE*-, *Prdx6*-, *Snag-1* und *Mea1*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 3.19A). Nach Quantifizierung konnte nur für das *Mea1*-Transkript ein Unterschied detektiert werden. So wird *Mea1* in der Wobbler-Maus im Testis-Gewebe auf das 0,7-fache des Wildtypniveaus herunterreguliert. Alle anderen Transkripte zeigten keine signifikanten Unterschiede. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Wobbler-Tieren, im Vergleich zum Wildtyp, eine Vielzahl von Genen reguliert wird. Es ließ sich eine weitgehende Übereinstimmung in der Regulationshöhe mit den drei verwendeten unabhängigen Methoden finden. Nicht reproduziert werden konnten die Microarray-Daten der Regulation für *Snag1* und *Plp1*.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen den Beweis für die Identität des für die Wobbler-Pathologie ursächlichen Gens zu erbringen. Zusammen mit der Identifizierung von differentiell regulierten Genen, könnten diese Erkenntnisse einen großen Einfluss auf die Betrachtung humaner neurodegenerativer Erkrankungen haben. So verbindet die Entdeckung, dass eine Mutation in dem Gen *Vps54* für den Wobbler-Phänotyp verantwortlich ist, neurodegenerative Prozesse mit einem möglichen gestörten intrazellulären Vesikeltransport.

Nach der Diskussion der Analyse des Kandidatengenintervalls und möglichen Funktionen der neu identifizierten Gene, werden die der Wobbler-Erkrankung zugrunde liegenden Pathomechanismen diskutiert. Im Ausblick werden einige weitergehende Experimente vorgeschlagen mit denen die genauen zellulären Funktionen von *Vps54* aufgedeckt und so mögliche ursächliche Beteiligungen an Krankheitsmechanismen nachgewiesen werden können.

4.1 Das *wr*-kritische Intervall

Die Verwendung der neuen Sequenzdaten aus den öffentlichen Datenbanken ermöglichte zum ersten Mal den gesamten Kandidatengenbereich zu betrachten. Die Sequenzabdeckung des hier verwendeten Assembly war vollständig, so dass die Lücken, die noch bei Fuchs et al. (2002) zu Unsicherheiten bei der Identifizierung aller Kandidatengene geführt hatten, eliminiert werden konnten. Die bei Fuchs et al. (2002) beschriebene Inversion konnte nicht bestätigt werden. Die Annahme einer Inversion basierte auf zwei genomischen Klonen, die den Bereich zwischen *Kiaa0903* und dem rekombinanten Marker *BAC147n22rev* überspannen sollten. Der eine genomische Klon, ein YAC mit der Bezeichnung ymWIBR100H6 (Fuchs et al., 2002) könnte ein chimärer Klon gewesen sein, der unterschiedliche Fragmente aus der *wr*-kritischen Region enthält. Der zweite Klon ist ein BAC mit der Bezeichnung BAC135B4. Dieser Klon ist mittlerweile fast vollständig vom Institut für molekulare Biotechnologie in Jena sequenziert worden. BLAST-Analysen konnten in der Sequenz des BAC135B4 (AC091422) keine Teile des *Kiaa0903*-Gens, wie in Fuchs et al. (2002) dargestellt, detektieren. Weiterhin zeigte sich, dass dieser genomische Klon die Sequenz von 20763369bp bis 20975807bp des

Mauschromosoms 11 (NCBI Assembly Build 33) enthält, und somit den Bereich zwischen den beiden Genen *NM_173752*, ein dem *wr*-kritischen Intervall flankierend liegendes Galektin-Gen, und *Peli1* überspannt. Hier könnte man spekulieren, dass eventuell falschpositive PCR-Signale erhalten worden sind, die so zu der irrtümlichen Annahme einer Inversion geführt haben (Fuchs 2001).

Auch müssen die Schätzungen über die Größe des *wr*-kritischen Intervalls revidiert werden. So basierte die Größenangabe von $0,41\text{cM} \pm 0,23\text{cM}$ (Fuchs 2001) auf der Berechnung der Häufigkeiten von Rekombinationsereignissen. Durch die hier verwendete Sequenz, welche die *wr*-kritische Region lückenlos überspannt, konnte der Abstand der beiden flankierenden Marker mit $2,02\text{Mb}$ bestimmt werden (siehe 3.1), was weit mehr als doppelt so groß ist, wie von Fuchs (2001) ermittelt. Diese Diskrepanz dürfte an der extrem rekombinationsarmen *wr*-kritischen Region liegen. So ergaben Untersuchungen der lokalen Rekombinationsfrequenzen des Mauschromosoms 11 für die hier relevante Region sehr geringe Werte (Jensen-Seaman et al., 2004), die somit eine Erklärung für den Unterschied zwischen genetischem und physikalischem Abstand liefern.

4.1.1 Identifizierung von neuen Genen

Für die Untersuchung der zu Beginn der Arbeit noch nicht annotierten genomischen Sequenz wurden verschiedene bioinformatische Werkzeuge verwendet. Gute Ergebnisse ließen sich mit den Alignments von EST-Sequenzen mit dem Programm *Gen2EST* vom EMBL-Server in Heidelberg erzielen. Aufgrund der geringen Kapazität des Servers konnten pro Analyse allerdings nur kürzere genomische Sequenzen ($<100\text{kb}$) untersucht werden. Eine signifikante Verbesserung ergab sich durch die Verwendung des *E2G* Programms (Krüger et al., 2004), das von einer Arbeitsgruppe an der Technischen Fakultät Universität Bielefeld für unsere Analysen maßgeschneidert entwickelt worden ist. Bei signifikanten Treffern von ESTs in der genomischen Sequenz, wurde mittels *BLAST*-Sequenzanalysen nach zugehörigen cDNA-Klonen in den Datenbanken gesucht. Diese Strategie führte zu der Entdeckung von drei Genen, die für den *wr*-kritischen Bereich neu annotiert werden konnten. Das *B3Gnt*-Gen war zwar schon funktional gut charakterisiert, aber noch nicht als Kandidat für die Wobbler-Erkrankung untersucht worden (Egan et al., 2000). Da nach der Reduktion des Kandidatengenintervalls (siehe 3.1.3) *B3Gnt* nicht mehr als Wobbler-Gen in Frage kam, wurde von einer weiteren Untersuchung abgesehen. Die anderen beiden neu identifizierten Gene wurden dagegen als Kandidaten für das Wobbler-Gen untersucht.

4.1.2 *Tmem17*

Tmem17 ist ein Vier-Exon-Gen, das für ein ubiquitär exprimiertes Protein von 198 Aminosäuren kodiert. Sequenzanalysen zeigten, dass *Tmem17* unter Vertebraten evolutionär hoch konserviert ist, und somit einem starken Selektionsdruck unterliegt. Diese hohe Konservierung spricht für eine essentielle Funktion dieses Proteins. Erste biochemische Untersuchungen mit rekombinantem Maus-*Tmem17*, zeigten eine Membranassoziiierung mit intrazellulären Strukturen in Cos7 bzw. CHO Zellen, die durch die Computervorhersage von vier Transmembran-Regionen unterstrichen wird (3.1.1.4). Auch konnten Hinweise auf eine posttranslationale Modifizierung des Proteins erhalten werden. Die Auftrennung von Zellysaten aus einer *Tmem17* exprimierenden Zellkultur und anschließender 2D-Gelelektrophorese ergab Hinweise auf multiple Phosphorylierungen des Proteins (Wiegand, pers. Mitteilung). Trotz der vier detektierten Transmembran-Regionen ist *Tmem17* kein Mitglied der Tetraspanin-Familie (Hemler 2001). So lassen sich weder die für die Tetraspanine charakteristischen Aminosäuremotive, noch die im Vergleich zur ersten längere zweite extrazelluläre Schleife detektieren (Yunta und Lazo, 2003). Es fanden sich auch keine Sequenzübereinstimmungen zu den sogenannten TVPs (*tetraspan vesicle membrane proteins*), die wichtige Funktionen im intrazellulären Vesikeltransport wahrnehmen, obwohl zumindest eine strukturelle Ähnlichkeit offensichtlich ist (Hübner et al., 2002). Weiter konnten keine bekannten Proteindomänen oder Struktur motive identifiziert werden, mit denen man *Tmem17* einer bestimmten Proteinfamilie zuordnen könnte, um somit erste Hinweise auf mögliche Funktionen zu bekommen.

Die Suche nach Interaktionspartnern erschien daher als eine vielversprechende Strategie, um die Funktion von *Tmem17* näher aufzuklären. Mittels des Yeast Two-Hybrid Systems konnten für das N-terminale und C-terminale Fragment des Proteins mögliche Bindepartner identifiziert werden (3.1.1.5). So ist Ppm1e (Synonyme: POPX1, Kiaa1072 und PP2CH) eine Proteinphosphatase, die PAK (*p21 (Cdc42/Rac) activated kinase*) durch Dephosphorylierung inaktiviert, und somit einen Einfluss auf zahlreiche biologische Prozesse, wie etwa Organisation des Cytoskeletts und Zellteilung ausübt (Koh et al., 2002). Ein weiterer möglicher Interaktionspartner ist Fem1b, das Maus Ortholog des *C. elegans fem-1*-Gens, das Funktionen bei der Geschlechtsbestimmung ausübt (Gaudet et al., 1996). Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Proteinphosphatase, die allerdings in Vertebraten noch funktional uncharakterisiert ist (Ventura-Holman et al., 2000). Ranbp9 (Synonym: RanBPM) ist ein in der Plasmamembran lokalisiertes Protein, das mit

Integrinen interagieren kann (Denti et al., 2004). Als ein weiterer möglicher Interaktionspartner konnte Cops5 (Synonyme: Cop9, Mov34, Jab1) identifiziert werden. Dieses Protein ist eine Komponente des Signalosom-Komplexes, der mit dem proteasomalen System assoziiert ist (Wolf et al., 2003). Der ABC-Halbtransporter Abcd4 (Synonyme: P70R, PMP69, Pxmp1-I) ist ein peroxisomal lokalisiertes Transmembranprotein (Gloeckner et al., 2000), das eine Rolle in der Pathogenese der Adrenoleukodystrophie spielt (Asheuer et al., 2005).

Um die Interaktionen von Tmem17 mit den identifizierten möglichen Bindepartnern zu verifizieren, sind weitere Untersuchungen nötig. So werden zurzeit im Rahmen einer laufenden Diplomarbeit die Klonierungen aus den Hefepiasmiden in einen Expressionsvektor durchgeführt. Anschließend sollen Koimmunpräzipitationen die Interaktionen verifizieren. Auch werden Kolokalisationsexperimente in Zellkulturen mit den hergestellten Plasmiden möglich, die weitere Hinweise auf die Interaktionen liefern können. Zur weiteren Charakterisierung von Tmem17 wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Konstruktion eines Vektors für ein Gene-Targeting-Experiment begonnen (Daten nicht gezeigt). So kann das Ausschalten von Tmem17 *in vivo* weitere funktionale Einsichten bringen. Neben den fehlenden Expressions- und Sequenzunterschieden zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren, konnte *Tmem17* durch die Reduktion des Kandidatenintervalls (3.1.3) als Kandidat für das Wobbler-Gen ausgeschlossen werden.

4.1.3 NM_172792

Das offene Leseraster von *NM_172792* kodiert für ein 226 Aminosäuren großes Protein, das eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne enthält. Durch BLAST-Sequenzsuchen konnten orthologe Gene in der Ratte und auf einem anderen Mauschromosom identifiziert werden (3.1.2.1). Die genauere Untersuchung der Sequenzen lässt vermuten, dass *NM_172792* keine funktionale Kinase ist, da wichtige Motive fehlen (Abb. 3.7). Da kein Antikörper zur Verfügung stand, konnte die Translation nicht nachgewiesen werden. Man kann daher über etwaige Funktionen des Transkripts nur spekulieren. Falls *NM_172792* translatiert wird, könnte dieses Protein zum Beispiel Phosphorylierungsstellen anderer Proteine blockieren, und somit Phosphorylierungsmuster beeinflussen, oder völlig andere Funktionen wahrnehmen. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass das *NM_172792*-Transkript nicht translatiert wird und die RNA ihrerseits funktional aktiv ist. In der Literatur gibt es mehrere Beispiele von untranslatierten RNAs, die wichtige zelluläre Funktionen

wahrnehmen können (Mattick 2004), wie zum Beispiel bei der X-Chromosom Inaktivierung (Heard 2004).

Die Expression von *NM_172792* konnte ausschließlich im Testis-Gewebe nachgewiesen werden. Bei Wobbler-Tieren wird das Transkript etwa 2-fach hochreguliert. Dass die differentielle Regulation von *NM_172792* in der Pathologie der Wobbler-Tiere eine Rolle spielt ist unwahrscheinlich. Da durch das Rescue-Experiment mit den BAC-transgenen Tieren (3.2.2.3) auch der Testis-Phänotyp gerettet worden ist, kann man schlussfolgern, dass *NM_172792* nicht ursächlich in die Wobbler-Pathologie involviert ist. Um trotzdem mehr über die Funktionen von *NM_172792* zu lernen, und letztendlich Mäuse zu generieren denen das Transkript fehlt, bot es sich an, das Gen *in vivo* durch ein Gene-Targeting-Experiment auszuschalten. Die Analyse der resultierenden *NM-172792*-defekten Mäuse könnte einen wesentlichen Beitrag zur funktionalen Charakterisierung dieses Gens leisten. Unglücklicherweise konnten keine für die homologe Rekombination positiven ES-Zellklone erhalten werden (3.1.2.3.2). Der Grund könnte an der geringen lokalen Rekombinationsfrequenz der chromosomalen Region liegen (siehe 4.1). Es scheint daher notwendig das Experiment zu wiederholen und eine größere Anzahl von ES-Zellklonen zu untersuchen.

4.1.4 Reduktion des *wr*-kritischen Intervalls

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue polymorphe Marker zwischen den beiden in der Rekombinationszucht verwendeten Mausstämmen C57BL6 und Cast/Ei etabliert werden, die es ermöglichten, den *wr*-kritischen Bereich signifikant einzuengen. So wurde der Kandidatengenbereich von 2024505bp auf 867651bp reduziert (3.1.3). Damit konnten die Gene *Murr1*, *B3Gnt*, *Tmem17*, *Kiaa0903*, *Otx1* und ein großer Teil des *Homoloc13*-Gens aus der Kandidatengenregion ausgeschlossen werden (Abbildung 3.10). Die mögliche höhere Auflösung des Rekombinationsbruchpunktes zwischen den beiden neuen Markern *Homint10* und *Homint14* (Abbildung 3.10D) bedeutet im günstigsten Fall eine Reduktion des Intervalls um ca. 108kb. Da aber dadurch kein weiteres Kandidatengen ausgeschlossen werden würde, ist von einer weiteren Suche nach neuen Markern aus ökonomischen Gründen abgesehen worden. Es verbleiben daher *Peli1*, *Vps54*, *Ugp2*, *NM_172792*, *Mdh1* und ein Teil des *Homoloc13*-Gens im Kandidatengenintervall.

4.2 Mutation in *Vps54* verursacht die Wobbler-Erkrankung

Die Detektion einer Missense-Mutation im *Vps54*-Gen in der Diplomarbeit von Phillip Hahn (2004), führte zu der Hypothese, dass diese für den Wobbler-Phänotyp ursächlich sein könnte. Erhärtet wurde diese Vermutung durch Sequenzuntersuchungen, die zeigten, dass die betroffene Aminosäure (ein Leucin) im Tierreich hochkonserviert ist, und sich offensichtlich nur bei der Wobbler-Maus ein Glutamin an der Position 967 der längsten Spleißisoform finden lässt (Hahn 2004). Mit dem in dieser Arbeit charakterisierten BAC115F6 konnten in der Arbeitsgruppe von Dr. Miriam Meisler, Institute of Human Genetics, Ann Arbor, Michigan transgene Tiere erzeugt werden, die in Bielefeld in den Wobbler-Stamm eingekreuzt worden sind. Es zeigte sich eine vollständige funktionale Rettung des Wobbler-Phänotyps. Sowohl der neurologische, als auch der Testis-Phänotyp konnten kompensiert werden (3.2.2.3). Man könnte zwar argumentieren, dass ein bislang noch unbekanntes von *Vps54* unabhängiges genetisches Element, das sich eventuell in der genomischen Sequenz des BAC115F6 befindet, den Wobbler-Phänotyp kompensiert haben könnte, dagegen sprechen jedoch mehrere Fakten. So ergaben die Sequenzuntersuchungen des BAC115F6 keinerlei Hinweise auf mögliche alternative Transkripte oder noncoding RNAs (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnten aus der in dieser Arbeit charakterisierten *Vps54* ^{β -geo} Trap-Zelllinie (3.2.3) in der Zwischenzeit Mäuse generiert werden, die in den Wobbler-Stamm eingekreuzt worden sind (Mußmann, laufende Dissertation). Die komplexheterozygoten Tiere (*wr/Vps* ^{β -geo}) zeigen sowohl den neurologischen, als auch den Testis-Phänotyp (Mußmann, pers. Mitteilung). Weiterhin unterstreicht die Beobachtung, dass die Expression von *Vps54* in Wobbler-Tieren erhöht ist (3.2.1), die Identität des Wobbler-Gens. Hier könnte die Hochregulierung des Transkripts eine kompensatorische Reaktion darstellen, die aufgrund von fehlendem funktionalem *Vps54* in den von der Wobbler-Erkrankung betroffenen Geweben auftritt.

Die Tatsache, dass in der Maus unterschiedliche *Vps54*-Transkripte identifiziert worden sind (Hahn 2004), wirft die Frage auf, welche Isoform für den Wobbler-Phänotyp verantwortlich ist. So führt die Punktmutation in allen detektierten alternativen Spleißisoformen zu einem veränderten Protein (Hahn 2004). Aus den Ergebnissen des Rettungsversuches mit den BAC-transgenen Tieren lässt sich diese Frage nicht beantworten, da von dem verwendeten BAC potentiell alle Spleißisoformen exprimiert werden können. Die Charakterisierung der *Vps54* ^{β -geo} Trap-Zelllinie (3.2.3) hat ergeben, dass nur die langen Spleißisoformen von der Insertion betroffen sind, und somit, falls die Insertionskassette nicht umspleißt wird, nicht vollständig exprimiert werden können. Da die

komplexheterozygoten Tiere den Wobbler-Phänotyp zeigen, kann man schließen, dass die beiden kurzen Spleißisoformen, die wahrscheinlich durch einen separaten Promoter reguliert werden, nicht ursächlich für die Wobbler-Pathologie sind. Weitere Expressionsuntersuchungen, die diese Frage klären sollen, werden derzeit in der laufenden Dissertation von Anke Mußmann bearbeitet.

4.3 Hinweise auf zelluläre Funktionen von Vps54

Vps54 liegt von der Hefe bis zum Menschen konserviert vor (Hahn 2004). Die funktionale Charakterisierung von Vps54 in der Hefe hat gezeigt, dass es sich dabei um ein Protein handelt, das in den retrograden Vesikeltransport vom endosomalen Kompartiment zum trans-Golgi-Netzwerk involviert ist (Conibear und Stevens, 2000, Oka und Krieger, 2005). Vps54 liegt dabei in der Zelle als sogenannter Garp- (*golgi associated retrograde protein*) Komplex mit Vps53, Vps52 sowie assoziiert mit Vps51 und dem t-SNARE (soluble *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) Tlg1 vor (Siniosoglou und Pelham, 2002, Conibear et al., 2003, Reggiori et al., 2003). Der GARP-Komplex wirkt dabei als Hilfsfaktor für die durch die v-SNAREs (*vesicle*) und t-SNAREs (*target*) vermittelten Andockvorgänge eines Vesikels mit seiner Zielmembran. Genau wie Vps53 und Vps52 besitzt Vps54 ebenfalls eine *coiled-coil* Domäne, über welche die Interaktion mit den anderen Garp-Proteinen vermittelt wird (Conboy und Cyert, 2000). Es gibt Hinweise, dass Vps54 auch Funktionen beim anterograden Transport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran übernimmt (Fiedler et al., 2002). In der gleichen Studie wurde auch gezeigt, dass der Verlust von Vps54 die Integrität des Actin-Cytoskeletts zerstört. Der Garp-Komplex ist in höheren Eukaryonten noch nicht charakterisiert. In der Ratte wurde Vps54 bislang lediglich chromosomal lokalisiert und die cDNA-Sequenz bestimmt (Walter et al., 2002). In *Drosophila melanogaster* wurde durch eine P-Element Insertionsmutagenese die Mutante *scattered* hergestellt (Castrillon et al., 1993). Das dabei inaktivierte Gen *scat* ist das *Vps54*-orthologe Gen in *Drosophila*. Interessanterweise zeigt die *scat*-Mutante einen Spermatogenese-Defekt (Fabrizio et al., 1998). In *C. elegans* führt der Verlust des *Vps54*-Orthologs zu Sterilität oder ist letal (Mitani, pers. Mitteilung und Allel tm585, www.wormbase.org).

Da Vps54 in Vertebraten funktional nicht untersucht worden ist, bot es sich auch hier an nach Interaktionspartnern zu suchen, die Hinweise auf mögliche zelluläre Prozesse geben könnten, in denen Vps54 eine Rolle spielt. Mittels des Yeast Two-Hybrid Systems konnten

insgesamt 17 unabhängige Bindepartner für ein C-terminales Fragment von Vps54 identifiziert werden (3.2.4).

Die Identifizierung einiger dieser Interaktionspartner stützen mögliche Funktionen von Vps54 im intrazellulären Vesikeltransport (Tab. 4.1). So ist das Dynamin1 eine essentielle Komponente bei der Endocytose von *clathrin-coated* Vesikeln. Interessanterweise konnten erst kürzlich Mutationen im Dynamin2-Gen mit einer dominanten Form der Charcot-Marie-Tooth (CMT) Erkrankung, einer peripheren Neuropathie, in Verbindung gebracht werden (Zuchner et al., 2005). Sorting Nexin 5 (Snx5) besitzt eine PX- (*phosphoinositide-binding Phox homology*) Domäne, kann Clathrin binden (Towler, et al., 2004) und liegt in der Zelle mit endosomalen Kompartimenten assoziiert vor. Zelluläre Funktionen, die Snx5 wahrnehmen kann, reichen von endosomalen Vesikel-Sortiervorgängen, bis zu Funktionen in der Phosphoinositid-Signalkaskade (Merino-Trigo et al., 2005). In der Hefe konnte eine Interaktion des Garp-Komplexes mit Ypt6, das zu Rab6 aus der Maus homolog ist, nachgewiesen werden (Siniosoglou und Pelham, 2001). Rab6 scheint auch Funktionen während der Akrosomfusion in der Spermatogenese zu übernehmen (Ramalho-Santos et al., 2001). Somit könnte auch das Rab6ip1 (*rab6 interacting protein 1*), das ein bislang noch uncharakterisiertes Protein ist, ein guter Kandidat für die Bindung an Vps54 *in vivo* darstellen. Für das Rab6ip2 Protein wurde zum Beispiel eine Funktion im Transport vom endosomalen Kompartiment zum trans-Golgi-Netzwerk gezeigt (Monier et al., 2002). Das t-Golgin-245 ist ein Golgi-lokalisiertes Protein, über das die Bindung von Arl1, einer GRIP-Domäne enthaltenden GTPase (Wu et al., 2004), zu Vps53 vermittelt wird (Panic et al., 2003). Somit könnte über Golgin-245 die Assoziierung des Garp-Komplexes mit dem trans-Golgi-Netzwerk reguliert werden (Oka und Krieger, 2005). Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine Interaktion von Maus-Vps54 mit einem molekularen Motor, dem unkonventionellen Myosin Q80ZMO, identifiziert werden. Schon in einem Yeast Two-Hybrid Experiment mit Hefe Vps54 konnte mit Myo2p ein Vesikel assoziiertes Myosin als Bindepartner charakterisiert werden (Fiedler et al., 2002). Weiterhin spielen die Myosine Va und VII eine zentrale Rolle während der letzten Schritte der Spermatogenese (Kierszenbaum et al., 2003). So wird der Vesikeltransport bei der Reifung der Spermien zum Teil über F-Aktin und Myosin reguliert (Kierszenbaum und Tres, 2004). Denkbar wäre, dass zum Beispiel die Übergabe von Myosin-assoziierten Vesikeln an den Garp-Komplex über Vps54 vermittelt wird. Dab2 ist ein Adapterprotein, das in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden Funktionen wahrnehmen kann. So scheint Dab2 bei der Clathrin-vermittelten Endocytose und dem Vesikeltransport involviert zu sein (Yang et al.,

2002, Dance et al., 2004). Weiter wirkt Dab2 als Myosin-Adapterprotein und reguliert die Endocytose des CFTRs (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, Swiatecka-Urban et al., 2004), ein ABC-Transporter mit sehr hohen Homologien zu Abcc5, der in dieser Arbeit ebenfalls als möglicher Interaktionspartner für Vps54 identifiziert worden ist.

Interaktionspartner	Funktionen
Dynamamin-1	Endocytose
Snx5	Endosomaler Vesikeltransport
Rab6ip1	Transport zwischen endosomalen Kompartimenten und TGN
Golgin-245	Golgi-assoziiertes, möglicherweise Garp-bindendes Protein
Q80ZMO	Vesikel-assoziiertes Myosin
Dab2	Endocytose, reguliert Vesikeltransport über Myosin
Bfsp2	Intermediärfilament
Alpha-Internexin	Intermediärfilament
Abcc5	ABC-Transporter
Cops3	Signalosom-Komplex Cop9, proteasomales System
Rasgrf1	Neuritenwachstum
Plakophilin4	Armadillo-Repeat Protein
Dkk3	Wnt-beta-catenin Signalkaskade
Dmap1	Transkriptionaler Repressor
Zhangfei	Transkriptionaler Repressor
NM_175245	?
Q8BUY8	?

Tabelle 4.1: Mögliche Interaktionspartner für Vps54. Die Zusammenfassung der Ergebnisse für die Suche nach Interaktionspartnern ist für das C-terminale Maus-Vps54-Fragment mit jeweiliger funktionaler Zuordnung, soweit bekannt, angegeben.

Neben diesen Proteinen, die eine offensichtliche Aufgabe im intrazellulären Vesikeltransport wahrnehmen, wurden noch Proteine mit anderen Funktionen identifiziert. So wurden in dieser Arbeit zum Beispiel zwei Intermediärfilamente als potentielle Interaktionspartner für Vps54 gefunden. Der Verlust des Bfsp2-Proteins (Synonyme: Phakinin, CP49) im Mausstamm 129 ist mit einer Linsentrübung verknüpft (Alizadeh et al., 2004). Interessanterweise wurde durch Kopplungsanalysen in einer indischen Familie mit rezessiver Retinitis Pigmentosa der humane RP28-Lokus einem relativ kleinem Kandidatengenintervall zugeordnet, in dem sich auch VPS54 befindet (Kumar et al., 2004). So wäre es denkbar, dass sich in dieser Familie eine Mutation von VPS54 über die Bindung zu Bfsp2 auswirkt und so die Erkrankung auslöst. Alpha-Internexin (Synonyme: Ina, 66kDa neurofilament protein) ist ein weiteres Intermediärfilamentprotein, das in Neuronen exprimiert wird und sich bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen als

zelluläre Einschlüsse nachweisen lässt (Cairns et al., 2004, Lariviere und Julien, 2004). Weiterhin kann alpha-Internexin hetero-Oligomere mit NFM (*neurofilament middle chain*) bilden (Yuan et al., 2003). Stammspezifische Sequenzabweichungen im NFM-Gen wurden als eine mögliche Ursache für einen verstärkten neurologischen Phänotyp für die Wobbler-Maus identifiziert (Ulbrich 2003). So könnten durch die Interaktionen von alpha-Internexin und NFM mit Vps54 axonale Transportvorgänge in Motoneuronen reguliert sein.

Eine mögliche Verbindung zum proteasomalen System, und somit den proteindegradativen Prozessen, könnte die Interaktion mit Cops3 (Synonyme: COP9 subunit3, Csn3) liefern (Schwechheimer 2004). Ein anderer möglicher Vps54-Bindepartner ist das Rasgrf1 (*ras guanine-releasing factor 1*). Hierbei handelt es sich um einen so genannten GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), der den Neurotrophin-Rezeptor TrkA aktivieren kann und wahrscheinlich Funktionen während des Neuritenwachstums von Neuronen wahrnimmt (Robinson et al., 2005).

Die zellulären Prozesse die von den restlichen möglichen Interaktionspartnern wahrgenommen werden, sind weit weniger gut untersucht. Plakophilin-4 (Synonyme: p0071, Pkp4) ist ein an den Zell-Zell-Kontaktstellen lokalisiertes Protein in Epithelzellen mit zehn Armadillo Repeats, das ERBIN (*ErbB2 receptor-interacting protein*) binden kann (Izawa et al., 2002). Dkk3 ist ein putatives Tumor-Suppressorgen, das in der Wnt-beta-catenin-Signalkaskade eine Rolle spielt (Hoang et al., 2004). Als kernlokalisierte, transkriptionale Repressoren haben sich sowohl das Dmap1 (*DNA methyltransferase 1-associated protein*, Rountree et al., 2000), als auch das Zhangfei-Protein (Misra et al., 2005), herausgestellt. NM_175245 ist ein bislang noch völlig uncharakterisiertes 79 Aminosäuren großes Arginin-reiches Protein.

Um der Frage nachzugehen, ob die Punktmutation in Vps54 die Bindung zu den identifizierten Interaktionspartnern beeinflusst, wurden die Bindungsstärken vergleichend mit dem Yeast Two-Hybrid System untersucht (3.2.4.2). Im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt war das Wachstum der kotransformierten Hefen für alle Interaktionspartner mit der Wobbler-Vps54-Variante deutlich schlechter. Auch die für eine Auswahl von sechs Interaktionspartnern durchgeführten Flüssig- β -Galactosidase Assays ergaben eine tendenziell schlechtere Bindung der Mutante (3.2.4.3). Hierfür könnten folgende Ursachen verantwortlich sein. Einerseits wäre es möglich, dass es sich bei diesem Ergebnis um ein Artefakt des Yeast Two-Hybrid Systems handelt. So wäre es denkbar, dass die Punktmutation einen negativen Einfluss auf den Kernimport des Gal4-Vps54 Fusionsproteins hat, und somit die Reporteraktivitäten reduziert werden. Vielleicht ist aber

auch die Transkript- oder Proteininstabilität des Fusionsproteins durch die *Vps54* Punktmutation in der Hefe beeinträchtigt. Lassen sich andererseits aber die gefundenen Interaktionsunterschiede mit alternativen Methoden verifizieren, so dürfte man der Ursache des Wobbler-Phänotyps auf der Spur sein. Die funktionale Beeinträchtigung einer Proteinbindestelle, und die damit verbundenen möglichen Funktionsverluste in wichtigen zellulären Prozessen, wie etwa einem gestörten intrazellulären Vesikeltransport, könnten den Wobbler-Phänotyp auslösen. Vielleicht führt aber auch die Punktmutation in *Vps54* zu einer geringeren Stabilität des Proteins, zu funktionalen Beeinträchtigungen des Garp-Komplexes, oder zu Akkumulationen.

Um letztendlich den Beweis für die *in vivo* Interaktionen der Bindepartner und den möglichen Unterschieden in der Bindestärke des Wobbler-*Vps54* zu liefern, sind weitere Experimente nötig. So werden zurzeit im Rahmen einer Diplomarbeit die Klonierungen der Interaktionspartner aus den Hefepiasmiden in einen Expressionsvektor durchgeführt und dabei mit einer Antikörper-Erkennungsstelle (*tag*) versehen. Die Expressionsvektoren werden die rekombinante Expression der möglichen Bindepartner erlauben, die dann für Koimmunpräzipitations-Experimente eingesetzt werden können. Diese Experimente könnten so die Interaktionen verifizieren und mögliche Unterschiede der Bindungsaffinitäten detektieren. Neben der biochemischen Charakterisierung sind unter Verwendung der Expressionsplasmide Kolokalisationsexperimente geplant, die in Zellkultur-Experimenten weitere Hinweise auf Interaktionen liefern könnten. Weiterhin wurde von Dr. Gleeson von der Universität Melbourne ein Expressionsplasmid erhalten, von dem ein Fusionsprotein aus GFP und *Snx5* exprimiert werden kann (Merino-Trigo et al., 2005), das für zelluläre Lokalisationsexperimente eingesetzt werden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit ist mit der Optimierung der rekombinanten Expression eines GST-*Vps54* Fusionsproteins in Bakterien begonnen worden (Daten nicht gezeigt), welches nach Aufreinigung für die Immunisierung von Kaninchen oder Mäusen zur Antikörperproduktion gegen *Vps54* eingesetzt werden kann. So wird man mit diesen Antikörpern zum Beispiel die subzelluläre Lokalisation von *Vps54* in Rückenmark und Testis aufklären können.

4.4 Differentielle Transkriptomanalyse spiegelt die Wobbler-Pathologie wieder

Durch die Verwendung eines Microarrays, basierend auf dem *arrayTAG 20k clone set* von der Firma Lion Bioscience (Drobyshev et al., 2003), konnte in der Arbeitsgruppe von Dr.

Johannes Beckers eine nahezu genomweite Suche nach differentiell exprimierten Transkripten im Rückenmark der Wobbler-Maus durchgeführt werden (3.3.1). Die in dieser Arbeit durchgeführten weitergehenden Expressionsuntersuchungen mittels qRT-PCR- (3.3.2) und Northern-Blot-Experimenten (3.3.3) konnten die durch das Microarray-Experiment erhaltenen Daten, bis auf wenige Ausnahmen, erhärten.

Viele der als differentiell exprimiert identifizierten und validierten Transkripte wurden ebenfalls bei ähnlichen Transkriptomuntersuchungen gefunden, die an verschiedenen Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen oder humanen Patientenmaterial durchgeführt worden sind. Ausgehend von diesen Untersuchungen kann man den meisten der differentiell exprimierten Gene verschiedene Teilprozesse der Wobbler-Pathologie wie etwa der Astro- und Mikrogliose zuordnen.

So ist denkbar, dass die detektierte Herunterregulierung der Neurofilamente (Nefh, Nef3 und Nefl) und des Contactins 2 (Synonyme: Axonin1, TAG-1, Brophy 2003) den Verlust von einigen Motoneuronen im Rückenmark reflektieren (Yoshihara, et al., 2002). Die Motoneurone erhöhen wahrscheinlich als eine mögliche Schutzreaktion die Expression des axonalen Membranproteins Gap43 (*growth associated protein 43*), das regenerative Aufgaben in geschädigten Motoneuronen wahrnehmen kann (Yanker, et al., 1990, Myerowitz et al., 2002). Eine Schutzfunktion gegen die aktivierte Mikroglia könnte die Hochregulierung des Clusterin-Transkripts, das für einen Complement-Inhibitor kodiert, darstellen (Anderson et al., 2005). Als Reaktion auf möglichen oxidativen Stress kann die erhöhte Transkriptabundanz des als Antioxidant wirkenden Peroxiredoxin6 angesehen werden. Ähnliches wurde bei einem anderen ALS-Mausmodell gefunden (Strey et al., 2004). Die Hochregulierung des in Vertebraten bislang noch uncharakterisierten Dhhr1 (*dehydrogenase/reductase (SDR family) member1*) könnte ebenfalls eine mögliche Schutzfunktion darstellen. Zumindest konnte für das *Drosophila*-homologe Protein ähnliches gezeigt werden (Botella et al., 2004).

Einer inflammatorischen Reaktion proliferierender Mikrogliazellen wird die Hochregulierung der Transkripte für die Complement-Komponenten C1q und C3, sowie Cathepsin D und dem Carboxypeptidase-Inhibitor Latexin zugeschrieben (van Beek et al., 2003, Myerowitz et al., 2002, Hashimoto et al., 2005, Aagaard et al., 2005). Auch könnte die Hochregulierung von Granulin (Synonyme: Acrogranin, Progranulin, PCDGF) mit der Mikrogliose assoziiert sein (Malaspina et al., 2001, He et al., 2003). CD68 (Synonym: Macrosialin) ist ein lysosomales, membranassoziertes Glycoprotein, das ebenfalls hauptsächlich in Mikrogliazellen exprimiert wird (Holness et al., 1993).

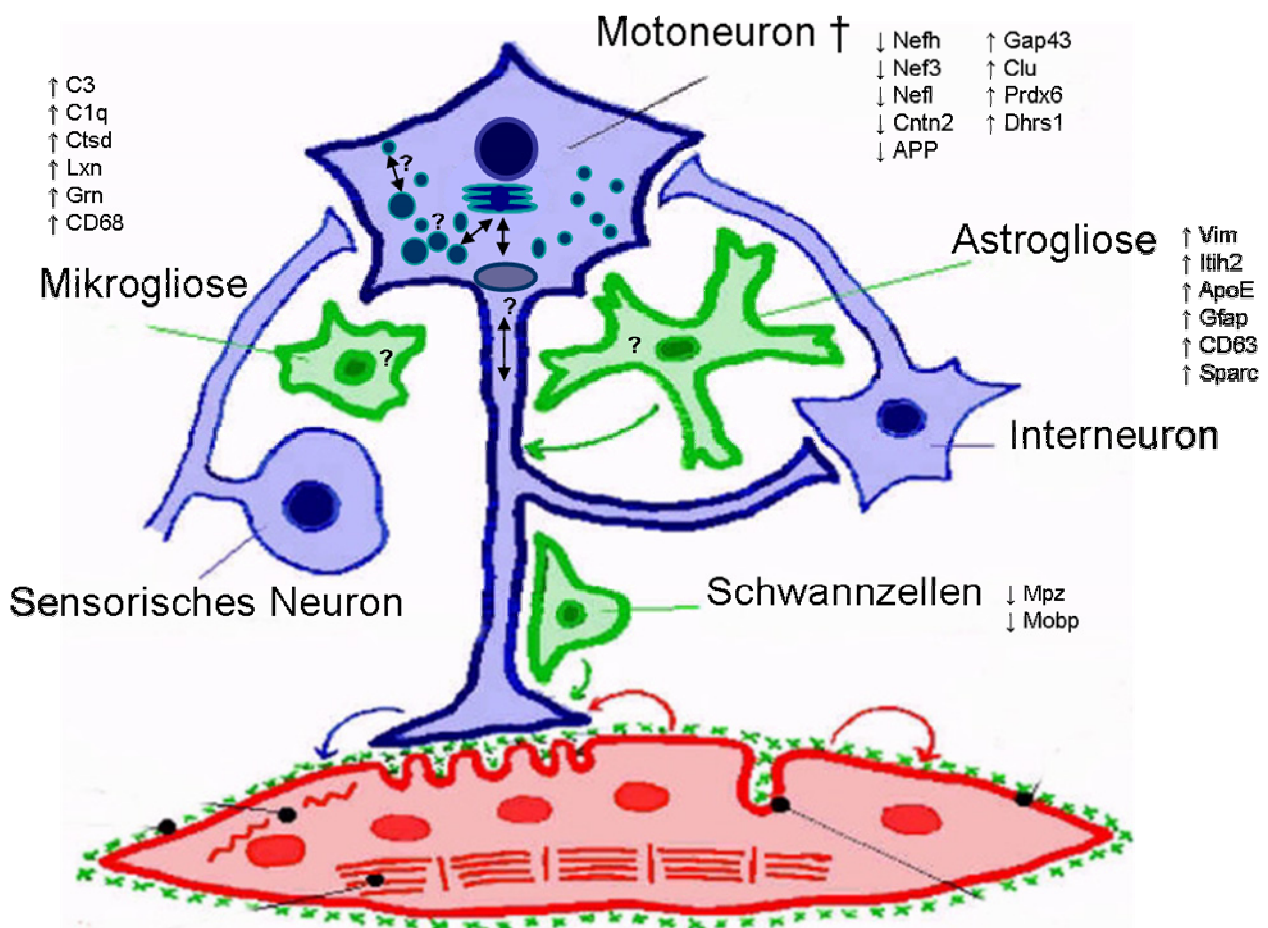


Abbildung 4.1: Simplifiziertes Schema der Wobbler-Pathologie im Rückenmark. Ein möglicher gestörter intrazellulärer Vesikeltransport führt in Motoneuronen zu Vesikelakkumulationen. Verschiedene pathologische Teilprozesse im Rückenmark von Wobbler-Tieren spiegeln sich in den detektierten Expressionsunterschieden wieder. Diese Teilprozesse umfassen die Astro- und Mikroglia, den Verlust von Myelin-bildenden Zellen und den Motoneuronverlust. Die Fragezeichen geben die zellulären Orte an, an denen Vps54 möglicherweise Funktionen ausübt, und die in Wobbler-Tieren potentiell gestört sein könnten (Abbildung verändert nach Haljos).

Die Astroglia ist durch die Hochregulierung der beiden Intermediärfilamente GFAP und Vimentin charakterisiert (Laage et al., 1988, Myerowitz et al., 2002). CD63 und ApoE kolokalisieren in Astrogliazellen, kommen aber auch in Neuronen vor (DeKroon und Armati, 2001). Die erhöhte Expression von Sparc (*secreted acidic cysteine rich glycoprotein*) und Itih2 (*inter alpha trypsin inhibitor 2*) könnte durch den entstehenden Gewebeumbau, der reaktiven Glia, erklärt werden (Bradshaw und Sage, 2001, Myerowitz et al., 2002). Der Verlust der sterbenden Axone ist mit einer geringeren Transkriptabundanz der Myelin-Komponenten Mobp (*myelin-associated oligodendrocytic basic protein*) und Mpz (*myelin protein zero*) in Myelin-bildenden Zellen verbunden.

Den anderen differentiell exprimierten Transkripten Funktionen zuzuordnen ist deutlich schwerer. Zum Teil sind diese gar nicht, oder nur wenig charakterisiert, so dass keine funktionalen Zusammenhänge zur Wobbler-Erkrankung hergestellt werden können.

Jedoch könnte die geringere Transkriptabundanz von Serf2 (small EDRK-rich factor 2) von besonderem Interesse sein. Die homologe humane Variante Serf1 (Synonym H4F5) kartiert in der für SMA-Patienten kritischen Deletionsregion 5q13 und wird als möglicher modifizierender Einfluss auf die Aggressivität des Krankheitsverlaufs diskutiert (Scharf et al., 1998). Daher könnte die Herunterregulierung von Serf2 einen Einfluss auf die Wobbler-Erkrankung haben. Weiterhin wird das APP-Transkript im Rückenmark der Wobbler-Tiere herunterreguliert. APP (*Amyloid Precursor Protein*) spielt zum Beispiel eine Rolle in der Alzheimer-Pathologie und liegt in Wobbler-Motoneuronen in Vesikeln akkumuliert vor (Schitek 2005). Die genaue zelluläre Funktion von APP ist aber noch nicht verstanden (1.1.1).

In Einzelfällen traten bei der Reproduktion der Microarray-Daten Diskrepanzen auf (Plp1, Pkp4 und Snag1). Snag1 ist von besonderem Interesse, da es sich dabei um ein noch uncharakterisiertes *Sorting Nexin*-Protein (Synonym: Snx18) handelt. Diese Gruppe von Proteinen nimmt Funktionen beim intrazellulären Vesikeltransport wahr (Worby und Dixon, 2002). Weiterhin besitzt Snx5, welches ebenfalls ein *Sorting Nexin*-Protein ist und in dieser Arbeit als möglicher Bindepartner für Vps54 charakterisiert worden ist, eine ähnliche Domänenstruktur (Worby und Dixon, 2002). So hätte die Hochregulierung des Snag1-Transkripts Hinweise für eine mögliche kompensatorische Reaktion auf einen gestörten Vesikeltransport bei Wobbler-Tieren liefern können. Auch Plakophilin-4 ist in dieser Arbeit als möglicher Interaktionspartner für Vps54 identifiziert worden (3.2.4.1), und daher könnte der detektierte Expressionsunterschied im Microarray-Experiment ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des Pkp4-Proteins an der Wobbler-Pathologie darstellen. Allerdings war es nicht möglich mit qRT-PCR-Experimenten die differentielle Regulation zu verifizieren. Hierbei wäre denkbar, dass eventuell noch unentdeckte Spleißisoformen, die mit den verwendeten Primerpaaren nicht abgedeckt worden sind, für die im Microarray-Experiment gefundene Regulation verantwortlich gemacht werden könnte. Ein weiteres Northern-Blot-Experiment mit einer Pkp4-spezifischen Sonde könnte die Frage abschließend klären. Überraschend war, dass sich die Herunterregulierung der Myelin-Komponente Plp1 (*proteolipid protein 1*) in Northern-Blot- und qRT-PCR-Experimenten nicht reproduzieren ließ. Andere Myelin-Komponenten, wie das Mobp und das Mpz werden dagegen in Wobbler-Tieren deutlich herunterreguliert.

Um die differentielle Regulation der Gene in einen kausalen Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der Wobbler-Erkrankung zu bringen, sind weitere Untersuchungen nötig. So könnten durch *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen an Wobbler-

Rückenmarksschnitten die Zelltypen identifiziert werden, welche die differentielle Expression der funktional bislang uncharakterisierten Gene bedingen.

4.5 Pathomechanismus der Wobbler-Erkrankung

Durch die funktionale Charakterisierung von Hefe-Vps54 in der Literatur und die in dieser Arbeit identifizierten Bindepartner des C-terminalen Teils von Maus-Vps54 (siehe 4.3), kann man auf einen gestörten intrazellulären Vesikeltransport als Ursache für die Wobbler-Erkrankung schließen. Unterstützt wird diese Hypothese durch histologische Untersuchungen an Rückenmarksschnitten der Wobbler-Maus. So konnten deutliche Akkumulation von vesikulären Strukturen in den Perikarien von Motoneuronen identifiziert werden (Duchen und Strich, 1968, Duchen 1978, Mitsumoto und Bradley, 1982). Weiterhin konnte in einer detaillierten Studie gezeigt werden, dass der Untergang der Axone zeitlich auf die Vakuolisierung der Perikarien folgt (Mitsumoto und Bradley, 1982). Ultrastrukturell sind somit die ersten morphologischen Änderungen in der Wobbler-Pathologie mit Vesikelakkumulation in Neuronen verknüpft (Duchen 1978). Diese Beobachtungen können durch einen möglicherweise gestörten Fusionsprozess von Vesikeln mit einem Zielkompartiment erklärt werden, die durch den Aminosäureaustausch L967Q im Vps54-Protein bei den Wobbler-Tieren verursacht wird. Denkbar wäre zum Beispiel die Akkumulation von retrograd transportierten Vesikeln, die nicht mehr mit endosomalen, oder Golgi-Zielmembranen fusionieren können (Abb. 4.1) und so zu einer zunehmenden Vakuolisierung der Perikarien führen. Zusätzlich könnten diese Vesikel als eine physikalische Barriere den axonalen Transport blockieren und so den Untergang der Axone bedingen. Das mutierte Vps54 könnte aber auch direkt störend in den axonalen Transport eingreifen. Hinweise darauf ergaben sich durch eine Studie, bei der das dominante *wallerian slow degeneration (Wlds)* Allel in den Wobbler-Stamm eingekreuzt worden ist (Kostenko et al., 2004). Das *Wlds*-Allel (Mack et al., 2001), welches protektiv den axonalen Transport unterstützt und axonale Degeneration inhibiert (Araki et al., 2004), konnte den Untergang der Motoneurone in Wobbler-Tieren signifikant verzögern (Kostenko et al., 2004). Eine andere Möglichkeit wie Vps54 den Wobbler-Phänotyp auslösen könnte, sind mögliche Vesikeltransportdefekte in umliegenden Gliazellen, jedoch scheint dieses aufgrund der oben diskutierten histologischen Daten unwahrscheinlich, ist aber nicht auszuschließen. Auch sind die kürzlich detektierten mitochondrialen Dysfunktionen in Wobbler-Neuronen (Dave et al., 2003, Dave et al., 2005) eher als

sekundär zu bewerten. Die in dieser Arbeit identifizierten Expressionsunterschiede in Wobbler-Tieren reflektieren hauptsächlich die sekundären Konsequenzen der Mutation, die sich histologisch durch die reaktive Gliose und axonale Degeneration darstellen.

Für den Spermatogenesedefekt in Wobbler-Männchen lassen sich ebenfalls histologische Hinweise für einen gestörten Vesikeltransport finden. So können proakrosomale Vesikel in Wobbler-Spermatozoen nicht fusionieren (Heimann et al., 1991). Die Wobbler-Mutation in *Vps54* könnte auch hier durch gestörte Fusionsprozesse der Vesikel mit den Zielkompartimenten zu diesem Defekt führen, oder den Vesikeltransport der proakrosomalen Vesikel zu den Zielkompartimenten unterbinden.

4.6 VPS54: Ein Kandidat für humane neurodegenerative Erkrankungen?

Beim Menschen ist das *Vps54*-Gen auf Chromosom 2p14 lokalisiert. In Datenbanken (OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*) lassen sich für diesen Bereich keine Kartierungen für humane neurodegenerative Erkrankungen finden, deren ursächliche Mutation noch nicht identifiziert worden ist (Daten nicht gezeigt). In der Nähe kartiert der *PARK3*-Lokus (2p13, OMIM: 602404), der aber physikalisch über 10Mb entfernt liegt, so dass *VPS54* hier als Kandidat unwahrscheinlich ist. Auch die anderen beiden Mitglieder des Garp-Komplexes, *VPS53* und *VPS52*, können nicht über Kartierungen in der Datenbank mit humanen neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Trotzdem erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass in seltenen, derzeit noch nicht kartierten, neurodegenerativen Erkrankungen Mutationen in *VPS54*, oder seinen Bindepartnern, entdeckt werden können. So wurden zum Beispiel bei fast 80% der erblichen, phänotypisch heterogenen ALS-Fälle, das krankheitsauslösende Gen noch nicht identifiziert (Cleveland und Rothstein, 2001). Aus diesem Grund werden derzeit in Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von Dr. Chris Shaw, Abteilung für klinische Neurologie, Institute für Psychatrie, King's College London, und Dr. Christoph Hübner, Abteilung für Neuropedatrie, Charité Berlin, in Pilotstudien mit humanem ALS- und SMA-Patientenmaterial nach möglichen *VPS54*-Mutationen gesucht. Besonders vielversprechend ist dieser Ansatz bei einer Subpopulation von SMA-Patienten, die an der infantilen SMARDnon1- (*spinal muscular atrophy with respiratory distress non type1*) Erkrankung leiden. So bildet die Wobbler-Maus viele der klinischen Zeichen dieser Patienten gut ab (Hübner, pers. Mitteilung). Zusammen mit histologischen Untersuchungen sollen so weitere mögliche Verbindungen von humanen

Motoneuronerkrankungen zu gestörtem Vesikeltransport aufgezeigt werden. Hinweise, dass Proteine die in Vesikeltransportprozesse involviert sind, humane ALS oder ähnliche Erkrankungen auslösen können, haben erst kürzlich die Untersuchungen zu Alsin, VAPB und Dynamin-2 eindrucksvoll geliefert (Topp et al., 2004, Nishimura et al., 2004, Zuchner et al., 2005).

4.7 Ausblick

Die Identifizierung des Wobbler-Gens *Vps54* eröffnet neue Möglichkeiten der Betrachtung von intrazellulären Transportprozessen in Neuronen und Spermatozoen. So wird die Verifizierung und biochemische Charakterisierung der in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner nicht nur helfen den genauen Pathomechanismus der Wobbler-Erkrankung zu klären, sondern wird auch ein breiteres Verständnis für den Prozess des spezialisierten Vesikeltransports von Neuronen und seiner möglichen Störungen liefern. Durch die Aufklärung dieser Prozesse wird man zukünftig vielleicht in der Lage sein, neue Angriffspunkte für eine therapeutische Intervention vorzuschlagen.

Auch können die in dieser Arbeit gewonnenen Einsichten über die ursächliche Beteiligung eines Vesikeltransportproteins an der Ausprägung einer Motoneuronerkrankung zur Identifizierung von Krankheitsgenen in anderen Mausmodellen beitragen. So zeigt zum Beispiel die *mdf*-Maus (*muscle deficient*), ebenso wie die Wobbler-Maus, Vesikelakkumulation in Motoneuronen (Blot et al., 1995). Der *mdf*-kritische Bereich wurde auf eine genreiche Region des Mauschromosoms 19 kartiert (Poirier et al., 1998). In dem Kandidatenintervall befinden sich einige Gene, die Funktionen im Vesikeltransport wahrnehmen könnten, darunter unter anderem ein *Sorting Nexin*-Protein (Snx15). Man könnte nun versuchen sich gezielt Kandidatengene auszusuchen und einer Mutationsanalyse zu unterziehen, um so das *mdf*-Gen zu identifizieren. Falls sich in einem Gen, das in Vesikeltransportvorgänge involviert ist, Mutationen finden lassen, wäre es weiterhin interessant beide Mausmodelle zu kreuzen und die daraus hervorgehenden Tiere zu analysieren. Es wäre denkbar, dass sowohl *wr* als auch *mdf* Defekte an den gleichen zellulären Transport- oder Vesikelfusions-Mechanismen verursachen.

Die dringlichsten Fragen, die jetzt zu bearbeiten sind, befassen sich mit der Charakterisierung der *Vps54* ^{β -geo} Trap-Mäuse, die zurzeit in der laufenden Dissertation von Anke Mußmann bearbeitet werden. Erste Analysen zeigen, dass homozygote (*Vps54* ^{β -geo}/*Vps54* ^{β -geo}) Mäuse embryonale letal sind (Mußmann, pers. Mitteilung). Somit stellt die

Punktmutation in *Vps54* bei der Wobbler-Maus nur einen partiellen Funktionsverlust (*loss of function*) des *Vps54*-Proteins dar. Bedingt durch die frühe embryonale Letalität der homozygoten (*Vps54* ^{β -geo}/*Vps54* ^{β -geo}) Mäuse können Defekte, die durch den Verlust von *Vps54* erst in späteren Entwicklungsstadien auftreten, derzeit noch nicht analysiert werden. Aus diesem Grund wird von Anke Mußmann ein konditionales Nullallel erzeugt, mit dem eine gewebespezifische und zeitlich determinierte Depletion von *Vps54* möglich wird. Die Analysen dieser Tiere können so die Funktionen von *Vps54* weiter aufklären.

Ein anderer Ansatz wird in einer laufenden Diplomarbeit verfolgt. Es ist möglich Primärzellkulturen aus Wildtyp-, Wobbler- und den *Vps54* ^{β -geo} Trap-Tieren zu etablieren, an denen sich Vesikeltransportprozesse direkt studieren lassen. An diesen Zellen können zum Beispiel Endocytoseuntersuchungen, subzelluläre Lokalisationsexperimente und strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden, die eine tiefere funktionale Charakterisierung des *Vps54*-Proteins erlauben.

Mit Spannung wird man die ersten Ergebnisse der Mutationsanalysen von humanen ALS- und SMARD-Patienten erwarten können, die die Wichtigkeit der Entdeckung des Wobbler-Gens unterstreichen könnten.

5 Literatur

- Aagaard A, Listwan P, Cowieson N, Huber T, Ravasi T, Wells CA, Flanagan JU, Kellie S, Hume DA, Kobe B, Martin JL (2005) An inflammatory role for the mammalian carboxypeptidase inhibitor latexin: relationship to cystatins and the tumor suppressor TIG1. *Structure (Camb)* 13(2):309-17
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW (2003) The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54(3):283-6
- Alizadeh A, Clark J, Seeberger T, Hess J, Blankenship T, FitzGerald PG (2004) Characterization of a mutation in the lens-specific CP49 in the 129 strain of mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(3):884-91
- Anderson AJ, Najbauer J, Huang W, Young W, Robert S (2005) Upregulation of Complement Inhibitors in Association with Vulnerable Cells following Contusion-Induced Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 22(3):382-97
- Andrew SE, Goldberg YP, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman M, Graham RK, Hayden MR (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4(4):398-403
- Andrews JM, Maxwell DS (1967) Ultrastructural features of anterior horn cell degeneration in the wobbler (wr) mouse. *Anat Rec* 157:206
- Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin SQ, Jordanova A, Kremensky I, Christodoulou K, Middleton LT, Sivakumar K, Ionasescu V, Funalot B, Vance JM, Goldfarb LG, Fischbeck KH, Green ED (2003) Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* 72(5):1293-9
- Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305(5686):1010-3
- Asheuer M, Bieche I, Laurendeau I, Moser A, Hainque B, Vidaud M, Aubourg P (2005) Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* Mar 30; [Epub ahead of print]
- Augustin M, Heimann P, Rathke S, Jockusch H (1997) Spinal muscular atrophy gene wobbler of the mouse: evidence from chimeric spinal cord and testis for cell-autonomous function. *Dev Dyn* 209: 286-295
- Bassel GJ, Kelic S (2004) Binding proteins for mRNA localization and local translation, and their dysfunction in genetic neurological disease. *Curr Opin Neurobiol* 14:574-581
- Beckers J, Herrmann F, Rieger S, Drobyshv AL, Horsch M, Hrabe de Angelis M, Seliger B (2005) Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. *Int J Cancer* 114(4):590-7
- Beffert U, Danik M, Krzywkowski P, Ramassamy C, Berrada F, Poirier J (1998) The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 27(2):119-42
- Bertoli-Avella AM, Oostra BA, Heutink P (2004) Chasing genes in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Hum Genet* 114(5):413-38
- Billingsley ML, Kincaid RL (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 323 (Pt 3):577-91
- Blot S, Poirier C, Dreyfus PA (1995) The mouse mutation muscle deficient (mdf) is characterized by a progressive motoneuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 54(6):812-25
- Boillee S, Peschanski M, Junier MP (2003) The wobbler mouse: A neurodegeneration jigsaw puzzle. *Molecular Neurobiology* 28: 65-106

- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meo G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299(5604):256-9
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10:S2-S9
- Botella JA, Ulschmid JK, Gruenewald C, Moehle C, Kretzschmar D, Becker K, Schneuwly S (2004) The *Drosophila* carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr Biol* 14(9):782-6
- Bradshaw AD, Sage EH (2002) SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 107(9):1049-54
- Bray N, Dubchak I, Pachter L (2003) AVID: A Global Alignment Program. *Genome Research*, 13:97
- Brophy PJ (2003) Myelinated nerves: filling in the juxtaparanodal gap. *Curr Biol* 13(24):R956-7
- Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723-49
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Bulet P, Violette L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32(3):479-82
- Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, Vance JM, Strittmatter WJ (1996) Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH. *Nat Med* 2(3):347-50
- Caenepeel S, Charyczak G, Sudarsanam S, Hunter T, Manning G (2004) The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *PNAS* 101(32):11707-12
- Cairns NJ, Zhukareva V, Uryu K, Zhang B, Bigio E, Mackenzie IR, Gearing M, Duyckaerts C, Yokoo H, Nakazato Y, Jaros E, Perry RH, Lee VM, Trojanowski JQ (2004) alpha-internexin is present in the pathological inclusions of neuronal intermediate filament inclusion disease. *Am J Pathol* 164(6):2153-61
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65(3):664-70
- Castrillon DH, Gonczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Viswanathan S, DiNardo S, Wasserman SA (1993) Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* 135(2):489-505
- Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin BA, Nicholson GA, Auer-Grumbach M, Wagner K, De Jonghe P, Griffin JW, Fischbeck KH, Timmerman V, Cornblath DR, Chance PF. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 74(6):1128-35
- Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302(5642):113-7
- Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2(11):806-19
- Conboy MJ, Cyert MS (2000) Luv1p/Rki1p/Tcs3p/Vps54p, a yeast protein that localizes to the late Golgi and early endosome, is required for normal vacuolar morphology. *Mol Biol Cell* 11(7):2429-43
- Conibear E, Cleck JN, Stevens TH (2003) Vps51p mediates the association of the GARP (Vps52/53/54) complex with the late Golgi t-SNARE Tlg1p. *Mol Biol Cell* 14(4):1610-23
- Conibear E, Stevens TH (2000) Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi. *Mol Biol Cell* 11(1):305-23
- Cornett J, Cao F, Wang CE, Ross CA, Bates GP, Li SH, Li XJ (2005) Polyglutamine expansion of huntingtin impairs its nuclear export. *Nat Genet* 37(2):198-204

- Cox GA, Mahaffey CL, Frankel WN (1998) Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele. *Neuron* 21(6):1327-37
- Dance AL, Miller M, Seragaki S, Aryal P, White B, Aschenbrenner L, Hasson T (2004) Regulation of myosin-VI targeting to endocytic compartments. *Traffic* 5(10):798-813
- Dave KR, Bradley WG, Perez-Pinzon MA (2003) Early mitochondrial dysfunction occurs in motor cortex and spinal cord at the onset of disease in the Wobbler mouse. *Exp Neurol* 182(2):412-20
- Dave KR, Raval AP, Purroy J, Kirkinetzos IG, Moraes CT, Bradley WG, Perez-Pinzon MA (2005) Aberrant deltaPKC activation in the spinal cord of Wobbler mouse: a model of motor neuron disease. *Neurobiol Dis* 18(1):126-33
- DeKroon RM, Armati PJ (2001) The endosomal trafficking of apolipoprotein E3 and E4 in cultured human brain neurons and astrocytes. *Neurobiol Dis* 8(1):78-89
- Denti S, Sirri A, Cheli A, Rogge L, Innamorati G, Putignano S, Fabbri M, Pardi R, Bianchi E (2004) RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 279(13):13027-34
- Drobyshev AL, Machka C, Horsch M, Seltmann M, Liebscher V, Hrabe de Angelis M, Beckers J (2003) Specificity assessment from fractionation experiments (SAFE): a novel method to evaluate microarray probe specificity based on hybridisation stringencies. *Nucleic Acids Res* 31(2):E1-1
- Duchen LW (1978) Motor neuron diseases in man and animals. *Invest Cell Pathol* 1(3):249-62
- Duchen LW, Strich SJ (1968) An hereditary motor neuron disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant wobbler. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 31: 535-542
- Egan S, Cohen B, Sarkar M, Ying Y, Cohen S, Singh N, Wang W, Flock G, Goh T, Schachter H (2000) Molecular cloning and expression analysis of a mouse UDP-GlcNAc:Gal(beta1-4)Glc(NAc)-R beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase homologous to *Drosophila melanogaster* Brainiac and the beta1,3-galactosyltransferase family. *Glycoconj J*, 17(12):867-75
- Esler WP, Marshall JR, Stimson ER, Ghilardi JR, Vinters HV, Mantyh PW, Maggio JE (2002) Apolipoprotein E affects amyloid formation but not amyloid growth in vitro: mechanistic implications for apoE4 enhanced amyloid burden and risk for Alzheimer's disease. *Amyloid* 9(1):1-12
- Everett CM, Wood NW (2004) Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* 127(Pt 11):2385-405
- Fabrizio JJ, Hime G, Lemmon SK, Bazinet C (1998) Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125(10):1833-43
- Falconer DS (1956) *Mouse News Lett* 15: 23
- Feany MB, La Spada AR (2003) Polyglutamines stop traffic: axonal transport as a common target in neurodegenerative diseases. *Neuron* 40(1):1-2
- Fiedler TA, Karpova TS, Fleig U, Young ME, Cooper JA, Hegemann JH (2002) The vesicular transport protein Cgp1p/Vps54p/Tcs3p/Luv1p is required for the integrity of the actin cytoskeleton. *Mol Genet Genomics* 268(2):190-205
- Florea L, Hartzell G, Zhang Z, Rubin GM, Miller W (1998) A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res.* 8, 967-974
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2004) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10: 1055-1063
- Fuchs S (2001) Mutationsanalyse von Kandidatengenen für die neurologische Mutation *wobbler* der Maus. Dissertation, *Universität Bielefeld*
- Fuchs S, Resch K, Thiel C, Ulbrich M, Platzer M, Jockusch H, Schmitt-John T (2002) Comparative transcription map of the wobbler critical region on mouse chromosome 11 and the homologous region on human chromosome 2p13-14. *BMC Genet* 3(1):14
- Gaudet J, VanderElst I, Spence AM (1996) Post-transcriptional regulation of sex determination in *Caenorhabditis elegans*: widespread expression of the sex-determining gene *fem-1* in both sexes. *Mol Biol Cell* 7(7):1107-21

- Gendron NH, MacKenzie AE (1999) Spinal muscular atrophy: molecular pathophysiology. *Curr Opin Neurol* 12:137-142
- Gloeckner CJ, Mayerhofer PU, Landgraf P, Muntau AC, Holzinger A, Gerber JK, Kammerer S, Adamski J, Roscher AA (2000) Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem Biophys Res Commun* 271(1):144-50
- Gregory SG, Sekhon M, Schein J, Zhao S, Osoegawa K, Scott CE, Evans RS, Burridge PW, Cox TV, Fox CA, Hutton RD, Mullenger IR, Phillips KJ, Smith J, Stalker J, Threadgold GJ, Birney E, Wylie K, Chinwalla A, Wallis J, Hillier L, Carter J, Gaige T, Jaeger S, Kremitzki C, Layman D, Maas J, McGrane R, Mead K, Walker R, Jones S, Smith M, Asano J, Bosdet I, Chan S, Chittaranjan S, Chiu R, Fjell C, Fuhrmann D, Girn N, Gray C, Guin R, Hsiao L, Krzywinski M, Kutsche R, Lee SS, Mathewson C, McLeavy C, Messervier S, Ness S, Pandoh P, Prabhu AL, Saeedi P, Smailus D, Spence L, Stott J, Taylor S, Terpstra W, Tsai M, Vardy J, Wye N, Yang G, Shatsman S, Ayodeji B, Geer K, Tsegaye G, Shvartsbeyn A, Gebregeorgis E, Krol M, Russell D, Overton L, Malek JA, Holmes M, Heaney M, Shetty J, Feldblyum T, Nierman WC, Catanese JJ, Hubbard T, Waterston RH, Rogers J, de Jong PJ, Fraser CM, Marra M, McPherson JD, Bentley DR (2002) A physical map of the mouse genome. *Nature* 418(6899):743-50
- Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hubner C, Martini R, Sendtner M (2004) Characterization of Ighmbp2 in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Hum Mol Genet* 13(18):2031-42
- Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt-Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmshurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Hubner C (2001) Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet* 29(1):75-7
- Guilherme A, Soriano NA, Bose S, Holik J, Bose A, Pomerleau DP, Furcinitti P, Leszyk J, Corvera S, Czech MP (2004) EHD2 and the novel EH domain binding protein EHBP1 couple endocytosis to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 279(11):10593-605
- Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29(2):166-73
- Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* 300(5620):808-12
- Hahn (2004) Detaillierte Sequenzanalyse der Gene im *wobbler*-kritischen Bereich und Identifikation einer Mutation in einem Kandidatengen. Diplomarbeit, *Universität Bielefeld*
- Hall CV, Jacob PE, Ringold GM, Lee F (1983) Expression and regulation of Escherichia coli lacZ gene fusions in mammalian cells. *J Mol Appl Genet* 2(1):101-9
- Hardison RC, Oeltjen J, Miller W (1997) Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome. *Genome Res* 7(10):959-66
- Hashimoto M, Koda M, Ino H, Yoshinaga K, Murata A, Yamazaki M, Kojima K, Chiba K, Mori C, Moriya H (2005) Gene expression profiling of cathepsin D, metallothioneins-1 and -2, osteopontin, and tenascin-C in a mouse spinal cord injury model by cDNA microarray analysis. *Acta Neuropathol (Berl)* 109(2):165-80
- He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A (2003) Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med* 9(2):225-9
- Heard E (2004) Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 16(3):247-55
- Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J (2000) A Concise Guide to cDNA Microarray Analysis. *BioTechniques* 29 (3): 548-562

- Heimann P, Laage S, Jockusch H (1991) Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse, wobbler (WR). *Differentiation* 47(2):77-83
- Heintz N (2001) BAC to the future: the use of bac transgenic mice for neuroscience research. *Nat Rev Neurosci* 2(12):861-70
- Hemler ME (2001) Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 155(7):1103-7
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge MI, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S (2002) A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52(5):549-55
- Hoang BH, Kubo T, Healey JH, Yang R, Nathan SS, Kolb EA, Mazza B, Meyers PA, Gorlick R (2004) Dickkopf 3 inhibits invasion and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt-beta-catenin pathway. *Cancer Res* 64(8):2734-9
- Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374,166
- Holmes SE, O'Hearn E, Margolis RL (2003) Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenet Genome Res* 100(1-4):189-97
- Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, Callahan C, Hwang HS, Ingersoll-Ashworth RG, Fleisher A, Stevanin G, Brice A, Potter NT, Ross CA, Margolis RL (2001) A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet* 29(4):377-8
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieria-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23(4):391-2
- Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL (1993) Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/Igp family. *J Biol Chem* 268(13):9661-6
- Holzbaur ELF (2004) Motor neurons rely on motor proteins. *Trends in Cell Biol* 14(5):233-240
- Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9(9):868-77
- Hubner K, Windoffer R, Hutter H, Leube RE (2002) Tetraspan vesicle membrane proteins: synthesis, subcellular localization, and functional properties. *Int Rev Cytol* 214:103-59
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393(6686):702-5
- Irobi J, Van Impe K, Seeman P, Jordanova A, Dierick I, Verpoorten N, Michalik A, De Vriendt E, Jacobs A, Van Gerwen V, Vennekens K, Mazanec R, Tournev I, Hilton-Jones D, Talbot K, Kremensky I, Van Den Bosch L, Robberecht W, Van Vandekerckhove J, Broeckhoven C, Gettemans J, De Jonghe P, Timmerman V. (2004) Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet* 36(6):597-601
- Iwabuchi K, Li B, Bartel P, Fields S (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8(6):1693-6
- Izawa I, Nishizawa M, Tomono Y, Ohtakara K, Takahashi T, Inagaki M (2002) ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes Cells* 7(5):475-85
- Jensen-Seaman MI, Furey TS, Payseur BA, Lu Y, Roskin KM, Chen CF, Thomas MA, Haussler D, Jacob HJ (2004) Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Res* 14(4):528-38
- Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85(2):149-58

- Jones JM, Datta P, Srinivasula SM, Ji W, Gupta S, Zhang Z, Davies E, Hajnoczky G, Saunders TL, Van Keuren ML, Fernandes-Alnemri T, Meisler MH, Alnemri ES (2003) Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of *mnd2* mutant mice. *Nature* 425(6959):721-7
- Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J, Payami H, Nutt J, Maraganore DM, Czyzewski K, Styczynska M, Wszolek ZK, Farrer MJ, Toft M (2005) Identification of a Novel LRRK2 Mutation Linked to Autosomal Dominant Parkinsonism: Evidence of a Common Founder across European Populations. *Am J Hum Genet* 76(4):672-80
- Kamal A, Almenar-Queralta A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414(6864):643-8
- Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, Goldstein LS (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28(2):449-59
- Kaupmann K, Simon-Chazottes D, Guénet JL, Jockusch H (1992) Wobbler, a mutation affecting motoneuron survival and gonadal functions in the mouse, maps to proximal chromosome 11. *Genomics* 13: 39-43
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2003) The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res* 103(3-4):337-44
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2004) The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67(4):271-84
- Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y (2004) The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* 427:510-7
- Koh CG, Tan EJ, Manser E, Lim L (2002) The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr Biol* 12(4):317-21
- Kostenko V, Zhang J, Piro EP (2004) Slow wallerian degeneration gene (*Wlds*) rescues the wobbler ALS phenotype. *R-AMA* 1(1):20
- Krüger J, Sczyrba A, Kurtz S, Giegerich R (2004) e2g: an interactive web-based server for efficiently mapping large EST and cDNA sets to genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 32: W301-4
- Krüger R (2004) Genes in familial parkinsonism and their role in sporadic Parkinson's disease. *J Neurol* 251(S6):VI/2-VI/6
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18(2):106-8
- Krupa A, Abhinandan KR, Srinivasan N (2004) KinG: a database of protein kinases in genomes. *Nucleic Acids Res.* 32(Database issue):D153-5
- Kumar A, Shetty J, Kumar B, Blanton SH (2004) Confirmation of linkage and refinement of the RP28 locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 2p14-p15 in an Indian family. *Mol Vis* 10:399-402
- La Spada AR, Taylor JP (2003) Polyglutamines placed into context. *Neuron* 38(5):681-4
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352(6330):77-9
- Laage S, Zobel G, Jockusch H (1988) Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal muscular atrophy, Wobbler. *Dev Neurosci* 10: 190-198
- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34(5):715-27
- Lariviere RC, Julien JP (2004) Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 58(1):131-48

- Lee NH, Weinstock KG, Kirkness EF, Earle-Hughes JA, Fuldner RA, Marmaros S, Glodek A, Gocayne JD, Adams MD, Kerlavage AR, Fraser CM, Venter JC (1995) Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment. *PNAS* 92: 8303-8307
- Leestma JE, Sepsenwol S (1980) Sperm tail axoneme alterations in the Wobbler mouse. *J Reprod Fertil* 58(1):267-70
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paslier D, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80(1):155-65
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395(6701):451-2
- Ley L, Herdegen T (2004) Neuroprotektive Therapien für neurodegenerative Erkrankungen. *Arzneimitteltherapie* 22:328-35
- Li B, Fields S (1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* 7(10):957-63
- Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin and its role in neuronal degeneration. *Neuroscientist* 10(5):467-75
- Ligon LA, Lamonte BH, Wallace KE, Weber N, Kalb RG, Holzbaur EL (2005) Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport* 16(6):533-536
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111(2):209-18
- Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM, Wang ZE, Miller W, Rubin EM, Frazer KA (2000) Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* 288(5463):136-40
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *PNAS* 96:6307-6311
- Lücking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 342(21):1560-7
- Mack TG, Reiner M, Beirowski B, Mi W, Emanuelli M, Wagner D, Thomson D, Gillingwater T, Court F, Conforti L, Fernando FS, Tarlton A, Andressen C, Addicks K, Magni G, Ribchester RR, Perry VH, Coleman MP. (2001) Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nat Neurosci* 4(12):1199-206
- Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J (2001) Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *J Neurochem* 77(1):132-45
- Margolis RL, Holmes SE, Rosenblatt A, Gourley L, O'Hearn E, Ross CA, Seltzer WK, Walker RH, Ashizawa T, Rasmussen A, Hayden M, Almqvist EW, Harris J, Fahn S, MacDonald ME, Mysore J, Shimohata T, Tsuji S, Potter N, Nakaso K, Adachi Y, Nakashima K, Bird T, Krause A, Greenstein P (2004) Huntington's Disease-like 2 (HDL2) in North America and Japan. *Ann Neurol* 56(5):670-4
- Mattick JS (2004) RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* 5(4):316-23
- Mayor C, Brudno M, Schwartz JR, Poliakov A, Rubin EM, Frazer KA, Pachter LS, Dubchak I (2000) VISTA: Visualizing Global DNA Sequence Alignments of Arbitrary Length. *Bioinformatics* 16:1046
- Merino-Trigo A, Kerr MC, Houghton F, Lindberg A, Mitchell C, Teasdale RD, Gleeson PA (2005) Sorting nexin 5 is localized to a subdomain of the early endosomes and is recruited to the plasma membrane following EGF stimulation. *J Cell Sci* 117(Pt 26):6413-24
- Miller DW, Hague SM, Clarimon J, Baptista M, Gwinn-Hardy K, Cookson MR, Singleton AB (2004) Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 62(10):1835-8

- Misra V, Rapin N, Akhova O, Bainbridge M, Korchinski P (2005) Zhangfei Is a Potent and Specific Inhibitor of the Host Cell Factor-binding Transcription Factor Luman. *J Biol Chem* 280(15):15257-66
- Mitsumoto H, Bradley WG (1982) Murine motor neuron disease (the wobbler mouse): degeneration and regeneration of the lower motor neuron. *Brain* 105:811-834
- Monier S, Jollivet F, Janoueix-Lerosey I, Johannes L, Goud B (2002) Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic* 3(4):289-97
- Mühlhardt C (2000) Der Experimentator Molekularbiologie. 2. Auflage *Spektrum Akademischer Verlag*
- Myerowitz R, Lawson D, Mizukami H, Mi Y, Tiffit CJ, Proia RL (2004) Molecular pathophysiology in Tay-Sachs and Sandhoff diseases as revealed by gene expression profiling. *Hum Mol Genet* 11(11):1343-50
- Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JR, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 75(5):822-31
- Ogino S, Wilson RB (2002) Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet* 111(6):477-500
- Ogino S, Wilson RB (2004) Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 4(1):15-29
- Ohinata Y, Sutou S, Kondo M, Takahashi T, Mitsui Y (2002) Male-enhanced antigen-1 gene flanked by two overlapping genes is expressed in late spermatogenesis. *Biol Reprod* 67(6):1824-31
- Oka T, Krieger M (2005) Multi-component protein complexes and Golgi membrane trafficking. *J Biochem (Tokyo)* 137(2):109-14
- Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, de Munain AL, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44(4):595-600
- Panic B, Whyte JR, Munro S. (2003) The ARF-like GTPases Arl1p and Arl3p act in a pathway that interacts with vesicle-tethering factors at the Golgi apparatus. *Curr Biol* 13(5):405-10
- Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G (2002) The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol* 14(3):305-312
- Piemonte and Valle d'Aosta Register for Amyotrophic Lateral Sclerosis (PARALS) (2001) Incidence of ALS in Italy: evidence for a uniform frequency in Western countries. *Neurology* 56(2):239-44
- Pigino G, Morfini G, Pelsman A, Mattson MP, Brady ST, Busciglio J (2003) Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci* 23(11):4499-508
- Poirier C, Blot S, Fernandes M, Carle GF, Stanescu V, Stanescu R, Guenet JL (1998) A high-resolution genetic map of mouse chromosome 19 encompassing the muscle-deficient osteochondrodystrophy (mdf-ocd) region. *Mamm Genome* 9(5):390-1
- Polymeropoulos MH, Higgins MH, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenross ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274:1197-1198
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenross ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papepetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL, (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047
- Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH Jr, Ludlow CL, Fischbeck KH (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33(4):455-6
- Ramalho-Santos J, Moreno RD, Wessel GM, Chan EK, Schatten G (2001) Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis. *Exp Cell Res* 267(1):45-60

- Rathke-Hartlieb S, Schmidt VC, Jockusch H, Schmitt-John T, Bartsch JW (1999) Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *NeuroReport* 10: 3411-3416
- Reggiori F, Wang CW, Stromhaug PE, Shintani T, Klionsky DJ (2003) Vps51 is part of the yeast Vps fifty-three tethering complex essential for retrograde traffic from the early endosome and Cvt vesicle completion. *J Biol Chem* 278(7):5009-20
- Resch K, Korthaus D, Wedemeyer N, Lengeling A, Ronsiek M, Thiel C, Baer K, Jockusch H, Schmitt-John T. (1998) Homology between human chromosome 2p13.3 and the wobbler critical region on mouse chromosome 11: comparative high-resolution mapping of STS and EST loci on YAC/BAC contigs. *Mamm Genome* 9(11):893-8
- Robinson KN, Manto K, Buchsbaum RJ, MacDonald JI, Meakin SO (2005) Neurotrophin-dependent tyrosine phosphorylation of Ras guanine-releasing factor 1 and associated neurite outgrowth is dependent on the HIKE domain of TrkA. *J Biol Chem* 280(1):225-35
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362(6415):59-62
- Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10: S10-S17
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25(3):269-77
- Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344(22):1688-1700
- Salic A, Waters JC, Mitchison TJ (2004) Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* 118(5):567-78
- Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM (1998) Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet* 20(1):83-6
- Schitek S (2005) Immunhistologische Untersuchung der Wobbler- Maus und Identifizierung der Kolokalisation von APP und Rab7. Diplomarbeit, *Universität Bielefeld*
- Schmitt-John T, Schmidt VC, Augustin M, Korthaus D, Jockusch H (1999) A new genetical strategy for the positional cloning of mouse disease genes. *BIOforum* 22: 86-90
- Schwechheimer C (2004) The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3):45-54
- Seitz A, Kragol M, Aglow E, Showe L, Heber-Katz E (2003) Apolipoprotein E expression after spinal cord injury in the mouse. *J Neurosci Res* 71(3):417-26
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25(3):302-5
- Singaraja RR, Hadano S, Metzler M, Givan S, Wellington CL, Warby S, Yanai A, Gutekunst CA, Leavitt BR, Yi H, Fichter K, Gan L, McCutcheon K, Chopra V, Michel J, Hersch SM, Ikeda JE, Hayden MR (2002) HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Hum Mol Genet* 11(23):2815-28
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentert M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841
- Siniossoglou S, Pelham HR (2001) An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes. *EMBO J* 20(21):5991-8
- Siniossoglou S, Pelham HR (2002) Vps51p links the VFT complex to the SNARE Tlg1p. *J Biol Chem* 277(50):48318-24

- Strey CW, Spellman D, Stieber A, Gonatas JO, Wang X, Lambris JD, Gonatas NK (2004) Dysregulation of stathmin, a microtubule-destabilizing protein, and up-regulation of Hsp25, Hsp27, and the antioxidant peroxiredoxin 6 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 165(5):1701-18
- Suter U, Scherer SS (2003) Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Neurosci* ;4(9):714-26
- Swiatecka-Urban A, Boyd C, Coutermarsh B, Karlson KH, Barnaby R, Aschenbrenner L, Langford GM, Hasson T, Stanton BA (2004) Myosin VI regulates endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 279(36):38025-31
- Taroni F, DiDonato S (2004) Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci* 5(8):641-55
- Topp JD, Gray NW, Gerard RD, Horazdovsky BF (2004) Alsln is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 279(23):24612-23
- Towler MC, Gleeson PA, Hoshino S, Rahkila P, Manalo V, Ohkoshi N, Ordahl C, Parton RG, Brodsky FM (2004) Clathrin isoform CHC22, a component of neuromuscular and myotendinous junctions, binds sorting nexin 5 and has increased expression during myogenesis and muscle regeneration. *Mol Biol Cell* 15(7):3181-95
- Ulbrich M (2003) Genetische Analyse eines modifizierenden Gen-Locus für den neurologischen Phänotyp der Wobbler Maus. Dissertation, *Universität Bielefeld*
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2003) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304(5674):1158-60
- van Beek J, Elward K, Gasque P (2003) Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 992:56-71
- Vaughan JR, Farrer MJ, Wszolek ZK, Gasser T, Durr A, Agid Y, Bonifati V, DeMichele G, Volpe G, Lincoln S, Breteler M, Meco G, Brice A, Marsden CD, Hardy J, Wood NW (1998) Sequencing of the alpha-synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (GSPD). *Hum Mol Genet* 7(4):751-3
- Ventura-Holman T, Haider NB, Maher JF (2000) Rapid communication: the human FEM1B gene maps to chromosome 15q22 and is excluded as the gene for Bardet-Biedl syndrome, type 4. *Am J Med Sci* 319(4):268-70
- Vila M, Przedborski S (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 10:S58-62
- Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF, Sporn MB (1996) Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 184(4):1425-33
- Walter L, Stark S, Helou K, Flugge P, Levan G, Gunther E (2002) Identification, characterization and cytogenetic mapping of a yeast Vps54 homolog in rat and mouse. *Gene* 285:213-20
- Wang H, Brautigan DL (2002) A novel transmembrane Ser/Thr kinase complexes with protein phosphatase-1 and inhibitor-2. *J Biol Chem* 277(51):49605-12
- Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Horl G, Malli R, Reed JA, Dierick I, Verpoorten N, Warner TT, Proukakis C, Van den Bergh P, Verellen C, Van Maldergem L, Merlini L, De Jonghe P, Timmerman V, Crosby AH, Wagner K (2004) Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat Genet* 36(3):271-6
- Winter S, Ludolph AC (2004) Kapitel 2.4: Motoneuronerkrankungen. In: Winkler J, Ludolph AC Hrsg. Neurodegenerative Erkrankungen des Alters. *Georg Thieme Verlag*
- Wolf DA, Zhou C, Wee S (2003) The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol* 5(12):1029-1033
- Worby CA, Dixon JE (2002) Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12):919-31

-
- Wu M, Lu L, Hong W, Song H (2004) Structural basis for recruitment of GRIP domain golgin-245 by small GTPase Arl1. *Nat Struct Mol Biol* 11(1):86-94
- Yang DH, Smith ER, Roland IH, Sheng Z, He J, Martin WD, Hamilton TC, Lambeth JD, Xu XX (2002) Disabled-2 is essential for endodermal cell positioning and structure formation during mouse embryogenesis. *Dev Biol* 251(1):27-44
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29(2):160-5
- Yankner BA, Benowitz LI, Villa-Komaroff L, Neve RL (1990) Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 7(1):39-44
- Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, Doyu M, Sobue G (2002) Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 80(1):158-67
- Yuan A, Rao MV, Kumar A, Julien JP, Nixon RA (2003) Neurofilament transport in vivo minimally requires hetero-oligomer formation. *J Neurosci* 23(28):9452-8
- Yunta M, Lazo PA (2003) Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 15(6):559-64
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yébenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55(2):164-73
- Zekanowski C, Religa D, Graff C, Filipek S, Kuznicki J (2004) Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64(1):19-31
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Forkert R, Wirth B (1995) Genetic basis of adult-onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 346(8983):1162
- Zuchner S, Nouredine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, Merory J, Oliveira SA, Speer MC, Stenger JE, Walizada G, Zhu D, Pericak-Vance MA, Nicholson G, Timmerman V, Vance JM (2005) Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet* 37(3):289-94

6 Anhang

6.1 Sequenzen: Tmem17 Interaktionspartner

Bei mehreren gleichen Plasmiden ist die Sequenz für die längsten Sequenzierläufe angegeben. Sequenziert mit Gal4_AD_seq, Multiple Klonierstelle des pACT2 bis zur *Sall* Schnittstelle. (Rot = *EcoRI*; Blau = *SmaI*; Grün = *SaII*)

```
>c2_c33_c66_n6_Ppmle (610 reliable bases)
cgctgaactggatcgcttccgATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTC
TATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGA
GGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGGAAGAGGAGGAAGCGGCTGCCCCGGG
GCACTCGGCCGTGCCGCCACCGCCGACGCCAGCTGCCACCGCTGCCCCGCTCCCACG
GCCGCTGTCCGAGCGCATCACCCGAGAGGAGGTGGAGGGCGAGAGCCTGGACCTGTGCCT
GCAGCAGCTCTACAAATATAACTGCCCTTCCCTTTCTGGCTGCTGCTTTAGCCAGAGCCAC
ATCAGATGAAGTCTCCAGAGTGACCTTTCTGCTCACTGTATCCCAAAGGAAACGGACGG
CACAGAAGGGACTGTGGAAATTGAGACAGTGAAATTGGCCCGTTCTGTCTTCAGCAAAC
ACATGAGATCTGCTGCAGTTGGGTGAAGGACTTCCCTCTGCGCAGGAGGCCTCAGATTTA
TTATGAGACGTCAAATTCATGCCATCAAGAACATGCGAAGGAAAATGGAGGACAAACACGT
CTGCATTCCTGACTTTAACATGCTCTTCAACctaaaggaccaggaggaacaagcattctt
Tgcagtgtttgatggccatgggggagtgagcgtgctatattatgccttcgttcaactaca
```

```
>c64_Fem1b (537 reliable bases)
ccCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGT
GGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACAGGTATTGT
AAAATGTGTGCATGGCTTTTTTTTTGTTGTTGCTCAGTAATCGGTAGAGAAGAGATGAGGGG
ACCTCTCCCTGCAAGCTTTCCCTAACAGTCTTTTCAGAAGTACATAGCTGGGAAGTAAAA
TCTGGCCTTAACCTACTGGCAGGACCCTGTCTTTGTAATGTTACCCGACCCCTGCAGTC
CTTGGTGCAGAGGAGCTACATAGTTGTAGTCTAGTAATTCACCGTGGTTTACTGCGAGCC
AGTGATGTCATTCTATCGTGCCTCTTGTCAAGCCATTTATGTGACTTTAATAAGCTTAG
TAACTTTGCTGACTGCACCGGGGCCTATTAGTGACTTATATATTGCATGATGTCTTCAAC
TTGAGTTTGACATGTAGAAATCACCTTTGATTTTCATGGCAATTGACAGTCCTAATGGCTc
agctaatttgaaactaacaactttgctgtgttaaaggaaaaatggtgtttgtgttcagtaa
atgtttgaaaaaataagaataaactcgaaagatctatgattgtagattctgaaacacc
```

```
>n15_n18_n19_n34 Cops5 (652 reliable bases)
ttggatATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGG
CTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCC
CGGGGATCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACGCGAAACCCCTGGACTAAGGATCACCCTACT
TTAAATACTGCAAAATCTCAGCATTGGCTCTACTGAAAATGGTGATGCATGCCAGGTCAG
GAGGCAACTTGGAAGTGATGGGTTTGATGCTCGGGAAAGTCGACGGCGAGACCATGATCA
TCATGGACAGTTTCGCTTTGCTGTAGAGGGCACAGAAACTCGAGTAAATGCTCAAGCTG
CTGCGTATGAGTATATGGCTGCATACATAGAAAATGCCAAACAGGTTGGCCGCCTTGAGA
ATGCAATCGGTTGGTATCATAGCCACCCTGGTTATGGCTGCTGGCTCTCCGGGATTGATG
TTAGTACACAGATGCTGAACCAGCAGTTTCAAGAACCATTTGTAGCAGTGGTGATTGATC
CAACCAGAACAATCTCTGCAGGAAAAGTGAATCTTGGCGCCTTTAGGACATATCCAAAGG
GCTACAAACCTCCTGATGAAGGACCTTCTGAGTACCAGACTATCCCACTTAATAAAATag
```

```
>n38_Abcd4 (665 reliable bases)
taTCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACC
CATAACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCCGGGGA
TCCGAATTCGCGGCCGCGTCGACTTGAGCTTGAAGATCTGTGAGGGGCAGAGTCTGCTCA
TCACAGGCAACACGGGCACGGGCAAGACCTCCCTGCTGCGGGTGTGGGAGGCCTGTGGG
AGGGCATGAAAGGCTCAGTGCAGATGCTGGCTGATTTTGGGCCCCACGGGGTGTCTGTTCC
```


TGCCTCAGAAGCCATTCTTCACTGATGGGACACTTCGGGAGCAGGTGATATATCCCCTGA
 AGGAGATCTACCCTGACTCAGGTTCTGCGGACGATGAGAGGATTGTGAGGTTCTTGGAAT
 TGGCAGGCCCTGTCCAGCTTGGTGGCAAGGACTGGAGGTCTGGACCAGCAGGTGGATTGGA
 ACTGGTATGATGTCTGTCCCCAGGGGAGATGCAAAGACTCTCCTTCGCCCCGTCTCTTCT
 ACCTGCAGCCCAAGTATGCAGTGTCTCGATGAAGCCACCAGTGCCTGACAGAGGAAGCAG
 AGAGTGAGCTCTACCGAATTGGTCAGCAACTGGGGATGACATTTATCAGCGTGGGACATC
 GTCCCAGccttgagaagtttcactcctgcgttctgggactccacggaggaggagaaactggg

>c49_c41_n13(Fragment) Ranbp9 (664 reliable bases)
 taTCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACC
 CATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGGGA**
 TCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**CGCCTCTACCCGGCTGTGGATGAGCAGGAGACGCCGC
 TGCCCCGGTCTGGAGCCCGAAGGACAAGTTCAGCTACATCGGCCTCTCGCAGAACAACC
 TGCGGGTGCACACAAAGGTCATGGTAAAACCCCAAAGATGCAGCATCTGTTTCGAGCCA
 CGCATCCAATACCAGCGGCCCTGTGGGATTTATTTATTTTGAAGTAAAAATTGTCAGTAAGG
 GAAGAGATGGCTACATGGGAATTGGTCTTTCTGCTCAAGGTGTGAACATGAATAGACTAC
 CAGGTTGGGATAAACATTCATATGGTTACCATGGGGATGATGGACATTCATTTTGTCTT
 CTGGAACGGACAACCGTATGGACCAACTTTTACAACCTGGTGTGATGTCATTGGCTGTTGTG
 TTAATCTTATCAACAATACCTGCTTTTACACGAAGAATGGACATAGTTTAGGTATTGCTT
 TCACCGGCTTACCGCAAATTTGTATCCTACTGTGGGGCTTACAGACACCAGGAGAAGTGG
 TTGATGccaacnttgggcaacatccttttgtgtttgatatagaagactacatgcgagaat

>n14_Virale Reverse Transkriptase Fragment(724 reliable bases)
 ctgctATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTAC
 CCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGGG**
 ATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**GGTATAACAATCCCTGATTTCAATCTGTACTACAGA
 ATTGTAGTAATGAAAACATGCAATGGTACAGGCATAAAAGCAGACATGTTGATCAGTGGAAT
 TGAATTAAAAACATAAAATTCACACACCTATGGACACATGATGTTTGATACAGAAGCCAGA
 AATATGCAAAAAGAAAGCATCTTCAATAAAATGGTGTGGTCTACCTAGATGTCAGTATGT
 AGAATAATGTACACAGACTCATATATTTACCCAGTGCAAAACTCAAGTTCAACTGAATC
 AAAGACCTCAACATAAACCTCACAGAAACCTGATACACTGAACCTGACAGAACAGAAAGT
 TGGGGATAATCTTGAATACATTAGTACAGAAGACAACCTTTGTGAACAGTACAACAATAGC
 TCAGACACTAAGAGCAACAACCTAACAAATGTGACCTCATGAAATCAAAGAGCTTCTATAA
 AGGAAGGGACACAGACTATGGGTCAAATGGCAGCCACAGAATAGCAAAAAGATTTTAC
 AACTCCACATCTGACAAAGGGCTAATATATATGTCATTACAGTAGACACCAATGCCAAGC
 AACCTAACTaaaaaatgtggtacatatctaacggaattctcaacagagaaatTTTTTaat

6.2 Sequenzierungen NM_172792

6.2.1 Sequenzierung des 1,8kb RT-PCR Produktes

CAP3 Assemblierung der Sequenzierungen für die klonierten PCR Produkte generiert mit dem Primerpaar: RT_Kinase_1_8_a/RT_Kinase_1_8_b. Je ein Klon kloniert aus (+/+)- und (wr/wr)-Testis ist sequenziert worden. Bei Sequenzabweichungen (rot markiert) wurde ein weiterer Klon nachsequenziert (bezeichnet mit 2kinwt/wr). Primerbereiche sind blau hervorgehoben, Startcodon grün und Stoppcodon braun. Graue Kästchen markieren die beiden festgestellten Transversionen im Wildtyp-Stamm.

Overlaps Containments No. of Constraints Supporting Overlap

***** Contig 1 *****

```
NM_172792chr11+
kinase-wt12.y_m13rev-49_1;+ is in NM_172792chr11+
kinase-wr12.y_m13rev-49_1;+ is in NM_172792chr11+
2kinwt.X_a_1;+ is in NM_172792chr11+
2kinwr.X_a_1;+ is in NM_172792chr11+
2kinwr.X_e_1;+ is in NM_172792chr11+
2kinwt.X_c_1;+ is in NM_172792chr11+
2kinwr.X_f_1;- is in NM_172792chr11+
2kinwt.X_f_1;- is in NM_172792chr11+
kinase-wr12.x_m13uni-43_1;- is in NM_172792chr11+
kinase-wr.X_kin-seq-a_1;+ is in NM_172792chr11+
kinase-wt.X_kin-seq-a_1;+ is in NM_172792chr11+
kinase-wr.X_kin-seq-f_1;- is in NM_172792chr11+
kinase-wt.X_kin-seq-e_1;+ is in NM_172792chr11+
2kinwt.X_e_1;+ is in kinase-wt.X_kin-seq-e_1;+
kinase-wt12.x_m13uni-43_1;- is in kinase-wt.X_kin-seq-e_1;+
kinase-wr.X_kin-seq-c_1;+ is in NM_172792chr11+
kinase-wt.X_kin-seq-c_1;+ is in kinase-wr.X_kin-seq-c_1;+
2kinwr.X_c_1;+ is in kinase-wt.X_kin-seq-c_1;+
kinase-wr.X_kin-seq-e_1;+ is in NM_172792chr11+
kinase-wt.X_kin-seq-f_1;- is in NM_172792chr11+
```

AK030017chr17+

DETAILED DISPLAY OF CONTIGS

***** Contig 1 *****

```
NM_172792chr11+      GAGAGAGGCAGTTTGTGGTGGGAGAGCATTGGACTCTGTGTTCCCAAACTGGC
AK030017chr17+      TTGGACTCAGTTGTTTCCCACTGACCTGGT
```

consensus GAGAGAGGCAGTTTGTGGTGGGAGAGCATTGGACTCAGTTGTTTCCCAAACTGGC

```
NM_172792chr11+      CTTTTCCTCCAACTTGTGGATCTGGATATACCTCATATATTCCTGGTTCTATATGAGAGT
AK030017chr17+      CTTTTCCTCCAACTTGTGGATCTGGATAGACCTCATATATTCCTGGTTCTATATGAGAGT
```

consensus CTTTTCCTCCAACTTGTGGATCTGGATAGACCTCATATATTCCTGGTTCTATATGAGAGT

```
NM_172792chr11+      AGGTGGTTGAACTTGAGCGAAACATCATGGCCAGCCACATGGAAGAGAACATCCTTGAAA
AK030017chr17+      AGGTGGTTGAACTTGAGCGAAACATCATGGCCAGCCACATGGAAGAGAACATCCTTGAAA
```

consensus AGGTGGTTGAACTTGAGCGAAACATCATGGCCAGCCACATGGAAGAGAACATCCTTGAAA

```
NM_172792chr11+      AGGATTTTCAGGATGTTGTCATCTCTGGGTTGTGGTTCATTTCGGGGAGGTAAAGCTTGCCT
AK030017chr17+      AGGATTTTCAGGATGTTGTTATCTCTGGGTTGTGGTTCATTTCGGGGAGGTAAAGCTTGCCT
```

consensus AGGATTTTCAGGATGTTGTCATCTCTGGGTTGTGGTTCATTTCGGGGAGGTAAAGCTTGCCT

```
NM_172792chr11+      GCCACTTCCACACTTATACGGGTGGCTGTCAAGTTCCTTGAGAAAAACATCAACAGCA
kinase-wt12.y_m13rev+      ACTTATACGGGTGGCTGTCAAGTTCCTTGAGAAAAACATCAACAGCA
kinase-wr12.y_m13rev+      ACTTATACGGGTGGCTGTCAAGTTCCTTGAGAAAAACATCAACAGCA
AK030017chr17+      GCCACCTTCCACACGTATACGGGTGGCTGTCAAGTTCCTTGAGAAAAACATCAACAGCA
```

consensus GCCACCTTCCACACTTATACGGGTGGCTGTCAAGTTCCTTGAGAAAAACATCAACAGCA

**RT-
Kinase_1_8_a**

```
NM_172792chr11+      TGGCTGACATCACTTTCGAAGCTGGAACCTTCAATCTTTAGAACACAGGAACATTGTTT
kinase-wt12.y_m13rev+      TGGCTGACATCACTTTCGAAGCTGGAACCTTCAATCTTTAGAACACAGGAACATTGTTT
kinase-wr12.y_m13rev+      TGGCTGACATCACTTTCGAAGCTGGAACCTTCAATCTTTAGAACACAGGAACATTGTTT
AK030017chr17+      TGGCTGACATCACTTTCGAAGTGGAACTCCTTCAATCTTTAGAACACAGGAACATTGTTT
```

consensus TGGCTGACATCACTTTCGAAGCTGGAACCTTCAATCTTTAGAACACAGGAACATTGTTT

```
NM_172792chr11+      GATTTTTT-CACATGATTGACACACTGACAACAACCTTATGTGATCATGGAGAATGTGGCA
kinase-wt12.y_m13rev+      GATTTTTT-CACATGATTGACACACTGACAACAACCTTATGTGATCATGGAGAATGTGGCA
kinase-wr12.y_m13rev+      GATTTTTT-CACATGATTGACACACTGACAACAACCTTATGTGATCATGGAGAATGTGGCA
AK030017chr17+      GATTTTTTTCACATGATTGACACACTGACAACAACCTTATGTGATCATGGAGTATGTGCCA
```

consensus GATTTTTT-CACATGATTGACACACTGACAACAACCTTATGTGATCATGGAGAATGTGGCA

Startcodon

```
.                      :                      .                      :                      .                      :
```

KinseqA

NM_172792chr11+ GGAGAGGACCTTGAGAAGTACCTCAGGG**CACTGGGCTGTCTGAAAGAGGA**GGAGGCTAGA
kinase-wt12.y_m13rev+ GGAGAGGACCTTGAGAAGTACCTCAGGGCACTGGGCTGTCTGAAAGAGGAGGAGGCTAAA
kinase-wr12.y_m13rev+ GGAGAGGACCTTGAGAAGTACCTCAGGGCACTGGGCTGTCTGAAAGAGGAGGAGGCTAGA
kinase-wr.X_kin-seq-+ gaggCTAGA
kinase-wt.X_kin-seq-+ gcTAGA
AK030017chr17+ GGAGAGGACCTTGAGAAGTACCTCAGGGCACTGGGCTGTCTAAAAGAGGAAGGCTAGA

consensus GGAGAGGACCTTGAGAAGTACCTCAGGGCACTGGGCTGTCTGAAAGAGGAGGAGGCTAGA

NM_172792chr11+ CCTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT
kinase-wt12.y_m13rev+ CCTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT
kinase-wr12.y_m13rev+ CCTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT
2kinwt.X_a_1;+ caGCAAGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT
2kinwr.X_a_1;+ CTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT
kinase-wr.X_kin-seq-+ CCTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT
kinase-wt.X_kin-seq-+ CCTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT
AK030017chr17+ CCTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT

consensus CCTGTTTTTCAGCAGGTCGTGTCAGCAGTTCACCTCCTCCACCAAAGACACATTGCACAT

NM_172792chr11+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC
kinase-wt12.y_m13rev+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC
kinase-wr12.y_m13rev+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC
2kinwt.X_a_1;+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC
2kinwr.X_a_1;+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC
kinase-wr.X_kin-seq-+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC
kinase-wt.X_kin-seq-+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC
AK030017chr17+ CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC

consensus CGCAATATTTAAATTAGAAAGCATTCTGGTCGATGCAGCAGGAAATGCAAAGCTTTGTGAC

NM_172792chr11+ TTTGGCATGGCAATTTAAACCACAGAAGGGCAGATGTTGGAGGAAACCTGTGGCTCCTTA
kinase-wt12.y_m13rev+ TTTGG
kinase-wr12.y_m13rev+ TTTGGC
2kinwt.X_a_1;+ TTTGGCATGGCAATTTAAACCACAGAAGGGCAGATGTTGGAGGAAACCTGTGGCTCCTTA
2kinwr.X_a_1;+ TTTGGCATGGCAATTTAAACCACAGAAGGGCAGATGTTGGAGGAAACCTGTGGCTCCTTA
kinase-wr.X_kin-seq-+ TTTGGCATGGCAATTTAAACCACAGAAGGGCAGATGTTGGAGGAAACCTGTGGCTCCTTA
kinase-wt.X_kin-seq-+ TTTGGCATGGCAATTTAAACCACAGAAGGGCAGATGTTGGAGGAAACCTGTGGCTCCTTA
AK030017chr17+ TTTGGCATGGCAATTTAAACCACAGAAGGGCAGATGTTGGAGGAGACCTGTGACTCCTTA

consensus TTTGGCATGGCAATTTAAACCACAGAAGGGCAGATGTTGGAGGAAACCTGTGGCTCCTTA

NM_172792chr11+ CTCTATAGGGCCCCAGAGATCTTGGCAAGGAAACCCATGATGGGCTGGCAGTTGACATG
2kinwt.X_a_1;+ CTCTATAGGGCCCCAGAGATCTTGGCAAGGAAACCCATGATGGGCTGGCAGTTGACATG
2kinwr.X_a_1;+ CTCTATAGGGCCCCAGAGATCTTGGCAAGGAAACCCATGATGGGCTGGCAGTTGACATG
kinase-wr.X_kin-seq-+ CTCTATAGGGCCCCAGAGATCTTGGCAAGGAAACCCATGATGGGCTGGCAGTTGACATG
kinase-wt.X_kin-seq-+ CTCTATAGGGCCCCAGAGATCTTGGCAAGGAAACCCATGATGGGCTGGCAGTTGACATG
AK030017chr17+ CTCTATAGGGCCCCAGAGATCTTGGCAAGGAAACCCATGATGGGCTGGCAGTTGACATG

consensus CTCTATAGGGCCCCAGAGATCTTGGCAAGGAAACCCATGATGGGCTGGCAGTTGACATG

NM_172792chr11+ TGGAGCTTAGGCATCGTCCTCTATGTTCTGGTCACAGGGCACTTTCCATATGTAGAAGCC
2kinwt.X_a_1;+ TGGAGCTTAGGCATCGTCCTCTATGTTCTGGTCACAGGGCACTTTCCATATGTAGAAGCC
2kinwr.X_a_1;+ TGGAGCTTAGGCATCGTCCTCTATGTTCTGGTCACAGGGCACTTTCCATATGTAGAAGCC
kinase-wr.X_kin-seq-+ TGGAGCTTAGGCATCGTCCTCTATGTTCTGGTCACAGGGCACTTTCCATATGTAGAAGCC
kinase-wt.X_kin-seq-+ TGGAGCTTAGGCATCGTCCTCTATGTTCTGGTCACAGGGCACTTTCCATATGTAGAAGCC
AK030017chr17+ TGGAGCTTAGGCATCGTCCTCTATGTTCTGGTCACAGGGCACTTTCCATATGTAGAAGCC

consensus TGGAGCTTAGGCATCGTCCTCTATGTTCTGGTCACAGGGCACTTTCCATATGTAGAAGCC

NM_172792chr11+ ACCATTGAGGATATGCACAGGGTCATCACTACTACAGTGTGTCCCATTCCCTTACCCTTG
2kinwt.X_a_1;+ ACCATTGAGGATATGCACAGGGTCATCACTACTACAGTGTGTCCCATTCCCTTACCCTTG
2kinwr.X_a_1;+ ACCATTGAGGATATGCACAGGGTCATCACTACTACAGTGTGTCCCATTCCCTTACCCTTG
kinase-wr.X_kin-seq-+ ACCATTGAGGATATGCACAGGGTCATCACTACTACAGTGTGTCCCATTCCCTTACCCTTG
kinase-wt.X_kin-seq-+ ACCATTGAGGATATGCACAGGGTCATCACTACTACAGTGTGTCCCATTCCCTTACCCTTG
AK030017chr17+ ACCATTGAGGATATGCACAGGGTCATCACTACTACAGTGTGTCCCATTCCCTTACCCTTG

consensus ACCATTGAGGATATGCACAGGGTCATCACTACTACAGTGTGTCCCATTCCCTTACCCTTG

NM_172792chr11+ TCATTTCCGTGTCACATCATCATTGCATGGTTACTTGGGGTCCCTACCTGGCACAGGATG

2kinwt.X_a_1;+ TCATATCCGTGTCACATCAT
 2kinwr.X_a_1;+ TCATGTCGGTGTACATCATC
 kinase-wr.X_kin-seq++ TCATTTCCGTGTCACATCATCATTGCATGGTTACTTGGGGTCCCTACCTGGCACAGGATG
 kinase-wt.X_kin-seq++ TCATTTCCGTGTCACATCATCATTGCATGGTTACTTGGGGTCCCTACCTGGCACAGGATG
 AK030017chr17+ TCATTTCCGTGTCACATCATCATTGCACGGTTACTCGGGGTCCCTACCTGGTTACAGGATG

consensus TCATTTCCGTGTCACATCATCATTGCATGGTTACTTGGGGTCCCTACCTGGCACAGGATG

NM_172792chr11+ ACAATACATCAGCTTGTGGAACGACCGTGGCTGGGCCACATTCAAGACC**ATGGACTGGTT**
 kinase-wr.X_kin-seq++ ACAATACATCAGCTTGTGGAACGACCGTGGCTGGGCCACATTCAAGACCAATGGACTGGTT
 kinase-wt.X_kin-seq++ ACAATACATCAGCTTGTGGAACGACCGTGGCTGGGCCACATTCAAGACCAATGGACTGGTT
 AK030017chr17+ ACAATACATCAGCTTGTGGAACGACCAATGGCTGGGCCACATCCAAGATCATGGACTGGTT

consensus ACAATACATCAGCTTGTGGAACGACCGTGGCTGGGCCACATTCAAGACCAATGGACTGGTT

NM_172792chr11+ **GCCACAAAAG**AAATCCTTCCCAGGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 2kinwt.X_c_1;+ cTTCCCAGGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 kinase-wr.X_kin-seq++ GCCACAAAAGAAATCCTTCCCAGGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 kinase-wt.X_kin-seq++ GCCACAAAAGAAATCCTTCCCAGGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 kinase-wr.X_kin-seq++ cttcc-agGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 kinase-wt.X_kin-seq++ cttcc-aGGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 2kinwr.X_c_1;+ cttcc-agaaTCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 kinase-wt.X_kin-seq-- tCCCAGGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT
 AK030017chr17+ GCCACAAAAGAAATCCTTCCCAGGATCATAAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT

consensus GCCACAAAAGAAATCCTTCCCAGGATCGTGAACACAATGTGCACCATTTGGCTATACCTGT

NM_172792chr11+ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGG**TG**ACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 2kinwt.X_c_1;+ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 kinase-wr.X_kin-seq++ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 kinase-wt.X_kin-seq++ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 kinase-wr.X_kin-seq-- GAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 kinase-wr.X_kin-seq-- GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 kinase-wt.X_kin-seq++ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 kinase-wt.X_kin-seq++ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 2kinwr.X_c_1;+ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 kinase-wt.X_kin-seq-- GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT
 AK030017chr17+ GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT

consensus GAAGAGATTGTGTCATCCTTAACAAATAGGTGACTCAAAGATGAAGTAATGGCAACATTT

NM_172792chr11+ AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGGAGAAGCCCTGG
 2kinwt.X_c_1;+ AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGGAGAAGCCCTGG
 kinase-wr.X_kin-seq++ AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGG
 kinase-wt.X_kin-seq++ AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGGAGAAGCCCT
 kinase-wr.X_kin-seq-- AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGG**G**AGAAGCCCTGG
 kinase-wr.X_kin-seq++ AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGG**G**AGAAGCCCTGG
 kinase-wt.X_kin-seq++ AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGGAGAAGCCCTGG
 2kinwr.X_c_1;+ AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGGAGAAGCCCTGG
 kinase-wt.X_kin-seq-- AATATTTTAA**T**ATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGGAGAAG**C**TCTGG
 AK030017chr17+ AATATTTTAAAATACCAACTGAGCTATGGGGACAGCCATCAGCAGGTGGAGAAGCCCTGG

consensus AATATTTTAAAATACCAGCTGAGCTATGGGGACAGCCATCAACAGGTGGAGAAGCCCTGG

NM_172792chr11+ GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT
 2kinwt.X_c_1;+ GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT
 2kinwt.X_f_1;- TTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACT**A**GAAAGAGGAGATCCAGT
 kinase-wr.X_kin-seq-- GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT
 kinase-wr.X_kin-seq++ GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT
 kinase-wt.X_kin-seq++ GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT
 2kinwr.X_c_1;+ GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT
 kinase-wt.X_kin-seq-- GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT
 AK030017chr17+ GCAAATAACAGCCCTTCAGGTGTCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGAGCCAGT

consensus GCAAATAGCAGCCCTTCAGGTGCCCTTATCCCCCTTCCCCACTTGAAGAGGAGATCCAGT

NM_172792chr11+ GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG
 2kinwt.X_c_1;+ GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG
 2kinwr.X_f_1;- AGTAACCTTCCAGGATGAGAATGTG
 2kinwt.X_f_1;- GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGCAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG
 kinase-wr.X_kin-seq-- GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG
 kinase-wr.X_kin-seq++ GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG

KinseqC

Stoppcodon

```

kinase-wt.X_kin-seq+ GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG
2kinwr.X_c_1;+ GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG
kinase-wt.X_kin-seq-- GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG
AK030017chr17+ GAATCTACCTTTTCAACTTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTCACTTTCAGGATGAGAATATT

```

```

consensus GAACCTACCTTTTCAACCTGTATAGAAGCTAGGAAGAGTAACCTTTCAGGATGAGAATGTG

```

```

NM_172792chr11+ GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
2kinwt.X_c_1;+ GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
2kinwr.X_f_1;- GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
2kinwt.X_f_1;- GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
kinase-wr.X_kin-seq-- GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
kinase-wr.X_kin-seq+ GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
2kinwr.X_c_1;+ GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
kinase-wt.X_kin-seq-- GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG
AK030017chr17+ GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCATAAATTCCCCATACTCACCACAAACT---GCCAGAG

```

```

consensus GAAAGAAGAAGCAAGAGTTGCAGAAGTTACCCCATACACACCAAAGCTCCTGCACAGAG

```

```

NM_172792chr11+ AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
2kinwr.X_e_1;+ cgGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
2kinwt.X_c_1;+ AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
2kinwr.X_f_1;- AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
2kinwt.X_f_1;- AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
kinase-wr.X_kin-seq-- AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
kinase-wt.X_kin-seq+ cgGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
2kinwt.X_e_1;+ gaTGCTGTGACAGCTGATGTCACT
kinase-wr.X_kin-seq+ AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
kinase-wt.X_kin-seq+ AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
2kinwr.X_c_1;+ AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
kinase-wr.X_kin-seq+ aAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
kinase-wt.X_kin-seq-- AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT
AK030017chr17+ AGGATGCCCAATTCAGATGACCCAGTGCCAGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT

```

KinseqE

```

consensus AGGATGCCCTATTCAGATGACCCAGTGCCCGAAAGTGATGCTGTGACAGCTGATGTCACT

```

```

NM_172792chr11+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
2kinwr.X_e_1;+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
2kinwt.X_c_1;+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAAC
2kinwr.X_f_1;- AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
2kinwt.X_f_1;- AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
kinase-wr.X_kin-seq-- AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
kinase-wt.X_kin-seq+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
2kinwt.X_e_1;+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
kinase-wr.X_kin-seq+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
kinase-wt.X_kin-seq+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
2kinwr.X_c_1;+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
kinase-wr.X_kin-seq+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
kinase-wt.X_kin-seq-- AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG
AK030017chr17+ AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACATAGATTCCACGGACTGCATGCCCTGGTGAG

```

Position
1414bp

```

consensus AACAGTGCTACAGGGGATATTGTAGTCAACAGAGATTCCACGAACAGCATGCTTGGTGAG

```

```

NM_172792chr11+ CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
2kinwr.X_e_1;+ CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
2kinwr.X_f_1;- CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
2kinwt.X_f_1;- CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
kinase-wr12.x_m13uni- CACTCACA
kinase-wr.X_kin-seq-- CATGCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
kinase-wt.X_kin-seq+ CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
2kinwt.X_e_1;+ CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
kinase-wr.X_kin-seq+ CATGCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
kinase-wt.X_kin-seq+ CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
kinase-wr.X_kin-seq+ CATGCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
kinase-wt.X_kin-seq-- CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA
AK030017chr17+ CCGGTCTCTCCAGTATCAGACTACGTTGGCCCCACAGCTTCTAAATCTAGGTCACACTTACA

```

```

consensus CATGTCTCTCCACTATCAGCCCACGTTGGCCCCACAGCTTCTAGATCTAGGTCACACTCACA

```

```

NM_172792chr11+ GTTTGGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
2kinwr.X_e_1;+ GTTTGGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGC

```

2kinwr.X_f_1;- GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGC**C**GTTGCTGCTGC
 2kinwt.X_f_1;- GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wr12.x_m13uni- GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wr.X_kin-seq-- GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wt.X_kin-seq++ GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 2kinwt.X_e_1;+ GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wt12.x_m13uni- CGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wr.X_kin-seq++ GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wt.X_kin-seq++ GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wr.X_kin-seq++ GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 kinase-wt.X_kin-seq-- GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC
 AK030017chr17+ GTTTGGAGGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAAGCACTGTG-----CTGCTGC

consensus GTTTGAAGCGAATTTCCCGTGCTCTGAAATCACTATGGTGCTGCTGCTGTTGCTGCTGC

NM_172792chr11+ . : . : . : . : . : . :
 2kinwr.X_e_1;+ TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 2kinwr.X_f_1;- TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 2kinwt.X_f_1;- TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 kinase-wr12.x_m13uni- TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 kinase-wr.X_kin-seq-- TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 kinase-wt.X_kin-seq++ TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 2kinwt.X_e_1;+ TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 kinase-wt12.x_m13uni- TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 kinase-wr.X_kin-seq++ TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 kinase-wt.X_kin-seq-- TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC
 AK030017chr17+ TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC

consensus TGCTGCTGCATCTGTGTGCCCTCCCCACGTGGGGAAACCGAAATGGACTAGGAGAATTTTC

NM_172792chr11+ . : . : . : . : . : . :
 2kinwr.X_e_1;+ AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 2kinwr.X_f_1;- AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 2kinwt.X_f_1;- AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 kinase-wr12.x_m13uni- AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 kinase-wr.X_kin-seq-- AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 kinase-wt.X_kin-seq++ AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 2kinwt.X_e_1;+ AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 kinase-wt12.x_m13uni- AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 kinase-wr.X_kin-seq++ AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 kinase-wt.X_kin-seq-- AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT
 AK030017chr17+ AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT

consensus AGCCTTATTGAAGAGAGACTCCACAGCAGAAAACCGAGACAGAACTCCATGGTGCCTGTGT

NM_172792chr11+ . : . : . : . : . : . :
 2kinwr.X_e_1;+ TCCTCCAATA**CAGGG**CATCAGGCT**TCTGTGTCTCTTTTCGCCCTTTG**ATCTAAATTGTCAG
 2kinwr.X_f_1;- TCCTCCAATA**CAGGG**CATCAGGCTTCTGTGTCTCTTTTCGCCCTTTGATCTAAATTGTCAG
 2kinwt.X_f_1;- TCCTCCAATA**CAGGG**CATCagctag
 kinase-wr12.x_m13uni- TCCTCCAATA**CAGGG**CATCagctag
 kinase-wr.X_kin-seq-- TCCTCCAATA**CAGGG**CATCAGgct
 kinase-wt.X_kin-seq++ TCCTCCAATA**CAGGG**CATCAGGCTTCTGTGTCTCTTTTCGCCCTTTGATCTAAATTGTCAG
 2kinwt.X_e_1;+ TCCTCCAATA**CAGGG**CATCAGGCTTCTGTGTCTCTTTTCGCCCTTTGATCTAAATTGTCAG
 kinase-wt12.x_m13uni- TCCTCCAATA**CAGGG**CATCAGGCTTCTGTGTCTCTTTTCGCCCTTTGATCTAAATTGTCAG
 kinase-wr.X_kin-seq++ TCCTCCAATA**CAGGG**CATCAGGCTTCTGTGTCTCTTTTCGCCCTTTGATCTAAATTGTCAG
 kinase-wt.X_kin-seq-- TCCTCCAATA**CAGGG**CATc
 AK030017chr17+ TTTTCCAATA**CATG**CATCAGGCTTCTGTGTCTCTCTCGATCTTTGGTGTGAAGTGTGTCAG

KinseqF

**Position
1691bp**

consensus TCCTCCAATACAGGGCATCAGGCTTCTGTGTCTCTTTTCGCCCTTTGATCTAAATTGTCAG

NM_172792chr11+ . : . : . : . : . : . :
 2kinwr.X_e_1;+ TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA
 kinase-wr12.x_m13uni- TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA
 kinase-wt.X_kin-seq++ TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA
 2kinwt.X_e_1;+ TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACT
 kinase-wt12.x_m13uni- TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA
 kinase-wr.X_kin-seq++ TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA
 kinase-wt.X_kin-seq-- TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA
 AK030017chr17+ TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA

consensus TGTGCATCTCCTTCATCTTACTCCAGCCCCATCACTGCTTGCTGGACAGAAAGGTGGGCA

```

      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
NM_172792chr11+      CGAGGAACATCTACCTGATGAGGCTCTTCTTCCTCAGCTTTGAGTGTGCTGTAGCACTAG
kinase-wr12.x_m13uni- CGAGGAACATCTACCTGATGAGGCTCTTCTTCCTCAGCTTTGAGTGTGCTGTAGCACTAG
kinase-wt.X_kin-seq-+ CGAGGAACATCTACCTGATGAGGCTCTTCTTCCTCAGCTTTGAGTGTGCTGTAGCACTAG
kinase-wt12.x_m13uni- CGAGGAACATCTACCTGATGAGGCTCTTCTTCCTCAGCTTTGAGTGTGCTGTAGCACTAG
kinase-wr.X_kin-seq-+ CGAGGAACATCTACCTGATGAGGCTCTTCTTCCTCAGCTTTGAGTGTGCTGTAGCACTAG
AK030017chr17+      TGAGGAACATCTACCTGATGAGGCTCTTCTTCCTCAGCTTTGAGTGTGCTGTAGCACTAG

consensus           CGAGGAACATCTACCTGATGAGGCTCTTCTTCCTCAGCTTTGAGTGTGCTGTAGCACTAG

      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
NM_172792chr11+      TGCCACAGCATCTAAAACAGATGCCTCCACAACCAGAAATGATGTGTCTTCTGACATAA
kinase-wr12.x_m13uni- TGCCACAGCATCTAAAACAGATGCCTCCACAACCAGAAATGATGTGTCTTCTGACATAA
kinase-wt.X_kin-seq-+ TGCCACAGCATCTAAAACAGATGCCTCCACAACCAGAAATGATGTGTCTTCTGACATAA
kinase-wt12.x_m13uni- TGCCACAGCATCTAAAACAGATGCCTCCACAACCAGAAATGATGTGTCTTCTGACATAA
kinase-wr.X_kin-seq-+ TGCCACAGCATCTAAAACAGATGCCTCCACAACCAGAAATGATGTGTCTTCTGACATAA
AK030017chr17+      TGCCACAGCGTCTAAAACAGATGCCTCCACCACCAGAAATGACGTGTCTTCTGACATAA

consensus           TGCCACAGCATCTAAAACAGATGCCTCCACAACCAGAAATGATGTGTCTTCTGACATAA

      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
NM_172792chr11+      GGAGCCTCATCATCTTGGTCACTTTATCCCTCCATCTTATTTCCCTGACTGTCTTTTGGG
kinase-wr12.x_m13uni- GGAGCCTCATCATCTTGGTCACTTTATCCCTCCATCTTATTTCCCTGACTGTCTTTTGGG
kinase-wt.X_kin-seq-+ GGAGCCTCATCATCTTGGTCACTTTATCCCTCCATCTTATTTCCCTGACTGTCTTTTGGG
kinase-wt12.x_m13uni- GGAGCCTCATCATCTTGGTCACTTTATCCCTCCATCTTATTTCCCTGACTGTCTTTTGGG
kinase-wr.X_kin-seq-+ GGAGCCTCATCATCTTGGTCACTTTATCCCTCCATCTTATTTCCCTGACTGTCTTTTGGG
AK030017chr17+      GGAGCCTCATCATCTTGGTCACTTTATCCCTCCATCTTATTTCCCTGACTGTATTTTGGG

consensus           GGAGCCTCATCATCTTGGTCACTTTATCCCTCCATCTTATTTCCCTGACTGTCTTTTGGG

      .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :   .   :
NM_172792chr11+      AAGAACTTCAAGAAACATCCTCTTTCATCCATTTAGTATTGTTCTGCTCCACTATGGAAA
kinase-wr12.x_m13uni- AAGAACTTCAAGAAACATCCTCTTTCATCCATTTAGTATTGTTCTGCTCCACTATGGAAA
kinase-wt.X_kin-seq-+ AAGAACTTCAAGAAACATCCTCTTTCATCCATTTAGTATTGTTCTGCTCCACTATGGAAA
kinase-wt12.x_m13uni- AAGAACTTCAAGAAACATCCTCTTTCATCCATTTAGTATTGTTCTGCTCCACTATGGAAA
kinase-wr.X_kin-seq-+ AAGAACTTCAAGAAACATCCTCTTTCATCCATTTAGTATTGTTCTGCTCCACTATGGAAA
AK030017chr17+      AAGAACTACAAGAAACAT-----

consensus           AAGAACTTCAAGAAACATCCTCTTTCATCCATTTAGTATTGTTCTGCTCCACTATGGAAA

      .   :   .
NM_172792chr11+      ATTAAGAAGACCTTGCC
kinase-wr12.x_m13uni- ATTAAGAAGACCTTGCC
kinase-wt.X_kin-seq-+ ATTAAGAAGACCTTGCC
kinase-wt12.x_m13uni- ATTAAGAAGACCTTGCC
kinase-wr.X_kin-seq-+ AT
AK030017chr17+      -----

consensus           ATTAAGAAGACCTTGCC

```

RT-Kinase_1_8_b

6.2.2 Sequenzierungen einzelner Exons von *NM_172792*

Primer wurden flankierend des zu sequenzierenden Exons (rot markiert) gelegt, das PCR-Produkt von (wr/wr) genomischer DNA generiert, und direkt von beiden Seiten mit den gleichen Primern sequenziert:

Exon1 (5'UTR):

```

WR      tgc atg taac at ca ta at ga ga ct tt g ca ag ga at g tt ag a ta c ca a a ca at ag ca ag ct
      |||
WT      tgc atg taac at ca ta at ga ga ct tt g ca ag ga at g tt ag a ta c ca a a ca at ag ca ag ct

WR      g ct g ct ag g ct g g g t t t g t t c t t g t g e t t c ag ag ag g c ag t t t g t t g g t g g g ag ag ca t
      |||
WT      g ct g ct ag g ct g g g t t t g t t c t t g t g e t t c ag ag ag g c ag t t t g t t g g t g g g ag ag ca t

```

WR **ttggactctgttgtttccacaaaacttggccttttcccaacttgttggatctggatata**
 |||
 WT **ttggactctgttgtttccacaaaacttggccttttcccaacttgttggatctggatata**

WR **gtgagttatatttgttttctaggttttcagtttagacttttggcat**
 |||
 WT **gtgagttatatttgttttctaggttttcagtttagacttttggcat**

Exon2 (5'UTR+CDS):

WR tcatgatagagaattccttctaaaattccattaatttttatttct**agcctcatatattcc**
 |||
 WT tcatgatagagaattccttctaaaattccattaatttttatttct**agcctcatatattcc**

WR **tggttctatatagagagtaggtggttgaacttgagcgaaacatcatggccagccacatgga**
 |||
 WT **tggttctatatagagagtaggtggttgaacttgagcgaaacatcatggccagccacatgga**

WR **agagaacatccttgaaaaggatttcaggatggttgcacatctctgggttggttcaattcgg**
 |||
 WT **agagaacatccttgaaaaggatttcaggatggttgcacatctctgggttggttcaattcgg**

WR **ggaggtaaagcttgctgccaacttcccaacttatacgggtggtgtcaaggtccttga**
 |||
 WT **ggaggtaaagcttgctgccaacttcccaacttatacgggtggtgtcaaggtccttga**

WR **gaaaaacatcaacagcatggctgacatcacttcgaagctggaactccttcaatctttaga**
 |||
 WT **gaaaaacatcaacagcatggctgacatcacttcgaagctggaactccttcaatctttaga**

WR **acacaggaacattgtttgatttttccat**gat**tgacacactgacaacaacttatgtgat**
 |||
 WT **acacaggaacattgtttgatttttccat**gat**tgacacactgacaacaacttatgtgat**

WR **catggagaa**tg**ggcaggagagga**
 |||
 WT **catggagaa**tg**ggcaggagagga**

Exon4 (3'UTR):

WR gcaacaaatggaaggtgtggcatctccatcatttgattcatattgtacccatgtctttgt
 |||
 WT gcaacaaatggaaggtgtggcatctccatcatttgattcatattgtacccatgtctttgt

WR cctcac**agcctctttcatccatttagtattggttctgctccactatggaaaattaagaaga**
 |||
 WT cctcac**agcctctttcatccatttagtattggttctgctccactatggaaaattaagaaga**

WR **ccttgccaggcctgatgccaggtattgtctctaggagacagcagccaag**g**taactacatt**
 |||
 WT **ccttgccaggcctgatgccaggtattgtctctaggagacagcagccaag**g**taactacatt**

WR gtatctattgccaaccaagaattcaggcttaggaaaaaccattggtgatcacgggtgttg
 |||
 WT gtatctattgccaaccaagaattcaggcttaggaaaaaccattggtgatcacgggtgttg

Exon9 (3'UTR):

WR tagcgatctagtttacaccctttaataaccatggttttctctatgacattctagtgaat
 |||
 WT tagcgatctagtttacaccctttaataaccatggttttctctatgacattctagtgaat


```

WR      gctcctgaaaatctctggcttactatgactctcacctctttagatgtgtctacagaagag
      |||
WT      gctcctgaaaatctctggcttactatgactctcacctctttagatgtgtctacagaagag

WR      caagaagtggggctgaggccactaagaacagcactacctgtacacacatcattacataga
      |||
WT      caagaagtggggctgaggccactaagaacagcactacctgtacacacatcattacataga

WR      atgcacaaattcttcagcgcctctggaaggagttagcatgtctttgaaactgactgag
      |||
WT      atgcacaaattcttcagcgcctctggaaggagttagcatgtctttgaaactgactgag

WR      aggggagcatggatttaggagtggtgttctgttgctcaagaggaaggtccagagtttt
      |||
WT      aggggagcatggatttaggagtggtgttctgttgctcaagaggaaggtccagagtttt

WR      taatgctaccatctcagaacaactgtaaagaagctttcttcagaacatccaacaggtga
      |||
WT      taatgctaccatctcagaacaactgtaaagaagctttcttcagaacatccaacaggtga

WR      tgcaagcctggacacaggatactatacttcacaatattctactagttctgatttggttc
      |||
WT      tgcaagcctggacacaggatactatacttcacaatattctactagttctgatttggttc

WR      ttgttttttggtttttggtatatactttaacaaataagttcttaattttgactttaga
      |||
WT      ttgttttttggtttttggtatatactttaacaaataagttcttaattttgactttaga

WR      aataataaagtatgataaaatgatttctctccactgtaatgtttcatgtggatatttg
      |||
WT      aataataaagtatgataaaatgatttctctccactgtaatgtttcatgtggatatttg

```

6.2.3 Sequenz des pBS-LacZ-neo-link Vektors

>pBS-loxP-lacZ-loxP-neo-loxP

```

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTAT
AAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAA
CAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAA
CCGTCATACAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGT
TTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAG
CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGG
AAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACA
GGGCGGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGAT
CGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCT
GCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
TAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAAT
TGGGTACCGGGCCGTTTAAACACTAGTGCTAGCATAACTTCGT
ATAATGTATGCTATACGAAGTTATAAGCTT
GGGATCTCTATAATCTCGCGCAACCTATTTTCCCCTCGAACACTTTTTAA
GCCGTAGATAAACAGGCTGGGACACTTCACATGAGCGAAAAATACATCGT
CACCTGGGACATGTTGCAGATCCATGCACGTAAACTCGCAAGCCGACTGA
TGCCTTCTGAACAATGGAAAGGCATTATTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTG
GTACCGGTGGGTGAAGACCAGAAACAGCACCTCGAACTGAGCCGCGATAT
TGCCAGCGTTTCAACGCGCTGTATGGCGAGATCGATCCCGTCGTTTTAC
AACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCT
GGTTCCGGCACCCAGAAGCGGTGCCGAAAGCTGGCTGGAGTGGCATCTT

```

Sequenz pBluescript
1-657 *Kpnl* (Violett)

blau: loxP-Element
Grün: *spacer*
Pink: *SpeI*
Braun: *Apal*

CCTGAGGCCGATACTGTGCTCGTCCCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTA
CGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGC
CGTTTGTTCACCGGAGAATCCGACGGGTGTTACTCGCTCACATTTAAT
GTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATATTTTTGATGG
CGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTTCGGTTACG
GCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGC
GCCGGAGAAAACCGCTCGCGGTGATGGTGTGCGCTGGAGTGACGGCAG
TTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTCCGTGACG
TCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCC
ACTCGCTTTAATGATGATTTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCA
GATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTTCTTTATGGC
AGGGTCAAACGCAGGTGCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTTCGGCGGTGAAATT
ATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTACACTACGTCTGAACGT
CGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGG
TGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCAGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGC
GATGTGCGTTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAA
CGGCAAGCCGTTGCTGATTTCGAGGCGTTAACCGTACAGGACATCATCCTC
TGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTG
ATGAAGCAGAACAACTTTAAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCGAACCA
TCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATG
AAGCCAAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGAT
GATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACCGGTAACCGCAATGGTGCA
GCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTTCGCTGGGGAATGAAT
CAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTC
GATCCTTCCCCTCCGTCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGC
CACCGATATTATTGCCCCGATGTACGCGCGCTGGATGAAGACCAGCCCT
TCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTTCGCTACCTGGA
GAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCACGCGATGGGTAACAG
TCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTT
TACAGGGCGGCTTCGCTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATAT
GATGAAAACGGCAACCCGTGGTTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATAC
GCCGAACGATCGCCAGTTCGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCA
CGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAG
TTCCGTTTATCCGGGCAAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCG
TCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACCTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGC
CGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCCTCTGGATGTGCTCCACAAGGTAACAG
TTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTG
GCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCG
GGCACATCAGCGCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTG
ACGCTCCCCGCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAAT
GGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGT
CAGGCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACCTGCTGACG
CCGCTGCGCGATCAGTTACCCGTCACCGCTGGATAACGACATTTGGCGT
AAGTGAAGCGACCCGATTGACCCTAACGCCTGGGTGCAACGCTGGAAGG
CGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGAT
ACACTTGTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCA
GGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTG
GTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCAT
CCGGCGCGGATTGGCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGT
AAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCCTTACTG
CCGCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATAACCCG
TACGCTTCCCAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAA
TTATGGCCACACAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCT
ACAGTCAACAGCAACTGATGGAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCG
GAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGG
CGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCAGCTGAGCGCCG
GTCGCTACCATTACAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAAACCAGGGC
AGGCCATGCTGCCCCGATTTTCGCGTAAGGAAATCCATTATGTACTATTT
AAAAAACACAACTTTTGGATGTTCCGTTTATTTCTTTTTCTTTACTTTT
TTATCATGGGAGCCTACTTCCCCTTTTCCCCTTTTGGCTACATGACATC
AACCATATCAGCAAAAGTGATACGGGTATTATTTTTGCGCTATTTCTCT
GTTCTCGCTATTATCCAACCGCTGTTTGGTCTGCTTTCTGACAAACTCG

GAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCA
 CAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG
 TCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT
GGATCCGTTAACGGCGCGC
 CCACGTGTCGAC**ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT**CTCG
 ACGGCTAGGATCGATCCGAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCT
 TGTCTTTTTTATTGCCGATCCCCCAGAGAAGCTCGTCAAGAAGGCGATAG
 AAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGCGATACCGTAAAGCACGAGGAA
 GCGGTCAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCA
 ACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATG
 AATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATC
 GCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCCGGCATGCGCGCCTTGAGCC
 TGGCGAACAGTTCCGGTGGCGCGAGCCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCA
 TCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCG
 ATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCA
 GCCGCCGATTCGATCAGCCATGATGGATACTTCTCGGCAGGAGCAAGG
 TGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCACCTTCGCCCAATAGCAGCCAGTC
 CCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCG
 TCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCCTCGTCTGCAGTTCATTTCAGG
 GCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCCCTGCGCTGA
 CAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTTGTCTGTTGTGCCAGT
 CATAGCCGAATAGCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAAT
 CCATCTTGTCAATGGCCGATCC**CAT**ATTGGCTGCAGGGTTCGCTCGGTGT
 TCGAGGCCACACGCGTCACCTTAATATGCGAAGTGGACCTGGGACCGCGC
 CGCCCCGACTGCTGCGTGTTCGAATTCGCCAATGACAAGACGCTGGG
 CGGGGTTTGGCTCGACATGGGTGGAAACATTCAGGCCATGGGTGGAGAGG
 CTTTTTGCTTCCCTTTCGAAAACACACTGCTCGACATTGGGTGGAAACA
 TTCCAGGCTGGGTGGAGAGGCTTTTTTGCTTCCCTTTCGAAAACACACTG
 CTCGAC**ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT**CTCGAGGTCT
 AGAGAGGCC**TGCGGCCG**
CACCGCGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGT
 TAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAAT
 TGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
 TAAAGCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGC
 GCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAA
 TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTC
 CGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAG
 CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
 GATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA
 CCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG
 ACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
 GGACTATAAAGATACCAAGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTC
 TCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTT
 CGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTG
 GTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCA
 GCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAACCCGG
 TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
 AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAA
 CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
 CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACC
 ACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG
 AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG
 CTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCA
 AAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATC
 AATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAA
 TCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTT
 GCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATC
 TGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAG
 ATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAAGAAGTGGT
 CCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC
 TAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTG
 CTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATTTCAGC

blau: loxP-Element

Grün: spacer

Pink: BamHI

Neomycin Resistenzkassette

Rot: Startcodon

blau: loxP-Element

Grün: spacer

Rot: NotI

Sequenz pBluescript

738-2961 SacII (Violett)

TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAA
 AAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG
 CCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACT
 GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAA
 GTCATTCGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGT
 CAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC
 ATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
 GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCAT
 CTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAT
 GCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACT
 CTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGA
 GCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCG
 CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

6.3 Sequenz *Homint14*

PCR Produkt generiert mit dem Primerpaar: Homint14_e/Homint14_f. Primerbereiche sind blau hervorgehoben. Die beiden festgestellten Transversionen im Cast/Ei Stamm sind rot markiert (138T→C; 244A→G). Dargestellt ist C57BL6/J-Sequenz.

>Homint14_ef_(304bp)ensembl_B16

CCCTGATACTGTCCTCTGCTCTTCCCTTGGGGACCTAGCCTGCTGCCTGAGACTGTGACTA
 TTGGCATAAAAAAGGAAAAGCCAGAATTGCCAACAACTGTCCCTTTGGGGACAAGGGGAAG
 GTCCGTGTCTGTTGCCCT**T**GCCTCTCTAGACATATGGTTAAATGCTAGAGAATTCAGTATTC
 CTATTGCTTATCCTGGAGAAGGTCTTCTCTATACCCACAGCCTTGTACAAAAGCTGTTTT
 GAT**A**CGTAAGCCCAGACATCACCAGATCTTGTCTAAGTTAGGTC**CAGGAAAGGGATGACC**
AGTG

6.4 Sequenz der Trap Insertionsstelle

Das PCR-Produkt wurde mit dem Primerpaar Trap_Neu_2a/PCR_Mut5b generiert. Die Primerbereiche sind blau, das Exon5 ist fett hervorgehoben. Genomische Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt. Ein Teil der Sequenz des Trap-Vektors pGT01xf (BayGenomics, Homepage, 8654bp) ist in Kleinbustaben gezeigt, hierbei handelt es sich um das *enolase2* Intron. Der Trap-Vektor ist ab Position 21 (BayGenomics Sequenz) in den *Vps54*-Lokus integriert. Somit befindet sich die genaue Insertionsstelle 369bp stromabwärts des Exon5.

ATGGTCTTGGTCCTTGGTGGCTGAGCCATCTCATCTGTCTCCCATGTGTCTTTTTAGTGT
 CATTCATGAAAAGAAAATAAACTTTATCTCTTTATCTCTCTATATCATCTATCTATCT
 ATCTATCTATCTACCTACCTACCTACCTACCTATCTAGATGGTTGGGTAAACCCAG
 TGCTTTACACAAGCTAGGTAAGTTCCTACCCTTTGGCTATATATATCTATATCCCTCCAT
 AATGGTATTTGGTCTGTTTCTATTTGTATTTAAGTTCAGAAGCTAGTGATTTTATATTG
 AAAGTTCAGAAGTAATTTTGTATATTTAATTATGTTGTAGAACATTTTGTATGCTTTGA
 GTAATCATATTTCCACATAGCATTGATTATTTTATTGTTTTTTTATT**AGAGAGAGAAG**
ATTTCATGAGAGATGCAAGAATATTTGTCTCCTAAAGATACCTTTGACAGGACTCTTTTA
CATATTCATGGTATGAATATATGCTATTTATAGACAATAAGCATAGCTTAACTTATTAAT
 GAACAAGTTATTAACATTGGAACCTTTGTTTCCATTATATATGTACTTTTTTTTTTTAGTA
 AATTCCTTCTGTGTTTTTTTTTTGTGGTACTGGGGATTGAACTTAGTATGCTAGGCTGTA
 CTCCTAGCTTTTTATTTTTAGTAAGAAATTTATAATCTAAAACCATAATCTTTTCTACAA
 GCTCCTTAGAGAGTGATCGTGAGAATAATCCTTCAGTTTGACAAGTATTTAATTGCTTGG
 TATTTGGTGCATTGCTTGTGCTTAAAAGTAAAAGAGTAAGAAATTCTCAAGGAATTTAA

Primer:
 Trap_Neu_2a

Ex5 79bp

AGAAAAAACCCTAAATCGgaggaaccgaaagtatgtttttcagatgttctttctcagaa
 ataggagtgtgagggttgagtggtgttaggacacgaacccagggtggaggaga
 ctggaggacagagcctctttccaggagggaaggaggagatgttgatccgctccgg
 aagtcggggtcaggttgagcaggccaggcctctcccgtggtctcgcctcttgctcta
 gaagcctcactggccagggtgaagccaggctcgtgggtgcccagccctgctccctcactcct
 cagcatggatgtgaagaggactgtatggcgtgcccgtgtgtgtgaccgtgggtacactta
 aacaccgggttttgatctgactgtcccggatgtcctctgggtgtcaaagaccctttt
 gggtttgcctttgtaagagcgcgggatctacttgtctggaggccaggagtcctcag
 ccgaggcttgccgcccctgactgcaactgactgagtagtgatggagggagagtcgtggtaccg
 cactgcccgtttcctccaccatccccgcagcgcagggcagtgacattccgtcctggctgcg
 aaggggatggtcgggccttctccagcctctccgcttctagcgaaggggccttgatgga
 agggcccgatgtctccaaagttgattcatgcttcttgacagagaaagaccagaaagaa
 ggtctcaagtttttagccggtagcccggatggccttttctgacggcaccatataaacct
 tgtgacctgactttgagaccctctaaccgaaggcccctaccactttaccctttccctt
 tgaaggctttccacaccacctccacactnccccaaactgccactatgtaggagg
 aaggggtgggactaacagaagaaccggtgtggggaagctgttgggaggggtcactttat
 gttcttgcccaaggtcagttgggtggcctgcttctgatgtcagccccccccctatccc
 ataggagccaggctcctctcctggacaggaggtgggtcccaaggtctggggtagaaggtga
 gagggacaggccaccaaggaagactgaaggggagatgccagagactcagtgaagcctggg
 gtaccctattggagtcttcaaggaacaaacttggcctcaccaggcctcagccttggtc
 cctcctgggaactctactgccccttgggatcctaccgcttctgatagcatacattatacga
 gttatgtgataggccttttagctacatctgccaatccatctcattttcacacacacacac
 accccaatgcccaacttgtatggccttggcggggtcatccccccccccccccagta
 tctactttcctctggtcagtgggcacaatgtccagcctcaagtttatatcaccaccgcaa
 cctcaagctagcttgggtgcttgggtgtggataagtagctagactccagcaaccagtaa
 cctctgcccctttctcctcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
 ACGCAGATCGCATCGATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCGCAGATCTGG
 ACTCTAGAGGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAA
 CTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC
 ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTT
 CCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGATACT
 GTCGTCGTCCTTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCATCTACACCAACGTA
 ACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTAC
 TCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTT
 GATGGCGTTAACTCGCGTTTTATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTGCGTTACGGCCAG
 GACAGTCGTTTGCCGCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGC
 CTCGCGGTGATGGTGCTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGG
 CGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGC
 GATTTCCATGTTGCCACTCGCTTAAATGATGATTTACGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAA
 GTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGT
 GAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGT
 GGTATGCCGATCGCTCACACTACGTCGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCC
 GAAATCCCGAATCTATCGTGCCTGCGGTGGTTGAACGTCACACCCCGACGGCAGCGTGAAT
 GAAGCAGAAGCCTCGCATGTGCGTTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTG
 CTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCAT
 usw.

Primer: PCR_Mut_5b

En2 intron

β-geo Kasette

6.5 Sequenzen: Vps54 Interaktionspartner

Bei mehreren gleichen Plasmiden ist die Sequenz für den längsten Sequenzierlauf angegeben. Sequenziert wurde mit dem Primer Gal4_AD_seq. Die Multiple Klonierstelle des pACT2 ist bis zur *SalI* Schnittstelle angegeben (Rot = *EcoRI*; Blau = *SmaI*; Grün = *SalI*).

>q1_q9_31_46_104_111 NM_175245 (713 reliable bases)
 cctggattAACTATCTATTTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCT
 CTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGG
 AGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**CTCCACCGGGGCGGGGGCCTCTCC

TCTCCATGGCGAGCGGTAGCGGCCCGGGCGCGGGCCCTCGGCCAACCTGAACGCGGTGA
 GGGAGACCATGGACGTTCTGCTTGAGATTTCAAGAATTTTGAATACCGGCTTAGATATGG
 AAACGCTGTCTATTTGTGTACGGCTTTGTGAACAAGGAATCAACCCAGAAGCCTTATCGT
 CTGTTATTAAGGAGCTTCGCAAGGGTACTGAGGCACTAAAGGCTGCTGAAAACACAAGCT
 GACTTCCAGAGAATTCCTGATGAGATATGTCAAGCTTAGCAAGAAAATTTGAAGATTCCA
 TCATAGTCAAGATATAAAAATGACAATGCTGCATGCTGAGTAGAAAATGTTTTCTTTTACA
 AAGAATTATAAAACCATGGCTGAGCATGTCAGTGGGAAGTGGCTTGAGCGAGAATCAGCA
 CGTGTGTTTACATCACGTCCTGTTGTAAATGGCCCCAACCCAGAGTGTGGCCACACTTAT
 TTATGTATATCTATAGGGCTGAGTGTGAGTTTCTAAACAGCATCTACCCGACATGCA
 CAgctgctgagcctgtttgaagttagtggttgcagaggtgatgtgttatattatg
 acttgtggacattaacaataaaaccttaattttgaattggttaagcattaaaaactggg
 ctgtgtgttccaatggaaccgtaagttaatggaaattgagccggtggtttgtgaaagt
 tttctggtttcacattctgtgttttgaaaaaataggaattcccaaacattctcaaaa
 ttcatctccctcatacaagaaattattttggtttttttatcccacaatttgtgggcagg
 tttaaaggggtgataagaaaaac

>q5_q6_q8_4_5_20_22_25_35_47_74_90_92_112_119_120 Zhangfei (577 reliable bases)

cccttgaTATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGAT
 CTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCAT
 GGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**CGGACTGGCACCTGGAGCCCGGG
 CTCAGCTCGCCCGGGCCCCGTCTCCTCGTCCGGCGGAGGCTCGGAGAGCGGCGGCCTGTTG
 AGGGGGGACGACGACGACACCGCGGCCGCCGAGATGCAGCGCTTCTCCGACTTGCTG
 CAGAGGCTGTTGAACGGCATCGGAGGCTGCAGCAGCGGCGGTGACCGCGGCGGCGGGGAG
 AAGAGGCGGAGAAAGTCCCGGGAGCAGGAGGCGGTGGCGCCAACGACGGCAACCAGGCG
 GCGACCAAGAGTCCCGGAAGGCGGCGGCCGCTGCCCGTCTTAATCGGCTCAAGAAG
 AAGGATACGTGATGGGGCTGGAGATCGGGTCCGGGGACTGGCAGCCGAGAACCAGGAG
 CTGCGGGCCGAGAATCGGGAGCTGGGCAAGCGCTGCAAGCACTgcaggaggagagtgc
 tacctacgggcccctcctggccaacgagaccgactagctcggctgctgagccgactgagc
 ggcgtgggactgcggtgaccacctccctcttcagaaactcgcccgcggcgaaacacgaa
 tacacctggcgggtggggaacaaccgcccggagccgcccgaagaggacgaccccggcgg
 gaggagtgttctctcctggtgaacaaggataaggtggttcgggggagttcttctcggc
 gtgcccggcgaagggcgtgacctctccttaaaaagggttagggccaagtaaaacttggtc
 cctttattccgcttaaacctcttttccccctcttcaacaagggtgaacaaacttta
 tttgggacatttgtcccccggaaccgcttttctgagggcgaaagaaaaagggatatt
 gactctcttaagtggggttaaccataaca

>80_117 Q80ZM0 (635 reliable bases)

tatACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTCTATGGC
 TTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCC**
GGGGATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**ATTCTGCAGGCTGATCAGACCTACAGTTCTGC
 CCTGGAAGGAATGAAGATGGAATCTCCAGCTAACTCGGGAGTTGCACCAGCGAGATAT
 CACTATTGCTTCTGCCAAGTGTTCCTCCTCAGACATGAAAAGCAGCTGAAGCGAGAGAT
 GCAGAAGCGAGAAGAAAAGGCTGTAGAGCATAAGGAGATTCTAAGTCAAGTGGAACTCTCT
 CAAATTAGAAAATCATCGTCTTTCTGAAACAGTGAAGCTGGAAGTGGGCTTGCATGA
 GGGCTCGCTGCCACCTCTCCTCTGGGATCGATAGCTACCAGGTTTTCTGGAAGAGGAGGA
 GCTGAGGTCTCACCATATTCTAGAGCGCCTGTACGCCACATTGAAGAACTGAAAAGAGA
 GAGTGAGAAGACGGTGAGGCAGTTCACAGCCCTCGTGTAGCCCTGCACACCCACAGACGG
 AAGACTGGATTATAAAGTTGTAATGAAAGCAATGCTCCgcaaggcggcactgaggagtct
 gcagactggcacttgggtatattcactgccttgtgtggaggactgcttccgtaggaactt
 gtgagaataaacgctttgccactttctcacaaaagggttttaccacagaacaaggctt
 ctctttcccaatttaaggttaataactggtttccaattgaaattaaagattggtctatgc
 cgggtggttaacttgaaacaaaaaacacatgcgcgcagaaaatctatgaatcgccaat
 actggaaaaaccccgcgaggttaattttcaatggtgctctgggaccaactccagttcgct
 tgtatatatacatcgggtgagggcctcctttaggtgacaattcccacc

>81_113 Cops3 (694 reliable bases)

accctttATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGA
 TCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCA
 TGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**AGCTTACCTCTGTTGCTCGGGC
 CACCAGCGGGGGGAAACATGGCTCTGCTCTGGAGCAGTTCGTGAACAGTGTCCGACAGC
 TCTCAGCTCAAGGGCAAATGACTCAGCTTTGTGAACTCATCAACAAGAGTGGAGAACTCC
 TTGCGAAGAACTTGTCCCATCTGGACACTGTGCTTGGGGCTTTAGATGTTCAAGAACACT

CTTTGGGTGTCCTTGCTGTTCTGTTTTGTGAAGTCTCAATGCCAGTGTTCCTGACTTCG
 AACACTATTCTCACAGGTTTCAGCTTTTCATCAGTACATGTAATGGCGAGCACATTCGAT
 ATGCAACAGATACGTTTGTGGGCTTTGCCATCAGCTAACAAATGCACTTGTGGAAAGAA
 AACAGCCCCCTCGAGGAATTGGCATCCTTAAGCAAGCCATAGACAAGATGCAGATGAATA
 CCAACCAACTGACCTCAGTACATGCCGATCTCTGCCAGCTTTGTTTACTAGCGAAGTGCT
 TTTAAACTGCCCTCCATATCTTGATGTGGATATGATGGATatctgtaaagagaatggag
 cctatgatgcaaaacactttctgtgctactactattatgggggaatgatctatacggcgc
 tggagaactttggaaagagcgtgtacttttatgagcaggctataacttctccctgccag
 ggcggcagccattatcatggttggaaatcataattaaagtaaatagtcctaaggcttttgaa
 attacactggcgaagtaaaaaagtgggcctaaaaatacaccccctccaataaatgggg
 taaaatttattaacccccctccaacaatggcttaccatcgaattaaacgcacagttt
 tatctaaaccacacaaaacc

>105_110 *Ina* (583 reliable bases)

cacTTGTATATAACTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGAT
 CTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCAT
 GGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**GGCGCGAAGGCGCCGAGCGCGCCC
 TGAAGGCGCAGCAGCGGACGTGGACGGCGCCACCCTGGCCCGCCTGGATCTGGAGAAGA
 AGGTGGAGTTCGCTGCTGGACGAGCTGGCTTTTCGTGCGCCAGGTCCACGACGAGGAGGTGG
 CCGAGCTCCTGGCCACGTTGCAGGCGTCTTCGCAAGCCGCGCCGAGGTGGACGTGGCCG
 TGGCTAAACCAGACCTGACTTTCGGCGCTGAGGGAGATCCGCGCGCAGTATGAGTCCCTGG
 CCGCTAAGAACCCTGCAGTCCGCCGAGGAGTGGTACAAGTCCAAGTTCGCCAACCTAAACG
 AGCAGGCTGCGCGCAGCACCCGAAGCCATCCGAGCCAGCCGAGAGGAGATCCAAGAGTACC
 GCGCCAGCTCCAGGCACGTACCATTGAGATAGAGGGTCTGCGCGGagcccatgagtccc
 tggagaggcagatcttggaaactggaggagcgggacagcgtgatgtggcgggtaccagg
 acagcatgggcagctggagagcgaactgaggaacacaaaaaacgagatgggacgccacct
 tcgggaataccaaggactggtcctcaatgtcaaaaatgggccttgacattggagatcgcgact
 taagtaaactcccggcaagtggaaaagacgcggtttaccccggcggggttaacatctcgg
 ggtggatccatcgccccatcccagttattggctcctccccaaaatctttacgtctacag
 cccccaaaatctccccctaccgggctgtccccgaaaaggaggacaaccaggaggagga
 aatgccccctaagagaagtcttaacaaaaactccaagggtcggggcagggtcc

>7_107 *Dnm* (623 reliable bases)

cctttgttaaaCTATCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATC
 TCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATG
 GAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**GAAGACTTCATAGGCTTTGCCAAT
 GCTCAGCAGAGAAGCAACCAGATGAACAAGAAGAAGACTTCAGGGAACCAGGATGAGATT
 CTGGTCATTTCGAAAGGGGTGGTTGACCATCAACAACATCGGCATCATGAAGGGAGGCTCC
 AAGGAGTACTGGTTTGTGCTGACTGCTGAGAATCTGTCTGGTACAAGGATGATGAGGAG
 AAAGAGAAGAAGTACATGCTGTCTGTGGACAATCTGAAGCTGCGTGATGTGGAGAAGGGC
 TTCATGTCAAGCAAGCATATTTTTGCCCTCTTCAACACAGAGCAGAGGAATGTCTACAAG
 GATTACCGGCAGCTGGAACGTGCCCTGTGAGACACAGGAGGAGGTGGACAGTTGGAAGGCT
 TCCCTCCTGAGGCTGGCGTGTACCTGAGCGTGTGGGGACAAAGAGAAAGCCAGTGAG
 ACCTAGGAGAACGGCTCTGACAGCTTCATGCACCTcgatggacctcagctggagcgcag
 gtggagaccatccggaacctggtagactcgtacatggccattgtcaacaagactgtgcgg
 ggactcatgccccaaaacatcatgcacctcatgatcaacaacaccaaggagggttttcttc
 tcttgaactggtggccacaccggtactcctgcgggggacaaaaacacctgattggaaga
 atcggggcgagcaaggctccacggggccgaagaagatgctggcccttgtaccacccccttg
 aagggggggccccatTTTTTTGGCGGaaattaatccaacaaccgtcagcgaacgccagg
 gccccctcgggtgaaaaatctcttgggtgtaaatcgcgccagtcgcgacctctcca

>23 *Snx5* (665 reliable bases)

ccctggtatataactctCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATC
 TCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATG
 GAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGAC**GAGCTATTTGAAAACTTAGGAAA
 GTGGAAGGTCGAGTCTCATCAGATGAAGACTTAAACTGACAGAGCTCCTCCGATACTAC
 ATGCTCAACATAGAGGCTGCAAAGGATCTCTTGTATAGACGTACCAAAGCCCTAATTGAC
 TATGAGAATTCAAACAAAGCTTTGGACAAGGCCCGGTTAAAAAGCAAAGATGTCAAGTTG
 GCAGAGACTCATCAGCAGGAATGCTGCCAGAAGTTTGAACAGCTTTCTGAATCTGCAAAA
 GAAGAGCTGATAAACTTCAAACGGAAGAGAGTGGCAGCATTTTCGAAAGAACCTAATCGAA
 ATGTTCTGAACCTGGAAATAAAGCATGCCAGAAACAACGTCTCCCTGTTGCAGAGCTGCATC
 GACTTATTCAGAACAACCTGACCTGTCTACTCTGAAGGACACCAATGTGAAAGCCAGCAT

CACTTGCACTTAAATCATTACTGCAAAAAGAAATAGCTTTGACTAGTTTAAATCATGTGA
 AATAATATTTTGATTTCTAAAaatccttaaacnaaagaactcgcgcgctatctcccagac
 ctagcggagtcacaaacgccccgaaaatcttataactcggaaatacggaaaacccccca
 aggttccattacagtgggctttggggccccccacaattccttcatttaaacccagcggtg
 cggctccttaatggaaataataaccccccaactaccaaactgggcgcgggaaccccc
 gtgtttataaaaatttcttaacggggtaaaaattagcgcgccactcttttttggggcgcc
 aaatctctcctggaaaatttattccgggggggctttttcaciaaaacttgtggactttctc
 gccc

>116 *Bfsp2* (584 reliable bases)

ctctggtactggCAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACG
 CTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCG**
ACGAGTGGCAGCGGACTTGCCCTCGGGGACCAACTCCAGCATGCCCCGTGCAGAGGCACAG
 GGTGTCATCCCTCAGGGGAACACACTCTCCATCTCCCTGGATAGCCCCCAGCATCCAG
 GACCAGTGTGTGGGTAGCCTCGTCCGTGCCCTGGGGTCTATGTAGGAGTCGCACCCAG
 TGGTGGCATAGGTGGTCTCGGTGCCGAGTGACCCGCCGGGCCCTGGGCATCAGCAGTGT
 CTTTCTACAGGGCCTGCGGAGTTCAGGCCTTGCCAACGTGCCTGCTCCGGGCCCAGAAAG
 GGATCACACTACTGTTGAGGACCTGGGGGGCTGCCTAGTGGAAATATATGACCAAGGTGCA
 TGCCTGGAGCAAGTCAGCCAGGAAC TGAAACACAACCTGCGGGCTCACCTGGAGAGCAA
 GGCCAAGAGCTCTGGAGGCTGGGATGCCCTCCGCGCCTCCTGGGCCAGCAGCTACCagca
 ggtgggagaggctgtcctagaaaacgcccggctcctgctgcagatggagacgatccaggc
 cgtgctggatgactttaagagagatatgaaaaacagcagccattcaggaaggcagcggga
 aaaaggaagttaattccctgttacaagtcacgaataacctaatttggacaaagacggga
 tcttcagccttcaatataaaaagcctgaaagaaagaactggggctttctgtcaagaaagc
 tattaanaagatggtgaagggtctggatcaacaagtgggaagggtcttgagctgggag
 caagcaaatgttccccatggtgcacacgggtctgggatgaatgtccttgtaaaaaacat
 cccgaagtcaatggtggaagaaaaaatttgggaaaaaaaaccgancataaaagccg
 ggaggcctttgcttccaagcgtttaggacaacttgacagcaaggtg

>1 *Pkp4* (630 reliable bases)

tcctggacttgcAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC
 TAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGA**
CACAGACTGTACCTGCAGTCTCCTCGAAGCTATGAAGACCCTTATTGTGATGACCGAGTT
 CACTTCCCAGCTTCTACTGATTACTCAACGCAGTACGGACTGAAATCAACCACGAATTAT
 GTAGACTTTTATCCACTAAACGACCTTCTTATAGAGCCGAACAGTACCCTGGGTCCCCG
 GACTCCTGGGTGTAGCATCAAGACGGCTGCCTGCTGAGGGGCGCTTTCCTTCTGACTCTG
 TTTGGATTGAGGGGAAGTCCGTCTTGCTGATGATGGTGACCGTGAAAGTGAAATGGAAGG
 GATGAGTGAAGAGGTTTTGGTTTTGTTTTGTTTTTCTTTTTTTGAGGAATTTTCAGG
 GAAGTGAGGAAACCCCTGGGAGAGGACTTTGTACGCGCTGTGTAGGTGTTAGATCTAATT
 ACTTGTAGAGTCTAGTGGTGAAGGTGTGGGTGACGTGCTGGGAGGCTTGAGACGTGGGTG
 AGATGAGATGGGTATGTGTAGGTCAAATCAAATGACAGATGAttgttttaatgtgaataa
 agttatgttcagatagtttgtacagaaaaataataaaaaatgggatgccccttcatgtg
 ttattgctattactaaatgtaagattgtatgtatcatgtcttgtaaaaaattccccttct
 gttgggtgttaataatggaagattgccacattgggttaagtggccatcaattggtaaggcag
 tgytgcctttagaaagagatttggaaaaaatggacagctttaaaccccccaagggggaaa
 aacccgccccgggaaatggttccggagttgtaaaaacaaaaattctgtacgcccctctgg
 ttnttaagtggagttggtgaaactccgggaagccacaaaagggccagcgggtgataaatag
 atggcccatggttctttcccaccctaacggggaaa

>12 *Q8BUY8* (539 reliable bases)

ccctggtccttcaacaacaaaatctcatatctctatggcttaccattcagatgttccaga
 ttactctagcttgcgtgttcacatggccatgcagGCCCCCTCCGATCC**GAATTC**CCGGTGC
 GTCCACCTTTAACTTATAGGAGACTAATGATAACATTCAGATTGTTATTAANAATGTTTCA
 GAACATCAGTAATATTGTAANAAGTGGAGCGATGTCTTTACTTGATGATGATTTTCAGTCT
 TGAGCCGCTTGTCTGCATTTTCATGAATTTGAAGAGCTAGCTAAACAGCTGCTCATCCA
 AATAGACAATCAAAATGATCCCAGGAGGGACAGTAAAGTTAGTGTGATTTAACCACCTG
 CCACTCATCAGCCTTATGTTCCCAAAGAGTCCCAAATAGTGCCTTGGTGTTCACAGTCTG
 TTTCTGTGTCGTAACCTTATATTTTCAATGCTAATGTTAACTTGTCAATCTCTCGTAGTGA
 CCTGGATCGTTTGTGGATGCCAAAATGAATATCAGAACTGAAAACACACTTGTGTCTAT
 TTGCTTACCGTCCAGATTGTGATATTTTTTATTGTTGAGCTCCAGTGAAGCAAGTCAT
 ATGTGTGAGCTATCTGCTATTTGTCAATTTAAAcattgtgggactctgcttgagtctgcgt
 tatcaataaagttcagatggtgaagttgccaacaacatccttgtaagaaaaaacctcgagac

atctatgaatcgtacattctggaacccccgcaagttcacttcaactggtgcatggtgca
 ccacctcaaacttcttccatttattcatcggtggggcgccgtttactggttaactatta
 ctccccataggtttcaattcttgggcatgtaaccctgctgatctgtataaaaatttgg
 gaaaagtaactaagatttatgggcgcatcctttccttgggacacttaattctgcatat
 gataaaattttccccgaggtgcttttttctagaaacgtcttggaccttcttttcgccac
 taaaggctttggtcccacgtatcctcataaccaaggtgtn

>2 *Golga4* (583 reliable bases)

cccttgtcctgcaacaacAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGA
 TTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGTCG
CGTCGACCAGCTCTTGTCTCAGATGGAAGAGAAAACCCAGCGGTATGCGAAGGACACAGA
 GAACCGACTGAGTGAGCTGAGTGCACAATTAAGAAAGAGAAAAGCAAGTTCACAGCCT
 ATAAGACAAACTTAAAAACCTGGAGAGTTCTCCACACCCAGAAGTGCCAGCGGTGTCCAC
 ATCTATGCAAAGTGTGGCAGCGTCTCCCGAGCAAGAGGCTCCAGATTCCCAGGACTGCAC
 ACACAAGGGCTGTAAAGAAAGACTCTGCATGCTGCAAAGACGTTAAGTGAAAAAGAGAA
 GCTGCTGCGCAGGCTGGAGCAAGGCGAAGGCGAGGCGAGGCCATCGCAGCCTGAGGCTCA
 GCACAGGGCGCTCTCTGGAAAGTTAGACTGCCTAGAGCCAGGCAGCTTGAAGATCACGT
 TCTGATAGGATGTCTTCCAGAAGAATCGAAGAAAAGATGAAATGTTCCCTAATTGTGTC
 Tcaaccagggggagaagaaactggttaccacacaggggtgaaacagaattgggcaagtgt
 gggtgacaggggtcagaaaaacccccaggaaaaggagctcacttgccaggcccttgagc
 aaagggtgaaaaaactggagtcggacttattaagaaaaaggggcgccattaactttgaa
 gtggaaaagttagccttaaaatttgcaaaatcgccattcttccaagcaagaaatgggg
 tggggaaaaataaattttgtaacagtgttggagaacaggcctgatggaaaaatcccc
 aatccccctaaatccaacccaaaactgtgggaccggtggacggcctttgcctaaggact
 ctgagtccaaaatttaaaagaggagggcggggaacaacaaaaaactgagctaaggagag
 gtggcgaagcgtttcacaagaggggccgcgcg

>29 *Dab2* (598 reliable bases)

ccttgttcgtgacttacAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGA
 TTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCG
CGTCGACTTTTGAGACCTGCCCGTCGGGGATTGGCTGGTATCAGTGACTGTCTACTGCTG
 GATTTTCTGCTTGCCTTCCCGTCATGTCTAACGAAGTAGAAACAAGCACAAACCAATGGCC
 AGCCTGACCAACAGGCTGCCCGAAAGCGCCATCAAAGAAGGAGAAGAAGAAAGTTCTG
 AAAAGACAGACGAGTACTTGTGGCCAGGTTCAAAGGTGATGGTGTAAAATACAAGGCCA
 AGCTAATCGGTATTGATGATGTGCCTGATGCTCGAGGAGACAAAATGAGTCAGGATTCTA
 TGATGAAACTCAAGGGAATGGCAGCAGCTGGTCGCTCTCAGGGACAACACAAGCAAAGAA
 TCTGGGTCAACATTTCTTGTCTGGCATAAAAATCATTGATGAGAAAATGGGGTAATTG
 AACATGAACATCCAGTAAATAAGATTTCTTTCATTGCTCGTGATGTGACAGACAACAGAG
 CATTTGGTTATGTGTGTggaggtgaaggccatcatcaatTTTTTgctataaaaaacagggc
 aacagggctaaccattagtcgctgatcttaagacctTTTTTcaagttatctataatgta
 agaaaaaggaagaagataagaaaaaggttgaagaagcccacaaagctgaagagaatggaa
 atgaggccctaataaacctttgatgatccaactaacaattgaagcttggaaagcaaaaa
 tttccctgttagtgggatctttaactctggaatcaaaagcacatccagaactcttttaa
 gaagaaaactccgctcttaacaaatggggttcaccttccctggttttctctcccgccaaca
 caaagcctccagggtattccttcttggcctggagaacgcctttggtctgtgctatttct
 caacttctTTTTTcccaccgcttatgacctgtct

>4 *Abcc5* (576 reliable bases)

gcctggaactgcAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC
 TAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGA**
CATTCCTCAGGAGCCAGTGTCTTCAAGTGGCAGTGTGATCAAACCTGGACCTTTCAA
 CCAGTACACGGAAGACCAGATCTGGGATGCTCTAGAGAGAACGCACATGAAGGAATGTAT
 TGCCAGCTACCTCTGAAACTTGAAGTCTGAAGTAATGGAGAACGGGGACAACCTTCTGT
 TGGGGAACGGCAGCTGTTGTGCATAGCAAGAGCCCTGCTGCGTCACTGTAAGATTCTGAT
 TTTAGATGAAGCTACAGCCGCTATGGACACAGAGACAGACTTACTGATCCAGGAGACCAT
 CCGGGAAGCATTTGCGGACTGCACCATGCTGACCATTTGCCATCGCCTGCACACAGTTCT
 GGGCTCTGACAGGATCATGGTGTGGCCAGGGACAGGTGGTGGAGTTTGACACCCCATC
 GGTCCTTCTGTCTAATGACAGTTCAAGATTTCTATGCCATGTTTGCTGctgcagagaacaa
 agtggctgtcaagggtgagtcctcccgtcctcgaagtctcttctcctcagagcattggcat
 tctcttctgggttgggccccctcatcctgtcctgctgaaattcgcccttcccagttttat
 ctctcacacaaacattcaggaactactgtgtgtttcacttttaaggaagtcataatttgg
 gttattgggtttttattccctaatacctttaaatgaaatttaagttttgggtcttaaatgg

gactccttaaagaggttcagggaaaccattcctataaaatgtttttctgggtgccttatt
aatgaaagcctttaaatgggtggaccatgggcttaataataaatcctgggtcaataacc
caaaatttaccaggaagaaaggttaagcgggggttttttgtcttattatataatggaaca
cctggtggcttaacacagcagggggccacccc

>6 *Rabip1* (615 reliable bases)

ctcttgatctccaAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC
TAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGA**
CGCACAAACCTATTATGAGACGTTAGAGCAGAATGACGTAGTTCAGAAGAAAACTGGCA
CACACGGGCCCGCAATTTCTGCCGCTTTGTCACTGCAGTCAACAACACGCCCCGGAACAT
TGGCAAGGACGGCAATTTTCCAGATGCTGGTGTGCCTGGGAGCCAGAGATCACCTCCTGCA
CCACTGGATAGCCTTGCTGGCCGACTGCCCATCACTGCGCACATGTATGAGGACGTGGC
GCTGATCAAGGACCACACACTCGTCAATTCCTTGATCCGAGTGTGCAGACCCTGCAAGA
ATTCAACATCACACTGGACACTTCCCTCGTTAAGGGCATTGACATCTGACCTCTGAGCAC
CAGCCAGCAGCAGGACCCAGAAAGACTCCCTGCAGCTCTGCCTCTTCATCCCAAAGGGAC
CTAAGCAAGTTGTGGGGGACAGAGAGGATATGTATACTTACTGTAAAAAGAAAACTAGAG
GATTTTTGGAAAAAAATAATCTATTTTtagagtttatttggctgacctgtttttacacac
tttcatgtgaaagagacagagaggggcaaggttggcgctgcttgttttgaagctggtgcc
tccttgcattggcgcacgctgggagcctgtgggctccccaactggccttggaaaaagt
gtgggctgttccacatgccggccccgtccccggggtgaagggcaattcccaatccgttt
ttaaactaaatgttttctatattaacaattattctggggtattttggcttttaacgggg
ccaccccaagtggtgcgaaagtggggacactccacagtgcgcccaattcaagagggag
atgttttaaggagtgccccctctggatctaagcacctgcgccaatgtatgcctccaaaat
ccgctttccccgctctcccccccttttttgtggccgagtaattta

>q11 *Dmap1* (442 reliable bases)

ccttggctcttgaccagcaAAAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGA
TTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCG
GTCGACGTGGGTCTTCCAGAGAGAGGTACCGACCCTTGACGTCGGGGTACTACCTCATCC
CTCGGGCGTGATGGCTACGGGCGCAGATGTACGAGACATTCTAGAACTCGGGGTCCAGA
GGGAGATGCCGCCTCTGGGACCATCAGCAAAAAGGATATTATCAACCCGGACAAGAAAA
GTCCAAGAAGTCCCTCAGAGACGCTGACCTTCAAGAGGCCTGAGGGCATGCATCGGGAGGT
CTATGCTTTGCTTTACTCTGACAAAAGGATGCACCCCCACTGCTGCCAGTGACACTGG
TCAGGGGTATCGGACAGTGAAGGCGAAACTGGGGTCCAAGAaggttcgccttggaaatgg
gtggccttactaaccccgctcgaagagcggcgctatgttttccactggcgacgagcg
gcygaggggcaacgactacccttttggccggtcaataagaacgggggaggtggcccg
tgttccctcagaagcaggggtaaccaactctaacttcattgatgacgattgacttaa
gggaaaaaatggaccaacttatttggacttcagcccgccgaatttgaatctgcgcct
tcgtaagttatttccccattcggggattgaaccaccaagaggtttcaagagaacggtt
ccggtgggggggacctgggaagaagaaggacttcccccttttgggtgcgcaaagattttc
caaatgtgaaggggctgggcccagggccaagatcttctaaaatatccactggtttgat
gcttggcacttaaaagaacgggcygaggggaccagtttcaagggggttttaaaaccga
aacccaaaagaaggttgggagaagaagaggagtaccccctcacaggaaggttcggtatg
atttgaagggcccggaaaaaagaagcggggaaaagcgcgaccacaaacttgtgaaacttt
tgtttccgggggtaac

>q2 *Rasgrf1* (583 reliable bases)

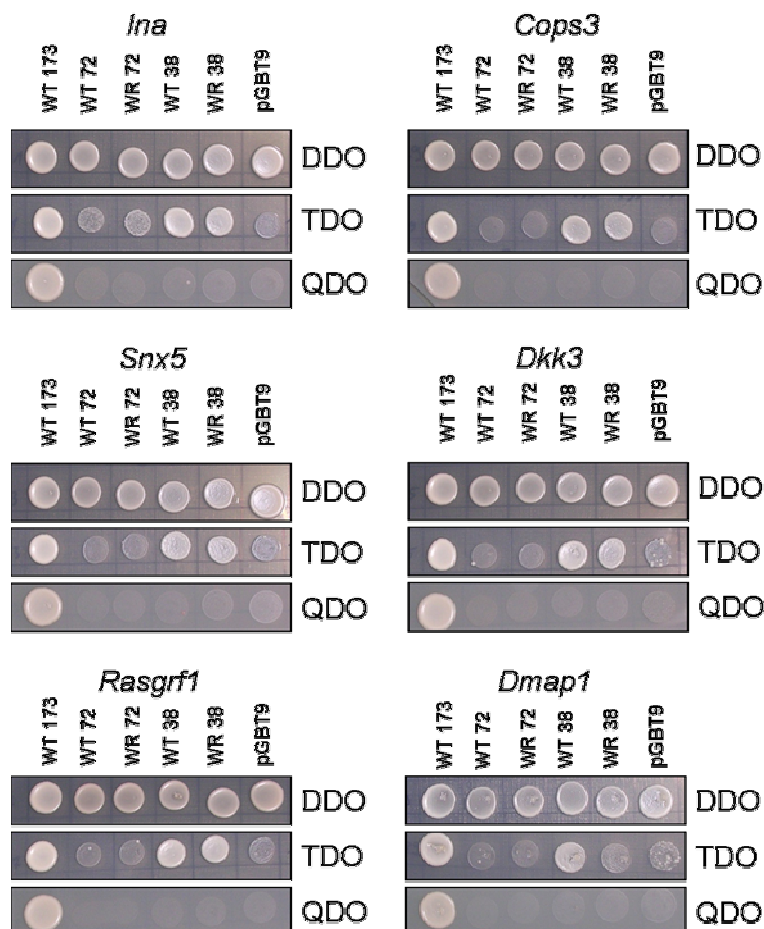
atccttgaactgcaacaangaGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC
TAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGCCGC**GTCGA**
CAAGGAGTCCGGCGAGAAACAGCAACATTACTTCACAGTGAACTTCTCCAATGACAGCCA
GAAGACCTTGGAGTTGAGGACCGAGGATGCCAAGGACTGTGACGAGTGGGTGGCTGCGAT
CGCTCGCGCCAGCTACAAGATACTGGCTACAGAACATGAGGCGCTTATGCAGAAGTACTT
ACACCTGCTGCAGGTAGTGGAGACAGAGAAGACTGTGGCTAAGCAGCTGCGCCAGCAGCT
TGAGGACGGTGAAGTTGAGATCGAGCGCCTGAAGACGGAGGTAACTATTACAAACCTGAT
CAAGGACAAATGATCGTATCCAATCCAGCAACAAAGCCGGTCTGCTGATGATGAGGACAG
TGACATCAAGAAAATTAAGAAGGTTTCAAGACTTCCCTCGGGGATGGCTGTGCCGGCGAAA
GTGGAAGAACATCATCCAGGACTACATCCGGTCTCCCCACGCGGACAGCATGCGCAAGAG
GAACcagctggtgttcagcatgctggaggccgacgctgagttcgtccaacagctacacat
ccttgtcaacaacttctgcccactgtgcatggccgaccagtcctaagaaagcgcctat
tacacacgaagacgtcagcagtatcttctgaacaggttaagcgggaagggacgattaaggt
ggggggcatccgttgccaaatgttggctggaatcggggtcaaacccacatgtgtttccac
caagtgcagttgaggaaccctattcccagggagggaggggaataattcaaggttgggtgac

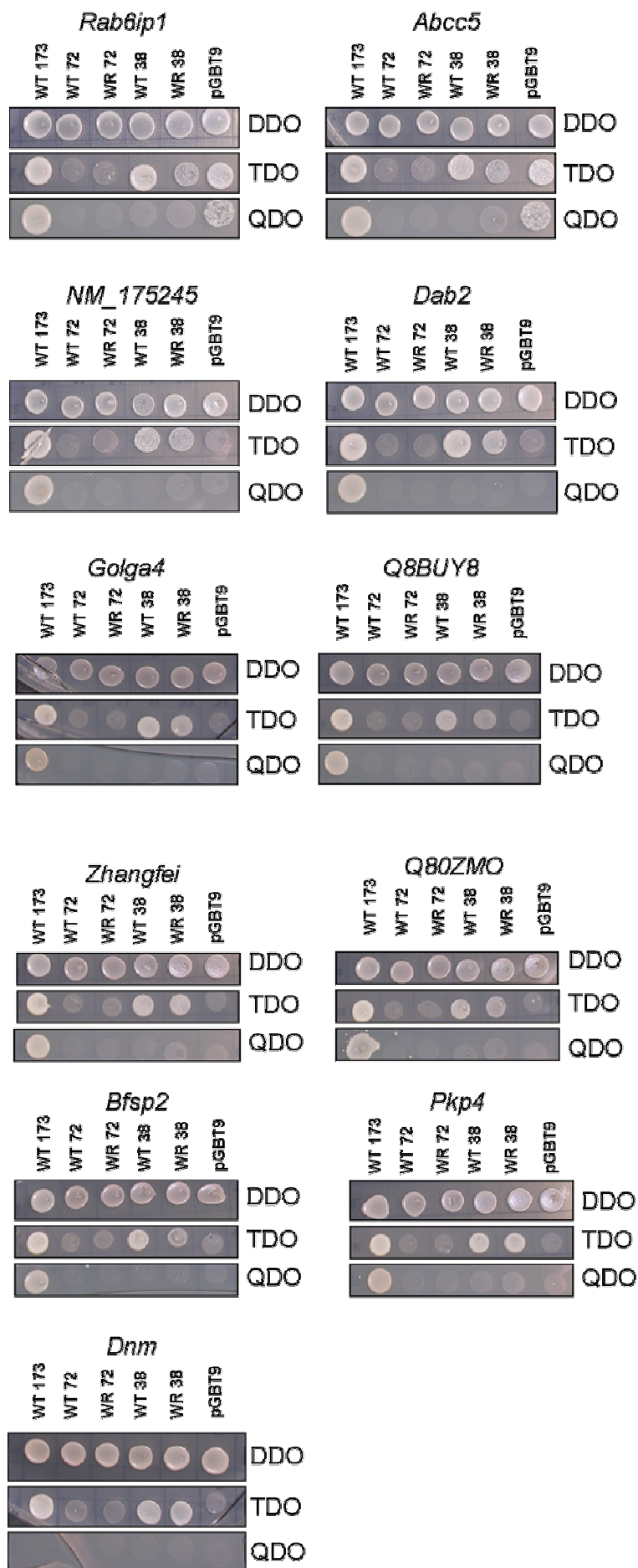
caaacagtttcagagccctgagaggggagtttttaactataggcggaccttttcaataaa
 taaagcatgttggcccgcgggatagagtggaaccagtggggggtttataccggcaacaa
 acttgttgc

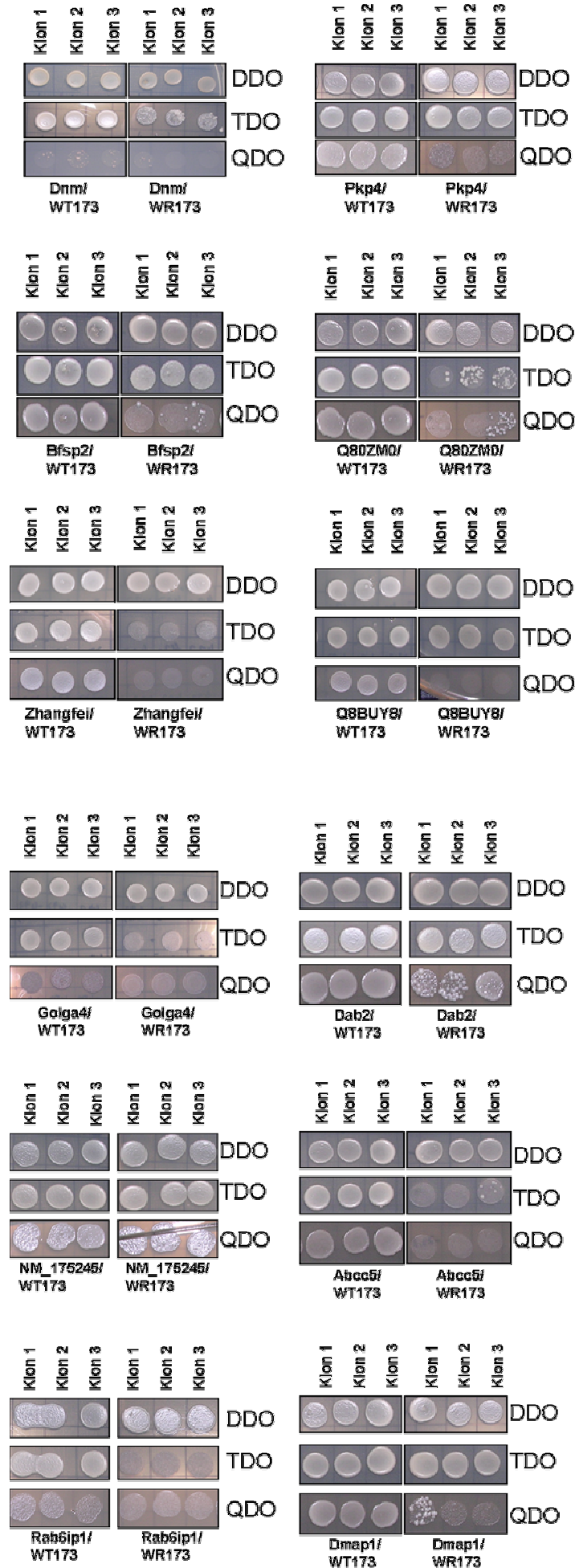
>q7 *Dkk3* (571 reliable bases)

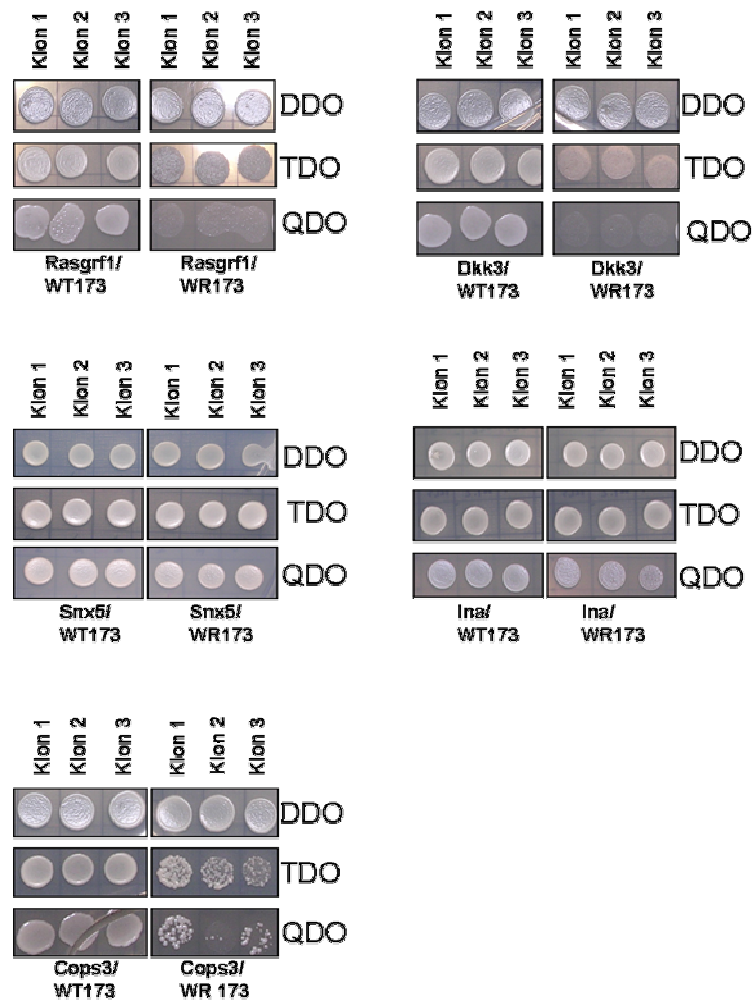
ccctggtcctgcaaccgcaaaaaaagaGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGA
 TTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCC**CCCGGG**GATCC**GAATTC**GCGGTTCG
CGTCGACCGGCGGGCACCGCGGAACAAACATGCAGCGGATCGGGGGTATTTTGCTGTGTA
 CACTGATGGCGGGCGGGTCCCCACTGCTCCTGCTCCTTCCCCGACGGTCACTTGGACTC
 CGGCGGAGCCGGGCCAGCTCTCAACTACCCTCAGGAGGAATCTACGCTCAATGATATGT
 TTCGAGAGGTGGAGGAGCTGATGGAAGACACTCACCACAAACTGCGCAGTGCCGTGGAGG
 AGATGGAGGCGGAAGAAGCAGCTGCTAAAACGTCCTCTGAGGTGAACCTGGCAAGCTTAC
 TCCCCAACTATCACAATGAGACCAGCACGGAGACCAGGGTGGGAAATAACACAGTCCATG
 TGCACCAGGAAGTTCACAAGGAATGTATCATTTGATGAAGACTGTGGGCCACCAGGTACT
 GGCAGTTCTCCAGCTTCAAGTACACCTGCCAGCCATGCCGGGACCAGCAGATGCTATGca
 cccgacacagtgagtgtgtggttaaccaactgtgtgcctggggctactgcacccaaaagg
 gccacaaaggttggcaatggaccatctggtgaccacaaaaggattgccgacctgcct
 gtgttgtgccttccaaagaaggcctgttgggtccccttgtgcacacccctttccgtgggag
 ggagaactctgtcgtgacccaccagccagctggtggatctcatcacctggaaccggta
 cctggaagagtttgaaccaatccccctgcgcccgtgggccccctatgcccgccacccc
 agcccagttctggtgttactggtgcaaagccaaccttctgtgggcgtccttggccaccaa
 tgaagagaagccagttgcccttgtagggcccgcgagtaagttccaagattttgggtt
 ctaaggggaagggcc

6.6 Kartierung der Bindedomänen und Vergleiche der Interaktionsstärken









6.7 Expressionsuntersuchungen: Microarray

Signifikanz-Betrachtungen der Microarray-Daten (Beckers, persönliche Mitteilung).

Acht Hybridisierungen wurden mit zwei unabhängigen Proben-Ansätzen (wr-pool1 und wr-pool2) gegen einen Referenz-Ansatz von 10 (+/+)-Tieren durchgeführt. Die Werte über einer Schwelle von 500 Einheiten (technisch über den verwendeten Scanner definiert) wurden in eine Rangfolge gebracht. Hierbei wurde der kleinste von den acht Werten pro Spot verwendet, ohne auf die Reproduzierbarkeit über alle acht Experimente zu achten. Unter den Top20 Genen in dieser Rangfolge, waren alle bis auf ein Gen durchgängig hoch- oder runterreguliert (entspricht ein "nicht-reproduzierbares Expressionsmuster"). Für die unterschiedliche Auswahl der Gene (10, 20, ..., 300) ist die Anzahl der Falsch-Positiven, also nicht-differenziell expremierten (NDE) Gene, für das Signifikanzniveau von $p < 0,01$ angegeben. So befand sich zum Beispiel unter den Top40 Genen der Rangliste

mit in allen acht Experimenten reproduzierbaren Tendenzen (hoch- oder herunterreguliert) nur 2 NDE Gene bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

Anzahl der Gene	Nicht-Reproduzierbar	NDE, $p < 0,01$	Verhältnis
1-10	0 (0%)	1	2,72-1,50
1-20	1 (5%)	2	2,72-1,31
1-40	2 (5%)	2	2,72-1,22
1-80	11 (14%)	2	2,72-1,11
1-150	49 (33%)	3	2,72-1,07
1-300	174 (58%)	6	2,72-1,04

Somit ist die Liste der Top38 Gene für die Rückenmark-Expressionsdaten als signifikant anzusehen:

Hochregulierte Gene

#Rang	Spot	Accession	Gen	Name, Beschreibung	Chr. Position	Verhältnis
1	MG-8-12b14	AC137525	-	genomic hit, no ESTs	3 / 88.49Mb	4.6
2	MG-8-17i10	M26251	<i>Vim</i>	Vimentin	2 / 13.53Mb	3.1
3	MG-8-11n18	BC034341	<i>Itih2</i>	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	2 / 10.04Mb	3.2
4	MG-8-118g23	?	(multiple hits)	(unclear)	-	3.1
5	MG-8-118d15	AF354051	<i>Atp5h</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	11 / 115.08Mb	2.6
6	MG-6-92j19	BC010716	<i>Ppp2r5d</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoform	17 / 44.08Mb	2.1
	(diese Probe überlappt mit beiden 3' UTRs)	?	<i>Mea1</i>	male enhanced antigen 1	17 / 44.08Mb	2.1
7	MG-8-46e22	NP_033826	<i>ApoE (1/2)</i>	apolipoprotein E	7 / 41.14Mb	1.8
8	MG-3-27f11	NP_033826	<i>ApoE (2/2)</i>	apolipoprotein E	7 / 41.14Mb	1.7
9	MG-14-120f7	AK028745	<i>2310043N10Rik</i>	mKiaa0256, ribosomal L7 similar	19 / 5.63Mb	2.1
10	MG-13-128j16	D16432	<i>Cd63</i>	Cd63 antigen, Lamp-3 (Lysosome-associated membrane glycoprotein 3), (Ocular melanoma-associated antigen) (OMA81H) (Granulophysin)	10 / 129.04Mb	1.8
11	MG-15-2p22	M86736	<i>Grn</i>	granulin	11 / 102.11Mb	1.6
12	MG-3-53o16	BC003930	<i>Dhrs1</i>	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	14 / 47.71Mb	1.7
13	MG-6-88g23	?	<i>Prdx6 (1/3)</i>	peroxiredoxin 6	1 / 161.25Mb	1.5
14	MG-6-27j9	BC054758	<i>Ctsd</i>	cathepsin D	7 / 130.08Mb	1.6
15	MG-3-58f20	?	<i>Prdx6 (2/3)</i>	peroxiredoxin 6	1 / 161.25Mb	1.5
16	MG-3-77p6	?	<i>Prdx6 (3/3)</i>	peroxiredoxin 6	1 / 161.25Mb	1.5
17	MG-8-96d13	AK008900	<i>2210411K11Rik</i>	RIKEN cDNA 2210411K11 gene	7 / 10.55Mb	1.8
18	MG-6-3a5	BC028288	<i>Gap43</i>	growth associated protein 43, Neuromodulin (Axonal membrane protein GAP-43) (PP46) (B-50) (Protein F1) (Calmodulin-binding protein P-57).	16 / 42.12Mb	1.4
19	MG-6-43d9	AK032170	<i>Lxn</i>	latexin	3 / 67.77Mb	1.5
20	MG-15-79e15	BC004638	<i>Sparc (1/2)</i>	secreted acidic cysteine rich glycoprotein clusterin, ApoJ, Apolipoprotein J, Cli,	11 / 55.03Mb	1.4
21	MG-14-54i3	?	<i>Clu</i>	complement lysis inhibitor, D14Ucla3, Sgp-2, Sgp2, sgp2, SP-40, Sugg-2, testosterone repressed prostate message	14 / 57.67Mb	1.4
22	MG-3-116f20	-	(multiple hits)	(unclear)	-	1.6

23	MG-8-79a16	AF408408	<i>Snag1</i>	sorting nexin associated golgi protein 1, mouse sorting nexin 18	13 / 110.54Mb	1.8
24	MG-8-19g21	-	(multiple hits)	(unclear)	-	2.0
25	MG-15-261m9	AK089212	<i>BC024814</i>	cDNA sequence BC024814, S-adenosyl-L- methionine-dep methyltransferase	16 / 8.18Mb	1.4
26	MG-3-251i14	BC004638	<i>Sparc (2/2)</i>	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	11 / 55.03Mb	1.4

Herunterregulierte Gene

# Rank	Spot	Accession	Gen	Name, Beschreibung	Chr. Position	Verhältnis
1	MG-6-46o19	BC027010	<i>Plp1</i>	proteolipid protein (myelin) 1	X / 126.84Mb	-1.8
2	MG-15-109l19	NM_008623	<i>Mpz</i>	myelin protein zero	1 / 171.23Mb	-2.0
3	MG-12-168p11	NM_010271	<i>Gpd1</i>	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	15 / 100.19Mb	-1.6
4	MG-6-75h19	AK028057	<i>Mobp</i>	myelin-associated oligodendrocytic basic protein	9 / 120.16Mb	-1.4
5	MG-8-11o7	AK007422	<i>LOC328023</i>	RIKEN cDNA 1810010H24 gene, unknown protein	11 / 106.70Mb	-1.5
6	MG-6-55b9	BC053033	<i>Cntn2</i>	contactin 2	1 / 132.39Mb	-1.4
7	MG-3-18m8	BC022919	<i>Tbb2</i>	RIKEN cDNA 4930542G03 gene	2 / 25.18Mb	-1.5
8	MG-6-91n14	-	(multiple hits)	(unclear)	-	-1.4
9	MG-15-163m24	?	<i>Trp53inp2</i>	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	2 / 155.45Mb	-1.4
10	MG-12-217a7	BC018275	<i>Rhob</i>	ras homolog gene family, member B	12 / 8.53Mb	-1.5
11	MG-12-222e9	AF172994	<i>Prss11</i>	protease, serine, 11 (Igf binding), Serine protease HTRA1 precursor, HtrA1, insulin-like growth factor binding protein 5 protease, L56, RSPP11	7 / 118.55Mb	-1.4
12	MG-12-3d23	XM_130277	<i>Pkp4</i>	plakophilin 4, Neural PLAKOPHILIN-related ARM repeat protein (Fragment), p0071	2 / 59.27Mb	-1.4

6.8 Expressionsuntersuchungen: qRT-PCR

Rohdaten für die Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR. Untersuchungen wurden mit dem Lightcycler-System von Roche durchgeführt. Pro Gen wurden zwei technische Replikate von drei unabhängigen Ansätzen für die (*wr/wr*)- und (*+/+*)-Erststrang-cDNAs ausgewertet. Die C_T -Werte in der nachfolgenden Tabelle stellen die Mittelwerte der technischen Replikate dar. Einzelne C_T -Werte wurden mit dem entsprechenden Kontrollansatz (β -actin), der immer mitgeführt worden ist, normalisiert (ΔC_T). Die normalisierte Expression wurde separat für die (*wr/wr*)- und (*+/+*)-Ansätze nach der Formel ($x = 2^{-\Delta C_T}$) bestimmt. Der Wert für den (*wr/wr*)-Ansatz wurde mit dem Wildtyp normalisiert und die Standardabweichung (SD) bestimmt.

Gen:		Rückenmark C_T -Werte			ΔC_T -Werte/Normalisierte Expression			Verhältnis WR / WT			Durchschnitt	SD
		1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.		
<i>Vim</i>	WT	19,16	19,86	19,84	4,37	5,07	5,05					
	WR	18,08	18,19	18,06	3,05	3,16	3,03	3,43426	3,18215	3,4822	3,3662033	0,1612
	WT β -actin	14,79			4,83	0,03515808						
	WR β -actin	15,03			0,12074204	0,11187813	0,122427537					
<i>Itih2</i>	WT	22,7	22,65	22,83	8,05	8	8,18					
	WR	22,07	22,17	22,18	7,47	7,57	7,58	1,52274	1,42076	1,41095	1,4514835	0,0619
	WT β -actin	14,65			8,07666667	0,00370409						
	WR β -actin	14,6			0,00564035	0,00526263	0,00522628					
<i>Ppp2r5d2</i>	WT	21,9	21,86	21,92	6,82	6,78	6,84					
	WR	23,84	23,71	23,6	7,75	7,62	7,51	0,52244	0,5717	0,617	0,5703786	0,0473
	WT β -actin	15,08			6,81333333	0,00889165						
	WR β -actin	16,09			0,00464534	0,00508337	0,005486113					

<i>Mea1</i>	WT	24,1	24,24	24,68	8,61	8,75	9,19						
	WR	24,26	24,12	24,2	8,865	8,725	8,805	0,98966	1,09051	1,03168	1,0372825	0,0507	
	WT beta-actin	15,49			8,85	0,00216713							
	WR beta-actin	15,395			0,00214471	0,00236327	0,002235789						
<i>ApoE</i>	WT	15,52	15,54	15,26	0,24	0,26	-0,02						
	WR	14,68	14,76	14,62	-0,59	-0,51	-0,65	1,68179	1,59107	1,75321	1,6753591	0,0813	
	WT beta-actin	15,28			0,16	0,89502507							
	WR beta-actin	15,27			1,50524675	1,4240502	1,569168196						
<i>CD63</i>	WT	19,35	19,69	19,61	3,64	3,98	3,9						
	WR	19,29	19,46	19,27	3,1	3,27	3,08	1,67018	1,48452	1,69349	1,6160633	0,1145	
	WT beta-actin	15,71			3,84	0,06983045							
	WR beta-actin	16,19			0,11662912	0,10366494	0,118257206						
<i>Prdx6</i>	WT	20,57	20,47	20,1	5,08	4,98	4,61						
	WR	18,99	19,14	18,56	3,595	3,745	3,165	2,45377	2,21146	3,3058	2,6570108	0,5748	
	WT beta-actin	15,49			4,89	0,03372588							
	WR beta-actin	15,395			0,08275556	0,07458348	0,111491065						
<i>Prdx5</i>	WT	19,31	19,34	19,34	4,15	4,18	4,18						
	WR	20,52	21,62	21,13	4,695	5,795	5,305	0,69496	0,32421	0,45533	0,4915013	0,188	
	WT beta-actin	15,16			4,17	0,05555267							
	WR beta-actin	15,825			0,03860683	0,01801072	0,025295069						
<i>Ctsd</i>	WT	17,89	17,86	17,71	1,915	1,885	1,735						
	WR	17,3	17,19	17,23	0,86	0,75	0,79	1,97931	2,13613	2,07772	2,0643874	0,0793	
	WT beta-actin	15,975			1,845	0,2783554							
	WR beta-actin	16,44			0,55095256	0,59460356	0,578344092						
<i>GAP43</i>	WT	20,63	20,21	19,9	5,83	5,41	5,1						
	WR	20,81	21,32	20,61	5,075	5,585	4,875	1,29385	0,90857	1,48624	1,2295515	0,2942	
	WT beta-actin	14,8			5,44666667	0,02292926							
	WR beta-actin	15,735			0,02966694	0,02083279	0,034078367						
<i>Sparc</i>	WT	15,79	15,69	15,62	-0,185	-0,285	-0,355						
	WR	15,1	15,07	15,09	-1,34	-1,37	-1,35	2,09217	2,13613	2,10672	2,1116743	0,0224	
	WT beta-actin	15,975			-0,275	1,20999409							
	WR beta-actin	16,44			2,53151319	2,58470566	2,549121255						
<i>Snag1</i>	WT	24,17	24,19	24,24	8,42	8,44	8,49						
	WR	26,43	26,05	25,9	9,93	9,55	9,4	0,35849	0,46652	0,51763	0,4475459	0,0813	
	WT beta-actin	15,75			8,45	0,00285954							
	WR beta-actin	16,5			0,00102511	0,00133402	0,001480192						
<i>NM 146247</i>	WT	22,58	22,51	22,19	6,87	6,8	6,48						
	WR	22,64	22,43	22,06	6,45	6,24	5,87	1,20303	1,39152	1,79834	1,464297	0,3043	
	WT beta-actin	15,71			6,71666667	0,00950784							
	WR beta-actin	16,19			0,01143817	0,0132304	0,017098339						
<i>Plp1</i>	WT	17,62	17,6	17,32	2,06	2,04	1,76						
	WR	17,24	17,47	17,56	1,62	1,85	1,94	1,25992	1,07425	1,00928	1,1144862	0,1301	
	WT beta-actin	15,56			1,95333333	0,25821893							
	WR beta-actin	15,62			0,32533546	0,27739237	0,26061644						
<i>Mpz</i>	WT	16,97	16,96	16,99	1,69	1,68	1,71						
	WR	17,61	17,65	17,44	2,34	2,38	2,17	0,63875	0,62129	0,71864	0,6595594	0,0519	
	WT beta-actin	15,28			1,69333333	0,30921167							
	WR beta-actin	15,27			0,19751033	0,1921094	0,22221067						
<i>Gpd1</i>	WT	22,82	23,05	22,93	7,66	7,89	7,77						
	WR	25,13	25,17	24,86	9,305	9,345	9,035	0,34588	0,33642	0,41706	0,366453	0,0441	
	WT beta-actin	15,16			7,77333333	0,00457081							
	WR beta-actin	15,825			0,00158094	0,00153771	0,001906312						
<i>Cntn2</i>	WT	19,22	19,75	19,8	3,66	4,19	4,24						

	WR	20,47	20,06	19,95	4,85	4,43	4,33	0,56644	0,75786	0,81225	0,7121842	0,1291
	WT beta-actin	15,56			4,03	0,06121377						
	WR beta-actin	15,62			0,03467405	0,04639136	0,04972103					
<i>Prss11</i>	WT	19,05	19,69	18,97	3,485	4,125	3,405					
	WR	19,32	19,64	18,93	3,825	4,145	3,435	0,89917	0,7203	1,17827	0,9325787	0,2308
	WT beta-actin	15,565			3,67166667	0,07847263						
	WR beta-actin	15,495			0,07056028	0,05652371	0,092461719					
<i>Pkp4</i>	WT	18,82	18,58	18,63	3,255	3,015	3,065					
	WR	18,62	18,66	18,61	3,125	3,165	3,115	0,9908	0,96371	0,99769	0,9840666	0,018
	WT beta-actin	15,565			3,11166667	0,11568978						
	WR beta-actin	15,495			0,11462551	0,11149106	0,115422789					
<i>CD-68</i>	WT	24,83	25,55	25,69	10,31	11,03	11,17					
	WR	23,58	23,59	23,42	8,69	8,7	8,53	4,42804	4,39745	4,94739	4,5909568	0,3091
	WT beta-actin	14,52			10,8366667	0,00054681						
	WR beta-actin	14,89			0,0024213	0,00240458	0,002705292					
<i>C3</i>	WT	20,82	20,8	20,89	6,03	6,01	6,1					
	WR	20,08	20,18	20	5,05	5,15	4,97	1,99538	1,86176	2,10916	1,988767	0,1238
	WT beta-actin	14,79			6,04666667	0,01512767						
	WR beta-actin	15,03			0,03018551	0,02816408	0,031906629					
<i>Nef3</i>	WT	14,91	14,97	15,01	0,3	0,36	0,4					
	WR	16,93	16,89	16,95	2,38	2,34	2,4	0,24542	0,25232	0,24204	0,2465951	0,0052
	WT beta-actin	14,61			0,35333333	0,78277342						
	WR beta-actin	14,55			0,1921094	0,19751033	0,189464571					
<i>Serf2</i>	WT	20,5	21,33	21,04	5,85	6,68	6,39					
	WR	21,78	22,1	21,7	7,18	7,5	7,1	0,54588	0,43729	0,57701	0,5200616	0,0734
	WT beta-actin	14,65			6,30666667	0,01263293						
	WR beta-actin	14,6			0,00689612	0,00552427	0,00728932					
<i>Nfh</i>	WT	17,71	17,83	17,7	2,415	2,535	2,405					
	WR	18,91	19,11	19,18	3,07	3,27	3,34	0,65142	0,5671	0,54024	0,5862525	0,058
	WT beta-actin	15,295			2,45166667	0,18279941						
	WR beta-actin	15,84			0,11907975	0,10366494	0,098755164					
<i>Tnfr1</i>	WT	22,89	22,83	22,78	7,595	7,535	7,485					
	WR	23,71	23,72	23,73	7,87	7,88	7,89	0,79462	0,78913	0,78368	0,7891418	0,0055
	WT beta-actin	15,295			7,53833333	0,00537942						
	WR beta-actin	15,84			0,00427458	0,00424506	0,004215735					
<i>Nefl</i>	WT	17,29	17,08	17,1	2,205	1,995	2,015					
	WR	20,12	20,13	20,05	4,295	4,305	4,225	0,21415	0,21267	0,22479	0,2172018	0,0066
	WT beta-actin	15,085			2,07166667	0,23788453						
	WR beta-actin	15,825			0,05094202	0,05059014	0,053474689					
<i>iNOS</i>	WT	30,01	30,67	31,03	14,66	15,32	15,68					
	WR	32,78	31,28	32,1	16,965	15,465	16,285	0,29833	0,84382	0,47797	0,5400408	0,278
	WT beta-actin	15,35			15,22	2,6201E-05						
	WR beta-actin	15,815			7,8167E-06	2,2109E-05	1,25235E-05					
<i>APP</i>	WT	17,52	17,72	17,72	2,33	2,53	2,53					
	WR	19,87	20	19,82	3,58	3,71	3,53	0,46116	0,42142	0,47742	0,4533332	0,0288
	WT beta-actin	15,19			2,46333333	0,18132713						
	WR beta-actin	16,29			0,08362047	0,07641502	0,086569342					

6.9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
Abb.	Abbildung
AD	engl. <i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimer-Erkrankung
Ade	Adenin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APP	engl. <i>Amyloid Precursor Protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> , künstliches bakterielles Chromosom
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	<i>copy DNA</i>
CH	Chorea Huntington
CM	Complete Medium
cm	Zentimeter
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CTP	Cytosintriphosphat
DDO	engl. <i>double dropout</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dHMN2	TypII hereditäre Motor Neuropathie
DMEM	Dulbeccos's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DRPLA	Dentatorubrale-Pallidolysiane Atrophie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tag
fALS	familiäre ALS
FCS	fötales Kalberserum
FM	Feeder Medium
FRDA	Friedreich Ataxie
FTD	Frontotemporale Demenz
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HDL2	Huntington disease-like 2
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-beta-D-1-thiogalacto-pyranoside
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
Lif	Leukemia inhibitory factor
M	molar
Mb	Megabasen
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFTs	engl. <i>neurofibrillary tangle</i>
NII	engl. <i>neuronal intranuclear inclusions</i> , neuronale Kerneinschlüsse
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ONPG	o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PD	engl. <i>Parkinson's disease</i> , Parkinson-Erkrankung
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
QDO	engl. <i>quadruple dropout</i>
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	engl. <i>round per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
sALS	spontane ALS
SBMA	Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy
SCA	Spinocerebelläre Ataxien
SCAN	Spinocerebellären Ataxie mit axonaler Neuropathie
SD	engl. <i>synthetic Dropout</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMARD1	engl. <i>spinal muscular atrophy with respiratory distress</i>
SPs	senile Plaques
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TDO	engl. <i>triple dropout</i>
Trp	Tryptophan
TTP	Thymidintriphosphat
U	engl. <i>unit</i> , Einheit
UTR	Untranslatierte Region
VISTA	engl. <i>Visualization tool for Alignments</i>
VPS	engl. <i>vacuolar protein sorting factor</i>
<i>wr</i>	Gensymbol <i>wobbler</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-galactopyranoside
X- α -Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl alpha-D-galactopyranoside
YAC	engl. <i>yeast artificial chromosome</i> , künstliches bakterielles Chromosom
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

6.10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur mit den hier aufgeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, den 18.04.05

Carsten Drepper