Universität Ulm
Abteilung Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. W. Vogel

Identifizierung und Analyse von Kandidatengenen für den charakteristischen Phänotyp von Neurofibromatose Typ 1 Patienten mit großen Deletionen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Elke Moschgath
aus Ochsenhausen
Ulm, 2002

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. med. Reinhard Marre
1. Berichterstatter:	PD Dr. Günter Assum
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Tag der Promotion: 24. Januar 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung..... 1
1.1 Symptomatik der Neurofibromatose Typ 1 1
1.2 Das *NF1* Gen und sein Genprodukt Neurofibromin 2
1.3 Deletionen bei Neurofibromatose Typ1 Patienten 4
1.4 Der *NF1* Lokus und Ausmaße von Deletionen 5
2. Material und Methoden..... 12
2.1 Material..... 12
2.1.1 Chemikalien 12
2.1.2 Radiochemikalien 13
2.1.3 Enzyme 13
2.1.3 Reagentiensysteme (Kits) 13
2.1.4 Lösungen, Puffer 14
2.1.5 Standards und Vektoren 16
2.1.6 DNA- und RNA-Quellen 16
2.1.7 Organismen 17
2.1.8 Oligonucleotide und PCR-Templates für radioaktive Sonden 17
2.2 Methoden..... 20
2.2.1 DNA- / RNA-Analysen 20
2.2.1.1Southern-Blot 20
2.2.1.2 Northern-Blot 20
2.2.1.3 Nachweisreaktionen mittels Hybridisierung 21
2.2.1.4 Sequenzanalyse 22
2.2.1.5 Amplifikation von cDNA-Enden 23
2.2.2 Genomische Lokalisation von Genen mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) 25
2.2.2.1 Zellkultur und Chromosomenpräparatsherstellung 25
2.2.2.2 Sondenherstellung 26
2.2.2.3 Denaturierung der Chromosomenpräparate und der Sonden 27
2.2.2.4 Hybridisierung 28
2.2.2.5 Detektion 28
2.2.3 Untersuchungen von Protein – Protein Interaktionen 30
2.2.3.1 Das Zwei-Hybrid-System (Two Hybrid-System) 30
2.2.3.1.1 Komponenten des Zwei-Hybrid-Systems 32
2.2.3.1.2 2-Hybrid-Assay relevante Methoden 35
2.2.3.1.2.1 Transformation von Hefen 35
2.2.3.1.2.2 Isolation von Plasmiden aus Hefen 36
2.2.3.1.2.3 Nachweis der lacZ Expression über den ß-Galactosidase Assay (ß-Gal-Assay, Colony-lift filter Assay) 37
2.2.3.1.3 Durchführung des 2-Hybrid-Systems 38
2.2.3.2 Glutathion-S-Transferase (GST) - Pulldown Assay 41

2.2.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung 42
2.2.3.2.2 Herstellung radioaktiv markierter Proteine durch *in vitro*-Transkription/Translation 43
2.2.3.2.3 Das Glutathion-S-Transferase Gen Fusionssystem 44
2.2.3.2.3.1 Komponenten des GST Gen Fusions-System 44
2.2.3.2.3.2 Herstellung und Isolierung des GST- Fusionsproteins 45
2.2.4.2.4 Der GST Pulldown Assay 48
3. Ergebnisse..... 50
3.1. Charakterisierung des *FN5* Gens von *Fugu rubripes* und *Homo sapiens* 50
3.1.1 Screening von Cosmid Banken und Southern Blot Analysen zur Identifizierung des *FN5* Gens bei *Fugu rubripes* 50
3.1.2 Sequenzcharakterisierung des *FN5* Gens von *Fugu* und Mensch 51
3.1.3 Genomische Lokalisation des humanen *FN5* Gens 54
3.2. Untersuchungen der *NF1* Region innerhalb der flankierenden repetitiven Sequenzen, den NF1REPs 57
3.3. Charakterisierung des *FHN3* Gens 59
3.3.1 Sequenzcharakterisierung des humanen *FHN3* Gens und dessen abgeleiteter Aminosäuresequenz 59
3.3.2 Identifizierung und Charakterisierung des murinen *FHN3* Gens und Homologievergleiche zwischen den Spezies 66
3.3.4 Funktionsanalysen zum FHN3 Protein 69
3.3.4.1 Funktionshinweise durch Screenen von Proteindatenbanken mit Hilfe der abgeleiteten Aminosäuresequenz 69
3.3.4.2 FHN3 Protein-Wechselwirkungen *in vivo* im 2-Hybrid-System 71
3.3.4.2.1 Konstruktion und Eigenschaften der Komponenten 71
3.3.4.2.2 Ermittlung der FHN3 Bindepartner durch den 2-Hybrid-Assay 73
3.3.4.2 FHN3 Protein-Wechselwirkungen *in vitro* im GST-Pulldown Assay 77
3.3.4.2.1 Synthese des GST-FHN3 Fusionsproteins in *E. coli* und Aufreinigung mittels immobilisiertem Glutathion 78
3.3.4.2.2 Herstellung der FHN3-Interaktionspartner durch in vitro Transkription/ Translation 80
4. Diskussion..... 85
4.1 Charakterisierung des *NF1* Lokus mit Hilfe des Modellgenoms *Fugu rubripes* 85
4.2 Expression der Gene zwischen den *NF1* flankierenden Duplikons 89
4.3 Das *FHN3* Gen und seine Isoformen 89
4.3 Mögliche Proteinfunktionen des FHN3 96
5. Zusammenfassung..... 108
6. Literaturverzeichnis..... 110

Abkürzungen

3-AT	3-Amino-Triazol
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
AMP	Ampicillin
AS	Aminosäure
BAC	Bacterial artificial chromosome
BD	Bindedomäne
ß-Gal	beta-Galactosidase
Bp	Basenpaare
Ci	Curie
cDNA	komplementäre DNA (copy-deoxy ribonucleic acid)
ddNTP	Didesoxynuleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxy-ribonucleic acid)
dNTP	Desoxynuleotidtriphosphat
EST	Expressed sequence tags
FHN3	Flanking the human *NF1* gene in 3' direction
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FN5	Flanking the Fugu *NF1* gene in 5' direction
g	Gravitationskonstante (Erdbeschleunigung)
GST	Glutathion-*S*-Transferase
His	Histidin
IF	Intermediärfilament
IMAGE	Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LOH	Loss of heterozygosity
Mb	Megabasenpaare
mRNA	Messenger RNA
NaAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	non-coding RNA
NF1	Neurofibromatose Typ 1
Nlk	Nemo-like kinase
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PAC	P1 artificial chromosome
PCR	Polymerasekettenreaktion
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
SD Medium	Synthetic Dropout Medium
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
Trp	Tryptophan
UAS	Upstream activating sequences
UTR	Nicht translatierte Region (untranslated region)
YAC	Yeast artificial chromosome

1. Einleitung

Die vorliegende Dissertationsschrift beschäftigt sich mit der Untersuchung des Neurofibromatose Typ 1 (*NF1*) Gens und seinen flankierenden Bereichen. Dabei sollte das Augenmerk auf benachbart liegende Gene gerichtet sein, die im Falle einer Neurofibromatose Erkrankung bei Patienten mit großen Deletionen codeletiert sein könnten. Die Bezeichnung der Neurofibromatose umfasst nach Riccardi et al. (1992) acht definierte Erkrankungen, die in ihrer Symptomatik bis zu einem gewissen Grad überlappen, jedoch auch deutlich voneinander abgrenzbar sind. Die Klassifizierung von Patienten zu den einzelnen Gruppen erfolgt lediglich durch Erfassung klinischer Diagnosekriterien, wobei bis heute lediglich zwei Formen molekulargenetisch unterschieden werden können. Die mit 90% als häufigste aller Neurofibromatose-Fälle auftretende NF1, auch als periphere NF bezeichnet, beruht auf einem Gendefekt des langen Arms von Chromosom 17 im Bereich der Bande q11.2 (Seizinger et al., 1987; Barker et al., 1987; White et al., 1987; Skolnick et al., 1987). Ursächlich für die seltenere Erscheinungsform, der Neurofibromatose Typ 2 (NF2) oder auch als zentrale NF bezeichnet, sind Fehler im *NF2* Gen auf Chromosom 22, das für das Transmembran-Protein Merlin codiert (Rouleau et al., 1993, Trofatter et al., 1993). Die weiteren Typen 3-8 sind sehr seltene Erscheinungsformen. Bedingt durch die Thematik dieser Arbeit soll an dieser Stelle ausschließlich auf die NF1 eingegangen werden.

1.1 Symptomatik der Neurofibromatose Typ 1

Die Symptome der NF1 Erkrankung treten mit variabler Expressivität auf, die sich sowohl interfamiliär, als auch teilweise innerhalb einer Familie zeigt, weshalb auch Einflüsse bestimmter „Modifier"-Gene diskutiert werden (Riccardi et al., 1992). Durch diese Problematik wurde 1988 vom National Institute of Health (NIH) sieben diagnostische Kriterien bestimmt, von denen zwei zur eindeutigen Diagnose einer NF1 Erkrankung ausreichen. Namensgebendes Kriterium ist das Auftreten eines plexiformen Neurofibroms oder multipler kutaner oder subkutaner Neurofibrome, benigne Tumoren, die aus Zellen der peripheren Nervenscheide entstehen und kollagenes Bindegewebe enthalten. Des weiteren manifestiert sich das Krankheitsbild bereits im Kindesalter durch hellbraune, hyperpigmentierte Hautareale, den sogenannten Café-au-lait Flecken (CALF), welche am ganzen

Körper erscheinen und Durchmesser von 0,5 – 50 cm erreichen können (Cotlier, 1977). Zusätzlich auftretende Anomalien sind axilläres und inguinales Freckling, kleine Pigmentflecken, die an Stellen mit geringer Lichtexposition aufgrund einer Hyperpigmentierung auftreten. Man findet sie vor allem in den Achselhöhlen (axillar) und in der Leistengegend (inguinal). Als weiteres Kriterium steht das Auftreten von Lisch-Knötchen, benigne Tumoren melanozytären Ursprungs an der Peripherie der Iris (Perry et al., 1982). Die weitere Diagnostik umfasst das Vorhandensein charakteristischer Skelettanomalien, Gliome des Nervus opticus oder eines Verwandten 1. Grades mit gesicherter NF1 Diagnose. Diese bisher beschriebenen charakteristischen Merkmale kommen zwar bei vielen NF1-Patienten vor, geben aber bei weitem nicht das gesamte, sehr variable Krankheitsbild wieder. Bei einer Minderheit können zusätzlich Lernschwierigkeiten, Anfälle, Makrozephalien, Kleinwuchs, Skoliosen oder Pseudoarthrose vorkommen (Riccardi, 1981; Huson et al., 1989). Weiter besteht bei etwa 10% aller Patienten ein erhöhtes Risiko zur sarkomatösen Entartung von Neurofibromen und zu vermehrten Leukämien, vorwiegend zu akuter und chronischer myeloischer Leukämie (Bader et al., 1978, Castro-Malaspina et al., 1984, Stiller et al., 1994). Die NF1 folgt einem autosomal-dominanten Erbgang mit einer Inzidenz von 1 zu 3500 Lebendgeburten, wobei ein hoher Anteil von 30-50% sporadisch auftretenden Fällen zuzuordnen ist. Diese sind auf eine geschätzte Mutationsrate des *NF1* Gens von 6,5x 10^{-5} bis 1x 10^{-4} pro Gamete und Generation zurückzuführen (Riccardi et al., 1986; Huson et al., 1994). Die hohe Mutationsrate, die ungefähr 100fach höher ist als bei einem gewöhnlichen Singlelokus, ist bedingt durch die enorme Größe des Gens und resultiert auch aus der Tatsache, dass jede Veränderung in der Aminosäure-Sequenz zum phänotypischen Defekt führt (Marchuk et al., 1991).

1.2 Das *NF1* Gen und sein Genprodukt Neurofibromin

Durch die Resultate verschiedener Arbeitsgruppen konnte das Gen, dessen Mutationen für die Krankheit verantwortlich ist, auf Chromosom 17 im Bereich der Bande q11.2 lokalisiert werden (Seizinger et al., 1987; Barker et al., 1987; White et al., 1987; Skolnick et al., 1987). Die nähere Identifikation und Charakterisierung ergab, dass das *NF1* Gen ungefähr 283kb genomische DNA umspannt (Viskochil, 1993) und 60 Exons umfasst, wovon 57 konstitutiv und 3 alternativ gespleißt sind

(Li et al., 1995; Danglot et al., 1995). Im Bereich des *NF1*-Gens, speziell im Intron 27, befinden sich weiterhin drei inserierte Gene, *EVI2A*, *EVI2B* (ecotropic viral integration site) und *OMgp* (Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein), die ausschließlich in entgegengesetzter Richtung zum *NF1* Gen transkribiert werden (O`Connell et al., 1990; Cawthon et al., 1990 und 1991; Viskochil et al., 1991). Die häufigste als Typ 1 bezeichnete Transkriptform des *NF1* Gens beinhaltet 57 Exons und codiert für ein Protein mit 2818 Aminosäuren, bzw. 327kDa (Cawthon et al., 1990; Viskochil et al., 1990; Wallace et al., 1990; Marchuk et al., 1991). Innerhalb dieses Proteins, als Neurofibromin bezeichnet, befindet sich ein Bereich von 360 AS, abgeleitet aus Exon 21-27a, der strukturell und funktionell ähnlich zu der GTPase aktivierenden Protein (GAP)-Familie ist (Martin et al., 1990). Die Familie schließt die Produkte der *IRA1* und *IRA2* Gene von *Saccharomyces cerevisiae*, die dafür bekannt sind, die $p21^{ras}$ Aktivität herunterzuregeln und das p120GAP (p21ras GTPase-activating Protein) von Säugern ein (Ballester et al., 1990; Xu et al., 1990; Buchberg et al., 1990). Durch diese Ähnlichkeit des Neurofibromins wurde die Domäne als „NF1 GAP related domain“ (NF1-GRD) bezeichnet. Das *NF1* Gen ist ein Tumorsuppressorgen, welches sich aus der Funktion des Neurofibromins als negativer Regulator von Ras ergibt. Es wirkt somit einer unkontrollierten Proliferation entgegen (Legius et al., 1993). DeClue et al. (1992) und Basu et al. (1992) zeigten dies an Neurofibrosarkomzellen, die kein Neurofibromin synthetisierten, jedoch einen erhöhten Ras-GTP-Spiegel aufwiesen. Überdies folgt das *NF1* Gen dem „2 Hit“ Modell für Retinoblastom (Knudsen 1971), bzw. dem dominant negativen Modell des mutanten p53 (Oren 1992), wodurch es als direkte Komponente involviert in die Tumorgenese angesehen wird. Diese Modelle beinhalten die biallelische Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens. Sie verdeutlichen, dass eine konstitutive Mutation nicht zur Tumorentstehung ausreicht, sondern die Anwesenheit eines funktionstüchtigen Allels ein normales Wachstum der Zellen gewährleistet. Erst eine zweite, somatische Mutation im Wildtyp-Allel einer Ausgangszelle führt zur unkontrollierten Expression oder Repression wachstumsrelevanter Gene und damit zur Tumorentstehung. Die zweite, somatische Mutation geht oftmals mit dem Verlust der jeweiligen chromosomalen Region einher, die über Heterozygotie-Untersuchungen (LOH = Loss of heterozygosity) nachgewiesen werden kann. Der zusätzliche Verlust der Wildtypkopie wurde auch in zahlreichen Neurofibromen

durch LOH Analysen oder über somatische Mutationen nachgewiesen (Colman et al., 1994; Sawada et al., 1996; Däschner et al., 1997; Serra et al., 1997, Eisenbarth et al., 2000; John et al., 2000). Jedoch nicht alle Symptome der NF1 Patienten lassen sich durch den zusätzlichen, somatischen Verlust der Wildtypkopie erklären, da manche Merkmale bereits bei Verlust eines Allels auftreten. Demzufolge müssen weitere funktionelle Eigenschaften und Einflüsse des Neurofibromins vorhanden sein. Beschrieben wurde von Guo et al. (1997 und 2000) der Einfluss auf die Regulation des *rutabaga* (*rut*) Adenylat-Cyclase Signalwegs, der eine essentielle Rolle beim Lernen und beim Kurzzeitgedächtnis spielt. Weiter konnte dem Neurofibromin eine Association mit cytoplasmatischen Mikrotubuli nachgewiesen werden (Xu & Gutmann, 1997).

1.3 Deletionen bei Neurofibromatose Typ1 Patienten

Bis heute sind Hunderte von Keimbahnmutationen des *NF1* Gens bekannt, wobei es sich meist um inaktivierende Mutationen handelt, die in einem vorzeitigen Translationsstop resultieren (Park et al., 1998). Praktisch jede Familie besitzt eine individuelle Mutation und nur sehr wenige Mutationen wurden öfters beschrieben. Insgesamt kann keine Genotyp-Phänotypkorrelation hergestellt werden, da selbst innerhalb einer Familie nichts über die Art der klinischen Manifestation vorhergesagt werden kann. Als einzige Ausnahme erscheinen die NF1 Patienten mit großen Deletionen, die den *NF1* Lokus umspannen (Valero et al., 1997; Upadhyaya et al., 1998; Rasmussen et al., 1998; Cnossen et al., 1997). Diese Patienten sind häufig von Gesichtsanomalien und mentaler Retardierung betroffen und es kommt bereits in sehr frühem Kindheitsstadium zum Auftreten vieler Neurofibromen (Kayes et al., 1992 und 1994). Durch diese besonders schwere Symptomatik, vorwiegend durch die Manifestation der Krankheit vor dem 10. Lebensjahr, wird angenommen, dass eine Codeletion flankierender, modifizierender Gene am Phänotyp beteiligt ist. Demnach wurde das Krankheitsbild zu den „contiguous gene syndrome“ eingeordnet. So entwickelte sich die Hypothese, dass eine NF1 Microdeletion in einer Haploinsuffizienz von Neurofibromin und des Genprodukts eines zweiten Lokus resultiert, wodurch es zusammen zu einer Potenzierung der Neurofibromgenese kommt (Kayes et al., 1994; Dorschner et al., 2000). Des weiteren werden Effekte auf kritische Entwicklungsschritte des zentralen Nervensystems mit codeletierten Genen in

Verbindung gebracht, durch die das Risiko mentaler Retardierung erhöht wird (Jenne et al., 2001). Die Beschreibung weiterer Deletionspatienten bis heute zeigten, dass auch dieser Phänotyp variabel ist (Cnossen et al., 1997; Valero et al., 1997; Tonsgard et al., 1997; Rasmussen et al., 1998), rechtfertigt aber die Annahme von verschiedenen, modifizierenden Genen in der Region.

1.4 Der *NF1* Lokus und Ausmaße von Deletionen

Da weder das Ausmaß der Deletionen, noch die im Deletionsbereich liegenden Gene bekannt waren, sollten ausgehend vom *NF1* Gen benachbarte Regionen kartiert werden. In der Arbeitsgruppe wurde die Kartierung des *NF1* Lokus mit Hilfe eines Modellgenoms angegangen. Ein kompaktes, bezogen auf die Genausstattung mit dem humanen vergleichbares Genom, war im Japanischen Pufferfisch *Fugu rubripes* wiedergegeben. Der auch als Takifugu bekannte Speisefisch gehört zu der Familie der Tetraodontidae (Kugelfische) aus der Ordnung der Tetraodontiformes (Haftkiefer) und bereits sehr früh wurde erkannt, dass er ein sehr kleines Genom von ungefähr 380 – 400Mb besitzt, resultierend aus einem sehr geringen haploiden DNA-Gehalt von ca. 0,4-0,5pg pro Zellkern (Hinegardner, 1968). Das Genom des *Fugu rubripes* ist etwa 7,5mal kleiner als das humane Genom mit 3000Mb, ursächlich bedingt durch kleine Introns, weniger repetitive Sequenzanteile und weniger Pseudogene (Elgar et al., 1995; Venkatesh et al., 1996), zeigt aber trotzdem ein vergleichbares Genrepertoire (Brenner et al., 1993). Brenner et al. (1993) bestimmten den repetitiven Anteil auf weniger als 10%, der beim Menschen um die 35-45% beträgt. Genanalysen bei *Fugu* verdeutlichten, dass intragenische Anteile im Vergleich humaner Gene deutlich kleiner sind, aber die Organisationsstruktur in vielen Fällen hoch konserviert bleibt, bis hin zum alternativen Spleißen (Coutelle et al., 1998). Eine Abweichung der Exon/Intron Struktur tritt nur in sehr seltenen Fällen auf, und äußert sich dann paradoxer Weise im Vorhandensein zusätzlicher Introns bei Fugu, die sehr große Exons bei Säugern in mehrere kleine teilen. Beispielsweise besitzt das humane PKD1 Gen (polycystic kidney disease1) auf Chromosom 16 ein 3,5kb großes Exon, das bei *Fugu* durch mehrere Introns aufgetrennt wird (Elgar et al., 1996). Der Großteil der bisher untersuchten Gene besitzt jedoch eine identische Organisationsstruktur. Zum Beispiel umfasst das HD-Gen (Huntington`s disease gene) beim Menschen 170kb mit 67 Introns, dagegen nimmt es bei *Fugu* nur 23kb ein, zeigt aber die

selbe Anzahl Introns (Baxendale et al., 1995). Ebenso verhält sich das DLST Gen (dihydrolipoamide succinyl transferase gene) mit 17kb beim Mensch und 2,2kb bei *Fugu* und beide Gene folgen wiederum dem gleichen Organisationsschema (Trower et al., 1996). Das sehr kleine Genom des Pufferfisches ist demnach auch durch die sehr kleinen Introns gegeben, deren Größen sich bei annähernd 80% auf weniger als 150bp belaufen (Elgar et al., 1996). Die Kompaktheit des Genoms ist aber nicht nur auf kleine Introns und weniger repetitive Abschnitte zurückzuführen, sondern äußert sich auch in der verschwindend geringen Menge an Pseudogenen (Venkatesh et al., 1996) und vordergründig durch sehr geringe intergene Abstände. Diese Kompaktheit beinhaltet interessante Aspekte für molekularbiologische Untersuchungen, da bereits in einem kurzen DNA-Abschnitt eine Menge an Informationen zur Aufklärung der Genomstruktur präsentiert sein kann. Bereits ein einziger Cosmidklon, der 40-50kb genomische DNA aufnehmen kann, liefert eine Fülle an Informationen und das gesamte Genom könnte in einem Cosmid-Contig von ca. 8000-10000 Klonen repräsentiert sein. Beispielsweise konnte ein einzelnes *Fugu* Cosmid mit acht Genen identifiziert werden. Der Vergleich mit dem Menschen ergab, dass alle acht Gene hoch konserviert sind und die selben Exon-/Intronstrukturen aufzeigen. Im Gegensatz zu *Fugu*, der die 8 Gene in einem Bereich von 12,4kb genomischer DNA lokalisiert hat, umfassen sie im humanen Genom eine Region von 600kb. Interessanterweise war nicht nur die Syntenie der Gene gegeben, sondern die gesamte Genabfolge der 8 Gene war zwischen *Fugu* und Mensch identisch (Trower et al., 1996). In der selben Zeit konnten einige weitere Beispiele dieser konservierten Genanordnung aufgezeigt werden (Elgar et al., 1996; How et al., 1996; Sandford et al., 1996; Schofield et al., 1997). Durch dieses Merkmal, durch die hohe Konservierung codierender Sequenzen und die kurzen intergenen und intragenen Abstände diente *Fugu rubripes* als Modellorganismus in vielen Fragestellungen der Genomanalyse beim Menschen. Auch in unserer Arbeitsgruppe war das Genom von *Fugu* herangezogen worden, um flankierende Bereiche zum *NF1* Gen zu identifizieren und gefundene Gene im humanen Genom zu lokalisieren. Dabei konnten bereits Cosmide identifiziert werden , die das *NF1* Gen von *Fugu rubripes* umspannten (Kehrer-Sawatzki et al., 1998). Die Charakterisierung dieses Gens zeigte, dass es 13mal kleiner war als des humane Gegenstück mit einer genomischen Spanne von 27kb, die aus deutlich kleineren Introns resultierte. Es wies eine starke

Konservierung der abgeleiteten Aminosäuresequenz von 91,5% auf und war bis auf die alternativ gespleißten Exons 9br, 48a und Exon 12b in seiner Organisationsstruktur dem humanen *NF1* Gen analog. Des weiteren konnte dem humanen inserierten *EVI2B* ähnliche Sequenzen identifiziert werde, wohingegen keine Strukturen ähnlich zu den *EVI2A* oder *OMgp* Genen gefunden werden konnten. Die Analyse der 3' gelegenen Sequenzen zum *Fugu NF1* Gen ergab die Identifizierung dreier weiterer Gene, *AKAP84* (A-kinase anchor protein84), *BAW* (located between *AKAP84* and *WSB1*) und *WSB1* (WD-40-repeat protein with a SOCS box) (Kehrer-Sawatzki et al., 1999). Die orthologen Gene des Menschen konnten in ihrer Struktur und Organisation charakterisiert und im humanen Genom lokalisiert werden. Dabei zeigte sich eine völlig andere Genanordnung als bei *Fugu rubripes.* Das humane *AKAP84* Gen konnte auf 17q21.3-q22, das *BAW* Gen distal dazu auf 17q21-q22 und das dritte Gen *WSB1*, welches bei *Fugu rubripes* am weitesten 3'-wärts lokalisiert ist, war im humanen Genom zwischen Centromer und *NF1* Gen zu finden. Somit konnte für alle 3 Gene, die 3' flankierend zum *Fugu NF1* Gen identifiziert wurden, eine konservierte Genabfolge ausgeschlossen werden. Die Charakterisierung des 5' flankierenden Bereichs des *NF1* Gens bei *Fugu* und die Lokalisation der identifizierten Gene im humanen Genom, war Teil dieser Arbeit. Bereits innerhalb meiner Diplomarbeit konnte ein 5' flankierendes Gen im Abstand von 6kb zum *NF1* Gen bei *Fugu rubripes* charakterisiert werden. Dieses *Nlk* Gen (Nemo like kinase) umspannt 6093bp genomische DNA und ist in 11 Exons organisiert, die einen offenen Leserahmen über 1329bp einschließen. Das abgeleitete Protein mit 442 Aminosäuren wies eine Ähnlichkeit von 81,7% gegenüber der humanen Nlk auf, die ebenfalls in dieser Arbeit charakterisiert worden war. Vergleiche zeigten, dass dieses Protein ortholog zur murinen Nlk ist (Brott et al., 1998) und zu den MAPKs (mitogen activating protein kinase) gehört. Funktionell ist die Nlk als ein wichtiger negativer Regulator des Wnt/WG (wingless) Signalwegs einzuordnen (Ishitani et al., 1999; Meneghini et al., 1999; Rocheleau et al., 1999). Bereits damals wurde deutlich, dass das *Nlk* Gen bei *Fugu rubripes* nicht das direkt 5'-flankierende zum *NF1* Gen darstellt. Es gelang in der vorliegenden Arbeit ein weiteres Gen zwischen *NF1* Gen und *Nlk* Gen zu identifizieren, das im Ergebnisteil näher beschrieben ist. Die Lokalisation sämtlicher Gene aus dem *NF1* Lokus von *Fugu* im humanen Genom, verdeutlichten dann den evolutionären Bruch zwischen *Fugu* und Mensch. Keines

der direkt flankierenden Gene des *NF1* Gens bei *Fugu* war in unmittelbarer genomischer Nähe zum humanen *NF1* Lokus zu finden. Somit ließen sich keinerlei Aussagen für die Problematik des Krankheitsbildes bei NF1 Deletionspatienten machen und von einer funktionellen Charakterisierung dieser Gene wurde abgesehen (Kehrer-Sawatzki et al., 2000).

Alternativ sollte die *NF1* Genregion direkt im humanen Genom betrachtet werden, erleichtert durch die Tatsache, dass diese Region inzwischen kartiert worden war. Der entscheidende Durchbruch dabei gelang Dorschner et al. (2000). Sie erstellten einen 3,5Mb, das *NF1* Gen umspannenden, physikalischen Contig aus BACs, PACs und YACs, untersuchten 20 Deletionspatienten hinsichtlich des Ausmaßes ihrer Deletion und verglichen die Genotypen mit den Phänotypen der Patienten. Dabei gelang es einen Sequenzblock zu identifizieren, der dreimal auf Chromosom 17 vorliegt (Abb. 1.1).

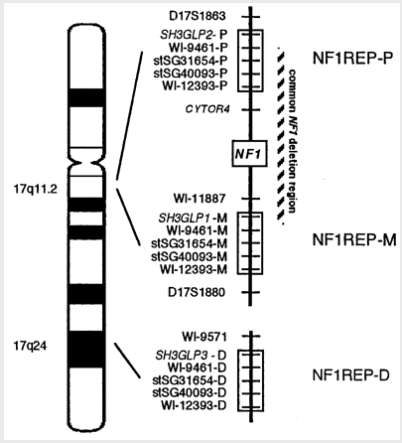


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Chromosoms 17 mit seinen paralogen Sequenzen, NF1REP-P, NF1REP-M, die den NF1 Lokus flankieren und NF1REP-D nach Dorschner et al. (2000). Des weiteren der häufig auftretende Deletionsbereich bei NF1 Deletionspatienten mit den Bruchpunkten in den Duplikons.

In diesem befinden sich jeweils fünf exprimierte Sequenzen, die in ihrer Anordnung und ihrer relativen Lage zueinander konserviert waren. Die paralogen Loci benannten sie mit NF1REP-P (proximal), -M (medial) und –D (distal). NF1REP-P und –M umschließen das *NF1* Gen und liegen ungefähr 1,5Mb voneinander entfernt. Der dritte NF1REP-D konnte auf 17q24 lokalisiert werden (Abb. 1.1).

Die Charakterisierung der Deletionen ergab, dass bei 17 Patienten die Bruchpunkte in den Bereichen der *NF1*REP-P und –M zu finden waren (Abb. 1.1,

1.2). Dies eröffnete die Hypothese, dass diese Intervalle eine homologe Rekombination in der Meiose oder Mitose erleichtern würden, die in der Deletion intervenierender Sequenzen resultiert. Ungleiche homologe Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen kann intrachromosomal geschehen, wobei neben einer Deletion, ein extrachromosomales zirkuläres DNA-Element entstehen würde. Sie kann auch zwischen Schwesterchromatiden oder homologe Chromosomen stattfinden. In diesem Fall erscheint neben dem Deletionschromosom, ein Chromosom mit duplizierten Sequenzen. Solche Deletionen oder auch Duplikationen und Inversionen, hervorgerufen durch homologe Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen, sind bereits früher in der Literatur beschrieben worden. Beispielsweise beim Williams Syndrom beruhen Deletionen des entsprechenden Gens auf 7q11.23 ebenfalls auf Rekombination zwischen flankierenden paralogen Loci (Perez Jurado et al., 1996). Auch findet man solche Duplikons auf 22q11, deren Rekombination zur einer Deletion führt, die im DiGeorge Syndrom resultiert. Zusätzlich erscheint eine Duplikation dieser Region, die mit dem Krankheitsbild des Cat Eye Syndroms einhergeht (Edelmann et al., 1999; Amos-Landgraf et al., 1999). Für den *NF1* Lokus sind bisher keine Duplikationen nachgewiesen worden. Hier könnte vermutet werden, dass die duplizierten Sequenzen entweder zu keinem oder eventuell zu einem unbekannten Phänotyp, der noch nicht als Folge einer Duplikation erkannt wurde, führt. Letztendlich besteht auch die Möglichkeit, dass ein solches Rearrangement mit einer duplizierten *NF1* Region letal ist (Lenzini et al., 1988).

Die Entdeckung der REPs flankierend zum *NF1* Gen und die Bestimmung der Deletionsbruchpunkte einiger Patienten machte deutlich, dass ein Großteil aller NF1 Patienten mit großen Deletionen die gleiche Deletion trägt. Demnach kann auch bei diesen Patienten die Variabilität des Phänotyps nicht durch unterschiedlich deletierte Bereiche erklärt werden. Die Ursachen dieser Variabilität resultiert demnach aus den gleichen Faktoren wie die Variabilität bei Patienten mit Punktmutationen. Für den charakteristischen Deletionsphänotyp können somit alle Gene zwischen den flankierenden REPs in Frage kommen. Dies sind im Bereich zwischen den zwei paralogen Sequenzen mit 1,5Mb, mindestens 11 verschiedene, exprimierte Sequenzen, die für die jeweils charakteristischen Merkmale modifizierend sein könnten (Dorschner et al., 2000; Jenne et al., 2000). Ein Schritt zur Einengung eines Modifier-Gens bei der Tumorgenese konnte bereits gemacht

werden. Alle Patienten, die Dorschner et al. (2000) untersuchten, hatten bereits im frühen Kindesalter eine hohe Anzahl kutaner Neurofibrome.

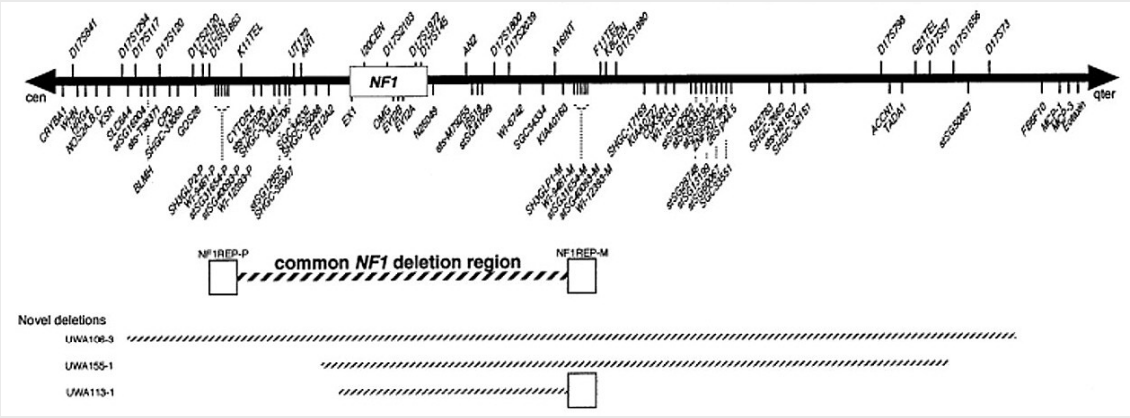


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des NF1 Lokus auf Chromosom 17 mit identifizierten Markern und Transkripten innerhalb der NF1REP-P und NF1REP-M nach Dorschner et al. (2000). Mit schraffiertem Balken ist der dominant auftretende Deletionsbereich mit Bruchpunkten in den NF1REPs wiedergegeben, der bei 17 Patienten gefunden wurde. Das Ausmaß der Deletion der anderen drei Patienten ist in leicht schraffierten Balken dargestellt.

Durch die Tatsache, dass auch Patient UWA113-1 (vgl. Abb. 1.2) im Alter von 8 Jahren bereits unzählige Neurofibrome aufwies, konnte die kritische Region auf 1Mb eingeengt werden. In diesem Bereich befinden sich 4 Gene, *NF1*, *OMgp*, *EVI2A* und *EVI2B*, 2 Pseudogene und 7 ESTs. Für eine Potenzierung der Tumorentwicklung kämen vor allem die 7 ESTs in Frage, da die Expressions-spektren eher nicht für die *OMgp* und *EVI2* Gene sprechen. Das *OMgp* Gen, welches für das Glycoprotein OMgp codiert, wird nur im Zentralnervensystem (ZNS) in Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert (Habib et al., 1998; Mikol & Stefansson, 1988). Das OMgp zeigt sich vor allem in den Myelinscheiden des ZNS, jedoch nicht im peripheren Nervensystem und scheint somit nicht an einer Potenzierung der Tumorgenese beteiligt zu sein. Die *EVI2* Gene werden zwar weitreichender, in verschiedensten Geweben exprimiert, jedoch nicht in Schwannzellen, die als Progenitorzellen der Neurofibrome gelten (Cawthon et al., 1991; Kluwe et al., 1999). Schließt man nun das *NF1,* das *OMgp* und die *EVI2* Gene aus, reduziert sich die kritische Region, in der sich ein Gen oder Regulationselement befindet, das die Tumorgenese ursächlich verstärken könnte, auf 700kb. Insgesamt vereinfachen diese Daten nach Dorschner et al. die Identifizierung und Charakterisierung von flankierenden Genen, die nach Funktionshinweisen eventuell Einblick in eine Genotyp-Phänotyp Korrelation

aufzeigen könnten. Jedes der 11 Gene innerhalb der repetitiven Sequenzen wäre demnach auch ein Kandidat für die Merkmalsausprägung mentale Retardierung. Im Laufe der vorliegenden Arbeit sollte ein Kandidatengen aus den 11 Genen identifiziert werden, das mit diesem Krankheitsbild in Verbindung gebracht werden könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylagel (30% Acrylamid-Lösung)	National Diagnostics, Atlanta
3-Amino-1,2,4-Triazol	Sigma, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Anti-Digoxigenin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Roche Diagnostics, Mannheim
Binde-Silan	Serva, Heidelberg
Biotin 16-dUTP	Boehringer, Mannheim
Biotinyliertes Anti-Avidin	Vector, Burlingame (USA)
Bis-Acrylagel (2% N,N' Methylenbisacrylamid)	National Diagnostics, Atlanta
5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galactosid (X-Gal)	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Colcemid	BRL, Gaithersburg (USA)
4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
DMEM	Biochrom, Berlin
Dropout Supplement -Trp	BD Biosciences, Heidelberg
Dropout Supplement -Leu	BD Biosciences, Heidelberg
Dropout Supplement -Trp	BD Biosciences, Heidelberg
Dropout Supplement -Trp/-Leu	BD Biosciences, Heidelberg
Dropout Supplement -Trp/-Leu/-His	BD Biosciences, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Neu-Ulm
Ethylen Glycol-bis-ß-aminoethyl Ether (EGTA)	Serva, Heidelberg
ExpressHyb™ Hybridization Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Fixogum	Marabuwerke, Tamm
Fluorescin-Iso-Thiocyanat (FITC)	Vector, Burlingame (USA)
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Glass Beads (425-600 microns)	Sigma, München
Glycin	Sigma, München
Guanidin-Hydrochlorid	Fluka, Neu-Ulm
HEPES	Sigma, München
Heringssperma-DNA	Sigma, München
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
Leupeptin	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym (Muramidase)	Boehringer, Mannheim
β-Mercaptoethanol	LKB, Bromma (Schweden)
Minimal SD Base	BD Biosciences, Heidelberg
Minimal SD Agar Base	BD Biosciences, Heidelberg
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natrium-Orthovanadat	Sigma, München
Octylphenolpolyethylenglycolether (Triton X-100)	Merck, Darmstadt
Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenylmethansulfon-Säurechlorid (PMSF)	Sigma, München

Reduziertes Glutathion	Sigma, München
RNasin® (Ribonuclease Inhibitor)	Promega, Mannheim
Sephadex G-50	Amersham Biosciences, Freiburg (Fr)
Tetracyclin	Boehringer, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, Neu-Ulm
Texas Red, Kaninchen Anti-Maus	Dianova, Hamburg
Texas Red, Ziege Anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg
Tween 20	Sigma, München
Vektashield (Antifading)	Vector, Burlingame (USA)
YPD Medium	BD Biosciences, Heidelberg

Weitere hier nicht aufgeführte Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen Aldag (Hamburg), Amersham Biosciences (Freiburg), Boehringer (Mannheim), BD Biosciences (Heidelberg), BRL (Gaithersburg, USA), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München) bezogen.

2.1.2 Radiochemikalien

α-^{32}P-dCTP	10µCi/µl	~3000 Ci/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig
α-^{35}S-dATP	10µCi/µl	~3000 Ci/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig
^{35}S-Methionin	10µCi/µl	~3000 Ci/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase = CIAP)	Invitrogen, Eggenstein
Klenow-Enzym (DNA-Polymerase I, large fragment)	Invitrogen, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen, MBI Fermentas, New England Biolabs (NEB)
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Eggenstein
T4-Polynucleotidkinase (PNK)	Invitrogen, Eggenstein
T4-RNA-Ligase	Promega, Mannheim
Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)	Invitrogen, Eggenstein
Taq-Polymerase	Amersham Biosciences, Fr

2.1.3 Reagentiensysteme (Kits)

AlkPhos Direct Labelling System	Amersham Biosciences, Fr.
Coomassie® Plus Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford (USA)
DC-Protein Assay	Biorad
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Fr.
GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences, Fr.
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences, Fr.
High Pure PCR Template Preparation Kit	Boehringer, Mannheim
Marathon-Ready™ cDNA	BD Biosciences, Heidelberg
Matchmaker Two-Hybrid System 2	BD Biosciences, Heidelberg

QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SUPER SCRIPT™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Eggenstein
Sure Clone® Ligation Kit	Amersham Biosciences, Fr.
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Biosciences, Fr.
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega, Heidelberg
Yeastmaker™ Yeast Transformation System	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.4 Lösungen, Puffer

Die folgend nicht aufgeführten Standardlösungen wurden nach üblichen Laborrezepten hergestellt.

Ammoniumpersulfat 10%	10% in H_2O
Denaturierungslösung	1,5M NaCl 0,5M NaOH
Elektrodenpuffer 5x (SDS-PAGE)	72g Glycin 5g SDS 15g Tris Base ad 1000ml H_2O, pH 8,3
Entfärbelösung (Coomassie) (über Aktivkohle regenerieren)	150ml Ethanol 50 ml Essigsäure 300ml H_2O
Färbelösung (Coomassie) (filtrieren)	225ml Ethanol 225ml H_2O 50ml Essigsäure 0,75g Serrablau
Färbelösung (FISH)	0,9µg/ml Propidiumjodid 0,6 µg/ml DAPI in 80ml 4x SSC/ 0,1% Tween 20
Fixativ (FISH)	3 VT Methanol 1 VT Essigsäure
Hybridisierungslösung	14,6g Na_2HPO_4 (0,25M), 4g BSA (1%), 0,8ml EDTA (pH 8; 1mM), 14ml 20% SDS ad 400ml H_2O, pH 7,2
Hybridisierungslösung für Cosmidlösung	100ml Formamid (50%) 20g Dextransulfat (10%) 40ml 20x SSC (4x) 10ml 1M Na_2HPO_4 10ml 20% SDS 40ml Denhardt`s (10x) 0,4ml EDTA (0,5 M) 2ml Heringssperma-DNA (5mg/ml)
IPTG-Stammlösung	100mM in H_2O

Konservierer (Proteingele)	10ml Glycerin (2%) 50ml Essigsäure (10%) ad 500ml H_2O
Lysispuffer (Hefen)	2% Triton X-100 1% SDS 100mM NaCl 10mMTris/HCl pH8 1mM EDTA
LS-C-Puffer	6,5µl Oligo-Lösung (dGTP) 6,5µl Oligo-Lösung (dTTP) 6,5µl Oligo-Lösung (dATP) 1964µl Hepes-Lösung 1944,5µl TM-Lösung
Neutralisierungslösung	1M NH_4Ac in H_2O
SSC (20x)	3M NaCl 0,3M NaCitrat pH 7
TEM-Puffer	10mM Tris/HCl, pH 7,5 1mM EDTA 1mM ß-Mercaptoethanol
TEM-Puffer/GnHCl	TEM-Puffer 6M Guanidinhydrochlorid
TEM-Puffer/NaCl	TEM-Puffer 1M NaCl
TM-Lösung (2x)	0,5M TRIS/HCl, pH 8 0,05M $MgCl_2$ 0,1M ß-Mercaptoethanol
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5M Tris/HCl, pH 8,8
TX-LB-Puffer	30mM Hepes (pH 7,5) 150mM NaCl 5mM $MgCl_2$ 1mM Natriumorthovanadat 25mM Natriumfluorid 1mM EGTA 2mM PMSF 1% Triton X-100 10% Glycerin 0,1% ß-Mercaptoethanol 10µg/ml Pepstatin 10µg/ml Aprotinin 10µg/ml Leupeptin 1mg/ml Lysozyme
Waschmix I	1x SSC 0,01% SDS
Waschmix II	0,5x SSC 0,01% SDS
Waschmix III	0,1x SSC 0,01% SDS
X-Gal-Stammlösung	2% (w/v) in Dimethylformamid
YPD-Medium (Hefen)	20g/l Difco Pepton 10g/l Hefeextrakt

	(Agar: 20g/l) pH 5,8 (autoklavieren) 2% Dextrose
Z-Puffer (ß-GAL Assay)	16,1g Na_2HPO_4 (7 H_2O) 5,5g NaH_2PO_4 (H_2O) 0,75g KCl 0,246g $MgSO_4$ (7 H_2O) ad 1l H_2O
Z-Puffer (X-GAL) (immer frisch ansetzen)	100ml Z-Puffer 270µl ß-Mercaptoethanol 1,67ml X-GAL

2.1.5 Standards und Vektoren

Längen-/Größenstandards:

λ-HindIII	λ-DNA, gespalten mit *Hind*III (Markerbanden: 27491, 23130, 9416, 6628, 4361, 2322, 2027, 560bp)
1kb-Leiter	NEB
100bp-Leiter	NEB
9ZBD	pGEM9Zf$^-$, restringiert mit *Bgl*I/*Dra*I (Markerbanden: 1121, 822, 457, 271, 235bp)
Rainbow Proteinmarker	Amersham Biosciences, Freiburg
(RPN 800)	(Markerbanden: 250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 15, 10kDa)
(RPN 756)	(Markerbanden: 220, 97.4, 66, 46, 30, 21.5, 14.3kDa)

Vektoren

pUC18	Boehringer, Mannheim
pUC118	Boehringer, Mannheim
pUC18 (*Sma*I restringiert)	Amersham Biosciences, Fr.
Lawrist4-Cosmid-Vektor	ICRF, HGMP
pAS2-1	BD Biosciences, Heidelberg
pACT2	BD Biosciences, Heidelberg
pVA3-1	BD Biosciences, Heidelberg
pTD1-1	BD Biosciences, Heidelberg
pGex-6P-1	Amersham Biosciences, Fr.

2.1.6 DNA- und RNA-Quellen

Homo sapiens

Chromosom 17 spezifische Cosmid Bank	HGMP, Cambridge (UK)
Fibroblasten-Kontroll-DNA	Isolierung aus Fibroblastenzellinien
Fibroblasten-Patienten-DNA	Isolierung aus NF1-Patienten-Fibroblastenzellinien
Fibroblasten-RNA	Isolierung aus Fibroblastenzellinien
Fötales Gehirn cDNA	BD Biosciences, Heidelberg
Fötale Leber cDNA	BD Biosciences, Heidelberg
Gesamt Gehirn-RNA	BD Biosciences, Heidelberg
Multiple Tissue cDNAs	Origene Technologies, Rockville, (Maryland, USA)
Human Fetal Brain MATCHMAKER cDNA Library	BD Biosciences, Heidelberg

Kontroll-DNA	Isolierung aus Blut
Melanocyten-DNA	Isolierung aus Melanocytenzellinien
Multiple Tissue Northern (MTE^{TM}) Blot	BD Biosciences, Heidelberg
Northern (MTN^{TM}) Blot	BD Biosciences, Heidelberg
Placenta cDNA	BD Biosciences, Heidelberg
Testis-RNA	BD Biosciences, Heidelberg

Fugu rubripes

Genomische Cosmid Bank	Human Genom Mapping Project Resource Center (HGMP), Cambridge (UK)
Genomische Cosmid Bank	Imperial Cancer Research Fund (ICRF), London
RNA aus Gehirn, Leber, Niere	Greg Elgar, Cambridge (UK)

Mus musculus

Gehirn-RNA	Isolierung aus Gehirn-Gewebe
Gesamt-RNA	Isolierung aus A9 Zellinie

2.1.7 Organismen

Bakterien

E. coli, BL21	Stratagene, Heidelberg
E. coli, Sure	Stratagene, Heidelberg
E. coli, XL1 blue	BD Biosciences, Heidelberg
E. coli, YM109	Stratagene, Heidelberg

Hefen

Saccharomyces cerevisiae CG-1945	BD Biosciences, Heidelberg
Saccharomyces cerevisiae Y187	BD Biosciences, Heidelberg
Saccharomyces cerevisiae Y190	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.8 Oligonucleotide und PCR-Templates für radioaktive Sonden

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Hybaid, Ulm bezogen, wobei die Stammlösungen Konzentrationen von 100µM aufwiesen. Es werden folgend ausschließlich Primer aufgelistet, welche für Sonden, Race-Protokolle und Funktionsanalysen herangezogen wurden. Zur Vervollständigung der einzelnen Transkripte, sowie zur Sequenzanalyse ausgewählte Oligonukleotide wurden aus bekannten Sequenzen generiert und werden hier nicht näher erwähnt. Die Annealing-Temperaturen der einzelnen Primer sind hier nicht separat aufgelistet, sondern wurde jeweils mit Hilfe der TM-Determination des Virtual Genome Centers berechnet (http://alces.med.umn.edu/rawtm.html).

Für Hybridisierungen mit radioaktiven Sonden wurden neben Restriktionsfragmenten verschiedene DNA Fragmente aus PCR-Reaktionen verwendet, die folgend durch die jeweilig benutzten Oligonucleotide gekennzeichnet sind.

FN5 Gen

Fugu rubripes

Hasti 3	5′	TCG GGC GCT CGG ATT ATA	3′	} Sonde
Hasti 4	5′	GCA GCG TAG ACG AAG AAG A	3′	

Homo sapiens

Hasti 1*	5′	AAG TCA AAA GAC CAG AGA A	3′	} Sonde
Hasti 2	5′	ATC AGT TTG CTG AAA TTA ATC A	3′	
Hasti 5*	5′	GTA CAC AAA CAC CAC GAT CA	3′	} Genomische Lokalisation
Hasti 7	5′	AGA CCT CCA AGG ACA AGA A	3′	
Hasti 8*	5′	CTG CGG GGC TCA CTC GGT GAT GGT	3′	

*Anwendung bei RACE Protokollen

Deletionsbereich (Gene/ESTs, Acc.No.)

Homo sapiens

G30528	uni	5′	TTA AAC TGA CAT TAA ACT GGA	3′
	rev	5′	CTT GAC CAA GTG TCT AAA ATA	3′
N67026	uni	5′	GTG CCC GGC CTA GAA TCT ATA	3′
	rev	5′	GCA AAG TTG GCT TTC TGG A	3′
T70563	uni	5′	CAG CCA TAG CTA ACT ACT AA	3′
	rev	5′	AGA GAG TCT TGA ATA CAA GCA	3′
H56424	uni	5′	ATC AGG GTC CTC ACC TAT A	3′
	rev	5′	AGG TTA AGC TGC CCT CAA A	3′
N22706	uni	5′	TTG TGG AAA GTT TAC TGG AA	3′
	rev	5′	ATC TTA CCT ATA GAC TTG CAT GA	3′
D19648	uni	5′	ATT TAA TAG CCA AAA GTC AGA A	3′
	rev	5′	TCT TCC CAT CAG ATA AAA TA	3′
G28215	uni	5′	GAG GAT CTG GTG CAT AGA TGA	3′
	rev	5′	ACA AGA TGC CAC TTG CAT GA	3′
H79008	uni	5′	AAG AAT CTT TAC CCT CCC AA	3′
	rev	5′	CAT TCT ATT TTT GGA CTA TTC TA	3′
T02847	uni	5′	CAA TAG TGG GTT CAA CAG AA	3′
	rev	5′	CCG CAA ACA TTC AGT CTA TA	3′
R44280	uni	5′	ACA GGA CCA GTT TGA ACG A	3′
	rev	5′	CAC AAC TCC TCT TGA CAC AAA	3′
D19683	uni	5′	CAT AAA ATT AAA GTG TGT CTC AA	3′
	rev	5′	CTA CTG GCG AGC GAT GAA A	3′
D63881	uni	5′	CAA CGA GTA AGA CTT CAC CAT A	3′
	rev	5′	TGG TTT CTT CCA CAA AAA TGA	3′
T03582	uni	5′	CAC ACC TGT ATT TGA TTC TCA	3′
	rev	5′	GAC CAC ACA CGT TTA TAT A	3′
M79255	uni	5′	CCT TTC CCG AGC CCT GTA AA	3′
	rev	5′	TAA TGA AAG ATT CTG TAC AAA	3′
H29300	uni	5′	TTC TGA GGC CTA CGT GGA A	3′
	rev	5′	AGA AGC AGG TTG GAG GCA AA	3′
N25049	uni	5′	CGA TGT GAT CAT ACC AGG AAA	3′
	rev	5′	GAT ACC AGC ACT GAG TCC TAA	3′

FHN3 Gen

Homo sapiens

wi9251 uni	5′	CAC ACC TGT ATT TGA TTC TCA 3′	Sonde
wi9251 rev	5′	GAC CAC ACA CGT TTA TAT A 3′	
naba1	5′	CAC ACA CCC TGC CCA GA 3′	Sonde
naba4	5′	ATC TCA GAG TAT GCT TTT AAA A 3′	
p3nawi	5′	CGC TGC TGG CTA GGA AGA 3′	Sonde
p4nawi	5′	TGC CCG ACA TCA CTA ACA A 3′	
adap1	5′	GGC CGC GAC CCC GAC 3′	Sonde
adap2	5′	CTC CTC GCC CTG GCC G 3′	
gap uni	5′	CGG GCT CCT TTT GTC TTG A 3′	Genomische Vervollständigung
gap rev	5′	GCA GAC CGC TCA GAA GGA 3′	
pwi5	5′	CCT TCA CCA TCT CCT CCA 3′	RACE
wirap2	5′	GTC CTC CAC CGA CAG CAC ATC CTT CA 3′	
wirap3	5′	CAG TCC ACA TCG TCA CCC TCC CCA TA 3′	
wirap4	5′	GTC CTT CTC GGC AGG ACT CCC GAC A 3′	

Mus musculus

mauswi1	5′	ACT TGT GAA GTG TTT GGA TC 3′	Sonde
mauswi2	5′	CAG GTA GGG CCA ATG TCA 3′	

2-Hybrid-System / Pulldown

1wi (*FHN3*)	5′	GAT GTG CTG TCG GTG GA 3′	
pwi7(*FHN3*)	5′	TTG TCC ATG TAC TGC CTC A 3′	
hiwi1(*FHN3*)	5′	CAT GAA AGG GTG CGA GGA 3′	
appuni2	5′	GCC CGG TTT GGC ACT GCT 3′	
apprev2	5′	TTC TGC ATC TGC TCA AAG AAC TTG TAG G 3′	
aplp2uni2	5′	TTG TGG GAA GTT AAA TAT GCA TGT GA 3′	
aplp2rev2	5′	TGC ATC TGC TCC AGG TAT TTG TA 3′	
T7*	5′	GGA TCC **TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG** 3′	
t7app695uni	5′	**T7**- ATC CCA CTC GCA CAG CA 3′	
app695rev	5′	GGA CAC CGA TGG GTA GTG AA 3′	
t7pACT2uni	5′	**T7**- CTA TCT ATT CGA TGA GTA AGA TAC CCC A 3′	
pACT2rev	5′	GTG AAC TTG CGG GGT TT 3′	
aplp1-640rev	5′	CCG CTG CAG TTC GCG GA 3′	
aplp1-653rev	5′	GGG TGT GAA ATG ATC ACT TCA AGA 3′	

2.2 Methoden

Verschiedenste angewandte molekularbiologische und biochemische Methoden wie Gelelektrophorese, DNA- und RNA-Isolierung und deren Quantifizierung, Aufreinigung und Fällung, sowie die Vervielfältigung und Analyse verschiedenster Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), „Pick-PCR“ (direkter Einsatz von Klonmaterial als Template), reverse PCR (RT-PCR), Klonierung und Restriktion wurden nach allgemein bekannten Standardprotokollen durchgeführt und werden hier im einzelnen nicht weitergehend erläutert. Lediglich auf speziell für die Arbeit relevante Methoden soll hier eingegangen, sowie Abwandlungen und Erweiterungen der allgemeingültigen Bedingungen aufgezeigt werden.

2.2.1 DNA- / RNA-Analysen

2.2.1.1 Southern-Blot

Das *Southern Blotting* (Southern, 1975), ist eine Methode zur Analyse genomischer DNA-Sequenzen. Ihr Prinzip beruht auf dem Transfer elektrophoretisch getrennter, denaturierter DNA-Fragmente von einem Agarosegel auf eine Nylon-Membran oder einen Nitrocellulose-Filter. Restringierte Cosmid-, bzw. YAC-DNA wurde auf einem niedrig-prozentigem Agarosegel langsam, mit niedriger Voltzahl, aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 5min in 0,1N HCl geschwenkt, wodurch eine Degradierung der DNA bewirkt werden sollte und somit größere Fragmente leichter aus dem Gel wandern können. Zur Transfervorbereitung erfolgte eine anschließende Denaturierung für 30min mit Denaturierungslösung (1,5M NaCl + 0,5M NaOH) und Neutralisierung für 2x 15min mit 1M Ammoniumacetat. Um die Möglichkeit zu erzeugen, dass DNA-Fragmente aus dem Gel auf den Filter geschwemmt werden benutzte man den allgemeingültigen Aufbau des Southern Blots, wodurch es zu einen Pufferfluss durch das Gel hin zu der Nylonmembran kommt. Die anschließende Fixierung der DNA auf den Filter wurde durch UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 254nm, das sogenannte „cross-linking“, erreicht.

2.2.1.2 Northern-Blot

Für die Erfassung von Genen, ihren Transkriptgrößen und ihren Expressionsspektren wurden käuflich erwerbare Northern- und RNA-Dot-Blots der Firma BD Biosciences herangezogen. Diese bieten den Vorteil verschiedenste

Gewebearten parallel mittels Hybridisierungen untersuchen zu können und desweiteren Gewebearten zu erfassen, die nicht unbedingt alltäglich zur Verfügung stehen. Die Behandlung der Filter erfolgte laut Herstellerangaben.

2.2.1.3 Nachweisreaktionen mittels Hybridisierung

Es gibt die verschiedensten Arten DNA und RNA sichtbar nachzuweisen, bzw. bestimmte Transkript- oder Fragmentgrößen zu bestimmen oder bestimmte Sequenzen zu identifizieren. Dazu gehören die nicht-/radioaktive Hybridisierungen mit Sonden aus cDNA- oder DNA-Fragmenten.

Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden auf Southern- und Northern-Blot Filter diente zur Lage- und Längenbestimmung von Restriktionsfragmenten und zur Charakterisierung von Transkripten bestimmter Gene. Sie ist auch nützlich zur Identifizierung von Klonen in käuflichen Cosmidbanken oder cDNA-Banken, die über die Ressourcenzentren RZPD und HGMP bezogen wurden. Bei diesen Banken sind ca. 76000 Klone in Rastern auf Nylonfilter gespottet. Die Filter wurden mit ^{32}P(-dCTP)-markierter Sonden-DNA und parallel mit ^{35}S(-dATP)-markierter *E. coli* DNA hybridisiert. Somit erreichte man eine Hintergrundsmarkierung des Rasters zur Auswertung und Auszählung der Rasterpositionen. Die beiden Markierungen verlaufen analog, mit unterschiedlichen Reagenzien. Allgemein umfasste die Vorgehensweise 3 Schritte, die folgend dargestellt sind.

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurden 50ng Fragment-cDNA (bzw. *E.coli*-DNA) mit 11,6µl LS-C-Puffer (bzw. LS-A) denaturiert, mit 5U Klenow-Enzym, 10µg BSA, sowie 20µCi ^{32}P-α-dCTP (bzw. 20µCi ^{35}S-dATP) versetzt und für ca. 1h bei 37°C inkubiert. Der LS-C-Puffer enthält zum einen Hexanukleotide mit Zufallssequenzen, die als Primer dienen, zum anderen die Nukleotide dGTP, dTTP und dATP, jedoch kein dCTP (analog: LS-A enthält dGTP, dTTP, dCTP, kein dATP). Die DNA-Polymerase I-Aktivität des Klenow-Enzyms erkennt die freien 3‘-Enden der angelagerten Hexanukleotide und synthetisiert nun nach Vorlage der einzelsträngigen DNA-Fragmente den komplementären Gegenstrang. Dabei wird zwangsläufig das radioaktiv markierte ^{32}P-α-dCTP (bzw. ^{35}S-dATP) eingebaut. Die nun markierten DNA-Stränge wurden über Sephadex-G50-Säulen von den nicht inkorporierten Nucleotiden abgetrennt und durch Erhitzen auf 95°C für 5min denaturiert. Die zu hybridisierenden Filter wurden parallel mit 2x SSC benetzt, mit Hybridisierungslösung überschichtet und für ca. 1h prähybridisiert.

Durch die enthaltene Heringssperma-DNA sollte der Filter abgesättigt und somit unspezifische Bindungen der Sonde vermindert werden. Die eigentliche Nachweisreaktion wurde durch Zugabe der markierten Sonde zum prähybridisierten Filter in Gang gesetzt. Die Inkubation erfolgte für ungefähr 16h bei ca. 58-62°C, in Abhängigkeit der Homologie der Sonde zur DNA-Sequenz, d.h. je höher die Homologie, um so höhere Temperaturen können eingesetzt werden. Durch Zugabe von Formamid zum Hybridisierungspuffer konnte, falls notwendig eine Herabsetzung der Hybridisierungstemperatur erreicht werden und somit eine empfindliche Reaktion wie beispielsweise die Hybridisierung von Northern Blots schonend und trotzdem stringent durchgeführt werden. Nichthybridisierte und unspezifisch gebundene Sondenanteile wurden nach der Hybridisierung durch drei Waschschritte entfernt. Der Reihenfolge nach wurden die Waschlösungen I, II, III jeweils für 15min bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur eingesetzt, und die Filter anschließend bei –70°C mit Röntgenfilmen exponiert.

Die nicht-radioaktiven Hybridisierungen von Southern-Blots wurden mit dem „Gene Images™ AlkPhos Direct™ labelling and detection system“ von Amersham Biosciences durchgeführt, das ein Chemilumineszens detektierendes System darstellt. Es beruht auf einem katalytischen Zerfall eines stabilen Dioxethan Substrats, hervorgerufen durch eine an die Probe gebundene alkalische Phosphatase. Der Vorteil dieses Systems liegt in der sehr kurzen Lag-Phase, was zu sehr schnellen Lichtreaktionen führt, die ihr Maximum bereits nach vier Stunden erreichen. Somit können schnellere und auch prägnantere Ergebnisse als bei der radioaktiven Hybridisierung erzielt werden. Die Durchführung der einzelnen Teilreaktionen erfolgte laut Herstellerangaben und die Detektion durch Exposition mit Röntgenfilmen bei RT.

2.2.1.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzreaktion wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger (1977) mit Hilfe eines "ALF*express*™ DNA Sequenzers" und dem „Thermo Sequenase Kit“ (Amersham Biosciences) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Aufarbeitung vier getrennter Ansätze, die jeweils alle vier Desoxynucleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und zusätzlich jeweils ein Didesoxynucleotid, entweder ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP enthalten. Kommt es zum Einbau eines ddNTPs anstatt eines dNTPs, fehlt ein freies 3’Ende

und die Elongation dieses Stranges kommt zum Stillstand. Hierdurch entsteht eine Kollektion von DNA-Fragmenten, deren Längen die Positionen der jeweiligen Nucleotidreste im Matrizen-Strang wiedergeben, jedoch alle primerbedingt das selbe 5'Ende besitzen. Als Ausgangsprimer wurden meist vektorspezifische Oligonucleotide verwendet, die jeweils mit dem Fluorophor Cy5 gekoppelt waren. Die computergesteuerte Sequenzanalyse ergab sich aus der elektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Moleküle und deren Detektion durch die Anregung der Farbstoffe mit Hilfe eines Lasers an einer definierten Stelle des Gels.
Des weiteren wurden Sequenzanalysen mittels des ABI PRISM 310 DNA Analyzers und dem DYEnamic Cycle Sequencing Kit von Amersham Biosciences laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip beruht ebenfalls auf der traditionellen Didesoxynucleotid Abbruchmethode. Hierbei sind die vier ddNTPs jeweils mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, Fluorescein und ein bestimmtes Rhodamin gekoppelt. Standardmäßig sind die ddNTPs mit Rhodamin 110 (dR110), Rhodamin-6-G (dR6G), Tetramethylrhodamin (dTAMRA), bzw. Rhodamin-X (dROX) markiert. Das Fluorescein, als Donorfarbstoff absorbiert die Energie des Laserlichts und transferiert sie auf den jeweiligen Rhodaminakkzeptorfarbstoff im selben Didesoxymolekül. Jeder Akkzeptorfarbstoff emittiert danach das Licht bei einer charakteristischen Wellenlänge, wodurch das jeweilige Nucleotid durch Computeranalyse identifiziert werden kann.

2.2.1.5 Amplifikation von cDNA-Enden

Die Herstellung einer cDNA aus einer sehr langen mRNA mit Hilfe von Oligo (dT)-Primern birgt die Schwierigkeit, dass die Reverse Transkriptase oftmals die Synthese vor dem endgültigen 5'-Ende abbricht, und somit nicht die komplette mRNA Sequenz erfasst werden kann. Die 5'-RACE Methoden (Rapid-Amplification of cDNA Ends) bieten nun die Möglichkeit, dieses Ende zu erhalten, unter der Voraussetzung, dass bereits Sequenzdaten aus dem codierenden Bereich vorliegen. Innerhalb der Erstellung dieser Arbeit wurden mehrere 5'-RACE Methoden angewandt, die im folgenden kurz dargestellt sind. Die jeweils erhaltenen PCR-Fragmente wurden unter Standardbedingungen kloniert und mittels Sequenzierung charakterisiert.

2.2.1.5.1 Amplifikation mittels Ringschluss

Im ersten Protokoll wurde die Erfassung unbekannter Endregionen durch eine Zirkularisierung der cDNA erreicht. Mit einem genspezifischen Primer, der am 5‘-Ende phosphoryliert sein musste, wurde unter Standardbedingungen eine cDNA-Synthese an der jeweils relevanten RNA durchgeführt. Nach einer anschließenden NaAc-Fällung, Zugabe von 2µl RNA-Ligase (40U/µl) und 8µl RNA-Ligase-Puffer (5x) zu einem Endvolumen von 40µl wurde diese Ligation über Nacht (15-18h) bei 16°C inkubiert. In dieser Zeit besitzt die Ligase die Möglichkeit, die einzelsträngige cDNA zum Ringschluss zu führen. Für die Amplifikation des gesuchten Sequenzbereiches wurden zwei weitere Primerpaare benötigt, die aber im Gegensatz zu einem gewöhnlichen Primerpaar nicht aufeinander zulaufen, sondern in entgegengesetzte Richtung weisen. Die Synthese eines PCR-Produktes erfolgte durch den Ringschluss des Templates und lieferte ein Produkt, das randständig bekannte Sequenzen aufwies und mittig den unbekannten 5‘-Bereich beinhaltete. Eine zweite, nested-PCR diente dem Ausschluss von Nebenprodukten aus der ersten PCR und zur Verkleinerung des PCR-Produkts in Richtung unbekannter Regionen. Das erhaltene Fragment wurde mit weiteren Standardmethoden analysiert.

2.2.1.5.2 Amplifikation mit Hilfe der Terminalen Transferase

Eine andere Vorgehensweise war die Erfassung der 5’-Enden mittels einer genspezifischen cDNA-Synthese und die darauffolgende Anheftung eines Poly-A-Restes an das freie 3’-OH-Ende. Hierzu wurde zur hergestellten einzelsträngigen cDNA in einem 40µl Ansatz 1µl Terminale Transferase und 2µl dATP (200µM) gegeben und bei 37°C für 5min inkubiert. Eine notwendige Abstoppung der Reaktion, um zu lange A-Schwänze zu verhindern, erfolgte durch einminütiges Kochen. Die Zweitsstrangsynthese an den nun getailten Einzelsträngen wurde durch einen PCR-Zyklus eines Standardansatzes mit der cDNA als Template und einem XT_{12} Primer erreicht. Dieser Primer besitzt am 5’-Ende eine beliebige Sequenz X von 20 Nucleotiden und am 3’-Ende 12 Thymidin-Reste, die an den getailten A-Rest hybridisieren. Die Reaktion zum Doppelstrang wurde nicht-zyklisch mit 1min 95°C, 1min 20°C, 1min 30°C, 1min 40°C, 10min 72°C und 2min 20°C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine PCR unter Standardbedingungen mit einem ebenfalls genspezifischen, 5’-wärts zum ersten gelegenen Primer und

einem, der Zufallssequenz entsprechendem Primer X. Für das Erhalten eines spezifischen PCR-Produktes war meist eine weitere, anschließende Nested-PCR von Nöten, welche dann zur Charakterisierung weiter verarbeitet wurde.

2.2.1.5.3 Amplifikation durch Adaptoren

Diese Art der 5'-Endsynthese wurde mit verschiedenen gewebsspezifischen Marathon-Ready™ cDNAs von BD Biosciences durchgeführt. Das Unternehmen stellt fertige cDNA zur Verfügung, die aus PolyA-RNA gewonnen wurde. Aus dieser RNA wurde doppelsträngige cDNA mittels Erst- und Zweitstrang-Protokollen synthetisiert und daran spezielle Adaptoren anligiert. Mit dieser fertigen doppelsträngigen cDNA war es nun möglich, sowohl die gewünschte 5'-RACE als auch eine 3'-RACE durchzuführen. Die Versuchsdurchführung beschränkte sich auf eine PCR mit darauffolgender Nested-PCR, die laut Herstellerangaben mit den mitgelieferten Adaptor-Primern AP1 und AP2, sowie nach Vorschlag generierten genspezifischen Primern zu Bewerkstellen war.

2.2.2 Genomische Lokalisation von Genen mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

2.2.2.1 Zellkultur und Chromosomenpräparatsherstellung

Für die FISH Analyse wurden humane, kondensierte Metaphasechromosomen aus Hautfibroblastenzellen gesunder Personen und NF1-Patienten mit großen Deletionen verwendet. Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s Medium), versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), bei 37°C in einem mit 5% CO_2-begasten Brutschrank kultiviert. Sie sollten immer genügend frisches Medium erhalten und niemals die maximale Konfluenz erreichen und dementsprechend musste das Medium nach Verbrauch der Nährstoffe, erkennbar durch den enthaltenen Farbindikator Phenolrot, erneuert werden. Die Kulturen mit zu hoher Zelldichte wurden durch Zugabe von Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst, 10min bei 1000U/min zentrifugiert und das Sediment verdünnt in neue Kulturflaschen mit frischem Medium überführt.

Für die Herstellung der Präparate wurden die Medienwechsel der Zellkulturen zu bestimmten Zeiten durchgeführt, wodurch eine gewisse Synchronisation der Teilungszyklen der Zellen stattfand. Es konnte somit erreicht werden, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt, der sogenannten „Mitosewelle", genügend mitotische

Zellen in der Kultur vorhanden waren. Da sich Zellen zum Teilen oftmals vom Flaschenboden lösen, sollte das Medium immer in die Präparation mit einbezogen werden und wurde daher in 10ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Zum Zellrasen wurde anschließend eine Trypsinlösung gegeben, die Zellen darin inkubiert bis sie sich ablösten. Die Trypsin-Zell-Lösung entgiftete man mit dem vorher abgenommenen Ausgangsmedium. Durch Zugabe von 10µl Colcemid pro ml Kulturmedium, welches an das Tubulin der Mitosespindel bindet und somit dessen Polymerisierung verhindert, konnten die Chromatiden nicht mehr auseinander weichen und die Zellen arretierten im Metaphasestadium. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt von 10min bei 1000rpm und die Resuspension des Zellpellets mit 1ml Medium. Zu diesem Zellpellet wurde nun langsam eine 0,4%ige KCl-Lösung zugegeben und für 20min im Wasserbad bei 37°C inkubiert, um somit hypotonische Bedingungen zu erreichen. Diese Art der Behandlung bewirkte die Quellung der mitotischen Zellen und somit später beim Auftropfen und Aufplatzen der Zellen eine gute Spreitung der Chromosomen. Anschließend mussten die Zellen noch, durch ein wiederholtes Abzentrifugieren und der Resuspension des Pellets mit 2-3ml eiskaltem Fixativ, fixiert werden, wobei nach dem 2. Schritt eine Inkubation über Nacht erfolgte. Beim letzten Zentrifugationsschritt engte man die Zellsuspension durch Aufnahme in 0,5ml Fixativ ein und tropft sie anschließend mit einer Pasteurpipette auf kalte, gewässerte Objektträger. Durch diese Prozedur zerplatzten die Metaphasezellen und die Chromosomen kamen in kleinen Gruppen frei zum Liegen. Sofort benötigte Chromosomenpräparate wurde ca. 5-7 Tage bei Raumtemperatur luftgetrocknet, bevor sie für eine FISH vorbereitet wurden. Die restlichen Präparate konnten nach einer Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe bei –70°C eingefroren werden.

2.2.2.2 Sondenherstellung

Als Sondenmaterial zur Genlokalisation dienten mittels radioaktiver Hybridisierung ermittelte humane Cosmide aus den zu untersuchenden Genbereichen, die mit dem Reagenziensystem BioNick™ Labeling System der Firma Invitrogen markiert wurden. Das Prinzip dieser Markierung basiert auf der „Nick-Translation“, bei der zwei verschiedene Enzyme beteiligt sind, die Dnase I und die DNA-Polymerase I von *E. coli.* Die Dnase I erzeugt Einzelstrangbrüche („nicks“) an der DNA durch Trennung einzelner Phosphodiesterbindungen. Die folgenden Nucleotide der

dabei entstehenden freien 5'-Phosphatenden, werden von der funktionellen Untereinheit 5'-3'-Exonuclease der Polymerase I nach und nach abgebaut. Gleichzeitig fügt die andere Untereinheit, die DNA-Polymerase das entstandene freie 3'-Hydroxylende wieder mit Nucleotiden auf. Dafür wurden in einem dNTP-Mix neben normalen dNTPs auch chemisch veränderte Nucleotide, das Biotin-14-dATP oder das Digoxigenin-11-dUTP angeboten. Diese chemischen Reportergruppen ragen aus dem neu synthetisierten Strang heraus und können dadurch mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert werden.

Die Reaktion wurde mit jeweils 1µg der entsprechenden Cosmid-DNA, dem Enzym-Mix und der Nucleotid-Mischung, welche neben den dNTPs auch entweder das biotinylierte oder das digoxygenierte dNTP und Pufferreagenzien enthielt, laut Herstellerangaben angesetzt. Die Nick-Translation sollte nach einer Stunde Inkubation bei 16°C 100-500bp lange Fragmente aufweisen. Darauf folgte ein Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 3M Natriumacetat und anschließender Ethanolfällung unter Zugabe von 25µg Heringssperma-DNA und 20µg Cot^1-DNA. Die humane Cot^1-DNA ist eine DNA-Fraktion mit hauptsächlich repetitiven Sequenzen, welche nach einer Denaturierung des gesamten Genoms am schnellsten wieder renaturieren und dessen Renaturierungsgeschwindigkeit mit dem Cot-Wert ausgedrückt wird. Somit wurde durch die Zugabe der Cot^1-DNA eine Abdeckung repetitiver Sequenzen in der Sonde erreicht und dadurch einer Hybridisierung dieser mit der Ziel-DNA entgegengewirkt, welche eine Überdeckung der gewünschten Signale zur Folge hätte. Die getrockneten Sonden wurden mit speziellem Hyb-Mix gelöst und bis zur Weiterverarbeitung bei –20°C eingefroren.

2.2.2.3 Denaturierung der Chromosomenpräparate und der Sonden

Für eine Hybridisierung mussten die Reaktionspartner einzelsträngig vorliegen, folglich mussten sowohl die Präparate, als auch die Sonden denaturiert werden. Die Präparate wurden vor der Denaturierung in einer eiskalten aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 99% und 100% Ethanol) entwässert und anschließend getrocknet. Danach erfolgte die Denaturierung mit 150µl einer 70%igen Formamidlösung in 2x SSC pro Objektträger, Auflegen eines Deckglases und Erhitzung auf 70°C für 1min 35sec. Nach einer erneuten Entwässerung und einer

Trocknungszeit von 30-60min standen die Chromosomenpräparate für die Hybridisierungsreaktion zur Verfügung.
Die in Hyb-Mix gelösten Sonden wurden in einem PCR-Cycler für 5min bei 70°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und unter erneuter Zugabe von Cot[1]-DNA für 15min bei 37°C prähybridisiert.

2.2.2.4 Hybridisierung

Für die eigentliche Hybridisierung wurden die denaturierten Objektträger mit ca. 30-40µl Sondenlösung benetzt und durch Auflegen eines Deckglases und Umrandung mit Fixogum eine abgeschlossene Flüssigkeitskammer geschaffen. Pro Objektträger wurden 100ng Plasmid-DNA, 200ng Cosmid-DNA, bzw. 400ng YAC-DNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C. Am nächsten Tag wurden die Präparate von unspezifisch- und ungebundenen Sondenanteilen durch Waschen befreit. Nach der Entfernung des Fixogums und dem Abschwemmen des Deckglases in 2x SSC wurden die Objektträger unter Schütteln bei 70°C zweimal für 4min in 0,5x SSC und einmal für 4min in 2x SSC getaucht. Das Sammeln von mehreren Präparaten erfolgte in 4x SSC mit 0,1% Tween20, wodurch die Präparate immer mit Flüssigkeit benetzt blieben und somit nicht Austrocknen konnten.

2.2.2.5 Detektion

Die Detektion der hybridisierten Signale war abhängig von den eingesetzten chemischen Reportergruppen, Biotin oder Digoxygenin. Das Biotin wurde innerhalb eines Biotin-Avidin-Systems und speziellen Antikörpern detektiert, da es eine sehr hohe Affinität zu dem Liganden Avidin aufweist. Dagegen wurden beim Digoxygenin ausschließlich Antikörper verwendet. Das Avidin und die Antikörper waren jeweils mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, so dass der endgültige Reaktionskomplex mit einem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden konnte. Beim verwendeten Biotin-Avidin-System kam der grün emittierende Farbstoff Fluoreszein-IsoThioCyanat (FITC) und beim Digoxygenin-System der rot emittierende Farbstoff Texas-Red zum Einsatz. Die Reaktionen der jeweiligen Systeme erfolgten über jeweils drei Detektionsschritte, um eine Amplifikation des Fluoreszenz-Signals an der Stelle der Bindung der DNA-Proben an die Chromosomen zu bekommen.

Das Biotin-Avidin-System besteht aus folgenden drei Detektionslösungen, die jeweils im angegebenen Verhältnis aus Antikörper-Stammlösung und 3%iger Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) in 4x SSC/0,1% Tween 20 angesetzt wurden:

1. 1 : 200 FITC-Avidin
2. 1 : 250 biotinylisiertes Anti-Avidin
3. 1 : 200 FITC-Avidin

Im ersten Detektionsschritt konnte das FITC-Avidin an die Biotin-Reportergruppe der Sonde binden. Danach wurde eine Verstärkung durch den Antikörper Anti-Avidin, der wie die Ausgangssonde biotinylisiert war, und dem wiederum an das Biotin bindende FITC-Avidin erreicht.

Beim Digoxygenin-System wurden nacheinander folgende drei Antikörper mit ihren angegebenen Verdünnungen verwendet, die ebenfalls wie oben beschrieben verdünnt wurden:

1. 1 : 50 Maus-Antidigoxygenin
2. 1 : 50 Kaninchen-Anti-Maus Texas Red
3. 1 : 50 Anti-Kaninchen Texas Red

Im Einzelnen erfolgte die Detektion durch Überschichtung der Objektträger mit jeweils 120µl der entsprechenden, verdünnten Detektionslösung, anschließendem Auflegen eines Objektträgers und Inkubation von 30min bei 37°C in einer feuchten Kammer. Vor der Inkubation mit der folgenden Lösung wurde überschüssige Detektionslösung aus dem vorhergegangen Schritt durch Waschung mit 4x SSC/0,1% Tween 20 in Küvetten dreimal für 5min bei 42°C entfernt.

Nach dem jeweiligen letzten Waschritt wurde die Chromosomenpräparate mit einer 4-6-Diamidino-2-phenylindol-Lösung für 8min gefärbt. Durch dieses DAPI konnten zum einen die Chromosomen sichtbar gemacht und zum anderen durch die entstehende schwach erkennbare Bänderung die Identifizierung der Chromosomen vereinfacht werden. Idealerweise wurde DAPI ausgewählt, da dessen Emissionslicht Blau nicht mit denen von FITC (Grün) und Texas Red (Rot) überlappt. Für die anschließende Waschung wurde 4x SSC/0,1% Tween 20 und bidestilliertes Wasser verwendet, dann die Präparate getrocknet und mit dem glycerinhaltigen Eindeckmittel „Antifade“, welches fluoreszenzstabilisierende Stoffe gegen ein Ausbleichen enthält, haltbar gemacht. Somit konnten die markierten Chromosomenpräparate bis zur Auswertung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop im Dunkeln aufbewahrt werden.

2.2.3 Untersuchungen von Protein – Protein Interaktionen

2.2.3.1 Das Zwei-Hybrid-System (Two Hybrid-System)

Das von Fields & Song (1989) erstmals beschriebene 2-Hybrid-System stellt eine Methode dar, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Dabei machten sich die Autoren die Vorteile des GAL4 Proteins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu Nutze. Das GAL4 Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Regulierung der Expression von Genen des Galactosemetabolismus benötigt wird. Dabei ist er, wie andere Faktoren aus unabhängig funktionierenden Modulen aufgebaut, wodurch die Fähigkeiten zur Bindung von DNA und zur Transkriptionsaktivierung in definierten Domänen des Transkriptionsfaktors lokalisiert sind. Somit besteht GAL4 aus einer N-terminalen Domäne, der DNA-Bindedomäne, welche an spezifische DNA Sequenzen (UAS = upstream activating sequences) bindet und einer C-terminalen Domäne, der Aktivierungsdomäne, welche Regionen für die Initiation der Transkription enthält. Durch die Trennbarkeit dieser zwei funktionellen Domänen kann man nun eine eintretende Wechselfunktion zweier Proteine miteinander testen. Dabei fusioniert man ein zu untersuchendes Protein X mit der DNA-Bindedomäne von GAL4 (Hybridmolekül 1; BD-X) und das andere Y mit der Aktivierungsdomäne (Hybridmolekül 2; AD-Y). Beide Hybridmoleküle werden als Plasmidkonstrukte in entsprechende Hefezellen transfiziert und dort exprimiert. Das Hybridprotein BD-X kann nun an die Zielsequenz UAS der DNA binden, jedoch keine Aktivierung der Transkription durch Fehlen der Aktivierungsdomäne einleiten. Demnach könnte das AD-Y Hybridprotein an sich die Initiation veranlassen, jedoch die Transkription ist durch die fehlende Bindung an das UAS Element blockiert. Erst durch Eintreten einer Wechselwirkung der zu untersuchenden Proteine X und Y, erlangen die zwei funktionellen Domänen des GAL4 Proteins eine räumliche Nähe zueinander und es entsteht ein GAL4-ähnlicher, funktionsfähiger Transkriptionsfaktor. Seine Aktivität ist mit Hilfe geeigneter Hefestämme mit stabil im Genom integrierten Reportergenen nachweisbar. Die Stämme sind dementsprechend manipuliert, dass sie konstruierte „Promotoren“ besitzen, die mit einer GAL4 Erkennungs-sequenz UAS und einer downstream gelegenen TATA Box, auch als Minimal-promotor (MP) bezeichnet, ausgestattet sind. Diesen nachgeschaltet, befindet sich Reportergene wie *his3*, ein Gen für die Biosynthese von Histidin oder das bakterielle *lacZ*-Gen, das für die ß-Galactosidase codiert. Bei der durch den

GAL4-Hybridprotein-Komplex vermittelten Aktivierung am UAS, kommt es zur Expression des *his3*-Gens und somit zur Synthese von Histidin, wodurch selektives Wachstum auf Minimalmedium (SD-Medium = Synthetic Dropout) ohne Histidin erfolgen kann. Ebenfalls wird die Transkription des *lac*Z Gens eingeleitet und die Produktion von ß-Galactosidase erlaubt eine einfache Blau-Weiß-Selektion mittels dem Farbstoff X-GAL, die durch einen ß-Galactosidase Assay (ß-Gal-Assay) erfolgte. Dadurch erreicht man den indirekten Nachweis der Interaktion zweier Proteine durch den Nachweis der Expression der jeweiligen Reportergene.

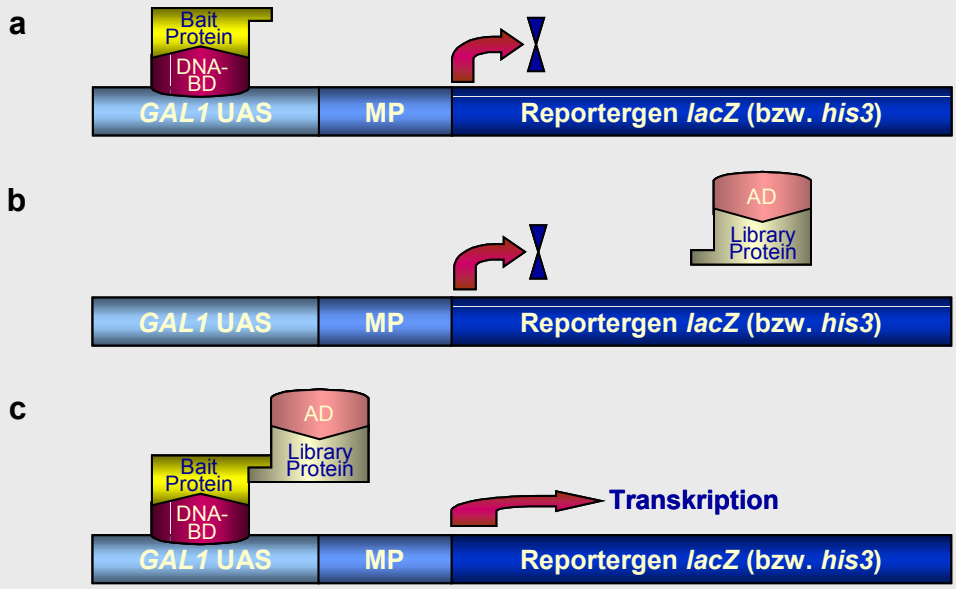


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des GAL4-basierten 2-Hybrid-Systems. Identifikation eines putativen Bindepartners (Library-Protein) eines gegeben Proteins (Bait-Protein) aus einer Expressionsbank. Das Bait-Protein fusioniert mit der Hefe GAL4-Bindedomäne (DNA-BD) bindet an die Zielsequenz *GAL1* UAS, welches upstream eines Reportergens liegt (*lacZ* oder *his3,* separate Konstrukte im Hefegenom integriert). Die Hefe GAL4-Aktivierungsdomäne AD, welche transkriptionale Aktivierungsfunktion ausüben kann, ist verbunden mit Proteinen generiert aus einer cDNA Bank. ***a*** Die Bindedomäne mit Bait-Protein bindet an den UAS, doch durch Fehlen des GAL4 Aktivators kommt es zu keiner Expression. ***b*** Ein Aktivator alleine kann seine Zielsequenz nicht lokalisieren und es kommt ebenfalls zu keiner Expression der Reportergene. ***c*** das BD-Fusionsprotein bindet an den UAS und durch die Wechselwirkung des Bait-Proteins mit einem Library-Protein kommt es zur räumlichen Nähe der AD-Domäne zur BD-Domäne und somit auch zum Promotor, wodurch eine Aktivierung stattfinden kann und die Transkription der Reportergene beginnt. MP = Minimalpromotor, Teil des Promotorkonstrukts.

Jedoch nicht nur der Interaktionsnachweis zweier bekannter Proteine ist durch dieses System möglich, sondern auch die Suche nach putativen Interaktions-partnern eines gegebenen Proteins (Bait-Protein) mit Hilfe spezieller Expressions-banken. Diese Librarys bestehen aus gewebsspezifischen cDNAs, jeweils fusioniert mit der Sequenz der Aktivierungsdomäne. Durch das System ist es nun

möglich, putative Partner (AD-Library-Proteine) des Bait-Proteins, das mit der Bindedomäne verbunden ist, aus der Bank durch Nachweis der Expression der Reportergene zu identifizieren (Abb.2.1).

2.2.3.1.1 Komponenten des Zwei-Hybrid-Systems

Mittlerweile werden käuflich erwerbbare Kits von verschiedenen Herstellern angeboten, die sämtliche Komponenten des 2-Hybrid-Systems beinhalten. Im Rahmen dieser Arbeit kam das MATCHMAKER Two-Hybrid System 2 von BD Biosciences zur Anwendung, bei dem neben den benötigten Vektoren zur Konstruktion der Hybridmoleküle 1 und 2, auch geeignete Hefestämme und bereits vorkonstruierte Kontrollplasmide enthalten waren. Sämtliche verwendete Vektoren und Hefestämme mit ihren jeweiligen Eigenschaften sind in Tabelle 2.1 zusammenfassend aufgeführt.

Klonierungsvektoren

Die benutzten Vektoren sind als binäre Plasmide konzipiert, wodurch es möglich ist, dass sie sowohl in Bakterien als auch in Hefen stabil integriert, vermehrt und selektiert werden können. Alle beinhalten einen Replikationsursprung (origin of replication, ori) zur Vermehrung in *E. coli* (ori pBR322) und in der Hefe (ori 2µ). Zur Selektion in *E. coli* dient das ß-lactamase (*bla*) Gen, das für eine Ampicillin Resistenz (Amp^r) sorgt. Weiter tragen die Vektoren einen Auxotropiemarker aus Aminosäurebiosynthesewegen wie *trp1* oder *leu2*, wodurch es den Hefetransformanten mit Plasmid möglich ist, auf Selektionsmedien ohne Tryptophan, bzw. Leucin zu wachsen.

Als Vektor zur Konstruktion des BD-Plasmids mit dem zu untersuchenden Transkript wurde pAS2-1 verwendet, der den Auxotropiemarker *trp1* und vor der MCS die Sequenz für die GAL4 Bindedomäne besitzt. Für die spätere Erzeugung eines funktionsfähigen BD-Hybridproteins war es nötig, dass der offene Leserahmen der Sequenz der Bindedomäne über das eingefügte Transkript hinweg bestehen blieb und nicht vorzeitig unterbrochen wurde. Die Überprüfung dazu wurde nach der Amplifikation in *E. coli* mittels ABI-Sequenzierung mit Primern aus der MCS und mit einer Reihe genspezifischen Primern an mehreren Klonen durchgeführt.

Zur Generierung des AD-Plasmids mit der Sequenz für die GAL4 Aktivierungs-

domäne fungierte pACT2, der den Selektionsmarker *leu2* trägt. Er war Bestandteil der käuflich erworbenen *E. coli* cDNA Bank „Human Fetal Brain MATCHMAKER cDNA Library“ von BD Biosciences. Diese Bank wurde über *E. coli* im Großmaßstab vermehrt, um so zu gewährleisten, dass sämtliche Transformanten der Bank wieder präsent sind. Nach einer Plasmidisolation und einer DNA-Mengenbestimmung konnten diese AD-Plasmide zum Screenen in den 2-Hybrid Assay eingesetzt werden. Zusätzlich diente der pACT2 Vektor zur gezielten Klonierung bestimmter Transkripte, deren Produkte auf Wechselwirkung mit dem Bait-Protein getestet werden sollten.
Die spezielle Konstruktion des BD- einzelnen Fusionsplasmide sind im Ergebnisteil detailliert beschrieben.

Hefestamm Y190 und CG-1945

Als Reporterhefestämme wurden *Saccharomyces cerevisiae* Y190 und CG-1945 eingesetzt. Sie sind in soweit manipuliert, dass sowohl das hefeeigene Gen *gal4* und das *gal80* Gen, das für einen Negativ-Regulatur von *GAL4* codiert, deletiert wurden. Dadurch werden Störungen durch endogene GAL4 und GAL80 Proteine vermieden. Zusätzlich sind die nativen Gene *leu2* und *trp1*, die als Bestandteil der Fusionsplasmide zur Selektion transformierter Hefezellen dienen, ausgeschaltet. Jeder Hefestamm besitzt zwei spezielle Promotor-Reporterkonstrukte fest im Genom integriert. Diese bestehen jeweils aus einer GAL4-Erkennungssequenz UAS, einem Minimalpromotor und einem Reportergen. Durch die Variabilität der drei Komponenten bei den verschiedenen Konstrukten, kommt es zu einer unterschiedlich starken Ausprägung der Expression der Reportergene. Beim Hefestamm Y190 sind die Konstrukte so gewählt, dass das System sehr empfindlich reagiert, womit selbst schwache Wechselwirkungen beim Screenen einer Expressionsbank erfasst werden können. Nachteilig wirkte sich dies jedoch auf die Genauigkeit des Systems aus, d.h. es war auch mit einer deutlich erhöhten Zahl an falsch positiven Wechselwirkungen zu rechnen, die mit Folgeuntersuchungen identifiziert werden mussten. Der Stamm CG-1945 zeigt deutlich niedrigere Expressionslevels der Reportergene, wodurch striktere Ergebnisse ohne viele Kontrollen erreicht, jedoch schwache Wechselwirkungen nicht erfasst werden können. Dieser Stamm eignet sich demnach vorwiegend zur Untersuchung einer direkten Interaktion zweier gegebener Proteine. Eine genaue

Beschreibung der Unterschiede der Konstrukte findet sich in Tabelle 2.1 wieder.

Tab. 2.1: Komponenten des MATCHMAKER GAL4 Two Hybrid System 2 von BD Biosciences. Angegeben sind die verwendeten Vektoren, mit ihren Selektionsmarkern für Transformantenwachstum auf Minimalmedium und ihr Anwendungsbereich, bzw. Eigenschaften. *TRP1* = codiert für 1. Enzym aus Tryptophanstoffwechselweg. *LEU2* = codiert für 2. Enzym aus Leucinstoffwechselweg. *HIS3* = codiert für 3. Enzym aus Histidinstoffwechselweg. Weiter die verwendeten Hefestämme mit ihren jeweiligen fest im Genom integrierten Promotor-Reporterkonstrukten und ihren Expressonsleveln. UAS = upstream activating sequences, Erkennungssequenz für GAL4; MP = Minimalpromotor, Regulation des Expressionslevels; $UAS_{G\ 17mer}$ = Synthetisch hergestellte Consensus Sequenz aus nativem UAS; *CYC1* = Cytochrom C1; Expression ++ = sehr starkes Promotorkonstrukt, sehr hoher Expressionlevel bei GAL4 Aktivierung; + = im Verhältnis zu ++ deutlich geringer; - + = im Verhältnis sehr gering.

Vektoren des GAL4 Zwei-Hybrid-Systems

	Selektion	Anwendung/Eigenschaften
Klonierungsvektoren		
pAS2-1	***TRP1***	**Generierung eines Fusionsproteins aus Bait Protein und GAL4 Bindedomäne (DNA-BD)**
pACT2	***LEU2***	**Generierung eines Fusionsproteins aus bekanntem Protein oder Kollektion unbekannter Proteine und GAL4 Aktivierungsdomäne (AD)**
Kontrollvektoren		
pCL1	***LEU2***	**Codiert natives GAL4 Protein, das die Expression der Reportergene einleitet; Positivkontrolle ß-Gal-Assay**
pVA3-1	***TRP1***	**Codiert für DNA-BD/murines p53 Fusionsprotein**
pTD1-1	***LEU2***	**Codiert für AD/SV40 T-Antigen Fusionsprotein**
Interaktion		
pVA3-1 + pTD1-1	***TRP1, LEU2***	**Positivkontrolle für interagierende Proteine, *HIS3***
pAS2-1 + AD-Library	***TRP1, LEU2***	**Negativkontrolle nicht-interagierender Proteine, *HIS3*, ß-Gal-Assay**
BD-Bait + pACT1	***TRP1, LEU1***	**Negativkontrolle nicht-interagierender Proteine, *HIS3*, ß-Gal-Assay**

Hefestämme des GAL4 Zwei-Hybrid-Systems

Stamm	Reportergen	UAS	MP	Expression
Y190	***HIS3***	**nativer *GAL1* Promotor**	**native *HIS3* TATA Boxen: TR + TC**	**++**
	LacZ	**nativer *GAL1* Promotor**	**native *GAL1* TATA Box**	**+**
CG-1945	***HIS3***	**nativer *GAL1* Promotor**	**native *GAL1* TATA Box**	**+**
	LacZ	**3x $UAS_{G\ 17mer}$**	**native *CYC1* TATA Box**	**- +**

Kontrollvektoren

Alle mitgelieferten Kontrollplasmide wurden in *E. coli* vermehrt, daraus isoliert und in *Saccharomyces cerevisiae* transformiert. Soweit möglich, wurden sie zusätzlich, bei jedem Schritt der Durchführung des 2-Hybrid-Assays, auf den erforderlichen Minimalagarplatten inkubiert. Somit konnte eine Wertung der jeweilig erhaltenen Ergebnisse bei den verschiedenen Selektionsschritten stattfinden. Die einzelne Beschreibung der Kontrollplasmide findet sich ebenfalls in Tabelle 2.1.

2.2.3.1.2 2-Hybrid-Assay relevante Methoden

2.2.3.1.2.1 Transformation von Hefen

Die Transformation der jeweiligen Plasmidkonstrukte erfolgte chemisch nach der von Ito et al. (1983) vorgestellten und nach Gietz et al. (1992) modifizierten Lithiumacetat-Methode. Sie wurde nach Abhängigkeit der einzusetzenden Mengen von Zellen, bzw. DNA in unterschiedlichen Ansätzen mit Hilfe des „YEASTMAKER^{TM} Yeast Transformation System“ von BD Biosciences realisiert. Die „small-scale Transformation“ diente zur Transformation einer Plasmidart in einen Hefestamm, wohingegen die „large-scale Methode“ nur beim Screenen der cDNA Bank Verwendung fand. Im folgenden wird die small-scale Methode besprochen und die large-scale, die analog verläuft, nur mit Mengenangaben in Klammer erwähnt.

2.2.3.1.2.1.1 Herstellung kompetenter Hefezellen für die Transformation

Vor der eigentlichen Transformation mussten die Hefezellen aufnahmefähig für die jeweiligen Plasmide gemacht werden. Für die Vorkultur verwendete man frische, maximal vier Woche alte, auf Platte ausgestrichene 2-3mm große Hefeeinzelkolonien. Diese wurden mit wenig Medium durch Vortexen in Lösung gebracht und in 25ml Medium (YPD-Vollmedium bei Hefen, bei Zweittransformation entsprechendes SD-Minimalmedium der Transformanten) aufgenommen. Nach Wachstum über Nacht bei 30°C erfolgte die Überimpfung der Kultur in 300ml frisches Medium bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,2 – 0,3. Unter Schütteln mit 230-250rpm wurden die Zellen bei 30°C für ca. 3h bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei einem OD_{600}-Wert von 0,4-0,6 inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur mit 1000g für 5min abzentrifugiert. Danach wurden das Zellpellet in 25–50ml Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Endauf-

nahme des Pellets erfolgte in 1,5ml frisch angesetztem 1x TE/1x LiAc. Diese Menge an kompetenten Hefezellen reichte für ca. 15 small-scale und einer large-scale Anwendung und wurde je nach Bedarf verkleinert, bzw. vergrößert. Die Zellen mussten immer frisch, maximal 2 Stunden vor der Transformation präpariert werden, da ansonsten die Transformationseffizienz deutlich herabgesetzt war.

2.2.3.1.2.1.2 Transformation kompetenter Hefezellen

Für die Transformation wurden 0,1µg (10–50µg bei large-scale) Plasmid-DNA mit 0,1mg (2mg) denaturierter Heringssperma-DNA vermengt und mit 100µl (1ml) kompetenten Hefezellen durch kurzes Vortexen vermischt. Nach Zugabe von 600µl (6ml) PEG/LiAc (Polyethylen Glykol/Lithium Acetat) Lösung und Vortexen für 10sec, wurden die Transformationslösung für 30min bei 30°C unter Schütteln mit 200rpm inkubiert. Die Aufnahme der Plasmide wurde durch Zugabe von DMSO, mit einer Endkonzentration von 10%, vorsichtigem Mischen und Hitzeschockinkubation für 15min bei 42°C im Wasserbad erreicht. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die transformierten Zellen für 5sec bei 14000rpm (5min bei 1000g) abzentrifugiert, das Zellpellet in 1,5ml (10ml) 1x TE Puffer resuspendiert und davon jeweils 100µl (250µl) auf entsprechende Minimalagarplatten (80, bzw. 200mm Durchmesser) ausplattiert. Das Wachstum bei 30°C war nach 3-4 Tagen mit einer Transformationseffizienz von 10^5 Kolonien pro µg DNA zu erwarten, wobei Doppeltransformanten annähernd eine Woche benötigten.

2.2.3.1.2.2 Isolation von Plasmiden aus Hefen

Positiv getestete Transformanten wurden durch Isolation der jeweiligen Plasmide aus den Hefen nach einem abgeänderten Schema von Hoffman et al. (1987) näher charakterisiert. Dazu verwendete man ein Eppendorfgefäß mit 50µl Lysispuffer, gab eine 3-4 Tage alte Einzelhefekolonie hinzu und vermischte das Ganze durch Vortexen. Danach versetzte man die Lösung mit 50µl TE-gesättigter Phenol : Chloroform Lösung und 0,1g Glass-Beads. Mit diesen erreichte man durch ein 2-minütiges Vortexen einen mechanischen Aufschluss der Hefezellen und die anschließende Zentrifugation für 5min bei 14000rpm sorgte für eine Phasentrennung. Somit war es möglich, eine Abtrennung der plasmidhaltigen wässrigen Phase von Zelltrümmern und Proteinen durchzuführen. Diese wiederum wurde mit Chloroform : Isoamylalkohol versetzt und damit Reste von Phenol

ausgeschüttelt, wobei sich hier die Plasmid-DNA ebenfalls in der wässrigen Phase befand. Nach einer anschließenden Ethanolfällung konnte die Plasmid-DNA in 10µl Wasser aufgenommen werden. Durch Transformation in *E. coli* konnten die Plasmide vermehrt und nach der Isolation durch Sequenzierung charakterisiert werden.

2.2.3.1.2.3 Nachweis der *lacZ* Expression über den ß-Galactosidase Assay (ß-Gal-Assay, Colony-lift filter Assay)

Die Initiation der Expression des *lacZ* Gens, vermittelt durch zwei interagierende Proteine innerhalb des Hybrid-Systems, konnte durch den ß-Galactosidase Assay nachgewiesen werden. Dabei kommt es durch die vermittelte Expression, zur Anwesenheit des Enzyms ß-Galactosidase, welches in der Lage ist, den Farbstoff X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indol-ß-D-Galactosid) in die tiefblaue Verbindung 3-Brom-4-Chlor-Indigo zu spalten. Somit erscheinen positive Klone des 2-Hybrid-System blau und negative Hefeklone bleiben weiß.
Für den Versuchsablauf wurde eine Petrischale mit einer Größe entsprechend der zu untersuchenden Hefeplatte vorbereitet. Dazu legte man einen Whatman-Rundfilter hinein und befeuchtete ihn mit frisch angesetztem Z-Puffer/X-GAL so, dass der Filter luftblasenfrei in der Schale lag und vollständig durchtränkt war. Danach wurde ein weiterer, zuvor auf einer sterilen Platte leicht angefeuchteter Filter auf die maximal 4 Tage alten Hefekulturen luftblasenfrei aufgelegt, nach dessen Vollsaugen abgenommen und mit der Kolonieseite nach oben für mindestens 10sec in Flüssigstickstoff eingefroren. Bei der Abnahme des Filters von der Hefeplatte, war auf eine Orientierungshilfe für die spätere Identifikation der Klone zu achten. Nach dem Auftauen des Filters bei Raumtemperatur, wurde er auf den vorbereiteten feuchten Filter in der Petrischale gelegt und bei 30°C für 1–8h inkubiert. Von einer längeren Inkubationszeit war abzusehen, da ansonsten auch negative Transformanten ohne vermittelte *lacZ* Expression im Assay positiv reagierten. Nur deutlich blaue, positive Transformanten wurden in weiteren Versuchen eingesetzt.

2.2.3.1.3 Durchführung des 2-Hybrid-Systems

Vorversuche:

Durch die Konstruktion des *his3*-Reporterkonstrukts beim Hefestamm Y190 trat bei einer Doppeltransformation immer eine konstitutive Expression des *his3* Gens auf. Zur Benutzung des *his3* Selektionsmarker musste dieser Selbstaktivierung durch Zugabe geeigneter Mengen an 3-Aminotriazol (3-AT) zum Medium entgegengewirkt werden. 3-AT ist ein konkurrierender Inhibitor zum Hefe HIS3 Protein, der das Background-Wachstum auf SD Minimalmedium ohne Histidin unterdrückt. Zur Bestimmung der benötigten 3-AT Konzentration wurde das BD-Bait-Plasmid in Y190 transformiert und auf Minimalmedium SD/-Trp/-His/+3AT selektioniert. Dabei wurden 3-AT-Konzentrationen von 2mM bis 60mM (2, 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45, 55 und 60mM) getestet. Als geeignete Konzentration wurde diejenige ausgewählt, bei der gerade keine Hefekolonien mehr auf SD/-Trp/-His/+3-AT gebildet wurden. Diese Konzentration wurde dann für weitere Untersuchungen, sowie für den großen Assay eingesetzt.

Als weiterer Vorversuch zum 2-Hybrid-Assay war die Bestimmung der Transformationeffizienz nötig, um später eine geeignete Menge an AD-Library-DNA, welche die gesamte Bank repräsentieren würde, einsetzen zu können. Dazu wurde zu einer Hefekolonie mit BD-Bait-Plasmid 5,4µg AD-Library-DNA transformiert. Die Hefelösung wurde in einer Verdünnungsreihe von 1, 1:10, 1:100, 1:1000 zu je 100µl auf SD/-Trp/-Leu Agarplatten ausgestrichen. Nach 8 Tagen Inkubation wurden die Doppeltransformanten ausgezählt und mit der Anzahl die Transformationseffizienz berechnet. Durch diese ergab sich die einzusetzende AD-Library-DNA Menge.

Berechnung:

$$\frac{\text{gezählte Kolonien x Gesamtvolumen der Suspension (µl)}}{\text{ausplattiertes Volumen (µl) x Verdünnungsfaktor x DNA-Menge (µg)}} = \text{Koloniemenge cfu/µg DNA}$$

Hauptversuch:

Für die Identifikation putativer Interaktionspartner des BD-Bait Proteins wurde BD-Bait-Plasmidlösung in den Hefestamm Y190 in einem small-scale Ansatz, entsprechend 2.2.3.1.2 transformiert und auf SD/-Trp selektioniert. Mit einer Einzelkolonie erfolgte eine Zweittransformation nach dem large-scale Ansatz mit der zuvor berechnenden Menge an AD-Library-DNA der cDNA-Bank. Als Kontrolle wurde bei der Zweittransformation anstatt der AD-Library-DNA, das AD-Ausgangs-

plasmid pACT2 verwendet. Folgend im Text sind die einzelnen Selektionsschritte dargestellt, die auch zusammenfassend schematisch in Abb. 2.2 aufgeführt sind.

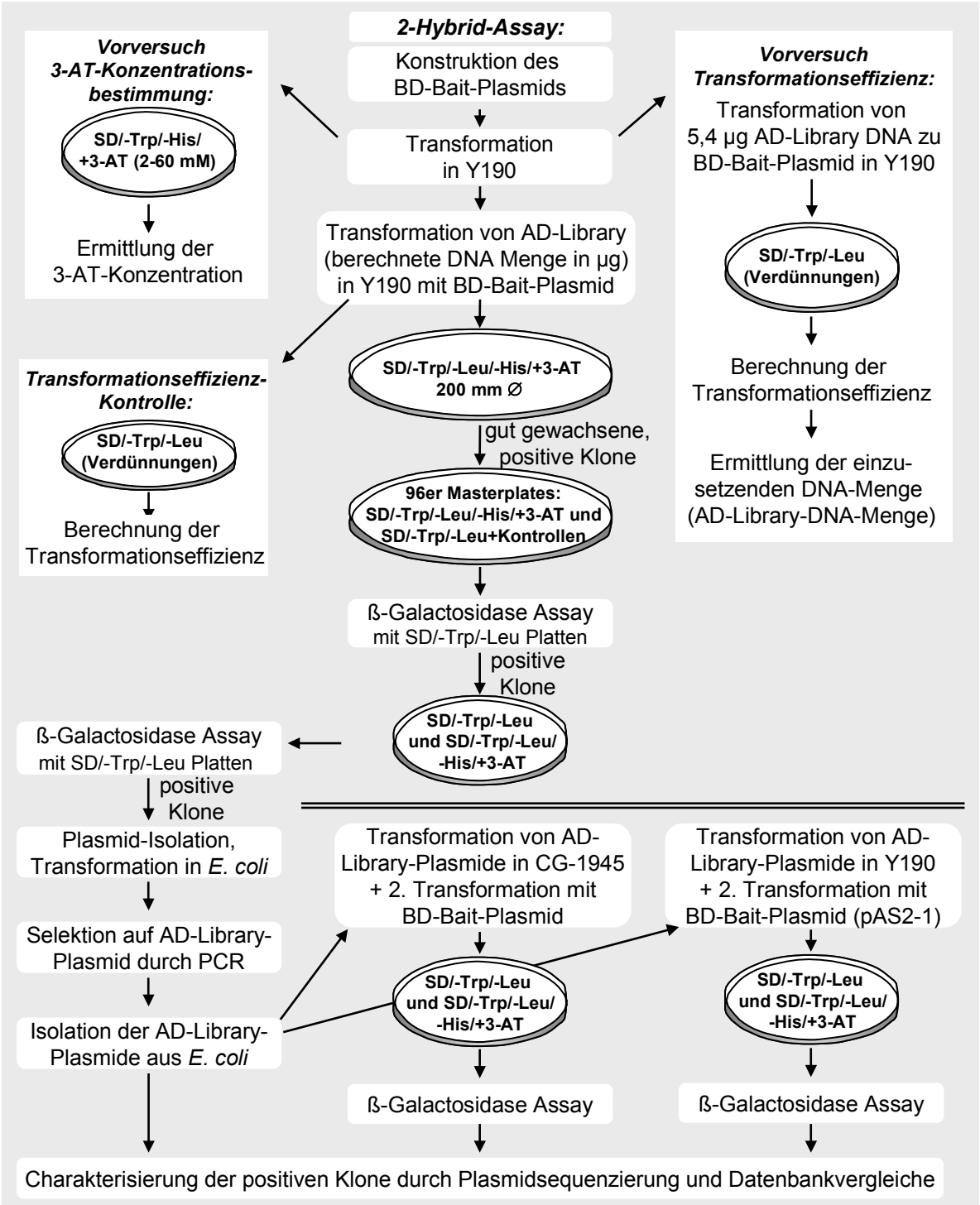


Abb. 2.2: Schematische Zusammenfassung der Vorgehensweise im durchgeführten 2-Hybrid-System. Transformanten wurden jeweils auf Selektionsmedien inkubiert. SD/ = Minimalagarplatten ohne bezeichnete Aminosäuren. Medien mit Histidin für *lacZ* Selektion durch ß-Galactosidase-Assay; Medien ohne Histidin für *his3* Selektion. BD-Bait-Plasmid = Konstrukt aus dem zu untersuchende Gen und pAS2-1 Vektor, der die Sequenz der Bindedomäne BD des GAL4 Proteins besitzt. AD-Library = cDNA-Bank kloniert in Aktivierungsdomänenvektor pACT2. Y190 und CG-1945 = 2-Hybrid-Hefestämme. 3-AT = 3-Amino-Triazol.

1. Selektionsschritt

Die resultierenden Doppeltransformanten wurden auf SD/-Trp/-Leu/-His/+3-AT Agarplatten (200mm ∅) bei 30°C inkubiert. Nur bei positiver Interaktion des BD-Bait Proteins mit einem AD-Library Protein, konnte ein Wachstum der Hefeklone auf diesem Minimalmedium erfolgen. Es wurden nur diejenigen Klone auf neue SD/-Trp/-Leu/-His/+3-AT Masterplatten in 96 Rastern überimpft, welche deutliche, große Kolonien gebildet hatten. Das Raster diente zur späteren Identifikation positiver Doppeltransformanten. Zusätzlich wurde die selben Klone in identischen Rasterpositionen auf SD/-Trp/-Leu übertragen und zusätzlich auf beide Plattenarten Kontrolltransformanten für die spätere Identifikation positiver Hefeklone inkubiert. Die SD/-Trp/-Leu/-His/+3-AT Masterplatten dienten zur Selektion mit Hilfe des *HIS3* Markers. Hier konnten nur Doppeltransformanten wachsen, die beide, BD-Bait- und AD-Library-Plasmide besaßen. Ferner musste sich eine Wechselwirkung der daraus resultierenden Hybridproteine einstellen, wodurch es zur Expression des *his3* Gens kommt und Wachstum auf SD-Minimalmedium ohne Histidin (-His) stattfinden konnte.

2. Selektionsschritt

Die im ersten Schritt hergestellten SD/-Trp/-Leu Masterplatten wurden zur Selektion über den *lacZ* Marker mittels eines ß-Gal-Assays herangezogen. Die eindeutig blau werdenden Doppeltransformanten wurden auf neuen SD/-Trp/-Leu/-His/+3-AT Platten (80mm ∅) inkubiert und mit einem erneuten ß-Gal-Assay auf positive Interaktion der beiden Hybridproteine getestet. Aus den bis zu diesem Schritt verbliebenen Klonen wurden die enthaltenen Plasmide isoliert. Da die Hefetransformanten sowohl das BD-Bait-, als auch das AD-Library-Plasmid enthielten, wurde die Plasmidlösung in *E. coli* YM109 transformiert. Mittels Pick-PCR wurden *E. coli* Klone mit AD-Library selektioniert und die Insertlängen dieser Hybridplasmide bestimmt. Durch die Möglichkeit, dass Hefetransformanten mehrere AD-Library Plasmide enthalten können, wurden mindestens 50 *E. coli* Klone, die aus einem Hefeklon stammten, betrachtet.

3. Selektionsschritt

Die weitere Selektion sollte nun über umgedrehte Transformationsschritte erfolgen. Dies bedeutet, dass zuerst das AD-Library-Plasmid, isoliert aus *E. coli*, transformiert und danach das BD-Bait-Plasmid durch eine Zweittransformation

hinzugefügt wurde. Somit war auszuschließen, dass mehrere, unterschiedliche AD-Library-Plasmide in einem Hefeklon vorhanden sind und die Interaktion speziell für ein entstehendes Hybridprotein mit dem BD-Bait-Protein überprüft wurde. Als Kontrolle wurde bei der Zweittransformation anstatt des BD-Bait-Plasmids, das BD-Ausgangsplasmid pAS2-1 verwendet. Die Erst- und Zweittransformationen wurden wiederum mit dem Hefestamm Y190 durchgeführt. Die Doppelmutanten wurden auf SD/-Trp/-Leu/-His/+3-AT und auf SD/-Trp/-Leu inkubiert. Hier konnte erneut die Expression des *his3* Gens, durch Wachstum der Klone auf Minimalmedium ohne Histidin und die Expression des *lacZ* Gens, mit Hilfe des ß-GAL-Assays, überprüft werden.

4. Selektionsschritt

Der vierte Schritt wurde analog zum dritten durchgeführt, jedoch mit dem Hefestamm CG-1945. Durch die Reporterkonstrukte dieses Stamms war eine konstitutive Expression *his3* Gens auszuschließen und die Zugabe von 3-AT zum Medium war nicht nötig. Hierdurch konnten zwar schwache Wechselwirkungen nicht erfasst werden, jedoch lieferten die Untersuchungen sehr verlässliche Ergebnisse.

Die in diesen Schritten selektionierten AD-Library-Plasmide wurden mittels Sequenzierung und Datenbankvergleiche charakterisiert. Für ihre entstehenden Hybridproteine konnte eine Wechselwirkung mit dem Bait Protein angenommen werden. Die einzelnen Schritte sollen einen Überblick über die Vorgehensweise schaffen. Sie wurden jedoch, je nach anfallenden Ergebnissen, weiter modifiziert. Abweichende Änderungen finden sich im Ergebnisteil separat genauer geschildert.

2.2.3.2 Glutathion-*S*-Transferase (GST) - Pulldown Assay

Der von Zhang et al. (1994) beschriebene GST-Pulldown Assay ist eine experimentelle Vorgehensweise, um direkt Protein-Protein Interaktionen *in vitro* nachzuweisen, wobei unterschiedliche Systeme der Proteinsynthese in Kombination zur Anwendung gelangen. Ein putativer Proteinpartner wird mittels des von Pelham et al. (1976) erstmals beschriebene *in vitro* Transkriptions/ Translations Systems hergestellt, welches modifiziert als Kit zu beziehen ist. Innerhalb dieser Arbeit kam das „TNT®T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ von Promega zum Einsatz, das alle notwendigen Komponenten für die

Proteinsynthese (Kaninchen-Reticulozyten-Lysat, tRNAs, Ribosomen, Enzyme, etc.) beinhaltet. Der zweite mögliche Interaktionspartner wird als Fusionspartner der Glutathion-*S*-Transferase (GST) in *E. coli* synthetisiert und über Glutathion Sepharose chromatographisch aufgereinigt. Die benötigten Komponenten für dieses nach Smith et al. (1988) entwickelte und mehrfach modifizierte System sind ebenfalls käuflich beziehbar. Hier kam das „GST Gene Fusion System“ von Amersham Biosciences zur Anwendung. Das Prinzip des GST-Pulldowns besteht darin, diese zwei separat hergestellten Proteinkomponenten in einem Assay zu verbinden und somit vorhandene Wechselwirkungen nachzuweisen. Die Interaktion lässt sich durch Inkubation des *in vitro* hergestellten Proteins 1 mit dem, an die Glutathion Sepharose gekoppelten Fusionsprotein GST-Protein 2 detektieren. Kommt es zu einer Wechselwirkung, befindet sich Protein 1 am gekoppelten GST-Fusionsprotein und nach Entfernung aller ungebunden Proteine, kann dieser Gesamtkomplex aus der Glutathion Sepharose isoliert werden. Die Einzelkomponenten können dann mit geeigneten Methoden wie Autoradiographie oder SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung nachgewiesen werden. Besteht keine Interaktionstendenz der zwei zu untersuchenden Proteine, wird das ungebundene Protein 1 bereits bei den Waschritten entfernt und nur das GST-Hybridprotein 2 kann später isoliert und detektiert werden.

2.2.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Die SDS-PAGE wurde nach der diskontinuierlichen Methode von Laemmli et al. (1970) durchgeführt. Dabei setzten sich die Gele aus jeweils zwei Komponenten zusammen, dem 4%igen Sammelgel und dem höherprozentigen, nach der Größe des Proteins zu wählenden Trenngel. Die vertikale Gel-Apparatur bestand aus 2 Glasplatten, welche durch 2-5mm dicken Spacer voneinander getrennt waren, einem Taschenkamm gleicher Stärke, dazu gehörigen Klammern zur Verankerung und einer Pufferkammer, die mit dem Netzgerät verbunden werden konnte. Die Gelkomponenten wurden wie folgt zusammengesetzt und bearbeitet:

Trenngel (8%, 5mm):	6,66ml	Acrylamid 30%	
	2,7ml	Bisacrylamid 2%	
	6,25ml	Trenngelpuffer	
	125µl	SDS 20%	
	250µl	APS 10%	
	25µl	TEMED	ad 25ml H_2O

Die Zusammensetzungen andersprozentiger Gele ließen sich aus dem Verhältnis Bisacrylamid : Acrylamid = 1 : 37,5 berechnen.
Die einzelnen Komponenten wurden vermischt, in die vorbereitete Kammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, konnte der Alkohol abgegossen, das Sammelgel hinzu gefügt und der entsprechende Kamm in das Gel eingeführt werden.

Sammelgel (4%, 5mm):	530µl	Acrylamid 30%	
	270µl	Bisacrylamid 2%	
	630µl	Sammelgelpuffer	
	25µl	SDS 20%	
	50µl	APS 10%	
	5µl	TEMED	ad 5ml H_2O

Nach dem Auspolymerisieren konnte das Gel in die mit 1x Elektrodenpuffer versetzte Kammer eingesetzt und mit den vorbehandelten Proben bestückt werden. Letztere, sowie Proteinstandards wurden vor dem Auftragen mit Proteinladepuffer gemischt und bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte für ca. 30min bei 20mA und sobald die Proteine das Trenngel ereichten, konnte die eigentliche Auftrennung bei 30-40mA durchgeführt werden. Anschließend wurde das Gel vorsichtig von den Platten getrennt und in einer Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schwenken für ca. 30min eingefärbt. Danach wurde das Gel in eine Entfärbelösung gegeben, um die vorhanden Farbe aus Gelteilen ohne Protein wieder zu entfernen und somit eine Visualisierung von Proteinbanden zu erreichen. Die Gele konnten in einer 10% Glycerin / 10% Essigsäure-Lösung in Plastikfolie eingeschweißt aufbewahrt werden.

2.2.3.2.2 Herstellung radioaktiv markierter Proteine durch i*n vitro*-Transkription/Translation

Für die Synthese radioaktiver Proteine durch *in vitro* Transkription/Translation wurden PCR-Produkte aus den zu untersuchenden Genen hergestellt. Dabei verwendete man Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit einer beliebigen 6 bp Sequenz als Nucleaseschutz und einer T7-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz bestückt waren. Durch die zusätzlichen Nucleotide am 5'-Ende wurde ein optimale Funktion der Polymerase gewährleistet (vgl. 2.1.8). Des weiteren musste bei der Wahl der Oligonucleotide gewährleistet sein, dass im PCR-Fragment upstream ein Translationstartcodon vorhanden war und bei der Amplifikation der offene

Leserahmen intakt blieb. Die Proteinsynthese erfolgte nach Herstellerangaben in einem 50µl Ansatz mit 400-500ng PCR-Produkt und 20µCi [^{35}S]-Methionin bei 37°C für 90min. Nach der Reaktion wurden die gewonnen Proteine von freien, nicht-inkorporierten Aminosäuren mittels Aufreinigung über eine MicroSpin Columns S200 getrennt. Dazu wurde die Säulenmatrix durch Vortexen resuspendiert und bei 735g für eine Minute abzentrifugiert. Folgend wurde die mit 50µl Wasser versetzte Protein-Lösung auf die Säule geben, für 2min bei 735 g zentrifugiert und das Protein-Eluat in einem neuen Gefäß aufgefangen. Vor dem Einsetzen dieses Eluats in den Pulldown-Assay, wurde eine erfolgreiche Herstellung des Proteins in einer SDS-PAGE überprüft.

2.2.3.2.3 Das Glutathion-*S*-Transferase Gen Fusionssystem

Das Glutathion-*S*-Transferase (GST) Gen Fusionssystem ist ein vielseitiges System zur Expression, Aufreinigung und Detektion von in *E. coli* produzierten Fusionsproteinen. Es basiert auf einer induzierbaren, high-level Expression von Genen, bzw. Genfragmenten fusioniert mit dem *GST* Gen von *Schistosoma japonicum.* In *E. coli* kommt es zur Produktion eines Fusionsproteins, das sich im Zellcytoplasma akkumuliert und ausgestattet ist mit GST am Aminoterminus und dem zu untersuchenden Protein am Carboxyterminus. Die Fusions-GST besitzt Nachgewiesenerweise ihre vollständige Enzymaktivität und kann aus dem Bakterienlysat mit Hilfe der Affinitätschromatographie unter Benutzung immobilisierten Glutathions isoliert werden.

2.2.3.2.3.1 Komponenten des GST Gen Fusions System

Alle benutzten Komponenten bis auf den Bakterienstamm BL21 von Stratagene wurden von Amersham Biosciences bezogen.

2.2.3.2.3.1.1 Expressionsvektor pGEX und Insert-DNA

Die Expression des Fusionsgens im verwendeten Vektor pGEX-6P-1 (AccNo. U78872) steht unter der Kontrolle des *tac* Promotors, der durch das Laktose-Analogon IPTG induzierbar wird. Der Vektor ist zusätzlich ausgestattet mit einem internen *lacI*^{q} Gen, dessen Genprodukt als Repressorprotein an die Operator Region des *tac* Promotors bindet und somit eine Expression ohne IPTG verhindert. Die MCS befindet sich am Anschluss an den offenen Leserahmen des

GST Gens, womit nach Einfügen eines Genfragments und einer induzierten Expression, ein Fusionsprotein mit GST am Aminoterminus entsteht. Des weiteren ist das Plasmid so konstruiert, dass im Fusionsprotein eine PreScission Protease Erkennungsschnittstelle entsteht, wodurch das GST Protein mit seinem Molekulargewicht M_r von 26kDa vom zu untersuchenden Protein abgetrennt werden kann. Für die Selektion in *E. coli* trägt der Vektor außerdem das ß-lactamase (Amp^r) Gen. Für die Konstruktion des Fusionsplasmids war darauf zu achten, dass der offene Leserahmen des GST-Gens über die eingefügte DNA hinweg bestehen bleibt.

2.2.3.2.3.1.2 Expressionsstamm *E. coli* BL21

Für die Klonierung und Expression wurde der *E. coli* Stamm BL21 herangezogen, der für die cytoplasmatischen Protease-Genprodukte OmpT und Lon defizient ist. Dadurch werden Effekte von proteolytischer Degradation durch den Wirt selber vermindert. Zusätzlich zeigt er hohe Expressionslevels von GST Fusionsproteinen.

2.2.3.2.3.1.3 Glutathion Sepharose 4B

Zur Aufreinigung des GST Fusionsproteins aus dem Bakterienlysat wurde immobilisiertes Glutathion verwendet, das an eine Matrix (Sepharose) gebunden vorlag. Das Glutathion, ein Tripeptid mit Sulfhydrylgruppe, besitzt eine Struktur, die komplementär zur Bindungsstelle der Glutathion-*S*-Transferase ist, wodurch das GST-Fusionsprotein an diesen Liganden andocken kann. Seine Kapazität beträgt ca. 8mg rekombinantes GST pro ml Matrix, wobei die Ausbeute je nach Art des Fusionsproteins stark variieren kann. Die Elution des rekombinanten Proteins aus der Matrix wurde mit reduziertem Glutathion durchgeführt. Die Verwendung der Glutathion-Sepharose wurde nach der „Batch-Methode“ laut Herstellerangaben gehandhabt.

2.2.3.2.3.2 Herstellung und Isolierung des GST- Fusionsproteins

Für das GST-Fusionsprotein System wurde zuerst der Vektor pGEX-6P-1 in *E. coli* vervielfältigt, daraus isoliert und mit dem Restriktiosenzym *Sma*I geschnitten. Nach einer Gelisolation und anschließender Dephosphorylierung konnte der behandelte Vektor mit einer Konzentration von 100ng in die folgende Ligation eingesetzt werden. Das einzufügende Genfragment wurde über PCR mit proof-

reading Funktion hergestellt, wobei die Oligonucleotide so gewählt wurden, dass nach der Integration in den Vektor ein offener Leserahmen über beide Gene hinweg bestehen blieb. Danach erfolgte die Transformation in *E. coli* BL21 mittels Elektroporation und anschließender Selektion auf LB/Amp$^+$ Agarplatten. Durch Pick-PCR wurden verschiedene Klone überprüft und durch Sequenzierung auf ihren intakten offenen Leserahmen hin untersucht.

Für die Induktion wurden überprüfte Bakterienklone mit Fusionsplasmid, sowie Klone mit dem Ausgangsplasmid pGEX-6P-1 in je 5ml LB/Amp$^+$ Medium über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag in je 200ml frisches LB/Amp$^+$ Medium überführt. Des weiteren wurde eine zusätzliche 5ml Kultur angesetzt, die als Negativinduktionskontrolle ohne IPTG fungieren sollte. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von ca. 0,6 wurden die 200ml Kulturen mit 0,1 mM IPTG versetzt und alle Kulturen bei 18–20 °C im leicht schüttelnden Wasserbad über Nacht (ca. 20h) inkubiert. Die erfolgte Induktion wurde über ein SDS-PAGE überprüft. Dazu wurden jeweils 1ml Kulturen abgenommen, mit 14000rpm abzentrifugiert und die Bakterienpellets mit 50µl 1x Proteinladepuffer resuspendiert. Nach einer Denaturierung konnten die Proteinlösungen auf ein SDS-Gel aufgetragen werden. Anschließend an die Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie blue Färbung sichtbar gemacht, wobei eine erfolgreiche Induktion durch abwechselndes Auftragen nichtinduziert/ induziert überprüft wurde. Als weitere Induktionskontrolle diente die ebenfalls induzierte BL 21 Kultur mit Orginalvektor, da diese in jedem Falle das GST Protein synthetisiert haben musste. Die restliche Bakterienkultur konnte währenddessen in vier 50ml Falcon-Gefäßen bei 3000rpm für 5min abzentrifugiert, jeweils das Zellpellet in 5ml 1x PBS resupendiert und vereinigt werden. Nach erneuter Zentrifugation konnten die Pellets bis zur Aufarbeitung bei –70°C aufbewahrt werden.

Isolations-Methode I

Nach dem Auftauen wurde die Zellpellets mit je 10ml TX-LB (+Lysozym) versetzt, darin resuspendiert und bei RT für 1h durch Kopf-über-Kopf Rotation inkubiert. Vor einer Ultraschallbehandlung mussten die Lösungen auf Eis abgekühlt werden, um einer Denaturierung der Proteine vorzubeugen. Die anschließende Behandlung erfolgte jeweils in vier Schritten drei mal nacheinander: Ultraschall – Einfrieren mit Flüssigstickstoff – Auftauen im 37°C Wassebad – Abkühlen auf Eis. Hierbei wurde ein Ultraschall-Impuls von 20sec Länge eingesetzt. Jedoch sollte darauf geachtet

werden, dass es beim Beschallen zu keiner Schaumbildung kommt, wodurch ebenfalls, wie bei einer Hitzeentwicklung, die Proteine denaturiert werden. Durch diese Art der Behandlung sollten die Bakterienzellwände aufgeschlossen werden und die Proteine frei in Lösung vorliegen. Die Protein-Lösungen wurden durch Zentrifugation mit 500g für 5min und anschließender Filtration (0,8µm Porengröße) des Überstandes, von anfallenden Zelltrümmern befreit. Die abzentrifugierten Reste wurden für Methode II bis zur Benutzung bei –70°C gelagert. Die erhaltene klaren Protein-Lösungen wurde zu je 1ml voräquilibrierter Glutathion-Sepharose gegeben, durchmischt und bei RT unter Rotation für 30min inkubiert. In dieser Zeit ist es dem Fusionsprotein möglich, an den Glutathion-Liganden zu binden. Um sämtliche ungebundene Bakterienproteine zu eliminieren, wurde anschließend eine Waschprozedur durchgeführt. Dafür wurden die Lösungen mit 500g für 5min abzentrifugiert, der Sepharose Schlamm mit 10ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Diese Prozedur wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde die Sepharose in 1ml 1x PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Gefäß überführt, mit 14000rpm für 10sec zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung des Fusionsproteins aus der Sepharose gelang durch Zugabe von 300µl Tris/HCl + 10mM reduziertem Glutathion (pH8), Inkubation für 20min unter Schütteln, Zentrifugation für 5min bei 1000–1500g und Abnahme des Überstandes. Da anzunehmen war, dass nicht alles gebundenes Fusionsprotein in einem Schritt abgetrennt werden kann, wurde die Isolierung mit reduziertem Glutathion zweimal wiederholt. Eine erfolgreiche Isolierung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Der Fusionsprotein-Gehalt konnte über SDS-PAGE mit Mengen-Referenzen oder nach der Methode von Bradford quantifiziert und die Lysate nach Zugabe von 10% Glycerin und Protease-Inhibitoren eingefroren werden.

Isolations-Methode II

Die zweite Methode zur Proteinisolierung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, da Bakterien Fremdproteine oftmals in sogenannte Inclusion Bodys verpacken, die mit einfachen, nativen Bedingungen schwer aufzubrechen sind. Zum Einsatz kam das denaturierende Guanidin-Hydrochlorid (GnHCl). Zuerst wurden abzentrifugierte Bakterienzelltrümmer aus Methode I mit TEM/GnHCl und 10% Glycerin resuspendiert, anschließend die Glycerin-Menge der Lösungen auf mindestens 75% erhöht und über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Das Detergenz bewirkt in dieser Zeit die Auflösung der Zellwände und auch der

Inclusion Bodys, jedoch kommt es auch zu einer Denaturierung der Proteine. Um letzteres rückgängig zu machen, wurden am nächsten Tag die Lösungen unter Rühren jeweils in eine Pufferlösung mit TEM/NaCl getropft. Durch diese schlagartige Reduktion der Glycerinmenge auf maximal 10% erreichte man teilweise eine Rückfaltung der denaturierten Proteine und somit wieder funktionsfähige Fusionsproteine. Die Isolierung erfolgte ebenfalls, wie in Methode I beschrieben, über Zentrifugation, Filtration und Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose und wurde auch mit SDS-PAGE überprüft.

2.2.4.2.4 Der GST Pulldown Assay

Der direkte Nachweis von Protein-Protein Interaktionen *in vitro* durch den GST Pulldown Assay beruht auf der Kombination der zwei separat hergestellten Proteinkomponenten. Ein putativer Proteinpartner wurde radioaktiv mit Hilfe des *in vitro* Transkriptions/Translations Systems hergestellt, die andere als Fusionsprotein mit GST in *E. coli*. Durch die chromatochraphische Aufreinigungsmöglichkeit des GST-Fusionsproteins, erlaubt eine Wechselwirkung mit der *in vitro* hergestellten Komponente, eine gekoppelte Isolation des gesamten Proteinkomplexes. Die Detektion des aufgereinigten, radioaktiv markierten Proteins wird durch Autoradiographie möglich.

Experimentell wurden erneut GST-Fusionsproteine nach Methode I hergestellt und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Jedoch in diesem Falle, wurden die Proteine nicht aus der Sepharose isoliert, sondern gebunden an die Matrix eingesetzt. Zu je 200µl der Glutathion-Sepharose mit gebundenem GST-Fusionsprotein, das zu untersuchen ist, bzw. mit gebundenem GST Protein als Kontrolle, gab man jeweils 45µl der *in vitro* hergestellten Proteinlösung mit dem putativen Interaktionspartner. Zusätzlich wurden 200µl Bindungspuffer (1x PBS), sowie 10% Glycerin, 0,1% Triton X-100 und je 50µg verschiedener Protease-Inhibitoren (Pepstatin, Aprotinin und Leupeptin) hinzugefügt. Nach Inkubation unter Rotation für 2h bei 4°C wurde die Reaktionslösung für 1min bei 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand verworfen und die Matrix 4x mit 500µl 1x PBS gewaschen. Abschließend wurde der Fusionsproteinkomplex mit 40µl Tris/HCl + 10mM reduziertem Glutathion nach Inkubation für 30min aus der Sepharose isoliert. Dieses Eluat, welches das Fusionsprotein, gekoppelt mit dem *in vitro* hergestellten Protein bei positiver Interaktionstendenz enthalten sollte, wurde mit 7µl Protein-Ladepuffer

versetzt, denaturiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Über Autoradiographie war nun das radioaktiv-markierte Protein nachzuweisen. Im Falle, dass keine Wechselwirkung zwischen den getesteten Proteinen stattfand, befand sich im Eluat ausschließlich das unmarkierte Fusionsprotein und somit war keine Detektion möglich. Als Referenz diente jeweils das aufgereinigte *in vitro* hergestellte Protein und als Negativ-Interaktionskontrolle eine, für jede zu untersuchende Wechselwirkung angesetzte, zusätzliche Probe mit GST Protein.

3. Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil ist in zwei Teile gegliedert. Zum einen, die Weiterführung der Problematik meiner Diplomarbeit (September 1998), die sich mit Vergleichsstudien zwischen *Fugu* und Mensch im *NF1* Gen Lokus beschäftigte. Hierbei wurde das *NF1* Gen von *Fugu rubripes* identifiziert und charakterisiert (Kehrer-Sawatzki et al., 1998) und anschließend flankierende Regionen auf mögliche Gene untersucht. Die Identifikation eines 5' flankierenden Gens, das für die Nemo-like Kinase (Nlk) codiert, wurde in dieser Diplomarbeit beschrieben und nun war die weitere Aufgabe, den Bereich zwischen dem *Nlk* Gen und dem *NF1* Gen von *Fugu* zu analysieren und eventuell weitere Gene zu identifizieren. Des weiteren sollten die orthologen Gene des Menschen charakterisiert und hinsichtlich ihrer genomischen Situation analysiert werden. Hauptaufgabe dabei sollte die Lokalisation der Gene im humanen Genom sein und die Frage, ob diese bei NF1 Deletionspatienten mit dem *NF1* Gen codeletiert sind. Durch die Tatsache, dass die identifizierten Gene bei *Fugu* nicht im humanen *NF1* Lokus lokalisiert waren, umfasst der zweite Teil, Hauptaspekt meiner Dissertation, die Identifizierung und Charakterisierung flankierender Gene des humanen *NF1* Gens. Im Besonderen sollten die Bereiche innerhalb der NF1REPs, die prädestiniert sind für Deletionsereignisse, untersucht werden (Dorschner et al., 2000). Dabei war die Identifizierung, Charakterisierung und funktionelle Analyse eines Gens aus diesem Bereich angestrebt worden, das ursächlich am Phänotyp „mentale Retardierung" von NF1 Patienten mit großen Deletionen beteiligt sein könnte.

3.1. Charakterisierung des *FN5* Gens von *Fugu rubripes* und *Homo sapiens*

3.1.1 Screening von Cosmid Banken und Southern Blot Analysen zur Identifizierung des *FN5* Gens bei *Fugu rubripes*

Mittels Hybridisierungen einer genomischen Cosmidbank von *Fugu rubripes* mit cDNA Sonden aus dem humanen *NF1* Transkript gelang es, 6 verschiedene Cosmid-Klone zu identifizieren, die genomische Anteile der *NF1*-Genregion enthielten (Abb. 3.1). Die Klone E0253Q5 und 108H24 enthielten Exon 1-42, bzw,

Exon 1-46 des *NF1*-Gens von *Fugu rubripes* und zusätzlich jeweils mindestens 12kb 5' flankierende Genomanteile. Innerhalb dieser 12kb Region konnte ich bereits in meiner Diplomarbeit das *Nlk*-Gen lokalisieren. Die Sequenzierung des Bereichs zwischen *Nlk* und *NF1* Gen und Datenbankvergleiche ergaben das Vorhandensein eines weiteren Gens, des *FN5* Gens (flanking the Fugu *NF1* gene in 5' direction). Darauffolgende Kartierungen ergaben die in Abbildung 3.1 dargestellte Genanordnung bei *Fugu rubripes*.

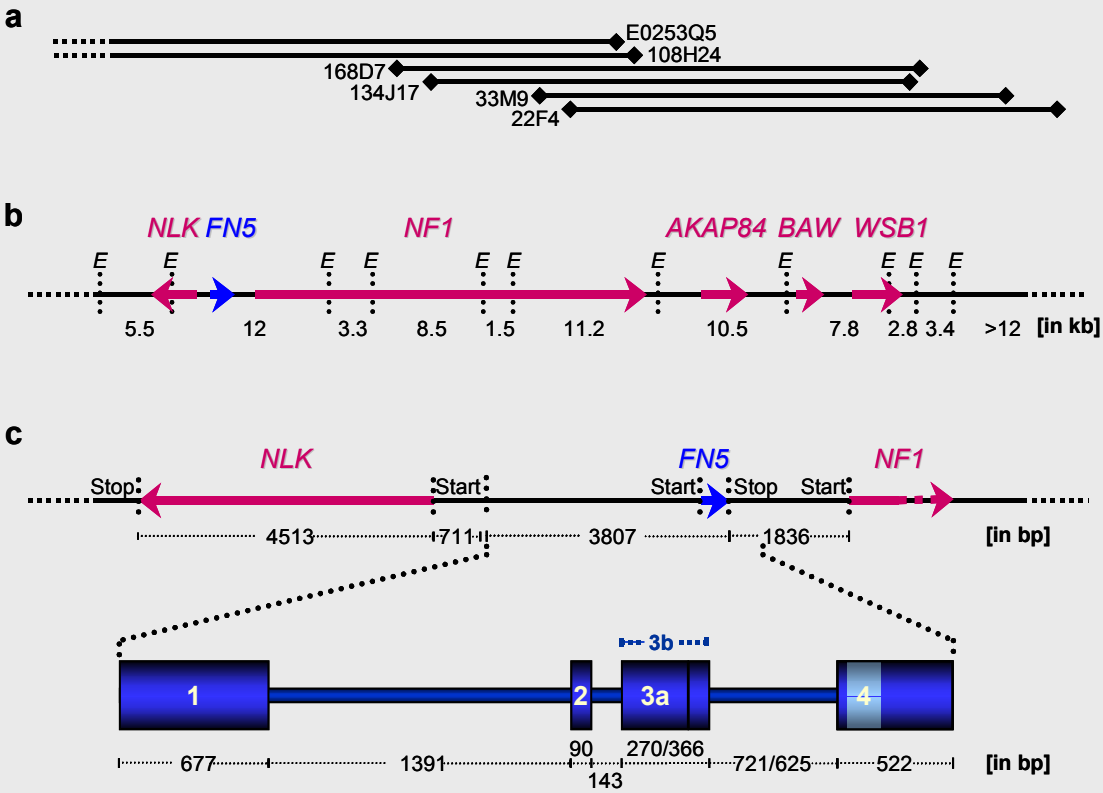


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der *NF1*-Genregion bei *Fugu rubripes.* In ***a*** sind die mittels Hybridisierung ermittelten *NF1*-Cosmide mit ihrer Lage bezüglich der Genregion wiedergegeben. Ebene ***b*** dieser Abbildung verdeutlich die Genanordnung mit den Orientierungen (Pfeile) der einzelnen Gene in der *NF1* Region, kartiert bezüglich den *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen (in kb). In ***c*** ist der *FN5* Genbereich, mit den Orientierungen der einzelnen Gene und die Lage ihrer Start-/Stop-Codons, den Größen und den Abständen zueinander (in bp), herausgegriffen. Des weiteren speziell das *FN5* Gen mit seinen 4 Exons (blaue Kästchen) und dem codierenden Bereich in Exon 4 (hellblauer Balken).

3.1.2 Sequenzcharakterisierung des *FN5* Gens von *Fugu* und Mensch

Sequenzierungen und RACE-Analysen ergaben, dass das *Fugu FN5* Gen sich über 3807bp genomische DNA erstreckt, die selbe Orientierung wie das *NF1* Gen besitzt und 4 Exons umfasst. Es wird in 2 verschiedenen Isoformen exprimiert, die durch alternatives Spleißen in der 5'UTR entstehen (Accession No. AF196775).

Diese 2 Formen mit 1559bp, bzw. 1655bp codieren beide für das selbe Protein mit 59 Aminosäuren. Der Genabstand des *FN5*-Gens zum *NF1*-Gen beläuft sich auf 1836bp, bzw. zum *Nlk*-Gen auf 711bp (Abb. 3.1). Die gesamte genomische Sequenz, welche das *Fugu NF1*, das *Nlk* und das *FN5* Gen enthält, wurde unter der Accession Nummer AF197897 in die NCBI Datenbank eingestellt.
Durch Vergleiche des *Fugu FN5* Transkripts mit der humanen EST-Datenbank des NCBIs, konnten die IMAGE Klone 162853 und 1075321 (Acc. No. h27837 und aa587944), die Teile des orthologen Gens enthielten, identifiziert werden.

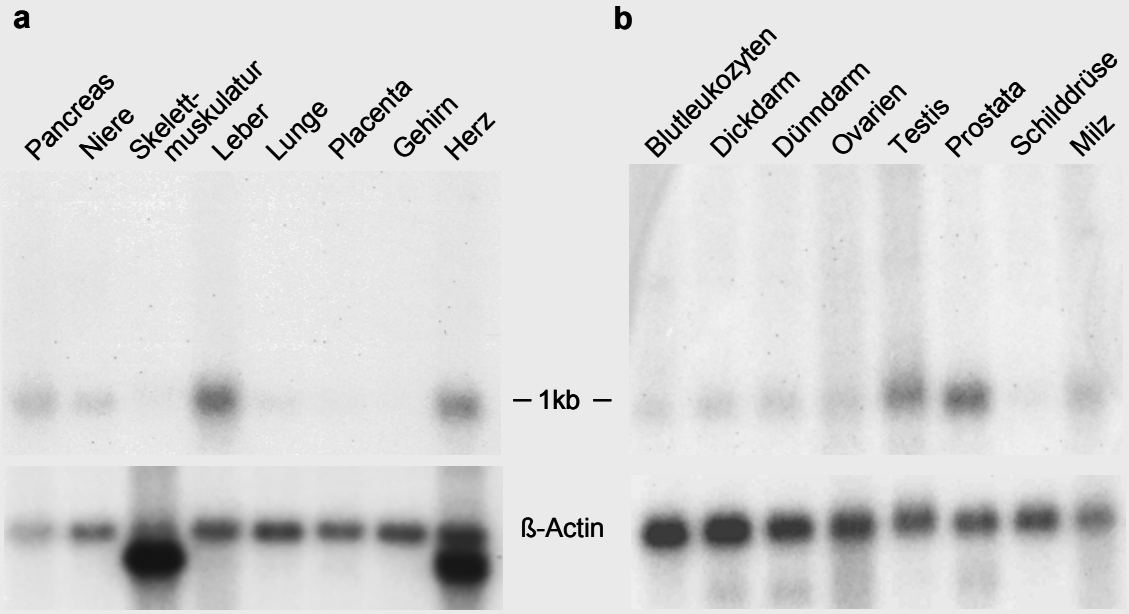


Abb. 3.2: Abschätzung der Expressionseigenschaften des humanen *FN5* Gens durch Northern Blot Hybridisierungen mit der Sonde Hasti1/2 an verschiedenen humanen Gewebstypen (BD Biosciences MTN Blot H (***a***) + H2 (***b***)). Detektiert wurde ein 1kb Transkript mit starker Expression in Leber, Herz, Testis und Prostata, mit schwacher in allen anderen Geweben außer Skelett-muskulatur und Schilddrüse. Die Vollständigkeit und Menge der geladenen RNA wurde mittels Hybridisierung mit einer ß-Actin Probe überprüft (es wurden jeweils 2 Isoformen von ß-Actin mit 2kb und 1.6kb bei Herz und Skelettmuskulatur detektiert).

Die Ergänzung der humanen *FN5* mRNA (Accession No. af197137) zeigte, dass sie eine Länge von 953 Nucleotiden einnimmt. Die Längendiskrepanz zum *Fugu* Transkript ergab sich aus einer verkürzten 5'UTR. Dies wurde durch die verschiedensten Arten der RACE-Analysen überprüft und im Falle der humanen Form mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen mit der Sonde Hasti 1/2, die annähernd das vollständige Transkript enthält, an verschiedenen humanen Geweben wie Leber, Prostata und Testis bestätigt (Abb. 3.2). Neben der Größe des humanen *FN5* Transkripts, zeigten diese Hybridisierungen eine sehr starke Expression in

Herz, Leber, Prostata und Testis. Die Sequenzvergleiche der orthologen *FN5* Transkripte mit Hilfe des GCG Programms, dem Clustal W Programms und mit dem Blast Programm des NCBI Servers zeigten, dass ausschließlich der codierende Bereich zwischen Mensch und Fugu hoch konserviert ist. Zusammenfassend sind die Vergleiche in Abb. 3.3 und Tab. 3.1 wiedergegeben.

Tab. 3.1: Vergleich zwischen der humanen und Fugu *FN5* mRNA, sowie zwischen den Genprodukten. Dargestellt sind die verschiedenen Größen der jeweiligen Transkripte, bzw. Teilabschnitte (in bp) und der Proteinsequenz (in AS). Einzig in den codierenden Bereichen findet sich eine Konservierung.

	Fugu rubripes	**Identität/ Ähnlichkeit (%)**	***Homo sapiens***
Transkriptlänge (bp)	**1559 / 1655**	**-**	**954**
Länge 5'UTR (bp)	**1058 / 1154**	**-**	**230**
Länge 3'UTR (bp)	**321**	**-**	**544**
Codierender Bereich (AS)	**59**	**80 / 85**	**59**

Die nähere Betrachtung der Sequenzen der *FN5* Transkripte ergaben keinerlei Sequenzähnlichkeiten zu anderen Genen, bzw. Genfamilien, womit keine Zuordnung zu bekannten Gengruppen und damit Spekulationen über mögliche Funktionen möglich waren.

```
Fugu    1 MRQLKGKPKKETSKDKRERKQAMQDARKQVATVVLPTVAVVVLLIVFFVYAATRPGAIA 59
          |||||||||||||||||:|||||||:|| |: ||||||.|||||||| ||| ||||
Mensch  1 MRQLKGKPKKETSKDKKERKQAMQEARQQITTVVLPTLAVVVLLIVVFVYVATRPTITE 59
```

Abb. 3.3: Alignment der vorausgesagten Aminosäuresequenzen, abgeleitet aus der jeweiligen cDNA Sequenz des *FN5* Gens von *Fugu rubripes* und *Homo sapiens.* Dabei ergab sich eine Übereinstimmung zwischen Fugu und Mensch von 80% und eine Ähnlichkeit von 85%.

Die computeranimierte Funktionsanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Hilfe von Programmen wie NCBI Protein BLAST, CATH – Protein Struktur Klassifikation, ExPASy – Prosite , FANS-REF und ProDom ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf mögliche Funktionseinordnung oder Aufschluss über vorhandene funktionelle Domänen innerhalb des Proteins.

3.1.3 Genomische Lokalisation des humanen *FN5* Gens

Da zumindest der codierende Anteil des *FN5* Gens zwischen *Fugu* und Mensch stark konserviert geblieben ist, blieb nun zu klären, ob die Genanordnung sich ebenfalls im Lauf der Evolution nicht verändert hatte. Eine genaue genomische Lokalisation des humanen *FN5*, sowie des *Nlk* Gens wurde über verschiedene Arten erreicht. Zum einen durch FISH Hybridisierungen, zum anderen durch Southern Blot-Hybridisierungen an YAC-DNAs aus der *NF1* Genregion, des weiteren durch PCRs an DNA eines Translokationszellhybriden A9/der(22) [t(17;22)(q11.2q11.2)], der nur den Teil des Chromosom 17 von Intron 31 des *NF1* Gens bis zum Telomer enthält (Kehrer-Sawatzki et al., 1997) und an mono-chromosomalen Zellhybrid-Panels.

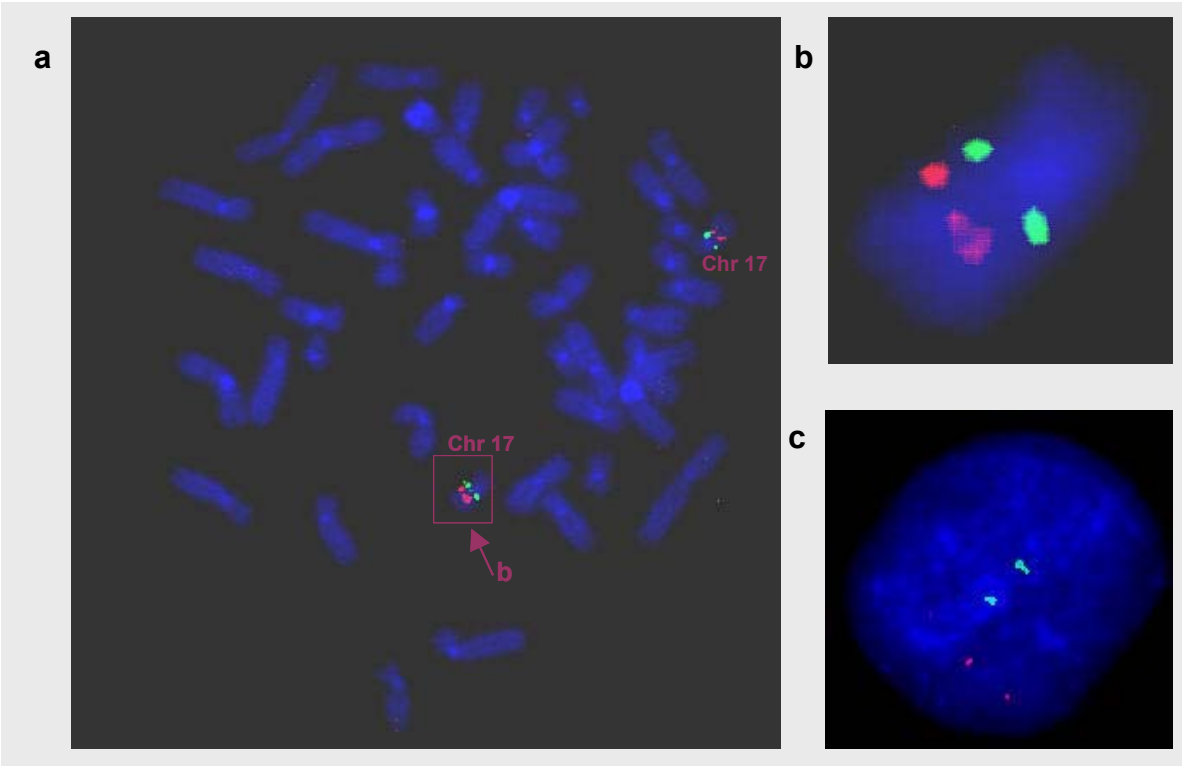


Abb. 3.4: FISH Hybridisierung der Chromosomen einer gesunden Kontroll-Person. Die grün-fluoreszierenden Signale geben die Biotin-markierte *NF1* Sonde wieder, die rot-fluoreszierenden Signale die DIG-markierte *FN5* Sonde. In ***a*** ist der gesamte Chromosomensatz zu sehen und in ***b*** eines der beiden Chromosomen 17 herausgegriffen, wo der enorme Abstand des *FN5* Gens zum *NF1* Gen veranschaulicht dargestellt ist. Die zwei Signale sind deutlich voneinander wahrnehmbar, was bei dem starken Kondensationszustand von Metaphasenchromosomen auf große Abstände hinweist. In ***c,*** der markierte Zustand von Interphase-Chromosomen, die in unkondensierter Form ebenfalls den großen Abstand der zwei Gene verdeutlichen.

Für die FISH Hybridisierung wurde zuerst mittels radioaktiver Hybridisierung mit einer cDNA Sonde aus dem humanen *FN5* Transkript ein P1 Klon aus einer humanen P1 Bank isoliert, der Teile des *FN5* Gens enthielt. Die FISH

Hybridisierung mit DIG-markiertem P1 Klon (rot fluoreszierend) und Biotin-markierter *NF1*-Sonde (grün fluoreszierend) wurde an Chromosomen eines gesunden Menschen (Abb. 3.4) und eines NF1-Deletionspatienten (Abb. 3.5) durchgeführt. Dabei sollte neben der Lokalisation bereits festgestellt werden, ob dieser Patient neben dem Fehlen einer *NF1* Kopie, auch nur ein *FN5* Gen besitzt. Wie Abbildung 3.4 zeigt, ist das *FN5* Gen im humanen Genom auf 17q21.3-q22 zu lokalisieren. Die Doppelmarkierung zeigte deutlich, dass zwischen dem auf 17q11.2 liegenden *NF1* Gen und dem *FN5* Gen mehrere Mb genomische DNA liegen müssen. Datenbankvergleiche festigten diese Ergebnisse dadurch, dass in der 3'UTR des *FN5* Gens die STS Marker G19909 und D17S930 lokalisiert werden konnten. Der Marker D17S930 befindet sich laut dem Stanford Human Genome Center zwischen den Markern D17S1970 und D17S1860, die mehrere Mb distal zum *NF1* Gen lokalisiert sind. Diese Datenbankeintragungen bestätigten das FISH Ergebnis zur genomischen Einordnung des *FN5* Gens. Somit war auch anzunehmen, dass das *FN5* Gen bei NF1 Deletionspatienten nicht mit dem *NF1* Gen codeletiert ist.

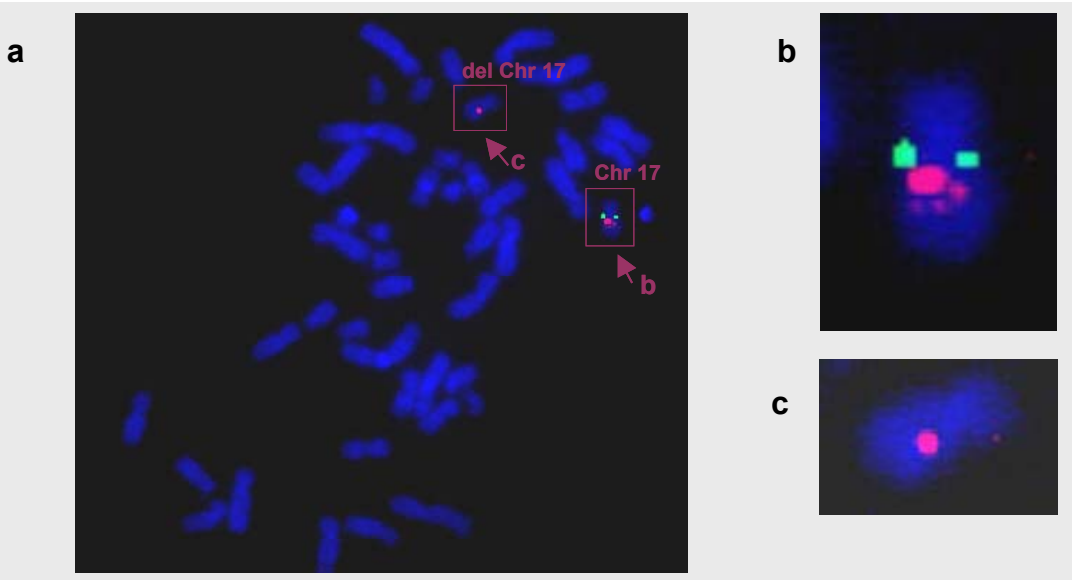


Abb. 3.5: FISH Hybridisierung der Chromosomen des NF1 Deletionspatienten AHK. Die grün-fluoreszierenden Signale geben die Biotin-markierte *NF1* Sonde wieder, die rot-fluoreszierenden Signale die DIG-markierte *FN5* Sonde. In ***a*** ist der gesamte Chromosomensatz zu sehen, wobei das deletierte Chromosom 17 erkennbar ist durch das Fehlen des *NF1* Signals. In ***b*** und ***c*** sind die beiden Chromosomen 17 einzeln noch einmal herausgegriffen. ***b*** zeigt deutlich beide Signale, im undeletierten Zustand mit dem *NF1* Gen und dem *FN5* Gen und in ***c*** der markierte Zustand des deletierten Chromosoms 17, bei dem hier die *NF1* Kopie deletiert ist, jedoch das *FN5* Gen, das in größerem Abstand liegt, von der Deletion nicht mehr betroffen ist.

Diese Annahme zeigte sich auch in der FISH Hybridisierung der Chromosomen des NF1 Deletionspatienten AHK (Abb. 3.5). Hier waren deutlich ein grün-fluoreszierendes Signal für das *NF1* Gen und zwei rot-fluoreszierende Signale für beide *FN5* Kopien zu erkennen und somit war für diesen Patienten an sich eine Beteiligung des *FN5* Gens am Phänotyp auszuschließen.

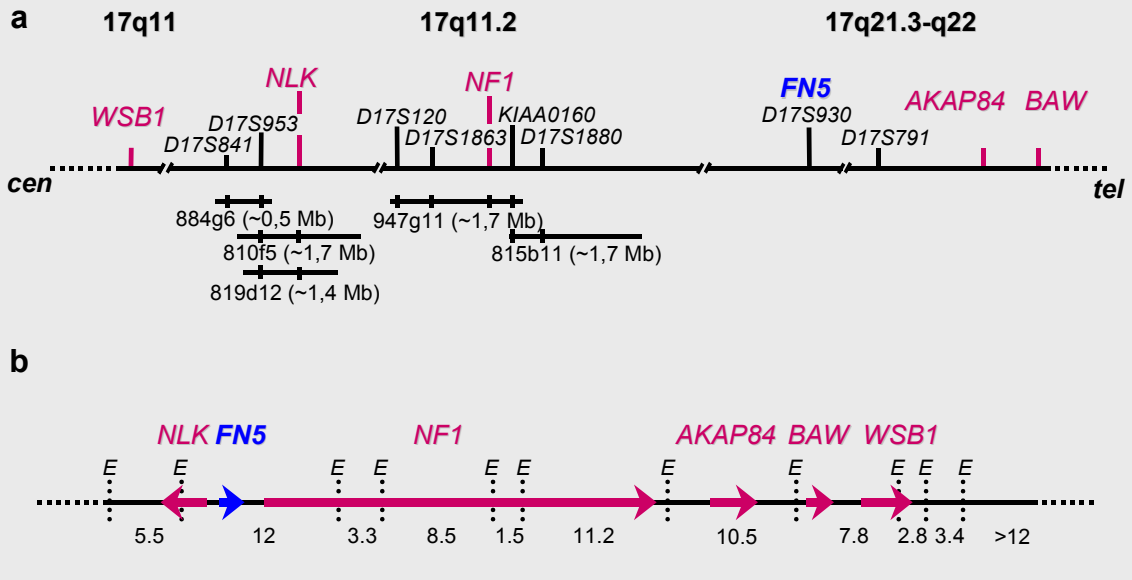


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der *NF1*-Genregion beim Menschen im Vergleich zu der Region bei *Fugu rubripes.* In ***a*** sind die untersuchten Gene, speziell in blau, das hier untersuchte *FN5* Gen, im Bereich der *NF1* Genregion des Menschen bezüglich ihrer Lage in Relation zu bekannten Markern wiedergegeben. Die Unterbrechungen der horizontalen Linie durch Diagonalen deuten unbekannte Distanzen an. Des weiteren sind die zur Kartierung herangezogenen YAC Klone zusammen mit ihren vermeintlichen Größen (aus CEPH Datenbank) abgebildet. Ebene ***b*** dieser Abbildung verdeutlich noch einmal im Vergleich die Genanordnung mit den Orientierungen (Pfeile) der einzelnen Gene bei *Fugu rubripes* (vgl. Abb. 3.1).

Anhand dieser Ergebnisse war nicht auszuschließen, dass weitere *FN5* Kopien vorhanden waren, die durch FISH nicht erfasst werden konnten. Daher wurden mit einer cDNA Sonde des *FN5* Gens Southern Blot Hybridisierungen an geschnittener Kontroll-DNA, P1-Klon-DNA, YAC-DNA und an DNA des Translokationszellhybriden A9/der(22) durchgeführt. Hier zeigte sich kein Signal an den YACs 947g11 und 815b11, die ungefähr 3,5 Mb der *NF1* Genregion umspannen (Corrado et al., 1999; vgl. Abb. 3.6). Somit war zumindest im Bereich des *NF1* Gens keine weitere *FN5* Kopie vorhanden. Vollständigkeitshalber wurde ein genomweiter monochromosomalener Zellhybrid-Panel mittels PCR auf eine weitere Kopie hin überprüft. Dieses Screening deutete auf eine weitere Kopie des *FN5* Gens auf Chromosom 11. Die nähere Untersuchung eines Chromosom 11

regionalen Panels lokalisierte diese genauer auf Chromosom 11 im Bereich der Bande q13.3 – q23.3.
Die in Abbildung 3.6 eingezeichneten YACs wurden zusätzlich für Southern Blot Analysen mit einer 3'-cDNA Sonde des *Nlk* Gens herangezogen. Diese zeigten, dass das *Nlk* Gen ebenfalls nicht auf den YACs 947g11 und 815b11 lokalisiert ist. YAC 810f5 zeigte hingegen ein positives Signal. Eine genauere Lokalisation des *Nlk* Gens konnte durch PCRs an den YACs 819d12 und 884g6 zwischen den Markern D17S935 und D17S120 erreicht werden (Abb. 3.6).
Letztendlich zeigten diese Ergebnisse, dass sowohl die identifizierten Gene aus dem 5'-Bereich des *NF1* Gens bei *Fugu*, als auch die 3'-lokalisierten Gene, *WSB1*, *AKAP84* und *BAW*, im humanen Genom nicht im *NF1* Lokus lokalisiert sind. *Fugu* zeigt in dieser Region eine vollständig andere Genanordnung als der Mensch, es haben also zahlreiche, den *NF1* Genbereich betreffende Rearrangements seit der evolutionären Trennung der zu *Fugu* und Säugern führenden Entwicklungslinien stattgefunden. Es können demnach keinerlei Aussagen über die humane *NF1* Genregion durch Vergleiche mit *Fugu* gemacht werden und daher auch nicht über codeletierte Gene bei NF1 Deletionspatienten.

3.2. Untersuchungen der *NF1* Region innerhalb der flankierenden repetitiven Sequenzen, den NF1REPs

Da bei den meisten Patienten mit Deletionen die Deletionsbruchpunkte innerhalb der Sequenzen der NF1REPs liegen und daher meist der gleiche Satz an Genen deletiert ist, müssen alle diese Gene als Kandidaten für den spezifischen Phänotyp angesehen werden. Da hier Gene identifiziert werden sollten, die im Fall einer Deletion zu mentaler Retardierung führen, wurde zunächst geprüft welche Gene ihre Hauptexpression im Gehirn zeigen.
Dazu wurden die in diesem Bereich lokalisierten Gene und ESTs mit Hilfe von RT-PCRs auf ihre Expression untersucht. Datenbankanalysen erlaubten es, die in Tabelle 3.2 aufgeführten 16 möglichen Gene der Region innerhalb der Repeats zuzuordnen. Zur Bestimmung ihres Expressionsmusters wurde für jedes dieser Gene, bzw. ESTs RT-PCRs mit Gehirn-RNA und als Kontrollen PCRs an Fibroblasten-cDNA und Kontroll-DNA durchgeführt. Hier zeigte sich, dass 13 der

16 PCR-Produkte, sowohl an cDNA aus Gehirn als auch aus Fibroblasten amplifizierbar sind (Tab. 3.2).

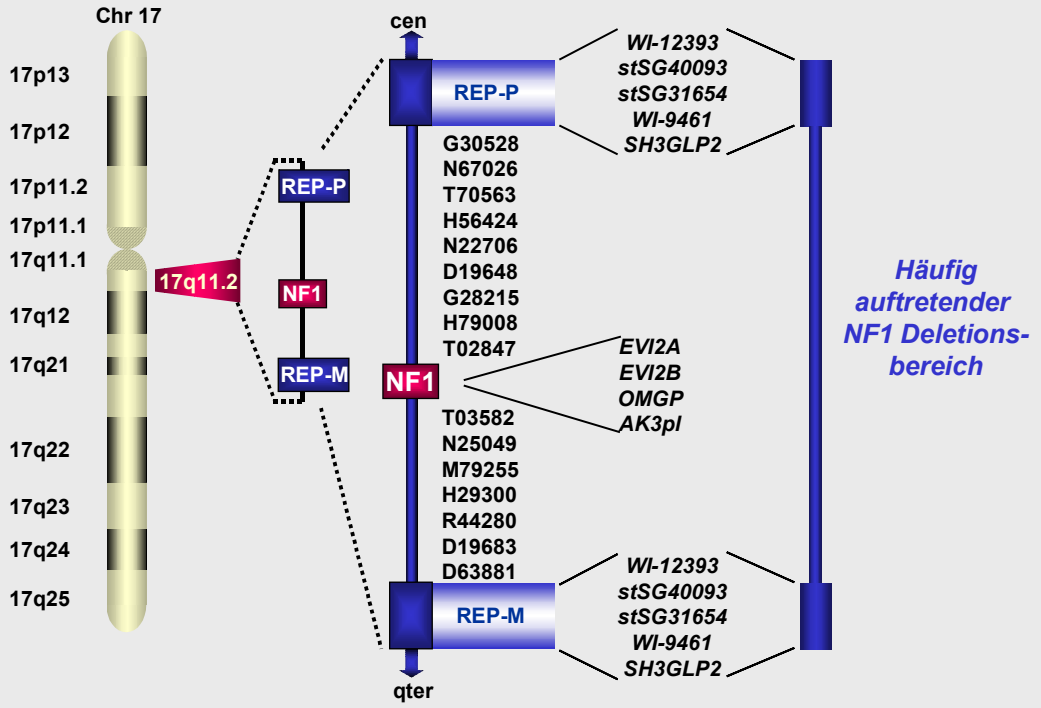


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der *NF1*-Genregion auf 17q11.2 bei *Homo sapiens* mit den flankierenden NF1-REPs (blaue Balken). Dargestellt sind die untersuchten ESTs mit ihren Datenbanknummern (Acc.No) innerhalb des üblichen Deletionsbereiches, in ihrer genomischen Anordnung relativ zum *NF1* Gen. ESTs/Gene aus dem direkten *NF1* Lokus und aus den REPs (kursiv) wurden nicht untersucht.

Jedoch konnten die PCR Fragmente der ESTs n25049, m79255 und h29300 ausschließlich in Gehirn cDNA detektiert werden. Datenbankeinträge zeigten, dass alle 3 cDNA Klone in unmittelbarer genomischer Nähe zueinander zu finden sind, und dass alle 3 der genomischen Sequenz ac003101 zuzuordnen waren. Diese genomische Sequenz umspannt 208396bp und überlappt unmittelbar mit der genomischen Sequenz ac004526 (297898bp), auf der das *NF1* Gen lokalisiert ist. Somit war anzunehmen, dass es sich hier unmittelbar um die 3' flankierenden Gene des humanen *NF1* Gens handelt. Diese 3 gehirnspezifisch exprimierten Sequenzen sollten nun für weitere Untersuchungen näher betrachtet und charakterisiert werden, da sie durch ihre Gehirnspezifität für eine Beteiligung am Phänotyp mentale Retardierung in Frage kamen.

Tab. 3.2: Gene/ESTs mit ihren Datenbank Accession Nummern aus dem Bereich des *NF1* Gencontigs. Angegeben ist die Länge der PCR-Teilfragmente amplifiziert mit Primern innerhalb der jeweiligen Gene/ESTs und der Erhalt dieser Produkte an Gehirn-, Fibroblasten-cDNA und Kontroll-DNA. Plus steht für positive Amplifikation, Minus für negative. Negatives Ergebnis bei der Kontroll-DNA bedeutet, dass das PCR-Produkt genomisch zu groß für eine Amplifikation ist. Gelb unterlegt sind die ESTs, die in dieser Untersuchung ausschließlich in Gehirn detektierbar waren.

Gen/EST	Genbank Accession No.	Länge des PCR-Fragments	PCR-Produkte		
			Gehirn	Fibro-blasten	Kontroll-DNA
CYTOR4	G30528	172	+	+	+
sts-N67026	N67026	406	-	+	-
SHGC-33441	T70563	280	+	+	+
stSG12855	H56424	340	+	+	+
N22706	N22706	332	+	+	+
SHGC-35907	D19648	274	+	+	+
SHGC-34232	G28215	150	+	+	+
SHGC-35088	H79008	268	+	+	+
FB12A2	T02847	272	+	+	+
IB518	T03582	256	+	+	+
N25049	N25049	149	+	-	+
sts-M79255	M79255	155	+	-	+
stSG-41099	H29300	236	+	-	+
WI-6742	R44280	220	+	+	+
SHGC-34334	D19683	228	+	+	+
KIAA0160	D63881	275	+	+	-

3.3. Charakterisierung des *FHN3* Gens

3.3.1 Sequenzcharakterisierung des humanen *FHN3* Gens und dessen abgeleiteter Aminosäuresequenz

Durch Datenbankvergleiche der genomischen Sequenz ac003101 und sämtlichen ESTs aus diesem Bereich konnten die drei oben erwähnten, gehirnspezifisch exprimierten ESTs N25049, M79255 und H29300 eingeordnet werden und es zeigte sich, dass diese drei cDNA Klone, dem selben Gen zuzuordnen sind. Northern Blot Hybridisierungen an verschiedenen humanen adulten Geweben mit der Sonde p3nawi/p4nawi, generiert aus den ESTs, detektierten ein 9,5kb

Transkript, das innerhalb der untersuchten Gewebe ausschließlich im Gehirn zu finden ist (Abb. 3.8).

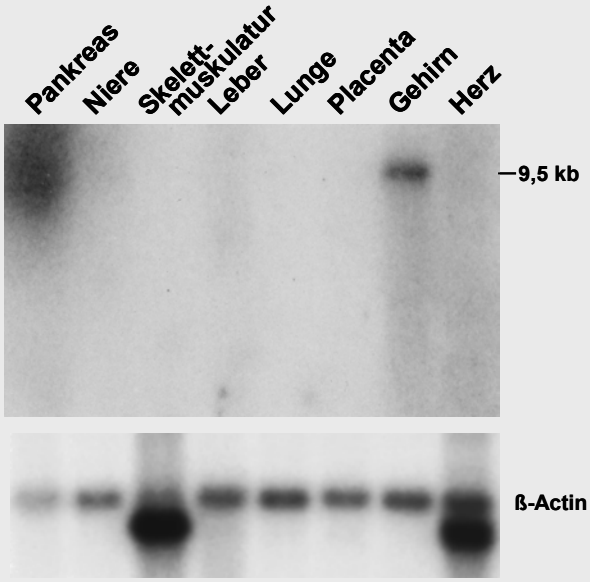
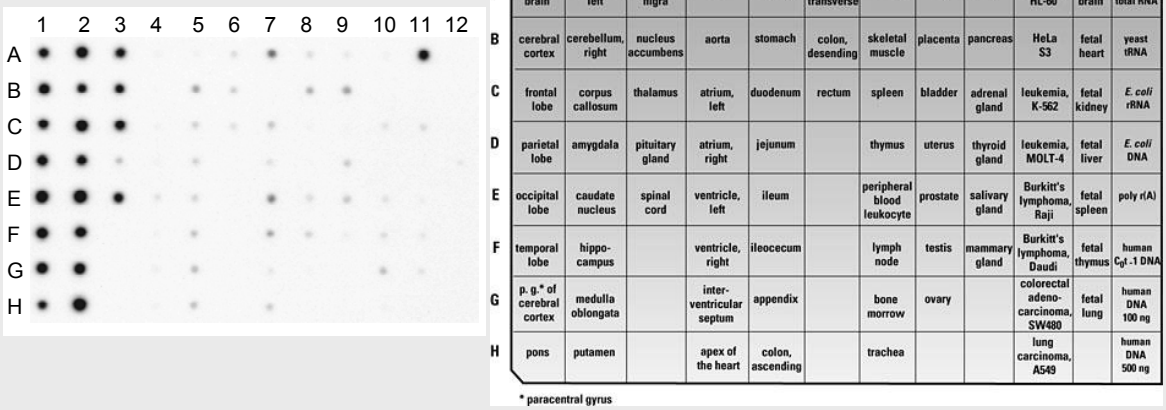


Abb. 3.8: Hybridisierungen des MTN-H Northern Blots von BD Biosciences mit der Sonde p3nawi/p4nawi, generiert aus den drei exprimierten Sequenzen, die ausschließlich im Gehirn über RT-PCR nachweisbar waren. Die Sonde detektiert ein 9,5kb Transkript innerhalb den erfassten Geweben ausschließlich in Gehirn RNA. Die geladenen RNA-Menge wurde mittels Hybridisierung mit einer ß-Actin Probe überprüft (2 Isoformen von ß-Actin mit 2kb und 1.6kb bei Herz und Skelettmuskulatur).

Nähere Analysen durch Datenbanken, RT-PCRs an Gehirn-RNA und Race-Methoden erlaubten die vollständige Charakterisierung dieses Transkripts. Es besitzt laut generierter Sequenz eine Transkriptlänge von 7655bp, wobei sich die Längendiskrepanz zum vorhergesagten 9,5kb Transkript vermutlich aus der schlechten Auftrennung großer Fragmente im Northern Blot ergibt (vgl. Abb. 3.8). Der offene Leserahmen überspannt 1674bp, resultierend in einem Protein mit 557 Aminosäuren. Die 5'UTR nimmt geringe 167 Nucleotide ein, im Gegensatz zur auffällig expandierten 3'UTR mit einer Länge von 5814bp.

Das erweiterte Expressionsspektrum dieses Transkripts ist in Abbildung 3.9 dargestellt, welche die radioaktive Hybridisierung des Expressions-Arrays MTE™ (BD Biosciences) ebenfalls mit der Sonde p3nawi/p4nawi aus der 3'UTR zeigt. Nachweisbar ist ein starkes Signal in sämtlichen Gehirn-Geweben, sowie eine schwache Expression in Aorta, Niere, Leukozyten, Lymphgewebe, Placenta und Pankreas und sehr schwache Signale in sämtlichen anderen Geweben.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
B	cerebral cortex	cerebellum, right	nucleus accumbens	aorta	stomach	colon, desending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
C	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	*E. coli* rRNA
D	parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	*E. coli* DNA
E	occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	poly r(A)
F	temporal lobe	hippo-campus		ventricle, right	ileocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human C_0t-1 DNA
G	p. g.* of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone morrow	ovary		colorectal adeno-carcinoma, SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
H	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

* paracentral gyrus

Abb. 3.9: Hybridisierung des MTE RNA Expressionsblots von BD Biosciences mit der Sonde p3nawi/p4nawi aus der 3'UTR. Sie detektiert einzig das 9,5kb Transkript. Daneben zum Vergleich die schematische Bennennung der aufgetragenen Gewebs-RNA/-DNA. Starke Signale zeigten sich in den RNAs verschiedener Gehirnanteile (1A-3E und 11A).

Mittels Datenbankvergleiche konnte das zugehörige Gen charakterisiert werden, das in einem Abstand von 14kb 3' der Polyadenylierungsstelle des *NF1* Gens liegt. Durch diese Lokalisation wurde es als *FHN3* Gen (flanking the human *NF1* gene in 3'direction) bezeichnet. Das Exon 1 des *FHN3* Gens war nach Datenbank-analysen nicht in der genomischen Sequenz ac004526 erfasst, die diesen Bereich umspannt. Southern Blot Hybridisierungen mit der Sonde adap1/2 aus Exon 1 (vgl. Abb.3.11) an verschiedene Cosmide aus dem Bereich zeigten jedoch, dass der genomischen Datenbanksequenz an dieser Stelle 700bp fehlten. Die Sonde detektierte an Cosmid-DNA ein 4,2kb großes *Nco*I-Fragment, welches laut Datenbanksequenz nur 3,5kb umfassen sollte und die Isolierung und Analysierung dieses Fragments bestätigte dies. In diesem fehlenden 700bp Bereich konnte Exon 1, sowie der Promotor des *FHN3* Gens lokalisiert werden, der einen extrem hohen GC-Gehalt von 80,1% aufweist. Das *FHN3* Gen, das schematisch in Abbildung 3.10 aufgezeigt ist, umspannt 142kb genomische DNA und ist in mindestens 23 Exons organisiert, von denen 15 konstitutiv und 8 gewebsspezifisch, alternativ gespleißt sind. Des weiteren konnten 3 alternative Polyadenylierungsstellen ausgemacht werden. Insgesamt war die Charakterisierung von 5 weiteren Isoformen neben der 9,5kb Transkriptform I möglich (Abb.3.10, Tab. 3.4), die als Isoformen II–VI bezeichnet wurden. Eine alternativ durchgeführte Northern Blot Hybridisierung mit der Sonde wi9521uni/rev, die ebenfalls in der 3'UTR lokalisiert ist (vgl. Abb. 3.11a), zeigte neben der 9,5kb Isoform I zwei der zusätzlichen Transkriptformen auf. Dabei konnte eine 3,4kb

Isoform detektiert werden, die wie Isoform I ausschließlich im Gehirn exprimiert wird und ein weiteres 3,2kb Transkript, welches in Pankreas, Niere, Leber, Lunge, Placenta, Herz und auch schwach in Skelettmuskulatur zu finden ist (Abb. 3.11c).

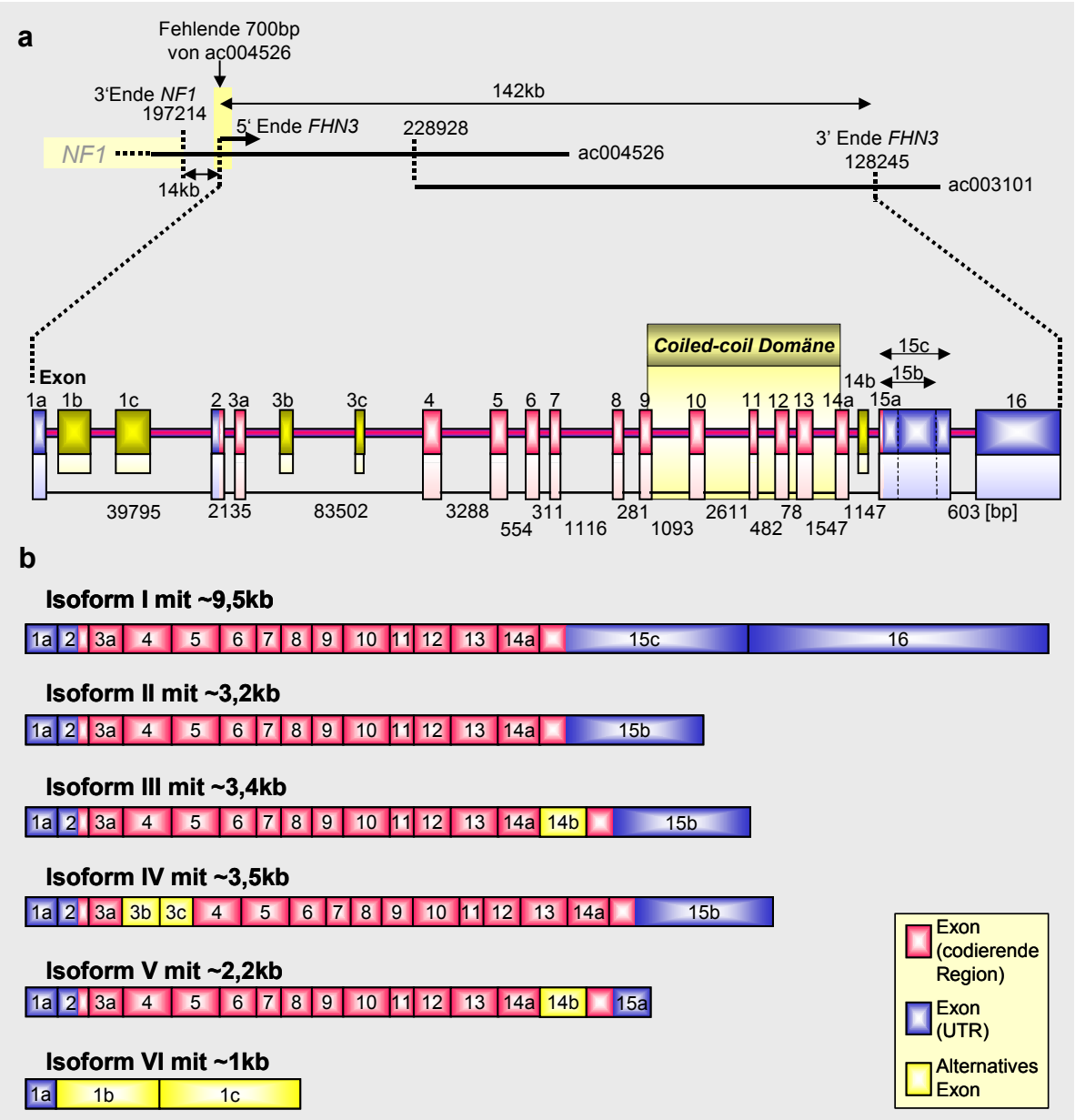


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der *NF1*-Genregion beim Menschen. In ***a*** ist die Lage des *FHN3* Gens in Bezug auf die genomischen Datenbank-Sequenzen ac004526 und ac003101 und die Lage relativ zum *NF1* Gen wiedergegeben. Die Zahlen an den ac-Sequenzen entsprechen der Basenpaar Nummer der genomischen Sequenzen an diesen Stellen. Des weiteren bedingt maßstabsgetreu sind die Exons des *FHN3* Gens mit ihren Bezeichnungen (Farbe siehe Box) und die Introngrößen (in bp) zwischen den jeweiligen Exons (ausgenommen der alternativ gespleißten) dargestellt. Angedeutet, mit gelbem Balken, ist die enthaltene Coiled-coil Domäne, die sich nach der Translation aus Exon 9-14a ergibt. Ebene ***b*** dieser Abbildung verdeutlicht die Zusammensetzungen der Exons der 6 Isoformen und ihre ungefähre Größe.

Die Isoformen I – V besitzen alle ihren Translationsstart im 88 bp großen Exon 2, wovon 7 bp codierend sind und ihren Translationsstop mit dem Codon TAA in Exon 15 haben, von welchem 114 Basenpaare zum codierenden Bereich zählen.

Das zuerst charakterisierte 9,5kb Transkript, als **Isoform I** bezeichnet, umfasst die Exons 1a, 2, 3a, 4-14a, 15c und 16. Bei der **Isoform II** handelt es sich um das Transkript, das in den meisten Geweben gefunden werden konnte. Es besteht aus den selben Exons wie Isoform I bis auf ein kürzeres Exon 15b, resultierend in einer 1325bp langen 3'UTR und ohne Exon 16. Daraus ergibt sich, dass beide Isoformen denselben codierenden Bereich innehaben und somit aus beiden Transkriptformen das selbe Protein entsteht. Die extrem erweiterte Form I unterscheidet sich also auf Proteinebene nicht von der Isoform II, tritt aber in erhöhtem Maße im Gehirn zusätzlich zur Form II auf.

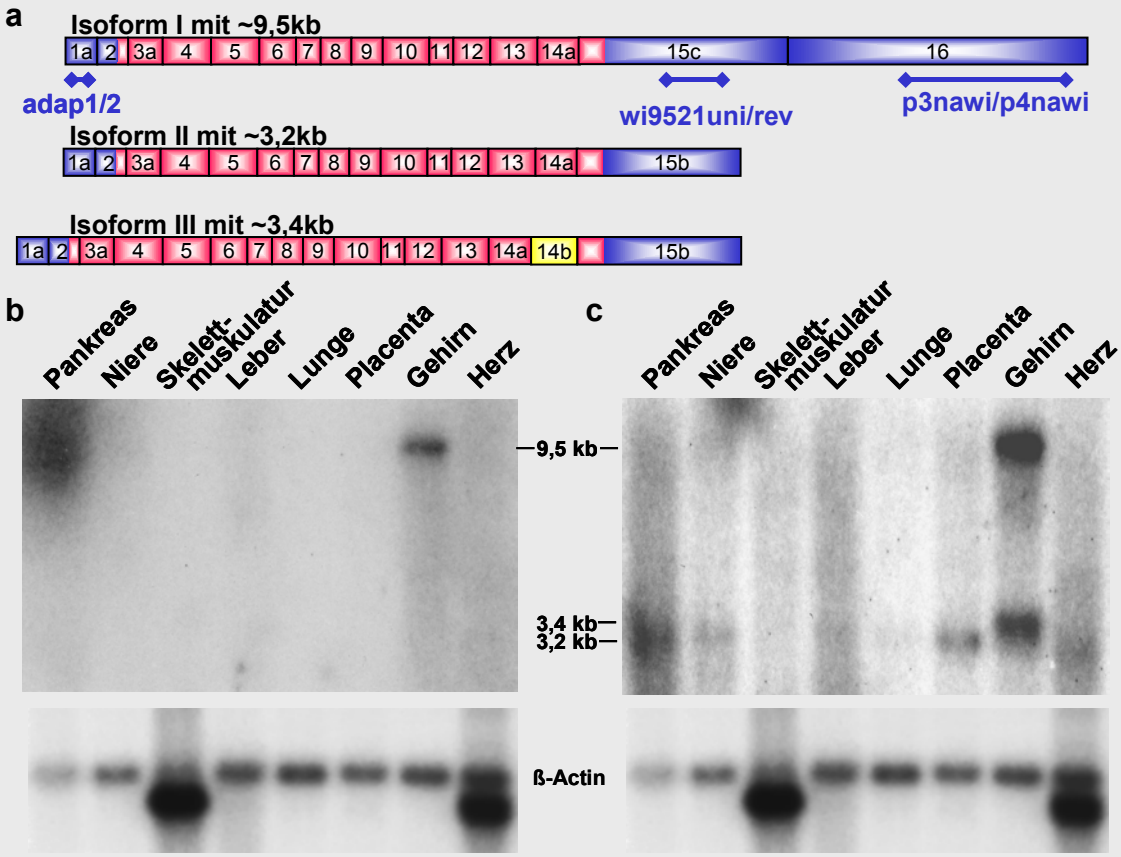


Abb. 3.11: Hybridisierungen des MTN-H Northern Blots von BD Biosciences. In ***a*** sind schematisch die drei verschiedenen detektierten Transkriptformen mit ihren Exons (rot codierend, blau nicht-codierend) dargestellt, mit Lage der Sonden in den 3'UTRs. Die Sonde p3nawi/p4nawi detektiert nur Isoform I und wi9521hin/rev kann alle 3 Formen erfassen. Ebene ***b*** zeigt nocheinmal die Hybridisierung mit der Sonde p3nawi/p4nawi, die ein 9,5kb Transkript ausschließlich im Gehirn detektiert (vgl. Abb.3.8). ***c*** zeigt die Detektion mit der Sonde wi9521hin/rev. Markiert wurde das selbe 9,5kb Transkript wie in b und ein 3,4kb im Gehirn, sowie eine 3,2kb Isoform in allen vorhandenen Geweben.

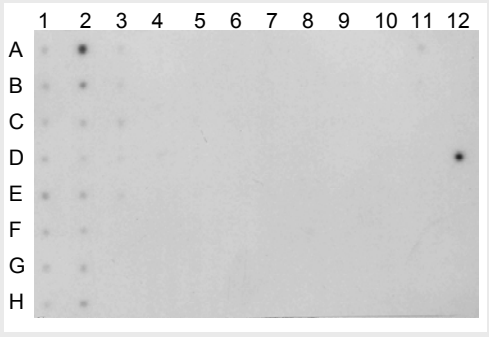
Die **Isoformen III** bis **V** ergaben sich aus alternativ gespleißten Exons und alternativ benutzten Polyadenylierungsstellen, die in gewebsspezifischer Form selten exprimiert werden (Tab. 3.4).

Tab. 3.3: Intron und Exon-Organisation des humanen *FHN3* Gens. Gegeben sind die Exons mit ihren Nucleotidpositionen bezüglich der genomischen Datenbanksequenzen ac004526 und ac003101, mit ihrer Größe und den dazugehörigen Introns. Die Organisation der Isoform II, die ubiquitär exprimiert ist, erscheint in schwarzer Schrift. Alternative Exons mit ihren alternativ gespleißten Introns sind in Grau und Kursiv dargestellt. Die daraus resultierenden Änderungen der Nucleotidpositionen auf cDNA Ebene und die Intronlängen sind in Klammern <> gefasst.

Exon	Nucleotid Position in ac004526	Nucleotid Position in ac003101	Nucleotide auf cDNA Ebene	Exon Größe	Intron Größe
1a	**-**	**-**	**1 – 86**	**86**	**39795** *<270>*
1b	*211274 - 211700*	*-*	*<87 – 513>*	*427*	*<1066>*
1c	*212765 - 213359*	*-*	*<514 – 1108>*	*595*	*-*
2	**250899 - 250986**	**21872 – 21959**	**87 – 174**	**88**	**2135**
3a	**253122 - 253210**	**24093 – 24181**	**175 – 263**	**89**	**83502** *<14266>*
3b	*267477 - 267630*	*38448 - 38601*	*<264 – 417>*	*154*	*<39572>*
3c	*-*	*78174 - 78305*	*<418 – 549>*	*132*	*<29378>*
4	**-**	**107684 – 107910**	**264 – 490**	**227**	**3288**
5	**-**	**111199 – 111393**	**491 – 685**	**195**	**554**
6	**-**	**111948 – 112082**	**686 – 820**	**135**	**311**
7	**-**	**112393 – 112428**	**821 – 856**	**36**	**1116**
8	**-**	**113545 – 113644**	**857 – 956**	**100**	**281**
9	**-**	**113926 – 114029**	**957 – 1060**	**104**	**1093**
10	**-**	**115123 – 115263**	**1061 – 1201**	**141**	**2611**
11	**-**	**117875 – 117956**	**1202 – 1283**	**82**	**482**
12	**-**	**118439 – 118576**	**1284 – 1421**	**138**	**78**
13	**-**	**118653 – 118811**	**1422 – 1580**	**159**	**1547**
14a	**-**	**120359 – 120502**	**1581 – 1724**	**144**	**1147** *<531>*
14b	*-*	*121033 – 121170*	*<1725 – 1862>*	*138*	*<478>*
15a	*-*	*121649 - 121885*	*<1863 - 2099>*	*237*	*-*
15b	**-**	**121649 – 123087**	**1725 – 3163**	**1439**	**-**
15c	*-*	*121649 – 124655*	*<1725 - 4731>*	*3007*	*<666>*
16	*-*	*125322 – 128245*	*<4732 - 7655>*	*2924*	*-*

Die **Isoform VI** wurde ausschließlich über 2 verschiedene Image-Klone A225219 und K19597 identifiziert. Die Analyse dieser Klone und der mRNA-Abgleich gegen die genomische Sequenz ac004526 ergaben, dass die Isoform ein Größe von 1108bp in drei Exons aufweist. Die Spleißseiten des Intron 1 bestehen aus den üblichen Dinucleotiden GT an der 5'-Spleißstelle und AG an der 3'- Spleißstelle, dagegen findet sich im Intron 2 die deutlich seltenere, alternative Variante GC-AG. Die Isoform ist polyadenyliert, besitzt jedoch keinen definierten, offenen Leserrahmen. Die Transkriptform war in keinem Gewebe mittels RT-PCR nachweisbar, weshalb eine Sonde aus diesen cDNA Klonen generiert wurde, die auf den RNA-Expressionsblot MTE^{TM} hybridisiert wurde. Dabei konnte das

Transkript schwach in den verschiedenen Gewebsteilen des Gehirns nachgewiesen werden, eine deutliche Expression zeigte sich im linken Kleinhirn (Abb. 3.12).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
B	cerebral cortex	cerebellum, right	nucleus accumbens	aorta	stomach	colon, desending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
C	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	*E. coli* rRNA
D	parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	*E. coli* DNA
E	occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	poly r(A)
F	temporal lobe	hippo-campus		ventricle, right	ileocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human C_0t-1 DNA
G	p. g.* of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone morrow	ovary		colorectal adeno-carcinoma, SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
H	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

* paracentral gyrus

Abb. 3.12: Hybridisierung des MTE RNA Expressionsblots von BD Biosciences mit der Sonde naba, amplifiziert durch die Primer naba1, naba4 an Plasmid-DNA des IMAGE Klons K19597. Sie detektiert ausschließlich die 1kb Isoform VI. Zum Vergleich die schematische Bennennung der aufgetragenen Gewebs-RNA/-DNA. Hier zeigte sich eine sehr schwache Expression ausschließlich in verschiedenen Gehirnanteile (1A-3E und 11A), jedoch vorwiegend im linken Kleinhirn (2A). Die Kontroll-*E. coli* DNA wird ebenfalls detektiert.

Ebenfalls detektiert wurde in diesem Ansatz die, als Negativkontrolle gespottete *E. coli* DNA. Dies deutete auf eine Ähnlichkeiten der Isoform VI mit Bakterien-Sequenzen hin. Durch das Fehlen eines offenen Leserahmens könnte diese Form zu den nicht-codierenden RNAs (ncRNA) zählen, die oftmals an transkriptionellen oder posttranskriptionellen Regulationen beteiligt sind.

Zusammenfassend sind die 6 verschiedenen Isoformen nochmals in Tabelle 3.4 mit ihren Eigenschaften aufgelistet.

Tab. 3.4: Die 6 verschiedenen Transkriptisoformen des *FHN3* Gens mit ihrer jeweiligen Länge, enthaltenen Exons und ihrer Expression. ++ stark exprimiert, + normaler mRNA Level, +- nur schwach nachweisbar. Bei Isoform III-V Expression nur über Datenbank erfasst.

	Transkript-länge (bp)	Exons	Expression
Isoform I	**7721**	**1a, 2, 3a, 4-14a, 15c, 16**	**Gehirngewebe ++ annähernd ubiquitär - +**
Isoform II	**3163**	**1a, 2, 3a, 4-14a, 15b**	**ubiquitär +**
Isoform III	**3301**	**1a, 2, 3a, 4-14b, 15b**	**Gehirn +**
Isoform IV	**3436**	**1a, 2-14a, 15b**	**Uterus, Tonsillen +**
Isoform V	**2099**	**1a, 2, 3a, 4-14b, 15a**	**Testis +**
Isoform VI	**1108**	**1a, 1b, 1c**	**Linkes Kleinhirn + Gehirngewebe - +**

Für die Fragestellung der Arbeit und somit für den Phänotyp mentale Retardierung kämen somit zwei Proteinformen, die im Gehirn exprimiert werden, in Frage. Diese zwei kommen zwar auch in anderen Gewebe vor, werden aber an gehirnspezifischen RNAs translatiert. Gerade aus der Begebenheit heraus, dass das resultierende Protein der Form I identisch war mit dem ubiquitär zu findenden Protein, resultierend aus Isoform II, musste der expandierten 3'UTR der Form I eine wichtige Bedeutung zugerechnet werden. Vorstellbar wären Eigenschaften wie eine spezifische Lokalisation in bestimmten Gehirngeweben oder auch eine Erhöhung der Stabilität und Translationseffizienz, die mehrfach als Folge regulatorischer Elemente in 3'UTRs beschrieben wurden. Somit wären durch die alternative Polyadenylierung gewebsspezifische Effekte im Gehirn gegenüber einem ubiquitär exprimierten Protein zu erwarten (Lin et al., 1993).
Vor diesem Hintergrund stellte sich auch die Frage, ob diese expandierte 3'UTR der *FHN3* mRNA nur beim Menschen auftritt und nur hier gewebsspezifische Effekte zu erwarten sind oder ob auch andere Spezies diese beiden Formen exprimieren. Hier speziell sollte das *FHN3* Gen der Maus betrachtet werden. Im Falle, dass sich das murine *FHN3* Gen ebenfalls in den verschiedenen Isoformen zeigte, könnten Vergleiche der 3'UTRs regulatorische Elemente aufschlüsseln, die für eine spezifische Funktion der UTRs von Bedeutung sein könnten und oftmals im Lauf der Evolution stark konserviert geblieben sind.

3.3.2 Identifizierung und Charakterisierung des murinen *FHN3* Gens und Homologievergleiche zwischen den Spezies

Der Vergleich des humanen *FHN3* Transkripts mit der Maus-EST Datenbank des NCBI ließen die Identifikation mehrerer ESTs der murinen Form zu. Mit Hilfe dieser, RT-PCRs und 5'/3'-RACE Analysen konnten zwei Transkripte mit einer Länge von 7019bp, bzw. 3010bp identifiziert werden. Eine daraus generierte Sonde mauswi1/2, die aus dem 5' Bereich stammte, wurde auf den „Mouse MTN® Blot" von BD Biosciences hybridisiert. Sie detektierte ebenfalls ein ungefähr 7kb großes mRNA Fragment in Gehirn, Leber, Niere und Testis und in diesen vier Geweben lässt sich auch schwach die Isoform mit ca. 3kb erkennen. Des weiteren zeigte sich ein ca. 2kb großes Transkript in Gehirn und Testis, das hier jedoch nicht näher betrachtet wurde. In Herz, Milz, Lunge und Skelettmuskulatur war kein *FHN3* Transkript mit dieser Sonde nachweisbar (Abb. 3.13).

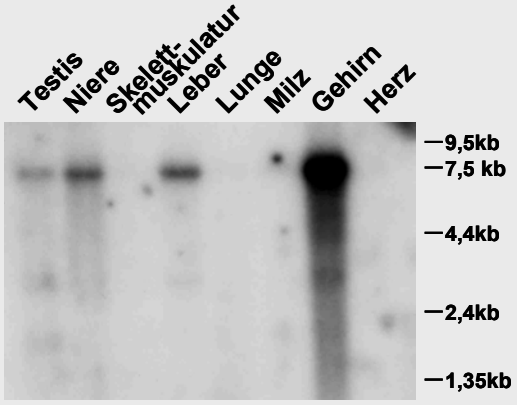


Abb. 3.13: Hybridisierungen des Maus MTN Blot (BD Biosciences) mit der Sonde mauswi1/2 aus dem 5'-mRNA Bereich des *FHN3* Gens. Detektiert wurde ein ca. 7kb großes Transkript mit sehr starker Expression in Gehirn und etwas schwächer in Testis, Niere und Leber. Sehr schwach ist auch die zweite Isoform bei ca. 3kb in diesen vier Geweben zu erkennen. Des weiteren findet sich eine sehr geringe Expression eines ca. 2kb Transkripts in Testis und Gehirn.

Das murine *FHN3* Gen erstreckt sich über ca. 107kb und ist auf Chromosom 11 in einem Abstand von ca. 10kb 3' flankierend zum murinen *NF1* Gen lokalisiert. Die zwei verschiedenen Isoformen umfassen jeweils 15 Exons, wobei die Längenvarianz aus alternativ benutzten Polyadenylierungsstellen entsteht (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Intron und Exon-Organisation des murinen *FHN3* Gens. Gegeben sind die Exons mit ihren Nucleotidpositionen bezüglich des *FHN3* Transkripts und der genomischen Datenbanksequenz al591174 (revers orientiert; Position 1 hier entspricht Position 205379 in al591174). Exons 15a und 15b besitzen die alternativen Polyadenylierungssignale der 7 und 3kb großen Isoformen. Ebenfalls gegeben sind die Introns mit ihren Größen.

Exon	Nucleotidposition in al591174 (reverse)	Nucleotidposition auf cDNA Ebene	Exon Größe (bp)	Intron Größe (bp)
1	95089 - 95174	1 – 86	86	28194
2	123369 - 123456	87 – 174	88	750
3	124207 - 124295	175 – 263	89	60232
4	184528 - 184751	264 – 487	224	2329
5	187081 - 187275	488 – 682	195	687
6	187963 - 188097	683 – 817	135	243
7	188341 - 188376	818 – 853	36	391
8	188768 - 188867	854 – 953	100	258
9	189126 - 189229	954 – 1057	104	1062
10	190292 - 190432	1058 – 1198	141	2922
11	193355 - 193436	1199 – 1280	82	761
12	194198 - 194335	1281 – 1418	138	76
13	194412 - 194567	1419 – 1574	156	928
14	195496 - 195639	1575 – 1718	144	823
15a	196463 - 201762	1719 – 3010	1292	-
15b	196463 - 201763	1719 – 7019	5301	-

Wie bei den humanen Transkripten unterscheiden sich diese Formen ausschließlich in einer expandierten 3'UTR der 7kb Form und beide codieren für ein Protein mit 555 Aminosäuren. Somit zeigten sich die selben Bedingungen wie beim Menschen, auch hier ist die lange Form im Gehirn sehr viel stärker exprimiert. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass die humane große Isoform I sich nur im Gehirn dominant zeigt, dagegen findet man bei der Maus das lange Transkript als häufigste Form in vielen Geweben, jedoch mit einem deutlich geringeren Expressionslevel als im Gehirn. Weitere Isoformen wie beispielsweise die beim Menschen ebenfalls im Gehirn auftretende Form III, konnten nicht identifiziert werden. Vergleicht man die murinen *FHN3* Transkripte mit den humanen, so findet man eine Übereinstimmung des offenen Leserahmens von 87,2%, wobei sich auf Proteinebene eine Identität von 92,4% und eine Ähnlichkeit von 93,7 ergibt. Die Konservierung der 5'UTRs ist ebenfalls deutlich mit 92,2% gegeben. Abfallende Übereinstimmung dagegen findet man im Vergleich der jeweiligen 3'UTRs, die für die langen Formen 53,6% und für die kurzen mit 57,2% anzugeben ist. Es ließen sich in den 3'UTRs keine konservierten Bereiche aufzeigen, die eventuell auf funktionelle Eigenschaften hingedeutet hätten. Zusammenfassend sind diese Interspezies Vergleiche der beiden großen Transkriptformen in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tab. 3.6: Vergleich zwischen dem humanen und murinen *FHN3* Gen bezüglich ihrer Transkriptformen. Dargestellt sind die verschiedenen Teilbereiche, sowie der offene Leserahmen (ORF) (in bp) und dem daraus resultierenden Protein (in AS) mit ihren Größen (in bp, bzw. AS), Übereinstimmungen, bzw. Ähnlichkeiten in Prozent zueinander.

	Homo sapiens	**Identität/ Ähnlichkeit (%)**	***Mus musculus***
ORF (bp)	**1674**	**87,2**	**1668**
Abgeleitetes Protein (AS)	**557**	**92,4 / 93,7**	**555**
5'UTR (bp)	**167**	**92,2**	**167**
3'UTR kurz (bp)	**1322**	**57,2**	**1178**
Transkriptlänge (bp)	**3163**	**75,9**	**3013**
3'UTR lang (bp)	**5814**	**53,6**	**5184**
Transkriptlänge (bp)	**7655**	**62,6**	**7019**

3.3.4 Funktionsanalysen zum FHN3 Protein

3.3.4.1 Funktionshinweise durch Screenen von Proteindatenbanken mit Hilfe der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Das Vorhandensein der im Gehirn prädominanten langen Isoform des *FHN3* Gens lässt darauf schließen, dass sie hier eine spezifische Funktion ausübt. Sequenzvergleiche der gesamten *FHN3* Transkripte mit Hilfe von DNA-Sequenz-Datenbanken ergaben keinerlei Ähnlichkeiten zu anderen Genen oder Genfamilien. Daher sollte das FHN3 Protein näher betrachtet und funktionell charakterisiert werden, um somit eventuell Rückschlüsse zu bekommen, ob dieses Protein mit dem Phänotyp mentale Retardierung in Zusammenhang stehen könnte. Mit Hilfe der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurden verschiedene Proteindatenbanken auf das Vorhandensein funktioneller Domänen untersucht. Herangezogen wurden die Proteinsequenzmotiv-Datenbanken BLOCKS, ExPASy, Pfam, ProDom, SWISS-PROT/TrEMBL, PROSITE, InterPro und weitere im Internet zugängliche Web Seiten (Baxevanis, 2000). Das FHN3 Protein zeigte Homologie zu Coiled Coil Domänen, die in Intermediärfilamenten (IF), aber auch in anderen Proteinen vorkommen. Die Intermediärfilamente gehören neben den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli zu den 3 Klassen von Filamenten, die das Cytoskelett eukaryotischer Zellen bilden. Sie enthalten auf über 300 bis 350 Aminosäureresten verteilte Kernbereiche aus zwei- oder dreisträngigen superspiralisierten α-Helices (coiled coils), die von unterschiedlichen Sequenzen an jeder Seite flankiert werden. Vertreter dieser IF Proteine sind beispielsweise Tropo-/Myosin des Muskels, Fibrin von Blutgerinnseln und auch das Keratin der Haare. Diese Struktur zeigt ebenfalls das FHN3 Protein mit seinem zentralen Kernbereich abgeleitet aus Exon 9 bis 14, einer nicht helikalen C-terminalen Domäne (tail) und einer N-terminalen Domäne (head), die ebenfalls nicht helical ist (Abb. 3.14, vgl. Abb. 3.10). Die Abbildung 3.14 zeigt deutlich die limitierte Sequenzhomologie der Intermediärfilament-Proteine untereinander und doch kommt es zur Ausbildung ähnlicher Strukturen. Hier könnte somit für das FHN3 eine strukturelle Rolle innerhalb des Cytoskeletts angenommen werden. Mittlerweile sind jedoch die verschiedensten Mitglieder mit Einfluss in unterschiedlichste Bereiche besprochen, die bis zur Modulation und Kontrolle wichtiger Zellprozesse oder Einfluss in Signaltransduktionswege reichen. Angenommen werden jedoch weite Spektren an Funktionen, die bis heute nicht aufgeklärt sind.

Ein sehr typisches Merkmal der IF Proteine, das sich jedoch immer wieder zeigt, ist das Eingehen von Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt durch die Coiled Coil Domäne. Dadurch können die IF Proteine funktionelle Einflüsse in verschiedenste Bereiche erreichen. Demnach sollte das FHN3 auf möglich Proteine, die mit ihm in Wechselwirkung treten, untersucht werden. Mit Identifizierung von Interaktionspartnern wäre eine funktionelle Einordnung eventuell leichter zu erreichen.

a Protein Coiled Coil Repeat Filament (Prodom PD000002)

```
FHN3          291 QENTQLVHRVHELEEMVKDQETTAEQALEEEARRHREAYGKLEREKATEVELLNARVQQL 350
                  QEN QLVHR + LEE +K+QE  A + + EE RR +E   K+EREK+ E+E L  R+QQL
CoiledCoil    492 QENLQLVHRANALEEQLKEQELRACEMVLEETRRQKELLCKMEREKSIEIENLQTRLQQL 551

FHN3          351 EEENTELRTTVTRLKSQTEKLDEERQRMSDRLEDTSLRLKDEMDLYKRMMDKLRQNRLEF 410
                  +EEN+ELR+    LK+  E+L+EE+Q++ D +E  +LRL +E +  +RM D+L   R +F
CoiledCoil    552 DEENSELRSCTPCLKANIERLEEEKQKLLDEIESLTLRLSEEQENKRRMGDRLSHERHQF 611

FHN3          411 QKEREATQELIEDLRKELEHLQMYKLDCERPGRGRSASSGLGEFNARAREVELEHEVKRL 470
                  Q+++EATQELIEDLRK+LEHLQ+ KL+ E+  RGRS+S GL E+++RARE ELE EV+RL
CoiledCoil    612 QRDKEATQELIEDLRKQLEHLQLLKLEAEQRRGRSSSMGLQEYHSRARESELEQEVRRL 670

FHN3          471 KQENYKLRDQNDDLNGQI 488
                  KQ+N  L++QN++LNGQI
CoiledCoil    671 KQDNRNLKEQNEELNGQI 688
```

b Intermediate filament protein (pfam00038)

```
                                10        20        30        40        50        60
                           ....*....|....*....|....*....|....*....|....*....|....*....|
Consensus                     1 NEKEQMQNLNDRLASYIDKVRFLEQQNKELEVKIEELRQKQAP---SVSRLYSLYETEIE 57
FHN3                        327 aygklerekatevellnaRVQQLEEENTELRTTVTRLKSQT--------------EKLDE 372
gi 118453                    98 NEKVELQELNDRFANYIEKVRFLEQQNALMVAEVNRLRGKQP------TRVAEMYEEELR 151
gi 124212                    96 NEKAEMIELNDRLANFLDKVRSLEQQNKMLLAELEQVKGKRP------SKIGDLYEQELR 149
gi 121135                    68 SERAEMMELNDRFASYIEKVRFLEQQNKALAAELNQLRAKEP------TKLADVYQAELR 121
gi 129822                    93 NEKQELQELNDRFANFIEKVRFLEQQNAALRGELSQARGQEP------ARADQLCQQELR 146
                                70        80        90       100       110       120
                           ....*....|....*....|....*....|....*....|....*....|....*....|....*..
Consensus                   58 ELRRQIDQLTNERARLQLEIDNLREAAEDFRKKYEDEINLRQEAENDLVGLRKDLDEATLARVDLENKVESLQ 130
FHN3                       373 ERQRMSDRLEDTSLRLKDEMDLYKRMMDKLRQNRLEFQKEREATQELIEDLRKELEHLQMYKLDCERpgrgrs 445
gi 118453                  152 ELRRQVDALTGQRARVEVERDNLLDNLQKLKQKLQEEIQLKQEAENNLAAFRADVDAATLARIDLERRIESLQ 224
gi 124212                  150 ELRLQIDQISNEKSRVEVERDNLADDLQKLREKLQDEVIQREDAENNLAAFRQDVDDACLARLDLERKVETLQ 222
gi 121135                  122 ELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLATVRQKLQDETNLRLEAENNLAAYRQEADEATLARLDLERKIESLE 194
gi 129822                  147 ELRRELELLGRERDRVQVERDGLAEDLGALKQRLEEETRKREDAEHNLVLFRKDVDDATLSRLELERKIESLM 219
```

Abb. 3.14: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *FHN3* Gens von *Homo sapiens* im Vergleich zu bekannten Strukturmotiven. Ebene ***a*** Verdeutlicht die Coiled Coil Domäne des FHN3 gegenüber der Consensussequenz nach der Datenbank Prodom. Diese Domäne ist maßgebend beteiligt an der Intermediärfilament-Struktur. Der Bereich, der eine Zuordnung zu den Intermediärfilamentproteinen (IF) nach *b* erlaubt, ist in Klammern wiedergegeben. In ***b*** ist die Zuordnung zu den Intermediärfilamenten nach der NCBI/Pfam Datenbank, in Bezug auf die Consensussequenz abgebildet. Zusätzlich der Vergleich mit anderen Proteinen, die diese Struktur innehaben. gi118453 = „Desmin“, gi124212 = „Type III IF“, gi121135 = „Glial Fibrillary Acidic Protein“. Dargestellt ist in schwarz die Domänenstruktur, in blau strukturmaßgebende AS.

3.3.4.2 FHN3 Protein-Wechselwirkungen *in vivo* im 2-Hybrid-System

Die Protein Wechselwirkungen des FHN3 wurden mittels des 2-Hybrid-Systems ermittelt, das eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* darstellt. Es basiert auf der Regulation der Expression durch den Hefe Transkriptionsfaktor GAL4, der seine Funktion über zwei unabhängige Module ausübt, der GAL4-DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD). Die Isolierung interagierender Proteine aus einer Expressionsbank erfolgt über Konstruktion zweier Hybridmoleküle mit jeweils einer dieser Domänen. Das Baitplasmid bestand aus der DNA-Bindedomäne, fusioniert mit FHN3 (BD-FHN3), das AD-Konstrukt aus der Aktivierungsdomäne fusioniert mit exprimierten Sequenzen einer cDNA Bank aus fötalem Hirn (AD-Library). Entsteht eine Wechselwirkung des FHN3 mit einem Protein aus der Bank, kommt es zur räumlichen Nähe der zwei GAL4 Domänen und somit zum funktionsfähigen Transkriptionsfaktor. Dieser kann mit Hilfe der BD an die konstruierten, im Hefegenom fest integrierten cis-Elemente der zwei verschiedenen Promotorkonstrukte der Reportergene binden. Die Einleitung der Transkription der nachgeschalteten Reportergene, *his3* oder *lacZ* erfolgt durch die AD, wobei die Effizienz von den jeweiligen Promotorkonstrukten abhängt. Diese Konstrukte variieren sowohl von Hefestamm zu Hefestamm, als auch zwischen den verschiedenen Reportergenen. Eine erfolgte Expression kann für *his3*, das für ein Protein aus dem Histidin Stoffwechsel codiert, durch Wachstum auf Minimalmedium SD ohne Histidin nachgewiesen werden und die Synthese von ß-Galactosidase von *lacZ* zeigt sich durch Spaltung von X-GAL und resultierenden blau gefärbten Kolonien. Somit konnte ein indirekter Nachweis der Interaktion des FHN3 mit einem Protein aus der Bank durch Nachweis der Expression der Reportergene erfolgen.

3.3.4.2.1 Konstruktion und Eigenschaften der Komponenten

Vor dem eigentliche 2-Hybrid-Assay mussten die Hybridplasmide konstruiert und auf ihre Eigenschaften im geeigneten Hefestamm kontrolliert werden.

Für die erste Komponente, dem Bait-Konstrukt mit der GAL4-DNA-Bindedomäne, wurde der DNA-BD-Vektor pAS2-1 herangezogen, der am 5’ Ende der MCS den offenen Leserahmen für die GAL4-DNA-Bindedomäne (AS 1-147) besitzt. Er trägt die Marker AMP^R zur Selektion in *E. coli*, bzw. Trp^+ in *Saccharomyces cerevisiae*.

Letztere kann durch Wachstum auf Minimalmedium ohne Tryptophan kontrolliert werden. Wie in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt ist, wurde der Vektor pAS2-1 (*Sma*I/*Nco*I restringiert) mit einem PCR-Fragment ligiert, das an *FHN3* cDNA (Isoform I) mit den Oligonucleotiden 1wi und pwi7 amplifiziert und mit *Nco*I geschnitten wurde. Somit konnte ein Konstrukt generiert werden, das für ein Hybridprotein mit der GAL4-Bindedomäne am Aminoterminus und dem FHN3 am Carboxyterminus codiert. Durch die Wahl der Oligonucleotide und der Restriktionsenzyme wurde eine Orientierung in sense Richtung des *FHN3* Transkripts erreicht. Das resultierende FHN3 Protein beinhaltete die Aminosäuren 79 bis 540. Hier fehlten zwar dem Bait Protein 78 Aminosäuren des Aminoterminus und 15 AS des Carboxyterminus gegenüber dem nativen FHN3 Protein, aber die interaktionsvermittelnde Coiled Coil Domäne war enthalten. Nach Testrestriktionen und Sequenzierung verschiedener Bait-Plasmid Klone, konnten 2Hyb1-7 und 2Hyb3-7 identifiziert werden, die beide in frame das *FHN3* Transkript enthielten.

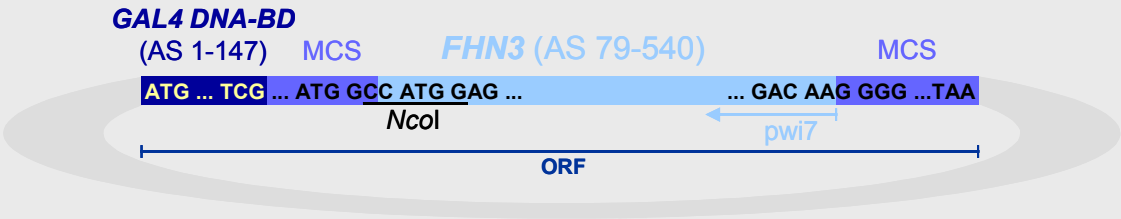


Abb. 3.15: Schematische Darstellung des Bait-Konstrukts mit dem Vektor pAS2-1, das in den 2-Hybrid Assay eingesetzt wurde. Gekennzeichnet ist der entstandene offene Leserahmen (ORF), der für 643 Aminosäuren (AS) codiert, 147 AS der GAL4-DNA-Bindedomäne (dunkelblau), 12 AS aus der Multiple Cloning Site (MCS, mittelblau), 462 AS aus FHN3 (hellblau), 22 AS aus MCS (mittelblau). Das *FHN3* Fragment ist generiert aus dem PCR-Produkt 1wi/pwi7, geschnitten mit *Nco*I, womit eine in sense gerichtete Einklonierung möglich war.

Für den 2-Hybrid-Assay wurde der Hefestamm Y190 herangezogen, der ein *lacZ*-Reporterkonstrukt trägt, das durch den nativen *GAL1*-UAS (*GAL1*-upstream activating sequences, cis-Element), einer TATA-Box mit *GAL1* Ursprung und dem *lacZ* Gen ausgezeichnet ist. Zusätzlich enthält er ein *his3*-Reporterkonstrukt mit dem *his3* Gen, das unter Kontrolle des selben *GAL1* UAS steht, jedoch zur Verstärkung der Expression zwei TATA Boxen (TC und TR) aus dem nativen Promotor des *his3* Gens besitzt. Durch diese Konstrukte kommt es bei einer GAL4-vermittelten Initiation der Expression, zu einer sehr starken Synthese beider Reporterproteine, wodurch selbst schwache Wechselwirkungen zwischen dem Bait-Protein und einem Bindepartner nachgewiesen werden können. Die

Konstrukte sind somit Idealerweise zum Screenen einer kompletten cDNA Bank geeignet. Nachteil des starken *his3*-Reporterkonstrukts ist die konstitutive Expression des *his3* Gens vermittelt durch die TC-TATA-Box, die in Wachstum der Hefemutanten auf Minimalmedium resultiert. Um dieser Selbstaktivierung entgegenzuwirken wurde 3-Amino-Triazol (3-AT), ein konkurrierender Inhibitor zum Hefe HIS3 Protein, eingesetzt. Zur Ermittlung der benötigten 3-AT-Konzentration wurden beide Klone 2Hyb 1-7 und 2Hyb 3-7 jeweils in den Hefestamm Y190 transformiert und auf Minimalmedium SD/-Trp/-His/+3AT selektioniert. Dabei wurden 3-AT-Konzentrationen von 2mM bis 60mM (2, 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45, 55 und 60mM) getestet. Nach drei Tagen konnte ein Wachstum bis zu einer Konzentration von 15mM, nach 6 Tagen bis zu 20mM und nach 10 Tagen bis zu 25mM festgestellt werden. Damit wurde deutlich, dass eine Selbstaktivierung des *his3* Reporters, sowohl von der Konzentration des eingesetzten 3-Aminotriazols, als auch von der Länge der Wachstumsphase abhängig war. Zur genauen Bestimmung der 3-AT-Konzentration wurde eine Versuchswiederholung mit Konzentrationen von 18–27mM und einer Wachstumsphase von 8 Tagen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass nach dieser Zeit bei 22mM 3-AT noch einige wenige Hefetransformanten zum Wachstum befähigt waren und bei 23mM keine mehr auf den Platten erschienen, womit die ideale 3-AT Konzentration zur Unterdrückung der *his3* Selbstaktivierung für spätere Versuche auf 23mM festgelegt wurde.

Für das zweite Hybridkonstrukt, das die GAL4 Aktivierungsdomäne fusioniert mit unterschiedlichen, exprimierten Sequenzen aus einer cDNA Bank enthält, war die Präparierung der käuflichen *E. coli* cDNA Bank nötig. Diese Bank enthält cDNA-Fragmente aus fötalem Hirn, kloniert im Vektor pACT2. Diese AD-Hybridplasmide tragen ebenfalls den Selektionsmarker AMP^R und zusätzlich den Marker Leu^+ zur Selektion in *S. cerevisiae* durch Wachstum auf Minimalmedium ohne Leucin.

3.3.4.2.2 Ermittlung der FHN3 Bindepartner durch den 2-Hybrid-Assay

Um sicher zu sein, dass alle in der cDNA Bank vorhandenen Sequenzen in die Hefe transformiert wurden, sollten ca. 10^6 transformierte Hefeklone analysiert werden. Um festzustellen, welche Plasmid-DNA Menge dazu eingesetzt werden musste, wurde eine Kontrolltransformation durchgeführt, um die Transformationseffizienz zu bestimmen. Danach wurde im Hauptansatz eine entsprechende

Plasmid DNA-Menge zur Transformation von Y190 Zellen, die bereits die Bait-Konstrukte 2Hyb1-7, bzw. 2Hyb3-7 trugen, eingesetzt. Eine erneute Bestimmung der Transformationseffizienz durch Ausplattieren eines Aliquots des Transformationsansatzes auf SD/-Trp/-Leu Platten zeigte, dass im Hauptansatz 0,97 x 10^6 Transformanten vorhanden waren.

Um Klone zu selektionieren, die mit FHN3 interagierende Proteine trugen, wurde der Hauptansatz auf SD/-Trp/-Leu/-His/+3-AT (23mM) aufgebracht. Nach 8 Tagen Wachstum waren 383 Klone deutlich erkennbar, die zur weiteren Selektion herangezogen wurden.

Die 383 Klone wurden einerseits erneut auf –His Minimalagarplatten plattiert, um die Aktivierung des *his3* Reporters zu bestätigen und andererseits auf SD/-Trp/-Leu Agarplatten, für Prüfung der Expression des 2. Selektionsmarkers *lacZ*. Von letzteren wurde ein Abklatsch der Kolonien auf Nitrocellulosefilter hergestellt, mit dem die Enzymreaktion des ß-GAL Assays durchgeführt wurde. Nach diesen zwei Selektionsschritten verblieben 9 Klone, die beide Reportergene aktivierten, d.h. möglicherweise mit FHN3-interagierende Proteine trugen.

Zur Bestätigung der Interaktion und um auszuschließen, dass die positiven Hefestämme mehr als ein AD-Library Plasmid trugen, wurden die Plasmide aus allen 9 Hefeklonen isoliert. Da die isolierten Plasmidlösungen sowohl das Bait-Plasmid, als auch eines bis mehrere AD-Plasmide enthalten konnten, wurde die gesamte Plasmidlösung in *E. coli* YM109 transformiert und jeweils 50 Einzelklone untersucht. Anschließend wurden die selektionierten AD-Library-Plasmide aus Einzelkolonien in Hefe rücktransfomiert. Zu Einzelhefekolonien mit AD-Library-Plasmid wurden dann BD-FHN3 Plasmide hinzutransformiert. Diese Art wurde mit zwei unterschiedlichen Hefestämmen parallel durchgeführt. Zum einen wiederum mit dem Hefestamm Y190, zum anderen mit CG-1945. Letzterer unterscheidet sich von Y190 durch andere Reporterkonstrukte, die zwar deutlich schwächere Expressionslevels aufweisen, aber insgesamt eine deutlich höhere Verlässlichkeit der Ergebnisse erreichen. Die Selektion erfolgte wiederum für den *his3* Reporter durch Ausplattierung der Doppeltransformanten auf –His Platten und für den lacZ Reporter durch Plattierung auf SD/-Trp/-Leu, Abklatsch der Hefekolonien und anschließender ß-Gal-Enzymreaktion.

Bei beiden Transformationsarten, sowohl mit dem Hefestamm Y190, als auch mit CG-1945, wurden 2 der 9 Doppeltransformanten durch die Selektion eliminiert. Die

restlichen sieben aktivierten im Hefestamm Y190 eindeutig beide Reportergene, hingegen im Hefestamm CG-1945 zeigten davon nur fünf Transformanten eindeutige Expression von *his3* und *lacZ*. Die verbleibenden zwei Hefeklone bildeten auf –His Minimalmedium nur sehr kleine Kolonien und zeigten nur eine minimale Blaufärbung bei der Enzymreaktion. Dies könnte auf eine sehr schwache Wechselwirkung der beiden enthaltenen AD-Library-Proteine mit FHN3 hinweisen.

Tab. 3.7: Charakterisierung der im 2-Hybrid Assay gefundenen cDNA Klone, die für Proteininteraktionspartner des FHN3 codieren. Die ersten vier Klone (1-4) waren eindeutig positiv, wobei Klon 4 im Assay doppelt isoliert wurde. Die Wechselwirkung zwischen FHN3 und den Klonen 5 und 6 war nicht eindeutig nachzuweisen. Syn.: Synonym; Unbekannte Funktion = es gibt keinerlei, bzw. wenig funktionelle Erkenntnisse; Accession Nummern geben cDNA Datenbank-Sequenzen wieder, in Klammern die genomische Lokalisation. Expression: (++) = sehr hoher Level, (+) = starker Level, (-+) = sehr geringer Level.

AD-Klon	Beschreibung	Accession Nummer (Chr./Lokus)	Expression
1	cDNA Klon HSYRA1000148 Unbekannte Funktion	XM_114083 (1p36.33) (ac068198)	Gehirn (++); Lunge, Niere,Testis (+); ubiqitär
2	Amyloid precursor-like protein 1 (APLP1), mRNA Transmembran Glycoprotein; Mitglied der APP-Familie; Funktion unbekannt	NM_005166 (19q13.1)	Gehirn (++); ubiqitär (+)
3	Hypothetisches Protein FLj11275, mRNA [soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP); Vesikeltransport] Funktion unbekannt	XM_005566 (9q31.1-31.3) (al359846)	Gehirn, Skelettmuskel, Placenta, Leber (++); ubiquitär (- +)
4 (2x)	Neuroblastoma (nerve tissue) Protein (AMY), mRNA; Syn.: Olfactomedin 1 (OLFM1) Unbekannte Funktion; eventuell essentielle Rolle im Nervengewebe	NM_006334 (9q34.3)	Nervenzellen des Gehirns (++); viele andere Gewebe (- +)
5	ADP-ribosylation factor related protein 1 (ARFRP1, ARP1), mRNA Inhibitiert ARF-abhängige Aktivierung der Phospholipase D; Transmembranprotein	NM_003224 (20q13.3) (AF217796)	Gehirn, Leber, Niere, Testis, Tymus (++); ubiquitär (- +)
6	Syntaxin binding Protein 3 (STXBP 3), mRNA, Syn.: Syntaxin 4 bindend; Munc-18c involviert in intrazellulären Vesikeltransport	XM_002163 (1p13.2) (NT_029862)	Gehirn (++); ubiquitär (- +)

Abschließend blieben somit fünf Klone mit gesicherter Interaktion und zwei mit schwacher Interaktionstendenz übrig, die mittels Sequenzierung der AD-Library-Plasmide näher charakterisiert wurden. Hier zeigte sich, dass zwei Klone dem

selben Gen zu zuordnen waren. Somit konnten mindestens vier Interaktionspartner, wenn nicht sechs des FHN3 Proteins gefunden werden. Eine zusammenfassende Darstellung der 2-Hybrid Assay Ergebnisse ist in Abbildung 3.16 zu sehen, wobei die Charakteristika der gefundenen Interaktionspartner kurz in Tabelle 3.7 aufgelistet wurden.

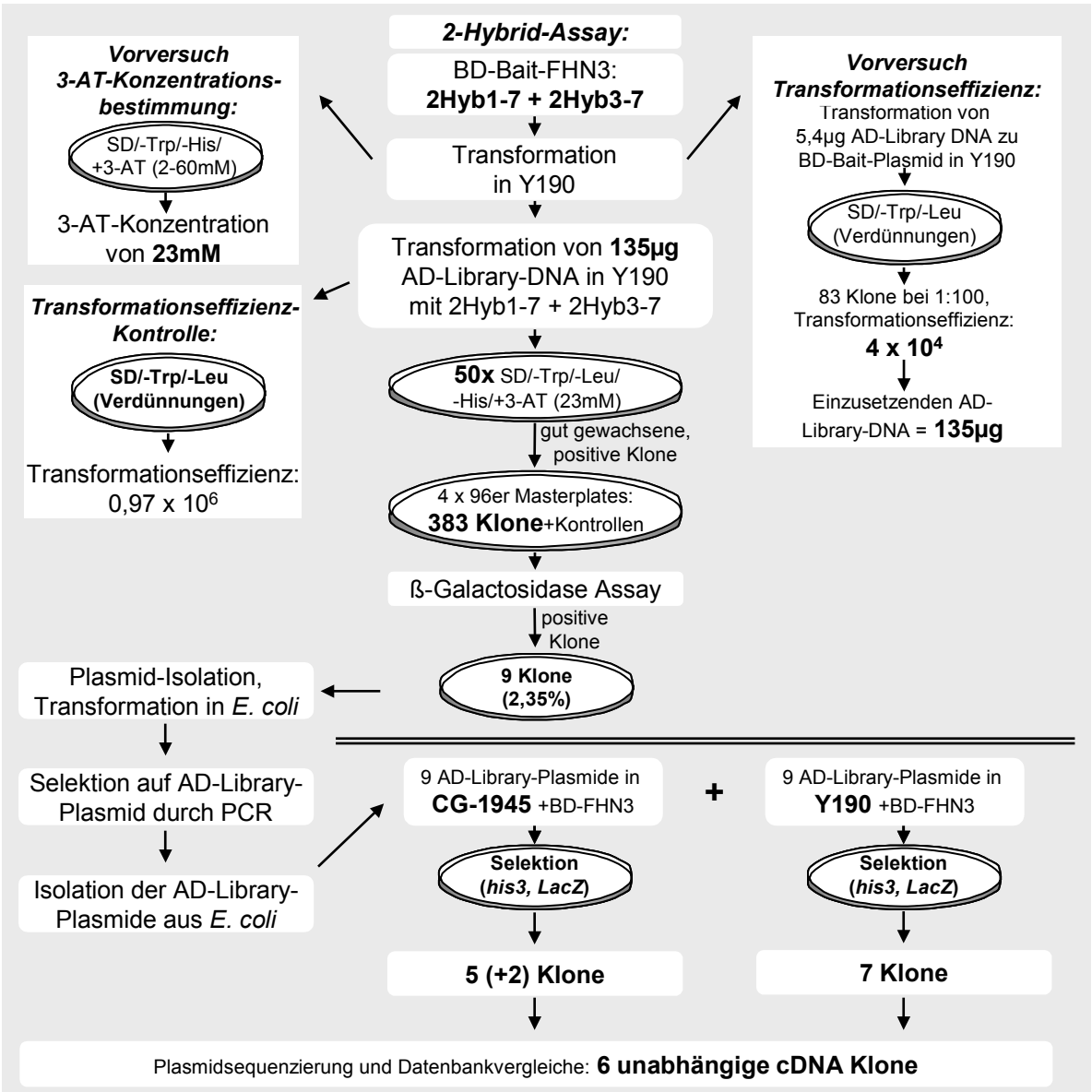


Abb. 3.16: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse im durchgeführten 2-Hybrid-System. Es ist in jedem Schritt die Anzahl der positiv verbleibenden AD-Library Klone angegeben. Zusammenfassend lieferte nach verschiedensten Selektionsschritten der 2-Hybrid Assay, durchgeführt mit einer Transformationseffizienz von 10^6, für das FHN3 Protein 4 unabhängige, sicher nachweisbare Interaktionspartner und 2 weitere, die eventuell nur eine sehr schwache Wechselwirkung mit FHN3 eingehen. SD/ = Minimalmedium; Y190 und CG-1945 = 2-Hybrid-Hefestämme; 3-AT = 3-Amino-Triazol.

3.3.4.2 FHN3 Protein-Wechselwirkungen *in vitro* im GST-Pulldown Assay

Zur Bestätigung der im 2-Hybrid-System gefundenen Interaktionspartner von FHN3, wurde ein Glutathion-S-Transferase (GST)-Pulldown Assay angewendet. Durch dieses System ist die Möglichkeit gegeben, Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* direkt nachzuweisen. Es beruht auf der Kombination zweier separat synthetisierter Proteinkomponenten. Ein möglicher Interaktionspartner wurde mittels radioaktiver *in vitro* Transkription/ Translation direkt an einem PCR Produkt synthetisiert, das am 5'-Ende mit einer T7-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz ausgestattet war. Die zweite Komponente FHN3 wurde als Fusionsprotein mit GST am Aminoterminus in einem speziellem *E. coli* Stamm produziert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Der Interaktionsnachweis erfolgte über Inkubation von gebundenem GST-FHN3 mit *in vitro* hergestellten Proteinen unter nativen Bedingungen, anschließender Abtrennung aller ungebundenen Proteine und abschließender Isolierung des FHN3-Protein-Komplexes aus immobilisiertem Glutathion. Durch die radioaktive Markierung der *in vitro* hergestellten Komponente, konnte diese unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Nur bei positiver Interaktion wird diese Komponente nachweisbar.

Mit dieser Methode sollte nun die Interaktion zwischen FHN3 und den 6 gefundenen Proteinpartnern bestätigt werden. Hierbei sollte auch vor allem die Wechselwirkung mit den Proteinen aus Klon 5 und 6 (vgl. Tab. 3.7), die im 2-Hybrid-System nur schwache Interaktion zeigten, abgesichert werden. Des weiteren konnte anhand der gefundenen Interaktion zwischen FHN3 und APLP1 (amyloid precursor- like protein 1) vermutet werden, dass FHN3 auch mit anderen Mitglieder der APP (amyloid precursor protein)-Familie in Wechselwirkung tritt. In der Literatur sind bisher mehrere Proteine beschrieben, die neben APLP1 auch mit APP (Amyloid precursor protein) und APLP2 (Amyloid precursor like protein 2) interagieren (Zambrano et al., 1997; Duilio et al., 1998; Homayouni et al., 1999). Daher sollte eine mögliche Wechselwirkung von FHN3 mit den Proteinen APP und APLP2 ebenfalls mit dieser Methode getestet werden.

3.3.4.2.1 Synthese des GST-FHN3 Fusionsproteins in *E. coli* und Aufreinigung mittels immobilisiertem Glutathion

Für die erste Komponente GST-FHN3, die in Abbildung 3.17 schematisch dargestellt ist, wurde ein Vektorkonstrukt aus pGEX-6P-1, ligiert mit einem RT-PCR Produkt des *FHN3* generiert. Durch die Wahl der Oligonucleotide hiwi1 und pwi7 entstand ein offener Leserahmen von 2355bp, wobei dem abgeleiteten GST-FHN3 Fusionsprotein 17 AS des Carboxyterminus des nativen FHN3 Proteins fehlten. Das Konstrukt wurde in den *E. coli* Stamm BL21 transformiert, auf LB-Amp$^+$ Agarplatten selektioniert und mehrere Klone mittels Pick-PCR überprüft. Nach der Plasmidisolation und Überprüfung des Konstrukts durch Sequenzierung, konnten zwei Klone, pGEX-FHN3-4 und -6 identifiziert werden, die ein Fusionsplasmid mit korrektem offenen Leserahmen ausgehend von *GST* über *FHN3* besaßen. Diese wurden zur Herstellung eines Fusionsproteins und deren Isolation herangezogen, die folgend kurz dargestellt ist.

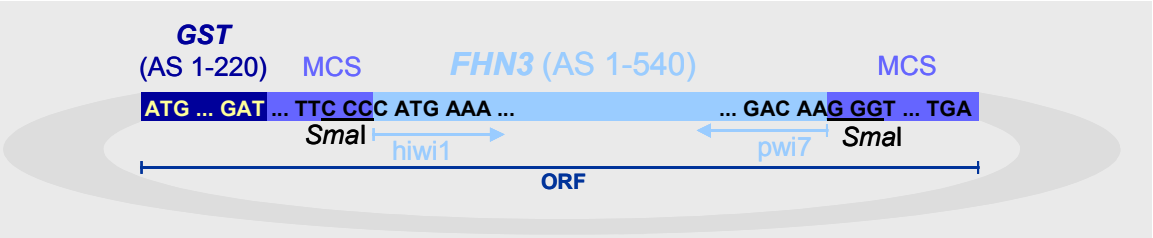


Abb. 3.17: Schematische Darstellung des *GST-FHN3*-Konstrukts mit dem Vektor pGEX-6P-1, das zur Produktion eines GST-Fusionsproteins in *E.coli* herangezogen wurde. Näher gekennzeichnet ist der entstandene offene Leserahmen (ORF), der für 784 Aminosäuren (AS) codiert, 220 AS des GST Produkts (dunkelblau) , 15 AS aus MCS (mittelblau), 540 AS aus FHN3 (hellblau), 9 AS aus MCS (mittelblau). Das FHN3 Fragment ist generiert aus PCR-Produkt hiwi1/pwi7 und blunt-end an der Restriktionsschnittstelle *Sma*I in den Vektor ligiert.

Nach Induktion mit IPTG der BL21 Klone pGEX-FHN3-4 und –6, sowie einem BL21 Klon mit Ausgangsplasmid pGEX-6P-1 als Kontrolle, konnten verstärkt Fusionsproteine, bzw. das GST-Protein hergestellt werden (Abb. 3.18; vgl. Spur 1:GST mit Spur 1:GST-FHN3-4 und -6). Die Bakterienproteine wurden insgesamt durch Pufferinkubation und Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht und zusätzlich von anfallenden Zelltrümmern und unlöslichen Proteinanteilen durch Zentrifugation befreit. Aus dieser Proteinlösung erfolgte eine chromatographische Isolation der GST-Proteine mittels der Glutathion-Sepharose. Nach jedem dieser 3 Schritte, Induktion, Abtrennung der Zelltrümmer und chromatographischer

Aufreinigung wurde jeweils eine Probe zur Überprüfung des vorhandenen GST-Proteins abgenommen und auf einer SDS-PAGE sichtbar gemacht (Abb.3.18).

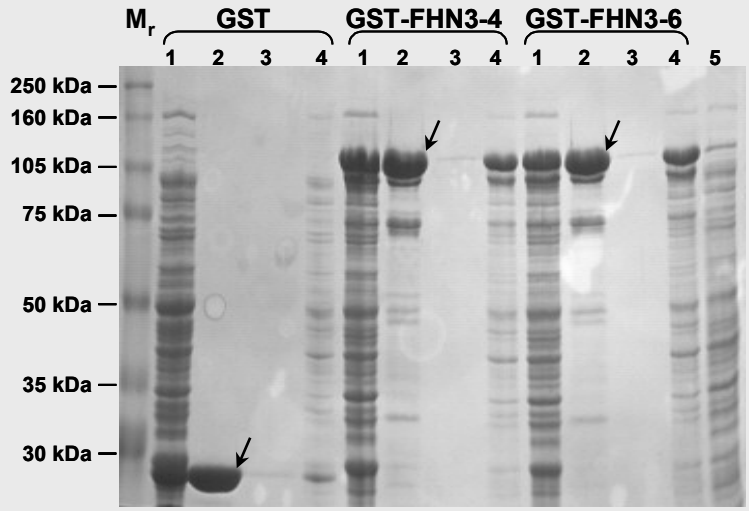


Abb. 3.18: SDS PAGE mit Coomassie blue Färbung von GST und GST-FHN3 Proteinen synthetisiert in *E. coli*. Gezeigt sind die Synthesen von GST, GST-FHN3 aus Klon4 und GST-FHN3 aus Klon 6. Aufgetragen ist entsprechend jeweils 1 = Bakterienlysat von BL21 mit IPTG induziert, 2 = Proteinlysat nach Aufreinigung über Methode I und Glutathion-Sepharose, 3 = Proteinlysat nach Aufreinigung über Methode II und Glutathion-Sepharose, 4 = Unlösliche, abgetrennte Proteine nach Aufreinigungsprozedur, 5 = Nicht-induzierte *E. coli* BL21mit pGEX-FHN3-6 Konstrukt. Die Pfeile markieren die aufgereinigten Proteine nach Methode I.

Abbildung 3.18 zeigt das jeweils induzierte, rekombinante Protein, das im Vergleich zu den Bakterienproteinen deutlich stärker synthetisiert wurde (jeweils Spuren 1). Hierbei erscheint eine 29kDa Proteinbande, das GST (26kDa der nativen GST mit weitere Aminosäuren, die aus der codierenden MCS stammen) und die ca. 110kDa Banden für die GST-FHN3-Fusionsproteine.

Die Spuren 2 zeigen diese Proteine GST, bzw. GST-FHN3, gekennzeichnet mit Pfeilen, nach Aufreinigung aus der Bakterienlösung (nach Methode 1). Die erfolgte Aufreinigung durch Glutathion-Sepharose belegte, dass unter nativen Bedingungen gearbeitet wurde und somit die vollständige Enzymaktivität des GST erhalten blieb. Diese war für den späteren Pulldown Assay notwendig, da so auch eine vollständige Aktivität des FHN3 angenommen werden konnte. Die zusätzlichen Banden stammen von Abbauprodukten, die durch Degradation der rekombinanten Proteine in *E. coli* entstehen. Die Proteinbande bei ca. 70kDa ist dem Hitzeschockprotein DnaK von *E. coli* zuzuordnen, welches in diese Degradation involviert ist, folgende Reaktionen jedoch nicht stört.

Die Spuren 3 verdeutlichen die Aufreinigung der rekombinanten Proteine mit der alternativen Methode II, die mit den verbliebenen Zelltrümmern aus Methode I durchgeführt wurde. Mit dieser Methode sollten die bisher nicht in Lösung gebrachten Proteine isoliert werden, wobei jedoch nur geringe Mengen an Protein aufgereinigt werden konnten.
Die Spuren 4 verdeutlichen, dass trotz der nacheinander angewendeten Methoden I und II, nicht die gesamten Fusionsproteine in Lösung gebracht werden konnten. Dies beruht auf der Tendenz von *E. coli*, fremdartigen Proteine in sogenannte Inclusion Bodys zu verpacken.
Die letzte Spur 5 zeigt die synthetisierten Proteine des Bakterienstamm mit GST-FHN3-6 Konstrukt ohne Induktion. Sie diente im Vergleich mit den Spuren 1 als Induktionskontrolle.

3.3.4.2.2 Herstellung der FHN3-Interaktionspartner durch *in vitro* Transkription/Translation

Für den Pulldown-Assay wurden die sechs gefundenen möglichen Interaktionspartner aus dem 2-Hybrid-System und zusätzlich die Proteine APP und APLP2 *in vitro* ausgehend von PCR-Produkten synthetisiert. Die schematischen PCR-Konstrukte und die Amplifikationen sind in Abbildung 3.19 aufgezeigt. Es wurden *APLP1*-Konstrukte aus dem AD-Library-Klon 2 des 2-Hybrid-Systems (vgl. Tab. 3.7) mit zwei verschiedenen Rückprimern generiert, womit zwei verschiedene Fragmente *APLP1-640* und *APLP1-653* entstanden. In den fehlenden 13 Aminosäuren im Carboxyterminus des resultierenden Proteins APLP1-640 gegenüber dem Protein ALPL1-653 befand sich das Protein-Interaktionsmotiv NPxY. Dieses Motiv stellt eine Bindungsstelle für cytoplasmatische Proteine dar, die auch als mögliche Bindungsstelle für FHN3 in Frage kam (Abb. 3.19a). Die PCR-Produkte für die Synthese der restlichen im 2-Hybrid Assay gefundenen Proteine, wurden ebenfalls an den jeweils dazugehörigen AD-Library-Plasmiden amplifiziert (Abb. 3.19b). Die Konstrukte zur Synthese von APP und APLP2 wurden an humaner Gehirn-RNA über RT-PCR amplifiziert. Es entstand für APP ein PCR-Fragment mit einer Länge von 2,2kb und für APLP2 ein Fragment mit 2,4kb, das jeweils den kompletten ORF der nativen Gene enthielt (Abb. 3.19c und d).

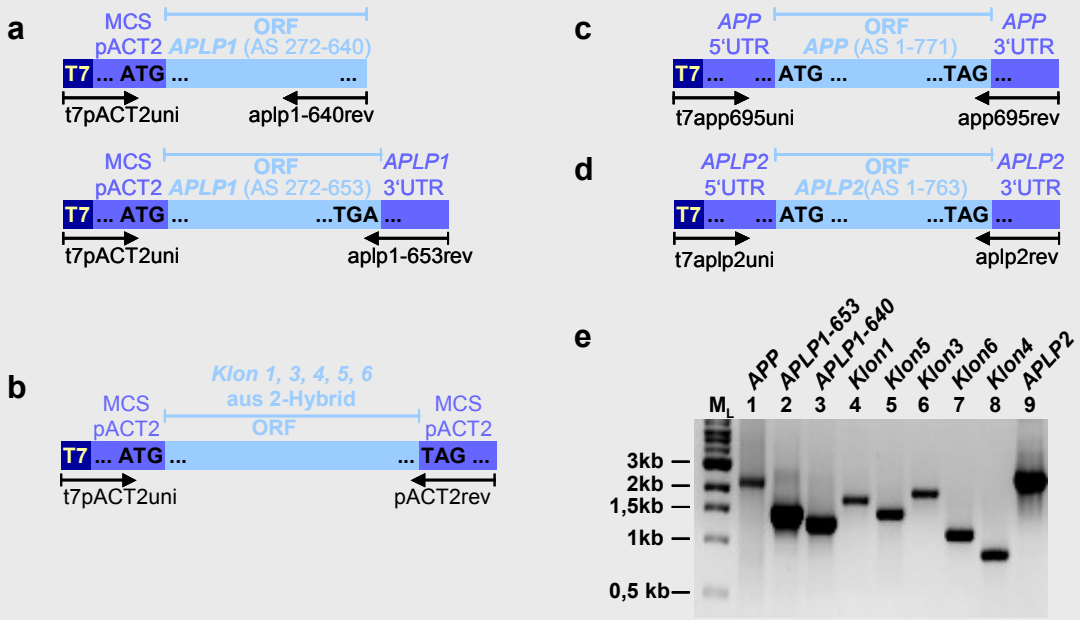


Abb. 3.19: Darstellung der PCR-Fragmente für die *in vitro* Transkription/Translation. In ***a - d*** sind die Konstrukte schematisch mit den jeweils eingesetzten Oligonucleotiden und dem entstandenen offenen Leserahmen, codierend für eine bestimmten Anzahl von Aminosäuren des Proteins, dargestellt. ***a*** beschreibt die Herstellung der zwei verschiedenen *APLP1* Konstrukte, die mit 2 unterschiedlichen Rückprimern an AD-Library-Klon 2 aus dem 2-Hybrid-System amplifiziert wurden. Bei *APLP1-640* fehlen gegenüber *APLP1-653* im resultierenden Protein die letzten 13 Aminosäuren des Carboxyterminus, welche die Proteininteraktionsdomäne (PI) einschließen. ***b*** zeigt die PCR-Konstrukte zur Synthese der anderen AD-Library Proteine aus dem 2-Hybrid-System (im Vergleich Tab. 3.7). ***c*** verdeutlicht die Konstruktion des *APP*-Fragments und ***d*** des *APLP2*-Fragments, jeweils amplifiziert an humaner Gehirn-cDNA. Ebene ***e*** zeigt die jeweils amplifizierten PCR-Produkte im Vergleich zum Längenmarker (1kb-Leiter, M_L).

Die erfolgte Proteinsynthese mit Hilfe der radioaktiven Transkription/Translation ausgehend vom jeweiligen PCR Fragment ist Abbildung 3.20 gezeigt. Hier bestätigte die SDS-PAGE, die mit Hilfe des GCG Programms zuvor berechnete Molekulargewichte von 87kDa, bzw. 89kDa für die Proteine APP und APLP2 (Abb.3.20, Spur 1 und 9). Es war jedoch nur sehr wenig APP Protein synthetisiert worden. Die zwei verschiedenen APLP1 Proteine und das Produkt aus Klon 1 (vgl. Tab. 3.7) mit jeweils ca. 40kDa konnten dagegen in größeren Mengen produziert werden (Spur 2, 3 und 4). Ebenfalls wurde eine starke Synthese des AMY Proteins mit 16kDa erreicht (Spur 8). Die geringere Menge an synthetisiertem ARFRP1 und SNAP zeigt Spur 5 und 6. Kein Protein ergab sich aus dem Fragment, das an AD-Library-Klon 6 amplifiziert wurde (Spur 7). Dessen erwartetes Produkt, Syntaxin Binding Protein 3 (STXBP3) war im 2-Hybrid System nur mit schwacher Interaktionstendenz aufgetreten. Sequenzanalysen zeigten, dass der offene Leserahmen vorzeitig durch einen Stopcodon unterbrochen war und nur ein kurzes Proteinfragment synthetisiert werden konnte, das durch die

Auflösungseigenschaften der SDS-PAGE nicht detektierbar war. Somit wäre auch eine schwache Interaktionstendenz dieses Protein im 2-Hybrid-System erklärbar, da ein trunkiertes Protein eventuell nicht die funktionelle Eigenschaften der nativen Form übernehmen kann und die Wechselwirkung mit FHN3 deutlich herabgesetzt sein könnte. Eine Interaktion mit diesem STXBP3 kann demnach weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

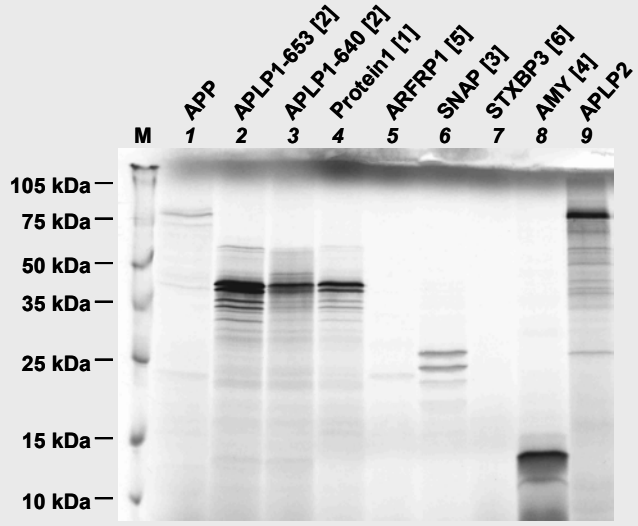


Abb. 3.20: Autoradiographie der durch *in vitro* Transkription/Translation an PCR-Fragmenten (vgl. Abb. 3.19) synthetisierte Proteine in Relation zum Molekulargewichtsmarker M. Das größte Protein mit ungefähr 80kDa war das APP *(*Spur *1),* das nur schwach zu synthetisieren war. Mit der selben Größe konnte das APLP2 produziert werden *(9),* gefolgt mit ca. 40kDa von APLP1 *(2+3)* und dem Produkt aus Klon 1 *(4)* des 2-Hybrid-Systems. Das kleinste Protein mit ca. 15kDa ist AMY *(8).* Von diesen Proteinen konnte eine größere Menge synthetisiert werden. Eine geringere Produktion zeigte sich vom ungefähr 25kDa großen SNAP (6). Eine sehr geringe Synthese ist bei ARFRP1 mit 23kDa zu beobachten *(5).* Kein Produkt war aus Klon 6 herzustellen, der für STXBP3 codiert *(7).* Letztere zwei zeigten im 2-Hybrid-Assay nur schwache Interaktionstendenz. Jeweils in Klammern [ ] angegeben, ist die Nummer des entsprechenden AD-Library Klons des 2-Hybrid-Systems.

Die verbliebenen acht verschiedenen Proteinprodukte konnten in den Pulldown Assay eingesetzt werden. Beim Pulldown Assay wurde jedes *in vitro* hergestellt Protein sowohl mit an Glutathion-Sepharose gebundenem GST Protein, als auch mit GST-FHN3-Fusionsprotein inkubiert. Eingesetzt wurden identischen Mengen an radioaktiv markiertem Protein und ein Überschuss an gekoppeltem GST, bzw. GST-FHN3 Protein. GST ohne Fusionspartner sollte als Negativ-Kontrolle dienen, mit dem die Proteine nicht in Wechselwirkung treten sollten.

Abbildung 3.21 verdeutlicht, dass in den meisten Fällen sich die potentiellen Bindepartner auch in den Proben mit GST ohne Fusionspartner befinden. Dies ist auf technische Gründe zurückzuführen, die durch eine Verfahrensänderung

beseitigt werden könnten. Jedoch aus Zeitgründen war eine Versuchswiederholung innerhalb dieser Arbeit nicht mehr möglich.

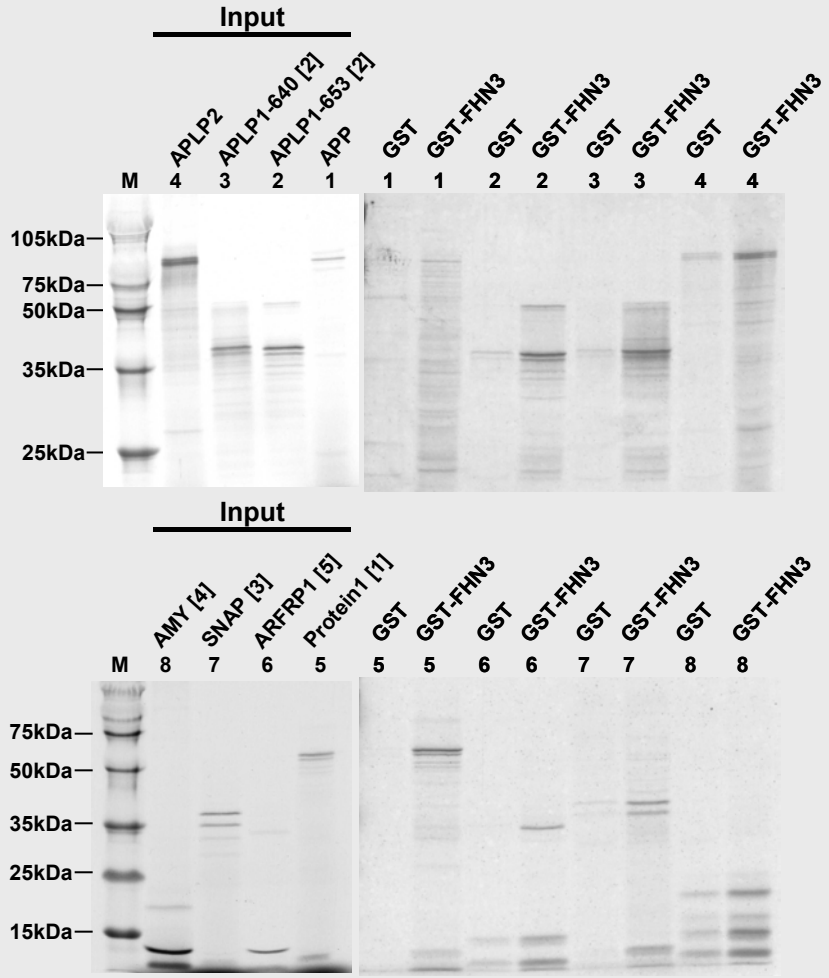


Abb. 3.21: Autoradiographie des Pulldown Assays. Dargestellt sind die Inputs, der durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellten Proteine (1-8). In eckigen Klammern [ ], die Klonnummern aus dem 2-Hybrid-System. Die Proteine jeweils in gleichen Mengen inkubiert mit GST-, bzw. GST-FHN3 Fusionsprotein und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Anschließend gewaschen und mit reduziertem Gluathion eluiert. Nach Denaturierung des Lysats konnten die radioaktiven Interaktionspartner von FHN3 sichtbar gemacht werden. Eine deutliche Anreicherung nach Bindung mit GST-FHN3 ergab sich für APLP1-653 (Spuren 2), APLP1-640 (3), Protein1 aus Klon1 (5), ARFRP1 (6) und SNAP (7). Eine schwache Anreicherung gegenüber Inkubation mit GST ohne Fusionspartner erfolgte bei AMY (8), APP (1) und APLP2 (4), womit bezüglich der Interaktion mit FHN3 für diese drei keine eindeutige Aussage gemacht werden kann.

Eine deutliche Anreicherung, nach Bindung an die GST-FHN3 Fusionsproteine im Verhältnis zur Probe mit GST ohne Fusionsprotein, ergab sich jedoch für beide APLP1 Proteine (Abb. 3.21; Spuren 2 und 3). Dieses Ergebnis zeigt neben der bestätigten Interaktion zwischen FHN3 und APLP1, dass FHN3 nicht an das 13 AS große Interaktionsmotiv bindet, das in APLP1-653 im Gegensatz zu APLP1-640 enthalten war. Eine ebenfalls deutlich höhere Menge nach Bindung an GST-FHN3 Fusionsprotein gegenüber GST lässt sich für Protein1 aus Klon1 (Spur 5),

ARFRP1 (Spur 6) und SNAP (Spur 7) detektieren. Somit kann für diese 4 Proteine, die ebenfalls im 2-Hybrid-System als Interaktionspartner auftraten, eine Wechselwirkung *in vitro* mit dem FHN3 Protein angenommen werden.
Dagegen findet man bei AMY, APP und APLP2 nur eine schwache Anreicherung nach der Bindung an GST-FHN3 Fusionsprotein im Vergleich zur Probe mit GST ohne Fusionsprotein. Folglich kann für diese drei Proteine mit diesem Versuch keine eindeutige Aussage im Hinblick auf eine Interaktion mit FHN3 gemacht werden. Dessen ungeachtet agiert das AMY Protein als Interaktionspartner von FHN3, was im 2-Hybrid-System für dieses Protein, sogar mit Isolation zweier Klone aus der cDNA Bank, eindeutig nachgewiesen werden konnte.
Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass mit größter Wahrscheinlichkeit die 6 verschiedenen Proteine, die im 2-Hybridsystem gefundenen wurden, mit FHN3 interagieren. Es handelt sich dabei um ein bisher nahezu unbekanntes Protein und ein ebenfalls funktionell nicht beschriebenes „soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment Protein“ (SNAP). Weiter tritt FHN3 mit dem Transmembran-protein Amyloid precursor-like Protein 1 (APLP1) und dem AMY Protein, das eine zentraler Rolle im Nervensystem einnimmt, in Wechselwirkung. Ferner konnte die Interaktion mit ADP-ribosylation factor related Protein 1 (ARFRP1) nachgewiesen werden, ebenfalls ein Transmembranprotein, das in die Regulation der Phospholipase D Aktivierung involviert ist. Letztendlich findet sich noch eine schwache Interaktionstendenz mit dem Syntaxin binding Protein 3 (STXBP3), welches in den intrazellulären Vesikeltransport eingreift. Über eine mögliche Wechselwirkung des FHN3 mit APP und APLP2 kann anhand der Pulldown Ergebnisse keine eindeutige Aussage gemacht werden. Es konnte weder eine Interaktion bestätigt, noch ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung des *NF1* Lokus mit Hilfe des Modellgenoms *Fugu rubripes*

Innerhalb dieser Arbeit war die Problematik von NF1 Patienten mit großen Deletionen aufgegriffen worden, die eine deutlich schwerere Symptomatik einer NF1 Erkrankung aufweisen als Patienten mit intragenen Mutationen. Deletionspatienten sind meist von gehäuftem Auftreten vieler Neurofibrome, Gesichts- und Skelettanomalien, sowie von mentaler Retardierung betroffen. Diese starke Manifestation wird mit einem contiguous gene Syndrome erklärt, wobei codeletierte Gene einen entscheidenden Einfluss auf den ausgeprägten Phänotyp besitzen können. Flankierende Gene zum *NF1* Gen waren jedoch bis dato nicht beschrieben und sollten daher im Rahmen eines größeren Projekts der Abteilung identifiziert und charakterisiert werden. Für die Verwirklichung wurde das Modellgenom *Fugu rubripes* herangezogen, das sich bisher bei vergleichender Kartierung mit dem humanen Genom zum besseren Verständnis erbbedingter Krankheiten des Menschen als nützlich erwiesen hatte. Durch die Charakterisierung des *NF1* Gen Lokus bei *Fugu rubripes* sollte Aufschluss über flankierende Bereiche im humanen Genom geschaffen werden. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits der hohe Konservierungsgrad des *NF1* Gens der beiden Spezies gezeigt werden. So erreicht das kompakte, 27kb genomische DNA umspannende *NF1* Gen bei *Fugu rubripes* ein ca. 10fach geringeres Ausmaß als das humane Gegenstück mit ungefähr 280kb. Die aus dem codierenden Anteil abgeleiteten AS-Sequenzen der orthologen Proteine wiesen eine Ähnlichkeit von 91,5% auf (Kehrer-Sawatzki et al., 1998). Ebenfalls konnte eine hohe Konservierung des 5'flankierenden Gens bei *Fugu rubripes*, des *Nlk* Gens aufgezeigt werden. Die Ähnlichkeit des FN5 Proteins von *Fugu* zum humanen Gegenstück ist mit 81,7% und innerhalb der funktionellen Kinase Domäne noch deutlich höher mit 98,2% ausgeprägt (Kehrer-Sawatzki et al., 2000). Hier spiegelte sich auch der Zusammenhang der Konservierung mit funktionell wichtigen Proteindomänen wieder, der bereits von Elgar et al. (1995) erkannt wurde. In dieser Arbeit wurde nun ein weiteres Gen bei *Fugu*, das *FN5* Gen zwischen *Nlk* und *NF1* charakterisiert. Es wird in zwei Isoformen von 1559bp und 1655bp transkripiert, die beide für ein Protein mit 59 Aminosäuren codieren. Mit Hilfe dieser Daten

gelang es, die humane *FN5* mRNA mit 954 Nucleotiden zu charakterisieren. Vergleicht man diese mit den *FN5* Transkripten von *Fugu*, findet man keine Ähnlichkeit mit Ausnahme des codierenden Bereiches. Bei beiden Spezies resultiert dieser in einem Protein von 59 Aminosäuren und die orthologen Proteine zeigen eine Übereinstimmung von 80%. Obwohl keine Strukturmotive innerhalb der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ausgemacht werden konnten, spricht diese Konservierung für eine vergleichbare Funktion zwischen den Spezies. Somit sind die bei *Fugu rubripes* lokalisierten Gene des *NF1* Lokus, *NF1* und *Nlk*, sowie auch das *FN5* Gen, zumindest im codierenden Bereich, im Lauf der Evolution stark konserviert geblieben. Im Gegenteil dazu zeigte sich keine Konservierung der Genabfolge im Vergleich *Fugu* und Mensch. Die Untersuchungen zeigten, dass die Gene *Nlk*, *FN5* und *NF1* bei beiden Spezies syntän lokalisiert sind, eine identische Anordnung jedoch nicht gegeben ist. Das *FN5* Gen konnte im humanen Genom wie das *NF1* Gen auf Chromosom 17 lokalisiert werden, jedoch mehrere Mb distal im Bereich der Banden q21.3-q22. Ebenso war das *Nlk* Gen nicht in direkter Nachbarschaft, sondern auf 17q11.2 zwischen den Markern D17S935 und D17S120, also deutlich proximal vom *NF1* Gen lokalisiert worden (Kehrer-Sawatzki et al., 2000). Die bei *Fugu* direkt 3'flankierenden Gene zum *NF1* Gen, *AKAP84*, *BAW* und *WSB1* zeigen ebenfalls keine konservierte Genabfolge (Kehrer-Sawatzki et al., 1999). Im humanen Genom liegen die Gene *AKAP84* und *BAW* noch weiter distal als das *FN5* Gen, wohingegen das *WSB1* Gen weiter proximal als das *Nlk* Gen zu finden ist. Somit ist für die gesamte *NF1* Genregion von *Fugu* eine Syntenie auch im menschlichen Genom gegeben, d.h. sämtliche in der Region identifizierten Gene konnte beim Menschen auf Chromosom 17 lokalisiert werden. Dagegen ist eine konservierte Genabfolge komplett auszuschließen, womit eine Beteiligung der bei *Fugu* identifizierten Gene am Phänotyp von NF1 Deletionspatienten nicht gegeben ist. Hier stellt sich die Frage, ob die Nichtkonservierung der *NF1* Genregion einen Ausnahmezustand darstellt, da bisher in vielen Regionen identische Genanordnung bei *Fugu rubripes* im Vergleich zum humanen Genom beobachtet werden konnte (Baxendale et al., 1995; Schofield et al., 1997; Nadeau et al., 1998; Gellner und Brenner, 1999). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten verstärken demnach Aufzeichnungen wie von Gilley et al. (1997), die eine konservierte Genabfolge ausschließlich innerhalb von Clustern mit Genfamilien beobachteten. Sie postulierten eine konservierte

Genabfolge im Laufe der Evolution ausschließlich bei funktionellem Zusammenhang der Gene. Im Bereich des *NF1* Gens konnte jedoch höchstens mit einem Modifier Gen zur Potenzierung der Tumorgenese gerechnet werden, nicht mit weiteren funktionell zusammenhängenden Genen und demnach war nach dieser Hypothese die Aufhebung der Konservierung erwartungsgemäß. Andere Untersuchungen widersprachen jedoch dieser allgemeinen Annahme und zeigten andere Beispiele konservierter Genabfolge ohne funktionellen Zusammenhang auf. Beispielsweise untersuchte Miles et al. (1998) die mögliche konservierte Genabfolge im *Fugu* Genom zur Region auf 11p13 des humanen Genoms. Dieser Bereich umspannt drei bekannte Gene, *PAX6, RCN1* und *WT1*, deren Heterozygotieverlust durch eine Deletion im WAGR Syndrom resultiert. Diese 3 Gene umspannen im humanen Genom einen Bereich von 750kb und sind voneinander funktionell unabhängig. Die Autoren identifizierten diese drei Gene und zusätzlich zwei neue in diesem Bereich im *Fugu* Genom. Die Analyse der Genabfolge der 5 Gene im humanen Genom zeigte eine identische Genanordnung. Somit war diese Region ein Beispiel konservierter Genabfolge in einem enormen Bereich beim Menschen von 1,5Mb, im Gegensatz zu 100kb bei Fugu und demonstrierte das Vorkommen konservierter Bereiche mit identischer Genanordnung auch außerhalb von Genfamilien. Demzufolge scheint das Auftreten konservierter Genombereiche mit identischer Genanordnung zwischen Mensch und *Fugu* zufallsbedingt zu sein und es kann keine Vorhersage darüber gemacht werden. Neuste genomweite Studien dazu wurden von Aparicio et al. (2002) durchgeführt, die das Vorkommen konservierter Bereiche untersuchten. Sie verglichen das humane mit dem *Fugu* Genom im Hinblick auf putative, in ihrer Genanordnung identische Segmente, die über Statistikprogramme ermittelt wurden, sowie Unterbrechungen dieser Bereiche durch unabhängige Gene. Allgemein konnte das Vorhandensein vieler kurzer, konservierter Genomsegmente mit identischer Genabfolge aufgezeigt werden. Diese Konservierung nimmt jedoch exponentiell mit der Zunahme an Genen in einem Segment ab. Dieses Bild wurde ebenfalls beim Vergleich Maus und Mensch beobachtet (Lander et al., 2001) und verdeutlicht, dass je größer ein Segment gewählt wird und demnach je mehr Gene in diesem Segment lokalisiert sind, umso seltener findet man eine konservierte Genanordnung. Demnach kann diese exponentiell abfallende Konservierung identischer Genabfolge über große Regionen als Wiederspiegelung der

Separierung der Spezies über 450 Millionen Jahre angesehen werden. Überträgt man nun diese Daten auf die *NF1* Genregion, die ein großes Segment mit mehreren Genen wiederspiegelt, so wird deutlich, dass das gefundene Bild der *NF1*-Genregion eher der Norm als einer Ausnahme entspricht. Aparicio et al. untersuchten ferner Segmente, in denen die Genanordnung durch intervenierende, unabhängige Gene unterbrochen war. Diese Segmente, die keine konservierte Genanordnung, jedoch noch eine Syntenie innerhalb des Segments aufwiesen, zeigten wiederum eine exponentielle Abhängigkeit von der Anzahl enthaltener Gene. Wiederum konnten sie innerhalb kurzer Segmente häufiger syntäne Gene finden. Auffällig war jedoch, dass zwischen syntänen Genen meist maximal 5 intervenierte, unabhängige Gene gefunden werden konnten. Somit findet man beim Mensch in Relation zu *Fugu* zwar wenige konservierte Genabfolgen, die sich dann meist auf sehr kurze Abschnitte beschränken, aber viele Bereiche mit syntänen Genen, die nur durch eine geringe Anzahl an intervenierten Sequenzen separiert sind. Demzufolge sind auch *Nlk* und *NF1* Gen im humanen Genom durch integrierte Gene mehrere Mb im Vergleich zu *Fugu* distanziert worden. Zieht man jedoch noch die Anordnung der anderen charakterisierten Gene, *FN5*, *AKAP84*, *BAW* und *WSB1* in Betracht, so wird deutlich, dass im Lauf der Evolution nicht nur Insertionen vorkamen, sondern dass die *NF1* Genregion wohl mehreren genomischen Umstrukturierungen unterlag. Insgesamt zeigen die Daten aus den neuen Genomanalysen von Fugu, dass solche Insertionen und Umstrukturierungen mit Erhalt der Syntenie, wie sie in der *NF1* Region beobachtet wurden, nichts außergewöhnliches sind. Eher scheinen die früheren Beispiele konservierter großer Genregionen zu den Ausnahmefällen zu zählen. Für bestimmte genomische Bereiche war der Vergleich *Fugu* und Mensch sicherlich vorteilhaft, jedoch mit den heutigen Daten erscheint das *Fugu* Genom als Modellgenom im Hinblick vergleichender Lokalisationsstudien eher bis auf Ausnahmefälle unbrauchbar. Jedoch bleibt *Fugu* als Modellgenom zur Identifizierung wichtiger funktioneller Domänen und Sequenzabschnitte nach wie vor interessant.

4.2 Expression der Gene zwischen den *NF1* flankierenden Duplikons

Durch die Entdeckung der *NF1* flankierenden Duplikons (Dorschner et al., 2000) und die daraus resultierenden, vorwiegend auftretenden Deletionen der

intervenierten Sequenzen und der Tatsache, dass die bisher charakterisierten Gene nicht innerhalb dieses Bereiches lokalisiert waren, wurden weitere Untersuchungen nötig. Die Analyse der Bereiche zwischen den paralogen Loci erlaubte die Identifizierung von 16 exprimierten Sequenzen, die bei einem Großteil der NF1 Deletionspatienten codeletiert sind. Hinter diesen ESTs konnten Gene vermutet werden, die ursächlich bei Codeletion an der erschwerten NF1-Symptomatik dieser Patienten beteiligt waren. Daher sollte auf diese ESTs in Zukunft das Hauptaugenmerk gelegt werden, um den Phänotyp besser verstehen zu können. Innerhalb dieser Arbeit sollte versucht werden, ein Gen zu identifizieren, das an der Ausprägung des Merkmals „mentale Retardierung“ beteiligt sein könnte. Beobachtungen zeigten, dass Deletionspatienten häufiger einen deutlich eingeschränkteren Intellekt aufweisen als Patienten mit intragenen Mutationen (Wu et al., 1995; Leppig et al., 1997; Upadhyaya et al., 1998). Als erster Schritt zur Identifizierung eines Kandidatengens sollte die gehirnspezifische Expression der ESTs überprüft werden. Die Analysen der 16 ESTs ergab, dass 15 davon im Gehirn, nur ein EST dort nicht exprimiert wird. Somit scheint das *NF1* Gen in einem hirnspezifischen Gencluster zu liegen, das den gesamten Bereich innerhalb der NF1REPs abdeckt. Drei dieser ESTs, n25049, m79255 und h29300, waren nur im Gehirn, nicht in Fibroblasten exprimiert und wurden aufgrund dieser hirnspezifischen Expression näher analysiert.

4.3 Das *FHN3* Gen und seine Isoformen

Die nähere Charakterisierung der drei ESTs n25049, m79255 und h29300 zeigte dann, dass alle drei dem selben Gen zuzuordnen waren, dem *FHN3* Gen (flanking the human *NF1* gene in 3’direction). Das *FHN3* Gen erstreckt sich über 142kb genomischer DNA. Sein 5’-Ende ist 14kb distal vom 3’-Ende des *NF1* Gens lokalisiert. Die genomischen überlappenden NCBI Datenbanksequenzen ac004526 und ac003101 enthalten beide Gene, jedoch nicht den Promotor und Exon 1 des *FHN3* Gens. Es konnte nachgewiesen werden, dass an dieser Stelle der ac004526 Sequenz 700bp fehlen, die einen sehr hohen GC-Gehalt von 80,1% aufweisen, in Kontrast zu einem durchschnittlichen GC-Gehalt des *FHN3* Gens von 51% (Eisenbarth et al., 2000). Diese Datenbanksequenz wurde im Rahmen des humanen Genomprojekts aus einem „bacterial artificial chromosome“ (BAC)-Klon generiert, der aus der RPCI-11 Library, der Hauptquelle des Genomprojekts

stammt. Osoegawa (2001) untersuchte diese Library nach solchen Artefakten und identifizierte dabei innerhalb der untersuchten Klone 11% mit Rearrangements, jedoch keine Deletionen. Potentielle, kleine Deletionen konnte er jedoch anhand der Untersuchungsmethoden nicht ausschließen. Dies war demnach im Falle der ac004526 Sequenz aufgetreten. Hier ist sogar eine wichtige Region, nämlich der komplette Promotorbereich, sowie das 5'-Ende des *FHN3* Gens betroffen und macht deutlich, dass Genombereiche durch Sequenzanalyse mehrerer Klone abgedeckt werden müssen, um solchen Effekten entgegenzuwirken. Durch Sequenzierung eines Restriktionsfragments eines Cosmids aus dem *NF1*-Genlokus gelang es, diesen Bereich zu analysieren und das *FHN3* Gen vollständig zu charakterisieren. Es ist in mindestens 23 Exons organisiert, von denen 15 konstitutiv und 8 alternativ, gewebsspezifisch gespleißt werden. Zusätzlich finden sich drei alternative Polyadenylierungsstellen. Insgesamt resultiert dies in 6 verschiedenen Transkripten, die als Isoformen I-VI bezeichnet wurden.

Die Isoform VI wird hirnspezifisch exprimiert. Dies verdeutlichte die Hybridisierung des MTE Expressionsblot, die ausschließlich sehr schwache Signale in sämtlichen Gehirn-Geweben und leicht verstärkt im Kleinhirn zeigte. Die Transkriptform mit 1108bp umfasst Exon 1, 1b und 1c und nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als sie außer Exon 1 mit den anderen Transkripten nichts gemeinsam hat. Die Spleißseiten des Intron 1 bestehen aus den üblichen Dinucleotiden GT an der 5'-Spleißstelle und AG an der 3'-Spleißstelle. Hingegen finden sich im Intron 2 die alternativen Nucleotide GC-AG. Dieses alternative Spleißmotiv findet man relativ selten bei 0,76% aller zu spleißenden RNAs. Jedoch ist es neben der dominierenden Form GT-AG, die mit 98,12% auftritt, die zweithäufigste Variante (Lander et al., 2001). Des weiteren ist die Transkriptform polyadenyliert, besitzt jedoch keinen definierten, offenen Leserahmen. Durch letzteres muss Isoform VI den nicht-codierenden „mRNA-like" RNA Transkripten zugeordnet werden. Solche nicht-codierenden RNAs (ncRNA) werden meist, wie im Falle der Isoform VI geschehen, polyadenyliert und ohne offenen Leserahmen gespleißt (Erdmann et al., 2000). Sie fungieren direkt als strukturelle, katalytische oder regulatorische RNA-Transkripte und werden oftmals deutlich schneller von ihren Genen transkripiert als protein-codierende Transkripte (Eddy 1999; Erdmann et al., 2001). Die Anzahl und Verschiedenheit von ncRNA Genen ist bis heute nicht bekannt

und scheint auch durch die momentan verwendeten Methoden der Genomanalyse, weiter unklar zu bleiben. Wenige Arbeiten beschäftigen sich jüngst mit dieser Problematik (Hüttenhofer et al., 2001; Lee et al., 2001; Lau et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001). Neue vergleichende Analysen des *E. coli* Genoms machten deutlich, dass das Vorhandensein von ncRNA Genen bis heute bei weitem unterschätzt wurde (Argaman et al., 2001; Rivas et al., 2001; Wassarman et al., 2001). Bei Säugern sind verschiedenen ncRNA Gene vor allem in imprinteten Regionen beschrieben wie beispielsweise *IPW* (imprinted in Prader-Willi Syndrom) und *H19*, deren Produkte als funktionelle Transkripte fungieren (Tilghman, 1999; Brannan et al., 1999; Meguro et al., 2001). Viele dieser ncRNAs sind cis-antisense RNAs, die eine codierende Region auf dem komplementären Strang überlappen und nach der Transkription als posttranskriptionelle Regulatoren ihre Funktion ausüben. Mittlerweile wurden auch ncRNAs beschrieben, die direkt als Kandidatengene für humane Genkrankheiten angesehen werden. So beschrieben beispielsweise Ridanpää et al. (2001) eine Cartilage-hair hypoplasia (CHH)-assoziierte Mutation im *RMRP*ncRNA Gen, von dem die RNA Komponente der Ribonuclease MRP (mitochondrial RNA processing) transkripiert wird (Topper und Clayton, 1990; Clayton, 2001). Insgesamt wurden immer mehr ncRNAs identifiziert, die anscheinend spezialisierte biologische Rollen spielen. Beispiele zeigen oftmals ein Vorkommen in Gehirngewebe, wo sie die Regulation neuronaler Funktionen oder anderer zellulärer Prozesse steuern (French et al., 2001; Sawata et al., 2002). Viele sind in die sequenzspezifische Erkennung anderer Nukleinsäuren durch komplementäre Basensequenzen involviert (Kiss, 2001; Lease et al., 1998). Durch solche komplementäre ncRNAs kann die Expression einfach durch sterische Hemmung der Ziel DNA oder mRNA post- oder transkriptionell reguliert werden. Diese Art der Regulator-Gene wurden bereits im Jahre 1961 von Jakob und Monod erkannt und beschrieben. Sie unterschieden im lac-Operon-Modell zwischen Strukturgenen (wie *lacZ*) und Regulatorgenen (wie *lacI*), wobei die resultierenden Proteine letzterer als Regulatoren der Strukturgene dienen. Die Autoren entwarfen anhand dieser Beobachtungen ein Modell zur Regulation der Expression durch untranslatierte RNAs. Dieses zeigt auf, dass Strukturgene mRNAs produzieren können, die für bestimmte Proteine codieren. Die Regulatorgene jedoch produzieren ncRNAs, die durch Basenpaarung mit Operatoren interagieren und so

entweder auf DNA-, transkriptionaler Ebene oder auf mRNA-, posttranskriptionaler Ebene die Transkription oder Translation verhindern (Übersicht in Eddy, 2001). Auf diesem Hintergrund wäre die Isoform VI als ncRNA eventuell auch zu verstehen. Sie könnte ein nicht-codierendes RNA-Transkript unbekannter Funktion sein.

Die vom *FHN3* Gen transkribierten Isoformen I-V besitzen alle ihren Translationsstart in Exon 2, sowie den Translationsstop in Exon 15 und codieren insgesamt für drei verschiedene Proteine. Die Isoformen III-V differenzieren sich weitgehend von Isoform I und II durch eingespleißte Exons und bei Form V durch eine alternative Polyadenylierungsstelle. Daraus resultieren erweiterte Proteine, die durch ihre vorwiegend gewebsspezifische Expression wahrscheinlich spezialisierte Funktionen übernehmen.

Für die Fragestellung der Arbeit wurde maßgeblich die lange Transkriptform I näher betrachtet, da diese hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird und demnach das resultierende Protein dort eine spezifische Funktion annehmen könnte. Diese Funktion erschien im Hinblick auf eine Codeletion bei NF1 Deletionspatienten von Wichtigkeit, da es ursächlich am Phänotyp „mentale Retardierung“ beteiligt sein könnte. Durch die Tatsache, dass die resultierenden Proteine der Isoformen I und II identisch sind, jedoch das Transkript I mit 7655 Nucleotiden eine deutlich expandierte 3’UTR gegenüber der Form II mit 3163bp aufweist, musste dieser verlängerten 3’UTR eine wichtige Bedeutung zugerechnet werden. Sie nimmt bei Isoform I 5817bp im Gegensatz zur 1325bp langen 3’UTR der Form II ein. Beide Formen codieren wie bereits erwähnt für die selben 557 Aminosäuren, womit demzufolge im Gehirn FHN3 Proteine angetroffen werden, die zum einen an einer hirnspezifischen, zum anderen an einer ubiquitär auftretenden mRNA translatiert wurden.

Solche erweiterten 3’UTRs sind in der Literatur relativ häufig beschrieben. Eine alternative Polyadenylierung tritt oftmals gewebsspezifisch oder entwicklungsspezifisch auf (Edwalds-Gilbert et al., 1997). Welchen Einfluss die Benutzung alternativer PolyA-Signale mit sich bringen, ist jedoch meist ungeklärt. Unverkennbar ist nur, dass verschiedene mRNA Formen unterschiedliche Stabilitäten und Translationsraten aufweisen und somit ein positiver oder negativer Einfluss auf die endgültige Menge an Protein unter Benutzung eines alternativen PolyA-Signals erreicht wird. Vielfach findet man ähnliche Bedingungen wie beim *FHN3* Gen,

dass sehr häufig im Gehirn Isoformen mit verlängerten 3'UTRs exprimiert werden, welche die gleichen ORFs wie ubiquitär auftretende Transkripte aufweisen (Beaudoing und Gautheret, 2001). So findet sich beispielsweise beim Huntington-Disease (*HD*) Gen eine differentielle 3'-Polyadenylierungstelle, die in zwei mRNA Formen resultiert. Die zwei Isoformen *HD12* und *HD14* zeigen identische protein-codierende Sequenzen und unterscheiden sich ausschließlich in den Längen ihrer 3'UTRs, mit weiteren 3360bp bei *HD14*. Dieses große Transkript wird prädominant im Gehirn exprimiert, wodurch ein weitgehend ubiquitär exprimiertes Gen gewebsspezifische Effekte unter Benutzung alternativer Polyadenylierungsstellen ausüben kann (Lin et al., 1993). Die identische Situation fanden Casanova et al. (1996) beim *HD* Gen der Maus, das ebenfalls in verschiedenen Isoformen exprimiert wird und eine deutlich verlängerte Transkriptform im Gehirn aufweist. Die eigentliche Funktion dieser verlängerten 3'UTR ist bis heute nicht erforscht, sie wird jedoch in Zusammenhang mit der Regulation der endgültigen Proteinmenge mit spezifischer Sublokalisation gebracht. Ein weiteres Beispiel ohne näher charakterisierter Funktion findet sich im humanen Transplantations Antigen (*tum-Antigen*) *P198* Gen, das in zwei verschiedenen mRNA Formen exprimiert wird. Diese zwei Formen unterscheiden sich ausschließlich in der Länge ihrer 3'UTR und in ihrem Expressionspektrum (Price et al., 1992). Ebenfalls findet man verschiedenen Isoformen der Methyl-CpG-binding protein 2 (*MeCP2*)-mRNA, mit dominantem Auftreten einer verlängerten Form im Gehirn. Das MeCP2 Protein ist in die Suppression der Expression methylierter Gene durch selektive Bindung an methylierte CpG Dinucleotide involviert. Mit dem Auftreten verschiedener, gewebs-spezifischer als auch entwicklungsspezifischer mRNA-Varianten wird die post-transkriptionelle Regulation der MeCP2 Expression erreicht. Somit kann letztendlich durch verschiedene 3'UTRs Einfluss auf die methylierungs-assoziierte Gen-expression stattfinden (Coy et al., 1999). Ein weiteres Beispiel ist im Falle der Amyloid Precursor Protein (*APP*) mRNA beschrieben (de Sauvage et al., 1992; Mbella et al., 2000), dessen Produkt in die Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung (AD) involviert ist. Es kommen ebenfalls zwei verschiedene Varianten mit unterschiedlich langen 3'UTRs vor, wobei die lange *APP* mRNA mit einer dreifach höheren Effizienz translatiert wird. Die Kontrolle der Translationseffizienz und der Stabilität des Transkriptes geht von den 3'UTRs aus. Die Autoren konnten zeigen, dass erst durch Bindung verschiedenster Proteine an die kurze 3'UTR die

Stabilität dieser mRNA erhöht, jedoch die Translationsrate verringert wird. Dagegen binden sie in Folge von Sekundärstrukturen nicht an Sequenzen der langen Form. Über die Art der 3'UTR und seinen Sequenzmotiven wird demnach eine Regulation der Stabilität und somit auch der Translationsrate erreicht. Diese unterschiedliche posttranskriptionelle Kontrolle der Translation und Stabilität der *APP* mRNA scheint von Wichtigkeit, da eine Überproduktion von APP mit der charakteristischen Läsion des Gehirns bei Alzheimer Patienten einhergeht. Insgesamt ist die Rolle, welche aus der Benutzung alternativer Polyadenylierungsstellen und den daraus resultierenden, variablen Transkripten hervorgeht meistens nicht vollständig geklärt. Jedoch durch das Auftreten gewebsspezifischer, unterschiedlicher 3'UTRs können spezifische Regulationen der Stabilisierung und Lokalisation der mRNA erreicht werden, die aus den allgemeinen Eigenschaften der 3'UTRs gegeben sind. Somit kann dann letztendlich Einfluss auf die endgültige Expression genommen und eine gewebs- oder zelltypspezifische Menge des Proteins erreicht werden.

Generell haben 3'UTRs Einfluss auf Stabilität, Translationsrate und Lokalisierung von mRNAs. Die Stabilität der mRNA und die Translation in das entsprechende Protein sind zwei eng miteinander verbundene Eigenschaften, die oftmals durch Sequenzmotive in der 3'UTR aktiv beeinflusst werden. Beispielsweise besitzt die humane Transferrin Rezeptor (*hTR*) mRNA zwei definierte Domänen in der 3'UTR, die durch Loop-Bildung zur Stabilität der mRNA befähigt sind (Mullner et al., 1988). Des weiteren findet man oftmals in 3'UTRs instabiler mRNAs, wie die von tumor necrosis factor alpha, c-myc oder c-fos, AU-reiche Regionen (AUREs oder AREs), welche als destabilisierende Elemente fungieren (Caput et al., 1986; Lai et al., 1999). Jedoch können AREs auch die Translation inhibieren und im Gegenzug dazu die mRNA stabilisieren, wie im Falle der humanen Interferon-ß mRNA (Kruys et al., 1987). Oftmals werden solche Effekte durch die Bindung verschiedenster Proteine an diese AREs hervorgerufen, wodurch die mRNA Stabilität erhöht und die Translationseffizienz herabgesetzt werden kann (Rajagopalan et al., 1997; Gueydan et al., 1996). Insofern beeinflussen AREs in 3'UTRs allgemein die mRNA-Stabilität und die Translationsrate, werden aber oftmals durch weitere Proteine reguliert, die mit ihnen RNA-Protein-Interaktionen eingehen. Neben den AREs sind bisher weitere Strukturelemente in 3'UTRs beschrieben, welche die Stabilität der mRNAs und die Translationseffizienz regulieren. So finden sich in der

bereits oben erwähnten kurzen Form der 3'UTR der *APP* mRNA, Elemente mit einer Länge von 29, bzw. 81 Nucleotiden, die durch RNA-Protein Interaktionen ebenfalls die Stabilität des Transkriptes erhöhen können, jedoch zu den AREs keine Ähnlichkeiten besitzen. An diese Elemente bindet beispielsweise TGF-beta, hnRNP C oder Nucleolin (Amara et al., 1999; Rajagopalan et al., 1998; Zaidi und Malter, 1995).

Eine weitere Hauptaufgabe der 3'UTRs ist die subzelluläre Lokalisation von mRNAs, um eine lokale, hohe Konzentration des Proteinprodukts zu erreichen. Als der effizientere Weg dazu, scheint sich die spezifische Lokalisierung der mRNA im Gegensatz zum Transport des Proteins darzustellen. Nicht zuletzt aus der Tatsache, dass ein einziges mRNA Molekül zu vielen Proteinmolekülen führt. Ein eindrucksvolles Beispiel zeigt sich in den subzellulären Lokalisationen von mRNAs in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Erst durch die *oskar* (*osk*) mRNA Lokalisation am posterioren Ende und der Akkumulierung der *bicoid* (*bcd*) mRNA am anterioren Ende der Oozyte wird eine Polarität des Embryos, mit anschließender Segmentierung gewährleistet. Die Sublokalisation der zwei mRNAs ist jeweils durch Sequenzmotive in der 3'UTR reguliert. In der 3'UTR der *bcd* mRNA finden sich drei Strukturen, die für eine Assoziation des Staufen (Stau) Proteins nötig sind und erst durch die Interaktion mit Stau die mRNA am anterioren Ende lokalisiert werden kann (Ferrandon et al., 1994; Lasko, 1999). Die Lokalisation der *osk* mRNA wird ebenfalls durch Bindung verschiedenster Proteine an ihre 3'UTR vermittelt (Kim-Ha et al., 1993). Solch eine axionale, spezifische Lokalisation von verschiedenen mRNAs findet sich auch in der Embryonal-entwicklung von *Xenopus* (Übersicht in Schnapp et al., 1997). Die mRNA Sublo-kalisation beschränkt sich jedoch nicht nur auf embryonale Entwicklungsschritte, sondern sie findet sich auch in humanen somatischen Zellen. Vor allem in stark asymmetrischen Zellen wie beispielsweise Neuronen, spielt die Sublokalisation bestimmter mRNAs eine essentielle Rolle. Während sehr viele mRNAs in den Dendriten lokalisiert sind, findet sich die *tau* mRNA, die für das Mikrotubuli assoziierte Protein Tau codiert, im proximalen Teil der Axons (Übersicht in Steward, 1997). Durch die Bindung des neuronalen RNA-binding Proteins HuD an Sequenzen der 3'UTR der *tau* mRNA, wird die Stabilität und Lokalisation dieses Transkriptes reguliert. Insgesamt sind zahllose Beispiele beschrieben, wo die Lokalisation und Stabilität der mRNA, sowie die Translationsrate in das

entsprechende Protein, in Abhängigkeit von Sequenzen der 3'UTR und deren Assoziation mit verschiedensten Proteinen steht. In vielen Fälle findet sich zusätzlich ein Zusammenspiel der einzelnen Komponenten mit dem Cytoskelett, durch das eine spezifische Lokalisation, aber auch ein effiziente Proteinsynthese erreicht wird (Übersicht in Jansen, 1999). So ist die vorher beschriebene anteriore Lokalisation der *bcd* mRNA nicht einzig durch die Verbindung mit dem Stau Protein gegeben, sondern erfordert zusätzlich eine Assoziation mit den Mikrotubuli des Cytoskeletts (Übersicht in St. Johnston, 1995).

Auf dem Hintergrund solcher Eigenschaften von 3'UTRs sollte eine Einordnung der *FHN3* mRNA durch Suche bestimmter Motive in ihrer 3'UTR, wie beispielsweise AU-reiche Elemente, erreicht werden. Durch Sequenzmotiv-Datenbankanalysen der langen und kurzen 3'UTRs der zwei Isoformen I und II konnten jedoch keine bekannten Motive ausgemacht werden. Da funktionsrelevante Sequenzbereiche oftmals zwischen Spezies stark konserviert geblieben sind, wurde die murine *FHN3* mRNA charakterisiert und mit der humanen verglichen. Das murinen *FHN3* Gen wird ebenfalls in zwei unterschiedlichen mRNAs mit 3kb und 7kb exprimiert. Die zwei Isoformen unterscheiden sich auch ausschließlich durch alternative Polyadenylierungsstellen und resultieren jeweils im selben Protein. Das Expressionsspektrum der langen Form erscheint weitläufiger als beim Menschen, sie liegt aber ebenso sehr stark im Gehirn vor. Vergleiche der verschiedenen 3'UTRs zwischen den Spezies zeigten nur eine sehr geringe Konservierung, selbst in sehr kurzen Abschnitten konnten keine konservierten Bereiche ausgemacht werden. Demzufolge bleibt die Funktion der verlängerten 3'UTR vorerst ungeklärt. Am wahrscheinlichsten könnte das dominante Auftreten der langen Form I des *FHN3* Gens im Gehirn durch spezifische Lokalisation erklärbar sein. Durch Regulation über die 3'UTR könnte die lange Form stabilisiert, eventuell an andere Zellkompartimente transportiert und dort das FHN3 Protein akkumuliert werden. Somit wäre durch die variablen Polyadenylierungsstellen eine Ansammlung des FHN3 Proteins an spezifischen Lokalisierungsstellen möglich.

4.3 Mögliche Proteinfunktionen des FHN3

Wie zuvor erwähnt, codieren die Isoformen I und II für ein Protein mit 557 Aminosäuren. Proteindatenbankanalysen erlaubten die Identifizierung einer Coiled-Coil Domäne innerhalb des FHN3 Proteins, abgeleitet aus Exon 9 bis 14. Des weiteren

ergab sich dadurch auch eine Homologie des FHN3 Proteins zu den Intermediärfilamenten (IF), Typ III. Diese IF gehören neben den Mikrofilamenten und Mikrotubuli zu den 3 Klassen der Filamente, die das innere Gerüst eukaryotischer Zellen bilden. Dieses Cytoskelett gibt der Zelle ihre definierte Gestalt, ermöglicht den Vesikeltransport, sowie die Gestaltänderung und Wanderung der Zellen. Intermediärfilamente mit ihren 7 bis 11 nm Durchmesser enthalten Kernbereiche aus zwei- oder dreisträngigen, superspiralisierten α-Helices (Coiled-coil). Flankierend finden sich eine nicht-helicale N-terminale Domäne variabler Länge und eine C-terminale Domäne, ebenfalls nicht-helical und extrem längenvariabel (Steinert und Roop, 1988; Stewart, 1990; Quinlan et al., 1995). Diese Struktur zeigte das FHN3, mit einer Coiled-Coil Domäne und konservierten einzelnen Aminosäuren, die in bestimmten Regionen des Kernbereiches lokalisiert sind und dem Protein diese spezielle Struktur verleihen. Demzufolge kann das FHN3 Protein als Cytoskelettkomponente angesehen werden. Durch die konservierten Aminosäurepositionen ergibt sich weiter eine genauere Einordnung von FHN3 zu den IF Proteinen Typ III, zu denen weiter die Proteine Vimentin, Desmin, GFAP (glial fibrillary acidic protein), Peripherin und Plasticin zählen. Dadurch, dass nur einzelne Aminosäuren innerhalb der Gruppe konserviert sind, kommt es zwar zur Ausbildung der speziellen Kernstruktur, aber auch zu variablen Faltungsmotiven. Demzufolge zeigen die einzelnen IF Proteine zwangsläufig sehr variable und auch spezielle Funktionen (Burkhard et al., 2001). Als Haupteigenschaft zeigt sich die Rolle der IF Proteine in der Strukturgebung des Cytoskeletts. Beispielsweise wurde gezeigt, dass es eine spezifische Association zwischen Mikrotubuli, Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten gibt, die durch microtubuli-assoziierte Proteine (MAPs) vermittelt wird. Dabei interagiert das microtubuli-assoziierte Protein tau auch mit Vimentin Filamenten (IF Protein Typ III) und verleiht so den Zellen, die diese Intermediärfilamente enthalten, seine Struktur (Capote & Maccioni, 1998). Jedoch anhand der sehr variablen Gewebs- und Differenzierungs-spezifische Expression geht hervor, dass neben den strukturellen Funktionen innerhalb des Cytoskeletts weitere Aufgaben vorhanden sein müssen. Beispiele verdeutlichen den Einfluss der IF Proteine in Transportwege, in Signaltransduktionswege, sowie in die Modulation und Kontrolle wichtiger Zellprozesse (Paramio und Jorcano, 2002).

Beispielsweise vermittelt Vimentin, ein IF Protein Typ III, den intrazellulären Transport von Cholesterin, der wiederum durch die Interaktion von Vimentin mit Oxysterol-binding Protein (OSBP) inhibiert wird (Wang et al., 2002). Somit ist sowohl der Transport, als auch die Regulation des Cholesterins von Vimentin abhängig. Ein ähnlicher Einfluss von Vimentin findet sich im Insulin-abhängigen Glucosetransport vermittelt durch den Glucosetransporter GLUT4. Dieser GLUT4 verweilt im nicht-stimulierten Zustand in perinukleären oder anderen intrazellulären Membranen, die nicht in Verbindung zu Plasmamembranen stehen (Rea und James, 1997). Erst als Antwort auf Insulin werden GLUT4-enthaltende Membranen als Vesikel zu peripheren Plasmamembranen transportiert und mit ihnen fusioniert. An diesem Translokationsmechanismus des GLUT4 sind das Vesikel-assoziierte Membranprotein 2 (VAMP2), Syntaxin 4, das Soluble *N*-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein 23 (SNAP23), das Mammalian homologue of unc-18 Protein (Munc-18c) und einige weitere Proteine beteiligt (Pessin et al., 1999). Somit sind all diese Proteine in die Insulin vermittelte Regulation des Blutzuckerspiegels involviert. Guilherme et al. (2000) konnten weiter zeigen, dass außer diesen Proteinen auch das Cytoskelett eine wichtige Rolle in der Regulation spielt. Die Sublokalisation des Glucosetransporters in intrazellulären Membranen wird durch die Assoziation von GLUT4 mit dem IF Protein Vimentin und dem Mikrotubuli Protein α-Tubulin gewährleistet. Erst durch Stimulierung wird diese Assoziation aufgehoben und GLUT4 wandert an die Peripherie. Folglich steht die GLUT4 Translokation in Abhängigkeit des Cytoskeletts, wodurch eine optimale Regulation des Glucosespiegels erreicht wird.

Die Eingruppierung des FHN3 Proteins zu den Cytoskelettproteinen gibt zwar demzufolge Funktionshinweise, die in Richtung Strukturgebung der Zelle, Transportprozesse oder auch Regulationen bestimmter Zellprozesse gehen könnten, aber durch die variablen Rollen der Intermediärfilamente kann keine genauere Aussage über das FHN3 gemacht werden. Ein sehr häufig auftretendes, typisches Merkmal der IF Proteine, speziell mit Vorhandensein der Coiled-coil Domäne, ist das Eingehen von Interaktionen mit anderen Proteinen. Sämtliche Einflüsse in verschiedenste Bereiche, wie die oben beschriebenen, sind erst durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen möglich. Ein Beispiel zeigt sich dazu auch im Dystrophin-assoziierten Protein (DPC) Komplex. Teil dieses Komplexes ist das Produkt des Dystrophin Gens, das mit der Duchenne Muskeldystrophie assoziiert

ist (Koenig et al., 1988). Der DPC Komplex ist durch die Interaktion mit dem IF Protein α-Dystrobrevin mit einem weiteren Komplex aus verschiedensten IF Proteinen verbunden (IF-Komplex), zu dem auch das Typ III IF-Protein Desmin zählt (Mizuno et al., 2001). Die strukturelle Funktion der IF Proteine in Herz- und Skelettmuskulatur ist erst durch die Interaktion gegeben, wobei Defekte einzelner Komponenten in verschiedenen Formen von Muskeldystrophie und Kardiomyopathien resultieren. (Sadoulet-Puccio et al., 1997; Blake et al., 2002).

In welche Prozesse die IF Proteine involviert sind, ist demnach durch die Identifikation von Interaktionspartnern einsichtiger. Daher war auch die Möglichkeit des Vorhandenseins von Interaktionspartnern des FHN3 Proteins in Erwägung gezogen worden, um so eventuell funktionelle Hinweise zu erhalten, die letztendlich auch Rückschlüsse auf die Ausprägung des Merkmals mentale Retardierung von NF1 Deletionspatienten zulassen.

Die Untersuchungen von Proteinwechselwirkungen des FHN3 Proteins wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems durchgeführt, das eine Methode zur Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen *in vivo* darstellt. Mit diesem GAL4-basierenden System können putative Proteinpartner aus einer Expressionsbank über verschiedene Selektionsschritte isoliert werden. Das Screenen der fötalen Gehirn cDNA-Bank auf mögliche Partner von FHN3 selektionierte 6 verschiedene Interaktionspartner, von denen 4 eindeutig im Assay interagierten und 2 nur eine schwache Tendenz zur Wechselwirkung besaßen. Die Interaktionen konnten mit Hilfe eines *in vitro* GST (Glutathion-S-Transferase)-Pulldown Systems bestätigt werden. Bei diesem System wurde der Nachweis der Interaktion mittels zwei separat hergestellten Komponenten erreicht. Die im 2-Hybrid-System gefundenen Bindepartner wurden mittels *in vitro* Transkription/Translation synthetisiert und radioaktiv markiert. Das FHN3 Protein hingegen wurde als Fusionsprotein mit GST in Bakterien exprimiert. Durch die Eigenschaft, dass das GST-FHN3 Fusionsprotein an Matrix-gebundenes Glutathion binden konnte, wurde die separate Isolierung des GST-FHN3 Fusionsprotein gekoppelt mit dem Bindepartner möglich. Bei positiver Wechselwirkung konnte demnach die radioaktive Komponente autoradiographisch sichtbar gemacht werden.

Neben den 6 Interaktionspartnern wurde mit dieser Methode auch eine Wechselwirkung des FHN3 mit den Proteinen Amyloid precursor protein (APP) und Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) untersucht, die neben APLP1 zur

APP-Familie gehören. In der Literatur sind mehrere Proteine beschrieben die mit allen drei Mitgliedern der Familie interagieren.

Ein im 2-Hybrid System isolierter Klon entspricht der mRNA-Datenbankeintragung mit der Accession Nummer XM_114083. Das Transkript weist eine Länge von 2213bp auf und resultiert in einem Protein von 195 AS. Dieses Protein ist bisher uncharakterisiert und wurde in keinem funktionellen Zusammenhang beschrieben. Datenbankvergleiche im Hinblick auf exprimierte Sequenzen (ESTs) erlaubten die Identifizierung verschiedenster cDNA Klone, isoliert aus verschiedensten Geweben. Eine sehr starke Expression findet man in Gehirngewebe, des weiteren eine etwas schwächere in Lunge, Niere und Testis, sowie eine sehr schwache in sämtlichen weiteren Geweben.

Ein weiterer eindeutig identifizierter Klon entsprach der mRNA-Datenbankeintragung NM_006334 mit 1009bp, die für das humane Neuroblastoma Protein AMY oder auch Olfactomedin 1, Variante 2 (OLFM1) genannte Protein von 135 AS codiert. Das humane AMY oder OLFM1 wurde erstmals von Yokoyama et al. (1996) beschrieben, die das Expressionsprofil einer Neuroblastom Zellinie im Vergleich zu Profilen anderer Gewebe untersuchten. Hierbei identifizierten sie 5 verschiedene Transkripte, eins davon als *AMY* bezeichnet, die ausschließlich in Neuroblastomen oder Nervenzellgewebe exprimiert werden. Hieraus ergab sich eine essentielle Rolle von AMY im Nervenzellgewebe. Die Namensgebung ergab sich aus der 96%igen Übereinstimmung mit dem Neuronen-spezifischen Olfactomedin-ähnlichen Glycoprotein AMY der Ratte (Danielson et al., 1994). Dieses Protein der Ratte wird von dem *D2Sut1e* Gen codiert, von dem 3 weitere Isoformen transkribiert werden. Die resultierenden vier Proteine AMY, BMY, AMZ und BMZ besitzen alle den selben mittleren Aminosäureabschnitt M und unterscheiden sich entweder am Aminoterminus mit den Formen A und B oder am Carboxyterminus mit Y und Z. Es zeigt sich im Mittelteil von AMY eine Ähnlichkeit zu Olfactomedin, einem extrazellulären Matrixprotein, das erstmals im Nervenepithelium der Riechzellen bei *Xenopus* entdeckt wurde (Snyder et al., 1991). Später wurden die vier orthologen, murinen Proteine von Nagano et al. (1998), die den Unterschied zwischen Cerebralem Cortex und Zentralem Nervensystem durch vergleichende Expression analysierten, als Pancortin 1 bis 4 bezeichnet. Deren Untersuchungen zeigten, dass die Pancortine 1 (AMZ) und 2 (AMY) prädominant im adulten cerebralen Cortex exprimiert werden, dort intrazellulär verbleiben und

relativ schnell degradiert werden. Dagegen sind die Pancortine 3 und 4 pränatal dominant im zentralen Neocortex, extrazellulär lokalisiert und spielen eine Rolle in der neuronalen Differenzierung (Nagano et al., 2000). Die eigentliche Funktion von AMY ist bis heute nicht beschrieben, es scheint jedoch eine zentrale Rolle im Nervengewebe und in der Großhirnrinde einzunehmen. In diesem Gewebe wird auch sehr stark die große Transkriptform I des *FHN3* Gens exprimiert, jedoch in welchem Zusammenhang diese 2 Proteine stehen, müssten erst weitere Analysen zeigen.

Als weiterer Bindepartner konnte das Transmembranprotein APLP1 (amyloid precursor-like protein 1) identifiziert werden. Es ist dominant in verschiedensten Gehirngeweben exprimiert, jedoch findet es sich auch geringer in anderen Geweben (Wasco et al., 1992 und 1993). Durch das Vorhandensein typischer extra- und intrazellulärer Domänen konnte APLP1 der APP (amyloid precursor protein)-Familie zugeordnet werden (Wasco et al., 1992; Zhong et al., 1996). Neben APLP1 und APP wird auch das APLP2 Protein in diese Gruppe gerechnet (Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1993). Bei allen 3 Mitgliedern handelt es sich um Transmembran-Glycoproteine mit einer hydrophoben Membrandomäne, einer langen extrazellulären und einer kurzen cytosolischen Domäne. Die Ergebnisse des 2-Hybrid-Systems und des Pulldown Assays wiesen APLP1 als eindeutigen Interaktionspartner von FHN3 aus. Hingegen konnte mit dem Pulldown Assay über eine Wechselwirkung des FHN3 Proteins mit APP oder APLP2 letztendlich aus technischen Gründen keine eindeutige Aussage gemacht werden. Es konnte weder eine Interaktion bestätigt, noch ausgeschlossen werden.

Von APLP1 sowie von APLP2 ist funktionell bisher wenig bekannt. Am besten untersucht stellt sich das APP dar, letztendlich auch durch die Tatsache, dass die Ablagerung seines Spaltprodukts Aβ im Gehirn als typisches Merkmal der Alzheimerschen Erkrankung (AD) auftritt. Diese Aβ Proteine sind die Folge abnormaler Prozessierung des APPs. Bei nicht-betroffenen Personen unterliegt dieses Vorläuferprotein einer relativ kurzen Halbwertszeit von ungefähr 45-60 min (Weidemann et al., 1989), hervorgerufen durch multiple proteolytische Spaltungen in verschiedene nicht-amyloide Derivate, die in Vesikel und extrazelluläre Räume sezerniert werden. Im Gegensatz dazu besitzen die beiden APLP Proteine nicht die Aβ Domäne des APPs, unterliegen jedoch ebenfalls nachträglich proteolytischen Modifikationen, deren Zweck bisher nicht bekannt ist. Funktionell

scheinen die Mitglieder untereinander ähnliche, sich gegenseitig kompensierende Rollen zu übernehmen. Es zeigte sich, dass Mäuse mit zwei defizienten Mitgliedern der APP-Familie nicht lebensfähig sind. Sowohl die APP$^-$/APLP2$^-$, als auch die APLP1$^-$/APLP2$^-$ defizienten Mäuse verstarben vor der Geburt, die einfache Mutanten waren jeweils lebensfähig (Müller et al., 1996; von Koch et al., 1997; Heber et al., 2000). So scheint es deutlich überlappende Funktionen innerhalb der APP-Familie zu geben, was auch durch die Tatsache unterstützt wird, dass bis heute die verschiedensten Proteine beschrieben wurden, die mit allen APP-Familienmitgliedern in Wechselwirkung treten können. Spezifische funktionelle Eigenschaften von APLP1 scheinen durch dessen dominante Expression in Nervenzellen gegeben zu sein, die bei den anderen Mitgliedern in der Form nicht zu Tage tritt. So zeigten Kim et al. (1995), dass APLP1 in synaptische Reifeprozesse während der kortikalen Entwicklung involviert ist. Jedoch weitere funktionell spezifische Erkenntnisse konnten bis heute nicht gewonnen werden.

Die eigentliche Funktion von APP und seinen prozessierten Spaltprodukten ist ebenfalls nur bruchstückhaft verstanden. Beschrieben finden sich Einflüsse auf die Regulation von Fibroblasten- und Neuritenwachstum, auf die Zelladhäsion und auf den Neuronenschutz (Saitoh et al., 1989; Mattson et al., 1997). Durch seine Struktur kann das APP als Zelloberfächen-Rezeptor eingeordnet werden, wodurch es zur extrazellulären Signalübermittlung in die Zelle befähigt ist (Kang et al., 1987; Nishimoto et al., 1998; Perez et al., 1997). Es besitzt außerdem eine Rolle in Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen, die anscheinend durch die Bindung mit Heparin und Collagen reguliert wird (Beher et al., 1996; Multhaup et al., 1994; Schubert et al., 1989). Auch konnte gezeigt werden, dass APP an das gehirnspezifische Singnaltransduktionprotein G_0 binden kann, und dass eine APP-Mutation eine G_0-vermittelte Apoptose von neuronalen Zellen verursachen kann (Nishimoto et al., 1993; Yamatsuji et al., 1996). APP spielt weiter eine Rolle in der neuronalen Migration während der Gehirnentwicklung und der Neuronenpositionierung im Gehirn (Sweet et al., 1996; Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Homayouni et al., 1999). Sämtliche dieser Funktionen des APPs sind jedoch meist nicht bis ins letzte Detail *in vivo* nachzuvollziehen, letztendlich auch durch die bereits erwähnten kompensierenden Eigenschaften von APLP1 und APLP2. Insgesamt erscheint die Struktur des APP-Systems sehr komplex und die gesamte

APP-Familie scheint in ein großes zentrales Netzwerk von Proteinen involviert zu sein, das um die cytosolische Domäne von APP lokalisiert ist. Es wurden auch mehrere Bindepartner der Mitglieder identifiziert, die in das Netzwerk eingreifen und so maßgeblich an Signaltransduktionswegen und Regulationen axonaler Lokalisation durch Zell-Zell-Interaktionen, bis hin zur Genregulation und neuronaler Differenzierung beteiligt sind. Beispiele weiterer Partner in diesem Netzwerk sind das G_0 Protein, die Preseniline, die Fe65 Familie (Guenette et al., 1996; McLoughlin et al., 1996) und die X11 Familie (Borg et al., 1996). Diese Proteine sind meist Bindepartner eines oder aller Mitglieder der APP-Familie, jedoch erweitern sie das Netzwerk insofern, als sie selbst wieder Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen eingehen. Durch dieses Ausmaß und die Vielzahl der Netzwerkkomponenten und deren Einflüsse, können Funktionen des Netzwerkes in verschiedenste Richtungen angenommen werden. Die Komplexität des Systems erscheint aber bei weitem noch nicht vollständig verstanden, sondern es wird vermutet, dass weitere Interaktionspartner von APP und anderen Mitgliedern in dieses System eingreifen und es beeinflussen. Nur mit Verständnis des ganzen Komplexes und seiner Mitglieder wäre auch die Funktionsmaschinerie von APP und letztendlich auch die Pathogenese von Alzheimer detaillierter zu verstehen. Durch die eindeutige Interaktion mit APLP1 könnte auch FHN3 in diesem Proteinnetzwerk eine Rolle spielen. Andererseits bestehen sicherlich für das APLP1 unabhängige Funktionen vom APP-Netzwerk, in die auch FHN3 vermittelt durch die Interaktion involviert sein könnte.

Der vierte identifizierte Klon ist bisher nur mit einer mRNA Sequenz XM_005566 mit einer Länge von 1564bp beschrieben, die für ein hypothetisches Protein mit 247 AS codiert. Es findet sich ebenfalls sehr stark im Gehirn und schwächer ubiquitär exprimiert. Funktionell ist es bisher noch nicht beschrieben, es zeigt jedoch Ähnlichkeiten zu den SNAP-Proteinen (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein). Allgemein sind die SNAP Proteine in den vesikulären Transport involviert. Ein Vesikel wird mit Hilfe eines GTP-abhängigen ADP-Ribosylierungsfaktors ARF von der Donormembran abgeschnürt, zur Zielmembran transportiert und dort durch Hydrolyse des ARF-GTP zu ARF-GDP angeheftet. Für die Anheftung und auch die Fusion mit der Zielmembran ist außerdem der *N*-ethylmaleimide-sensitive Faktor (NSF) nötigt. Damit jedoch die Vesikel mit ihren spezifischen Zielmembranen fusioniert werden, braucht der NSF die SNAP

Proteine, die zwei komplementäre Membranrezeptoren erkennen. Ein solcher SNAP-Rezeptor (SNAREs) findet sich verankert in der Vesikelmembran (v-SNARE), der komplementäre in der Zielmembran (t-SNARE). Zu den t-SNAREs zählen beispielsweise die Syntaxine (Rothman et al., 1992). Details einzelner Komponenten dieses Mechanismus werden nachfolgend bei den letzten zwei Interaktionspartnern nochmals näher erläutert. Die Homologie zu diesen SNAP Proteinen lässt das gefundene, mit FHN3 assoziierte Protein als Komponente eines vesikulären Transportmechanismus erscheinen.

Neben diesen vier eindeutigen Interaktionspartnern wurden zwei weitere identifiziert, die jedoch nur eine schwache Interaktionstendenz mit FHN3 aufwiesen. Einschränkend muss hier auch erwähnt werden, dass die cDNA Klone aus der Expressionsbank oftmals keine vollständigen Transkripte enthalten und somit aus ihnen auch nicht immer ein vollständig funktionsfähiges Protein synthetisiert werden kann. Im Falle dieser 2 Proteine, die folgend beschrieben sind, könnte die schwache Interaktionstendenz auch auf eine eingeschränkte Bindungsmöglichkeit hindeuten.

Das 201 AS umfassende ADP-ribosylation factor related protein 1 (ARFRP1) zeigt konservierte Motive, die es zu den Ras-related GTP-bindenden Proteinen einordnen lässt (Schürmann et al., 1995). Allgemein gehören sämtliche ARP Proteine zur ARF-Familie (ADP-ribosylation factor), zu denen zusätzlich die ARFs und die ARF-like Proteine zählen. ARFs repräsentieren eine Subfamilie von Ras-homologen GTPasen, die in wesentliche zellbiologische Funktionen involviert sind. Sie regulieren den bereits oben beschriebenen vesikulären Transport in eukaryotischen Zellen (Boman et al., 1995). Dabei stimulieren sie im aktivierten Zustand die Phospholipase D (PLD) in verschiedenen zellulären Systemen und isolierten Membranen (Brown et al., 1993; Cockcroft et al., 1994; Massenburg et al., 1994). Die Stimulierung von PLD ist ein notwendiges Signal für die Vesikelformation und ihres Transports und wird über verschiedene Wege erreicht, unter anderem über G Protein-gekoppelte Rezeptoren durch aktivierte ARFs. Der GDP/GTP Austausch bei ARFs wird beschleunigt durch mSec7-1/Cytohesin (Schmidt et al., 1996; Rümenapp et al., 1997). Schürmann et al. (1999) zeigten, dass auch das hier im 2-Hybrid-System gefundene ARP in diesen Vesikeltransport involviert ist. Aktiviertes ARP-GTP bindet an diesen Exchange Faktor mSec7-1/Cytohesin, womit ARF nicht mehr zur aktiven, GTP-gebundenen Form

konvertieren kann und somit die Aktivierung der Phospholipase D inhibiert ist. Auf diese Weise wird durch aktiviertes ARP-GTP der Vesikeltransport verhindert. Weitere Funktionen und Einflüsse von ARP sind bis heute nicht bekannt. Jedoch durch das ubiquitäre Expressionsspektrum von ARP und auch durch die evolutionäre Konservierung bis hin zu *Saccharomyces cerevisiae* erscheinen weitere grundlegende Rollen sehr wahrscheinlich.

Als sechster möglicher Partner präsentierte sich ein Klon, welcher der mRNA mit der Acc.No. XM_002163 entspricht. Sie codiert für das ubiquitär exprimierte 592 AS große Syntaxin binding protein 3 (STXBP3), das auch als Munc-18c (mammalian homologue of unc-18) bezeichnet wird (Tellam et al., 1995). Es zeigte im 2-Hybrid System eine schwache Interaktion mit FHN3, wohingegen diese Wechselwirkung mit Hilfe des Pulldown Assays nicht bestätigt werden konnte, da die Synthese *in vitro* nicht erreicht wurde. Hier zeigte sich durch Sequenzierung, dass der offene Leserahmen des im 2-Hybrid-System isolierten Klons frühzeitig von einem Stop betroffen war, und somit nur ein deutlich verkürztes Protein synthetisiert wird. Dieses trunkierte Protein war angesichts seiner geringen Größe nicht mit der SDS-PAGE zu detektieren. Dies könnte auch die schwache Interaktion im 2-Hybrid-System erklären, zwar kommt es hier noch zu einer Wechselwirkung mit FHN3, jedoch mit einer deutlich niedrigen Tendenz.

Dieses Munc-18c Protein gehört zu einer großen Familie mit mehreren Munc-18 Vertretern, die alle in den bereits erwähnten vesikulären Transport involviert sind. Sie vermitteln die Interaktion der komplementären SNAREs an der Zielmembran und regulieren somit letztendlich den intrazellulären Vesikeltransport. Die SNARE Komplexe werden gebildet aus v-SNAREs (vesicle membrane SNARE) wie VAMP (Vesikel-assoziierte Membranproteine) und t-SNAREs (target membrane SNAREs) wie die Syntaxine. Welche Isoformen von Syntaxinen, VAMPs und auch Munc-18 speziell beteiligt sind, ist abhängig vom speziellen Vesikeltransportweg. Die hier im 2-Hybrid-System gefundene Munc-18c Form ist beschrieben als spezifischer Bindepartner von Syntaxin 4, wobei beide in den bereits erwähnten Insulin-abhängigen Glucosetransport, vermittelt durch den Glucosetransporter GLUT4, in Fettzellen involviert sind (Tellam et al., 1997). Syntaxin 4, ein t-SNARE in der Zielmembran koppelt mit VAMP-2, dem v-SNARE in der Vesikelmembran und ermöglichen so die Lokalisation des in der Vesikelmembran verankerten GLUT4. Dieser Glucosetransportweg steht in Bezug zum Cytoskelett, speziell wie

bereits oben beschrieben, in Abhängigkeit vom Intermediärfilament Vimentin. Bei Abwesenheit von Insulin inhibiert das gefundene Munc-18c die Assoziation zwischen Syntaxin 4 und VAMP-2 durch Interaktion mit Syntaxin 4, wodurch die spezifische Lokalisation von GLUT4 nicht stattfinden kann und letztendlich die Aufnahme von Glucose in die Zelle verhindert wird. Bei Stimulation durch Insulin kommt es zur Interaktion von Syntaxin 4 und VAMP-2, wodurch die Vesikelmembran mit GLUT4 mit der Plasmamembran fusionieren kann und die Glucoseaufnahme ermöglicht wird. Ob Insulin direkt Munc-18c oder Syntaxin 4 durch Konformationsänderungen beeinflusst, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Insgesamt erscheinen sämtliche Vertreter der Munc-18 und SNARE Familien in die verschiedensten Transportwege involviert zu sein, letztendlich auch durch ihre Möglichkeiten unterschiedlichste Protein-Protein Interaktionen einzugehen. Beispielsweise kann Munc-18c ebenfalls an Syntaxin 2 binden, wohingegen VAMP-2, außer mit Syntaxin 4, auch mit Syntaxin 1A in Wechselwirkung tritt.

Betrachtet man nun diese 6 verschiedenen Interaktionspartner des FHN3 Proteins mit ihren einzelnen Funktionen, so wird die Deutung des funktionellen Zusammenhangs mit FHN3 schwierig. Auffällig erscheint das Expressionsspektrum. Alle Proteine zeigen ein gehirnspezifisch dominantes Auftreten, was somit auf eine mögliche gehirnspezifische Rolle von FHN3 und seinen Interaktionspartnern hindeuten könnte, jedoch oftmals auch eine geringere ubiquitäre Expression. Als Bindepartner wurde ein völlig uncharakterisiertes Protein identifiziert, das somit keine funktionellen Rückschlüsse zulässt. Über das AMY Protein wird nur vermutet, dass es eine essentielle Rolle in Nervenzellen des Gehirns einnimmt, konkrete Hinweise sind hier daher ebenfalls nicht gegeben.

Durch die Interaktion des FHN3 Proteins mit APLP1 könnte angenommen werden, dass FHN3 eine Rolle im APP-Netzwerk spielt. Funktionen des Netzwerkes wie neuronale Differenzierung, axonale Lokalisation und Formation der Gehirnstruktur oder die Apoptose neuronaler Zellen könnten den Phänotyp der NF Deletionspatienten mit mentaler Retardierung erklären. Die Zugehörigkeit des FHN3 Proteins zum APP-Netzwerk konnte innerhalb dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden, da aus technischen Gründen keine Aussage bezüglich einer Interaktion mit APP und APLP2 gemacht werden konnte. Die Interaktion mit APLP1 eröffnet zwar die Möglichkeit, funktionell in dieses Netzwerk Einfluss zu

nehmen, sie könnte aber auch in Zusammenhang mit anderen Funktionen von APLP1, die unabhängig vom APP-Netzwerk sind, stehen.

Eine funktionelle Einordnung des FHN3 ergibt sich am ehesten aus der Einordnung als Cytoskelettkomponente und der Verbindung zu Proteinen wie das SNAP Protein, ARP1 und Munc-18c, die letztendlich alle in vesikuläre Transportvorgänge involviert sind. Demzufolge könnte FHN3 eine Rolle in solchen Prozessen einnehmen, vor allem auch durch seine Eigenschaften als Intermediärfilament, die solche Vorgänge in der Zelle oftmals vermitteln. Durch die Variabilität dieser Vorgänge und die Möglichkeit der einzelnen Proteine in unterschiedlichste Transportvorgänge einzugreifen, kann jedoch keine Aussage gemacht werden, an welchen vesikulären Prozessen FHN3 spezifisch beteiligt sein könnte.

Mit diesen gewonnen Daten könnte jedoch folgendes Modell für die Interaktion mit den Bindepartnern und daraus resultierenden funktionellen Eigenschaften des FHN3 Proteins aufgestellt werden:

Das FHN3 Protein ist in neuronale, vesikuläre Transportvorgänge involviert, welches sich aus den Expressionsspektren von FHN3 und den gefundenen Bindepartner mit gehäuftem Auftreten im Gehirn ergibt. Demzufolge ist das Auftreten der langen Transkriptform im Gehirn mit einer axonalen Sublokalisation des FHN3 zu verstehen. Erst durch die lange Form der 3'UTR kann das Transkript stabilisiert und ans Axonende transportiert werden. Dort kommt es zur Synthese dieses Intermediärfilaments. Durch die Möglichkeit der Interaktion mit dem Transmembranprotein APLP1, das als Zelloberfächen-Rezeptor die extrazelluläre Signalübermittlung übernimmt, kann eine Regulation bestimmter vesikuläre Transportprozesse im Zusammenspiel mit den Proteinen SNAP, ARP1 und Munc-18c erfolgen.

Nach diesem Modell wäre ein Einfluss des FHN3 Proteins auf die Ausprägung des Merkmals mentale Retardierung bei NF1 Deletionspatienten, durch seine Funktionen im vesikulären, neuronalen Transport und somit auch in der Regulation bestimmter Signalprozesse im Gehirn, denkbar. Wie dieser Effekt letztendlich aussehen könnte, bleibt durch die Ungeklärtheit des spezifischen Weges unklar.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Untersuchungen der NF1 Genregion hinsichtlich Identifizierung flankierender Gene, die bei NF1 Deletionspatienten von einer Codeletion betroffen sind und dadurch eventuell an der erschwerten Symptomatik dieser Patienten beteiligt sind. Zu Beginn der Arbeit war der NF1 Genlokus wenig charakterisiert, weshalb auf das Genommodell Fugu rubripes zurückgegriffen wurde. Mit Hilfe dieses Modells sollten flankierende Gene charakterisiert und im humanen Genom lokalisiert werden. Dabei konnte die Identifizierung des Nlk Gens (Diplomarbeit, 1998) und des FN5 Gens erreicht werden. Das FN5 Gen wurde sowohl bei Fugu, als auch beim Menschen charakterisiert. Es zeigte sich, dass der codierende Bereich zwischen den Spezies stark konserviert geblieben ist, die nicht-codierenden Regionen jedoch keine Ähnlichkeiten zueinander aufwiesen. Die genomische Lokalisation der Gene im humanen Genom zeigte dann, dass die NF1 Genregionen zwar syntän aufgebaut waren, aber sich in der direkten Genabfolge deutlich voneinander unterschieden. Sämtliche humanen Gene, die insgesamt in der Arbeitsgruppe identifiziert wurden, konnten weitab vom NF1 Gen lokalisiert werden, wodurch sie von großen Deletionen unbetroffen bleiben und demnach nicht am Phänotyp der Patienten beteiligt sein können.

Die Analysen direkt am humanen Genom ließen die Vermutung zu, dass das NF1 Gen in einem großen gehirnspezifischen Gencluster lokalisiert ist und annähernd alle Gene innerhalb der NF1REPs an der Ausprägung des Merkmals der mentalen Retardierung ursächlich beteiligt sein konnten. Im Hinblick auf diesen Phänotyp wurde ein Gen aus dem NF1 Lokus näher betrachtet, das sich als einziges mit ausschließlicher Gehirnexpression auszeichnete. Die Charakterisierung dieses FHN3 Gens zeigte eine Lokalisation 14kb 3'-flankierend zum NF1 Gen. Es ist in mindestens 21 Exons organisiert, die durch alternatives Spleißen und Benutzung alternativer Polyadenylierungssignale in 6 verschiedenen Isoformen resultieren, die gewebsspezifisch exprimiert werden. Die Form I konnte prädominant im Gehirn nachgewiesen werden und war damit hauptsächliches Untersuchungs-objekt im Hinblick auf das Merkmal der mentalen Retardierung. Das resultierende Protein mit 557 AS war identisch mit dem abgeleiteten aus der ubiquitär exprimierten Form II, wodurch sich die Transkripte ausschließlich in der stark expandierten 3'UTR der Form I unterschieden. Somit musste dieser eine

bedeutende Rolle zugeordnet werde, die sich in einer spezifischen mRNA Lokalisation in Zellkompartimenten von Gehirnzellen, wie beispielsweise den Axonen neuronaler Zellen, wiederspiegeln könnte. Dadurch wäre eine spezifische Lokalisation und Akkumulation des FHN3 Proteins an spezifische Orten ermöglicht. Weiter konnte das FHN3 Protein zu den Intermediärfilament Proteinen Typ III eingeordnet werden, die oftmals strukturelle Rollen einnehmen, aber auch durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zu einer Vielzahl an Funktionen befähigt sind. Die Eigenschaften des FHN3 und damit die Erklärung, ob es am Phänotyp beteiligt sein könnte, sollten durch die Ermittlung solcher Interaktionspartner erreicht werden. Mit dem 2-Hybrid-System und dem Pulldown Assay gelang es, 6 verschiedene Bindepartner des FHN3 Proteins zu identifizieren. Dabei handelte es sich um ein bisher nicht charakterisiertes, hypothetisches Protein, das sich vorwiegend im Gehirn exprimiert findet. Ferner das AMY Protein, auch unter Olfactomedin 1 beschrieben, von dem bisher ebenfalls sehr wenig bekannt ist. Einzig sein Expressionsspektrum lässt auf eine zentrale Rolle im Nervengewebe schließen. Zusätzlich interagiert FHN3 mit dem Amyloid-precursor-like protein 1 (APLP1), das als Komponente innerhalb eines Proteinnetzwerks um APP funktionell in Signaltransduktionswege, axonale Lokalisation, Neuritenwachstum, Zelladhäsion und Neuronenschutz involviert ist. Die Interaktion mit FHN3 könnte jedoch auch außerhalb dieses Netzwerkes von funktioneller Bedeutung sein, da keine Wechselwirkung zwischen FHN3 und anderen Mitgliedern des Netzwerkes nachgewiesen werden konnte und APLP1 auch unabhängige Funktionen besitzt. Bei den letzten drei FHN3-Bindepartnern handelt es sich um die Proteine ARP (ADP-ribosylation factor related protein), Munc-18c (mammalian homologue of unc-18) und ein hypothetisches SNAP Protein (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein). Alle drei Proteine sind in intrazelluläre Vesikeltransportwege involviert. Folglich kann auch das FHN3 Protein an solchen Prozessen beteiligt sein, letztendlich auch durch die Tatsache, dass Intermediärfilamente ebenfalls in vesikuläre Transporte eingreifen. Insgesamt scheint es vor allem an neuronalen Transportvorgängen beteiligt zu sein, da sämtliche gefundene Interaktionspartner gehäuft im Gehirn exprimiert zu finden sind. Die Codeletion des FHN3 Gens und dieser Einfluss in neuronale Vorgänge könnte in Zusammenhang mit der Merkmalsausprägung mentale Retardierung bei NF1 Patienten mit großen Deletionen stehen.

6. Literaturverzeichnis

Amara FM, Junaid A, Clough RR, Liang B.
TGF-beta(1), regulation of alzheimer amyloid precursor protein mRNA expression in a normal human astrocyte cell line: mRNA stabilization.
Brain Res Mol Brain Res 1999 Jul 23;71(1):42-9

Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD.
Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints.
Am J Hum Genet 1999 Aug;65(2):370-86

Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, Christoffels A, Rash S, Hoon S, Smit A, Gelpke MD, Roach J, Oh T, Ho IY, Wong M, Detter C, Verhoef F, Predki P, Tay A, Lucas S, Richardson P, Smith SF, Clark MS, Edwards YJ, Doggett N, Zharkikh A, Tavtigian SV, Pruss D, Barnstead M, Evans C, Baden H, Powell J, Glusman G, Rowen L, Hood L, Tan YH, Elgar G, Hawkins T, Venkatesh B, Rokhsar D, Brenner S.
Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of Fugu rubripes.
Science 2002 Aug 23;297(5585):1301-10

Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, Altuvia S.
Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli.
Curr Biol 2001 Jun 26;11(12):941-50

Bader JL, Miller RW.
Neurofibromatosis and childhood leukemia.
J Pediatr 1978 Jun;92(6):925-9

Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, Collins F.
The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins.
Cell 1990 Nov 16;63(4):851-9

Barker D, Wright E, Nguyen K, Cannon L, Fain P, Goldgar D, Bishop DT, Carey J, Kivlin J, Willard H, et al.
A genomic search for linkage of neurofibromatosis to RFLPs.
J Med Genet 1987 Sep;24(9):536-8

Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J.
Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients.
Nature 1992 Apr 23;356(6371):713-5

Baxendale S, Abdulla S, Elgar G, Buck D, Berks M, Micklem G, Durbin R, Bates G, Brenner S, Beck S.
Comparative sequence analysis of the human and pufferfish Huntington's disease genes.
Nat Genet 1995 May;10(1):67-76

Baxevanis AD.
The molecular biology database collection: an online compilation of relevant database resources.
Nucleic Acids Res 2000 Jan 1;28(1):1-7

Beaudoing E, Gautheret D.
Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST data.
Genome Res 2001 Sep;11(9):1520-6

Beher D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G.
Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I.
J Biol Chem 1996 Jan 19;271(3):1613-20

Blake D, Martin-Rendon E.
Intermediate filaments and the function of the dystrophin-protein complex.
Trends Cardiovasc Med 2002 Jul;12(5):224

Boman AL, Kahn RA.
Arf proteins: the membrane traffic police?
Trends Biochem Sci 1995 Apr;20(4):147-50

Borg JP, Ooi J, Levy E, Margolis B.
The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein.
Mol Cell Biol 1996 Nov;16(11):6229-41

Brannan CI, Bartolomei MS.
Mechanisms of genomic imprinting.
Curr Opin Genet Dev 1999 Apr;9(2):164-70

Brenner S, Elgar G, Sandford R, Macrae A, Venkatesh B, Aparicio S.
Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome.
Nature 1993 Nov 18;366(6452):265-8

Brott BK, Pinsky BA, Erikson RL.
Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Feb 3;95(3):963-8

Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC.
ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity.
Cell 1993 Dec 17;75(6):1137-44

Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, Copeland NG.
Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway.
Nature 1990 Sep 20;347(6290):291-4

Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV.
Coiled coils: a highly versatile protein folding motif.
Trends Cell Biol 2001 Feb;11(2):82-8

Capote C, Maccioni RB.
The association of tau-like proteins with vimentin filaments in cultured cells.
Exp Cell Res 1998 Mar 15;239(2):202-13

Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A.
Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators.
Proc Natl Acad Sci U S A 1986 Mar;83(6):1670-4

Casanova E, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Garate C, Calvo P, Chinchetru MA.
Identification of a long huntingtin mRNA transcript in mouse brain.
Brain Res 1996 Dec 16;743(1-2):320-3

Castro-Malaspina H, Schaison G, Passe S, Pasquier A, Berger R, Bayle-Weisgerber C, Miller D, Seligmann M, Bernard J.
Subacute and chronic myelomonocytic leukemia in children (juvenile CML). Clinical and hematologic observations, and identification of prognostic factors.
Cancer 1984 Aug 15;54(4):675-86

Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, White R.
Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts.
Genomics 1990 Aug;7(4):555-65

Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg AM, Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M, et al.
cDNA sequence and genomic structure of EV12B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene.
Genomics 1991 Mar;9(3):446-60

Clayton DA.
A big development for a small RNA.
Nature 2001 Mar 1;410(6824):29, 31

Cnossen MH, van der Est MN, Breuning MH, van Asperen CJ, Breslau-Siderius EJ, van der Ploeg AT, de Goede-Bolder A, van den Ouweland AM, Halley DJ, Niermeijer MF.
Deletions spanning the neurofibromatosis type 1 gene: implications for genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1?
Hum Mutat 1997;9(5):458-64

Cockcroft S, Thomas GM, Fensome A, Geny B, Cunningham E, Gout I, Hiles I, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ.
Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes.
Science 1994 Jan 28;263(5146):523-6

Colman SD, Wallace MR.
Neurofibromatosis type 1.
Eur J Cancer 1994;30A(13):1974-81

Corrado L, Colapietro P, Larizza L, Riva P.
Mapping of human WHN gene in a 17q11.2 YAC contig and identification of an intragenic STR.
Mol Cell Probes 1999 Jun;13(3):199-202

Cotlier E.
Cafe-au-lait spots of the fundus in neurofibromatosis.
Arch Ophthalmol 1977 Nov;95(11):1990-2

Coutelle O, Nyakatura G, Taudien S, Elgar G, Brenner S, Platzer M, Drescher B, Jouet M, Kenwrick S, Rosenthal A.
The neural cell adhesion molecule L1: genomic organisation and differential splicing is conserved between man and the pufferfish Fugu.
Gene 1998 Feb 16;208(1):7-15

Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Delius H, Poustka A.
A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3"-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression.
Hum Mol Genet 1999 Jul;8(7):1253-62

Danglot G, Regnier V, Fauvet D, Vassal G, Kujas M, Bernheim A.
Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene.
Hum Mol Genet 1995 May;4(5):915-20

Danielson PE, Forss-Petter S, Battenberg EL, deLecea L, Bloom FE, Sutcliffe JG.
Four structurally distinct neuron-specific olfactomedin-related glycoproteins produced by differential promoter utilization and alternative mRNA splicing from a single gene.
J Neurosci Res 1994 Jul 1;38(4):468-78

Däschner K, Assum G, Eisenbarth I, Krone W, Hoffmeyer S, Wortmann S, Heymer B, Kehrer-Sawatzki H.
Clonal origin of tumor cells in a plexiform neurofibroma with LOH in NF1 intron 38 and in dermal neurofibromas without LOH of the NF1 gene.
Biochem Biophys Res Commun 1997 May 19;234(2):346-50

DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR.
Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis.
Cell 1992 Apr 17;69(2):265-73

Dorschner MO, Sybert VP, Weaver M, Pletcher BA, Stephens K.
NF1 microdeletion breakpoints are clustered at flanking repetitive sequences.
Hum Mol Genet 2000 Jan 1;9(1):35-46

Duilio A, Faraonio R, Minopoli G, Zambrano N, Russo T.
Fe65L2: a new member of the Fe65 protein family interacting with the intracellular domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein.
Biochem J 1998 Feb 15;330 (Pt 1):513-9

Eddy SR.
Noncoding RNA genes.
Curr Opin Genet Dev 1999 Dec;9(6):695-9

Eddy SR.
Non-coding RNA genes and the modern RNA world.
Nat Rev Genet 2001 Dec;2(12):919-29

Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE.
A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11.
Hum Mol Genet 1999 Jul;8(7):1157-67

Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C.
Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end?
Nucleic Acids Res 1997 Jul 1;25(13):2547-61

Eisenbarth I, Vogel G, Krone W, Vogel W, Assum G.
An isochore transition in the NF1 gene region coincides with a switch in the extent of linkage disequilibrium.
Am J Hum Genet 2000 Oct;67(4):873-80

Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G.
Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1.
Am J Hum Genet 2000 Feb;66(2):393-401

Elgar G, Rattray F, Greystrong J, Brenner S.
Genomic structure and nucleotide sequence of the p55 gene of the puffer fish Fugu rubripes.
Genomics 1995 Jun 10;27(3):442-6

Elgar G, Sandford R, Aparicio S, Macrae A, Venkatesh B, Brenner S.
Small is beautiful: comparative genomics with the pufferfish (Fugu rubripes).
Trends Genet 1996 Apr;12(4):145-50

Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, Groot N, Barciszewski J.
Non-coding, mRNA-like RNAs database Y2K.
Nucleic Acids Res 2000 Jan 1;28(1):197-200

Erdmann VA, Barciszewska MZ, Szymanski M, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J.
The non-coding RNAs as riboregulators.
Nucleic Acids Res 2001 Jan 1;29(1):189-93

Ferrandon D, Elphick L, Nusslein-Volhard C, St Johnston D.
Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner.
Cell 1994 Dec 30;79(7):1221-32

Fields S, Song O.
A novel genetic system to detect protein-protein interactions.
Nature 1989 Jul 20;340(6230):245-6

French PJ, Bliss TV, O'Connor V.
Ntab, a novel non-coding RNA abundantly expressed in rat brain.
Neuroscience 2001;108(2):207-15

Gellner K, Brenner S.
Analysis of 148 kb of genomic DNA around the wnt1 locus of Fugu rubripes.
Genome Res 1999 Mar;9(3):251-8

Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH.
Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.
Nucleic Acids Res 1992 Mar 25;20(6):1425

Gilley J, Armes N, Fried M.
Fugu genome is not a good mammalian model.
Nature 1997 Jan 23;385(6614):305-6

Guenette SY, Chen J, Jondro PD, Tanzi RE.
Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Oct 1;93(20):10832-7

Gueydan C, Houzet L, Marchant A, Sels A, Huez G, Kruys V.
Engagement of tumor necrosis factor mRNA by an endotoxin-inducible cytoplasmic protein.
Mol Med 1996 Jul;2(4):479-88

Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J, Czech MP.
Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes.
J Biol Chem 2000 Dec 8;275(49):38151-9

Guo HF, The I, Hannan F, Bernards A, Zhong Y.
Requirement of Drosophila NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACAP38-like neuropeptides.
Science 1997 May 2;276(5313):795-8

Guo HF, Tong J, Hannan F, Luo L, Zhong Y.
A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in Drosophila.
Nature 2000 Feb 24;403(6772):895-8

Habib AA, Marton LS, Allwardt B, Gulcher JR, Mikol DD, Hognason T, Chattopadhyay N, Stefansson K.
Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system.
J Neurochem 1998 Apr;70(4):1704-11

Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretzschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Muller U.
Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members.
J Neurosci 2000 Nov 1;20(21):7951-63

Hinegardner R.
Evolution of cellular DNA content in teleost fishes
Am. Naturalist 1968; 102:517-23

Hoffman CS, Winston F.
A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli.
Gene 1987;57(2-3):267-72

Homayouni R, Rice DS, Sheldon M, Curran T.
Disabled-1 binds to the cytoplasmic domain of amyloid precursor-like protein 1.
J Neurosci 1999 Sep 1;19(17):7507-15

How GF, Venkatesh B, Brenner S.
Conserved linkage between the puffer fish (Fugu rubripes) and human genes for platelet-derived growth factor receptor and macrophage colony-stimulating factor receptor.
Genome Res 1996 Dec;6(12):1185-91

Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA.
Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1.
Nature 1997 Oct 16;389(6652):733-7

Huson SM, Compston DA, Clark P, Harper PS.
A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity.
J Med Genet 1989 Nov;26(11):704-11

Huson SM, Compston DA, Harper PS.
A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. II. Guidelines for genetic counselling.
J Med Genet 1989 Nov;26(11):712-21

Huttenhofer A, Kiefmann M, Meier-Ewert S, O'Brien J, Lehrach H, Bachellerie JP, Brosius J.
RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse.
EMBO J 2001 Jun 1;20(11):2943-53

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K.
The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF.
Nature 1999 Jun 24;399(6738):798-802

Ito R, Ohnishi Y.
The roles of RNA polymerase and RNAase I in stable RNA degradation in Escherichia coli carrying the srnB+ gene.
Biochim Biophys Acta 1983 Jan 20;739(1):27-34

Jansen RP.
RNA-cytoskeletal associations.
FASEB J 1999 Mar;13(3):455-66

Jenne DE, Tinschert S, Stegmann E, Reimann H, N]urnberg P, Horn D, Naumann I, Buske A, Thiel G.
A common set of at least 11 functional genes is lost in the majority of NF1 patients with gross deletions.
Genomics 2000 May 15;66(1):93-7

Jenne DE, Tinschert S, Reimann H, Lasinger W, Thiel G, Hameister H, Kehrer-Sawatzki H.
Molecular characterization and gene content of breakpoint boundaries in patients with neurofibromatosis type 1 with 17q11.2 microdeletions.
Am J Hum Genet 2001 Sep;69(3):516-27

John AM, Ruggieri M, Ferner R, Upadhyaya M.
A search for evidence of somatic mutations in the NF1 gene.
J Med Genet 2000 Jan;37(1):44-9

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B.
The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.
Nature 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6

Kayes LM, Riccardi VM, Burke W, Bennett RL, Stephens K.
Large de novo DNA deletion in a patient with sporadic neurofibromatosis 1, mental retardation, and dysmorphism.
J Med Genet 1992 Oct;29(10):686-90

Kayes LM, Burke W, Riccardi VM, Bennett R, Ehrlich P, Rubenstein A, Stephens K.
Deletions spanning the neurofibromatosis 1 gene: identification and phenotype of five patients.
Am J Hum Genet 1994 Mar;54(3):424-36

Kehrer-Sawatzki H, Maier C, Moschgath E, Elgar G, Krone W.
Genomic characterization of the Neurofibromatosis Type 1 gene of Fugu rubripes.
Gene 1998 Nov 5;222(1):145-53

Kehrer-Sawatzki H, Maier C, Moschgath E, Elgar G, Krone W.
Characterization of three genes, AKAP84, BAW and WSB1, located 3' to the neurofibromatosis type 1 locus in Fugu rubripes.
Gene 1999 Jul 22;235(1-2):1-11

Kehrer-Sawatzki H, Moschgath E, Maier C, Legius E, Elgar G, Krone W.
Characterization of the Fugu rubripes NLK and FN5 genes flanking the NF1 (Neurofibromatosis type 1) gene in the 5' direction and mapping of the human counterparts.
Gene 2000 Jun 13;251(1):63-71

Kim TW, Wu K, Xu JL, McAuliffe G, Tanzi RE, Wasco W, Black IB.
Selective localization of amyloid precursor-like protein 1 in the cerebral cortex postsynaptic density.
Brain Res Mol Brain Res 1995 Aug;32(1):36-44

Kim-Ha J, Webster PJ, Smith JL, Macdonald PM.
Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA.
Development 1993 Sep;119(1):169-78

Kiss T.
Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs.
EMBO J 2001 Jul 16;20(14):3617-22

Kluwe L, Friedrich R, Mautner VF.
Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma.
Genes Chromosomes Cancer 1999 Mar;24(3):283-5

Knudson AG Jr.
Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.
Proc Natl Acad Sci U S A 1971 Apr;68(4):820-3

von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS.
Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice.
Neurobiol Aging 1997 Nov-Dec;18(6):661-9

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM.
The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein.
Cell 1988 Apr 22;53(2):219-26

Kruys V, Wathelet M, Poupart P, Contreras R, Fiers W, Content J, Huez G.
The 3' untranslated region of the human interferon-beta mRNA has an inhibitory effect on translation.
Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Sep;84(17):6030-4

Laemmli UK.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 1970 Aug 15;227(259):680-5

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T.
Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.
Science 2001 Oct 26;294(5543):853-8

Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS, Blackshear PJ.
Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA.
Mol Cell Biol 1999 Jun;19(6):4311-23

Lander ES et al.
Initial sequencing and analysis of the human genome.
Nature 2001 Feb 15;409(6822):860-921

Lasko P.
RNA sorting in Drosophila oocytes and embryos.
FASEB J 1999 Mar;13(3):421-33

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP.
An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans.
Science 2001 Oct 26;294(5543):858-62

Lease RA, Cusick ME, Belfort M.
Riboregulation in Escherichia coli: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Oct 13;95(21):12456-61

Lee RC, Ambros V.
An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans.
Science 2001 Oct 26;294(5543):862-4

Legius E, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW.
Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis.
Nat Genet 1993 Feb;3(2):122-6

Lenzini E, Leszl A, Artifoni L, Casellato R, Tenconi R, Baccichetti C.
Partial duplication of 17 long arm.
Ann Genet 1988;31(3):175-80

Leppig KA, Kaplan P, Viskochil D, Weaver M, Ortenberg J, Stephens K.
Familial neurofibromatosis 1 microdeletions: cosegregation with distinct facial phenotype and early onset of cutaneous neurofibromata.
Am J Med Genet 1997 Dec 12;73(2):197-204

Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Neil S, Robertson M, White R, Viskochil D.
Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1).
Genomics 1995 Jan 1;25(1):9-18

Lin B, Rommens JM, Graham RK, Kalchman M, MacDonald H, Nasir J, Delaney A, Goldberg YP, Hayden MR.
Differential 3' polyadenylation of the Huntington disease gene results in two mRNA species with variable tissue expression.
Hum Mol Genet 1993 Oct;2(10):1541-5

Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol R, Swaroop M, Wallace MR, Andersen LB, Mitchell AL, Gutmann DH, Boguski M, Collins FS.
cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product.
Genomics 1991 Dec;11(4):931-40

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, et al.
The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21.
Cell 1990 Nov 16;63(4):843-9

Massenburg D, Han JS, Liyanage M, Patton WA, Rhee SG, Moss J, Vaughan M.
Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Nov 22;91(24):11718-22

Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L.
Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and Alzheimer's disease.
Brain Res Brain Res Rev 1997 Feb;23(1-2):47-61

Mbella EG, Bertrand S, Huez G, Octave JN.
A GG nucleotide sequence of the 3' untranslated region of amyloid precursor protein mRNA plays a key role in the regulation of translation and the binding of proteins.
Mol Cell Biol 2000 Jul;20(13):4572-9

McLoughlin DM, Miller CC.
The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system.
FEBS Lett 1996 Nov 18;397(2-3):197-200

Meguro M, Mitsuya K, Nomura N, Kohda M, Kashiwagi A, Nishigaki R, Yoshioka H, Nakao M, Oishi M, Oshimura M.
Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: an imprinted direct repeat cluster resembling small nucleolar RNA genes.
Hum Mol Genet 2001 Feb 15;10(4):383-94

Meneghini MD, Ishitani T, Carter JC, Hisamoto N, Ninomiya-Tsuji J, Thorpe CJ, Hamill DR, Matsumoto K, Bowerman B.
MAP kinase and Wnt pathways converge to downregulate an HMG-domain repressor in Caenorhabditis elegans.
Nature 1999 Jun 24;399(6738):793-7

Mikol DD, Stefansson K.
A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes.
J Cell Biol 1988 Apr;106(4):1273-9

Miles C, Elgar G, Coles E, Kleinjan DJ, van Heyningen V, Hastie N.
Complete sequencing of the Fugu WAGR region from WT1 to PAX6: dramatic compaction and conservation of synteny with human chromosome 11p13.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998 Oct 27;95(22):13068-72

Mizuno Y, Thompson TG, Guyon JR, Lidov HG, Brosius M, Imamura M, Ozawa E, Watkins SC, Kunkel LM.
Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001 May 22;98(11):6156-61

Moschgath, E.
Sequenzcharakterisierung des 5'Bereichs des Neurofibromatose Typ 1 Lokus bei *Fugu rubripes* und des 5' flankierend liegenden Gens
Diplomarbeit, Universität Ulm, 1998

Müller U, Cristina N, Li Z, Wolfer DP, Lipp H, Rulicke T, Brandner S, Aguzzi A, Weissman C.
Mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein (beta APP) gene show impaired behavior and high incidence of agenesis of the corpus callosum.
Ann N Y Acad Sci 1996 Jan 17;777:65-73

Mullner EW, Kuhn LC.
A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm.
Cell 1988 Jun 3;53(5):815-25

Multhaup G, Bush AI, Pollwein P, Masters CL.
Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP).
FEBS Lett 1994 Nov 28;355(2):151-4

Nadeau JH, Sankoff D.
Counting on comparative maps.
Trends Genet 1998 Dec;14(12):495-501

Nagano T, Nakamura A, Mori Y, Maeda M, Takami T, Shiosaka S, Takagi H, Sato M.
Differentially expressed olfactomedin-related glycoproteins (Pancortins) in the brain.
Brain Res Mol Brain Res 1998 Jan;53(1-2):13-23

Nagano T, Nakamura A, Konno D, Kurata M, Yagi H, Sato M.
A2-Pancortins (Pancortin-3 and -4) are the dominant pancortins during neocortical development.
J Neurochem 2000 Jul;75(1):1-8

Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E.
Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)
Nature 1993 Mar 4;362(6415):75-9

Nishimoto I.
A new paradigm for neurotoxicity by FAD mutants of betaAPP: a signaling abnormality.
Neurobiol Aging 1998 Jan-Feb;19(1 Suppl):S33-8

O'Connell P, Viskochil D, Buchberg AM, Fountain J, Cawthon RM, Culver M, Stevens J, Rich DC, Ledbetter DH, Wallace M, et al.
The human homolog of murine Evi-2 lies between two von Recklinghausen neurofibromatosis translocations.
Genomics 1990 Aug;7(4):547-54

Oren M.
p53: the ultimate tumor suppressor gene?
FASEB J 1992 Oct;6(13):3169-76

Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, Catanese JJ, de Jong PJ.
A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome.
Genome Res 2001 Mar;11(3):483-96

Paramio JM, Jorcano JL.
Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling?
Bioessays 2002 Sep;24(9):836-44

Park VM, Pivnick EK.
Neurofibromatosis type 1 (NF1): a protein truncation assay yielding identification of mutations in 73% of patients.
J Med Genet 1998 Oct;35(10):813-20

Pelham HR, Jackson RJ.
An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.
Eur J Biochem 1976 AUG 1;67(1):247-56

Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH.
The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity.
J Neurosci 1997 Dec 15;17(24):9407-14

Perez Jurado LA, Peoples R, Kaplan P, Hamel BC, Francke U.
Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth.
Am J Hum Genet 1996 Oct;59(4):781-92

Perry HD, Font RL.
Iris nodules in von Recklinghausen's Neurofibromatosis. Electron microscopic confirmation of their melanocytic origin.
Arch Ophthalmol 1982 Oct;100(10):1635-40

Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S.
Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!
J Biol Chem 1999 Jan 29;274(5):2593-6

Price SR, Nightingale MS, Bobak DA, Tsuchiya M, Moss J, Vaughan M.
Conservation of a 23-kDa human transplantation antigen in mammalian species.
Genomics 1992 Dec;14(4):959-64

Quinlan R, Hutchison C, Lane B.
Intermediate filament proteins.
Protein Profile 1995;2(8):795-952

Rajagopalan LE, Malter JS.
Regulation of eukaryotic messenger RNA turnover.
Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1997;56:257-86

Rajagopalan LE, Westmark CJ, Jarzembowski JA, Malter JS.
hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA.
Nucleic Acids Res 1998 Jul 15;26(14):3418-23

Rasmussen SA, Colman SD, Ho VT, Abernathy CR, Arn PH, Weiss L, Schwartz C, Saul RA, Wallace MR.
Constitutional and mosaic large NF1 gene deletions in neurofibromatosis type 1.
J Med Genet 1998 Jun;35(6):468-71

Rea S, James DE.
Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles.
Diabetes 1997 Nov;46(11):1667-77

Riccardi VM.
Von Recklinghausen neurofibromatosis.
N Engl J Med 1981 Dec 31;305(27):1617-27

Riccardi VM, Eichner JE.
Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis.
Baltimore, 1986: John Hopkins University Press

Riccardi VM.
The prenatal diagnosis of NF-1 and NF-2.
J Dermatol 1992 Nov;19(11):885-91

Ridanpää M, van Eenennaam H, Pelin K, Chadwick R, Johnson C, Yuan B, vanVenrooij W, Pruijn G, Salmela R, Rockas S, Makitie O, Kaitila I, de la Chapelle A.
Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia.
Cell 2001 Jan 26;104(2):195-203

Rivas E, Klein RJ, Jones TA, Eddy SR.
Computational identification of noncoding RNAs in E. coli by comparative genomics.
Curr Biol 2001 Sep 4;11(17):1369-73

Rocheleau CE, Yasuda J, Shin TH, Lin R, Sawa H, Okano H, Priess JR, Davis RJ, Mello CC.
WRM-1 activates the LIT-1 protein kinase to transduce anterior/posterior polarity signals in C. elegans.
Cell 1999 Jun 11;97(6):717-26

Rouleau GA, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze C, Plougastel B, et al.
Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2.
Nature 1993 Jun 10;363(6429):515-21

Rümenapp U, Schmidt M, Wahn F, Tapp E, Grannass A, Jakobs KH.
Characteristics of protein-kinase-C- and ADP-ribosylation-factor-stimulated phospholipase D activities in human embryonic kidney cells.
Eur J Biochem 1997 Sep 1;248(2):407-14

Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM.
Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs.
Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Nov 11;94(23):12413-8

Saitoh T, Iimoto D.
Aberrant protein phosphorylation and cytoarchitecture in Alzheimer's disease.
Prog Clin Biol Res 1989;317:769-80

Sandford R, Sgotto B, Burn T, Brenner S.
The tuberin (TSC2), autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1), and somatostatin type V receptor (SSTR5) genes form a synteny group in the Fugu genome.
Genomics 1996 Nov 15;38(1):84-6

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.
Biotechnology 1992;24:104-8

de Sauvage F, Kruys V, Marinx O, Huez G, Octave JN.
Alternative polyadenylation of the amyloid protein precursor mRNA regulates translation.
EMBO J 1992 Aug;11(8):3099-103

Sawada S, Florell S, Purandare SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D.
Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma.
Nat Genet 1996 Sep;14(1):110-2

Sawata M, Yoshino D, Takeuchi H, Kamikouchi A, Ohashi K, Kubo T.
Identification and punctate nuclear localization of a novel noncoding RNA, Ks-1, from the honeybee brain.
RNA 2002 Jun;8(6):772-85

Schmidt M, Rumenapp U, Bienek C, Keller J, von Eichel-Streiber C, Jakobs KH.
Inhibition of receptor signaling to phospholipase D by Clostridium difficile toxin B. Role of Rho proteins.
J Biol Chem 1996 Feb 2;271(5):2422-6

Schnapp BJ, Arn EA, Deshler JO, Highett MI.
RNA localization in Xenopus oocytes.
Semin Cell Dev Biol 1997 Dec;8(6):529-40

Schofield JP, Elgar G, Greystrong J, Lye G, Deadman R, Micklem G, King A, Brenner S, Vaudin M.
Regions of human chromosome 2 (2q32-q35) and mouse chromosome 1 show synteny with the pufferfish genome (Fugu rubripes).
Genomics 1997 Oct 1;45(1):158-67

Schubert D, LaCorbiere M, Saitoh T, Cole G.
Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate.
Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Mar;86(6):2066-9

Schürmann A, Massmann S, Joost HG.
ARP is a plasma membrane-associated Ras-related GTPase with remote similarity to the family of ADP-ribosylation factors.
J Biol Chem 1995 Dec 22;270(51):30657-63

Schurmann A, Schmidt M, Asmus M, Bayer S, Fliegert F, Koling S, Massmann S, Schilf C, Subauste MC, Voss M, Jakobs KH, Joost HG.
The ADP-ribosylation factor (ARF)-related GTPase ARF-related protein binds to the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor cytohesin and inhibits the ARF-dependent activation of phospholipase D.
J Biol Chem 1999 Apr 2;274(14):9744-51

Seizinger BR, Rouleau GA, Lane AH, Farmer G, Ozelius LJ, Haines JL, Parry DM, Korf BR, Pericak-Vance MA, Faryniarz AG, et al.
Linkage analysis in von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) with DNA markers for chromosome 17.
Genomics 1987 Dec;1(4):346-8

Serra E, Puig S, Otero D, Gaona A, Kruyer H, Ars E, Estivill X, Lazaro C.
Confirmation of a double-hit model for the NF1 gene in benign neurofibromas.
Am J Hum Genet 1997 Sep;61(3):512-9

Sheldon M, Rice DS, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell BW, Cooper JA, Goldowitz D, Curran T.
Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice.
Nature 1997 Oct 16;389(6652):730-3

Skolnick MH, Ponder B, Seizinger B.
Linkage of NF1 to 12 chromosome 17 markers: a summary of eight concurrent reports.
Genomics 1987 Dec;1(4):382-3

Smith DB, Johnson KS.
Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase.
Gene 1988 Jul 15;67(1):31-40

Snyder DA, Rivers AM, Yokoe H, Menco BP, Anholt RR.
Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein.
Biochemistry 1991 Sep 24;30(38):9143-53

Southern EM.
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J Mol Biol 1975 Nov 5;98(3):503-17

Sprecher CA, Grant FJ, Grimm G, O'Hara PJ, Norris F, Norris K, Foster DC.
Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family.
Biochemistry 1993 May 4;32(17):4481-6

St Johnston D.
The intracellular localization of messenger RNAs.
Cell 1995 Apr 21;81(2):161-70

Steinert PM, Roop DR.
Molecular and cellular biology of intermediate filaments.
Annu Rev Biochem 1988;57:593-625

Steward O.
mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism?
Neuron 1997 Jan;18(1):9-12

Stewart M.
Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions.
Curr Opin Cell Biol 1990 Feb;2(1):91-100

Stiller CA, Chessells JM, Fitchett M.
Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study.
Br J Cancer 1994 Nov;70(5):969-72

Sweet HO, Bronson RT, Johnson KR, Cook SA, Davisson MT.
Scrambler, a new neurological mutation of the mouse with abnormalities of neuronal migration.
Mamm Genome 1996 Nov;7(11):798-802

Tellam JT, McIntosh S, James DE.
Molecular identification of two novel Munc-18 isoforms expressed in non-neuronal tissues.
J Biol Chem 1995 Mar 17;270(11):5857-63

Tellam JT, Macaulay SL, McIntosh S, Hewish DR, Ward CW, James DE.
Characterization of Munc-18c and syntaxin-4 in 3T3-L1 adipocytes. Putative role in insulin-dependent movement of GLUT-4.
J Biol Chem 1997 Mar 7;272(10):6179-86

Tilghman SM.
The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development.
Cell 1999 Jan 22;96(2):185-93

Tonsgard JH, Yelavarthi KK, Cushner S, Short MP, Lindgren V.
Do NF1 gene deletions result in a characteristic phenotype?
Am J Med Genet 1997 Nov 28;73(1):80-6

Topper JN, Clayton DA.
Secondary structure of the RNA component of a nuclear/mitochondrial ribonucleoprotein.
J Biol Chem 1990 Aug 5;265(22):13254-62

Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K, et al.
A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor.
Cell 1993 Mar 12;72(5):791-800

Trower MK, Orton SM, Purvis IJ, Sanseau P, Riley J, Christodoulou C, Burt D, See CG, Elgar G, Sherrington R, Rogaev EI, St George-Hyslop P, Brenner S, Dykes CW.
Conservation of synteny between the genome of the pufferfish (Fugu rubripes) and the region on human chromosome 14 (14q24.3) associated with familial Alzheimer disease (AD3 locus).
Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Feb 20;93(4):1366-9

Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, Penttinen M, Cordeiro I, Ponder M, Ponder BA, Krawczak M, Cooper DN.
Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay.
Hum Genet 1998 May;102(5):591-7

Valero MC, Pascual-Castroviejo I, Velasco E, Moreno F, Hernandez-Chico C.
Identification of de novo deletions at the NF1 gene: no preferential paternal origin and phenotypic analysis of patients.
Hum Genet 1997 Jun;99(6):720-6

Venkatesh B, Tay BH, Elgar G, Brenner S.
Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (Fugu rubripes) actin genes.
J Mol Biol 1996 Jun 21;259(4):655-65

Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, et al.
Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus.
Cell 1990 Jul 13;62(1):187-92

Viskochil D, Cawthon R, O'Connell P, Xu GF, Stevens J, Culver M, Carey J, White R.
The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene.
Mol Cell Biol 1991 Feb;11(2):906-12

Viskochil D, White R, Cawthon R.
The neurofibromatosis type 1 gene.
Annu Rev Neurosci 1993;16:183-205

Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, et al.
Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients.
Science 1990 Jul 13;249(4965):181-6

Wang C, JeBailey L, Ridgway ND.
Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentin intermediate filaments.
Biochem J 2002 Feb 1;361(Pt 3):461-72

Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F.
Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor.
Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Nov 15;89(22):10758-62

Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE.
Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor.
Nat Genet 1993 Sep;5(1):95-100

Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S.
Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays.
Genes Dev 2001 Jul 1;15(13):1637-51

Weidemann A, Konig G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K.
Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein.
Cell 1989 Apr 7;57(1):115-26

White R, Nakamura Y, O'Connell P, Leppert M, Lalouel JM, Barker D, Goldgar D, Skolnick M, Carey J, Wallis CE, et al.
Tightly linked markers for the neurofibromatosis type 1 gene.
Genomics 1987 Dec;1(4):364-7

Wilson DW, Whiteheart SW, Wiedmann M, Brunner M, Rothman JE.
A multisubunit particle implicated in membrane fusion.
J Cell Biol 1992 May;117(3):531-8

Wu BL, Austin MA, Schneider GH, Boles RG, Korf BR.
Deletion of the entire NF1 gene detected by the FISH: four deletion patients associated with severe manifestations.
Am J Med Genet 1995 Dec 4;59(4):528-35

Xu H, Gutmann DH.
Mutations in the GAP-related domain impair the ability of neurofibromin to associate with microtubules.
Brain Res 1997 Jun 6;759(1):149-52

Xu GF, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R, Tamanoi F.
The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of S. cerevisiae.
Cell 1990 Nov 16;63(4):835-41

Yamatsuji T, Matsui T, Okamoto T, Komatsuzaki K, Takeda S, Fukumoto H, Iwatsubo T, Suzuki N, Asami-Odaka A, Ireland S, Kinane TB, Giambarella U, Nishimoto I.
G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP.
Science 1996 May 31;272(5266):1349-52

Yokoyama M, Nishi Y, Yoshii J, Okubo K, Matsubara K.
Identification and cloning of neuroblastoma-specific and nerve tissue-specific genes through compiled expression profiles.
DNA Res 1996 Oct 31;3(5):311-20

Zaidi SH, Malter JS.
Nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins specifically interact with the 3'-untranslated region of amyloid protein precursor mRNA.
J Biol Chem 1995 Jul 21;270(29):17292-8

Zambrano N, Buxbaum JD, Minopoli G, Fiore F, De Candia P, De Renzis S, Faraonio R, Sabo S, Cheetham J, Sudol M, Russo T.
Interaction of the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding-related domains of Fe65 with wild-type and mutant Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins.
J Biol Chem 1997 Mar 7;272(10):6399-405

Zhang L, Xiao Y, Priddy R.
Increase in placental glutathione S-transferase in human oral epithelial dysplastic lesions and squamous cell carcinomas.
J Oral Pathol Med 1994 Feb;23(2):75-9

Zhong S, Wu K, Black IB, Schaar DG.
Characterization of the genomic structure of the mouse APLP1 gene.
Genomics 1996 Feb 15;32(1):159-62

Danke

Herrn Prof. Dr. Winfrid Krone möchte ich dafür danken, dass ich dieses Thema bearbeiten durfte, und dass er mir die Aufnahme in das Graduiertenkolleg Biomolekulare Medizin ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. med. Walther Vogel danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit nach dem Zusammenschluss der Abteilungen weiterführen zu können.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. Günter Assum für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Übernahme der Betreuung meiner Promotionsarbeit. Vor allem auch für die Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler bedanke ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Danke auch an Herrn Prof. Dr. Günter Speit und Herrn PD Dr. Walter Just für die Bereitschaft, als Wahlprüfer aufzutreten.

Frau Dr. Hildegard Kehrer-Sawatzki danke ich für die Bereitstellung des Themas.

Vielen Dank an Helene Spöri, die durch ihr Ideenreichtum in technischen Fragen stets eine kompetente Anlaufstelle war und mich immer durch ihre aufbauende, fröhliche Art ermutigt hat.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Sigrid Wieland-Lange für ihre besondere Art und für ihr Engagement technische Probleme zu beseitigen. Vor allem auch für die gemeinsame Etablierung der Proteinaufreinigung, die durch immer neue Ideen und dadurch letztendlich auch mit viel Spaß erfolgreich bewältigt wurde.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an Andrea Striebel richten, die mich herzlich in der Arbeitsgruppe willkommen hieß und in dieser Zeit zur sehr guten Freundin geworden ist. Danke vor allem für richtungsgebende, fachliche Diskussionsgespräche und stetige Hilfsbereitschaft in methodischen Fragen, die letztendlich sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke auch an Birgit Schmoll, Marta Schanbacher, Britta Pietsch, Claudia Schmegner, Simone Veit-Wohnhaas und Vera Wiest für den tollen Teamgeist der Arbeitsgruppe und für das sehr angenehme Arbeitsklima, vor allem auch für den Spaß bei privaten Treffen.

Ein ganz liebes Danke auch an den guten Geist der Abteilung Sonja Böse, durch die viele Arbeiten sehr erleichtert wurden. Danke auch für die immer nette, angenehme Art.

Den größten Dank möchte ich meinem Lebenspartner Volker Printz zukommen lassen. Danke für Deine Liebe und Deine Geduld, vor allem in der Zeit der Niederschrift dieser Arbeit. Nicht zuletzt danke für die Erinnerung daran, dass neben der Humangenetik auch noch ein Leben stattfindet.