

**Positionsklonierung des Morbus Best-Gens *VMD2*:  
Analyse zweier Genfamilien.**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg

vorgelegt von  
ANDREAS MARQUARDT  
aus Bremen

Würzburg, 2001

Eingereicht am: 10.05.2001

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. BERNHARD H.F. WEBER

Gutachter: Prof. Dr. MARTIN HEISENBERG

Tag des Promotionskolloquiums: 10.10.2001

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

**Erklärung gemäß §4, Absatz 3 der Promotionsordnung für die Fakultät für Biologie  
der Universität Würzburg:**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form zu einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Es wurde zuvor kein anderer akademischer Grad erworben.

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard H.F. Weber angefertigt.

Die Dissertation ist entsprechend den Regeln der neuen deutschen Rechtschreibung vom 1. August 1998 verfasst.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b> .....	4
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	6
2.1. Die vitelliforme Makuladystrophie Typ 2 .....	6
2.2. Positionsklonierung .....	9
2.3. Positionsklonierung von <i>VMD2</i> .....	14
<b>3. MATERIAL &amp; METHODEN</b> .....	16
3.1. <i>VMD2</i> -Patienten .....	16
3.2. DNA-Extraktion aus Blut .....	16
3.3. Die PAC-Bank RPCI-1 .....	17
3.4. Isolierung der Endfragmente von PAC-Klonen .....	17
3.5. Alkalische Extraktion von PAC-DNA .....	19
3.6. Alkalische Extraktion von Plasmid-DNA .....	19
3.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure .....	20
3.8. Restriktionsansätze .....	20
3.9. DNA-Agarosegelelektrophorese .....	20
3.10. DNA-Elution aus Agarosegel .....	21
3.11. 'Southern blotting' .....	21
3.12. Plasmidklonierung .....	22
3.13. Herstellung von Kolonie-Rundfiltern .....	23
3.14. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren .....	24
3.15. Endmarkierung von Oligonukleotiden .....	25
3.16. Radioaktive Hybridisierung .....	25
3.17. Kopplungsanalyse .....	26
3.18. Durchsuchung der Phagenbank $\lambda$ gt10HRET .....	27
3.19. Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierungen .....	28
3.20. EBV-Transfektion von Leukozyten .....	28
3.21. Zelllinien .....	29
3.22. RNA-Extraktion .....	29
3.23. cDNA-Synthese .....	30
3.24. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	30
3.25. Genspezifische PCR-Analysen .....	31
3.25.1. PCR-Amplifikation intronischer Sequenzen von <i>TU51</i> .....	31
3.25.2. PCR-Amplifikationen zur Analyse von Hamster/Mensch-Hybridzelllinien .....	32

3.26. Genspezifische Reverse Transkriptase-PCR-Analysen (RT-PCR) .....	33
3.27. 5'-rapid amplification of cDNA ends' (5'-RACE) .....	34
3.28. Denaturierende RNA-Gelelektrophorese .....	36
3.29. 'Northern blotting' .....	37
3.30. Sequenzierung .....	38
3.31. Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) .....	39
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
4.1. Klonierung und Charakterisierung von <i>VMD2</i> .....	42
4.1.1. Erstellung eines PAC-'Contigs' für die <i>VMD2</i> -Kandidatenregion .....	42
4.1.2. Einengung der <i>VMD2</i> -Kandidatenregion .....	45
4.1.3. Identifizierung von <i>VMD2</i> .....	47
4.1.4. Expressionsanalyse von <i>VMD2</i> .....	50
4.1.5. Mutationsanalyse von <i>VMD2</i> .....	51
4.1.6. Das <i>VMD2</i> -Protein .....	51
4.2. Klonierung und Charakterisierung von drei Fettsäuredesaturase-Genen .....	52
4.2.1. cDNA-Klonierung von <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> und <i>FADS3</i> .....	53
4.2.2. Expressionsanalyse von <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> und <i>FADS3</i> .....	55
4.2.3. Genomische Organisation und Genstruktur von <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> und <i>FADS3</i> .....	57
4.2.4. Protein-Sequenzanalyse von <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> und <i>FADS3</i> .....	59
4.3. Charakterisierung weiterer Gene aus der Region 11q12-q13.1 .....	62
4.3.1. <i>FTH1</i> .....	62
4.3.2. <i>FEN1</i> .....	63
4.3.3. <i>RAB3IL1</i> .....	63
4.3.4. <i>C11orf9</i> .....	65
4.3.5. <i>C11orf10</i> .....	66
4.3.6. <i>C11orf11</i> .....	67
4.4. Charakterisierung der <i>VMD2</i> -Genfamilie .....	69
4.4.1. <i>TU51</i> .....	69
4.4.1.1. cDNA-Klonierung und genomische Struktur von <i>TU51</i> .....	69
4.4.1.2. Expressions-Analyse von <i>TU51</i> .....	72
4.4.2. <i>TU52</i> .....	74
4.4.2.1. cDNA-Klonierung und genomische Struktur von <i>TU52</i> .....	74
4.4.2.2. Expressions-Analyse von <i>TU52</i> .....	77
4.4.3. <i>TU53</i> .....	80
4.4.3.1. cDNA-Klonierung und genomische Struktur von <i>TU53</i> .....	80
4.4.3.2. Expressions-Analyse von <i>TU53</i> .....	82
4.4.4. Chromosomale Kartierung von <i>TU51</i> , <i>TU52</i> und <i>TU53</i> .....	83
4.4.5. Sequenzidentitäten in der <i>VMD2</i> -Genfamilie .....	85

<b>5. DISKUSSION</b> .....	86
5.1. Die untersuchte chromosomale Region .....	86
5.2. <i>VMD2</i> .....	87
5.3. Mutationen in <i>VMD2</i> .....	88
5.4. Die <i>VMD2</i> -Genfamilie .....	94
5.5. Die Fettsäuredesaturase-Gene <i>FADS1</i> , <i>FADS2</i> und <i>FADS3</i> .....	96
5.6. Weitere Gene aus der <i>VMD2</i> -Kandidatenregion .....	99
<b>6. LITERATUR</b> .....	101
<b>7. VERÖFFENTLICHUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DER VORLIEGENDEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEIT</b> .....	118
7.1. Publikationen .....	118
7.2. Kongressbeiträge .....	118
<b>8. WEITERE PUBLIKATIONEN</b> .....	120
<b>9. ANHANG</b> .....	121
9.1. GenBank-Zugangsnummern .....	121
9.2. Bezugsquellen für Chemikalien .....	121
9.3. Bezugsquellen für Enzyme .....	121
9.4. Kits .....	121
9.5. Vektoren .....	121
9.6. Bakterienstämme .....	122
9.7. Antibiotika .....	122
9.8. Längenstandards .....	122
9.9. Sonstiges Material .....	122
9.10. Geräte .....	122
9.11. Online-Software .....	123
9.12. Sonstige Software .....	123
9.13. Abkürzungsverzeichnis .....	124

## 1. ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Die Dissertation beschreibt die Positionsklonierung von *VMD2*, einem Krankheitsgen des Menschen, dass der dominant vererbten vitelliformen Makuladystrophie Typ 2 (*VMD2*) zugrundeliegt. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein etwa 1.4 Mbp großer Klon-'Contig' aus artifiziellen Phagenchromosomen ('phage artificial chromosomes', PAC) erstellt, der die *VMD2*-Kandidatengenregion auf Chromosom 11q12-q13.1 physikalisch repräsentiert. Durch die Identifizierung polymorpher (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotidmarker aus dem kritischen Intervall und anschließender Kopplungsanalyse gelang es, die Kandidatengenregion auf ca. 500 kbp zu reduzieren. In der öffentlichen Datenbank (GenBank) bereitgestellte Nukleinsäuresequenzen zweier genomischer Klone aus dem Kern des relevanten chromosomalen Bereichs von zusammen etwa 290 kbp wurden dazu genutzt, über eine Kombination aus computergestützter Vorhersagen kodierender Sequenzen, Kartierung von EST-Klonen ('expressed sequence tags'), RT-PCR-Analysen und, wenn erforderlich, 5'-RACE-Experimenten, acht neue Gene des Menschen zu isolieren. Von den charakterisierten Genen erwiesen sich mehrere als potentielle Kandidaten für *VMD2*. Ein Gen, provisorisch als Transkriptionseinheit *TU15B* bezeichnet, konnte durch eine Mutationsanalyse schließlich eindeutig mit der Erkrankung assoziiert werden und wurde 1998 als *VMD2* publiziert. Drei Gene aus der untersuchten Region kodieren Mitglieder einer Familie von Fettsäuredesaturasen (*FADS1*, *FADS2* und *FADS3*), während ein anderes Gen ('Rabin3 interacting protein-like 1'; *RAB3IL1*) signifikante Sequenzidentität zu einem Transkript der Ratte besitzt, welches das GTPase-interagierende Protein Rabin3 kodiert. Den putativen Translationsprodukten drei weiterer Gene (*C11orf9*, *C11orf10* und *C11orf11*) konnte bislang keine präzise Funktion zugeschrieben werden. Mit *FTH1* ('ferritin heavy chain 1') und *FEN1* ('flap endonuclease 1') liegen zudem zwei bekannte Gene im analysierten Intervall, deren cDNA-Sequenzen bereits 1984 bzw. 1995 von anderen Forschungsgruppen isoliert und publiziert wurden. Zweifellos kann die Region als sehr genreicher Abschnitt des menschlichen Genoms bezeichnet werden. Neben der Erstellung des PAC-'Contigs', der Einengung der *VMD2*-Kandidatenregion und der Klonierung von *VMD2* war die vollständige genetische Charakterisierung der genannten Fettsäuredesaturase-Gene ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit.

Unabhängig von der Klonierung und Charakterisierung des *VMD2*-Gens sowie der chromosomal eng benachbarten Gene, richtete sich mein Interesse schließlich noch auf drei Gene des Menschen, provisorisch als *TU51*, *TU52* und *TU53* bezeichnet, die gemeinsam mit *VMD2* eine Genfamilie bilden und auf den Chromosomen 19p13.2-p13.12 (*TU51*), 12q14.2-q15 (*TU52*) und 1p32.3-p33 (*TU53*) lokalisiert werden konnten. Durch die Aufklärung der kodierenden Nukleinsäuresequenzen der Gene wurden konservierte Sequenzabschnitte innerhalb der Genfamilie erkennbar, die auf wichtige funktionelle Abschnitte der Translationsprodukte schließen lassen.

This work describes the positional cloning of the *VMD2* gene responsible for vitelliform macular dystrophy type 2 (VMD2), a dominantly inherited eye disorder in human. A physical contig of phage artificial chromosomes (PAC clones) covering 1.4 Mbp of genomic sequence was established, representing the entire *VMD2* candidate region on chromosome 11q12-q13.1. Identification and subsequently linkage analysis of polymorphic (CA)<sub>n</sub>-dinucleotide repeats was performed to refine the critical interval to approximately 500 kbp. Genomic sequences of approximately 290 kbp from the central part of the *VMD2* candidate region, available at the public database (GenBank), were helpful to reveal the structure of eight novel genes by using computational exon prediction, comprehensive mapping and assembling of expressed sequence tags (ESTs), RT-PCR and 5'-RACE analysis. Some of the identified genes were found to represent excellent candidates for *VMD2*. One gene, provisionally designated 'transcription unit 15B' (*TU15B*) has been shown to be associated with the disease and was published as *VMD2* in 1998, according to the official gene nomenclature. Three genes encode family members of the human fatty acid desaturases (*FADS1*, *FADS2* and *FADS3*), one gene (rab interacting protein like 1, *RAB3IL1*) shows high sequence identity to Rabin3, an GTPase-interacting protein first described in rat and another three genes encode proteins of unknown function (*C11orf9*, *C11orf10*, *C11orf11*). Additional two genes localized in the same region, *FTH1* (ferritin heavy chain 1) and *FEN1* (flap endonuclease 1), have been characterized previously by other research groups. The analyzed interval represents a gene-rich segment of the human genome. In addition to the assembly of PAC clones from the *VMD2* candidate region, the refinement of the critical interval using polymorphic dinucleotide repeats and the cloning of *VMD2*, this work also includes the full characterization of the three fatty acid desaturase genes.

Finally, three genes, provisionally termed *TU51*, *TU52* and *TU53* showed high sequence identity to *VMD2* and were characterized as paralogous members of the *VMD2* gene family. The corresponding gene loci were assigned to chromosome 19p13.2-p13.12 (*TU51*), 12q14.2-q15 (*TU52*) and 1p32.3-p33 (*TU53*), respectively. By determining the coding nucleic acid sequences of the genes conserved sequence elements in the gene family were identified, possibly representing functional important protein domains.

## 2. EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Positionsklonierung von *VMD2*, eines mit der vitelliformen Makuladystrophie Typ 2 (VMD2) assoziierten Krankheitsgens beschrieben. Das Ziel der Arbeit war dabei nicht nur die Identifizierung von *VMD2*, sondern auch die Charakterisierung der humanen *VMD2*-Genfamilie. In diesem Zusammenhang wurden drei zu *VMD2* paraloge<sup>1</sup> Gene isoliert und genetisch analysiert. Ebenfalls detailliert charakterisiert wurde eine Genfamilie von Fettsäuresaturasen, aus der drei Mitglieder in enger chromosomaler Nachbarschaft zu *VMD2* lokalisiert werden konnten und die aufgrund ihrer Funktion seinerzeit als potentielle Kandidatengene im Zusammenhang mit der untersuchten Erkrankung in Betracht kamen.

Die Einleitung soll zunächst einen kurzen Überblick zu Makuladegenerationen, speziell VMD2 geben, als auch anhand zahlreicher Beispiele die prinzipielle Vorgehensweise bei einer Positionsklonierung beleuchten.

### 2.1. Die vitelliforme Makuladystrophie Typ 2

In der Netzhautmitte des menschlichen Auges liegt der etwa 5 mm große „gelbe Fleck“, die Macula lutea. Im Zentrum der Makula befindet sich mit der im Durchmesser 1.5 mm großen Fovea centralis der Punkt des schärfsten Sehens, in dessen Mitte wiederum, mit 0.35 mm Durchmesser, die Foveola liegt. Die Fovea centralis enthält ausschließlich Zapfen (110.000 bis 115.000 in der Fovea centralis; 25.000 in der Foveola), während in der Peripherie der Anteil an Stäbchenzellen zunimmt. Die Retina enthält etwa 6 Millionen Zapfen, zuständig für das Sehen bei Tage und das Farbsehen sowie 120 Millionen Stäbchen zur Erhaltung der Sehfähigkeit bei Dämmerung und der Wahrnehmung von Bewegungen im peripheren Blickfeld. Die Zapfen werden bei zunehmender Dunkelheit inaktiv, so dass es zur natürlichen Entstehung eines partiellen Gesichtsfeldausfalls, eines Zentralskotoms, kommt. Parallel hierzu geht bei Nacht die Farbsichtigkeit verloren. Die insgesamt 126 Millionen Photorezeptoren des menschlichen Auges sind mit rund 1 Million Ganglien verknüpft. In der retinalen Peripherie ist der Seheindruck generell weniger deutlich, da die hier lokalisierten Ganglien den Reiz mehrerer Photorezeptorzellen weiterleiten, während im Bereich der Makula jedem Photorezeptor eine spezifische Ganglionzelle zugeordnet ist.

Häufige Ursache einer partiellen Erblindung des Menschen ist eine progressive Degenerationen der Makula. Da bei dieser Augenerkrankung die Sinneszellen außerhalb der Makula in der Regel nicht betroffen sind, kommt es glücklicherweise nicht zu einer vollständigen Erblindung der Patienten. Im äußeren Gesichtsfeld bleiben weiterhin Kontraste und Umrisse erkennbar, so dass das visuelle Orientierungsvermögen selbst bei einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium erhalten bleibt. Die

---

<sup>1</sup> Homologe Gene innerhalb eines Organismus werden als „paralog“ bezeichnet, um sie von orthologen Genen, also sequenzverwandten Genen anderer Spezies, zu differenzieren (FITCH, 2000). Obwohl noch etwas ungebräuchlich, wird dieser Definition in der Arbeit streng gefolgt.

generellen Symptome einer Makuladegeneration sind eine Reduzierung der Sehschärfe, der Lesefähigkeit, des Farbsehens, der Anpassungsfähigkeit an verschiedene Lichtverhältnisse sowie eine erhöhte Blendempfindlichkeit.

Makuladegenerationen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen, entsprechend einem altersbedingten oder einem juvenilen Beginn der Symptome. Sehr viele Menschen sind von einer altersbedingten Makuladegeneration, der AMD betroffen. Es handelt sich um eine genetisch komplexe Erkrankung, die auch von exogenen Faktoren, wie dem Fettgehalt der Nahrung, Bluthochdruck oder dem Rauchen beeinflusst wird (YATES und MOORE, 2000). In den Industrienationen ist die AMD eine prävalente Ursache für Visusbeeinträchtigungen der Bevölkerung über 65 Jahren (KLEIN *et al.*, 1992). Allein in den USA kommt es jährlich zu etwa 300.000 Neuerkrankungen. Dies hängt natürlich auch mit der hier hohen Lebenserwartung zusammen. THYLEFORS *et al.* (1995) gehen davon aus, dass im Jahr 2030 schätzungsweise 16 Mio Menschen an AMD erkrankt sein werden. Die AMD manifestiert sich generell in zwei Verlaufsformen, der häufigeren „trockenen“ und der selteneren „feuchten“ Variante. Ein charakteristisches Merkmal der trockenen AMD ist die Ausbildung kleiner gelblicher Flecke unter der Netzhaut, sog. Drusen, die in der Regel jedoch nur zu einer geringen Beeinträchtigung der Sehkraft führen. Ein typisches Symptom der feuchten AMD ist dagegen die Entwicklung abnormaler Blutgefäße, die aus der Sklera (Lederhaut) in den Bereich der Makula einwachsen (Neovaskularisierung) und durch austretende Flüssigkeit die Netzhaut anschwellen lassen. Diese Variante der AMD geht mit einem deutlichen Visusverlust einher, da das auf die Netzhaut projizierte Bild nur noch verzerrt wahrgenommen werden kann.

Zu den juvenilen Formen der Makuladegeneration gehören der Morbus Stargardt (STGD), die vitelliforme Makuladystrophie Typ 2 (VMD2), die X-chromosomale Retinoschisis (XLRS) sowie zahlreiche seltene Varianten, wie beispielsweise die Sorsby'sche Fundusdystrophie (SFD) oder die North Carolina-Makuladystrophie (NCMD). Es handelt sich um hereditäre Erkrankungen, die den allgemeinen Vererbungsregeln unterliegen. Um diese Erkrankungsformen von der alterabhängigen Makuladegeneration abzugrenzen, wird der Begriff der „Makuladystrophie“ verwendet.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die nach Morbus Stargardt zweithäufigste Form juveniler Makuladystrophien, die monogene, dominant vererbte VMD2. Anzeichen von VMD2 sind meist bereits in jungen Jahren, in der 1. bis 2. Lebensdekade des Patienten erkennbar. Erstmals 1905 von dem deutschen Ophthalmologen F. BEST als hereditäre Makulaaffektion bezeichnet, ist VMD2 auch als Best'sche Erkrankung oder Morbus Best bekannt. Der Namenszusatz „vitelliform“, eingeführt von ZANEN und RAUSIN (1950), beschreibt ein charakteristisches Merkmal der Erkrankung, nämlich eine sich bildende, eidotterförmige Substanzablagerung des retinalen Pigmentepithels (RPE) im Bereich der Makula (Abb. 1). Die Ablagerung ist in dieser Form aber keineswegs immer vorhanden, sondern repräsentiert lediglich ein frühes Stadium im Krankheitsverlauf von VMD2.



**Abb. 1** Fundus-Fotografie des rechten Auges eines Patienten mit Morbus Best. Deutlich erkennbar ist die submakuläre, eidotterförmige Ablagerung von lipofuskinähnlichem Material im Zentrum.

Das einschichtige RPE stellt die Blut-Retina-Barriere dar. Seine Hauptfunktion ist der Stofftransport von und zur Retina, insbesondere auch von Fettsäuren (z.B. BAZAN *et al.*, 1992; WANG und ANDERSON, 1992; WANG und ANDERSON, 1993). Die Substanzakkumulation bei Morbus Best ähnelt natürlich auftretenden Lipofuskinablagerungen, auch „Alterspigmente“ genannt, welche als heterogene Stoffgemische aus Oxidations- und Peroxidationsprodukten von Fettsäuren, Proteinen und diversen fluoreszierenden Komponenten, wie beispielsweise Vitamin A-Derivaten, bekannt sind (BAZAN *et al.*, 1990; AKEO *et al.*, 1996; DONTSOV *et al.*, 1999). Lipofuskinablagerungen im RPE unterscheiden sich hierbei von denen anderer Gewebe dadurch, dass sie zusätzlich die Abbauprodukte der Photorezeptoren enthalten, da die Zellen des RPE die regelmäßig von den Photorezeptoren abgestoßenen photopigmenthaltigen Membranscheiben phagozytieren und resorbieren (KENNEDY *et al.*, 1995; RESZKA *et al.*, 1995; SCHRAERMAYER und HEIMANN, 1999).

Die charakteristische lipofuskinartige Ablagerung im Bereich der Makula ist für den behandelnden Augenarzt durch eine funduskopische Untersuchung leicht diagnostizierbar. Oftmals aber zerfällt die Läsion später und hinterlässt eine ophthalmoskopisch normal erscheinende Makula. Zur präzisen Diagnose der Erkrankung ist die Aufzeichnung eines Elektrookulogrammes (EOG) geeignet, welches bei gleichzeitig normalem Elektroretinogramm (ERG) abnormal verläuft (WELEBER, 1989; WAJIMA *et al.*, 1993). Nur wenige Ausnahmen wurden hier beschrieben (BIRNDORF und DAWSON, 1973; WEBER *et al.*, 1994<sup>c</sup>; GRAFF *et al.*, 1997). Beim EOG wird das lichtabhängige Membranpotential der RPE-Zellen elektrisch abgeleitet und das Verhältnis von Hell- zu Dunkeladaptation bestimmt. Morbus Best-Patienten zeigen hierbei keinen oder einen deutlich reduzierten Hellanstieg. Vor allem in den späteren Stadien der Erkrankung, wenn die Lipofuskin-Ablagerung gegebenenfalls wieder zerfallen ist, ist ein EOG zur Diagnose von Morbus Best hilfreich. In Anlehnung an MOHLER und FINE (1981) lassen sich die funduskopisch distinkten Stadien von Morbus Best wie folgt beschreiben:

- 0 Normaler Fundus aber abnormales EOG
- I leichte Granularisierung des retinalen Pigmentepithels; leichte Hypoplasie der Retina
- IIa Typische, scharf abgegrenzte vitelliforme Läsion
- IIb erste Zerfallserscheinungen der Läsion ('scrambled egg'-Phase/Rührei-Phase)
- III Verflüssigung der vitelliformen Ablagerung (Pseudohypopyon-Phase)
- IV Subretinale Vernarbung und Neovaskularisierung, Atrophie des RPE

Zu berücksichtigen ist, dass die Erkrankung eine variable Expressivität zeigt und sich sogar innerhalb einer betroffenen Familie unterschiedlich manifestieren kann (BRALEY und SPIVEY, 1964; NORDSTRÖM und THORBURN, 1980). Auch zeigen nicht immer beide Augen des Patienten pathologische Symptome. Bei den meisten Patienten kommt es zudem lediglich zur Ausprägung der Stadien II-III. Trotz des drastischen Krankheitsbildes im Stadium IIa (Abb. 1) ist die Sehkraft in dieser Phase der Makuladegeneration kaum reduziert. Erst in den späteren Stadien und entsprechend höherem Alter der Patienten kommt es zu einer deutlichen Visusbeeinträchtigung.

## 2.2. Positionsklonierung

Unter Positionsklonierung versteht man die Isolierung von Kandidatengenomen allein aufgrund der chromosomalen Lokalisation des Krankheitsgens (COLLINS, 1992). Bei einer Positionsklonierung wird also zunächst das Krankheitsgen identifiziert und erst danach funktionell charakterisiert. Hierin unterscheidet sich das Prinzip vom dem der funktionellen Klonierung, bei der basierend auf dem Wissen über mögliche biochemische Zusammenhänge und veränderte Stoffwechselwege bei der Krankheitsentwicklung gezielt Kandidatengene analysiert werden. Der Weg der Positionsklonierung wird wesentlich häufiger beschritten, da von der überwiegenden Zahl humaner Erbkrankheiten, u.a. auch von VMD2, keine detaillierten Kenntnisse der zugrundeliegenden physiologischen Störung vorliegen. Die Herausforderung bei einer Positionsklonierung liegt im Prinzip darin, die krankheitspezifische Nukleinsäurealteration an eventuell nur einer einzigen von  $3 \times 10^9$  möglichen Nukleotidpositionen des menschlichen Genoms zu detektieren und als pathologisch relevante Mutation zu beschreiben. Dass es sich bei der Positionsklonierung um eine sehr effiziente Strategie handelt, zeigt sich an der erfolgreichen Identifizierung von mittlerweile mehr als 100 hereditären Krankheitsgenen des Menschen. Eine Zusammenstellung der Gene wird vom amerikanischen National Human Genome Research Institute (NHGRI) unter Internetadresse <http://genome.nhgri.nih.gov/clone/> bereitgehalten. Detaillierte Informationen zur Kartierung bzw. Identifizierung von Genen im Zusammenhang mit Augenerkrankungen sind zudem unter <http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/home.htm> einzusehen.

Der erste Schritt der Positionsklonierung ist die genetische Kartierung des krankheitsassoziierten Gens auf Basis des Phänotyps. Die grobe Kartierung des Gens ist dabei in seltenen Fällen durch klassische zytogenetische Untersuchungen (Karyotypanalysen) möglich, wie bei lichtmikroskopisch erkennbaren Chromosomenanomalien, etwa der Deletion oder Translokation eines größeren

chromosomalen Abschnitts. Beispielsweise trugen FOUNTAIN *et al.* (1989<sup>a</sup>, 1989<sup>b</sup>) zur Klonierung von *NF1* (Neurofibromatose 1) bei, indem sie zwei Patienten mit balancierten Translokationen zwischen Chromosom 17q11.2 und 22 bzw. 17q11.2 und 1 untersuchten.

In der Regel ist zur Lokalisierung eines Krankheitslocus jedoch eine Kopplungsanalyse genetischer Marker erforderlich. Hierbei werden die Stammbäume krankheitsbetroffener Familien analysiert, um mit Hilfe von polymorphen DNA-Segmenten, wie z.B. (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotidsequenzen, die Kandidatengenregion zu erfassen und sukzessive einzuengen. Das generelle Prinzip der Technik beruht darauf, dass sich bei den betroffenen Mitgliedern einer Familie jeweils eine bestimmte Allel-Variante eines DNA-Markers nachweisen lässt, wenn der Marker in chromosomaler Nähe zum Locus des Krankheitsgens liegt (Kopplung). Um eine Kopplungsanalyse erfolgreich durchzuführen müssen sich natürlich genügend Patienten und, sehr wichtig, deren Angehörige bereiterklären, Blut, respektive DNA zu spenden, um die genetischen Segregationsanalysen zur chromosomalen Kartierung und Feinkartierung des Krankheitsgens zu ermöglichen. Bei der Untersuchung seltener Erkrankungen oder Erkrankungen, die sich erst bei höherem Alter der Patienten manifestieren, wie etwa die AMD, ist diese Grundvoraussetzung zwangsläufig weniger leicht zu erfüllen.

Die Distanz zweier genetischer Loci wird generell über die Häufigkeit der zwischen ihnen auftretenden Rekombinationsereignisse berechnet und üblicherweise in CentiMorgan (cM) angegeben, der Einheit zur genetischen Kartierung. Ein cM entspricht dabei dem Abstand zweier Marker, bei dem die Wahrscheinlichkeit, dass zwischen den Loci ein meiotisches Rekombinationsereignis stattfindet, ein Prozent ist. Die Einheit korrespondiert nicht direkt mit der physikalischen Distanz, dennoch entspricht 1 cM des menschlichen Genoms im Durchschnitt etwa 1 Mbp an Nukleinsäuresequenz. Als Voraussetzung für die weiteren Schritte der Positionsklonierung ist man in der Regel bestrebt, die Kandidatengenregion auf 1-2 cM einzuengen.

An dieser Stelle ist auf eine Variante der Positionsklonierung, die positionelle Kandidatengen-Strategie, einzugehen, bei der basierend auf einer relativ groben Kartierung des Krankheitsgenlocus bereits bekannte Gene aus der chromosomalen Region auf Mutationen hin untersucht werden, bevor der wesentlich aufwendigere Schritt der Identifizierung neuer Gene erfolgt. Ein Beispiel hierfür ist die Analyse von *ROM1*, dem Gen für das photorezeptorspezifische 'rod outer segment protein 1', das lange Zeit als Kandidatengen für VMD2 galt, lag es doch exakt in dem für die Klonierung des Krankheitsgens kritischen Intervall (BASCUM *et al.*, 1992; STONE *et al.*, 1992). Bei Mutationsanalysen von *ROM1* konnten jedoch keine Alteration des Gens in VMD2-Patienten nachgewiesen werden (NICHOLS *et al.*, 1994). Im Zuge der Feinkartierung des Locus konnte *ROM1* wenig später zudem definitiv aus der für die Klonierung von *VMD2* relevanten Region ausgeschlossen werden (STÖHR *et al.*, 1995; HOU *et al.*, 1996).

Ist nach der Etablierung des minimalen Kandidatengen-Intervalls kein bereits bekanntes Gen in der Region lokalisiert, das als krankheitsassoziiert in Betracht käme, folgt als Basis der nun erforderlichen Suche nach neuen Genen die Erstellung eines physikalischen 'Contigs' für das definierte chromosomale Intervall. Unter einem 'Contig' versteht man eine Anordnung überlappender genomischer Klone, wie beispielsweise von YAC-Klonen ('Yeast artificial chromosome'), PAC-

Klonen ('phage artificial chromosome'), BAC-Klonen ('bacterial artificial chromosome') oder Cosmiden. Das Aufnahmevermögen an externer DNA variiert dabei erheblich innerhalb der genannten Vektorsysteme. Während YAC-Klone mehr als eine Megabase (Mbp) 'Insert'-Sequenz aufzunehmen vermögen, liegt das Limit für PAC- und BAC-Klone üblicherweise bei etwa 250 Kilobasen (Kbp). Heute werden chromosomale 'Contigs' dennoch hauptsächlich auf Basis von PAC/BAC-Klonen erstellt, da sich diese Klone als genetisch sehr stabil erwiesen haben, während YAC-Klone oftmals Chimäre unterschiedlicher chromosomaler Abschnitte darstellen oder größere Deletionen aufweisen (z.B. GREEN *et al.*, 1991; SELLERI *et al.*, 1992; BATES *et al.*, 1992). Cosmide werden ebenfalls nur noch selten in 'Contigs' integriert, da sie üblicherweise maximal 50 kbp an externer DNA beinhalten.

Im Anschluß an die Erstellung eines physikalischen 'Contigs' erfolgt die Suche nach neuen Genen. Hierzu wird eine Transkriptkarte für die kritischen Kandidatengenregion etabliert, zu deren Erstellung verschiedene, sich ergänzende Techniken eingesetzt werden können.

Nur noch selten beschrieben werden Klonierungen von Genen mit Hilfe der 'Island rescue PCR' (VALDES *et al.*, 1994), bei der der Umstand ausgenutzt wird, dass im 5'-Bereich vertebraler Gene häufig „Inseln“ hypomethylierter, CpG-reicher Dinukleotidsequenzen von etwa 1 kbp Länge vorliegen. Da solche Sequenzen einigen Restriktionsendonukleasen als Erkennungssequenz dienen, beispielsweise den 'rare-cutter'-Enzymen *SacII* oder *EagI*, lassen sich durch einen entsprechenden Restriktionsverdau der zu analysierenden genomischen Sequenz und anschließender Subklonierung oftmals 5'-Fragmente von Genen isolieren.

Häufiger angewandte Methoden sind das 'Exon trapping', auch 'Exon amplification' genannt (z.B. BUCKLER *et al.*, 1991; CHURCH *et al.*, 1994; DATSON *et al.*, 1994; DEN DUNNEN, 1999) oder die sog. direkte cDNA-Selektion (LOVETT *et al.*, 1991; PARIMOO *et al.*, 1991). Diese beide Verfahren sollen etwas detaillierter vorgestellt werden.

Der Vorteil einer Genisolierung mittels des 'Exon trappings' liegt darin, dass es sich um eine expressionsunabhängige Technik handelt, die also auch dann einsetzbar ist, wenn das Expressionsprofil des zu identifizierenden Gens nicht bekannt ist oder das Gen nur auf geringem Niveau, eventuell nur innerhalb eines engen zeitlichen Rahmens während der Entwicklung exprimiert wird. Die Technik basiert auf der Detektion funktioneller Spleiß-Stellen in der genomischen Sequenz. Hierzu werden entsprechende Fragmente in spezielle 'Trapping'-Vektoren kloniert (z.B. pSPL-Vektoren, sCOGH-Vektoren), welche ein artifizielles Minigen enthalten. Dieses besteht oft aus einem Segment des Simian Virus 40 (SV40) inklusive eines Replikationsursprungs, einer hochaktiven Promotor-Sequenz, zwei flankierenden, spleißkompetenten Sequenzen (artifizielle Exons), einer dazwischenliegenden pseudointronischen Sequenz mit multipler Klonierungsstelle ('multiple cloning site', MCS) und des SV40-Polyadenylierungs-Signals. Wird nun in die MCS Fremd-DNA integriert, die Spleiß-Stellen enthält, also eine oder mehrere exonische Sequenzen trägt, so entsteht bei der *in vitro*-Transkription der rekombinanten DNA (z.B. in der Säugerzelllinie COS7) ein fusioniertes mRNA-Transkript aus Vektor- und Fremd-Sequenz(en). Mittels einer spezifischen

Reverse Transkriptase (RT)-PCR basierend auf Oligonukleotidprimern aus den flankierenden vektoriellen Exon-Sequenzen lassen sich die isolierten Exons anschließend amplifizieren. Inzwischen wurde die Technik zur erfolgreichen Klonierung von wenigstens 30 Genen eingesetzt, beispielsweise zu der des 'Huntington Disease'-Gens *HD*, (THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP, 1993), des 'Menke Disease'-Gens *MCI* (VULPE *et al.*, 1993), oder des Tumor-Suppressorgens für die Neurofibromatose 2 (TROFATTER *et al.*, 1993). Auch zur Erstellung einer Transkriptkarte für die *VMD2*-Kandidatenregion wurde die Methode verwendet (COOPER *et al.*, 1998). Während der Vorteil der 'Exon trapping'-Technik in der Expressionsunabhängigkeit liegt und darin, direkt kodierende Sequenzen zu ermitteln, ist ein wesentlicher Nachteil, dass intronlose Gene mit Hilfe der Methode nicht detektierbar sind.

Ist der Expressionsort eines Krankheitsgens bekannt, bietet sich als Alternative die Durchführung einer direkten cDNA-Selektion an. Es handelt sich um eine expressionsabhängige Methode, bei der ein Pool von cDNA-Transkripten, synthetisiert aus mRNA eines als Expressionsort des Gens anzunehmenden Gewebes, auf immobilisierte genomische Klone (z.B. PAC- oder BAC-Klone) hybridisiert wird, um nach einer Stringenzwäsche spezifisch gebundene cDNA-Fragmente zu eluieren und zu klonieren. Die durch eine direkte cDNA-Selektion isolierten cDNA-Fragmente repräsentieren also gewebsspezifisch transkriptionsaktive Gene aus der analysierten Region. Das Verfahren ist inzwischen so ausgereift, dass es sogar möglich wurde, chromosomenspezifische cDNA-Banken zu klonieren. Als „Fänger“-DNA wurden dazu Cosmid-'Pools' eingesetzt, welche ein komplettes humanes Chromosom abdecken (CHENG *et al.*, 1994). Ein Nachteil der direkten cDNA-Selektion ist, dass meist nur cDNA-Fragmente aus der 3'-untranslatierten Region der Gene isoliert werden, da unter Verwendung einer Reversen Transkriptase selten die 'full length'-Synthese von cDNA gelingt. Dies liegt daran, dass die Reaktion üblicherweise durch einen Oligo-d(T)<sub>12-18</sub>-Primer initiiert wird, welcher am äußersten 3'-Ende der polyadenylierten mRNA bindet. Da partielle cDNA-Klone aus der 3'-Region von Genen aber nur selten Abschnitte der kodierenden Sequenz beinhalten, kann bei der Analyse der selektierten cDNA-Sequenzen oftmals noch keine Aminosäuresequenz des putativen Translationsprodukts abgeleitet werden. Meist kann erst nach Erstellung eines datenbankbasierten 'Contigs' aus EST-Klonen ('expressed sequence tags'), der die 'full length'-cDNA repräsentiert oder, wenn dies nicht gelingt, durch ein 'Screening' von cDNA-Banken oder die Durchführung von 5'-RACE-Experimenten die vollständige kodierende Sequenz ermittelt werden. Angewandt wurde die Technik der direkten cDNA-Selektion beispielsweise zur Klonierung von *MEN1* ('multiple endocrine neoplasia type 1'; THE EUROPEAN CONSORTIUM ON MEN1, 1997), zur Erstellung einer Transkriptkarte der 'Huntington Disease'-Region (ROMMENS *et al.*, (1993) oder auch zur Erstellung einer Transkriptkarte für die *VMD2*-Kandidatenregion (STÖHR *et al.*, 1998<sup>b</sup>).

Heutzutage werden sowohl die Technik des 'Exon trappings' als auch die direkte cDNA-Selektion seltener angewandt, da durch moderne, automatisierte Verfahren die zügige Sequenzierung eines kompletten Kandidatengen-'Contigs' möglich und bezahlbar geworden ist. Viele Gene einer zu untersuchenden Region können nach Erstellung einer lückenlosen Sequenz durch 'Gene prediction'-Programme wie GRAIL, FGENES oder GENSCAN vorhergesagt werden (Übersicht zur Software:

CLAVERIE, 1997). Obwohl viele dieser Programme sehr effizient Genstrukturen erkennen, müssen Experimente zur Validierung der Ergebnisse durchgeführt werden. Prinzipiell lassen sich Gene bei Vorliegen einer genomischen Sequenz auch durch eine *in silico*-Kartierung exprimierter Sequenzen, den EST-Klonen aus der dbEST-Datenbank, detektieren. Besonders die Existenz eines größeren EST-'Clusters' innerhalb der genomischen Sequenz weist deutlich auf einen potentiellen Genlocus hin. Der erforderliche Arbeitsaufwand um beispielsweise zwei überlappende, genomische PAC-Klone von zusammen vielleicht 300 kbp DNA zu sequenzieren, ist allerdings nicht zu unterschätzen. Nach der durchzuführenden Subklonierung und Sequenzierung ggf. hunderter von Subklonen muss eine zusammenhängende Sequenz erzeugt werden. Besonders die zahlreichen repetitiven Sequenzelemente innerhalb des humanen Genoms, wie beispielsweise die 100-400 bp umfassenden 'short interspersed elements' (SINE's), zu denen die repetitiven Elemente der Alu- und MIR-Klasse zählen, erschweren die fehlerfreie Zusammenfügung der einzelnen Sequenzfragmente erheblich. Nach Abschluss der Sequenzierung des humanen Genoms wird der Anteil an repetitiven Sequenzen immerhin auf mindestens 45% geschätzt. Hierunter sind allein 1.5 Millionen Kopien von SINEs und 850000 Kopien von LINE's ('long interspersed elements') erfasst (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001).

Bei Untersuchungen der chromosomalen Kandidatenregion für das Werner-Syndrom-Gen *WRN* führten HISAMA *et al.* (1998) sowohl die Sequenzierung eines größeren genomischen Abschnitts als auch eine direkte cDNA-Selektion und ein 'Exon trapping' durch. Beim Vergleich der Effizienz aller drei Methoden stellte sich heraus, dass keine Technik genügte, alle der letztendlich isolierten Transkriptionseinheiten nachzuweisen. Interessanterweise waren die Autoren aber mit Hilfe der cDNA-Selektion in der Lage wenigstens 11 von 12 Transkriptionseinheiten innerhalb eines 1.4 Mbp großen genomischen Intervalls zu detektieren, während sich das 'Exon trapping' (durchgeführt für einen kleineren Intervall von 800 kbp) und auch die Sequenzierung (650 kbp) mit jeweils 4 von 8 Transkriptionseinheiten als weniger effizient herausstellten. Bestätigt wird das Potential der direkten cDNA-Selektion auch von HARSHMAN *et al.* (1995) durch vergleichende Experimente zur Klonierung des *BRCA1*-Gens (*BRCA1*; 'breast cancer type 1'). Im Falle der Klonierung von *VMD2* hingegen führte die cDNA-Selektion nicht zum Erfolg. Vielmehr wurde das Gen schließlich mit Hilfe computergestützter Analysen auf Basis genomischer Sequenzen detektiert.

Der erfolgreiche Abschluss einer Positionsklonierung besteht in der Identifizierung des krankheitsverursachenden Gendefekts. Häufig angewandte Techniken zur Mutationsdetektion sind die Einzelstrangkondensations-Analyse ('single stranded conformational analysis'; SSCA), die Dichtegelgradienten-Elektrophorese (DGGE), die direkte Sequenzierung oder, in jüngerer Zeit, die denaturierende 'High-Performance'-Flüssigchromatographie (DHPLC). Ist eine Mutation identifiziert muss hinreichend belegt werden, dass die gefundene Alteration ursächlich mit der Pathologie der Erkrankung assoziiert ist und nicht einfach einen Polymorphismus der Normalpopulation darstellt. Bei humanen Erbkrankheiten eignet sich zur Validierung die Segregationsanalyse der Mutation in

betroffenen Familien, bzw. die Bestätigung des Befundes durch die Untersuchung einer signifikanten Anzahl nichtverwandter Patienten. Um die Pathologie einer Mutation nachzuweisen wird zudem oftmals ein Tiermodell etabliert. Dies geschieht in der Regel durch gezielte *in vitro*-Mutagenese des Gens in pluripotenten, embryonalen Stammzellen der Maus und anschließender Reimplantation und Zucht heterozygoter und homozygoter 'Knock out'- bzw. 'Knock in'-Mäuse. Allerdings ist diese Strategie nicht immer erfolgreich, da der erzeugte Gendefekt in der Maus durchaus einen anderen oder gar keinen Phänotyp verursachen kann.

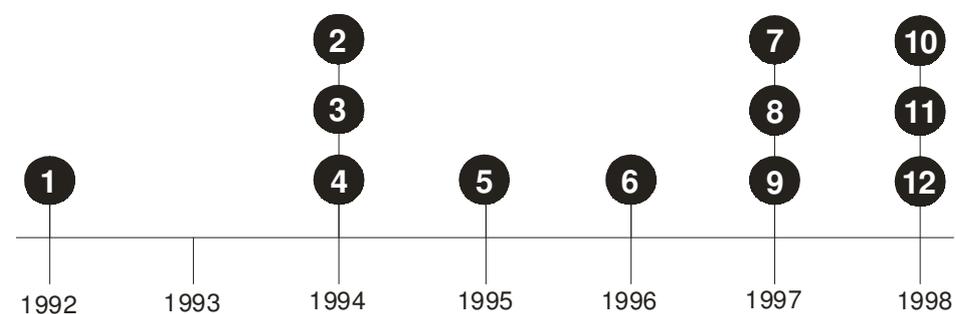
### 2.3. Die Positionsklonierung von *VMD2*

Anfang 1996, zu Beginn der Doktorarbeit, waren im Rahmen der Positionsklonierung von *VMD2* bereits umfangreiche Vorarbeiten abgeschlossen. Schon 1992 wurde *VMD2* mit Hilfe von Kopplungsanalysen auf Chromosom 11q13 kartiert (STONE *et al.*, 1992; FORSMAN *et al.*, 1992). Sukzessive Analysen polymorpher Marker führten zur Einengung der Kandidatenregion (WEBER *et al.*, 1994<sup>a</sup>; WEBER *et al.*, 1994<sup>b</sup>; NICHOLS *et al.*, 1994; GRAFF *et al.*, 1994; STÖHR *et al.*, 1995; WADELIUS *et al.*, 1996), an deren Ende zunächst ein etwa 1.4 Mbp großes Intervall zwischen Marker D11S1765 und dem Uteroglobin-Gen *UGB* auf 11q12-q13.1 bestehen blieb. Durch diese Arbeiten wurde u.a. der Locus von *ROM1* aus der *VMD2*-Kandidatenregion ausgeschlossen. Ebenfalls als nichtassoziiert mit Morbus Best wurde das zu dieser Zeit noch im kritischen chromosomalen Bereich liegende Gen *DDB1* gefunden (STÖHR *et al.*, 1998<sup>a</sup>), ein Gen, das in der Retina exprimiert wird und das 'UV-damaged DNA-binding protein 1' kodiert. Die zuletzt publizierten Grenzen der *VMD2*-Kandidatenregion basieren auf Untersuchungen der polymorphen Marker D11S4076 und *UGB*. Der Bereich wurde auf etwa 980 kbp geschätzt (GRAFF *et al.*, 1997). Bisher nicht publiziert ist ein weiterer polymorpher Marker, 221L18CA/GT benannt und in Abschnitt 4.1.2. ausführlich beschrieben, der aufgrund eines Rekombinationsereignisses in einer der untersuchten Familien mit Morbus Best hilfreich war, die Kandidatenregion schließlich auf etwa 500 kbp einzuengen.

1998 wurde vergeblich versucht, *VMD2* mit Hilfe eines 'exon trappings' (COOPER *et al.*, 1998) bzw. einer direkten cDNA-Selektion zu isolieren (STÖHR *et al.*, 1998). In letzterer Untersuchung wurden dabei nicht weniger als 14 bislang unbekannte Transkriptionseinheiten analysiert. Wenig später wurden in der öffentlichen Sequenzdatenbank (GenBank) erstmals genomische, anfänglich noch fragmentarische Nukleinsäuresequenzen zweier Klone aus dem zentralen Bereich des relevanten chromosomalen Abschnitts bereitgestellt. Es handelt sich um PAC-Klon dJ466A11, sequenziert am Eugene McDermott Center for Human Growth and Development (Universität von Texas, Dallas, USA) und BAC-Klon CIT-HSP-311e8 (Joint Genome Institute, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, USA). Beide Klone überlappen einander und konnten zu einer lückenlosen DNA-Sequenz von 290 kbp vereint werden. Die Veröffentlichung der Sequenzen war sowohl hilfreich die genomischen Strukturen der durch die cDNA-Selektion identifizierten Transkripte aufzuklären als auch die Lage und genomische Organisation weiterer, nicht durch die cDNA-

Selektion detektierter Gene zu ermitteln. Computergestützte Vorhersagen exonischer Sequenzen in Kombination mit einer umfassenden EST-Kartierung, RT-PCR-Analysen und 5'-RACE-Experimenten führte zur Charakterisierung acht neuer Gene, von denen sich gleich mehrere als potentielle Kandidatengene für Morbus Best erweisen sollten.

Eines der Gene, seinerzeit provisorisch als Transkriptionseinheit *TU15B* bezeichnet, konnte schließlich eindeutig mit *VMD2* assoziiert werden und wurde wenig später als *VMD2* publiziert (MARQUARDT *et al.*, 1998). Der Übersicht halber sind die Meilensteine in der Positionsklonierung von *VMD2* noch einmal in Abbildung 2 zusammengefasst.



- |   |  |
|---|--|
| <p><b>1</b> Kartierung des Genlocus' auf Chromosom 11q13 (STONE <i>et al.</i>, 1992)</p> <p><b>2</b> Beschreibung der Kandidatengenregion als 10 cM-Intervall (NICHOLS <i>et al.</i>, 1994)</p> <p><b>3</b> Einengung der Kandidatengenregion auf einen 6 cM-Intervall (GRAFF <i>et al.</i>, 1994)</p> <p><b>4</b> Einengung der Kandidatengenregion auf einen 3.7 cM-Intervall (WEBER <i>et al.</i>, 1994)</p> <p><b>5</b> Ausschluß von <i>ROM1</i> aus der Kandidatenregion (STÖHR <i>et al.</i>, 1995)</p> <p><b>6</b> Erstellung eines YAC-' Contigs' für Chromosom 11 (QIN <i>et al.</i>, 1996)</p> | <p><b>7</b> Einengung der Kandidatenregion auf einen Intervall von 980 kbp (GRAFF <i>et al.</i>, 1997)</p> <p><b>8</b> Etablierung eines PAC-' Contigs' für die Kandidatengenregion (COOPER <i>et al.</i>, 1997)</p> <p><b>9</b> Einengung der Kandidatenregion auf einen Intervall von 500 kbp (MARQUARDT, unveröffentlicht)</p> <p><b>10</b> Erstellung von Transkriptkarten für die kritische Region (STÖHR <i>et al.</i>, 1998; COOPER <i>et al.</i>, 1998)</p> <p><b>11</b> Bereitstellung genomischer Sequenzen aus dem Kern der Kandidatenregion (GenBank)</p> <p><b>12</b> Klonierung von <i>VMD2</i> (MARQUARDT <i>et al.</i>, 1998; PETRUKHIN <i>et al.</i>, 1998)</p> |
|---|--|

**Abb. 2** Chronologie der *VMD2*-Klonierung.

### 3. MATERIAL & METHODEN

#### 3.1. VMD2-Patienten

Für die vorgenommenen Mutationsanalysen wurden DNA-Extrakte aus peripheren EDTA-Blutproben von Patienten der unten genannten 12 Familien mit Morbus Best herangezogen. Es sind jeweils wenigstens zwei Generationen der Familien von der Erkrankung betroffen. Die Blutproben wurden von Augenkliniken aus Deutschland, Großbritannien, Kanada, Ungarn und der Tschechischen Republik eingesandt, wo auch die entsprechenden Diagnosen gestellt wurden:

Familie C	Großbritannien
Familie D	Kanada
Familie Di	Kanada
Familie F	Großbritannien
Familie G	Deutschland
Familie H	Deutschland
Familie N	Kanada
Familie O	Deutschland
Familie R	Deutschland
Familie S	Tschechische Republik
Familie T	Ungarn
Familie W	Deutschland

Detaillierte klinische Befunde der betroffenen Familien D, Di, H, N, R und W wurden vorgestellt von WEBER *et al.* (1994<sup>a</sup>), WEBER *et al.* (1994<sup>b</sup>), WEBER *et al.* (1994<sup>c</sup>) und STÖHR *et al.* (1998). Die Diagnosen für die betroffenen Personen der Familien C (fünf Betroffene), F (acht), G (drei), O (drei), S (drei) und T (fünf) basieren auf dem positiven Familienhintergrund, gründlichen Fundus-Analysen und EOG-Aufzeichnungen, die jeweils bei wenigstens einem der betroffenen Familienmitgliedern zur Feststellung der VMD2-typischen Läsion der Makula führten (MARQUARDT *et al.*, 1998).

#### 3.2. DNA-Extraktion aus Blut

DNA aus nichtkoagulierte EDTA-Blut wurde mit Hilfe einer Salzextraktion isoliert. Hierzu wird die Blutprobe mit dem 4fachen Volumen an Lysispuffer [155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHOC<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.4] versetzt und bei mehrfachem Invertieren 30 min auf Eis inkubiert. In einer vorgekühlten Zentrifuge (4°C, 10 min, 2000 rpm), werden die Kerne der Leukozyten präzipitiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml SE-Puffer [75 mM NaCl, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0] gelöst. Es werden 250 µl einer 20%igen SDS-Lösung und 50 µl Proteinase K (Stocklösung: 10 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz für wenigstens 3 h bei 55°C oder über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von je 2.5 ml SE-Puffer und 6M NaCl. Nach kräftigem Schütteln

und 10 min Inkubation bei 55°C wird der Ansatz zentrifugiert (RT, 10 min, 4000 rpm). Die DNA befindet sich im klaren Überstand und wird in ein frisches Röhrchen überführt.

### 3.3. Die PAC-Bank RPCI-1

Am Department of Human Genetics, Roswell Park Cancer Institute, RPCI (Buffalo, USA) wurde eine humane PAC-Bank erstellt, von der uns der Teil 1 (RPCI-1), mit einem Umfang von 115.200 individuellen Klonen auf insgesamt 321 Mikrotiterplatten zur Verfügung gestellt wurde. Die Detektion spezifischer PAC-Klone erfolgt durch DNA-Hybridisierung von 'high density'-Nylonmembranen, auf die die Klone gestempelt sind. Die RPCI-1-Bank ist am Institut für Humangenetik bei -80°C verwahrt.

### 3.4. Isolierung der Endfragmente von PAC-Klonen

Die Technik beruht auf einer speziellen 'degenerate oligonucleotide primed'-PCR (DOP-PCR), wie sie WU *et al.* (1996) beschreibt. Es wird eine geschachtelte PCR mit PAC-DNA als 'Template' angesetzt, bei der einerseits die PAC-Vektor-spezifischen Primer PCYPAC2-01 (5'-TGA CTG GGT TGA AGG TCC TC-3'), PCYPAC2-02 (5'-AAG TAC AAG TAC AGA GGA AG-3') als äußere Primer, SP6 (5'-CGA CAT TTA GGT GCA CTA T-3') und T7 (5'-GCC GCT AAT ACG ACT CAC TA-3') als innere Primer und andererseits der teilweise degenerierte, zufällig bindende Primer 6-MW (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3'; TELENIOUS *et al.*, 1992) eingesetzt werden. Die PCR-Konditionen müssen im Bedarfsfalle angepasst werden, entsprechen aber prinzipiell dem nachfolgend beschriebenen Protokoll.

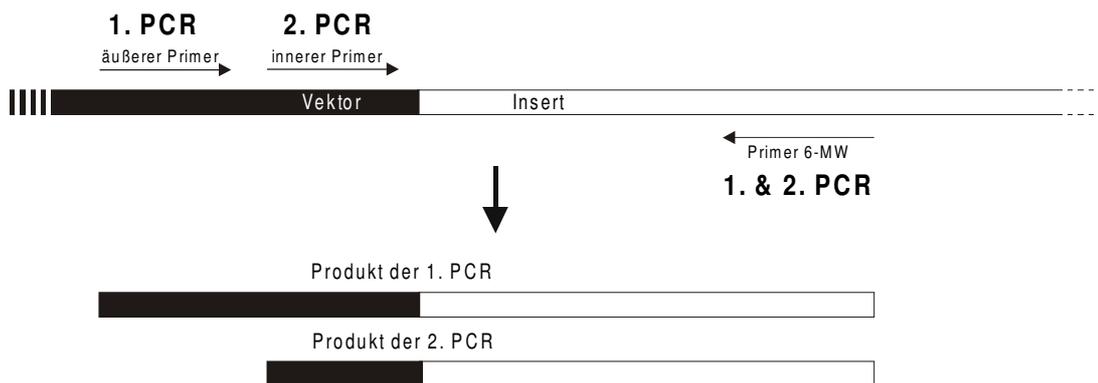
Im ersten PCR-Ansatz werden 50-100 ng an isolierter PAC-DNA (gelöst in 3 µl H<sub>2</sub>O) oder, alternativ dazu, 3µl Übernachtskultur des entsprechenden PAC-Klons in einem 50µl-Reaktionsansatz bestehend aus 1×PCR-Puffer [20mM Tris HCl (pH 8.4), 50mM KCl; Fa. GIBCO-BRL], 0.2 µM 6-MW, 0.6 µM PCYPAC2-01 bzw. PCYPAC2-02, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100µM dNTP's und 1 U *Taq*-Polymerase bei folgendem PCR-Profil amplifiziert:

5min	94°C	
30 sec	94°C	} 5x
60 sec	30°C	
60 sec	72°C	
5 min	72°C	
30 sec	94°C	} 25x
60 sec	52-60°C	
60 sec	72°C	
5 min	72°C	
∞	4°C	

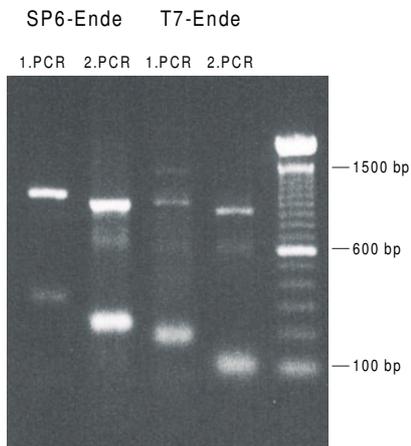
Als 'Template' für die zweite PCR werden 2 µl einer 1:200-Verdünnung der ersten Reaktion eingesetzt. Die Zusammensetzung des Ansatzes entspricht der zuvor genannten, mit dem Unterschied, dass nun die 'nested' gelegenen Vektor-Primer' T7 ('nested' zu PCYPAC2-01 gelegen) bzw. SP6 ('nested' zu PCYPAC2-02) in Kombination mit 6-MW verwendet werden. Folgendes PCR-Profil hat sich bewährt:

5 min	94 °C	} 32x
30 sec	94 °C	
60 sec	60 °C	
60 sec	72 °C	
5 min	72 °C	
∞	4 °C	

Zur Verdeutlichung der Prozedur ist in Abb. 3a der schematische Ablauf der beiden aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen dargestellt. In Abb. 2b ist als Beispiel die gelelektrophoretische Analyse der entsprechenden PCR-Ansätze für PAC dJ527E4 zu sehen.



**Abb. 3a** Schematische Darstellung der DOP-PCR-basierten Isolierung spezifischer Endfragmente von PAC-Klonen.



**Abb. 3b** Beispiel einer gelelektrophoretischen Auftrennung von Amplifikationsprodukten der ersten und zweiten DOP-PCR zur Isolierung spezifischer Endfragmente von PAC-Klonen (hier dJ527E4). Gut zu erkennen ist die Verkürzung der PCR-Produkte durch die zweite, 'nested' PCR-Reaktion, ein klares Indiz für die Lage des Produkts am Übergang von Vektor und 'Insert'.

Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel wurde jeweils das deutlichste Nukleinsäurefragment aus dem Gel eluiert (3.10.),  $\alpha^{32}\text{P}$ -markiert (3.14.) und zur Hybridisierung (3.16.) der PAC-Bank RPCI-1 benutzt, um sequenzüberlappende PAC-Klone zu detektieren.

### 3.5. Alkalische Extraktion von PAC-DNA

DNA aus den bakteriellen PAC-Klonen wurde analog der Vorgehensweise bei einer Plasmid-Extraktion mittels alkalischer Lyse (SAMBROOK *et al.*, 1989) durchgeführt. Hierbei wird mit einem Einzelklon zunächst eine 3 ml-Übernachtskultur [LB-Medium: 10 g Bacto-Pepton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl auf 1 L H<sub>2</sub>O; 75 µg/ml Kanamycin] angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (180-200 rpm) inkubiert. Die Übernachtskultur wird anschließend auf 30 ml aufgefüllt (mit o.g. Medium) und bei Zusatz von 300 µl 0.1 M IPTG weitere 3-4 h inkubiert. Danach werden die Bakterien 2 min abzentrifugiert (9000 rpm) und in Lösung I [50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt durch Zugabe von 4 ml Lösung II [0.2 N NaOH, 1% SDS] bei vorsichtigem Schütteln für 3-4 min. Danach werden 3ml NaOAc (pH 5.2) zugemischt und die genomische DNA 20 min bei 4°C ausgefällt. Nach Abzentrifugation für 25 min bei 12000 rpm wird der Überstand in ein neues Röhrchen überführt, um durch Zugabe eines gleichen Volumens an PCI-Mix [50% Phenol, 49% Chloroform, 1% Isoamylalkohol] 5 min lang die bakteriellen Proteine auszuschütteln. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 12000 rpm) wird der Überstand erneut überführt und der Vorgang wiederholt. Daraufhin erfolgt eine Ausschüttelung mit dem gleichen Volumen an reinem Chloroform. Abschließend wird der Überstand wiederum überführt und die Nukleinsäure entweder mit gleichem Volumen Isopropanol oder mit dem 2.5 fachen Volumen an Ethanol (incl. 1/10 Vol. 3M NaOAc) ausgefällt. Bei Verwendung von Isopropanol erfolgt dies bei Raumtemperatur, bei Verwendung von Ethanol bei -20°C, jeweils für wenigstens 2 h. Nach Zentrifugation des Fällungsansatzes für 25 min bei 12000 rpm wird die pelletierte Nukleinsäure mit 70%igem Ethanol gewaschen, ein letztes Mal abzentrifugiert und in 50-200 µl H<sub>2</sub>O bzw. TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) gelöst. Zum Verdau der enthaltenen RNA wird der Lösung 25 µg/ml RNase A zugesetzt und der Ansatz 30min bei 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wird die DNA-Lösung bei 4°C oder -20°C aufbewahrt.

### 3.6. Alkalische Extraktion von Plasmid-DNA

Zur Plasmidpräparation, z.B. zwecks Vektor-Präparation oder zur Sequenzierung, wurden entsprechende Kits unter Verwendung der mitgelieferten Protokolle eingesetzt (QIAprep<sup>®</sup> Spin Plasmid Kit, Fa. QIAGEN; Nucleospin<sup>®</sup>, MACHEREY-NAGEL). Die Zusammensetzung der Lösungen entspricht im Prinzip dem klassischen Protokoll zur alkalischen Lyse, wie es bereits im vorherigen Abschnitt detailliert angeführt wurde. Der generelle Unterschied liegt lediglich in der Verwendung von Zentrifugationssäulen zur Affinitätsbindung der Nukleinsäure, wodurch zur

Aufreinigung der DNA eine Ausschüttelung der Extrakte mit Phenol/Chloroform und die nachfolgende Alkoholfällung ersetzt werden.

### 3.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure

Bei Bedarf wurde mit Hilfe der UV-Spektrometrie bei 260 nm die Konzentration von Nukleinsäuren ermittelt. Zur Vermessung wurde dabei auf die Faustformel zurückgegriffen, nach der eine gemessene Absorption  $A_{260}$  von 1 einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger RNA bzw. 33  $\mu\text{g/ml}$  einer Oligonukleotidprimer-Lösung entspricht.

### 3.8. Restriktionsansätze

Zum Verdau von Nukleinsäuren, wie PAC-DNA, Plasmid-DNA, PCR-Produkten etc. wurden im Rahmen diverser Experimente zahlreiche handelsübliche Restriktionsendonukleasen incl. der mitgelieferten Reaktionspuffer benutzt. Die Inkubationstemperatur wurde dabei entsprechend den Angaben der Hersteller eingehalten. Häufig eingesetzte Enzyme waren *EcoRI*, *PstI*, *Sau3AI* und *BamHI*. In seltenen Fällen verwendet wurden u.a. *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *SalI*, *SmaI*, *SpeI*, *SrfI*, *XbaI* und *XhoI*.

### 3.9. DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA, z.B. zur Analyse von PCR-Produkten, zur Kontrollen der Effizienz von Plasmid-Extraktionen, PAC-Extraktionen oder Restriktionsansätzen und oftmals zwecks nachfolgendem 'Southern blots', wurden Agarosegele von 0.7-2% angefertigt.

Um beispielsweise ein 1%iges Gel mit einem Volumen von 100 ml herzustellen, wird 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer [89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8.0] gegeben und mit Hilfe eines Mikrowellengerätes in Lösung gebracht. Nach Ausgleich der Verdunstungsmenge mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  und Abkühlung des Gels auf etwa 55°C wird zur späteren Visualisierung der Nukleinsäure Ethidiumbromid [200ng/ml] zugesetzt und das Gel in die vorbereitete Kammer gegossen. Als Laufpuffer wird ebenfalls TBE-Puffer verwendet. Welcher Längenstandard aufzutragen ist, hängt von der erwarteten Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente ab. In aller Regel ist die 1 kb Plus-Leiter der Fa. GIBCO-BRL geeignet (100-12000 bp, unterteilt in 20 Banden). Vor Auftrag der Ansätze werden zu je 15  $\mu\text{l}$  Probe 5  $\mu\text{l}$  eines beschwerenden Puffers [30% Glycerin, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol; in TBE] gegeben, damit die Nukleinsäure 'submerge' beladen werden kann. Das Gel läuft je nach Bedarf 1-4 h bei 75-120 V und kann anschließend unter UV-Licht betrachtet und fotografiert werden. Gegebenenfalls werden Nukleinsäurefragmente aus dem Gel eluiert (3.10.) oder das Gel wird für einen 'Southern blot' (3.11.) vorbereitet.

### 3.10. DNA-Elution aus Agarosegel

Um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu eluieren, z.B. für eine nachfolgende Klonierung, Sequenzierung oder Sondenpräparation, wurden, je nachdem, was genau das Vorhaben war, zwei alternative Methoden zur Gelelution angewandt.

Zur späteren  $\alpha^{32}\text{P}$ -Markierung eines DNA-Fragments beispielsweise wird in Laufrichtung vor der entsprechenden Nukleinsäurebande liegend ein kleiner Agaroseblock mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und die entstandene Lücke mit 'low melting point'-Agarose ausgegossen. Nach Erhärtung der 'low melting point'-Agarose wird die Gelelektrophorese fortgesetzt, bis das Nukleinsäurefragment der Wahl in die 'low melting point'-Agarose eingewandert ist. (ca. 10 min bei 70 V). Nun wird die Bande mit einem Skalpell herausgelöst und kann direkt zur  $\alpha^{32}\text{P}$ -Markierung eingesetzt werden (3.14.).

Alternativ zur beschriebenen Vorgehensweise kam das NucleoSpin<sup>®</sup> Extract 2 in 1 Kit der Fa. MACHEREY-NAGEL zum Einsatz. Hier kann die gewünschte Nukleinsäurebande direkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden, muss also nicht vorher in 'low melting point'-Agarose überführt werden. Es soll hier darauf verzichtet werden, die Prozedur der Elution detailliert zu beschreiben. Sie ist vergleichsweise simpel und wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die extrahierte DNA kann anschließend ohne weitere Aufreinigung in Sequenzierungsreaktionen, Ligationsansätzen, Restriktionsansätzen etc. verwendet werden.

### 3.11. 'Southern blotting'

Im Rahmen der Arbeit wurden sehr viele 'Southern blot'-Analysen durchgeführt. Beispielsweise mussten allein zur Erstellung des PAC-'Contigs' für die *VMD2*-Kandidatenregion regelmäßig 'Southern blots' angefertigt werden, um mittels Hybridisierungsexperimenten die Lage der isolierten Klone zueinander zu prüfen. Das Protokoll ist dabei nicht direkt an die von SOUTHERN (1975) empfohlene Vorgehensweise angelehnt, sondern stellt eine als 'squash blot' bekannte Abwandlung dar, wie sie von SAMBROOK *et al.* (1989) beschrieben wird. Mittels dieser Technik können bei Bedarf gleich zwei Kopien von Transfermembranen erzeugt werden.

Das zu ‚blottende‘ Gel wird 10 min in 0.25 M HCl geschwenkt, 5 min in ddH<sub>2</sub>O, zweimal 20 min in Denaturierungslösung [0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl], 5 min in ddH<sub>2</sub>O und abschließend 10 min in Neutralisierungslösung [25 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5]. Währenddessen wird ein Stapel aus passend zugeschnittenem, saugfähigem Papier errichtet (10-15cm hoch; das Papier sollte in den Maßen etwas größer sein als das Gel) und mit zwei Lagen Whatman<sup>®</sup>-Papier abgedeckt, welches zuvor in 2×SSC [300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat; pH 7.0] getränkt wurde. Auf das feuchte Whatman<sup>®</sup>-Papier wird die ebenfalls mit 2×SSC angefeuchtete Transfermembran (hier die Nylonmembran Hybond<sup>®</sup>-N<sup>+</sup>, AMERSHAM-USB) gelegt und auf der Membran, ohne Luftblasen zu erzeugen, das Gel plaziert. Nun wird auch von oben eine Membran auf das Gel gebracht und mit zwei Lagen Whatman<sup>®</sup>-Papier sowie einem Stapel Saugpapier belegt. Zum Schluß wird der Aufbau mit einer geeigneten Platte abgedeckt, seitlich stabilisiert und mit einem Gewicht von etwa 500 g beschwert. Ein Pufferreservoir,

wie es beim originalen 'Southern blot' errichtet wird, ist nicht nötig. Als Transferpuffer dient hier ausschließlich die im Gel enthaltene Flüssigkeit. Der Nukleinsäuretransfer dauert mehrere Stunden und erfolgt idealerweise über Nacht. Nach dem Entfernen der Papierstapel werden auf den Nylonmembranen mit einem Bleistift die Positionen der Ladetaschen des Gels markiert. Bei der weiteren Beschriftung ist unbedingt zu beachten, dass die obenliegende Nylonmembran die Nukleinsäure spiegelverkehrt zur vorherigen Orientierung im Gel trägt.

### 3.12. Plasmidklonierung

Da für Klonierungsexperimente die Methode der Elektrotransformation gewählt wurde, mussten sog. „elektrokompetente“ Zellen bereitgehalten werden. Es so ll zunächst deren Herstellung beschrieben werden:

Mit einer vereinzelt Kolonie von *Escherichia coli* XL-1 Blue oder DH5 $\alpha$  wird eine 10 ml-Übernachtskultur aus LB-Medium [10 g Bacto-Pepton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl (nicht 10 g!) auf 1 L H<sub>2</sub>O; 25  $\mu$ g/ml Tetracyclin] angesetzt. Mit dieser Vorkultur wird eine 800 ml-Hauptkultur angeimpft und das logarithmische Wachstum der Bakterien regelmäßig am Spektrometer (600 nm) protokolliert. Nach etwa 3 h erreicht die Kultur die gewünschte OD von etwa 0.7. Die Bakterien werden nun in eiskalten Zentrifugenbechern und vorgekühlter Zentrifuge bei 5200 rpm 6 min pelletiert, zweimal in 400 ml eiskaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und jeweils erneut zentrifugiert. Abschließend wird mit einer Pipette möglichst viel überschüssige Flüssigkeit von den Bakterien entfernt. Die Zellen werden nun mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von etwa 1400  $\mu$ l bei 15% Glycerin gebracht, in einem Trockeneisbehälter in Portionen von 50 $\mu$ l schockgefroren und bis zur Transformation bei -80°C verwahrt.

Zur Ligation von Plasmidvektor und Insert(s) wurde eine handelsübliche T4-Ligase unter Verwendung des mitgelieferten Reaktionspuffers benutzt. In Anlehnung an die verbreitete Faustformel wurde für 'sticky end'-Ligationen (z.B. von *EcoRI*-Überhängen) ein Vektor-Insert-Verhältnis von etwa 1:3 und für 'blunt end'-Ligationen (z.B. *EcoRV*-Enden) eines von 1:6 bis 1:9 gewählt, jeweils bezogen auf die geschätzte Anzahl beider beteiligter Fragmente. Als Vektor wurde zumeist pBluescript<sup>TM</sup> gewählt. Die Ligationsreaktion erfolgte i.d.R. in einem Volumen von 12  $\mu$ l über Nacht bei 16°C. Alternativ hierzu wurden auch vergleichbar effiziente Reaktionen in 2-4 h bei RT durchgeführt.

PCR-Produkte wurden häufig mit Hilfe des TA Cloning<sup>®</sup> Kits der Fa. INVITROGEN oder dem pCR-Script<sup>TM</sup> Amp SK(+) Cloning Kit (STATAGENE) kloniert, welche auf den Vektoren pCR<sup>TM</sup> II bzw. pCR-Script<sup>TM</sup> basieren. Bei Anwendung des TA Cloning<sup>®</sup> Kits wird der Umstand ausgenutzt, dass die *Taq*-Polymerase bei der DNA-Synthese einen 3'-Überhang eines einzelnen Deoxyadenosins am synthetisierten Strang produziert, so dass das amplifizierte Fragment leicht in einen geöffneten Vektor mit T-Überhang (z.B. eben pCR<sup>TM</sup> II) integriert werden kann. Der Vorteil des pCR-Script<sup>TM</sup> Amp SK(+) Cloning Kits hingegen ist, dass nach der Transformation besonders wenig falschpositive Klone heranwachsen, da während des Ligationsprozesses das 'rare-cleavage'-Restriktionsenzym *SrfI*

(Erkennungssequenz: 5'-GCCC|GGGC-3') im Reaktionsansatz enthalten ist und selbstligierte Vektormoleküle wieder öffnet. Voraussetzung für die Verwendung dieses Kits ist selbstverständlich, dass das zu klonierende Nukleinsäurefragment keine Erkennungssequenz für *SrfI* trägt, so dass durch die Ligation mit den Vektorenden die vektorspezifische *SrfI*-Erkennungssequenz unterbrochen wird. Außerdem ist bei dieser Klonierungsstrategie eine *Pfu*-Polymerase zur PCR zu verwenden, da dieses Enzym, im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase, eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt und daher nicht den o.g. 3'-Überhang am PCR-Produkt erzeugt. Zur Klonierung wurde den Instruktionen der Hersteller gefolgt.

Die eigentliche Transformation erfolgte stets mit Hilfe des 'Gene Pulsers' der Fa. BIO-RAD und wurde folgendermaßen durchgeführt:

Eine 50 µl-Zellsuspension „elektrokompetenter“ Bakterien (*E. coli* XL-1 Blue oder DH5α) wird bei 4°C langsam aufgetaut und mit 1-2 µl des Ligationsansatzes (10-50 ng DNA) beschickt. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis werden die Zellen mittels steriler Pasteurpipette in eine vorgekühlte Transformationsküvette (0.2 cm) überführt und diese an den Elektroden des Gerätes eingerastet. Die Elektroporation der bakteriellen Zellwände zwecks Einschleusung der Plasmid-DNA erfolgt für 10 µsec bei 2.5 kV, einer elektrischen Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Danach werden die Bakterien zur Regeneration in 1ml SOC-Medium [20 g Bacto-Peptide, 5 g Hefeextrakt, 0.5g NaCl auf 1L H<sub>2</sub>O, 20mM Glukose] aufgenommen, 1h bei 37°C geschüttelt und anschließend auf vorbereiteten Petrischalen mit Selektions-LB-Agar [10 g Bacto-Peptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar auf 1 L H<sub>2</sub>O; 100 µg/ml Ampicillin; 3.5µl/ml 100mM IPTG, 1,7 µl/ml 2%ige X-Gal-Lösung] ausplattiert. Die Klone werden über Nacht bei 37°C kultiviert.

### 3.13. Herstellung von Kolonie-Rundfiltern

Zur Hybridisierung von bakteriellen Klonen, beispielsweise durchgeführt nach Subklonierung eines restringierten PAC-Klons in pBluescript®/*E. coli* DH5α oder Klonierung eines PCR-Produkts, werden die Klonierungsansätze zunächst in geeigneter Verdünnung in einer Petrischale mit Selektions-LB-Agar [10 g Bacto-Peptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar auf 1 L H<sub>2</sub>O; 100 µg/ml Ampicillin] ausplattiert und über Nacht bei 37°C herangezogen. Am nächsten Tag, bei ausreichender Größe der gewachsenen Bakterienkolonien, wird ein passender Rundfilter aus Nylonmembran (DuPONT) auf die Klone gelegt, zur späteren Orientierung viermal eingestochen (z.B. mit einem kleinen Skalpell) und wieder abgezogen. Die Kolonien haften nun fast vollständig an der Membran. Die Petrischale wird bis zur Isolierung der gewünschten Klone bei 4°C gelagert. Bei Bedarf können die auf dem Agar verbliebenen Reste der Kolonien zuvor noch kurz bei 37°C kultiviert werden (4-5 h sind hier ausreichend), um sie später leichter lokalisieren zu können. Die Membran wird mit der Rückseite (Seite ohne Kolonien) für 15 min auf ein mit Denaturierungslösung [0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl] getränktes Whatman®-Papier gelegt, anschließend für 5 min auf ein mit Neutralisierungslösung [25 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5] befeuchtetes Whatman®-Papier überführt und

zuletzt für 15 min auf ein mit 2×SSC [300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat; pH 7.0] behandeltes Whatman®-Papier aufgebracht. Die Zellrückstände der Kolonien werden mit einem Papiertuch und einer erwärmten Lösung aus 3×SSC/0.1%SDS vorsichtig abgewischt. Vor der nun folgenden Prähybridisierung wird die Bindung der extrahierten Nukleinsäure an die Membran durch ein 'cross linking' unter UV-Licht (322nm, 2min) verstärkt. Soll die Membran bis zur Hybridisierung gelagert werden, so geschieht dies bei -20°C.

### 3.14. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Für die meisten Hybridisierungsexperimente, wie z.B. Southern blot'- und 'Northern blot'-Analysen oder Hybridisierungen der PAC-Bank RPCI-1, wurden die eingesetzten Nukleinsäuresonden mittels des 'random labelings' markiert. Verwendet wird hierzu OLB-Puffer [Lösungen A, B und C im Verhältnis 2:5:3; Lösung A: 1ml Lösung O (1.25 M Tris-HCl (pH 8.0), 125 mM MgCl<sub>2</sub>), 18 µl β-Mercaptoethanol, 5 µl 100 mM dATP, 5 µl 100 mM dGTP, 5 µl 100 mM dTTP; Lösung B: 2 M Hepes (pH 6.6); Lösung C: 50 OD U pd(N)<sub>6</sub>-'random hexamer' (PHARMACIA #27-2166-O1)]. Die zu markierende Nukleinsäure wurde zuvor in 'low melting point'-Agarose aufgenommen (3.10.) und kann nun direkt in folgende 50 µl-Reaktion eingebracht werden:

5 µl	DNA in 'low melting point'-Agarose (25-75 ng)
10 µl	5×OLB
2 µl	BSA [10mg/ml]
29 µl	ddH <sub>2</sub> O
Ansatz 3 min auf 100°C erhitzen, dann Zugabe von	
3 µl	α- <sup>32</sup> P-dCTP [30 µCi]
1 µl	KLENOW-Fragment [4U/µl]
Inkubation bei RT über Nacht oder für wenigstens 2h bei 37°C	

Nach Ende der Reaktion erfolgt die Reinigung der Nukleinsäuresonde mittels Gelfiltration. Hierzu wird Sephadex® G25 verwendet [4 g in 80ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0, autoklaviert)]. Eine 1 ml-Einwegspritze (ohne Kanüle) wird am Boden mit autoklavierter und silikonisierter Glaswolle verstopft und mit hydratisiertem Sephadex® G25 unter Anwendung einer Wasserstrahlpumpe gefüllt (bis ca. 1 cm unterhalb der maximalen Füllhöhe). Die hergestellte Säule wird 2 min bei 1600 rpm zentrifugiert und der Auslauf verworfen. Anschließend wird die Säule weitere 2 min bei 1600 rpm mit ddH<sub>2</sub>O äquilibriert und der Durchlauf erneut verworfen. Nun kann die Säule mit dem Markierungsreaktionsansatz (mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl Vol. gebracht) beschickt werden. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 1600 rpm) wird der Durchlauf mit einem GEIGER-MÜLLER-Zähler auf ausreichende Radioaktivität hin überprüft (mind. 500 cps erforderlich). Bis zur Hybridisierung kann die Nukleinsäuresonde bei RT oder 4°C gelagert werden, muss aber unmittelbar vor der Hybridisierung 5 min bei 100°C denaturiert werden. Enthält die zu hybridisierende Nukleinsäure repetitive Sequenzelemente, wie z.B. solche der Alu/SINE-Klasse, oder ist dies unbekannt aber nicht unwahrscheinlich, sind der Sonde vor der Hybridisierung 50 µl gescherte

Plazenta-DNA [4µg/µl] zuzusetzen, um repetitive 'Template'-Sequenzen in der zu hybridisierenden Nukleinsäure zu blockieren.

### 3.15. Endmarkierung von Oligonukleotiden

Zu mehreren Zwecken wurden radioaktiv markierte Oligonukleotidsonden eingesetzt, beispielsweise zur 'Southern blot'-Hybridisierung überlappender PAC-Klone, um mit Hilfe der vektorspezifischen Primer T7 und SP6 deren Orientierung zueinander zu ermitteln oder zur Segregationsanalyse von (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotidmarkern (3.17.). Die Markierungs-Reaktion wird von der T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert:

2 µl	Primer [10pmol/µl]
16 µl	ddH <sub>2</sub> O
mischen, 2min bei 70°C inkubieren, dann Zugabe von	
2.5 µl	10×PNK-Puffer
1.5 µl	PNK [10 U/µl]
3 µl	γ- <sup>32</sup> P-dATP [30 µCi]
Inkubation für mind. 30min bei 37°C	

Im Anschluß an die Reaktion wird der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf 100µl Vol. aufgefüllt und die Nukleinsäuresonde entsprechend Abschnitt 3.14. über eine Sephadex<sup>®</sup> G25-Säule zur Hybridisierung aufbereitet.

### 3.16. Radioaktive Hybridisierung

Hybridisiert wurden angefertigte 'Southern blots' (3.11.), 'Northern blots' (3.29.) und Kolonie-Rundfilter (3.13.) sowie Membranen der RPCI-1-PAC-Bank (3.3.) und der retinalen Phagenbank λgt10HRET (3.18.). Als Nukleinsäuresonde wurde stets DNA eingesetzt, entweder aus einem Gel eluierte und mittels 'random labeling' radioaktiv markierte PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente (3.14.) bzw. endmarkierte Oligonukleotidprimer (3.15.). Das generelle Verfahren zur Hybridisierung, ohne nennenswerte Modifikation gültig für alle genannten Anwendungen, soll kurz beschrieben werden:

Zuerst wird der zu hybridisierende Nukleinsäurefilter mind. 30 min in 15 ml 60°C warmen CHURCH-Puffer prähybridisiert [0.5 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 7% SDS; CHURCH und GILBERT (1984)]. Hierzu wird ein geeigneter Meßzylinder mit Gummistopfen (und kleiner Bohrung zum Druckausgleich) und ein Hybridisierungs-ofen mit passendem Rotor verwendet. Anschließend wird der Prähybridisierungspuffer abgegossen und durch frischen, ebenfalls vorgewärmten CHURCH-Puffer ersetzt. Das Volumen des Hybridisierungspuffers ist möglichst gering zu halten (max. 15-20 ml), muss aber auf jeden Fall ausreichend bemessen sein, um die zu hybridisierende Membran pro Rotorumlauf vollständig zu benetzen. Vor Zugabe der Nukleinsäuresonde ist diese für 5 min bei

100°C zu denaturieren (ggf. nach Zugabe von 'Blocking'-DNA, vgl. 3.14.). Hybridisierungen unter Verwendung markierter Oligonukleotide erfolgen aufgrund der Kürze der Sonde bei nur 42°C, während längere DNA-Sonden bei 60-65°C hybridisiert werden. Die Inkubationszeit beträgt wenigstens 4h. Nach Beendigung der Hybridisierung wird die sondenhaltige Hybridisierungslösung abgegossen und ggf. für weitere Hybridisierungen aufbewahrt. Es folgt die Stringenzwäsche der Membran mit SSPE-Puffer [150 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA; pH 7.0]. Entsprechend der eingesetzten Nukleinsäuresonde wird sowohl die Temperatur (42-65°C) als auch die Salzkonzentration der SSPE/SDS-Waschlösung angepasst. Bei einer Standard-Stringenzwäsche wird die hybridisierte Membran beispielsweise je 15 min in 2×SSPE/0.1% SDS, 1×SSPE/0.1% SDS, 0.5×SSPE/0.1% SDS, 0.2×SSPE/0.1% SDS sowie 0.1×SSPE/0.1% SDS gewaschen. Vor den beiden letzten Waschschrritten sollte allerdings mit Hilfe eines GEIGER-MÜLLER-Zählers geprüft werden, inwieweit noch radioaktive Zerfallsereignisse auf der hybridisierten Nukleinsäuremembran messbar sind. Bei ausreichend geringer Radioaktivität kann die Membran in Folie verschweißt und in der Dunkelkammer zur Autoradiographie in eine lichtundurchlässige Mappe mit Röntgenfilm eingelegt werden. die Exposition dauert i.d.R. 1-2 Tage bei RT, kann im Falle insensitiverer 'Northern blot'-Hybridisierungen aber durchaus 1-2 Wochen in Anspruch nehmen. Sind nur sehr schwache Hybridisierungssignale zu erwarten, kann die Sensitivität durch Verwendung einer Verstärkerfolie und dann erforderlicher Exposition bei -80°C gesteigert werden.

Soll eine hybridisierte Membran später wiederverwendet werden, was besonders im Falle wertvoller RNA-Fragmente von Interesse ist, so kann die gebundene Nukleinsäuresonde durch ein 'stripping'-Verfahren von der Membran entfernt werden. Diese wird hierzu 10-15 min in einer 100°C heißen Lösung aus 0.01×SSC/0.01% SDS geschwenkt. Bei Bedarf wird der Vorgang wiederholt.

### 3.17. Kopplungsanalyse

Zur Einengung der *VMD2*-Kandidatenregion wurden meiotische Rekombinationsereignisse in betroffenen Familien analysiert. Hierzu wurden mehrere der in der relevanten Region auf Chromosom 11q12-q13.1 lokalisierten PAC-Klone auf enthaltene repetitive (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotid-Sequenzen und deren Kopplung/Cosegregation mit dem Krankheitsgen hin untersucht. Für die Analyse wurden die PAC-Klone dJ59L21, dJ398K24, dJ71C4, dJ52B24, dJ527E4, dJ465G21, dJ379A21 und dJ221L18 herangezogen (vgl. Abb. 6). Die isolierte DNA der PAC-Klone wurde mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I verdaut und mittels 'Southern blot' auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Detektion der (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotid-'Repeats' wurde die PAC-DNA anschließend mit dem <sup>32</sup>P-endmarkiertem Oligonukleotid (GT)<sub>24</sub> hybridisiert (vgl. Abb. 7). Nach Subklonierung der *Pst*I-verdauten PAC-Fragmente in pBluescript® erfolgte das 'Screening' der Subklone durch die erneute Hybridisierung mit (GT)<sub>24</sub>. Nach Plasmidpräparation der detektierten Subklone wurden diese mit den vektorspezifischen Oligonukleotidprimern SP6 (5'-CGA CAT TTA GGT GCA CTA T-3') und T7 (5'-GCC GCT AAT ACG ACT CAC TA-3') sequenziert.

Drei (CA)<sub>n</sub>-Repeats' aus den PAC-Klonen dJ52B24, dJ379A21 und dJ221L18 wurden für die Kopplungsanalyse herangezogen. Die PCR-Amplifikation der repetitiven Sequenzen erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 1 angegebenen Oligonukleotidprimer. Die Amplifikation entspricht dabei der unter 3.24. beschriebenen, allgemeinen Methodik. Wurde das Oligonukleotid zuvor nicht endmarkiert, wird den Reaktionen zur Markierung und späteren Analyse der PCR-Produkte  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zugesetzt (0.1  $\mu\text{l}$  [1  $\mu\text{Ci}$ ] auf 25  $\mu\text{l}$  Reaktionsvolumen).

**Tab. 1) Kopplungsanalyse von (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotid-Sequenzen**

PAC-Klon	'forward'-Primer 'revers'-Primer	5'→3'-Primer-Sequenzen	Fragmentgröße (bp)
dJ52B24	52B24_A-F 52B24_A-R	GCAAACTCCATATAAACAC GCTTTTGTGTCTTTATTGG	~ 180
dJ379A21	379A21-F 379A21-R	GGCAGGGGGAATTTAGAGGA CAGCCAATACTCCGAACAGATG	~ 235
dJ221L18	221L18-F 221L18-R	TGATTTTATTACCCTCTGTGC AAAGAAAACGTCAAATGAGT	~ 175

Zur Segregationsanalyse der Allele werden die radioaktiv markierten PCR-Produkte auf einem 6%igen Polyacrylamidgel (Fertiglösung Sequagel-6, Fa. BIOZYM) aufgetrennt (3-4 h bei 55-75 W, 150-250 mA, 1700-2000 V). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel getrocknet und 1-2 d auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Auswertung der Allele erfolgt anhand des Autoradiogramms.

### 3.18. Durchsuchung der Phagenbank $\lambda\text{gt10HRET}$

Zur Isolierung genspezifischer cDNA-Fragmente von *FADS2* wurde die im Phagen  $\lambda$  angelegte retinale cDNA-Bank  $\lambda\text{gt10HRET}$  hybridisiert. Das Phagenlysat wurde freundlicherweise von Dr. J. NATHANS (University School of Medicine, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt.

Für das 'Screening' der Bank wurde vom RZPD in Berlin der IMAGE-Klon 51069 des *FADS2*-spezifischen EST-Klons ym42c04 (GenBank-Zugangsnummer H17219, vgl. Abb. 14b) erhalten. Nach Anzucht des Klons und nachfolgender Plasmidpräparation wurde das 'Insert' mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *HindIII* isoliert, geextrahiert und für die Hybridisierung  $\alpha^{32}\text{P}$ -markiert. Die Hybridisierung erfolgte nach Standardprotokoll (3.16.) auf zwei identischen Kopien der angelegten Nylonmembranen der  $\lambda$ -Bank um die Interpretation falschpositiver Signale zu erleichtern. Die eindeutig positiven Signalen zugrundeliegenden Phagenplaques wurden mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette mitsamt dem darunterliegenden Agar ausgestanzt und in 100  $\mu\text{l}$  SM-Puffer [100 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.01% Gelatine] überführt. Nach mehrstündiger Inkubation bei 4°C (ohne Schütteln) wurde 1  $\mu\text{l}$  des nunmehr phagenhaltigen Puffers direkt zur PCR-Analyse mit den  $\lambda$ -Vektor-spezifischen Oligonukleotidprimern  $\lambda\text{gt10-F}$  (5'-GGT GGC GAC TCC TGG AGC CCG-3') und  $\lambda\text{gt10-R}$  (5'-TTG ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG-3') sowie dem *FADS2*-spezifischen Primer TUK8-F2 (5'-AAA GGA GAG GAG AAA GGG A-3') verwendet, der in reverskomplementärer Orientierung in den 5'-Bereich von EST-Klon ym42c04

gelegt wurde. Das aus der Primerkombination TUK8-F2/ $\lambda$ gt10-F resultierende PCR-Produkt, benannt als F2- $\lambda$ gt10HRET (vgl. Abb. 14b), erweiterte die seinerzeit bekannte cDNA-Sequenz von *FADS2* im 5'-Bereich. Durch die erneute Hybridisierung der cDNA-Bank mit F2- $\lambda$ gt10HRET konnte leider kein weiteres *FADS2*-spezifisches cDNA-Fragment isoliert werden. Zur Aufklärung des 5'-Sequenz des Gens wurde daher eine 5'-RACE-Analyse vorgenommen (3.27.).

### 3.19. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen zur chromosomalen Lokalisation von *TU51*, *TU52* und *TU53* wurden von Dr. INDRAJIT NANDA aus der zytogenetischen Abteilung des Instituts durchgeführt. Das Protokoll orientiert sich an der von LICHTER *et al.* (1990) und WARD *et al.* (1995) beschriebenen Methodik. Die zu verwendende Nukleinsäuresonde (hier genspezifische PAC-Klone) wird mittels 'nick translation' mit Biotin-16-dUTP (Fa. BOEHRINGER) markiert und auf fixierte Metaphase-Chromosomen kultivierter peripherer Blutzellen des Menschen hybridisiert. Die anschließende Detektion erfolgt mit fluoreszenzmarkiertem Avidin und, zur Verstärkung des Signales, mit fluoreszenzmarkierten Anti-Avidin-Antikörpern unter Verwendung eines Axiophot Epifluoreszenzmikroskopes der Fa. ZEISS. Zur Gegenfärbung der Chromosomen wird Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) verwendet.

Mein eigener Arbeitsanteil an den Analysen lag in der Detektion und Isolierung der zur Hybridisierung eingesetzten PAC-Klone dJ142H8 (spezifisch für *TU51*), dJ321A17 (*TU52*) und dJ181M10 (*TU53*), wie unter 4.4.4. beschrieben.

### 3.20. EBV-Transfektion von Leukozyten

Transfektionen mit dem EPPSTEIN-BARR-Virus (EBV) wurde zum Zwecke einer unlimitierten Gewinnung von RNA aus Blutzellen von VMD2-Patienten standardmäßig wie folgt durchgeführt:

3 ml von eingesandtem peripheren EDTA-Blut werden zu 3 ml HBSS-Medium (60 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g NaCl, 350 mg  $\text{NaHCO}_3$ , 48 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ad 1 L sterilem  $\text{ddH}_2\text{O}$ ) pipettiert, vermischt und behutsam (ohne Vermischung) mit 3 ml Ficoll<sup>®</sup> (Dichte: 1.077 g/ml) überschichtet. Die im Blut enthaltenen Leukozyten werden 30 min lang bei 2100 rpm abzentrifugiert. Der herausgebildete Ring aus Leukozyten wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, ohne dabei die Ficoll<sup>®</sup>-Phase zu erfassen, und mit 2 ml HBSS versetzt. Durch erneute Zentrifugation (10 min, 2100 rpm) werden die Zellen pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen vorsichtig in RPMI-Komplett-Medium [15% FKS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) in 200 ml RPMI 1640 (GIBCO-BRL)] resuspendiert. Es werden 500  $\mu$ l einer 0.45  $\mu$ m-filtrierten EPPSTEIN-BARR-Virus (EBV)-Lösung (zur Verfügung gestellt von GITTA EMMERT aus der Abteilung für Biochemische Humangenetik) zugeführt. Die Inkubation erfolgt für 24 h bei 37°C im Brutschrank (5%  $\text{CO}_2$ ). Anschließend werden die transfektierten Leukozyten (transfektiert werden die B-Lymphozyten) kurz abzentrifugiert (10 min, 2100 rpm) und der EBV-haltige Überstand abgenommen. Anschließend

werden die Zellen in 3 ml RPMI-Komplett-Medium gelöst und wie zuvor inkubiert (zunächst noch im Zentrifugenröhrchen). Etwa zweimal wöchentlich ist das Wachstumsmedium auszutauschen. Sind die Zellen zu ausreichender Dichte vermehrt, erfolgt die weitere Kultivierung in Zellkulturfläschchen à 10 ml RPMI-Komplett-Medium. Bei Bedarf werden die Kulturen geteilt. Besonders am Tag vor der geplanten RNA-Extraktion sollten die Zellen noch einmal mit frischem Medium versorgt werden. Soll eine Kultur kryokonserviert werden, ist ein Einfriermedium anzusetzen [50% RPMI-Komplett-Medium, 40% FKS, 10% DMSO] und das abzentrifugierte Zellpellet (10 min, 2100 rpm) in 2 ml davon aufzunehmen. Je 1 ml wird in Kryoröhrchen der Fa. NUNC über 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf werden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut, in 3 ml RPMI überführt, abzentrifugiert (10 min, 2100 rpm), mit frischem Medium versehen und wie beschrieben kultiviert.

### 3.21. Zelllinien

Es wurde die vom retinalen Pigmentepithel abgeleitete Zelllinie ARPE-19 (DUNN *et al.*, 1996) zur Präparation von RNA verwendet. Als Wachstumsmedium dient hier DULBECCO's MEM Nut Mix F-12-Medium [HAM, 2.5mM L-Glutamin, 15mM Hepes] der Fa. GIBCO-BRL, dem 10% inaktiviertes FKS, 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) sowie 0.5% Fungizone (250 µg/ml) zugesetzt sind. Die Kultivierung erfolgte analog zu den bereits unter 3.20. beschriebenen Bedingungen im Brutschrank. Im Gegensatz zu den lymphoblastoiden Zelllinien wächst ARPE-19 als konfluenten Rasen adhäsiver Zellen, so dass zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche (z.B. zwecks Passagierung oder Kryokonservierung) zunächst eine Trypsinlösung [0.05% Trypsin, 0.02% Na<sub>4</sub>EDTA in HBSS] auf die Zellen einwirken muss (2-10 min). Zur RNA-Extraktion ist dies nicht erforderlich. Hier kann die Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Lösung (siehe 3.22.) direkt auf den Zellrasen gegeben werden. Unter leichtem Schwenken kommt es dabei rasch zur Lyse der Zellen. RNA-Extrakte anderer Zelllinien (Y79 [Donorgewebe: Retinoblastom], HS683 [Donorgewebe: Gliom des linken Temporallappens], Fibroblasten, HeLa [Donorgewebe: Cervix-Karzinom]) zur Verwendung in den Expressionsstudien zu *TU51*, *TU52* und *TU53* wurden mir von Dr. HEIDI STÖHR und REGINA WARNEKE-WITTSTOCK vom Institut für Humangenetik zur Verfügung gestellt.

### 3.22. RNA-Extraktion

RNA wurde für 'Northern blot'-Analysen, cDNA-Synthesen und 5'-RACE-Experimente benötigt. Es wurde dabei ausschließlich auf Gesamt-RNA zurückgegriffen, da aufgrund der geringen Verfügbarkeit menschlichen Gewebes, insbesondere retinalem Gewebes, keine effiziente mRNA-Anreicherung durchführbar war. Die Isolierung der RNA verlief prinzipiell entsprechend dem Protokoll von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) zur sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion, allerdings wurde zur Vereinfachung der Prozedur die Fertiglösung RNA-Clean<sup>TM</sup>-LS (enthält Guanidiniumthiocyanat und Phenol) der Fa. AGS verwendet.

Je nachdem ob RNA aus Gewebe oder Zelllinien isoliert werden soll, muss die Extraktionsmethode entsprechend modifiziert werden. Im Falle der Extraktion aus Zelllinien werden zu je 25 ml Zellsuspension direkt 75 ml Clean<sup>TM</sup>-LS zugesetzt und das Gemisch zwecks Lyse der Zellen dreimal in eine Spritze mit 0.9mm-Kanüle aufgezogen, während festes Zellgewebe vor Zugabe der Lösung in einem geeigneten, sterilen Homogenisator mehrere Minuten zerkleinert wird. Nach Zugabe der Lösung und mehrminütigem Schütteln lässt sich dann auch dieses Homogenat zur weiteren Zersetzung des Gewebes in eine Spritze aufziehen. Anschließend werden 0.2 ml Chloroform pro ml Homogenat zugegeben, der Ansatz 15 sec geschüttelt und 5 min auf Eis gekühlt. Danach lassen sich durch Zentrifugation (15 min, 12000 rpm) zwei Phasen trennen, die untere Phenol-Chloroform-Phase und die obere, wässrige und RNA-haltige Phase. DNA und Proteine bilden eine schwach sichtbare Interphase. Der RNA-haltige Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, mit 0.5 ml Isopropanol pro 0.75 ml gemischt und mind. 15 min auf Eis gehalten. Die RNA wird daraufhin durch Zentrifugation (15 min, 12000 rpm) pelletiert, abschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation wie zuvor), in 50-100 µl autoklaviertem DEPC-H<sub>2</sub>O (0.1% Diethylpyrocarbonat) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingelagert.

### 3.23. cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde die Reverse Transkriptase SuperScript<sup>TM</sup> II der Fa. GIBCO-BRL verwendet. ein Standardreaktionsansatz von 20 µl Volumen wird wie folgt angesetzt:

1 µl	Oligo-(dT) <sub>12-18</sub> [500µg/ml]
1-5 µg	Gesamt-RNA
ad 12 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
der Ansatz wird 10 min auf 70°C erhitzt und danach auf Eis gestellt; Zugabe von:	
4µl	5×Reaktionspuffer [250mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl, 15mM MgCl <sub>2</sub> ]
2µl	0.1M DTT
1µl	10 mM dNTP-Mix [je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP]
mischen und 2min bei 42°C halten	
1µl	SuperScript <sup>TM</sup> II [200U]
mischen und für mindestens 50min bei 42°C inkubieren	

Nach Abschluss der cDNA-Synthese wird die Reverse Transkriptase inaktiviert (15 min, 70°C) und 1 µl RNase H [2 U] zugesetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 20 min ist der RNA-'Template'-Strang verdaut und die cDNA zur Verwendung in RT-PCR-Analysen geeignet.

### 3.24. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Reaktionen wurden dem unten gezeigtem Schema nach durchgeführt. Die verwendete *Taq*-DNA-Polymerase sowie ein 10x-Reaktionspuffer [200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl] wurden von GIBCO-BRL bezogen. Die Endkonzentration an MgCl<sub>2</sub> wurde zumeist auf 1.5 mM

eingestellt. Eine Zugabe von Formamid (Endkonzentration von 4%) war häufig geeignet, die Spezifität der PCR zu erhöhen. Die 'Annealing'-Temperatur (nn, siehe Schema) wurde generell entsprechend der zu ermittelnden Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotidprimer gewählt. Die Dauer der 'Elongation' orientiert sich an der Größe des zu amplifizierenden PCR-Produkts und betrug bis zu 2 min. Es wurden PCR-Maschinen der Firmen BIOMETRA und PERKIN-ELMER verwendet.

PCR-Ansatz:	2.5 µl	10×PCR-Puffer (GIBCO-BRL)	
	0.75 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>	
	2.0 µl	dNTP-Mix (je 1.25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	
	(1.0 µl)	(Formamid)	
	1.0 µl	10 pmol/µl Primer 1	
	1.0 µl	10 pmol/µl Primer 2	
	0.2 µl	<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl]	
	~100 ng	DNA	
	ad 25 µl	ddH <sub>2</sub> O	
	10-20 µl	Paraffinöl zum Überschichten	
PCR-Profil:	5 min	94°C	
	30 sec	94°C	} 33x
	30 sec	nn°C	
	30-120 sec	72°C	
	5 min	72°C	
	∞	4°C	

### 3.25. Genspezifische PCR-Analysen

#### 3.25.1. PCR-Amplifikation intronischer Sequenzen von *TU51*

Die Sequenzen der ersten sieben Introns von *TU51* wurden ermittelt als noch keine genomische Sequenz des Gens in der GenBank-Datenbank verfügbar war. Hierzu wurden genomische PCR-Analysen mit exonisch gelegenen Oligonukleotidprimern durchgeführt (vgl. Abb. 26). Die gewählten Primerkombinationen sind in Tabelle 2 angegeben.

**Tab. 2) PCR-Amplifikation intronischer Sequenzen von *TU51***

Intron	'forward'-Primer 'revers'-Primer	5'→3'-Primer-Sequenzen	Introngröße (bp)
1	TU51-F7 TU51-R9	TGCTTCCTTGGGTTCTACAT GCTGGCATACTGGTCACAAT	515
2	TU51-F8 TU51-R3	ATTGTGACCAGTATGCCAGC ATGAGTGTGCGCCGGTAG	1197
3	TU51-F3 TU51-R4	GCTACGCAGGGCTCTCGG TTCAAACCTTCTTGCGCTCCT	91
4	TU51-F4 TU51-R5b	CGACAACAGCGCCCTTAA TGAAAGAGCATTCCACATTTC	347

[Fortsetzung Tab. 2]

5	TU51-F5 TU51-R6b	TGGATTAGCGTACCCCTCG AGGCAAGCCAGGAAGTAGCT	158
6	TU51-F TU51-R7	ACAGCTACTTCTGGCTTGC CTCTCCGAAGGGTTGATG	87
7	TU51-F6 TU51-R8	CGGAGAGGACGATGATGACT TCATACATCTCGTCCACTGCC	205

### 3.25.2. PCR-Amplifikation zur Analyse von Hamster/Mensch-Hybridzelllinien

Zur Identifizierung der chromosomalen Loci von *TU51*, *TU52* und *TU53* wurde das Hamster/Mensch-'Radiation Hybrid Panel' der BIOS CORPORATION benutzt. Es handelt sich um 25 DNA-Extrakte von 'Hybrid-Zelllinien, bei denen mit Hilfe einer radioaktiven Bestrahlung unterschiedliche humane Chromosomen in das Genom des Hamsters integriert wurden. Tabelle 3 gibt hierzu einen Überblick. Die Analyse der Zelllinien erfolgt mittels PCR (siehe Abb. 36). Es wurden folgende genspezifische Oligonukleotidprimer-Kombinationen verwendet: TU51-F2/TU51-R (5'-TGG GGC AGG GCT TAT GGC TC-3'/5'-TTT GGA ATC ACC ACT GAC CGG-3'), TU52-F/TU52-R (5'-AAG GCT ATC CAC TCA ATG TTT C-3'/5'-GCA GAG TAT TCA AAC GAG GCT-3') und TU53-F3/TU53-R3 (5'-TGA CCC AGG AGC AGA GGT AC-3'/5'-GGG TAA TTC TGA CCC TCG GA-3').

**Tab. 3) Hamster/Mensch-Hybrid-Zelllinien**

Nr.	Zelllinie	Menschliche(s) Chromosom(en)
1	SM-324	18
2	SM-423	3
3	SM-734	5, 9, 18
4	SM-750	5 (p15.1, p15.2 deletiert), 13, 14, 15, 19 (SM-750 ist nicht amplifizierbar)
5	SM-803	4, 5, 8, 11 (in 10%), 22, X
6	SM-860	3, 5, 6, 10, 19, 21
7	SM-867	1, 5, 13, 14, 18, 19
8	SM-940	5, 20
9	SM-212	5 (mehrere Deletionen), Y
10	SM-507	3, 5, 12, 14, 20, 22, Y
11	SM-683	5, 11, 12, 14, 19, 21, 22
12	SM-756	5 (p15.1, p15.3 deletiert), 6, 7, 12, 13, 14, 19, 20, 21, Y
13	SM-811	8, 17, 18
14	SM-861	3, 5, 10 (in 75%), 19
15	SM-862	5, 9
16	SM-909	5 (p15.2 deletiert), 6, 9, 14, X
17	SM-937	1, 5, 14, 15, 17, 21
18	SM-854	2, 5
19	SM-904	5 (p15.2 deletiert), 6, 12, 16 (in 20%), 21, Y
20	SM-967	5, 8, 16
21	SM-968	5, 9, 13, X
22	SM-1006	4, 5, 7, 8, 13, 15, 19, 21
23	SM-1049	5, 11
24	SM-1079	3, 5, 10, 15 (in 5%), 16
25	SM-1099	1, 5 (p15.2 deletiert), 13, 19, 21, 22
26	CHO-104	Hamster-DNA (Kontrollansatz)

### 3.26. Genspezifische Reverse Transkriptase-PCR-Analysen (RT-PCR)

Es wurden RT-PCR-Analysen von *TU15B/VMD2*, *FADS1*, *FADS2*, *FADS3*, *RAB3ILI*, *TU51*, *TU52*, *TU53* und des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens (dient als Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese) durchgeführt. Die verwendeten Gewebe zur cDNA-Synthese, die in der RT-PCR eingesetzten Kombinationen von Oligonukleotidprimern sowie die resultierenden PCR-Fragmentlängen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Zur Amplifizierung von cDNA-Fragmenten der Gene *TU51*, *TU52* und *TU53* wurden jeweils geschachtelte ('nested') RT-PCR-Analysen vorgenommen (vgl. Abb. 27, 31 und 35).

Die cDNA-Sequenz von *C11orf9* wurde von Dr. HEIDI STÖHR verifiziert. Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in der Veröffentlichung zur Klonierung des Gens angegeben (STÖHR *et al.*, 2000). Ebenfalls hauptsächlich von Dr. HEIDI STÖHR bearbeitet wurde *C11orf10*. Die hier eingesetzten Oligonukleotidprimer sind h72F (5'-TTA TTA TGA GCA GCA GGT GG-3') und h72R (5'-GCG GAG CGG CGG ATT AGC-3') und ermöglichen die Amplifizierung eines 372 bp großen cDNA-Fragmentes, welches alle 4 Exons erfasst.

**Tab. 4a) RT-PCR-Analyse von *TU15B/VMD2***

Exon	'forward'-Primer 'revers'-Primer	5'→3'-Primer-Sequenzen	Fragment- größe (bp)	Zur cDNA-Synthese verwendetes Gewebe
2-9	TU15new-F4 TU15new-R2	CATGACCATCACTTACACAAGC ATCTCATCCACAGCCAACAG	975	retinales Pigmentepithel
8-11	TU15new-F3 TU15-ex11.2R	GAGACCAACTGGATTGTGCGA CTGTATGGCTGTGACTGGAT	929	
<b>b) RT-PCR-Analyse von <i>FADS1</i></b>				
1-12	TU12-Ex1-F2 TU12-F5*	CGTCGCCAGGCCAGCTATG CTCAAGCTCCCCTCTGCCT	1421	Leber, Lunge, Uterus, Lymphozyten, Stammhirn, Basalganglien, ARPE-19-Zelllinie
4-9	TU12-F9 TU12-R7	GGAAACCCAGTCCATGTTCC CTCAAAGTGGAACCATCTGCT	506	
<b>c) RT-PCR-Analyse von <i>FADS2</i></b>				
1-12	FADS2-F TU13-1F	CGTCACAGTCGGCAGGCAGC CCTCAGAACAAAAGCCCATC	1435	Leber, Lunge, Uterus, Lymphozyten, Stammhirn, Basalganglien, ARPE-19-Zelllinie
8-12	TU13-1R TU13-1F	ACATCCCTTTCTACGGCATC CCTCAGAACAAAAGCCCATC	487	
<b>d) RT-PCR-Analyse von <i>FADS3</i></b>				
1-12	TU19-Ex1-F TU19-F	AGGACTCGTGCGTGCCAGCAT TGGTTGCTGGTGCCCTGAG	1403	Leber, Lunge, Uterus, Lymphozyten, Stammhirn, Basalganglien, ARPE-19-Zelllinie
11-12	TU19-F3 TU19-R	ACAGCTTCCCCCAATTCTC GGCCTCAGCTACGAAGTGAAG	362	
<b>e) RT-PCR-Analyse von <i>RAB3ILI</i></b>				
6-9	TU20-F TU20-R	AGGACAACACGCTCACCATT GCGTTACATTCCATCCAAAAG	1278	Leber
<b>f) RT-PCR-Analyse von <i>TU51</i></b>				
1-8	TU51-F7 TU51-R	TGCTTCCTTGGGTTCTACAT TTTGGAAATCACCAGTACCCGG	778	Leber, Herz, Niere, Prostata, Temp. Cortex, HeLa-Zelllinie, ARPE-19-Zelllinie, Fibroblasten- Zelllinie, Y79-Zelllinie, HS683- Zelllinie
2-8	TU51-F8 ('nested') TU51-R8 ('nested')	ATTGTGACCAGTATGCCAGC TCATACATCTCGTCCACTGCC		
6-8	TU51-F TU51-R	ACAGCTACTTCTGGCTTGCCT TTTGGAAATCACCAGTACCCGG		
7-8	TU51-F6 ('nested') TU51-R8 ('nested')	CGGAGAGGACGATGATGACT TCATACATCTCGTCCACTGCC	88	

[Fortsetzung Tab. 4]

**g) RT-PCR-Analyse von TU52**

Exon	'forward'-Primer 'revers'-Primer	5'→3'-Primer-Sequenzen	Fragment- größe (bp)	Zur cDNA-Synthese verwendetes Gewebe
1-5a	TU52-F6 TU52-R4	TGCAGCACCCGACCTGAAG ATTTTATTGCCCTTGAGCCA	352 (Spleiß- variante 1)	Leber, Herz, Niere, Prostata, Temp. Cortex, HeLa-Zelllinie, ARPE-19-Zelllinie, Fibroblasten- Zelllinie, Y79-Zelllinie, HS683- Zelllinie
1-5a	TU52-F7 ('nested' 1) TU52-R ('nested' 1)	TCGGAGACTACAAACCAAATAA GCAGAGTATTCAAACGAGGCT		
2-5a	TU52-F8 ('nested' 2) TU52-R ('nested' 2)	TCCAGTAAAGTAGCAAATGCAA GCAGAGTATTCAAACGAGGCT	558	
1-9	TU52-F6 TU52-Ex9R	TGCAGCACCCGACCTGAAG CACTATGTTCTCAGGCTGGA	688 (Spleiß- variante 2)	
1-9	TU52-F7 ('nested') TU52-Ex9R2 ('nest.')	TCGGAGACTACAAACCAAATAA CTCAGGCTGGAAATATTAGAG		
1-8	TU52-F6 TU52-R7	TGCAGCACCCGACCTGAAG TCCAAAAGGGTTGATAAGCT	865 (Spleiß- variante 3)	
1-7	TU52-F7 ('nested') TU54-R ('nested')	TCGGAGACTACAAACCAAATAA TGTAGGAGGGTGAAGATGGGA		
4-9	TU52-F2 TU52-Ex9R	GGCCAGACAGGCTAATGTTCC CACTATGTTCTCAGGCTGGA	330/343	
7-9	TU52-F5 ('nested') TU52-Ex9R2 ('nest.')	TACATCCCATCTTCACCCT CTCAGGCTGGAAATATTAGAG		

**h) RT-PCR-Analyse von TU53**

3-8	TU53-Fseq3 TU53-Rseq8 TU53-Fseq4 (nest.)	CAGCTGATGTGCGTCACTCTC GCTGGTCCTCATCCCAGTAC TCGCTCTGTCTACTTTTGGGA	411	Leber, Herz, Niere, Prostata, Temp. Cortex, HeLa-Zelllinie, ARPE-19-Zelllinie, Fibroblasten- Zelllinie, Y79-Zelllinie, HS683- Zelllinie
4-8	TU53-Rseq9 ('nest.')	GGTACATTTGCTCCACGGAT		

**i) RT-PCR-Analyse des  $\beta$ -Glucuronidasegens**

6-7	GUS-B6F GUS-B7R	GATCCACCTCTGATGTTTAC CCTTTAGTGTTCCCTGCCTAG	454	Leber, Herz, Niere, Prostata, Temp. Cortex, HeLa-Zelllinie, ARPE-19-Zelllinie, Fibroblasten- Zelllinie, Y79-Zelllinie, HS683- Zelllinie
-----	--------------------	---	-----	---

\* Erläuterung: Die Bezeichnung TU12-# der Oligonukleotidprimer ist auf die ehemaligen laborinterne Benennung von *FADS1*, nämlich *TU12*, zurückzuführen. Ähnliches gilt auch für weitere Gene (*FADS2*=*TU13*; *FADS3*=*TU19*, *RAB31L1*=*TU20*). Obwohl die Bezeichnung „F“ in aller Regel den 'Forward'-Primer kennzeichnet, ist TU12-F5 dennoch der reverskomplementäre Oligonukleotidprimer in der genannten RT-PCR. Die Benennung des Primers erfolgte noch bevor kodierende EST-Sequenzen von *FADS1* in den EST-'Contig' (Abb. 14) eingebunden werden konnten und so die korrekte Orientierung der *FADS1*-cDNA-Sequenz erkennbar wurde. Es handelt sich hier also nicht um einen Schreibfehler in der Primerbezeichnung. Gleiches gilt z.B. auch für den *FADS2*-spezifischen Primer TU13-F1 und den *FADS3*-spezifischen Primer TU19-F.

**3.27. 5'-'rapid amplification of cDNA ends' (5'-RACE)**

Entsprechende Analysen wurden in Anlehnung an die Instruktion zum 5'-RACE Kit (Rev. 2) der Fa. GIBCO-BRL für mehrere Gene durchgeführt (*FADS1*, *FADS2*, *TU51*, *TU52*), waren letzten Endes jedoch lediglich im Falle von *FADS2* bedingt erfolgreich (siehe Abb. 14b), so dass hier neben der prinzipiellen Methodik unter Verwendung der Oligonukleotidprimer AAP ('abridged anchor primer'; 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') und AUAP (abridged universal anchor primer'; 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3') ausschließlich die eingesetzten *FADS2*-spezifischen Oligonukleotidprimer TUK8-F8 (5'-AAA TAC ATG GGG ATG AGC AG-3'), TU13-F5 (5'-AGT ATT CGT GCT GGT GAT TG-3') und TU13-F4 (5'-TGT AGG GCA GGT ATT TCA GC-3') angeführt werden sollen. Zur Amplifizierung der 5'-Sequenz der *FADS2*-cDNA wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

cDNA-Erststrangsynthese:	2.5 pmol	GSP1 ('gene specific primer 1'; hier TUK8-F8)
	1 µg	Gesamt-RNA (hier aus humanem Lebergewebe)
	ad 15 µl	DEPC-H <sub>2</sub> O
	10 min	70 °C, dann auf Eis zugeben:
	2.5 µl	10×PCR-Puffer (GIBCO-BRL)
	2.5 µl	25mM MgCl <sub>2</sub>
	1 µl	dNTP-Mix (je 10mM)
	2.5 µl	0.1M DTT
	1 min	42 °C
	1 µl	SuperScript™ II [200 U]
	50 min	42 °C, 15min 70 °C, dann zugeben:
	1 µl	RNase H [2 U]
	30 min	37 °C, dann auf Eis

Nach Aufreinigung der synthetisierten Erststrang-cDNA mittels des NucleoSpin® Extrakt Kits der Fa. MACHEREY-NAGEL erfolgt das oligo-d(C)-'tailing' der cDNA:

'Tailing'-Reaktion:	6.5 µl	ddH <sub>2</sub> O
	5.0 µl	5×TdT-Puffer (GIBCO-BRL)
	2.5 µl	2 mM dCTP
	10 µl	Erststrang-cDNA-Lösung
	3 min	94 °C, 1 min auf Eis, dann zugeben:
	1 µl	Terminale Transferase [2 U/µl]
	10 min	37 °C, 10min 65 °C, dann auf Eis

Nun wird die mit einem oligo-d(C)-Rest variabler Länge versehene cDNA in die erste zweier geschachtelter PCR-Reaktionen eingebracht:

1. PCR:	31.5 µl	ddH <sub>2</sub> O
	5.0 µl	10×PCR-Puffer (GIBCO-BRL)
	3.0 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
	1.0 µl	10 mM dNTP-Mix
	1.0 µl	10 pmol/µl GSP2 (hier TU13-F5)
	2.0 µl	10 pmol/µl AAP
	5.0 µl	d(C)-'tailed'-cDNA
	0.5 µl	Taq-Polymerase [5 U/µl]
	10-20 µl	Paraffinöl zum Überschichten

PCR-Profil:	5 min	94 °C	} 33x
	30 sec	94 °C	
	30 sec	55 °C	
	90 sec	72 °C	
	5 min	72 °C	
	∞	4 °C	

Das PCR-Produkt wird in einer 1:100-Verdünnung in die zweite, 'nested' PCR-Reaktion eingebracht:

2. PCR:	Reaktionsansatz wie oben gezeigt aber nicht mit GSP2 und AAP, sondern mit	
	1.0 µl	10 pmol/µl GSP3 (hier TU13-F4)
	1.0 µl	10 pmol/µl AUAP
PCR-Profil:	s.o.	

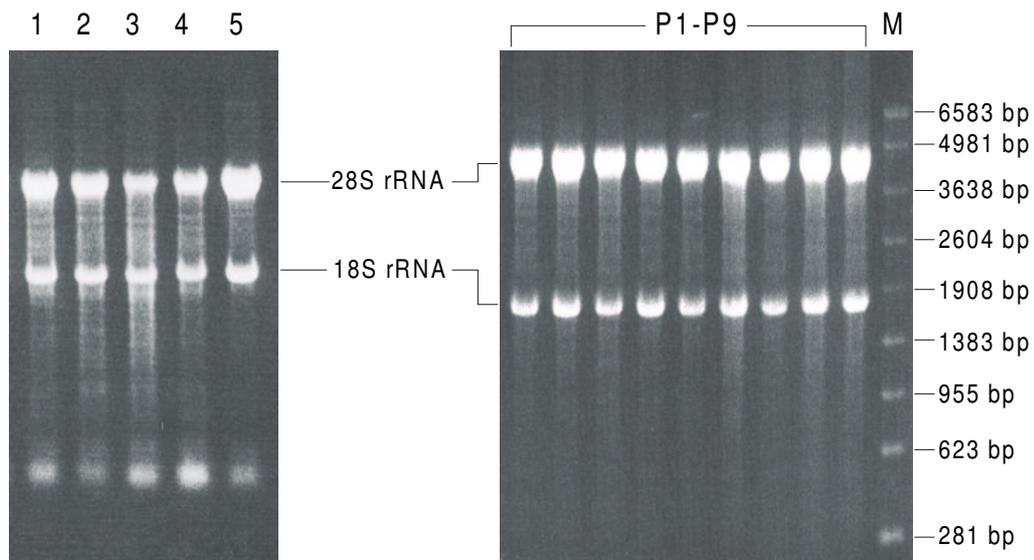
Nach Ende der Amplifikation werden 10-15 µl des PCR-Ansatzes mit Hilfe einer Gelelektrophorese analysiert. Sichtbare Fragmente werden zur Sequenzierung aus dem Gel eluiert.

### 3.28. Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Sowohl die RNA-Gelelektrophorese als auch die noch zu beschreibende 'Northern blot'-Technik basieren auf der von KROCZEK und SIEBERT (1989) optimierten Vorgehensweise. Zur Gelelektrophorese wird zunächst ein denaturierendes, 1.2%iges Agarosegel gegossen. Hierzu werden 1.2 g Agarose bei Verwendung eines Mikrowellengerätes in ca. 80 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst, 10 ml 10×MOPS [Stocklösung: 41,86 g MOPS, 16,6 ml 3 M NaOAc, 20 ml 0.5M EDTA, mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 1L auffüllen (pH 7.0)] hinzugegeben, das Volumen des Gels mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 97 ml gebracht und, nach Abkühlung des Geles auf etwa 55°C, 3 ml Formaldehyd (37%ig) zugesetzt. Nach kurzem Schwenken wird das Gel unter einem Abzug (Formaldehyd!) in die vorbereitete Gelkammer gegossen.

Nach der Aushärtung des Gels wird die aufzutragende RNA (bis 12 µg) in einem Verhältnis von max. 1:1 (besser 1:10, z.B. 2 µl + 18 µl) in RNA-Probenpuffer aufgenommen [Zusammensetzung für 500 µl: 250 µl deionisiertes Formamid (Stock: pro 100 ml Formamid werden 5 g eines Ionenaustauschers zugesetzt (BIO-RAD, #143-7424), 30 min verrührt und abfiltriert. Das deionisierte Formamid wird in Dunkelheit bei -20°C gelagert), 88 µl Formaldehyd (37%ig), 50 µl 10×MOPS (s.o.), 50 µl Dye (50% Glycerin, 1mM EDTA, 0.4% Bromphenoblauf), 0.85 µl Ethidiumbromid (Stock: 10 mg/ml), 61,15 µl DEPC-H<sub>2</sub>O], 5min bei 65°C erhitzt, sofort auf Eis gestellt und 'submerge' in die Geltaschen gefüllt. Als Laufpuffer wird 1×MOPS verwendet. Die RNA-Gelelektrophorese läuft bei 50 bis max. 75 V etwa 3h. Es wurde meist ein 0.28-6.58 kbp-RNA-Längenstandard (unterteilt in neun Banden) der Fa. PROMEGA (#G3191) eingesetzt.

Die Qualität einer Gesamt-RNA-Extraktion lässt sich leicht anhand der aufgetrennten Banden der ribosomalen 28S- und 18S-RNA (4.8 bzw. 1.9 kbp) erkennen. Sind beide Banden deutlich und unverschmiert sichtbar, ist dies ein Indiz für eine intakte, noch nicht durch endogene oder exogene RNAsen degradierte RNA. Dass sich die hochwertigsten RNA-Extrakte in aller Regel aus Zelllinien gewinnen lassen, wird in Abbildung 4 deutlich, die hierzu ein Beispiel geben sollen.



**Abb. 4** Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Extrakten aus menschlicher Lunge (1), Cerebellum (2), Retina (3), retinalem Pigmentepithel (4) und der Zelllinie ARPE-19 sowie neun RNA-Extrakten aus EBV-transformierten Zelllinien von Morbus Best-Patienten (P1-P9). Die Degradation der RNA aus den Gewebeproben (1-4) ist zwar gering, aber dennoch erkennbar größer als die der RNA-Extrakte aus den Zelllinien. Aufgetragen wurden je ~12 µg Gesamt-RNA.

### 3.29. 'Northern blotting'

Zur Transkriptionsanalyse der untersuchten Gene wurden selbsthergestellte 'Northern blots' mit jeweils etwa 12 µg Gesamt-RNA pro Spur verwendet. Der Transfer der RNA erfolgte dabei in Anlehnung an KROCZEK und SIEBERT (1989) mittels eines Vacuum-Blotters (hier verwendet: VacuGene™, Fa. PHARMACIA). Der Vorteil bei dieser Technik liegt im vergleichsweise schnellen und nahezu kompletten Transfer der Nukleinsäure.

Nach Abschluss der RNA-Gelelektrophorese (3.28.) wird das Gel zunächst 10 min in 20×SSC [3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat; pH 7.0] äquilibriert. Gleichzeitig wird die zum 'Blotting' vorgesehene Nylonmembran (hier Hybond®-N<sup>+</sup>, Fa. AMERSHAM-USB) mit 2×SSC angefeuchtet und entsprechend der Betriebsanleitung auf dem Vacuum-Blotter gelegt. Das RNA-Gel wird vorsichtig auf die Membran gelegt und eine Saugspannung von max. 70 mbar erzeugt. Das Gel darf nicht austrocknen und wird daher in regelmäßigen Abständen mit 20×SSC überschichtet. Nach etwa 4h ist der Nukleinsäuretransfer beendet. Zur Kontrolle der Effizienz kann das Gel unter UV-Licht auf RNA-Rückstände hin geprüft werden. Vor Abheben des Gels sollten aber auf der darunterliegenden Membran mit einem Bleistift die Positionen der Ladetaschen markiert werden. Bei Verwendung einer UV-Handlampe (idealerweise in einer Dunkelkammer) werden zudem die Banden des RNA-Längenstandards und der ribosomalen RNA gekennzeichnet. Abschließend wird die RNA unter UV mit der Membran vernetzt ('cross linking'; 322nm, 2min) und bis zur Hybridisierung bei -20°C eingefroren. Hybridisiert wurden die 'Northern blots' gemäß der Beschreibung in Abschnitt 3.16. Zur 'Northern blot'-Analyse von *TU15B/VMD2* wurde das 929 bp große RT-PCR-Produkt TU15new-

F3/TU15-ex11.2R (Tab. 4a) als Nukleinsäuresonde eingesetzt, während zur Hybridisierung von *FADS3* mit den Oligonukleotidprimern TU19-F3 und TU19-R ein 362 bp langes Fragment aus dem 3'-UTR des Gens amplifiziert und markiert wurde (Tab. 4d).

### 3.30. Sequenzierung

Sequenziert wurde vorwiegend mit dem 'Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing Kit' der Fa. AMERSHAM-USB. Bei dem Prozess werden  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-Didesoxynukleotide in die zu analysierende Nukleinsäure eingebaut.

Zunächst werden pro Sequenzanalyse vier separate Terminationsansätze hergestellt. Hierzu werden 2  $\mu$ l eines Nukleotidgemisches, entweder dGTP [je 7.5  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP] oder dITP [je 7.5  $\mu$ M dATP, dCTP, dTTP und 37.5  $\mu$ M dITP] mit je 0.5  $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>33</sup>P-ddNTP (G,A,T oder C) vermischt. Die Verwendung von dITP hilft dabei Bandenkompressionen bei der späteren Auftrennung im PAA-Gel zu vermeiden, resultiert aber in einer etwas ungleichmäßigen Intensität der Banden.

Ein 20  $\mu$ l-Reaktionsansatz wird folgendermaßen bereitet:

2 $\mu$ l	10 $\times$ Reaktionspuffer [260mM Tris-HCl, pH 9.5; 65mM MgCl <sub>2</sub> ]
1-5 $\mu$ l	DNA-Probe (50-500ng in ddH <sub>2</sub> O)
0.5-2.5 pmol	Oligonukleotidprimer
ad 18 $\mu$ l	ddH <sub>2</sub> O
2 $\mu$ l	Thermo Sequenase™ Polymerase [4U/ $\mu$ l]

Von diesem Ansatz werden jeweils 4.5 $\mu$ l mit den vorbereiteten Terminationsgemischen vereint und mit 10-20  $\mu$ l Paraffinöl überschichtet. die Sequenzierreaktion erfolgt zyklisch in einer PCR-Apparatur:

Bei Verwendung von dGTP:	95°C	30sec	} 30-45 $\times$
	55°C	30sec	
	72°C	60-120 sec	
Bei Verwendung von dITP:	95°C	30sec	} 30-45 $\times$
	50°C	30sec	
	72°C	5-10 min	

Während isolierte Plasmid-DNA sowie aus einem Agarosegel eluierte Nukleinsäurefragmente direkt in die Sequenzierreaktion eingebracht werden können, wird ein zu sequenzierendes PCR-Produkt zunächst mit einer alkalischen Phosphatase und Exonuklease I behandelt, um die im PCR-Puffer enthaltenen Nukleotide zu dephosphorylieren bzw. die noch vorhandenen Oligonukleotidprimer zu verdauen. Dazu werden 0.5-3  $\mu$ l der PCR-Lösung mit je 1 U beider Enzyme in 10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzung auf 80°C (15 min) beendet. Alternativ

hierzu kann die Aufreinigung des PCR-Ansatzes natürlich auch mittels eines Kits erfolgen (z.B. QIAquick® PCR Purification Kit, Fa. QIAGEN). Es werden anschließend 50-500 ng DNA in die beschriebene Sequenzierreaktion eingebracht.

Nach Abschluss der Reaktion werden den Sequenzierungsansätzen je 4 µl einer Stopplösung (AMERSHAM-USB) zugegeben, die zugleich als Ladepuffer für die Auftrennung der Ansätze auf einem 6%igen PAA-Gel (hergestellt aus den mischfertigen Komponenten Sequagel-6 der Fa. BIOZYM) dient. Vor der Beladung des Gels sind die Reaktionsansätze 5 min bei 94°C zu denaturieren. Der Gellauf erfolgt bei 55-75 W, 150-250 mA, 1700-2000 V. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel in einem Gelrockner getrocknet und 1-2 d auf einem Röntgenfilm exponiert (Autoradiographie). In Abhängigkeit von der Laufzeit der Gelelektrophorese können pro Reaktion bis zu 350 bp Sequenzinformation ermittelt werden.

In der letzten Phase der Doktorarbeit, der Analyse der *VMD2*-verwandten Gene *TU51*, *TU52* und *TU53*, wurde gelegentlich auf einen automatischen Sequenzierapparat zurückgegriffen (Prism 310, ABI). Die Probenvorbereitung sowie die Operation des Gerätes erfolgten dabei entsprechend der Bedienungsanleitung des Herstellers und wurden zumeist von den Mitarbeiterinnen NADINE HEMMICH, ANDREA GEHRIG und FRANZISKA KRÄMER durchgeführt.

### 3.31. Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA)

Die Untersuchung der relevanten Gene auf Punktmutationen in Morbus Best-Patienten erfolgte über Einzelstrangkonnformationsanalysen ('single strand conformational analysis', SSCA). Diese wurden vornehmlich von ANDREA RIVERA, FRANZISKA KRÄMER und LORI PASSMORE durchgeführt.

Eine Standard PCR-Reaktion zur SSCA ist wie folgt anzusetzen:

50-100 ng	DNA
2.5 µl	10xPCR-Puffer (GIBCO-BRL)
0.75 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
2.0 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
1.0 µl	Formamid
1.0 µl	Oligonukleotidprimer 1 (10pmol/µl)
1.0 µl	Oligonukleotidprimer 2 (10pmol/µl)
0.1 µl	α- <sup>32</sup> P-dCTP [1 µCi]
0.2 µl	<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/µl]
ad 25 µl	ddH <sub>2</sub> O

PCR-Profil:	5 min	94°C	} 33x
	30 sec	94°C	
	30 sec	nn°C	
	30 sec	72°C	
	5 min	72°C	
	∞	4°C	

Die 'Annealing'-Temperatur (nn) ist in Abhängigkeit von der Sequenz der verwendeten Oligonukleotidprimer zu wählen

Ist das resultierende PCR-Produkt länger als 300 bp, so wird es vor der gelelektrophoretischen Analyse mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease verdaut:

5.0 µl	PCR-Ansatz
2.5 µl	10×Reaktionspuffer (in Abhängigkeit vom verwendeten Enzym zu wählen)
0.5 µl	Restriktionsenzym
17.5 µl	ddH <sub>2</sub> O
90 min Inkubation (die Temperatur ist in Abhängigkeit vom verwendeten Enzym zu wählen)	

Jeweils 5 µl vom verdauten oder 2 µl vom unverdauten PCR-Produkt (+ 3 µl ddH<sub>2</sub>O) werden nach Zugabe von 5 µl eines PAA-Ladepuffers [95% Formamid, 5 mM NaOH, 0.1% Bromphenolblau, 0.1% Xylencyanol] auf einem 6%igen PAA-Gel [49 ml ddH<sub>2</sub>O, 10.5 ml Acrylamid-Lösung (rotiphoreseGel<sup>®</sup> 40, ROTH), 4.0 ml 85%iges Glycerin, 7.0 ml 5×TBE [44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM Borsäure, 1mM EDTA (pH 8.3)], 70 µl TEMED, 180 µl APS] aufgetragen. Gegebenenfalls können bessere Ergebnisse erzielt werden, wenn der Gelmatrix kein Glycerin zugesetzt wird. Vor der Gelelektrophorese werden die Reaktionsansätze 5 min bei 94°C denaturiert. Die Gelelektrophorese (25 W, 250 mA<sub>max</sub>, 2000 V<sub>max</sub>) erfolgt anschließend für 130-500 min (in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäureragmente) bei 4°C. Als Laufpuffer wird 0.5×TBE benutzt. Das Gel wird anschließend in einem Geltdrockner getrocknet und zur Autoradiographie 1-2 d auf einem Röntgenfilm exponiert.

In den Tabellen 5a bis 5f sind die spezifischen SSCA-Oligonukleotidprimer-Kombinationen für die untersuchten Gene, die aus den PCR-Analysen resultierenden Fragmentlängen sowie die ggf. benötigten Restriktionsendonukleasen zusammengestellt. Im Falle von *C11orf9* wurden die verwendeten Primer bereits von STÖHR *et al.* (2000) veröffentlicht und sollen daher nicht erneut angeführt werden.

Während *VMD2* exonweise, auf Ebene der genomischen DNA von *VMD2*-Patienten analysiert wurde, wurde für die SSC-Analyse der Gene *FADS2*, *FADS2*, *FADS3*, *RAB3IL1* und *C11orf10* auf cDNA zurückgegriffen, die zuvor auf Basis von RNA-Extrakten aus immortalisierten Lymphozyten-Zelllinien (3.20.) der Patienten synthetisiert wurde.

**Tab. 5a) Mutationsanalyse genomischer DNA von *TU15B/VMD2***

Exon	'forward'-Primer 'revers'-Primer	5'→3'-Primer-Sequenzen	Fragmentgröße (bp)	Restriktionsenzym
1	TU15-Ex1-F	AGCCCAACACCCTCCAAGAA	297	-
	TU15-Ex1-R	AGTCCACCTGGGGCACCTT		
2	TU15-Ex2-F	CCCTACAAACCCCAATCG	272	-
	TU15-Ex2-R	CCAGCCACATCCTTCCCAG		
3	TU15-Ex3-F	AGTCTCAGCCATCTCCTCGC	211	-
	TU15-Ex3-R	TGGCCTGTCTGGAGCCTG		
4	TU15-Ex3-F2	GCCATCCCTTCTGCAGGTT	201+222	<i>TaqI</i>
	TU15-Ex4-R	GCGGCAGCCCTGTCTGTAC		
5	TU15-Ex5-F	GCCATCCCTTCTGCAGGTT	239	-
	TU15-Ex5-R	GCGGCAGCCCTGTCTGTAC		
6	TU15-Ex6-F	GGGGCAGGTGGTGTTCAGA	150	-
	TU15-Ex6-R	GGCAGCCTCACCAGCCTAG		
7	TU15-Ex7-F	TGATTTACAGGGTCCCACCTAG	295	-
	TU15-Ex7-R	CATCCTCGTCTCAGGCAGCT		
8	TU15-Ex8-F	AGGGTTTACAGAGCCTCACCTG	158	-
	TU15-Ex8-R	CACTTTGGGAAGGTCCATG		
9	TU15-Ex9-F	CCTCCAAGTCATCAGGCACATA	289	-
	TU15-Ex9-R	CTAGGCAGACCCTGCCTAG		
10a	TU15-Ex10I-F	ACTGGCTCAGCCCTGCATC	215+125	<i>PstI</i>
	TU15-Ex10I-R	GTGGGGCACTGTAGTGCCTG		
10b	TU15-Ex10II-F	CCTTCAAGTCTGCCCCACTG	271+108+38	<i>HindIII</i>
	TU15-Ex10II-R	TGCAGTGCCCTGGTTC		
11	TU15-Ex11-F	GGTACCTTCCATACTTATGCTG	149	-
	TU15-Ex11.2-R	GTCTATGGCTGTGACTGGAT		

**b) cDNA-Mutationsanalyse von *FADS1***

1-4	TU12-R4	ACATCAGCGAGTTCACCCCG	273+209	<i>RsaI</i>
	TU12-F10	CAGGTGGCCAAATCACAAAAT		
4-9	TU12-R7	CTCAAAGTGAACCATCTGCTA	209+295	<i>RsaI</i>
	TU12-F9	GGAAACCCAGTCCATGTTCC		
8-12	TU12-R6	CCTGGGCCTTTTCTTCATAGT	284+165	<i>RsaI</i>
	TU12-F5	CTCAAGCTCCCCTCTGCCT		

**c) cDNA-Mutationsanalyse von *FADS2***

1-3	TU13-4R	TCAGAAGCATAACCTGCGC	247+109	<i>MboI</i>
	TU13-6F	CTCTCCAGGGCGATGATGT		
2-6	TU13-3R	CCCCTGCTGATTGGTGAAC	232+301	<i>AccI</i>
	TU13-5F	AGTATTCGTGCTGGTGATTG		
6-8	TU13-2R	AGCCCATCGAGTACGGCAA	242	-
	TU13-2F	TGAAGTTGAGGAAAAGGAGG		
8-12	TU13-1R	ACATCCCTTTCTACGGCATC	269+218	<i>Sau3AI</i>
	TU13-1F	CCTCAGAACAAAAGCCCATC		

**d) cDNA-Mutationsanalyse von *FADS3***

1-9	TU19-R2	TCTTGCTCGGACCTCGGC	125+160+171+283+240	<i>AluI</i>
	TU19-F2	GTGATCCACACGACCCAGTG		
2-12	TU19-R3	GAAGAACCCAGCCAGGATG	111+287+240+93+148+	<i>AluI+AccI</i>
	TU19-F4	CCCTTCTCTGCCCGCCTG		

**e) Mutationsanalyse genomischer DNA von *RAB31L1***

2-3	TU20-F3	GTGCTCAAGTGCCTGCCTCT	211+128	<i>RsaI</i>
	TU20-Ex3-R	GGTGCCTGGGCTGGCCTG		
4	TU20-Ex4F	TGGGTGAGGGTTGACAGCC	194+136	<i>DdeI</i>
	TU20-Ex4R	GCTCGGACCCTGCCTACCG		
5-6	TU20-Ex5-F	CCTCAGCTCAGCCTGCATCT	117+287	<i>HinfI</i>
	TU20-R2	CCTCGGCCACCTTCACTGT		
6	TU20-F	AGGACAACACGCTCACCATT	119	-
	TU20-Ex6-R	CATGGGCAGGAAGGAGCTAAG		
7	TU20-Ex7-F	GCATCTTCCCTGTATGCAGG	216	-
	TU20-Ex7-R	CCAAAGGAGTCAAGTAACGCT		
8	TU20-Ex8-F	TCCTGCTCTGGACTCAGATCC	196	-
	TU20-Ex8-R	CCACTCCCGTGTGCGATC		
9	TU20-Ex9-F	CGAGGTGACCCTGAGCTGTC	163	-
	TU20-Ex9-R	AGAGCTCCCCTTCAAGCCT		

**f) cDNA-Mutationsanalyse von *C11orf10***

1-4	h72-R	GCGGAGCGGCGGATTAGC	173+220	<i>RsaI</i>
	h72-F	TTATTATGAGCAGCAGGTGG		

## 4. ERGEBNISSE

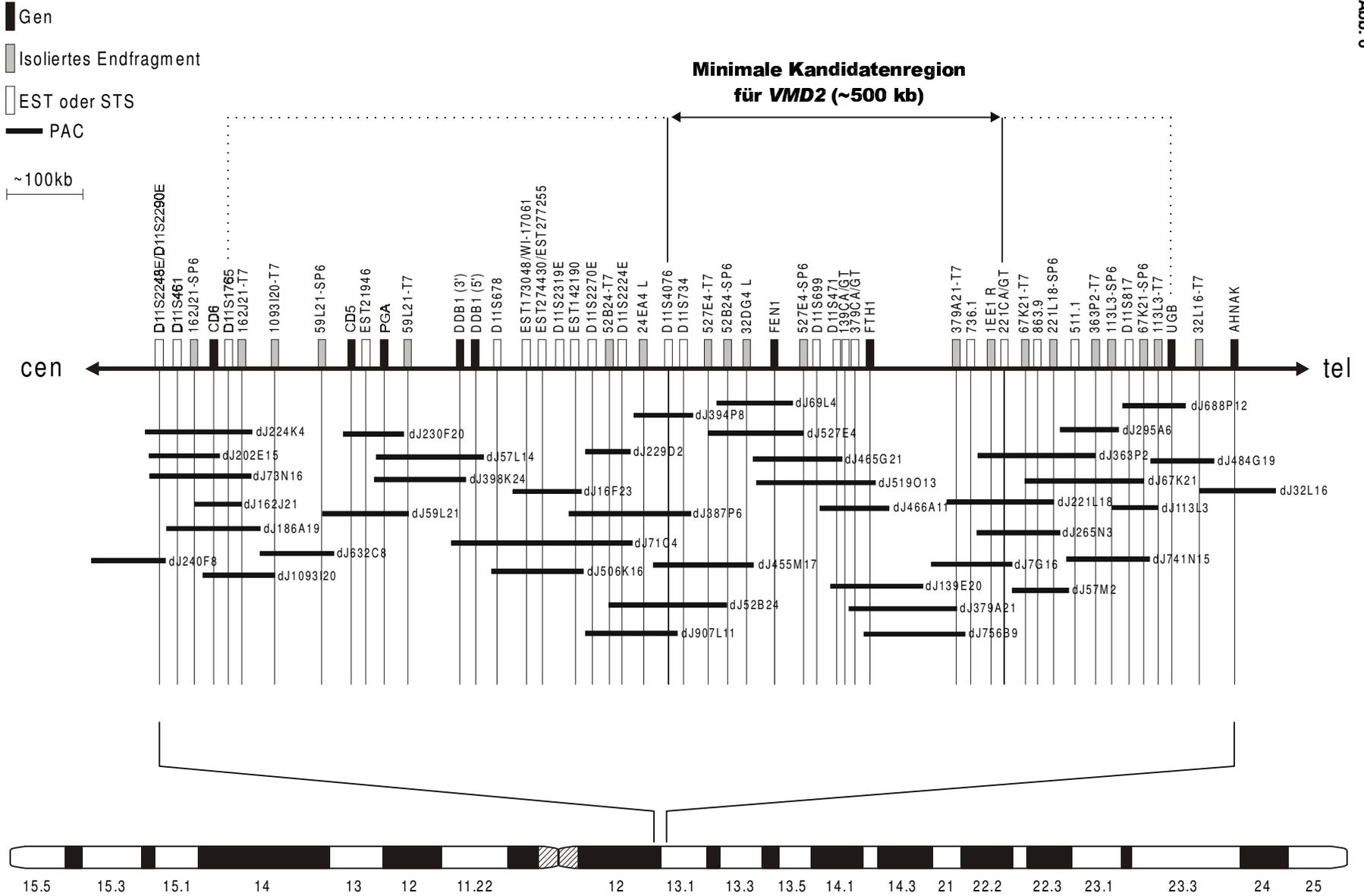
### 4.1. Klonierung und Charakterisierung von *VMD2*

#### 4.1.1. Erstellung eines PAC-'Contigs' für die *VMD2*-Kandidatenregion

1996 etablierten QIN *et al.* einen 'Contig' aus überlappenden YAC-Klonen ('Yeast artificial chromosomes'), der sich u.a. über den für die Identifizierung von *VMD2* kritischen chromosomalen Bereich 11q12-q13.1 erstreckt. Wie in Abbildung 5 zu sehen, deckt der YAC-'Contig' die damals aktuelle Kandidatenregion für *VMD2* zwischen D11S1765 und *UGB* allerdings nicht vollständig ab. Da sich zudem viele der YAC-Klone bei näherer Analyse als chimärisch oder partiell deletiert herausgestellt hatten, beschlossen wir, die relevante chromosomale Region in überlappenden PAC-Klonen zu isolieren, um so eine solide Basis für die Identifizierung und Klonierung von *VMD2* zu schaffen. PAC-Klone stellen genetisch wesentlich stabilere Klone dar und besitzen ein Aufnahmevermögen an externer DNA von immerhin 100-250 kbp.

Der PAC-'Contig' wurde in Kooperation mit dem 'Department of Human Genetics, Roswell Park Cancer Institute, RPCI' (Buffalo, USA) erstellt, von wo uns die PAC-Bank RPCI-1, mit einem Umfang von 115.200 individuellen Klonen, zur Verfügung gestellt wurde. Die Isolierung der ersten PAC-Klone und auch der gezeigten Cosmide am *ROM1*-Locus (Abb. 5) ist ausführlich in der Dissertationsschrift von Dr. HEIDI STÖHR (1998<sup>c</sup>) beschrieben. Mit diesen PAC-Klonen als Basis begann meine eigene Arbeit damit, weitere überlappende Klone zu identifizieren, um den PAC-'Contig' über die komplette *VMD2*-Kandidatenregion hinaus auszudehnen. Hierzu wurden von den bereits bekannten Klonen Endfragmente der 'Inserts' isoliert, um mit diesen als Nukleinsäuresonde ein 'Screening' der RPCI-1-Bank durchzuführen. Die Technik zur Isolierung der Endfragmente beruht auf einer speziellen 'degenerate oligonucleotide primed'-PCR (DOP-PCR), wie sie von WU *et al.* (1996) beschrieben wurde. Sukzessive wurden so weitere PAC-Klone isoliert und in den 'Contig' integriert. Die jeweils exakte Lage der gefunden Klone konnte dabei mit Hilfe der damals bereits in der chromosomalen Region lokalisierten Gene *CD6*, *CD5*, *PGA*, *FEN1*, *FTH1*, *DDB1*, *UGB* und *AHNAK* bzw. STS- und EST-Marker ermittelt werden. PAC-Klone mit Kennzahlen jenseits von 321 wurden am RPCI in den 'Contig' integriert, da unserer Arbeitsgruppe seinerzeit lediglich die aus den Mikrotiterplatten 1-321 bestehende PAC-Bank RPCI-1 zur Verfügung stand. Der 'Contig' wurde schließlich publiziert (COOPER *et al.*, 1997). Die in Abbildung 6 gezeigte minimale *VMD2*-Kandidatenregion, welche von den Markern D11S4076 und 221CA/GT flankiert wird, war zu Beginn der 'Contig'-Erstellung im Jahre 1996 noch deutlich größer, etwa 1.4 Mbp (D11S1765-*UGB*, vgl. Abb. 5), weshalb der PAC-'Contig' über die Kandidatenregion hinaus erweitert ist.



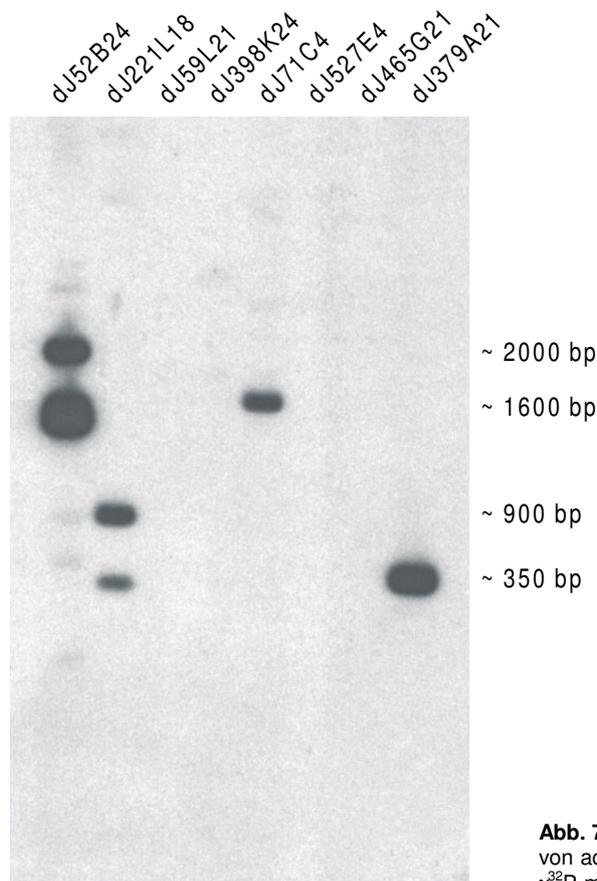


**Abb. 5** YAC-'Contig' für die *VMD2*-Kandidatenregion (Stand von 1996). Gezeigt sind außerdem die ersten kartierten PAC-Klone der Region sowie einige Cosmid-Klone am *ROM1*-Locus. Die Flanken der angegebenen Kandidatenregion (~ 1.4 Mbp) waren zu dieser Zeit durch Kopplungsanalysen auf den proximalen STS-Marker D11S1765 und das distal gelegene Uteroglobin-Gen (*UGB*) festgelegt. Die verwendete Symbolik ist der Legende zu entnehmen. Der 'Contig' stellt die Grundlage dieser Doktorarbeit dar, welche seinerzeit mit der Etablierung des PAC-'Contigs' für das kritische genomische Intervall zur Positionsklonierung von *VMD2* begann.

**Abb. 6** PAC-'Contig' für die *VMD2*-Kandidatenregion. Die verwendete Symbolik ist erneut der Legende zu entnehmen. Erkennbar ist, dass das kritische Intervall für die Klonierung von *VMD2* nach der Etablierung der polymorphen STS-Marker 221CA/GT und D11S4076 auf etwa 500 kbp verringert ist.

#### 4.1.2. Einengung der *VMD2*-Kandidatenregion

Die Einengung der *VMD2*-Kandidatenregion erfolgte durch die Untersuchung meiotischer Rekombinationsereignisse in betroffenen Familien. Hierzu wurden mehrere der in der relevanten Region auf 11q12-q13.1 lokalisierten PAC-Klone auf darin enthaltene (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotid-Sequenzen hin untersucht, um diese repetitiven und daher in der Regel polymorphen Sequenzen für eine Kopplungsanalyse zu verwenden. Die gewählten PAC-Klone waren dJ59L21, dJ398K24, dJ71C4, dJ52B24, dJ527E4, dJ465G21, dJ379A21 und dJ221L18 (vgl. Abb. 6). Die isolierte PAC-DNA der Klone wurden zunächst mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I verdaut und mittels 'Southern blot' auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit dem  $\gamma^{32}$ P-markiertem Oligonukleotid (GT)<sub>24</sub> hybridisiert, um reverskomplementäre (CA)<sub>n</sub>-Sequenzen zu detektieren (Abb. 7).

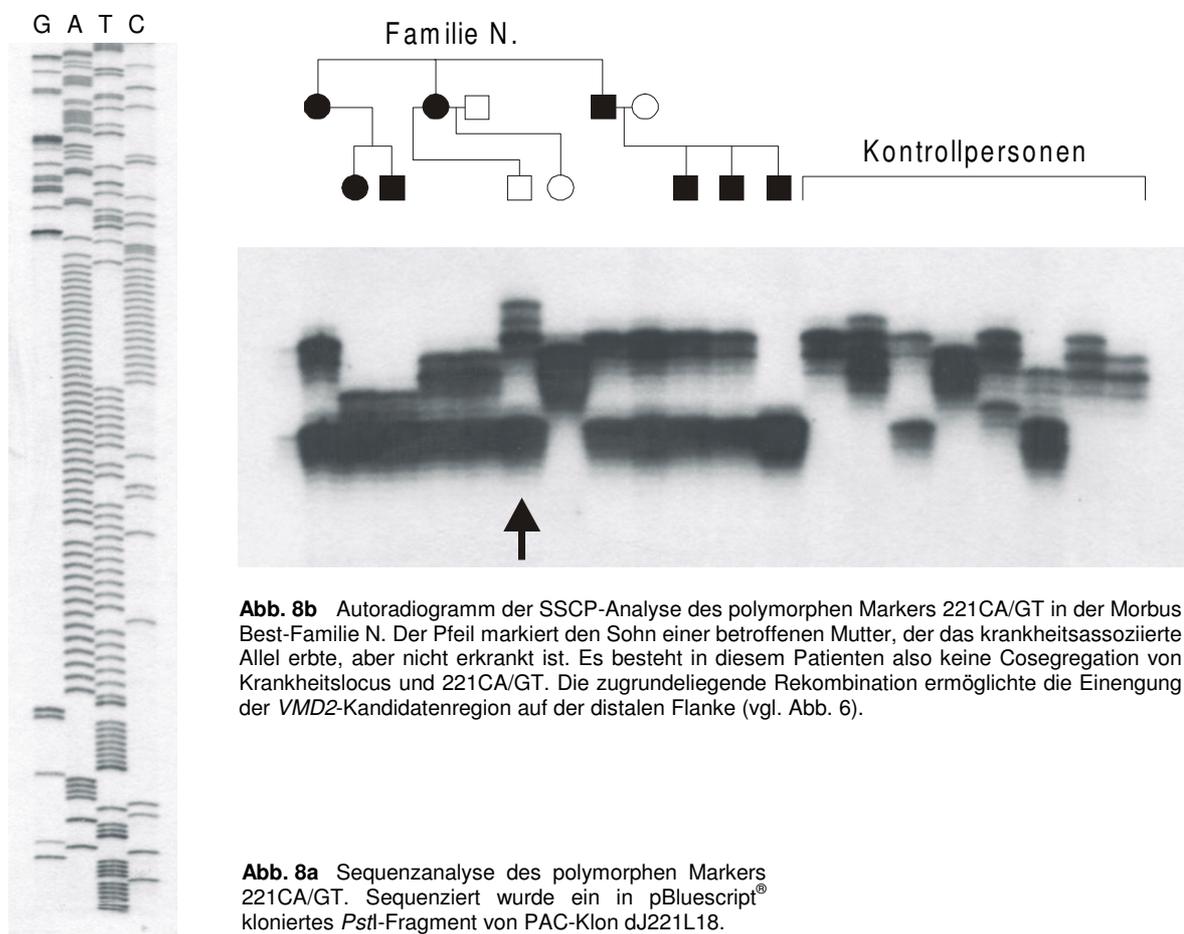


**Abb. 7** Autoradiogramm nach Hybridisierung von acht *Pst*I-restringierten PAC-Klonen mit der  $\gamma^{32}$ P-markierten Oligonukleotidsonde (GT)<sub>24</sub>.

Da die Heterogenität einer repetitiven Dinukleotid-Sequenz zumeist proportional zur Länge/Komplexität der Sequenz steigt, wurde mit (GT)<sub>24</sub> ein vergleichsweise langes 48 bp-Oligonukleotid als Sonde verwendet, um unter geeigneter Stringenz vorrangig längere (CA)<sub>n</sub>-Dinukleotide zu isolieren. Nach Subklonierung der *Pst*I-verdauten PAC-Fragmente in pBluescript®, erneutem 'Screening' mit Hilfe der Oligonukleotid-Sonde (GT)<sub>24</sub>, Plasmidpräparation und abschließender Sequenzierung der detektierten Klone wurden letztendlich folgende (CA)<sub>n</sub>-Repeats' aus den PAC-Klonen dJ52B24, dJ379A21 und dJ221L18 isoliert und für die Kopplungsanalyse herangezogen:

PAC-Klon	repetitive CA-Dinukleotid-Sequenz
dJ52B24:	(CA) <sub>8</sub> G(CA) <sub>12</sub> bzw. (AC) <sub>25</sub> (identisch mit D11S4076; Abb. 6)
dJ379A21:	(CA) <sub>22</sub>
dJ221L18:	(TA) <sub>6</sub> CA(TA) <sub>6</sub> TC(TA) <sub>3</sub> (CA) <sub>2</sub> (TA) <sub>2</sub> CA(TA) <sub>7</sub> (CA) <sub>15</sub>

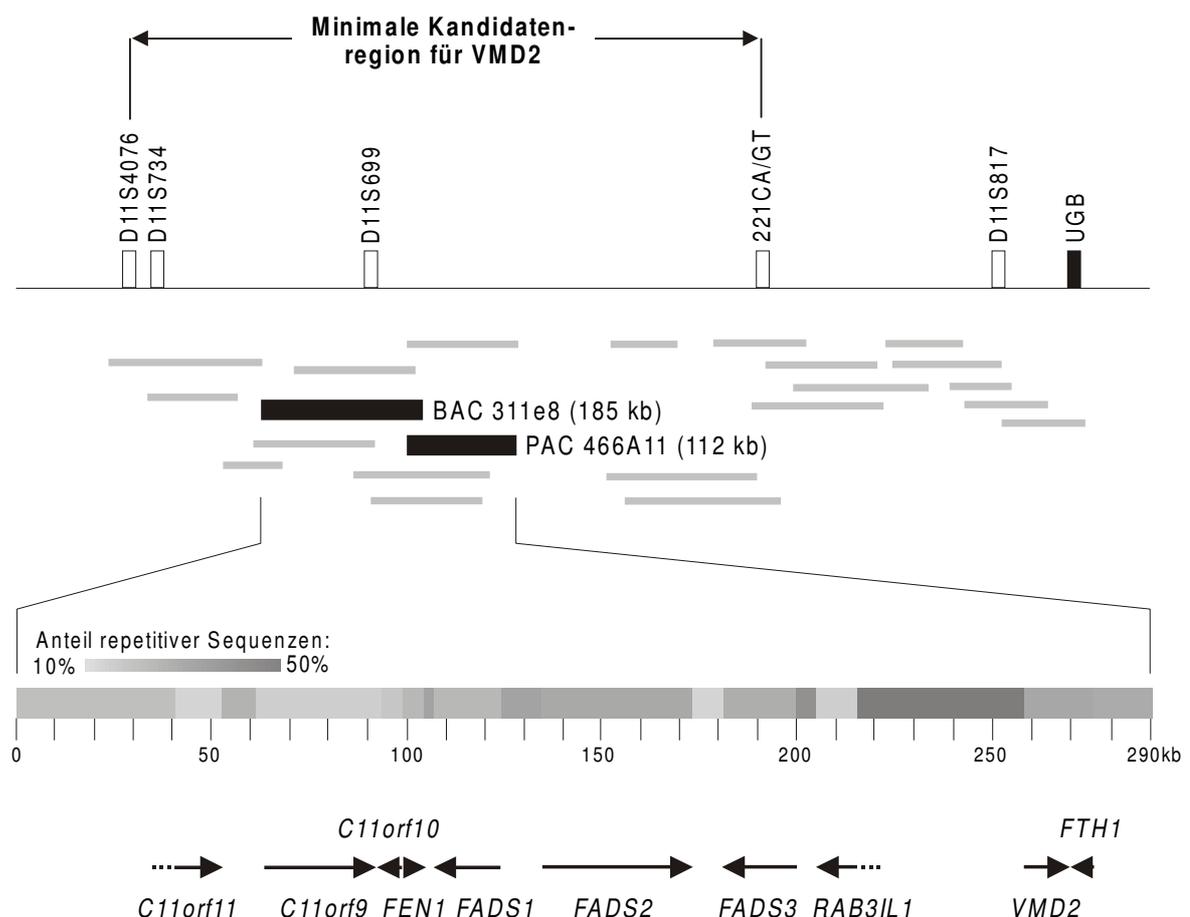
In den von uns untersuchten Familien mit Morbus Best stellte sich einzig der in PAC-Klon dJ221L18 identifizierte, relativ komplexe Marker 221CA/GT (Abb. 8a) als geeignet heraus, die *VMD2*-Kandidatenregion weiter einzuengen. Der Haplotyp von Familie N. am Locus 221CA/GT zeigt, dass bei einem nichterkrankten Familienmitglied keine Cosegregation des Markers 221CA/GT mit dem *VMD2*-assoziierten Allel auftritt, also offenbar ein Rekombinationsereignis zwischen den Loci von *VMD2* und 221CA/GT stattgefunden hat (Abb. 8b).



Durch Kopplungsanalyse des Markers D11S4076 in einer betroffenen Familie aus Schweden gelang GRAFF *et al.* (1997) etwa zeitgleich die Einengung der *VMD2*-Kandidatenregion von der proximalen Seite her, so dass der für die Identifizierung des Gens kritische chromosomale Bereich schließlich flankiert wurde von D11S4076 und 221CA/GT (Abb. 6).

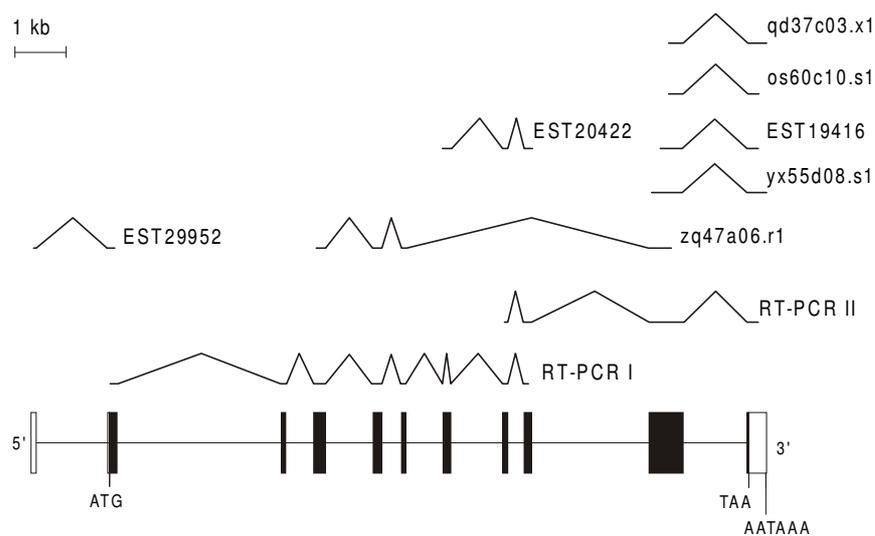
#### 4.1.3. Identifizierung von *VMD2*

1998 wurde vom Eugene McDermott Center for Human Growth and Development der Universität von Texas (Dallas, USA) die erste, anfänglich noch fragmentarische genomische Sequenz des 112 kbp großen PAC-Klons dJ466A11 (GenBank-Zugangsnummer AC003025; Abb. 6 und 9) in der öffentlichen Datenbank publiziert. Wenig später folgte die Veröffentlichung der Sequenz des mit dJ466A11 überlappenden, 185 kbp großen BAC-Klons CIT-HSP-311e8 (AC004770; Abb. 9) durch das Joint Genome Institute, Lawrence Livermore National Laboratory (Livermore, USA).



**Abb. 9** Schematische Darstellung der *VMD2*-Kandidatenregion. Hervorgehoben sind BAC-Klon CIT-HSP-311e8 und PAC-Klon dJ466A11. Die beiden genomischen Sequenzen der Klone wurden zu einer ununterbrochenen Sequenz von 290 kbp zusammengestellt. Basierend auf einer Sequenzanalyse mit Hilfe des RepeatMaskers (Online-Software aufrufbar über <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>) ist der Anteil an repetitiven Elementen in der Sequenz durch Grauschattierungen kenntlich gemacht. Besonders auffällig ist hier der hohe Anteil repetitiver Elemente im intergenischen Abschnitt zwischen *RAB3IL1* und *VMD2*. Auch gezeigt sind die Loci aller weiterer Gene im untersuchten Intervall sowie die jeweilige Transkriptionsorientierung (Pfeile). Unterbrochene Pfeile deuten an, dass die Exon-Intron-Struktur der betroffenen Gene (*C11orf11* und *RAB3IL1*) noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

Da beide Klone aus der Kernregion des für die Klonierung von *VMD2* relevanten Intervalls stammen, wurden die genomischen Sequenzen (zu 290 kbp kombiniert) mit Hilfe von 'exon prediction'-Programmen (GRAIL, FGENES) auf darin enthaltene, kodierende Sequenzen hin untersucht. Die Analyse wurde dabei durch BLAST-Abfragen (dbEST) zur Identifizierung zugehöriger EST-Klone ergänzt. In der Sequenz von dJ466A11 konnten so u.a. die miteinander überlappenden EST-Klone EST20422, EST1941 und yx55d08 kartiert werden. Beim Vergleich mit der genomischen Sequenz waren drei Spleiß-Ereignisse erkennbar. Zudem führte die 'exon prediction'-Analyse der umliegenden genomischen Sequenz zur Vorhersage von zunächst sechs weiteren Exons strangaufwärts der drei EST-Klone. Anhand der sich abzeichnenden Genstruktur konnten folgend auch die EST-Klone EST29952 und zq47a06 integriert werden, wobei EST29952 den 5'-Anfang des Gens repräsentiert, während mit zq47a06 ein alternativ gespleißtes Transkript vorliegt (Abb. 10). Die zunächst noch hypothetische Struktur des provisorisch *TU15B* genannten Gens wurde schließlich mit Hilfe von RT-PCR-Analysen bestätigt (3.26., Tab 4a). Am Ende lag ein aus 11 Exons bestehendes Gen vor, welches sich genomisch über 14.1 kbp erstreckt.

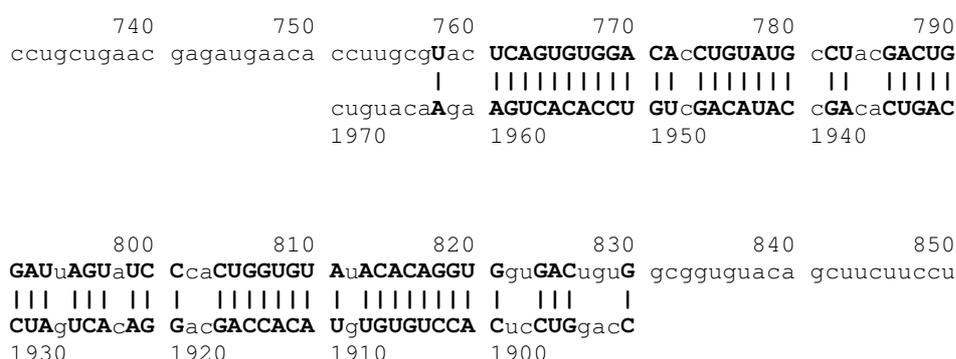


**Abb. 10** Proportionale Darstellung der Genstruktur von *VMD2*. Schwarze Balken symbolisieren die exonischen Sequenzen, offene Balken kennzeichnen untranslatierte Abschnitte. Angegeben sind weiterhin die Positionen partieller, genspezifischer EST-Klone (einschließlich ihrer Spleiß-Strukturen), wie sie in der GenBank-Datenbank verfügbar sind, sowie die Produkte zweier *TU15B/VMD2*-spezifischer RT-PCR-Reaktionen (siehe Tab. 4a).

Die cDNA von *TU15B/VMD2* ist 2192 bp lang und enthält einen offenen Leserahmen von 1843 bp. Das Translationsstart-Kodon ATG befindet sich 89 bp strangabwärts in Exon 2 und entspricht im Sequenzkontext CTGGCCATGA interessanterweise keineswegs der von KOZAK (1996) für Vertebraten definierten Konsensus-Sequenz GCCACCATGG mit den beiden hochkonservierten Nukleotidpositionen A<sup>-3</sup> und G<sup>+4</sup>. Das Polyadenylierungs-Signal AATAAA liegt an Position +2166-

2171, am Ende einer 328 bp langen 3'-UTR-Sequenz. Erwähnenswert ist der in Abbildung 11 dargestellte selbstkomplementäre Sequenzabschnitt von *TU15B/VMD2*, der starken Einfluss auf die Sekundärstruktur der mRNA haben dürfte und vermutlich zu deren Stabilität beiträgt. Etwa 2/3 der Nukleinsäuresequenz von Exon 6 und der Anfang von Exon 7, zusammen ca. 70 bp, zeigen deutliche Sequenzidentität zu einem reverskomplementären Abschnitt aus dem 3'-UTR des Gens.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die genomische Organisation von *TU15B/VMD2*. Die gefundenen Spleißmotive stehen in Übereinstimmung mit den definierten Spleiß-Konsensus-Sequenzen, also der GT-AG-Regel für intronische Sequenzen (z.B. BREATHNACH und CHAMBON, 1981; MOUNT, 1982; PENOTTI, 1991).



**Abb. 11** Selbstkomplementäre Sequenzabschnitte in der mRNA von *VMD2* zwischen den Exons 6/7 und der 3'-untranslatierten Region des Gens.

**Tab. 6) Exon-Intron-Grenzen von *TU15B/VMD2***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	68		..CCCACCTgtgagta..	1343
2 <sup>2</sup>	188	..ctaccagGACCCAA..	..TTTATAGgtaaagc..	3145
3	95	..ccccagGCTGGCC..	..GTGCTGGgtgagtt..	516
4	234	..gccccagGCTTCTA..	..CAAGCAGgtgggcg..	892
5	155	..tctgcagGCTTTAT..	..GCTGAACgtgagcc..	388
6	78	..ccccagGAGATGA..	..TACACAGgtgagga..	702
7	153	..ctcccagGTGGTGA..	..GCTGAAGgtgggcc..	986
8	81	..ccccagGTGGCAG..	..TTTGCAGgtatggg..	313
9	152	..tgaccagGTGTCCC..	..ACATCAGgtgtggc..	2211
10	639	..tttccagCCTGAAC..	..AAAACAGgtctgtc..	1210
11 <sup>3</sup>	365	..tcactagGGATGAA..		

<sup>1</sup> Die angegebene Exon-Größe beruht auf dem Ergebnis eines 5' RACE-Experimentes von Petrukhin *et al.* (1989) und ist nicht kodierend.

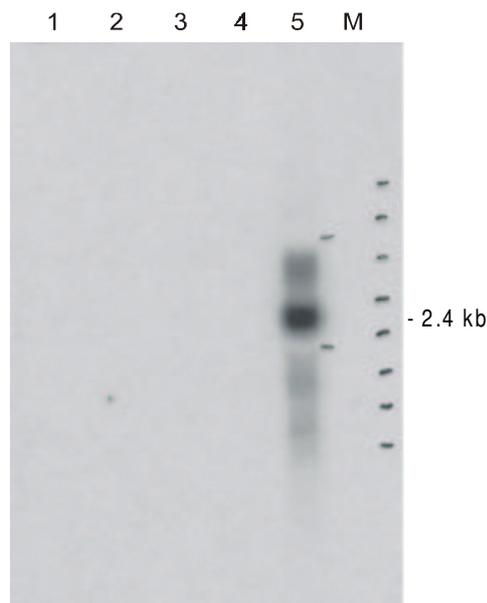
<sup>2</sup> Das Exon enthält eine 5'-UTR-Sequenz von 36 bp.

<sup>3</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 346 bp.

Direkt neben *TU15B/VMD2* liegt das Gen *FTH1* ('ferritin heavy chain 1'). Beide Gene sind 'tail-to-tail' angeordnet und überlappen einander um 146 bp in den 3'-untranslatierten Regionen, wenn man das spätere der beiden bekannten Polyadenylierungs-Signale von *FTH1* berücksichtigt. *FTH1* wird in Abschnitt 4.3.1. noch kurz vorgestellt.

#### 4.1.4. Expressionsanalyse von *VMD2*

Das Expressionsprofil von *TU15B/VMD2* wurde mittels einer 'Northern blot'-Analyse untersucht. Hybridisiert wurde ein selbstgefertigter Filter mit je 12 µg Gesamt-RNA aus Lunge, Cerebellum, Retina, retinalem Pigmentepithel (RPE) und der RPE-Zelllinie ARPE-19. Als Sonde wurde ein 975 bp langes RT-PCR-Produkt eingesetzt, das sich mit den Oligonukleotidprimern TU15new-F4 und TU15new-R2 (3.26., Tab. 4a) amplifizieren lässt. Wie in Abbildung 12 zu sehen, konnte eine Expression ausschließlich für das retinale Pigmentepithel nachgewiesen werden.



**Abb. 12** 'Northern blot'-Analyse von *VMD2*. Es wurden je 12 µg Gesamt-RNA aus menschlicher Lunge (1), Cerebellum (2), Retina (3), der Zelllinie ARPE-19 (4) und retinalem Pigmentepithel (5) hybridisiert. Durch Striche markiert sind die Positionen der Markerbanden (281-6583 Basen) nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA sowie die Lage der abundanten ribosomalen 28S- und 18S-rRNA-Moleküle von etwa 4.8 bzw. 1.9 kbp Länge.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die zuvor genannten *TU15B/VMD2*-spezifischen EST-Klone aus unterschiedlichen Geweben isoliert wurden, nämlich EST29952 aus Cerebellum, EST20422 und EST19416 aus Retina, yx55d08 aus Melanozyten und zq47a06 aus Neuronen, was eine zumindest geringe Expression von *TU15B/VMD2* in diesen Geweben belegt. Vorsicht ist hier allerdings bei den Retina-Klonen geboten, da die Retina vor der RNA-Präparation ggf. nicht sauber vom umgebenden RPE getrennt wurde, so dass EST20422 und EST19416 voraussichtlich aus dem RPE isoliert wurden und nicht aus der Retina. Die 'Northern blot'-Analyse zeigt jedenfalls deutlich, dass das Gen offenbar nicht oder zumindest unterhalb der Nachweisgrenze in der Retina exprimiert wird. Eine jüngere Abfrage der dbEST-Datenbank mit der cDNA-Sequenz von *TU15B/VMD2* resultierte in der Identifizierung weiterer spezifischer EST-Klone, welche aus Herz (qd37c08) und Brusttumorgewebe (os60c10) isoliert wurden und auf eine geringe Expression des Gens auch in diesen Geweben hinweisen.

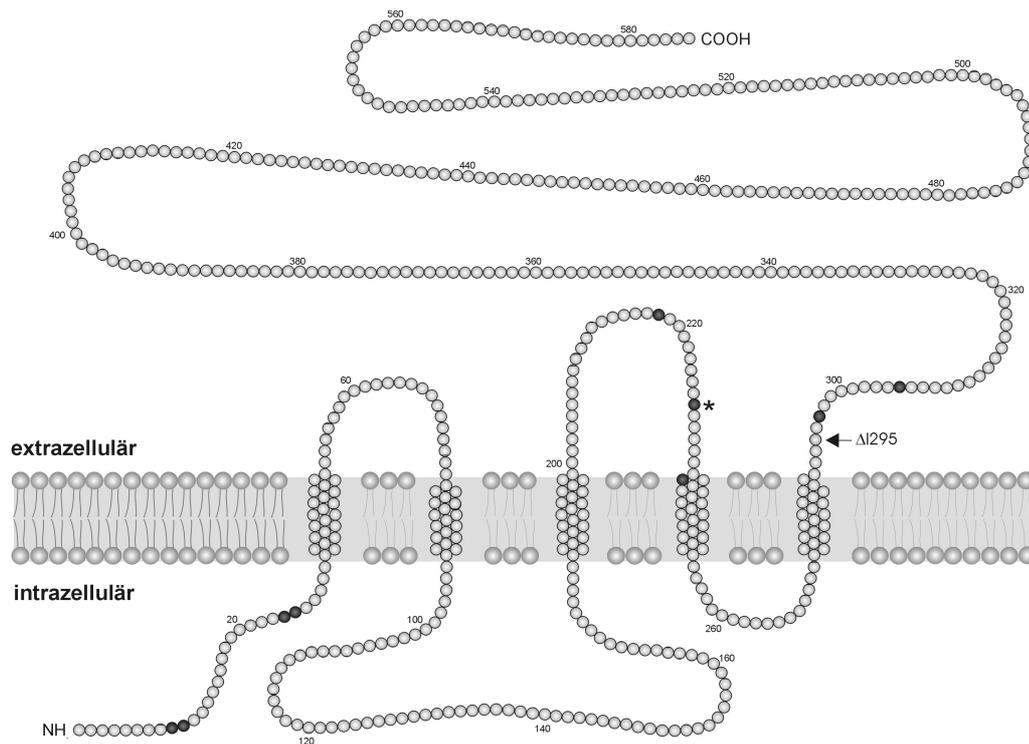
#### 4.1.5. Mutationsanalyse von *VMD2*

Aufgrund der abundanten Expression von *TUI5B/VMD2* im retinalen Pigmentepithel wurde das Gen in 12 Familien mit Morbus Best auf Mutationen hin untersucht. Hierzu wurden Einzelstrang-Konformationsanalysen (SSCA) von PCR-Produkten aller Exons durchgeführt. Die verwendeten flankierenden Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 5a aufgeführt. Durch die Sequenzierung auffällig im Gel wandernder PCR-Produkte, also Fragmenten mit 'band shift', konnten in 10 Familien Punktmutationen mit folgender Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des Translationprodukts festgestellt werden: V9M, A10T, W24C, R25Q, R218C, Y227N, Y227C, V235M, P297A und F305S. In der elften Familie wurde eine 3 bp-Deletion des Kodons 295 ( $\Delta I295$ ) festgestellt (siehe auch Abb. 13). Aufgrund dieser Befunde wurde *TUI5B* im Herbst 1998 als *VMD2* publiziert (MARQUARDT *et al.*, 1998). Etwa zeitgleich wurde das Gen auch von PETRUKHIN *et al.* (1998) als genetische Ursache für die Best'sche Erkrankung identifiziert und veröffentlicht.

#### 4.1.6. Das *VMD2*-Protein

Das Translationsprodukt von *VMD2*, auch „Bestrophin“ genannt, besteht aus 585 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 67.7 kDa mit einem isoelektrischen Punkt von 6.5. Das bisher nicht näher untersuchte alternative Transkript, welches von EST-Klon zq47a06 abgeleitet werden kann (Abb. 10), enthält nicht die Exons 7-9 und entspräche in der Translation einem Protein aus 270 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 31.5 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 9.8. Interessanterweise konnte bisher weder durch RT-PCR noch durch die 'Northern blot'-Analyse von *VMD2* die Existenz eines entsprechend verkürzten Transkripts bestätigt werden.

Die Funktion des Translationsprodukts von *VMD2* ist noch unbekannt. Es scheint sich aber auf jeden Fall um ein Membranprotein zu handeln. Einer aktuellen Publikation zufolge ist das Protein in der basolateralen Plasmamembran der RPE-Zellen lokalisiert (MARMORSTEIN *et al.*, 2000). Computeranalysen der Peptidsequenz lassen auf drei bis fünf enthaltene Transmembrandomänen schließen, je nachdem, welches Computerprogramm zur Vorhersage benutzt wird (TopPred, SOSUI oder TMPred). Abbildung 13 zeigt ein Modell des Proteins, dessen Transmembrandomänen vom Programm TMPred (HOFMANN und STOFFEL, 1993) vorhergesagt sind. Eine Gemeinsamkeit der Translationsprodukte von *VMD2* mit sequenzähnlichen Proteinen, beispielsweise von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, ist die Zugehörigkeit zur sog. RFP-Proteinfamilie. In dieser Familie sind Proteine zusammengefasst, bei denen im N-terminalen Bereich von etwa 350-400 Aminosäuren die Positionen der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin relativ hoch konserviert sind und die zudem das invariante Aminosäuremotiv Arginin-Phenylalanin-Prolin (RFP) aufweisen. Im Translationsprodukt von *VMD2* liegt dieses Motiv an Peptidposition 150-152 (vgl. Abb. 39). Eine funktionelle Bedeutung wurde für das Motiv bisher nicht prognostiziert.



**Abb. 13** Topographisches Transmembranmodell des *VMD2*-Proteins, basierend auf der Vorhersage von fünf Transmembrandomänen durch TMpred (HOFMANN und STOFFEL, 1993; Online-Software aufrufbar über [www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)). Dunkel hervorgehoben sind Aminosäurepositionen, die durch Mutation bei den untersuchten Morbus Best-Patienten betroffen sind. Ein Stern kennzeichnet die zweimal unabhängig gefundene Alteration an Position Y227 (Y227N und Y227C).

## 4.2. Klonierung und Charakterisierung von drei Fettsäuredesaturase-Genen

Folgend soll die Isolierung der drei Fettsäuredesaturase-Gene *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* beschrieben werden. Erste cDNA-Fragmente von *FADS1* und *FADS2* wurden durch eine direkte cDNA-Selektion auf Basis der PAC-Klone dJ527E4 und dJ465G21 isoliert (STÖHR *et al.*, 1998<sup>b</sup>). Da die selektierten, partiellen cDNA-Sequenzen keine für ein Protein kodierende Sequenzabschnitte enthielten, also keine Funktion der detektierten Gene abgeleitet werden konnte, wurden *FADS1* und *FADS2* zunächst unter der neutralen Bezeichnungen *TU12* und *TU13* (TU = 'transcription unit') geführt und zusammen mit anderen selektierten cDNA-Fragmenten in einer Transkriptionskarte für die chromosomale Region 11q12-q13.1 veröffentlicht (STÖHR *et al.*, 1998<sup>b</sup>). Die offiziellen Gensymbole wurden erst später, nachdem die Rolle der Gene im Fettsäuremetabolismus geklärt war, in Absprache mit dem 'Human Gene Nomenclature Committee' in *FADS#* umgeändert. Beide Gene wurden inzwischen zusammen mit dem später identifizierten *FADS3* publiziert (MARQUARDT *et al.*, 2000).

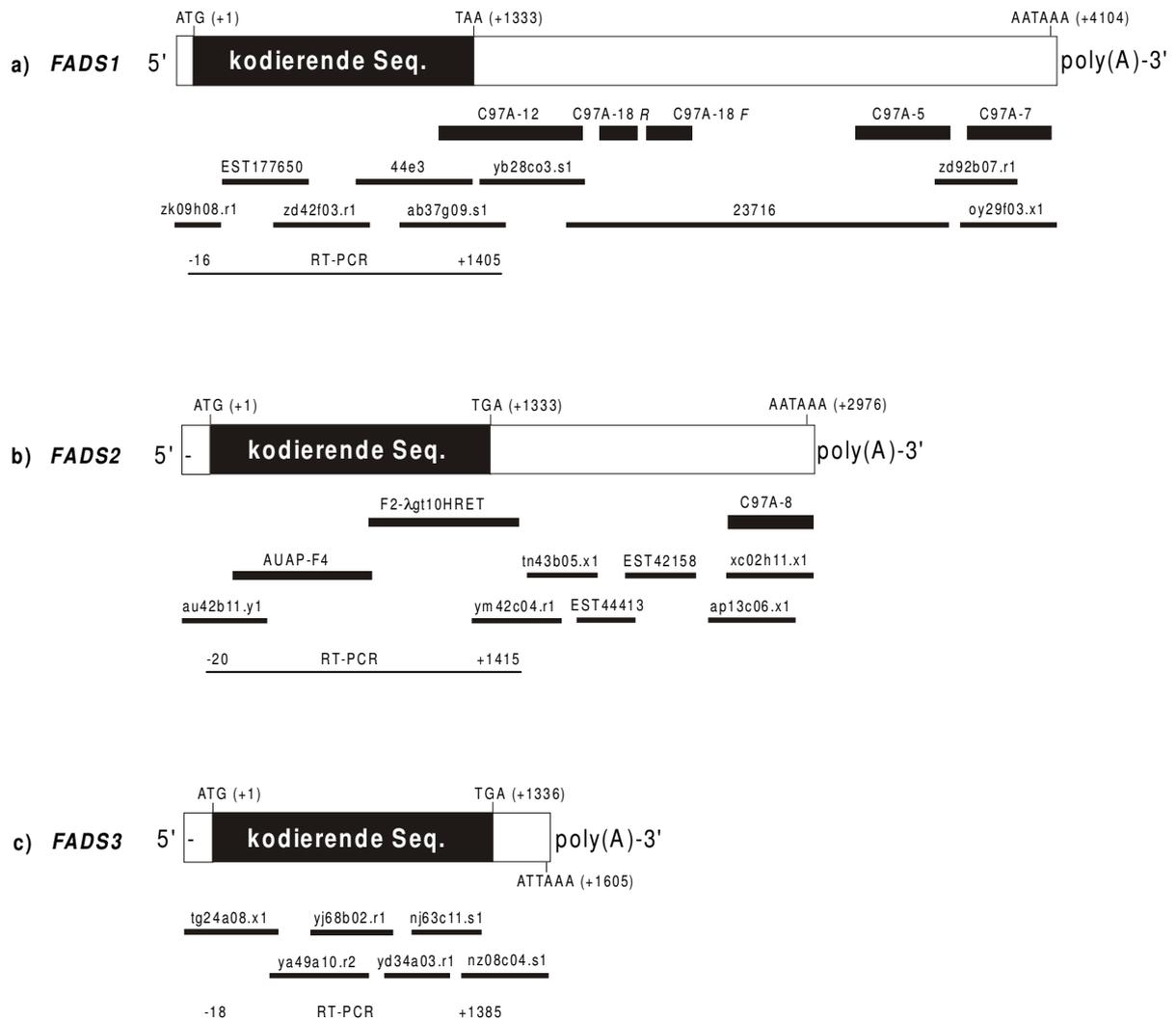
#### 4.2.1. cDNA-Klonierung von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3*

Auf Basis einer dbEST-Datenbanksuche mit den vier selektierten cDNA-Klonen C97A-5, C97A-7, C97A-12 und C97A-18 (STÖHR *et al.*, 1998<sup>b</sup>) konnte ein 4205 bp großer EST-'Contig' aus insgesamt 155 unabhängigen, überlappenden Klonen erstellt werden, der die komplette cDNA von *FADS1* repräsentiert. In Abbildung 14a ist der minimale cDNA-'Contig' des Gens dargestellt. Die Sequenz enthält einen offenen Leserahmen von 1410 bp mit einem Translationsstart-Kodon ATG 79 bp strangabwärts im am weitesten 5'-expandierten EST-Klon zk09h08.r1. Das Translationsstart-Signal liegt im Sequenzkontext CCAGCTATGG und entspricht nur mäßig der von KOZAK (1996) ermittelten Konsensus-Sequenz (vgl. 4.1.3.). *FADS1* kodiert ein 53 kDa-Protein von 444 Aminosäuren. Im 3'-UTR von *FADS1* liegen zwei repetitive Sequenzen der Alu/SINE-Klasse (AluSg/x an Nukleotidposition 1780-1947; AluJb an Position 3472-3644).

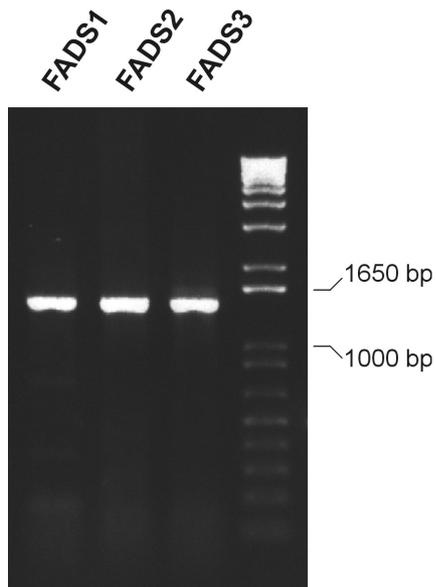
Ein weiterer selektierter cDNA-Klon (C97A-8) ermöglichte es, einen 76 Klone umfassenden EST-Contig zu initiieren, der partiell die cDNA-Sequenz von *FADS2* abdeckt. Zur Vervollständigung der letztendlich 3149 bp langen cDNA von *FADS2* war sowohl ein 'Screening' der retinalen Phagen-cDNA-Bank λgt10HRET als auch die Durchführung einer 5'-RACE-Analyse erforderlich (Abb. 14b). Im offenen Leserahmen von 1352 bp liegt das Translationsstart-Kodon 21 bp strangabwärts im *FADS2*-cDNA-'Contig' und entspricht im Sequenzkontext GGCAGCATGG dem Konsensus-Motiv besser als *FADS1*. Das 5'-Ende des *FADS2*-cDNA-'Contigs' ist durch EST-Klon au42b11.y1 repräsentiert. *FADS2* kodiert wie *FADS1* ein 444 Aminosäuren großes Protein (52.3 kDa).

Weitere 62 humane EST-Klone aus der dbEST-Datenbank zeigen eine signifikante Sequenzidentität von 50-60% zur cDNA von *FADS1* bzw. *FADS2*, können aber definitiv keinem der beiden Gene zugeordnet werden. Ausschließlich auf Basis der zur Verfügung stehenden EST-Klone, also *in silico*, wurde ein 'Contig' von 1757 bp für eine dritte sequenzähnliche Fettsäuredesaturase erstellt (*FADS3*, Abb. 14c). Der offene Leserahmen umfasst 1468 bp und trägt das Translationsstart-Kodon 134 bp strangabwärts des 5'-Endes von *FADS3*, definiert durch EST-Klon tg24a08.x1. Der Sequenzkontext des Translationsstart-Kodons, TGCAGCATGG, steht ebenfalls in guter Übereinstimmung mit der KOZAK-Konsensus-Sequenz. Das ableitbare Translationsprodukt von *FADS3* umfasst 445 Aminosäuren (51.1 kDa) und ist dadurch um eine Aminosäure größer als die von *FADS1* und *FADS2* kodierten Proteine. Eine weitere Abweichung zeigt sich beim Polyadenylierungs-Signal von *FADS3*, welches mit ATTAAA von dem gängigen Motiv AATAAA abweicht. Die entsprechende Sequenz am 3'-Ende der *FADS3*-cDNA ist hierbei durch mehrere unabhängige EST-Klone gesichert. SHEETS *et al.* (1990) beschreiben das Motiv ATTAAA als häufigste natürlich vorkommende Variante des Polyadenylierungs-Signales bei Eukaryonten.

Die kodierenden Abschnitte von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* wurden jeweils mittels RT-PCR amplifiziert und zur Kontrolle der Nukleinsäuresequenz sequenziert (Abb. 15).



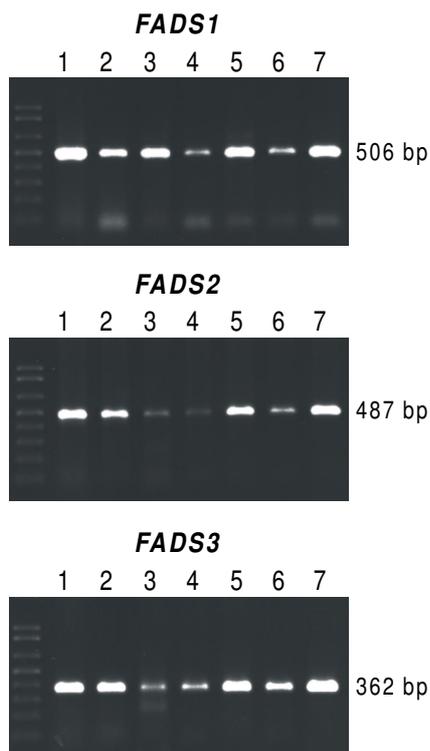
**Abb. 14** Zusammensetzung der cDNA-Sequenzen von *FADS1* (a), *FADS2* (b) und *FADS3* (c). Weiße Abschnitte kennzeichnen die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen der Gene. Kräftige Linien repräsentieren die Position selektierter cDNA-Sequenzen (STÖHR *et al.*, 1998<sup>b</sup>), mittelstarke Linien in der Darstellung von *FADS2* repräsentieren die Lage eines aus der retinalen λgt10-Phagenbank isolierten cDNA-Fragmentes bzw. des genspezifischen 5'-RACE-Produkts, während dünneren Linien den jeweiligen Minimal-'Contig' bestehend aus spezifischen EST-Klonen der GenBank-Datenbank darstellen. Dieser ist im Falle von *FADS2* lückenhaft, weswegen sowohl das 'Screening' der Phagenbank als auch die 5'-RACE-Analyse durchgeführt wurden. Haarlinien zeigen die Länge und Position der RT-PCR-Amplifikationsprodukte zur Kontrolle der kodierenden Sequenz der drei Gene an. Außerdem angegeben sind die Nukleotidpositionen der putativen Translationsstartpunkte innerhalb der cDNA-Sequenzen, der Translationsstopp-Kodons und der Polyadenylierungssignale.



**Abb. 15** Transkriptanalyse von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3*. Durch die Amplifizierung und nachfolgende Sequenzierung der hier gezeigten kodierenden Sequenzabschnitte aller drei Gene (vgl. Abb. 14) wurde die korrekte cDNA-Sequenz ermittelt. Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 4b,4c und 4d angegeben.

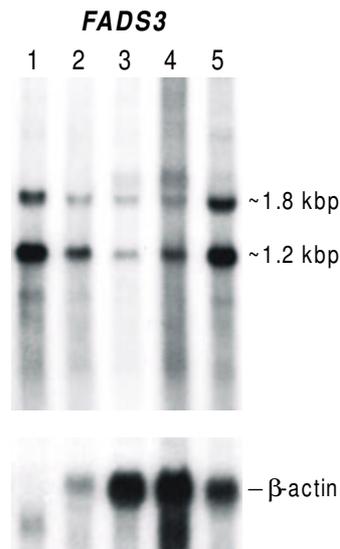
#### 4.2.2. Expressionsanalyse von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3*

In der dbEST-Datenbank sind die drei Fettsäuresaturasen durch 155 (*FADS1*), 76 (*FADS2*) und 62 (*FADS3*) unabhängige EST-Klone repräsentiert (Stand vom März, 2000). Anhand der jeweils zur Isolierung der EST-Klone verwendeten gewebsspezifischen cDNA-Banken zeigt sich, dass alle drei Gene offenbar ubiquitär exprimiert werden. Bestätigt werden konnte dies durch eine RT-PCR-Expressionsanalyse (Abb. 16). Es waren nur geringe Abweichungen in der Abundanzverteilung festzustellen.



**Abb. 16** RT-PCR-Expressionsanalyse von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* in menschlicher Leber (1), Lunge (2), Uterus (3), Lymphozyten (4), Stammhirn (5), Basalganglien (6) und der Zelllinie ARPE-19 (7). Die verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 4b, 4c und 4d angegeben.

'Northern blot'-Analysen von *FADS1* und *FADS2* wurden bereits im Rahmen der Publikation einer Transkriptkarte für die *VMD2*-Kandidatenregion gezeigt (damals noch unter der Bezeichnung *TUI2* bzw. *TUI3*; STÖHR *et al.*, 1998<sup>b</sup>). Es konnten seinerzeit in allen untersuchten Geweben (Lunge, Cerebellum, Retina und RPE-Zelllinie ARPE-19) den zu erwartenden Längen entsprechende Transkripte von etwa 4.2 kbp für *FADS1* bzw. 3.1 kbp für *FADS2* detektiert werden. An dieser Stelle soll ergänzend die 'Northern blot'-Analyse von *FADS3* gezeigt werden (Abb. 17).

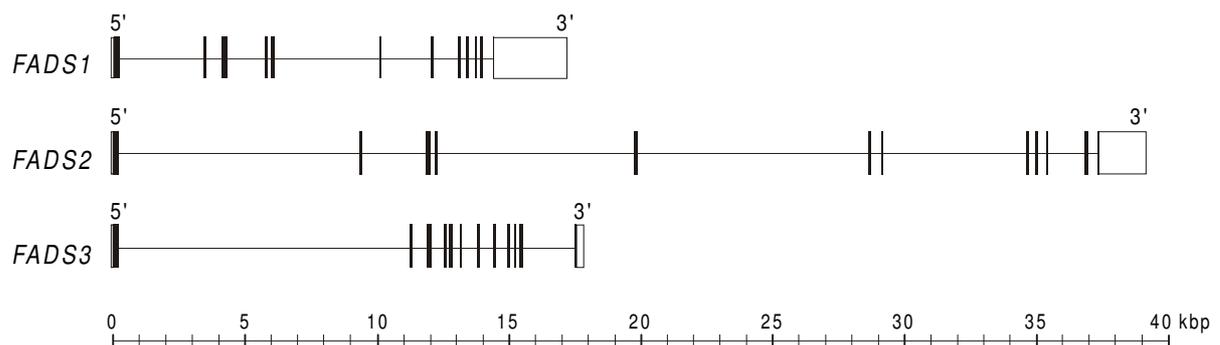


**Abb. 17** Autoradiogramm einer 'Northern blot'-Analyse von *FADS3*. Hybridisiert wurden jeweils 12  $\mu$ g Gesamt-RNA aus Herz (1), Leber (2), Lunge (3), Uterus (4) und Stammhirn (5). Als Sonde diente ein Nukleinsäurefragment aus dem 3'-UTR des Gens (3.29.). In allen untersuchten Geweben lassen sich Transkripte von etwa 1.8 und 1.2 kbp detektieren, wobei das kleinere der beiden Transkripte etwas stärker repräsentiert zu sein scheint. Zur besseren Beurteilung der Abundanzverteilung von *FADS3* in den Geweben wurde auf derselben Membran eine Kontrollhybridisierung mit einer  $\beta$ -Aktin-Probe durchgeführt.

Mit einer 362 bp großen Nukleinsäuresonde, amplifiziert mit der Primerkombination TU19-F3/TU19-R (Tab. 4d), die fast den gesamten 3'-UTR von *FADS3* erfasst, lassen sich Signale von etwa 1.8 kbp und 1.2 kbp in allen untersuchten Geweben detektieren. Während das höhergelegene Signal dem vollständigen *FADS3*-Transkript entsprechen dürfte, lässt sich über die Zusammensetzung des kleineren Transkripts zur Zeit nur spekulieren. Da eine RT-PCR-Amplifikation der kompletten kodierenden Sequenz von *FADS3* nur in einem einzigen Fragment resultiert, also nicht die Existenz eines zweiten, alternativ gespleißten Transkripts belegt (Abb. 15) und das 1.2 kbp-Transkript, aufgrund der Detektion im 'Northern blot', offenbar den gleichen 3'-UTR beinhaltet wie das 1.8 kbp-Transkript, ist anzunehmen, dass das kleinere Transkript im 5'-Bereich verkürzt ist. Eine RT-PCR-Amplifizierung unabhängig vom längeren Transkript wäre dadurch unmöglich. Es könnte sich bei dem 1.2 kbp-Transkript um eine Variante von *FADS3* handeln, die nicht die Cytochrom b5-Domäne enthält (vgl. 4.2.4.) und somit eine Desaturase kodiert, welche frei lösliches Cytochrom b5 als Elektronendonator verwendet. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden weitere 'Northern blots' mit Nukleinsäuresonden hybridisiert, die lediglich Exon 1, Exon 2 bzw. Exon 3 von *FADS3* repräsentierten. Leider blieben die Hybridisierungen auch nach mehrfacher Wiederholung und 2wöchiger autoradiografischer Exposition ohne Ergebnis, was eventuell an einer zu geringen Länge der verwendeten Nukleinsäuresonden gelegen haben mag. So ist also zunächst noch unbekannt, wie sich das 1.2 kbp-Transkript von *FADS3* exakt zusammensetzt.

#### 4.2.3. Genomische Organisation und Genstruktur von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3*

Die Genstrukturen der drei Fettsäuredesaturasen und ihre exakte chromosomale Lage zueinander wurden sichtbar, als die überlappenden Sequenzen von PAC-Klon dJ466A11 und BAC-Klon CIT-HSP 311e8 in der GenBank-Datenbank veröffentlicht wurden (vgl. Abb. 9). *FADS1* ist demnach lediglich 2.4 kbp distal zu *FEN1* in 'tail to tail'-Orientierung lokalisiert. Das Gen besteht aus 12 Exons und überspannt 17.2 kbp an genomischer DNA. *FADS2* liegt distal, 'head to head' zu *FADS1* in einer Distanz von 11.3 kbp. Mit ebenfalls 12 Exons und einer genomischen Spannweite von 39.1 kbp ist *FADS2* das größte der drei Desaturase-Gene. Wiederum distal zu *FADS2*, in 'tail to tail'-Orientierung, liegt *FADS3* in einer Entfernung von 6 kbp. *FADS3* setzt sich ebenfalls aus 12 Exons zusammen und überspannt genomisch 17.9 kbp. In Abb. 18 sind die Genstrukturen von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* proportional zueinander dargestellt. Während die Längen der intronischen Sequenzen im Vergleich der drei Gene stark voneinander abweichen, sind die Längen der Exons und die Positionen der Spleiß-Stellen konserviert. Die Exons 2-4, 6-11 und der kodierende Abschnitt von Exon 12 haben in allen drei Genen identische Längen (vgl. Tab. 7a-c).



**Abb. 18** Proportionale Darstellung der genomischen Strukturen von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3*. Vertikale schwarze Balken repräsentieren die Exons, weiße Balken die untranslatierten Regionen der Gene.

**Tab. 7a) Exon-Intron-Grenzen von *FADSI***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1	282 <sup>1</sup>		..TGCCACGgtgagcg..	3202
2	111	..cttgcagGATCCCT..	..CAAGAATgtaagac..	574
3	198	..tctgcagAAAGAGC..	..AGTTCAGgtgagag..	1395
4	102	..cacctagGCCCAGG..	..CCTGAAGgtcagtg..	94
5	129	..tctgtagGGGGCCC..	..TGTGGAGgtgagtg..	4026
6	61	..ttcacagCTTGGGA..	..TTCTAAgtgagtg..	1902
7	77	..tccccagTTGGGCC..	..GTGGGTGgtgagta..	917
8	98	..actatagGACTTGG..	..TAGTCAGgtagat..	210
9	97	..ctaacagGTTCTTG..	..CACCCAGgtaaggg..	251
10	80	..ccgccagCTCCAGG..	..AGCACCAgtgagta..	105
11	126	..cctaaagTCTTTTT..	..TCATCCAgtgagta..	338
12	2819 <sup>2</sup>	..cctgcagCTACTA..		

<sup>1</sup> Die angegebene Exon-Größe basiert auf dem am weitesten 5'-gelegenen EST zk09h08.r1 (AA029030) und enthält eine 5'-UTR-Sequenz von 78 bp.

<sup>2</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 2792 bp.

**Tab. 7b) Exon-Intron-Grenzen von *FADS2***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>3</sup>	357		..TGCAACGgtaaggg..	9158
2	111	..tctccagGATGCCT..	..CAAGAACgtaagtc..	2445
3	198	..tcaacagTCAAAGA..	..CTCTCAGgtgaggc..	92
4	102	..tccccagGCCCAAG..	..CTTAAAGgtaagtg..	7432
5	126	..cccacagGGTGCCT..	..CATCGAGgtacgac..	8730
6	61	..tcctcagTACGGCA..	..TTCTGAgtgagtg..	382
7	77	..cctgcagTTGGGCC..	..CTGGGTGgtgagtt..	5451
8	98	..cccgagGACCTGG..	..TCATCAGgtgcctg..	212
9	97	..cttgcagGTTCTTG..	..TAGCCAGgtaggg..	328
10	80	..ctgacagCTGACAG..	..AGCACCAgtgagcg..	1365
11	126	..tcctcagCCTCTTC..	..TCATCAGgtgaggg..	360
12 <sup>4</sup>	1698	..tttgcagGTCCCTG..		

<sup>3</sup> Die angegebene Exon-Größe basiert auf dem am weitesten 5'-gelegenen EST au42b11.y1 (AI815395) und enthält eine 5'-UTR-Sequenz von 150 bp.

<sup>4</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 1664 bp.

**Tab. 7c) Exon-Intron-Grenzen von *FADS3***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>5</sup>	346		..CGCCACGgtaagga..	11015
2	111	..ccttcagGATGCCT..	..CCTGAATgtgagcc..	531
3	198	..atggcagGCGCAGC..	..CTCTCAGgtgacc..	464
4	102	..tccccagGCTCAGT..	..GCTAAAGgtgaggg..	111
5	123	..tccacagGGCTTCT..	..CGTCGAGgtgggtg..	296
6	61	..tccacagTATGGCA..	..TTCTGAgtgagtg..	567
7	77	..cttgcagTCGGCCC..	..GTGGCGgtgagtg..	547
8	98	..tctgcagGATTTGC..	..CTGTCAGgtatggc..	410
9	97	..cccacagGGTCCTG..	..CTCTCAGgtgggca..	168
10	80	..ccggcagCTGGCAG..	..AGCACCAgtgagtg..	134
11	126	..ccccagCCTCTTC..	..TCGTCAGgtgaggc..	1977
12 <sup>6</sup>	325	..ctcccagGTCCCTG..		

<sup>5</sup> Die angegebene Exon-Größe basiert auf dem am weitesten 5'-gelegenen EST tg24a08.x1 (AI394672) und enthält eine 5'-UTR-Sequenz von 133 bp.

<sup>6</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 286 bp.

#### 4.2.4. Protein-Sequenzanalyse von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3*

Im paarweisen Vergleich zeigen die drei Fettsäuredesaturasen auf Proteinebene folgende Sequenzidentitäten:

*FADS1* - *FADS2*: 61%

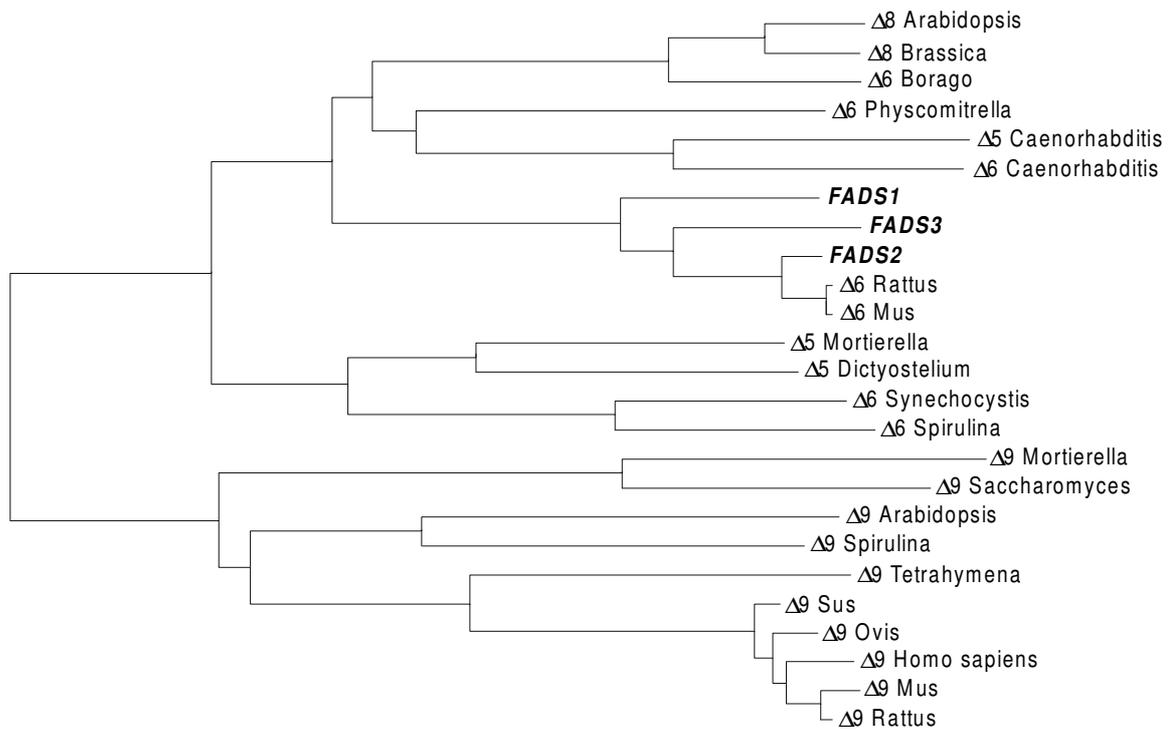
*FADS1* - *FADS3*: 52%

*FADS2* - *FADS3*: 62%

Datenbankabfragen mit den Proteinsequenzen von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* zeigen geringere, dennoch signifikante Sequenzidentitäten von 22-27% zu diversen  $\Delta 5$ -,  $\Delta 6$ - u.  $\Delta 8$ -Desaturasen aus der Tier- und Pflanzenwelt, aber keine signifikante Sequenzidentität zu  $\Delta 9$ -Desaturasen. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 19 die Berechnung eines phylogenetischen Baumes für eine Auswahl an Fettsäuredesaturasen gezeigt (verwendete Software: TREECON 3.1b). Nicht berücksichtigt wurden hierbei die für Pflanzen und Insekten spezifischen Desaturasen (z.B.  $\Delta 11$ -,  $\Delta 12$ - und  $\Delta 15$ -Desaturasen).

Ende 1999 publizierten CHO *et al.* (1999<sup>a</sup>) die menschliche  $\Delta 6$ -Desaturase, die sich als identisch mit *FADS2* herausstellte. Kurz darauf veröffentlichten dieselben Autoren auch die  $\Delta 5$ -Desaturase des Menschen (CHO *et al.*, 1999<sup>b</sup>), welche identisch ist mit *FADS1*. Wenig später wurde die  $\Delta 5$ -Desaturase zudem von LEONARD *et al.* (2000) identifiziert. So ist momentan lediglich noch die spezifische Aktivität von *FADS3* unbekannt. Weitere Ausführungen zu Sequenzidentitäten und der möglichen Funktion von *FADS3* erfolgen in Abschnitt 5.5. der Diskussion.

In den Aminosäuresequenzen von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* lassen sich jeweils vier potentielle Membrandomänen finden sowie die drei für membrangebundene Desaturasen typischen, konservierten Histidinmotive HDxGH, HFQHH und QIEHH (Abb. 20), welche vermutlich an der Bindung von Sauerstoff im Reaktionszentrum der Desaturase beteiligt sind (LOS und MURATA, 1998; SHANKLIN *et al.*, 1994). Der N-Terminus der drei Proteine besteht aus einer Cytochrom b5-ähnlichen Domäne, die als Elektronendonator bei der Desaturierung der Fettsäuren fungiert und in dieser fusionierten Variante bereits seit geraumer Zeit von zahlreichen (aber nicht allen) Fettsäuredesaturasen bekannt ist (DAILEY und STRITTMATTER, 1980; MITCHELL und MARTIN, 1995; SAYANOVA *et al.*, 1997; NAPIER *et al.*, 1998). In allen drei Proteinen enthalten die Cytochrom b5-ähnlichen Domänen das charakteristische HPGG-Motiv (Abb. 20). Dieses Aminosäuremuster, in der PROSITE-Datenbank unter Nummer PS00191 erfasst, wird als aktives, Eisen-bindendes Element der Domäne diskutiert (LEDERER, 1994; NAPIER *et al.*, 1997).



**Abb. 19** Dendrogramm zur phylogenetischen Verwandtschaft der Translationsprodukte von *FADS1*, *FADS2*, *FADS3* und den putativen Proteinsequenzen funktionell charakterisierter Fettsäuredesaturasen anderer Spezies. Die analysierten Aminosäuresequenzen sind in der GenBank-Datenbank unter den folgenden Zugangsnummern abgelegt: Δ5- (AF199596), Δ6- (AF126799) und Δ9-Desaturase (Y13647) des Menschen; Δ6- (AF126798) und Δ9-Desaturase (M26270) der Maus; Δ6- (AB021980) und Δ9-Desaturase (J02585) der Ratte; Δ6- (X87094) und Δ9-Desaturase (AJ002065) von *Spirulina platensis*; Δ5- (AF067654) und Δ9-Desaturase (AB015611) von *Mortierella alpina*; Δ6- (AF031477) und Δ5-Desaturase (AF078796) von *Caenorhabditis elegans*; Δ8- (AJ224161) und Δ9-Desaturase (D88537) von *Arabidopsis thaliana*; Δ6-Desaturasen von *Physcomitrella patens* (AJ222980), *Borago officinalis* (U79010) und *Synechocystis* (U38467); Δ5-Desaturase von *Dictyostelium discoideum* (AB022097); Δ8-Desaturase von *Brassica napus* (AJ442160); Δ9-Desaturasen von *Ovis aries* (AJ001048.1), *Sus scrofa* (Z97186), *Saccharomyces cerevisiae* (J05676) und *Tetrahymena thermophila* (D83478).

Abb. 20

			////
Δ5 FADS1	1	MAPDPVAA..ETAAGPTPR.YFTWDEVAQRSGCEERWLVIDRKVYNI SEFTRRHPPGGSRVISHYAGQD	
Δ6 FADS2	1	MGKGGNQG..EGAAAREVSVPTFSWEEIQKHNLRTDRWLVIDRKVYNI TKWSIQHPGGQORVIGHYAGED	
Δ? FADS3	1	MGGVGEPPREGPAOPGAPLPTFCWEQIRAHLPQGDKWLVIERRVYDISRWAQRHPGGSRLIGHHGAFED	
Δ6 Mus	1	MGKGGNQG..EGSTERQAPMPTFRWEEIQKHNLRTDRWLVIDRKVYNTKWSQRHPGGHRVIGHYSGED	
Δ6 Rattus	1	MGKGGNQG..EGSTERQAPMPTFRWEEIQKHNLRTDRWLVIDRKVYNTKWSQRHPGGHRVIGHYSGED	
Δ6 C.elegans	1	MVVDENASGLRMKV D GKWLYLSEELVKKHPGGA.VIEQYRNSD	
Δ5 C.elegans	1	MVLREQEHEPFFIKIDGKWCQIDDAVLRSHPPGGS.AITTYKNMD	
Cytochrom b5	1	MAEQSDEAMKYITLFEIQKHNSKSTWLI LHHKVYDITKLEHEHPGGEEVIREQAGCD	
Δ5 FADS1	67	ATDPFVAF.HINKGLVKKYNLSL.....IGELSPPEPSPFEPKKNKELTDFRE	
Δ6 FADS2	68	ATDAFRAF.HPDLEFVGKFLKPLL.....IGELAPEEPSODHGKNSKLTEDFRA	
Δ? FADS3	70	ATDAFRAF.HQDLNFVRKFLQPLL.....IGELAPEEPSODGFLNAQIVDFRA	
Δ6 Mus	68	ATDAFRAF.HLDLDFVGKFLKPLL.....IGELAPEEPSLDRGKSSQITEDFRA	
Δ6 Rattus	68	ATDAFRAF.HLDLDFVGKFLKPLL.....IGELAPEEPSLDRGKSSQITEDFRA	
Δ6 C.elegans	61	ATHIFHAF.FEGSSQAYKQDL LKKH..GEHDEFLEKQLEKRLDKVDINVSAYDVSVQEKKQVSEFEK	
Δ5 C.elegans	62	ATTVFHTF.HTGSKEAYQWTELKKECPTQPEIPIDIKDDPKIGLDDVMMGTFNISEKRSQAQINKSFTD	
Cytochrom b5	59	ATENFEDVGHSTDAREMSKFTI.....IGELHPDPRPKLNKPPETLITITDS	
Δ5 FADS1	115	LRAIVRMGLMKANHVFFLLYLHLILLDGAAWLTLWVFGTSELPPELLCAVLLSAVQAQAGWLQHDYGH	
Δ6 FADS2	116	LRKTAEDMNLFKTNHVFLLLLAHI IALESIAWFTVEYFGNGWIPTLITAFVLATSQAQAGWLQHDYGH	
Δ? FADS3	118	LHQAAEDMKLFDASPTFFAFLLGHILAMEVLAWLLYLLGPGWVPSALAAFLLAISQAQSWLQHDYGH	
Δ6 Mus	116	LKKAEDMNLFKTNHVFLLLSHIVMESIAWFTLSYFGNGWIPTLITAFVLATSQAQAGWLQHDYGH	
Δ6 Rattus	116	LKKAEDMNLFKTNHVFLLLSHIVMESIAWFTLSYFGNGWIPTLITAFVLATSQAQAGWLQHDYGH	
Δ6 C.elegans	127	LRQKLHDDGLMKANETYFLFKAI STL SIMAFAYLOYLGW....YITSAQLALAWQFGWLTHEFCGH	
Δ5 C.elegans	130	LRMRVRAEGLMDCSPLEFYTRKLLTETITLFAFYLOYHTY....YLP SAILMCGVAWQGLWLIHEFAH	
Cytochrom b5	106	SSSWWTNWVPAISAWAVALLMYRLYMAED	
Δ5 FADS1	184	LSVFE STSKWNHLHFFVIGHLKGAPASWNNHMHFQHHAKPNCFRKDPDINMHFFFFAL.GKILSVELGK	
Δ6 FADS2	185	LSVYRKPKWNHLVHKFVIGHLKGASANWNNHRHFQHHAKPNIFHKDPDVNMLHVFV.L.GEWQPLEYGK	
Δ? FADS3	187	ASIFKKSWWNHVAQKFVMGQLKGFSAHWWNHRHFQHHAKPNIFHKDPDVTAPVFL.L.GE..SSVEYGK	
Δ6 Mus	185	LSVYKKSINWNVVHKFVIGHLKGASANWNNHRHFQHHAKPNIFHKDPDIKSLHVFV.L.GEWQPLEYGK	
Δ6 Rattus	185	LSVYKKSINWNVVHKFVIGHLKGASANWNNHRHFQHHAKPNIFHKDPDIKSLHVFV.L.GEWQPLEYGK	
Δ6 C.elegans	191	QOPTKNRPLNDTISLFFGNFLQGFSSRWWKDKHNTHHAATNVIDHGDIDLAPLFAFIPGLCKYKASF	
Δ5 C.elegans	194	HQLFKNRYNNDLASFYVGNFLQGFSSGGWKEQHNVHHAATNIVGRDGLDLVPPFYATVAEHLNNY..SQ	
Δ5 FADS1	252	QKKKYPYNHQHKYFFLIGPPLLPLFYQVYIIFYVIQRKKWV.....DLAWMIFVYRFFLTYVP	
Δ6 FADS2	252	KKLKYL PYNHQHEYFFLIGPPLLIPMYFYQYQIIMTMI VHKNWV.....DLAWAISYYIRFFITYIP	
Δ? FADS3	253	KRRYLPYNHQOHL YFFLIGPPLLTLNFEVENLAYMLVCMQWA.....DILLWAASFYARFFLSYIP	
Δ6 Mus	252	KKLKYL PYNHQHEYFFLIGPPLLIPMYFYQYQIIMTMI SRRDWV.....DLAWAISYYMRFFYTYIP	
Δ6 Rattus	252	KKLKYL PYNHQHEYFFLIGPPLLIPMYFYQYQIIMTMI RRRDWV.....DLAWAISYYARFFYTYIP	
Δ6 C.elegans	260	EKAILKIVPYOHL YFTAMLPMIRFSWTGOSVQWVFKENQMEYKVYQRNAFWQCATIVGHWANVFYQLFL	
Δ5 C.elegans	261	DSWVMTLFRWQHVTFMLEFLRLSWLQSLIFVSVQMPHTYMDYRNTAYEIQVGLSLHWAWSLQLYF	
Δ5 FADS1	313	LLGLKAFGLGFEFIVRFLESNWFVWVTQMNHTEMH...IDHDRNMDWVSTQLQATCNVHKSAFNDWFSGH	
Δ6 FADS2	313	FYGILGALFENFIRFLESHWFVWVTQMNHIVME...IDQRAYRDFWSSQLTATCNVEQSFNDWFSGH	
Δ? FADS3	314	FYGVCGVLLFFVAVRVLESHWFVWVTQMNHPEKE...IGHEKHRDWVSSQLAATCNVEPSLFTNWFSGH	
Δ6 Mus	313	FYGILGALFENFIRFLESHWFVWVTQMNHIVME...IDL DHYRDFWSSQLAATCNVEQSFNDWFSGH	
Δ6 Rattus	313	FYGILGALFENFIRFLESHWFVWVTQMNHIVME...IDL DHYRDFWSSQLAATCNVEQSFNDWFSGH	
Δ6 C.elegans	329	LPTWPLRVAFIISQMGGLLIAHVTFNHNNSVDKYPANSRI LNNEAALQILTRNMTSPFIDWLWGG	
Δ5 C.elegans	330	LPDWSTRIMFFLVS.LVGGFLLSHVVFNFHYSVEKFALSSNIMSNYACLOLMTTRNMRPGRFIDWLWGG	
Δ5 FADS1	379	LNFQIEHHLFPMPRHNYHKA PLVQSLCAKHGIEYQSKPLL SAFADIIHSLKESGQLWLDAYLHQ	
Δ6 FADS2	379	LNFQIEHHLFPMPRHNLHKIAPLVKSLCAKHGIEYQEKPLL RALDII RSLKKSGLWLDAYLHK	
Δ? FADS3	380	LNFQIEHHLFPMPRHNYSRVAPLVKSLCAKHGLSYEVKPELITALVDIVRSLKKSGLWLDAYLHQ	
Δ6 Mus	379	LNFQIEHHLFPMPRHNLHKIAPLVKSLCAKHGIEYQEKPLL RALDII VSSLKKSGLWLDAYLHK	
Δ6 Rattus	379	LNFQIEHHLFPMPRHNLHKIAPLVKSLCAKHGIEYQEKPLL RALDII VSSLKKSGLWLDAYLHK	
Δ6 C.elegans	398	LNYQIEHHLFPMPRNLNACVKYVKEWCKENNLPLYLVDDYFDGYAMNLQOLKNMAEHIQAKAA	
Δ5 C.elegans	399	LNYQIEHHLFPMPRHNLNTVPLVKEFAAANGLPYVDDYFTGFWLEIEQFENIA.LNVAAKLTKKIA	

**Abb. 20** Proteinsequenz-'Alignment' der putativen Translationsprodukte von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* sowie der  $\Delta 6$ -Desaturasen von Maus (AF126798), Ratte (AB021980) und *C. elegans* (AF031477) und der  $\Delta 5$ -Desaturase von *C. elegans* (AF078796). Außerdem in die Analyse einbezogen ist die Sequenz vom humanen Cytochrom b5 (M22865). Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Aminosäuren ähnlicher chemischer Eigenschaft/Struktur erscheinen grau unterlegt. Punkte kennzeichnen die vom 'Alignment'-Programm MultAlign (CORPET, 1988) eingefügten Lücken zur Darstellung maximaler Sequenzübereinstimmung. Das Programm ist 'online' aufrufbar über Internetadresse <http://www.toulouse.inra.fr/multalign.html>. Ebenfalls markiert sind die Konsensus-Positionen von vier potentiellen Transmembrandomänen (graue Balken), die Lage des für Cytochrom b5 und Cytochrom b5-Fusionsproteine charakteristischen, invarianten HPPG-Motivs (schraffierter, grauer Balken) und der drei weitgehend konservierten Histidin-Motive HDxGH, HFQHH und QIEHH (schwarze Balken).

### 4.3. Charakterisierung weiterer Gene aus der Region 11q12-q13.1

Neben *VMD2* und den für die drei Fettsäuredesaturasen kodierenden Genen *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* liegen in der direkten chromosomalen Nachbarschaft einige weitere Gene, die in diesem Abschnitt beschrieben werden sollen. Dies sind die beiden bereits länger bekannten Gene *FTH1* und *FEN1* sowie die vier neuen Gene *RAB3IL1*, *C11orf9*, *C11orf10* und *C11orf11* (vgl. Abb. 9). Von diesen wurde *C11orf9* aufgrund der abgeschlossenen genetischen Analyse inzwischen von uns publiziert (Stöhr *et al.*, 2000).

#### 4.3.1. *FTH1*

*FTH1* kodiert die 'ferritin heavy chain 1', eine 183 Aminosäuren große Untereinheit des eisenspeichernden Ferritins. BOYD *et al.* gelang bereits 1984 die Klonierung der entsprechenden cDNA. Wenig später klärten HENTZE *et al.* (1986) die genomische Struktur von *FTH1* auf. Das Gen besteht aus vier Exons (Tab. 8) und liegt, wie sich nach Veröffentlichung der genomischen Sequenz von PAC-Klon 466A11 zeigte, in unmittelbarer Nachbarschaft zu *VMD2* in 'tail to tail'-Orientierung. 1994 klonierten DHAR *et al.* eine neue 'full length'-cDNA von *FTH1*, diesmal mit einem alternativen Polyadenylierungs-Signal 273 bp strangabwärts des ersten. Berücksichtigt man dieses spätere Signal, so überlappen die 3'- untranslatierten Bereiche von *FTH1* und *VMD2* um 146 bp.

**Tab. 8) Exon-Intron-Grenzen von *FTH1***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	321		..GTCCATGgtgagcg..	1797
2	147	..ctttcagTCTTACT..	..TATCAAGgtgaaca..	256
3	126	..cattcagAAACCAG..	..CCCCCATgtgagta..	95
4 <sup>2</sup>	312,590	..tttgcagTTGTGTG..		

<sup>1</sup> Die angegebene Exon-Größe basiert auf der veröffentlichten cDNA von *FTH1* (GenBank-Nummer: L20941) und enthält einen 5'-UTR von 207 bp.

<sup>2</sup> Das Exon enthält einen 3'-UTR von 150 bzw. 428 bp, in Abhängigkeit vom benutzten Polyadenylierungs-Signal.

### 4.3.2. *FEN1*

*FEN1* wurde 1995 kloniert und publiziert (HIRAOKA *et al.*). Das Gen kodiert die 380 Aminosäuren große 'flap endonuclease 1', ein strukturspezifisches, von Archaeobakterien bis zum Menschen konserviertes Enzym, das u.a. an der DNA-Replikation beteiligt ist (GREENE *et al.*, 1999). Aufgrund dieser elementaren Funktion wurde *FEN1* zu keiner Zeit als mögliches Kandidatengen für *VMD2* in Erwägung gezogen. Mit der Veröffentlichung der genomischen Sequenz von BAC-Klon CIT-HSP-311e8 ist die Genstruktur von *FEN1* erkennbar geworden. Das Gen besteht demnach lediglich aus zwei Exons, wobei Exon 1 nicht translatiert wird.

**Tab. 9) Exon-Intron-Grenzen von *FEN1***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	125		..AGGCCAGgtgagac..	2312
2 <sup>2</sup>	1885	..tttttagTCATCCC..		

<sup>1</sup> Die angegebene Exon-Größe basiert auf dem am weitesten 5'-gelegenen EST EST65162 (AA356591). Das Exon wird nicht translatiert, repräsentiert also ausschließlich 5'-UTR.

<sup>2</sup> Das Exon enthält einen 5'-UTR von 21 bp und einen 3'-UTR von 724 bp.

Genomisch erstreckt sich *FEN1* über 4.3 kbp und liegt eng benachbart zum 294 bp proximal gelegenen Gen *C11orf10* auf dem Gegenstrang und dem distal, in einer Distanz von knapp 2.4 kbp folgendem *FADS1* (ebenfalls auf dem Gegenstrang gelegen; vgl. Abb. 9).

### 4.3.3. *RAB3IL1*

Bei der Analyse der genomischen Sequenz von PAC-Klon dJ466A11 wurde durch die Anwendung der 'gene prediction'-Programme GRAIL und FGENES, in Kombination mit einer EST-Kartierung, ein Gen erkennbar, dessen putatives Translationsprodukt eine signifikante Sequenzidentität von 59% zu Rabin3 ('Rab3-interacting protein 3') von *Rattus norvegicus* zeigt. In Absprache mit dem 'Human Gene Nomenclature Committee' wurde das Gen daher als 'Rab3A interacting protein-like 1' (*RAB3IL1*) bezeichnet.

Nach der Identifizierung von *VMD2* wurde *RAB3IL1* von uns nicht weiter charakterisiert. Dennoch soll das Gen hier kurz vorgestellt werden. Die chromosomale Lokalisation von *RAB3IL1* ist in Abbildung 9 gezeigt. Von neun der vorhersagbaren Exons sind lediglich die letzten vier, incl. einem 3'-UTR von 985 bp und abschließendem Polyadenylierungs-Signal durch existierende cDNA-Klone bestätigt (z.B. durch yd15e03.r1, oh49g03.s1). Wie ein Sequenzvergleich zu Rabin3 zeigt, dürfen aufgrund des hypothetischen Translationsprodukts von *RAB3IL1* aber auch die vorderen fünf Exons als real angenommen werden dürfen (Abb. 21). Bei dem Abgleich wird deutlich, dass die 5'-Sequenz der Nukleinsäure von *RAB3IL1* noch nicht vollständig vorhergesagt ist, sondern zusätzliche Exons strangaufwärts vermutet werden können. Das derzeit ableitbare Translationsprodukt besteht aus 337 Aminosäuren und ist damit noch deutlich kleiner als Rabin3 (460 Aminosäuren).

Die Spleiß-Struktur von *RAB3IL1*, soweit sie bekannt ist bzw. angenommen werden darf, ist in Tabelle 10 angeführt.

Rabin3	1	MANDPLEGFHEVNLASPTSPDLLGVCDPGTQEQTTSPSVIYRPHPSTLCSATIQANALNL
Rabin3	61	SDLPTQPVYSSPRHLNCAEISNISIHVPEPASSVASEVAAGLTRFTSRKDCSNAERFLQ
Rabin3	121	GATVTEASAGND DIFGLSTD SLSRLRSPSVLEVREKGYERLKEELAKAQRELKCLKDEECE
RAB3IL1 Exon1		E E A Q G Q E G P A A A Q L D V L . R L R S S S . M E I R E K G S E F L K E E L H R A Q K
RAB3IL1 Exon2		ELKCLKDEECE
Rabin3	181	RLSKVRDQLGQELEELTASLFEEAHKVMREANVKQATAEKQLKEAQGKIDVLOAEVAALK
RAB3IL1 Exon2		RLSKVREQLGQELEELTASLFE
RAB3IL1 Exon3		E A H K M V R E A N M K Q A A S E K Q L K E A R G K
RAB3IL1 Exon4		I D M L Q A E V T A L K
Rabin3	241	TLVLSSSP T S E T Q E P L A D G K T P F K G G . . . H T R N K S T S S A M S G S H Q D F S A I Q A T V K D C R E
RAB3IL1 Exon4		T L V I T S T P A S P N R E L H P Q L L S P T K A G P R K G H S R H K S T S S T L C P A V C P . A G H T L T P D R E G
Rabin3	297	ADLSLYNEFRSWKDEPTMDR TCPFLDKIYQEDIFPCLTF AKSEI ASAVLEAVENNTLSIE
RAB3IL1 Exon4		K E
RAB3IL1 Exon5		V D T I L F A E F Q A W R E S P T L D K T C P F L E R V Y R E D V G P C L D F T M Q E
RAB3IL1 Exon6		I S V L V R A A V E D N T L T I E
Rabin3	357	PVGLQPIRFVKASAVECGGPKK CALTGQSKPCKHRIKLGDSSSYYIISPVCRYRITSVCN
RAB3IL1 Exon6		P V A S Q T L P T V K V A E V D C S S T
RAB3IL1 Exon7		T C A L S G L T R T C R H R I R L G D S K S H Y Y I S P S S R A R
RAB3IL1 Exon8		I T A V C N
Rabin3	417	FFT Y I R Y I Q Q G L V K Q Q D V D Q M F W E V M Q L R K E M S L A K L G Y F K E E L *
RAB3IL1 Exon8		F F T Y I R Y I Q Q G L V R Q D
RAB3IL1 Exon9		E P M F W E I M R L R K E M S L A K L G F F P Q E A *

**Abb. 21** Proteinsequenz-'Alignment' von Rabin3 und dem exonweise dargestellten, putativen Translationsprodukt von *RAB3IL1*. Angegeben sind die abgeleiteten Proteinsequenzen aller ermittelten bzw. vorhersagbaren exonischen Sequenzen des Gens. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Aminosäuren ähnlicher chemischer Eigenschaft/Struktur erscheinen grau unterlegt. Die 5'-Organisation einschließlich der Position des potentiellen Translationsstartkodons von *RAB3IL1* ist noch unbekannt. Dies bedeutet, dass das hier angegebene Exon 1 nicht das wahre erste Exon des Gens repräsentiert.

**Tab. 10) Exon-Intron-Grenzen von *RAB3IL1***

Exon	Größe (bp)	3' Spleiß-Akzeptor	5' Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	131		..GCAGAAGgtgggtg..	393
2	96	..cctccagGAGCTGA..	..GTTTGAGgtacacc..	94
3	78	..ttcctagGAAGCTC..	..GGGCAAGgtgagggc..	708
4	219	..catgcagATCGACA..	..CAAGGAGgtgagggg..	1582
5	129	..cccacagGTGGACA..	..GCAGGAGgtgagggc..	95
6	113	..gccacagCTCTCGG..	..GCACCAAgtaagct..	2004
7	100	..cccctagCACATGT..	..GGCCAGGgtgagtc..	3061
8	67	..cccacagATCACCG..	..CAGGACGgtgagcg..	953
9 <sup>2</sup>	1043	..cctgcagCAGAGCC..		

<sup>1</sup> Die Größe des Exons basiert auf der am weitesten 5'-gelegenen, als kodierend vorhergesagten Sequenz. Es handelt sich nicht um das wahre erste Exon von *RAB3IL1*, da die 5'-Region des Gens noch unbekannt ist.

<sup>2</sup> Das Exon enthält einen 3'-UTR von 276 bp.

#### 4.3.4. *C11orf9*

Bei *C11orf9* handelt es sich um ein Gen, das über die direkte cDNA-Selektion in der *VMD2*-Kandidatenregion detektiert und laborintern als Transkriptionseinheit *TU10* geführt wurde (Stöhr *et al.*, 1998<sup>b</sup>). Inzwischen ist das Gen komplett charakterisiert und publiziert (STÖHR *et al.*, 2000). Die 'Northern blot'-Analyse von *C11orf9* zeigte eine abundante Expression in der RPE-Zelllinie ARPE-19, wodurch das Gen seinerzeit als guter Kandidat für *VMD2* galt. Da die 'full length'-Klonierung der cDNA, die genomische Charakterisierung und die Mutationsanalyse vornehmlich von Dr. HEIDI STÖHR durchgeführt wurden, soll *C11orf9* in dieser Arbeit nur in sehr komprimierter Form vorgestellt werden.

Die cDNA des Gens hat incl. 38 bp 5'-UTR und 2376 bp 3'-UTR eine Länge von 5746 bp und kodiert für ein 120 kDa-Protein aus 1111 Aminosäuren. Es lassen sich zwei Membrandomänen in der C-terminalen Hälfte des Proteins sowie zwei prolinreiche Regionen mit den Motiven P<sub>5</sub>X<sub>3</sub>PXP<sub>9</sub> und PXP<sub>2</sub>XP<sub>2</sub>X<sub>2</sub>PX<sub>2</sub>PXP identifizieren. Letztere werden als Strukturen diskutiert, die in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind (WILLIAMSON, 1994). Weiteres ist zur Funktion des Translationsprodukts von *C11orf9* derzeit nicht bekannt.

Genomisch erstreckt sich das Gen über 33.1 kbp und ist in 26 Exons gespleißt (Tab. 11). Die chromosomale Lokalisation von *C11orf9* ist in Abbildung 9 gezeigt. Das Gen liegt in nur 613 bp Distanz proximal zu *C11orf10* ('tail to tail').

**Tab. 11) Exon-Intron-Grenzen von *C11orf9***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	57		..CCAGCAGgtaaccg..	10180
2	88	..cctgcagGCCACGA..	..CCGACCTgtgagtg..	245
3	264	..cccgcagCTGCTTC..	..CCCCAGGgtgagta..	3038
4	62	..ctcgcagCACACTG..	..GTGAATGgtgagtc..	923
5	280	..cctgcagAGCCCCA..	..GAGCTGAgtaagac..	974
6	251	..tccccagGCTCCCT..	..TCCCCAGgtacatg..	78
7	124	..cctccagGCCTCCT..	..AGGAGCTgtgagtg..	2012
8	196	..ccccagGCCCATG..	..AGTGAAGgcaagtt..	1893
9	77	..cccacagCTGGAGG..	..CGGTACGgtgagtg..	189
10	111	..tctgcagGGTCAAT..	..ACCAGAGgtgagca..	354
11	91	..gtcccagGTACTTC..	..TGTGCGGgtgaggg..	386
12	201	..gcggtagGCCTCCA..	..GCAGGAGgtggga..	269
13	112	..cccgcagGTGGACA..	..GAGACAGgtaggg..	534
14	110	..ccccagGTGTCAT..	..GAACAAGgtctgtg..	773
15	161	..atggcagGAGCGCA..	..CCTTCAGgtagggg..	74
16	73	..gctgcagCCATGCA..	..CAGCAAGgtagggg..	271
17	89	..tcctcagTCATCGT..	..CCTTCAGgtgactt..	291
18	69	..gctccagCGTGGTG..	..CTGATGGgtaggtt..	666
19	89	..tccccagCAGGTCC..	..CTGCTGGgtgctgtg..	92
20	192	..tcctcagTGACCAC..	..CGCTCAGgtaaggc..	243
21	252	..tccacagGCCCCAG..	..CAGTCAGgtacttg..	1688
22	88	..cttgcagAGCCAGT..	..CCTGCAGgtgggct..	250
23	75	..cctgcagGCCTGGG..	..AGATGAAgtgagtg..	354
24	106	..tctacagCTCCTCC..	..CACCCAGgtaggtg..	1414
25	75	..tctccagGGCACCT..	..ACTGCTGgtgagca..	188
26 <sup>2</sup>	2431	..caccagGGTCAGG..		

<sup>1</sup> Die Größe des Exons basiert auf dem Ergebnis einer 5'-RACE-Analyse und enthält einen 5'-UTR von 38 bp.

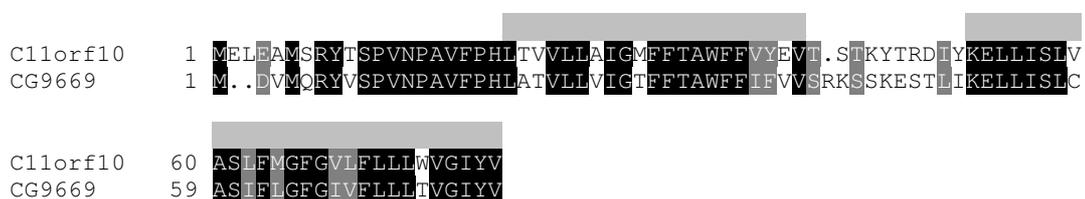
<sup>2</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 2350 bp.

### 4.3.5. *C11orf10*

*C11orf10* ist die vorläufige Bezeichnung eines kleinen Gens unbekannter Funktion, dessen cDNA eine Länge von nur 406 bp hat. In der dbEST-Datenbank ist *C11orf10* durch mehr als 50 humane EST-Klone aus diversen cDNA-Banken repräsentiert (z.B. durch EST49947, yu03d12.r1, om08c01.s1), von denen die meisten die komplette kodierende Sequenz enthalten. Die vier potentiellen Translationsstart-Kodons von *C11orf10* liegen allesamt in einem einzigen offenen Leserahmen von 252 bp. Ein Vergleich der jeweiligen Kontextsequenz mit der von KOZAK (1996) ermittelten Konsensus-Sequenz zeigt, dass vermutlich das erste ATG-Motiv das Translationsstart-Kodon repräsentiert:

GCC <u>ACCATG</u> G	Kozak-Konsensus mit den hochkonservierten Positionen <b>A</b> <sup>-3</sup> und <b>G</b> <sup>+4</sup>
GGC <u>AAAATG</u> G	16 bp strangabwärts im ORF von <i>C11orf10</i>
GAGGCC <u>ATGA</u>	31 bp strangabwärts im ORF von <i>C11orf10</i>
ATTGGC <u>ATGT</u>	103 bp strangabwärts im ORF von <i>C11orf10</i>
CTCTTC <u>ATGG</u>	205 bp strangabwärts im ORF von <i>C11orf10</i>

Entsprechend besteht das wahrscheinlichste und gleichzeitig längstmögliche Translationsprodukt von *C11orf10* aus 79 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von lediglich 9 kDa. Inzwischen wurde durch das Projekt zur Sequenzierung des *Drosophila melanogaster*-Genoms (ADAMS *et al.*, 2000) ein zu *C11orf10* homologes Gen mit der Bezeichnung *CG9669* bekannt (GenBank-Zugangsnummer AAF49405), welches ein putatives Protein von 78 Aminosäuren kodiert. Für beide Proteine lassen sich je zwei Transmembrandomänen vorhersagen (Abb. 22). Trotz großer evolutionärer Distanz zwischen Mensch und Fliege ist die Sequenzidentität beider Translationsprodukte mit 64% recht hoch, so dass es sich bei *CG9669* wahrscheinlich um das zu *C11orf10* orthologe Gen in *Drosophila* handelt, zumal die vorgenommenen Datenbankrecherchen nicht auf die Existenz weiterer sequenzähnlicher Gene in beiden Spezies hindeuten.

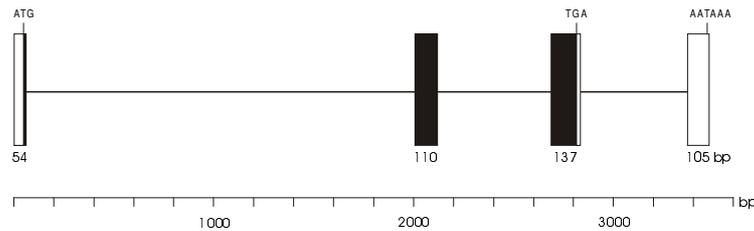


**Abb. 22** Proteinsequenz-'Alignment' von *C11orf10* und dem putativen Translationsprodukt von *CG9669*, dem vermutlich orthologen Gen in *Drosophila melanogaster*. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Aminosäuren ähnlicher chemischer Eigenschaft/Struktur erscheinen grau unterlegt. Hervorgehoben sind die Konsensus-Positionen von zwei potentiellen Transmembrandomänen (graue Balken).

Genomisch überspannt *C11orf10* 3479 bp und ist nur 613 bp distal, in 'tail to tail'-Orientierung zu *C11orf9* lokalisiert. Proximal zu *C11orf10* liegt *FEN1* in 'head to head'-Orientierung und einer noch geringeren Distanz von nur 294 bp. *C11orf10* besteht aus vier Exons, wobei das dritte Spleiß-

Ereignis interessanterweise erst 13 bp strangabwärts des Translationsstopp-Kodons TGA stattfindet, also bereits in der 3'-untranslatierten Region. (Abb. 23 und Tab. 12). Spleiß-Ereignisse im 3'-UTR von Genen wurden bisher nur selten beschrieben (z.B. von ANDERSON *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 1999).

Zu erwähnen sei noch, dass mittlerweile YE *et al.* (1999) die cDNA-Sequenz HSPC005 in der GenBank-Datenbank veröffentlichten (GenBank-Nummer AAD20967), welche mit der cDNA-Sequenz von *C11orf10* identisch ist.



**Abb. 23** Genomische Organisation von *C11orf10*. Die vier Exons des Gens sind als vertikale Balken dargestellt. Schwarze Flächen repräsentieren hierbei die kodierenden Abschnitte, während untranslatierte Regionen weiß gehalten sind. Auffällig ist das Spleiß-Ereignis im 3'-UTR von *C11orf10*.

**Tab. 12) Exon-Intron-Grenzen von *C11orf10***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	54		..CAAATGgtgagag..	1953
2	110	..cctctagGAGCTCG..	..TCTTCGTgtatcct..	571
3 <sup>2</sup>	137	..tgcccagTTACGAG..	..CCCAAGGgtaagag..	549
4 <sup>3</sup>	105	..cttttagGTAACAA..		

<sup>1</sup> Die angegebene Exon-Größe basiert auf der am weitesten 5'-gelegenen cDNA EST49947 (AA344058) und enthält eine 5'-UTR-Sequenz von 51 bp.

<sup>2</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 13 bp.

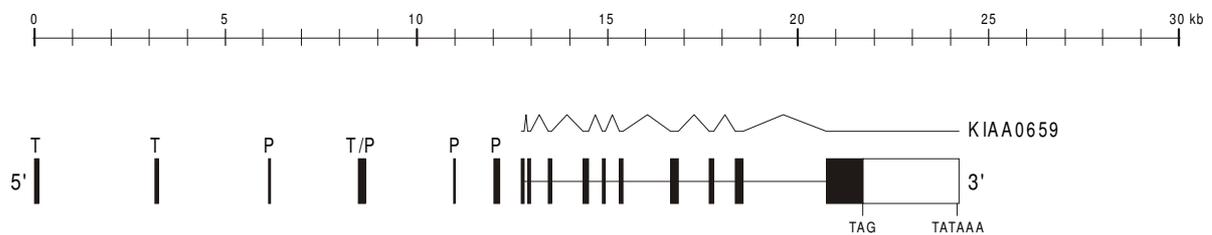
<sup>3</sup> Das Exon besteht komplett aus 3'-UTR-Sequenz.

#### 4.3.6. *C11orf11*

*C11orf11* ist die vorläufige Bezeichnung für ein Gen, das wie *RAB3IL1* im 5'-Bereich noch unvollständig analysiert ist. Basierend auf der genomischen Sequenz von BAC-Klon CIT-HSP 311e8 konnte die Genstruktur von *C11orf11* zunächst durch die 'gene prediction'-Programme GRAIL und FGENES partiell vorhergesagt werden. Wenig später übermittelten ISHIKAWA *et al.* (1998) die cDNA-Sequenz KIAA0659 zur GenBank-Datenbank, die mit einer Länge von 4459 bp die letzten zehn Exons von *C11orf11* erfasst (Abb. 24) aber kein potentielles Translationsstart-Signal enthält.

Im Gegensatz zur unvollständigen 5'-Region wird das 3'-Ende des Gens durch sechs unabhängige menschliche EST-Klone bestätigt. Unklar bleibt dabei lediglich die genaue Position des Polyadenylierungs-Signals. Statt der üblichen Nukleotidabfolge AATAAA, dient offenbar das Motiv

TATAAA als Polyadenylierungs-Signal, wovon am Ende der 3'-untranslatierten Region, im Abstand von 49 bp zueinander, gleich zwei vorliegen. Während das erste Signal z.B. das Ende der EST-Klone os53a04.s1 und yg76g08.s1 markiert, wird das zweite u.a. durch die entsprechend längeren cDNA-Sequenzen von KIAA0659 und ow84e03.s1 bestätigt. Einige EST-Klone aus Maus und Ratte zeigen eine eindeutige Sequenzähnlichkeit zum 3'-UTR von *C11orf11* und enden ebenfalls mit dem Polyadenylierungs-Signal TATAAA (z.B. ub63h11.x1). Interessanterweise hat sich die Nukleotidabfolge TATAAA bei *in vitro*-Experimenten als relativ ineffektives Polyadenylierungs-Signal herausgestellt, mit nur 17% Aktivität gegenüber AATAAA (SHEETS *et al.*, 1990). Die Genstruktur von *C11orf11* ist, soweit durch die cDNA KIAA0659 bestätigt, in Tabelle 13 zusammengefasst.



**Abb. 24** Genomische Organisation von *C11orf11*. Gezeigt ist die Spleiß-Struktur des partiellen cDNA-Klons KIAA0659 (ISHIKAWA *et al.*, 1998). Schwarze Flächen repräsentieren kodierende exonische Sequenzen (durch eine horizontale Linie verbunden) bzw. potentielle exonische Sequenzen (proportional angeordnet im 5'-Bereich). Durch 'exon prediction' vorhergesagte Exons sind hierbei mit einem P gekennzeichnet, während Exons, die durch ein 'exon trapping'-Experiment von Cooper *et al.* (1998) detektiert wurden, mit einem T markiert sind. Die 3'- untranslatierte Region von *C11orf11* ist durch eine weiße Fläche symbolisiert.

**Tab. 13) Exon-Intron-Grenzen von *C11orf11***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	29		..CCCCAAGgtacgct..	94
2	78	..cccccaagGATGCC..	..CCACAAGgtaaccc..	453
3	81	..caccagGGTATGG..	..AGACCTGgtgagga..	831
4	143	..tctccagGGCCGCG..	..TGCTGAGgtgagcc..	362
5	69	..cttgcagTGAGGAT..	..TCCCCAGgtgagtc..	379
6	73	..tccccagGATTGGC..	..GCCCAAagtgagcc..	1257
7	197	..cgcgcagTGGCGGA..	..AGTGCTGgtaggtt..	801
8	130	..ctctcagCTGCTGT..	..CAACAAGgtgaggc..	569
9	188	..tcctcagGTGCTGG..	..GCGTCAGgtgagcc..	2182
10 <sup>2</sup>	3455	..tctgcagGAGCAAG..		

<sup>1</sup> Die angegebene Exon-Größe basiert auf der am weitesten 5'-gelegenen cDNA KIAA0659 (AB014559), repräsentiert aber aufgrund des fehlenden Translationsstart-Signals nicht das 5'-Ende von *C11orf11*.

<sup>2</sup> Das Exon enthält einen 3'-UTR von 2451 bzw. 2500 bp, in Abhängigkeit vom benutzten Polyadenylierungs-Signal.

Das unvollständige Translationsprodukt von *C11orf11*/KIAA0659 besteht derzeit aus 647 Aminosäuren. Nicht weit strangaufwärts vom genomischen 5'-Ende des Klons KIAA0659 lassen sich mittels GRAIL und FGENES vier exonische Sequenzen vorhersagen. Zudem fanden COOPER *et al.* 1998 durch 'exon trapping' drei kodierende Sequenzen, bezeichnet als 2A4, 8B10 und 8B4, in direkter genomischer Nachbarschaft (Abb. 24). Es ist wahrscheinlich, dass zumindest ein oder zwei

dieser potentiellen Exons *C11orf11* zuzuordnen sind, da die ableitbaren Translationsprodukte z.T. Sequenzähnlichkeiten zu Di- und Triacylglycerol-Lipasen bzw. entsprechenden 'precursor'-Proteinen diverser Organismen zeigen (z.B. von *Aspergillus oryzae*, *Fusarium heterosporum*, und *Penicillium camemberti*), wie man sie auch für das Translationsprodukt von KIAA0659 findet. Die entsprechenden Sequenzidentitäten sind hierbei jedoch mit 25-35% nicht allzu hoch und betreffen zudem nur recht kleine Abschnitte des Proteins, so dass sich eine funktionelle Verwandtschaft von *C11orf11* und den genannten Lipasen nicht zweifelsfrei ableiten lässt.

Weitere Analysen des KIAA0659-Translationsprodukts zeigten, dass *C11orf11* definitiv ein membranassoziiertes Protein kodieren dürfte, da sich an den Peptidpositionen 205-225 und 234-254 zwei hochwahrscheinliche Transmembrandomänen vorhersagen lassen.

#### **4.4. Charakterisierung der *VMD2*-Genfamilie**

Verwendet man die cDNA-Sequenz von *VMD2* für eine Abfrage der dbEST-Datenbank, so findet man außer den *VMD2*-spezifischen EST-Klonen auch solche, die eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, aber eindeutig nicht *VMD2* zuzuordnen sind. Zum Zeitpunkt der letzten Abfrage, im März 2000, waren drei distinkte *VMD2*-verwandte Gene, provisorisch *TU51*, *TU52* und *TU53* benannt, durch EST-Klone in der Datenbank repräsentiert. Aufgrund der erforderlichen, vergleichsweise unkonventionellen Vorgehensweise zur genetischen Charakterisierung der drei Gene, werden die cDNA-Klonierung und die Aufklärung der genomischen Struktur für jedes Gen im Kontext beschrieben.

##### **4.4.1. *TU51***

###### **4.4.1.1. cDNA-Klonierung und genomische Struktur von *TU51***

Zu Beginn der Genanalyse von *TU51* standen lediglich die beiden überlappenden EST-Sequenzen nk99g10.s1 (isoliert aus Kolon) und af06b11.s1 (Testis) aus der dbEST-Datenbank zur Verfügung, welche eine Sequenzidentität von etwa 60% zu den Exons 4-7 von *VMD2* aufweisen. Da beide Klone jeweils nur von einer Seite her sequenziert waren, wurden die entsprechenden IMAGE-Klone 1028994 und 1030845 beim RZPD ('Resource Center / Primary Database') in Berlin zur Nachsequenzierung bestellt. Von den gelieferten Klonen stellte sich lediglich Klon 1030845 als korrekt und damit geeignet heraus, die cDNA-Sequenz von *TU51* im 3'-Bereich zu erweitern. Wie sich dabei zeigte, geht die cDNA von *TU51* dort, wo *VMD2* von Exon 9 auf Exon 10 gespleißt wird, in eine 3'-untranslatierte Region über. Die enthaltene potentielle Erkennungssequenz für die Polyadenylierung, AATAAA, liegt dabei inmitten einer repetitiven Sequenz der Klasse AluJo/FLAM SINE Alu. Im 5'-Bereich endete die zu diesem Zeitpunkt bekannte cDNA-Sequenz von *TU51* noch etwa in der Mitte des paralogen Exons 4 von *VMD2*, war also unvollständig.

Um einen ersten Anhaltspunkt bezüglich der vollständigen Transkriptlänge und des Expressionsprofils von *TU51* zu erhalten, wurde mit den Oligonukleotidprimern TU51-F2 (5'-TGG GGC AGG GCT TAT GGC TC-3') und TU51-R (5'-TTT GGA ATC ACC ACT GAC CGG-3') ein 223 bp großer Abschnitt der 3'-UTR-Sequenz von *TU51* aus genomischer DNA amplifiziert, mit  $\alpha^{32}\text{P}$  markiert und zur 'Northern blot'-Hybridisierung verwendet. Dabei konnte jedoch für keines der untersuchten Gewebe (RPE, Retina, Herz, Lunge, Cerebellum, Leber und Uterus) eine Expression von *TU51* nachgewiesen werden. Leider stand kein Gewebe aus menschlichem Kolon oder Testis, also den beiden Geweben, aus denen die einzigen *TU51*-spezifischen EST-Klone nk99g10.s1 und af06b11.s1 isoliert wurden, zur Verfügung. Ebenfalls unternommene 5'-RACE- und 3'-RACE-Experimente scheiterten fast zwangsläufig an der offenbar geringen oder zu gewebsspezifischen Expression von *TU51*.

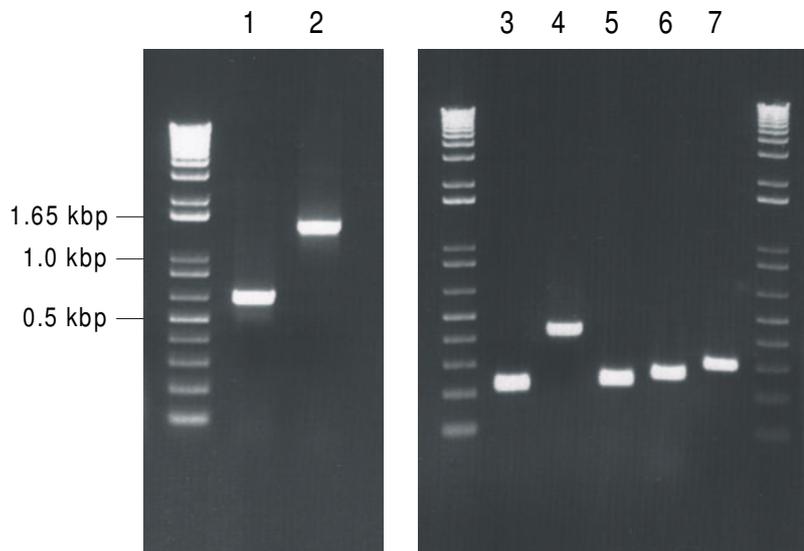
Um das Gen dennoch weiter zu charakterisieren, wurde eine Strategie auf Basis der genomischen Sequenz gewählt. Mit PAC dJ142H8 stand zu diesem Zeitpunkt bereits ein geeigneter Klon zur Verfügung (vgl. 4.4.4.). Zunächst wurde dJ142H8 mit *EcoRI* verdaut und in pBluescript<sup>®</sup> subkloniert. Die ausplattierten Klone wurden anschließend mit dem  $\gamma^{32}\text{P}$ -markiertem Oligonukleotid TU51-R3 (5'-ATG AGT GTG CGC CGG TAG-3') hybridisiert, dessen Sequenz am äußersten 5'-Ende der zu diesem Zeitpunkt bekannten cDNA-Sequenz von *TU51* liegt. Von mehreren positiven Klonen wurde einer, folgend E2a genannt, ausgehend von TU51-R3 strangaufwärts sequenziert und gab so die noch fehlende 5'-Hälfte der zum Exon 4 von *VMD2* paralogen Sequenz von *TU51* preis.

Aufgrund der 'Insert'-Größe von E2a (~7.5 kbp) war nicht unwahrscheinlich, dass auch die zu *VMD2* paralogen Exons 1-3 im Klon enthalten sind. Um E2a nicht einfach auf Verdacht hin zu sequenzieren, wurde der Klon mit *Sau3AI* verdaut, mittels 'Southern blot' auf eine Nylonmembran transferiert und separat mit den Exons 2 und 3 von *VMD2* als Nukleinsäuresonden hybridisiert. Aufgrund einer „spezifischen“ Hybridisierung beider Sonden wurden die *Sau3AI*-Fragmente von E2a anschließend in die *BamHI*-Klonierungsstelle von pBluescript<sup>®</sup> subkloniert. Das nachfolgende 'Screening' der ausplattierten Subklone resultierte in der Identifizierung und Sequenzierung zweier genomischer Sequenzen ('Inserts' von 826 bp und etwa 950 bp), von denen eine die zu Exon 2 von *VMD2* paraloge Sequenz enthielt, während die andere die zu Exon 3 paraloge Sequenz trug. Nach einer zum nichtkodierenden Exon 1 von *VMD2* paralogen Sequenz wurde nicht gesucht, da anzunehmen war, dass diese, wenn sie existiert, ebenfalls nichtkodierend ist und daher keine Sequenzähnlichkeit aufweist. Somit entspricht das momentane Exon 1 von *TU51* also dem sequenzparalogen Exon 2 von *VMD2*. Es enthält das potentielle Translationsstart-Signal ATG im Sequenzkontext GCCACGATGA, welcher gut mit der KOZAK-Konsensus-Sequenz übereinstimmt. Die exonische Sequenz strangaufwärts des ATG-Translationsstart-Signales von *TU51* zeigt keine Paralogie mehr zu der von *VMD2*, so dass die Länge und Organisation des 5'-UTR von *TU51* zur Zeit noch unbekannt ist.

Nach Abschluß der beschriebenen Klonierungsarbeiten wurde Ende 1999 in der GenBank-Datenbank sowohl eine erste 'high-throughput genomic sequence' der entsprechenden chromosomalen Region von *TU51* (GenBank-Nummer: AC18761) als auch die cDNA-Sequenz FLJ20132 (AK000139)



cDNA FLJ20132 mit der entsprechenden genomischen Sequenz von Klon AC18761 erkennbar und beträgt 1355 bp. Die Exon-Intron-Struktur von *TU51* ist in Tabelle 14 gezeigt.



**Abb. 26** Amplifikation der ersten sieben Intron-Sequenzen von *TU51* mit Hilfe exonischer Oligonukleotidprimer. Die Zahlen kennzeichnen die jeweilige Intron-Nummer. Die zur gezeigten PCR-Analyse und der späteren Sequenzierung verwendeten Oligonukleotidprimer sind in Tabelle 2 angegeben.

**Tab. 14) Exon-Intron-Grenzen von *TU51***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	152		..CCTACCGgtgagggc..	515
2	95	..cccgcagCTTTGTG..	..GTGCTTGgtgcggt..	1197
3	234	..gctgcagGCTTTTA..	..GAGGCTGgtgagta..	91
4	155	..cctccagGGTTTAT..	..GCTCGAGgtgggccc..	347
5	78	..ccccagGAGCTGA..	..CACGCAGgtaaccc..	158
6	153	..tgcccagGTGGTGA..	..GCTCAAGgtaggtg..	87
7 <sup>2</sup>	77	..ctctcagGTAGCTG..	..CTTCCAGgtgagac..	206
	81	..caggtagCTGAGCA..		
8 <sup>3</sup>	566	..cccgtagGTGTCCA..	..ACATCACgtgagcc..	1355
9 <sup>4</sup>	805	..cccgcagGCTGGCC..		

<sup>1</sup> Die Größe der 5'UTR-Sequenz von *TU51* ist unbekannt. Das Exon beginnt derzeit mit dem putativen Translationsstart-Kodon.

<sup>2</sup> Es finden zwei alternative Spleiß-Akzeptoren Verwendung.

<sup>3</sup> Das Exon geht in eine 3'-UTR-Sequenz von 406 bp über oder wird vorher, entsprechend dem cDNA-Klon FLJ20132, erneut gespleißt.

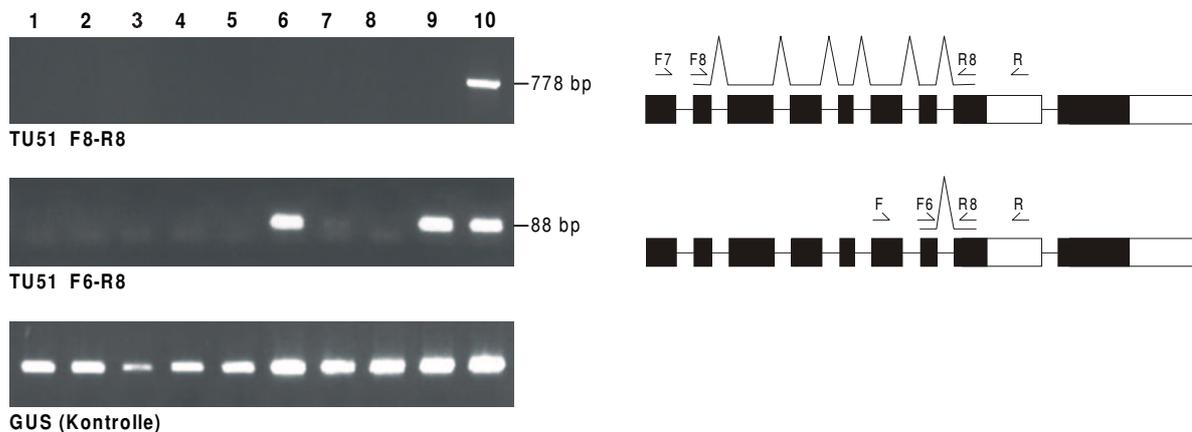
<sup>4</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 381 bp.

#### 4.4.1.2. Expressions-Analyse von *TU51*

Um die genetische Charakterisierung von *TU51* fortzusetzen, wurden Anstrengungen unternommen, die verschiedenen Transkripte des Gens mittels RT-PCR nachzuweisen. Da dafür weder RNA-Extrakte aus menschlichem Kolon noch aus Testis zur Verfügung standen, wurde für die

entsprechenden Reaktionsansätze auf RNA aus Leber, Herz, Niere, Prostata, Temporalem Cortex sowie aus fünf Zelllinien (HeLa, ARPE-19, Fibroblasten, Y79, HS683) zurückgegriffen. Letztere wurden in die Untersuchung einbezogen, da sich aus Zelllinien generell besonders reine und intakte RNA isolieren lässt. Als strenge Qualitätskontrolle für die cDNA-Synthese wurde ein 454 bp großes Fragment des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens amplifiziert, welches als 'low-copy-number housekeeping gene' eingestuft wird (KARGES *et al.*, 1994).

Um eine Expression von *TU51* nachzuweisen, war es im Gegensatz zur RT-PCR-Analyse des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens nötig, mit internen Oligonukleotidprimern jeweils eine zweite, sog. 'nested' PCR an die erste RT-PCR anzuschließen. So gelang die partielle Amplifikation des kürzeren *TU51*-Transkripts, dessen 3'-Ende durch die EST-Klone nk9g10.s1 und af06b11.s1 definiert wird. Eine entsprechende cDNA konnte aus der Zelllinie HS683 isoliert werden und überspannt die Exons 1 bis 8. Wurde die RT-PCR ausschließlich zur Amplifizierung des 3'-Bereichs von *TU51* durchgeführt, konnte zudem eine Expression des Gens in den Zelllinien HeLa, Y79 und sehr schwach in ARPE-19 nachgewiesen werden (Abb. 27). Ein cDNA-Transkript, das entsprechend dem Klon FLJ20132 zusätzlich Exon 9 enthält, konnte bei Verwendung Exon 9-spezifischer 'revers'-Primer allerdings aus keinem der untersuchten Gewebe amplifiziert werden.



**Abb. 27** Expressionsanalyse von *TU51* mittels geschachtelter RT-PCR-Analyse ('nested' RT-PCR). Untersucht wurden Leber (1), Herz (2), Niere (3), Prostata (4), Temp. Cortex (5) sowie die fünf Zelllinien HeLa (6), ARPE-19 (7), Fibroblasten (8), Y79 (9), HS683 (10). Die verwendeten Oligonukleotidprimer-Kombinationen sind in der Abbildung angegeben (Sequenzen siehe Tab. 4f). Als Positivkontrolle ist außerdem die Amplifikation (nicht 'nested') eines Fragments des menschlichen  $\beta$ -Glucuronidase-Gens gezeigt. Links ist die jeweilige Position und Spleiß-Struktur der amplifizierten cDNA-Fragmente von *TU51* dargestellt. Angegeben sind hier zudem die Oligonukleotidprimer der ersten RT-PCR, welche nicht in klar erkennbare Fragmente resultierte.

Dass *TU51* ausgesprochen gering oder aber sehr gewebsspezifisch oder zellstadienspezifisch exprimiert wird, ist auch daran erkennbar, dass das Gen nur durch insgesamt drei cDNA-Klone in der GenBank-Datenbank vertreten ist, obwohl dort bereits Sequenzen von mehr als 1.8 Millionen EST-Klonen aus diversen menschlichen Geweben erfasst sind (Stand vom März, 2000; Quelle: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)). Wie eine Datenbankabfrage zeigte, ist selbst das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen mit über 100 EST-Klonen deutlich stärker repräsentiert.

Eine interessante Eigenheit von *TU51* offenbarte sich beim Sequenzieren des in Abbildung 27 gezeigten RT-PCR-Produkts F8-R8 aus Zelllinie HS683. Es liess sich ein alternativer Spleiß-Akzeptor für Exon 7 nachweisen, der vier Nukleotide hinter dem bisher bekanntem Motiv (basierend auf den cDNA-Klonen af06b11 und FLJ20132) liegt. Fehlen diese vier Basen in der prozessierten mRNA, so ändert sich zwangsläufig der Leserahmen für die Translation (Abb. 28). Zudem liegt dann bereits 58 bp strangabwärts in Exon 7 ein 'in frame'-Stopp-Kodon TGA. Weitere Untersuchungen dieser Transkriptionsvariation, insbesondere bezüglich einer eventuell gewebsspezifischen Verwendung beider Spleiß-Akzeptoren, wurden nicht vorgenommen.

```

a)      ...cctaactgctccctctcctctcagGTAGCTGAGCAGCTCATCAACCCCTTCGGAGAG
          V A E Q L I N P F G E

      GACGATGATGACTTTGAGACCAACTTTCTGATCGATAGAACTTCCAGgtgagactc...
      D D D D F E T N F L I D R N F Q

b)      ...cctaactgctccctctcctctcaggtagCTGAGCAGCTCATCAACCCCTTCGGAGAG
          L S S S S T P S E R

      GACGATGATGACTTTGAGACCAACTTTCTGATCGATAGAACTTCCAGgtgagactc...
      T M M T L R P T F *
  
```

**Abb. 28a/b** Alternativ verwendeter Spleiß-Akzeptor im Exon 7 von *TU51*. Das Exon ist in Großbuchstaben angegeben, während die flankierenden intronischen Sequenzen kleingeschrieben sind. Die Position des Spleiß-Akzeptors ist um 4 Basen versetzt (vgl. a und b). Diese Verschiebung des Leserahmens führt zu einer abgewandelten Proteintranslation und resultiert im Falle von (b) in einem früheren Translationsstopp als in (a).

## 4.4.2. *TU52*

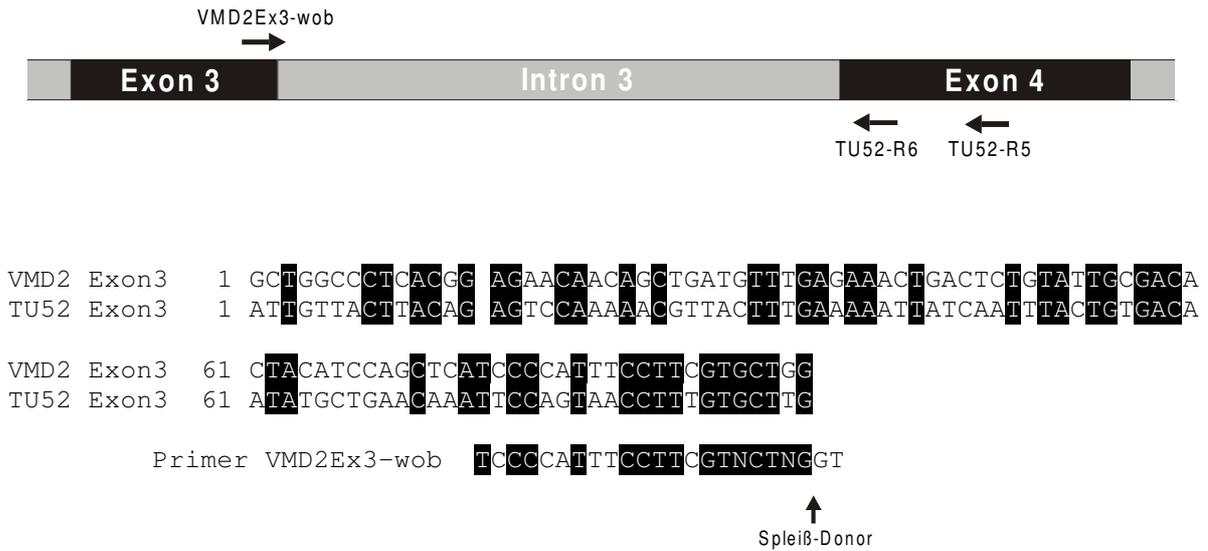
### 4.4.2.1. cDNA-Klonierung und genomische Struktur von *TU52*

*TU52* ist in der dbEST-Datenbank durch vier ungespleißte EST-Klone (z.B. yr53b07) und zwei gespleißte EST-Klone vertreten. Gespleißt sind zf24a04.s1 und nx56g12.s1 (vgl. Abb. 30), welche aus fötalem Herz respektive einem alveolarem Rhabdomyosarkom isoliert wurden. Die Klone überlappen einander und weisen eine deutliche Paralogie zu Exon 4 von *VMD2* auf. Beide EST-Klone wurden als IMAGE-Klone zur Nachsequenzierung bestellt. Dabei konnte die Sequenz von zf24a04 um 127 bp vervollständigt werden. Das Insert des Klons ist insgesamt 594 bp groß und überragt die Sequenz von nx56g12 zu beiden Seiten. Klon zf24a04 enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 176 bp, das Polyadenylierungssignal AATAAA sowie eine poly(A)-Abfolge 15 bp strangabwärts des Signals. Wie sich später noch zeigen wird, ist hiermit allerdings nicht die einzige 3'-UTR-Sequenz von *TU52* repräsentiert, denn mit zf24a04 liegt lediglich eines von vielen möglichen Transkripten des Gens vor. Der Klon repräsentiert dabei eine interessante, deutlich verkürzte cDNA-Variante. Da die Sequenzähnlichkeit zu *VMD2* im 5'-Bereich von zf24a04, strangaufwärts der zu Exon 4 paralogen Sequenz abreisst und gleichzeitig der ORF nicht erhalten bleibt, war zunächst unklar, ob

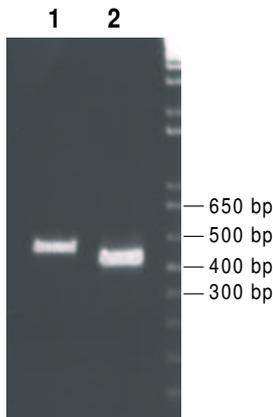
zf24a04 nicht womöglich ein chimärer EST-Klon ist, der aus einer Coligation zweier unabhängiger cDNA-Fragmente hervorging. Da zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung noch keine entsprechende genomische Sequenz verfügbar war, blieb die 5'-Organisation von *TU52* unklar, während das 3'-Ende zunächst eindeutig definiert schien.

Wie zuvor schon im Falle von *TU51*, konnte auch für *TU52* mittels eines 'Northern blots' kein mRNA-Transkript detektiert werden. Eine 5'-RACE-Analyse blieb ebenfalls erfolglos. Analog zum Vorgehen bei der Charakterisierung von *TU51* wurde *TU52* daher ebenfalls auf Basis der genomischen Sequenz charakterisiert. Mit den vom ungespleißten EST-Klon yr53b07 abgeleiteten Oligonukleotidprimern TU52-F (5'-TGG GGC AGG GCT TAT GGC TC-3') und TU52-R (5'-TTT GGA ATC ACC ACT GAC CGG-3') ließ sich ein 1317 bp großes Fragment aus genomischer DNA amplifizieren. Die anschließende Hybridisierung des Fragmentes auf die RPCI-1-PAC-Bank führte zur Identifizierung der PAC-Klone dJ212P10 und dJ321A17. Nach separater *EcoRI*- bzw. *PstI*-Restriktion beider Klone und Subklonierung in pBluescript<sup>®</sup> wurden die ausplattierten Subklone zunächst mit einem 140 bp langen, Exon 4-spezifischen PCR-Fragment (Primerkombination TU52-F2/TU52-R2; 5'-GGC CAG ACA GGC TAA TGT TCC-3'/5'-GTA CAC AGC AGT GCT CAC CGA G-3') hybridisiert. Ein positiver, etwa 5 kbp großer *EcoRI*-Subklon von dJ212P10 gab nach Sequenzierung mit dem ebenfalls Exon 4-spezifischen Oligonukleotidprimer TU52-R6 (5'-AAA TTC ACA AAC TGG TTC CA-3'), in einer Distanz von 464 bp strangaufwärts zu Exon 4, einen 95 bp langen Abschnitt mit deutlicher Sequenzähnlichkeit zu Exon 3 von *VMD2* preis. Diese Sequenz konnte im weiteren Verlauf der Transkriptanalysen von *TU52* als kodierend bestätigt werden, ist aber nicht in EST-Klon zf24a04 enthalten, ein erster Hinweis auf die Existenz alternativer Transkripte des Gens.

Ein parallel gewählter Weg war prinzipiell ebenfalls erfolgreich, Exon 3 von *TU52* zu isolieren und soll darum kurz beschrieben werden. Auf Basis von PAC-Klon dJ212P10 wurde eine 'nested' PCR mit den geschachtelten, Exon 4-spezifischen Oligonukleotidprimern TU52-R5 (5'-CTT CCG TGA ACA CTG CTA GA-3') und TU52-R6 (Sequenz s.o.) und einem 'wobbled'-Oligonukleotidprimer, bezeichnet als VMD2Ex3-wob (5'-TCC CCA TTT CCT TCG NCT NGG T-3'), durchgeführt (Abb. 29). Letzterer ist von der Nukleinsäuresequenz am Ende des Exons 3 von *VMD2* abgeleitet, enthält aber an zwei Positionen variable Nukleotide und die dem Konsensus für Spleißmotive entsprechenden intronischen Nukleotide GT am 3'-Ende. Durch diese PCR konnte die intronische Sequenz zwischen Exon 3 und 4 amplifiziert und sequenziert werden. Hiermit war die Voraussetzung für eine nachfolgende spezifische Hybridisierung der PAC-Subklone und Detektion des Exons 3 von *TU52* geschaffen. Obwohl Exon 3 bereits über das zuvor beschriebene Verfahren der PAC-Subklon-Hybridisierung mit der Sequenz des Exons 4 von *VMD2* als Nukleinsäuresonde gefunden werden konnte, stellt die genannte PCR-Technik nichtdestotrotz eine elegante und daher erwähnenswerte Alternative dar.



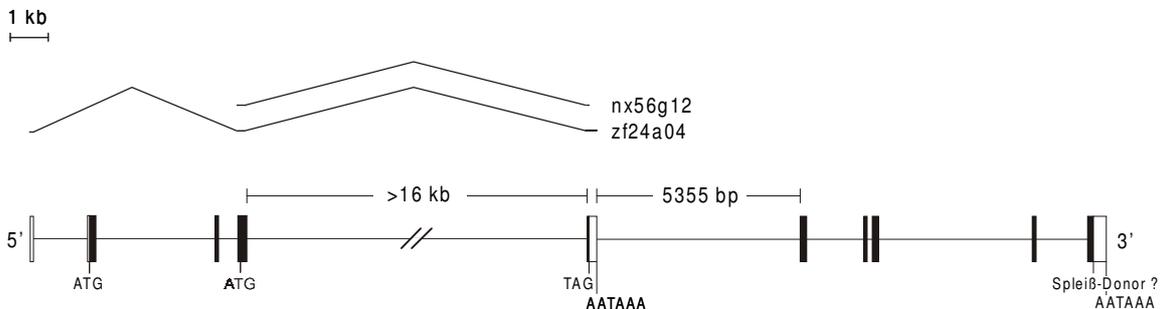
**Abb. 29a** PCR-Strategie zur Amplifizierung des Introns 3 von *TU52* als Basis zur Detektion von Exon 3. Es handelt sich um eine geschachtelte PCR, bei dem die *TU52*-Exon 4-spezifischen Oligonukleotidprimer TU52-R5 in der ersten PCR-Reaktion bzw. TU52-R6 in der zweiten, 'nested' PCR-Reaktion in Kombination mit dem von *VMD2* abgeleiteten Primer VMD2Ex3-wob benutzt werden, von dem anzunehmen war, dass er im Bereich der Spleiß-Donorsequenz des Exons 3 von *TU52* binden würde. Da die intronische Sequenz zwischen den Exons klein genug ist, um mittels PCR amplifiziert zu werden, wurde somit die Voraussetzung zur Sequenzierung von Exon 3 mit Hilfe eines spezifischen Primers aus der flankierenden intronischen Sequenz geschaffen.



**Abb. 29b** Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte aus der ersten PCR mit den Oligonukleotidprimern VMD2Ex3-wob und TU52-R5 (1) und der 'nested' PCR mit den Primern VMD2Ex3-wob und TU52-R6 (2). Durch die Sequenzierung des PCR-Produkts wurde die Sequenz des Introns 3 von *TU52* ermittelt.

Nachdem es also entgegen den ersten EST-Analysen zu *TU52* doch eine Sequenz mit Paralogie zu Exon 3 von *VMD2* gab, war es nur konsequent, auch nach einer Sequenz mit Paralogie zu Exon 2 von *VMD2* zu forschen. Zu dessen Identifizierung wurden aber ein Hybridisierungsexperiment oder die PCR-Strategie beschriebener Art unnötig, da gerade zu dieser Zeit eine genomische Sequenz vom *TU52*-Locus verfügbar wurde. Unter Genbank-Nummer AC008730 wurden erste Fragmente des BAC-Klon CTD-2514H9 bereitgestellt. Der Klon ist dabei allerdings fälschlicherweise Chromosom 16 zugeordnet (vgl. 4.4.4.). Inzwischen besteht die angegebene Sequenz nur noch aus 10 ungeordneten Teilen von insgesamt 146 kbp DNA (Stand vom 04.05.2000) und offenbart in zwei unzusammenhängenden Abschnitten die genomische Organisation von *TU52*. Es lässt sich nicht nur eine zu Exon 2 von *VMD2* paraloge Sequenz erkennen, sondern zudem fünf weitere Exons strangabwärts der zuvor durch zf24a04 definierten 3'-untranslatierten Region. Diese zeigen deutliche Paralogien zu den Exons 5-9 von *VMD2*. Dabei endet das letzte, zu Exon 9 von *VMD2* paraloge Exon mit einem potentiellen Spleiß-Donor, so dass sich eventuell ein weiteres Exon anschließt. Zwischen Exon 10 von *VMD2* und der bekannten genomischen Sequenz strangabwärts des Exons 9

von *TU52* besteht jedoch keinerlei Sequenzähnlichkeit mehr, so dass zur Zeit keine Angaben zur entsprechenden 3'-Organisation von *TU52* gegeben werden können. Die Exon-Intron-Struktur des Gens ist, soweit bekannt, in Abbildung 30 und Tabelle 15 gezeigt.



**Abb. 30** Proportionale Darstellung der genomischen Struktur von *TU52*, soweit bekannt. Vertikale schwarze Balken repräsentieren die Exons, weiße Balken die untranslatierten Regionen des Gens. Angegeben sind weiterhin die Positionen der derzeit verfügbaren genspezifischen EST-Klone aus der GenBank-Datenbank, einschließlich ihrer Spleiß-Strukturen.

**Tab. 15) Exon-Intron-Grenzen von *TU52***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	101		..TAAATAGgtagtg..	1406
2 <sup>2</sup>	167	..cttctagAAAAAC..	..TGACAGgtacttt..	3177
3	95	..gctccagATTGTTA..	..GTGCTTGgtaagta..	464
4	234	..tctacagGGTTTTA..	..GAAGCAGgtactat..	>16 kbp
5a <sup>3</sup>	242	..ctttcagAAAGAAC..		5355
5b	155	..tgtaaagGTTTTAT..	..GATGACTgtagtat..	1452
6	78	..ggcttagGAAATGA..	..CACCCAGgtaagaa..	111
7	153	..gttccagGTTGTCA..	..GCTTAAGgtagcca..	3869
8	81	..actacagGTAGCAG..	..TTTGACGgtagag..	1282
9 <sup>4</sup>	unbekannt	..atdddtagGTCTCTC.. ..ctdddtagCTGTGGA.. <sup>5</sup>	..AGATGGGgtaagtg.. <sup>6</sup>	

<sup>1</sup> Das Exon basiert auf der vollständig nachsequenzierten Sequenz des EST-Klons zf24a04 und ist nichtkodierend.

<sup>2</sup> Das Exon enthält eine 5'-UTR-Sequenz von 15 bp.

<sup>3</sup> Das Exon enthält eine 3'-UTR-Sequenz von 186 bp.

<sup>4</sup> Die angegebenen Exon-Längen sind von der kodierenden Sequenz abgeleitet und enthalten in Abhängigkeit des verwendeten Spleiß-Akzeptors eine kodierende Sequenz von 153 bzw. nur 18 bp. Im Falle der längeren kodierenden Sequenz folgt nach Nukleotid-Position 152 ein putativer Spleiß-Donor. Wird der Spleiß-Donor nicht verwendet, schließt sich eine 3'-UTR-Sequenz unbekannter Länge an.

<sup>5</sup> Alternativer Spleiß-Akzeptor von Exon 9.

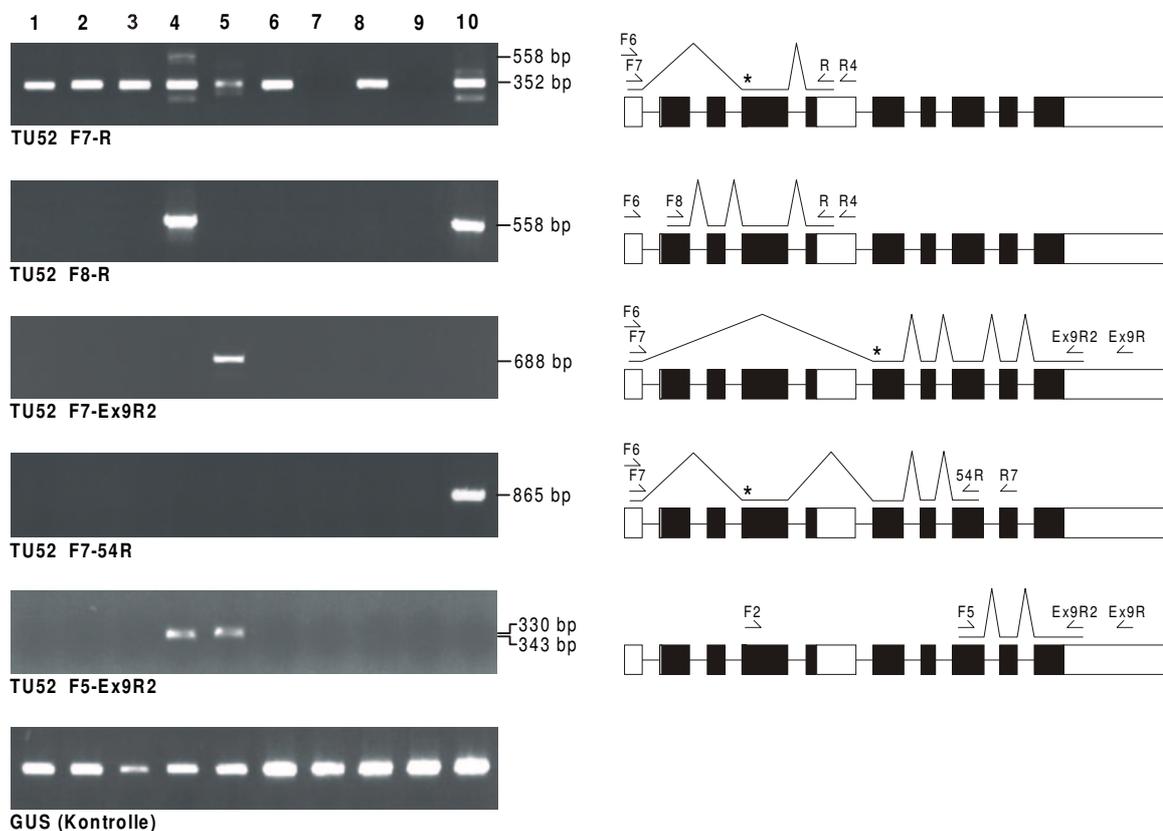
<sup>6</sup> Putativer Spleiß-Donor von Exon 9.

#### 4.4.2.2. Expressions-Analyse von *TU52*

Um die Genstruktur von *TU52* zu bestätigen, sollten die unterschiedlichen mRNA-Transkripte des Gens mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Dies gestaltete sich schwierig, da auch *TU52* scheinbar nur sehr gering exprimiert wird. Analog dem Vorgehen bei der Analyse von *TU51* mussten geschachtelte PCR-Reaktion angesetzt werden, um überhaupt Transkripte von *TU52* zu

amplifizieren. Im Verlaufe der Analysen wurden dann weitere Spleiß-Varianten sowie ein zweiter 3'-UTR von *TU52* erkennbar. Die Vielfalt der mittlerweile nachgewiesenen alternativen Transkripte des Gens ist in Abbildung 31 veranschaulicht. Interessanterweise ließ sich bislang keine cDNA amplifizieren, die alle existierenden Exons in sich vereint.

Die ohnehin komplexe Transkription von *TU52* wird noch dadurch verkompliziert, dass analog zu *TU51* zwei alternative Spleiß-Akzeptoren vorliegen, hier allerdings in Exon 9 (Abb. 32). Dadurch wird erneut der Leserahmen für die Proteinkodierung verschoben, was natürlich Einfluß auf die Position des Stopp-Kodons hat. Findet der hintere, 13 bp strangabwärts des ersten Spleiß-Akzeptors gelegene Akzeptor Verwendung, so liegt ein 'in frame'-Stopp-Kodon bereits 19 bp strangabwärts. Wird der vordere Spleiß-Akzeptor verwendet, liegt das Stopp-Kodon 154 bp strangabwärts, exakt 2 bp hinter dem putativen Spleiß-Donor von Exon 9 (Abb. 33).



**Abb. 31** Expressionsanalyse von *TU52* mittels geschachtelter RT-PCR-Analyse ('nested' RT-PCR). Untersucht wurden Leber (1), Herz (2), Niere (3), Prostata (4), Temp. Cortex (5) sowie die fünf Zelllinien HeLa (6), ARPE-19 (7), Fibroblasten (8), Y79 (9), HS683 (10). Die verwendeten Oligonukleotidprimer-Kombinationen sind in der Abbildung angegeben (Sequenzen siehe 3.26.). Als Positivkontrolle ist außerdem die Amplifikation (nicht 'nested') eines Fragments des menschlichen Glucuronidase-Gens gezeigt (3.26.). Links sind Position und Spleiß-Struktur der amplifizierten cDNA-Fragmente von *TU52* dargestellt. Angegeben sind hier zudem die Oligonukleotidprimer der ersten RT-PCR, welche nicht in klar erkennbare Fragmente resultierte, sowie die Positionen potentieller, alternativer ATG-Startkodons (Sterne) für den Fall, dass Exon 2 (trägt das zu *VMD2* paraloge ATG-Signal) nicht im Transkript enthalten ist.

a) ...ttaatttacatctgagttatttctaacaatataacaatgatttttag**GTCTCTCTTTTA**  
V S L L

**GCTGTGGACGAAATGCACATGAGCTTACCCAAGATGAAGAAGGACATTTACTGGGACGAT**  
A V D E M H M S L P K M K K D I Y W D D

**TCTGCTGCTCGCCACCATACACATTGGCAGCTGCTGACTACTGCATACCCTCATTCTG**  
S A A R P P Y T L A A A D Y C I P S F L

**GGGTCAACAGTCCAGATGGGGTAAGTGCATTTTTAAAAAATCTCTAATATTTCCAG...**  
G S T V Q M G \*

b) ...ttaatttacatctgagttatttctaacaatataacaatgatttttaggtctctctttta

**gCTGTGGACGAAATGCACATGAGCTTACCCAAGATGAAGAAGGACATTTACTGGGAC...**  
L W T K C T \*

**Abb. 32a/b** Alternativ verwendeter Spleiß-Akzeptor im Exon 9 von *TU52*. Das Exon ist in Großbuchstaben angegeben, während die flankierenden intronischen Sequenzen kleingeschrieben sind. Die Position des Spleiß-Akzeptors ist um 13 Basen versetzt (vgl. a und b). Diese Verschiebung des Leserahmens führt zu einer abweichenden Proteintranslation und resultiert im Falle von (b) in einem früheren Stopp-Kodon (Stern) als in (a).

putativer Spleiß-Donor (Exon 9)

▼

... A G T C C A G A T G G G G T A A G T G C A T T T ...

Stopp

**Abb. 33** Potentieller Spleiß-Donor in Exon 9 von *TU52*, zwei Basenpositionen vor dem als Translationsstopp-Signal fungierendem Kodon TAA.

Während die RT-PCR mit den Oligonukleotidprimern *TU52-F5* und *TU52-Ex9R2* zeigt, dass dieser Spleiß-Donor nicht verwendet wird, sondern sich ein 3'-UTR anschließt (Abb. 37), ist ein Indiz für ein dennoch mögliches Spleiß-Ereignis an der oben gezeigten Position, dass kein entsprechendes Produkt aus der Zelllinie *HS683* amplifiziert werden konnte, obwohl diese ansonsten stets geeignet war, cDNA-Transkripte nachzuweisen (vgl. auch RT-PCR-Analysen von *TU51* in Abb. 27 und *TU53* in Abb. 35). Dies deutet darauf hin, dass die verwendeten 3'-UTR-spezifischen 'revers'-Primer *TU52-Ex9R* bzw. *TU52-Ex9R2* keine cDNA-'Templates' der Zelllinie binden können, das cDNA-Spektrum von *HS683* also offenbar ausschließlich *TU52*-Transkripte enthält, die den UTR im Exon 9 nicht beinhalten, sondern kürzer sind oder, was in diesem Fall wahrscheinlicher scheint, ein weiteres Mal gespleißt wurden und deshalb statt der 3'-UTR-Sequenz von Exon 9 ein noch unbekanntes Exon 10 erfassen. Ein Vergleich mit der analogen Situation bei *TU51* macht deutlich, dass diese Möglichkeit besteht.

Wie in Abbildung 31 zu sehen, zeigt das außergewöhnlich vielfältige Transkriptionsmuster von *TU52* zumindest in den hier untersuchten Geweben eine deutliche Gewebsspezifität. Es sind aber

sicherlich weitere Analysen notwendig, bevor ein aussagekräftiges Expressionsprofil für das Gen definiert werden kann. Der Begriff „Expressionsprofil“ sollte ohnehin nur mit Vorsicht gebraucht werden, denn aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Transkripte von *TU52* wäre auch noch zu untersuchen, ob alle der alternativen Transkripte translatiert werden und welche Translationsstart-Kodons jeweils Verwendung finden. Sowohl die RT-PCR-Produkte *TU52-F7/R* bzw. *TU52-F7/54-R* als auch *TU52-F7/Ex9R2* beinhalten jedenfalls nicht das dem Translationsstart-Kodon von *VMD2* entsprechende ATG-Motiv. Zur Translation müssen also andere, strangabwärts gelegene Translationsstart-Kodons dienen. Durch die gezeigten RT-PCR-Analysen ist zwar belegt, dass entsprechende mRNA-Transkripte von *TU52* in der Zelle vorliegen, angezweifelt werden darf aber, dass alle putativen Translationsprodukte von funktioneller Bedeutung sind. Zum Beispiel lässt sich durch die RT-PCR *TU52-F7/R* in fast allen untersuchten Geweben eine mRNA nachweisen, die ein Protein von maximal 72 Aminosäuren kodieren würde, wenn das erstmögliche ATG-Motiv im ORF, welches an Nukleinsäureposition 107 liegt (72 bp strangabwärts des Spleiß-Akzeptors von Exon 4), als Translationsstart-Kodon fungiert. Da dieses Translationsstart-Kodon aber im Sequenzkontext AGGCTAATGT steht und damit nicht annähernd der definierten Konsensus-Sequenz entspricht, wird eventuell keine Translation initiiert. Auch das erstmögliche Translationsstart-Signal des durch die RT-PCR *TU52-F7/Ex9R2* nachgewiesenen Transkripts (an Aminosäureposition 164, vgl. Abb. 39) steht in einem vermeintlich ungeeignetem Sequenzkontext, so dass auch in diesem Fall womöglich keine Translation erfolgt.

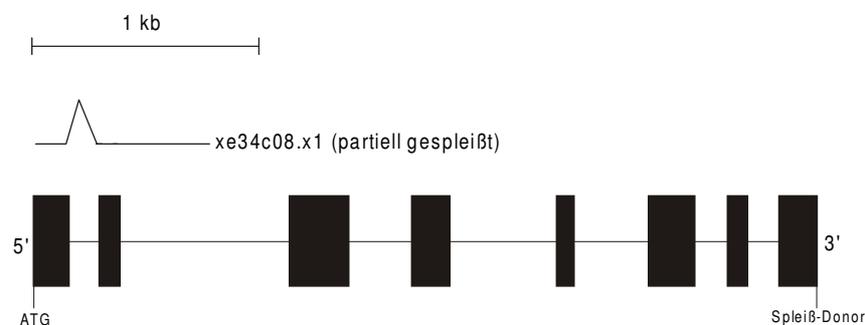
### 4.4.3. *TU53*

#### 4.4.3.1. cDNA-Klonierung und genomische Struktur von *TU53*

*TU53* stellt das vierte und bislang letzte bekannte Mitglied der *VMD2*-Genfamilie des Menschen dar. Mit der Analyse des Gens wurde auf Basis von EST-Klon *xe34c08.x1* (isoliert aus einem Endometriumkarzinom) aus der dbEST-Datenbank begonnen. Bislang wurde keine weitere cDNA-Sequenz von *TU53* in der Datenbank veröffentlicht (Stand vom März, 2000), so dass davon auszugehen ist, dass auch *TU53* ausgesprochen selten oder aber sehr gewebspezifisch exprimiert wird. Das 'Insert' von *xe34c08.x1* ist 456 bp lang und enthält die *VMD2*-paralogen Exons 2 und 3. Die hinteren 115 bp des Klons entsprechen einer repetitiven Sequenz der SINE/Alu-Klasse, was sofort vermuten ließ, dass der Klon eine partiell gespleißte cDNA repräsentiert. Zudem ist die zu Exon 2 von *VMD2* paraloge Sequenz am 5'-Ende des Klons unvollständig. Die Sequenz des Klons beginnt exakt ein Kodon nach dem potentiellen ATG-Translationsstart-Signal des Gens.

Um die kodierende Sequenz von *TU53* vollständig zu ermitteln, wurde zuerst mit den auf der Sequenz von *xe34c08.x1* basierenden Oligonukleotidprimern *TU53-F3* (5'-TGA CCC AGG AGC AGA GGT AC-3') und *TU53-R3* (5'-GGG TAA TTC TGA CCC TCG GA-3') ein 177 bp großes PCR-Fragment aus genomischer DNA amplifiziert und zur Hybridisierung der PAC-Bank *RPCI-1* eingesetzt. Dadurch konnten die drei PAC-Klone *dJ26B15*, *dJ4N14* und *dJ181M10* detektiert

werden. Nach Abschluss der Sequenz-Analyse von xe34c08.x1 bezüglich aller enthaltener Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, wurde PAC-Klon dJ181M10 mit *Sau3AI* bzw. *EcoRI* geschnitten und in pBluescript® subkloniert (zur Klonierung der *Sau3AI*-Fragmente wurde der Vektor mit *BamHI* geöffnet). Nach Hybridisierung der ausplattierten Subklone mit dem oben genannten PCR-Fragment konnten ein 716 bp großes *Sau3AI*-Fragment und ein ca. 6 kbp großes *EcoRI*-Fragment aus dJ181M10 isoliert werden. Der *Sau3AI*-Klon war geeignet, die genomische 5'-Sequenz von *TU53* aufzuklären. Es konnte sowohl das in xe34c08.x1 fehlende ATG-Startkodon an der erwarteten Position bestätigt als auch das erste Intron des Gens von 87 bp Länge und die Größe des zweiten Exons (95 bp) definiert werden. Das Translationsstart-Signal von *TU53* befindet sich im Sequenzkontext AGCACCATGA und entspricht damit vergleichsweise gut der definierten Konsensus-Sequenz. Der isolierte *EcoRI*-Klon, welcher den *Sau3AI*-Klon um 385 bp überlappt, erstreckt sich über die genomische 3'-Region von *TU53*. Aufgrund des verhältnismäßig kleinen ersten Introns sowie der relativen Größe des *EcoRI*-Klons durfte vermutet werden, dass der Klon weitere Exons von *TU53* enthält. Nach vollständiger Sequenzierung des Inserts (5964 bp) konnten durch Vergleiche mit den kodierenden Sequenzen von *VMD2* tatsächlich die Exons 3-8 ermittelt werden. Zu beachten ist, dass es analog zur Genstruktur von *VMD2* und *TU52* eventuell ein nichtkodierendes erstes Exon von *TU53* gibt, welches aber aufgrund mangelnder Sequenzidentität zu *VMD2* bzw. *TU52* nicht über Sequenzvergleiche der Nukleinsäuren detektierbar ist. Momentan entspricht Exon 1 von *TU53* also dem sequenzparalogen Exon 2 von *VMD2*. Entsprechend ist Exon 8 von *TU53* sequenzparalog zu Exon 9 von *VMD2*. Damit endet die Sequenzähnlichkeit beider Gene, wie schon zuvor zwischen *TU51*, *TU52* und *VMD2*, mit dem Ende des neunten Exons von *VMD2*. Wie in Abbildung 34 und Tabelle 16 zu sehen ist, liegt am Ende der Sequenz des achten Exons von *TU53* ein putativer Spleiß-Donor. Mittels GRAIL lässt sich 145 bp strangabwärts von Exon 8 ein 246 bp großes Exon vorhersagen, dass den Leserahmen von *TU53* verlängern würde, aber keinerlei Sequenzähnlichkeit zu *VMD2*, *TU52* oder *TU51* aufweist. Weitere cDNA-Analysen sind also nötig, um die Genstruktur von *TU53* vollends aufzuklären.



**Abb. 34** Proportionale Darstellung der genomischen Struktur von *TU53*, soweit bekannt. Vertikale schwarze Balken repräsentieren die Exons des Gens. Angegeben ist weiterhin die Position des genspezifischen, partiell gespleißten EST-Klons xe34c08.x1 aus der GenBank-Datenbank.

Eine Auffälligkeit in der Genstruktur von *TU53* ist die Verlängerung von Exon 6, welches mit einer Größe von 198 bp gegenüber den sequenzparalogen Exons 6 von *TU51* bzw. 7 von *VMD2* und *TU52* (jeweils 153 bp) eine Insertion von 45 bp in sich birgt. Damit kodiert das Exon 15 Aminosäuren mehr (vgl. Abb. 39). Die zusätzlichen 45 bp wurden im Laufe der evolutionsgenetischen Differenzierung von *TU53* in die Mitte der exonischen Sequenz inseriert, so dass die Erweiterung des Exons also nicht einfach die Folge einer Verschiebung von Spleiß-Akzeptor oder Spleiß-Donor ist.

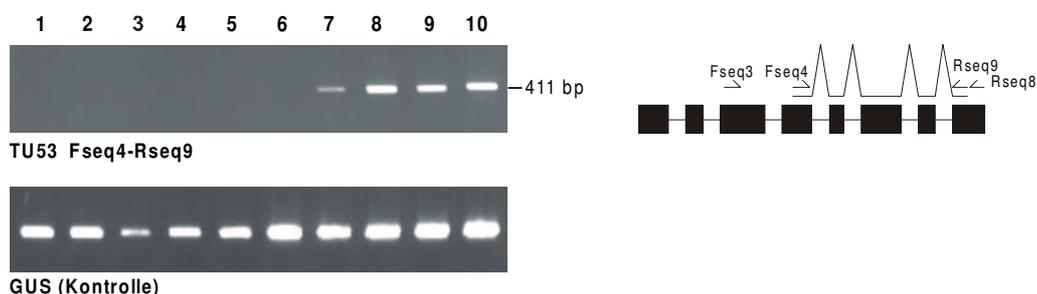
**Tab. 16) Exon-Intron-Grenzen von *TU53***

Exon	Größe (bp)	3'-Spleiß-Akzeptor	5'-Spleiß-Donor	Intron-Größe (bp)
1 <sup>1</sup>	152		..CCTACCGgtaaggg..	87
2	95	..tccccagGCTGCTG..	..GTATTGGgtaaggc..	650
3	234	..caagcagGTTTCTA..	..GACGCAGgtgcgcc..	235
4	155	..ccctcagGTTTCAT..	..TTTGAAgtgagtg..	396
5	78	..ccccagGAGCTGA..	..CACCCAgttaactg..	292
6	198	..tctccagGTGGTGA..	..GCTCAAGgtgggca..	122
7	81	..cctatagGTGGCTG..	..CTTGCAgtgagca..	121
8 <sup>2</sup>	155	..ggcccagGTGTCCC..	..ACCTGCGgtgagtg..	

<sup>1</sup> Die Größe des 5'-UTR von *TU53* ist unbekannt. Die Exon-Sequenz beginnt derzeit mit dem putativen Translationsstart-Kodon.  
<sup>2</sup> Das Exon endet mit einem putativen Spleiß-Donor. Die weitere 3'-Organisation des Gens ist unbekannt.

#### 4.4.3.2. Expressions-Analyse von *TU53*

Analog zu *TU51* und *TU52* ist in Abbildung 35 das „Expressionsprofil“ von *TU53* dargestellt. Erneut zeigt sich, dass vornehmlich die verwendeten Zelllinien geeignet sind, Transkripte von *TU53* nachzuweisen. Wie zuvor gelang dies nur nach Ansetzen einer zweiten, 'nested' PCR. Eine 'Northern-Blot'-Analyse des Gens wurde aufgrund der geringen Erfolgsaussichten die mRNA von *TU53* zu detektieren nicht durchgeführt.



**Abb. 35** Expressionsanalyse von *TU53* mittels geschachtelter RT-PCR-Analyse ('nested' RT-PCR). Untersucht wurden Leber (1), Herz (2), Niere (3), Prostata (4), Temp. Cortex (5) sowie die fünf Zelllinien HeLa (6), ARPE-19 (7), Fibroblasten (8), Y79 (9), HS683 (10). Die verwendeten Oligonukleotidprimer-Kombinationen sind in der Abbildung angegeben. Als Positivkontrolle ist außerdem die Amplifikation (nicht 'nested') eines Fragments des menschlichen Glucuronidase-Gens gezeigt. Links ist die Position und Spleiß-Struktur des amplifizierten cDNA-Fragmentes von *TU52* dargestellt. Angegeben sind hier zudem die Oligonukleotidprimer der ersten RT-PCR, welche nicht in klar erkennbare Fragmente resultierte.

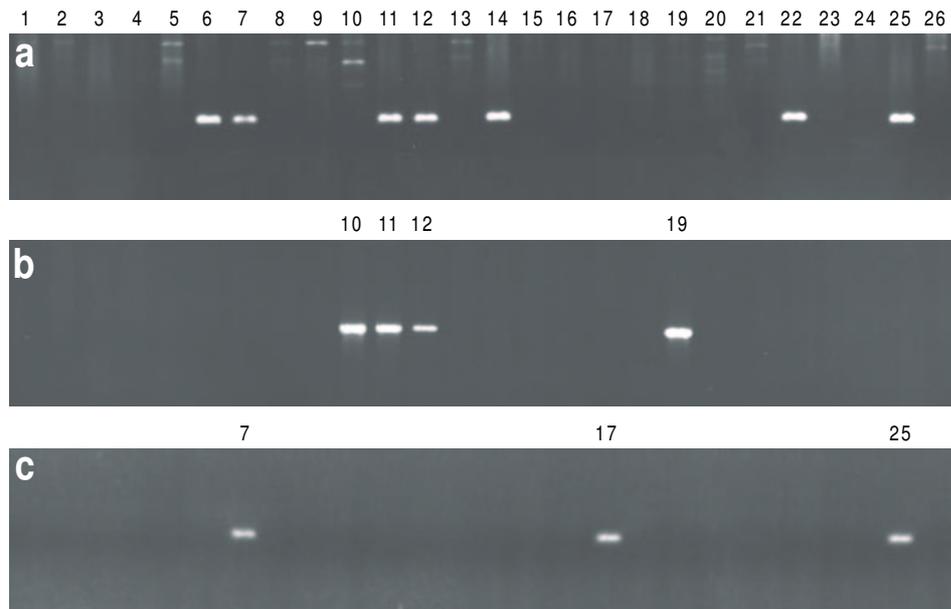
#### 4.4.4. Chromosomale Kartierung von *TU51*, *TU52* und *TU53*

Zur Identifizierung der chromosomalen Loci von *TU51*, *TU52* und *TU53* wurde das Hamster/Mensch-Hybrid-'Panel' der BIOS CORPORATION benutzt (3.25.2.). Desweiteren wurden in der zytogenetischen Abteilung des Instituts Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen durchgeführt (3.19.).

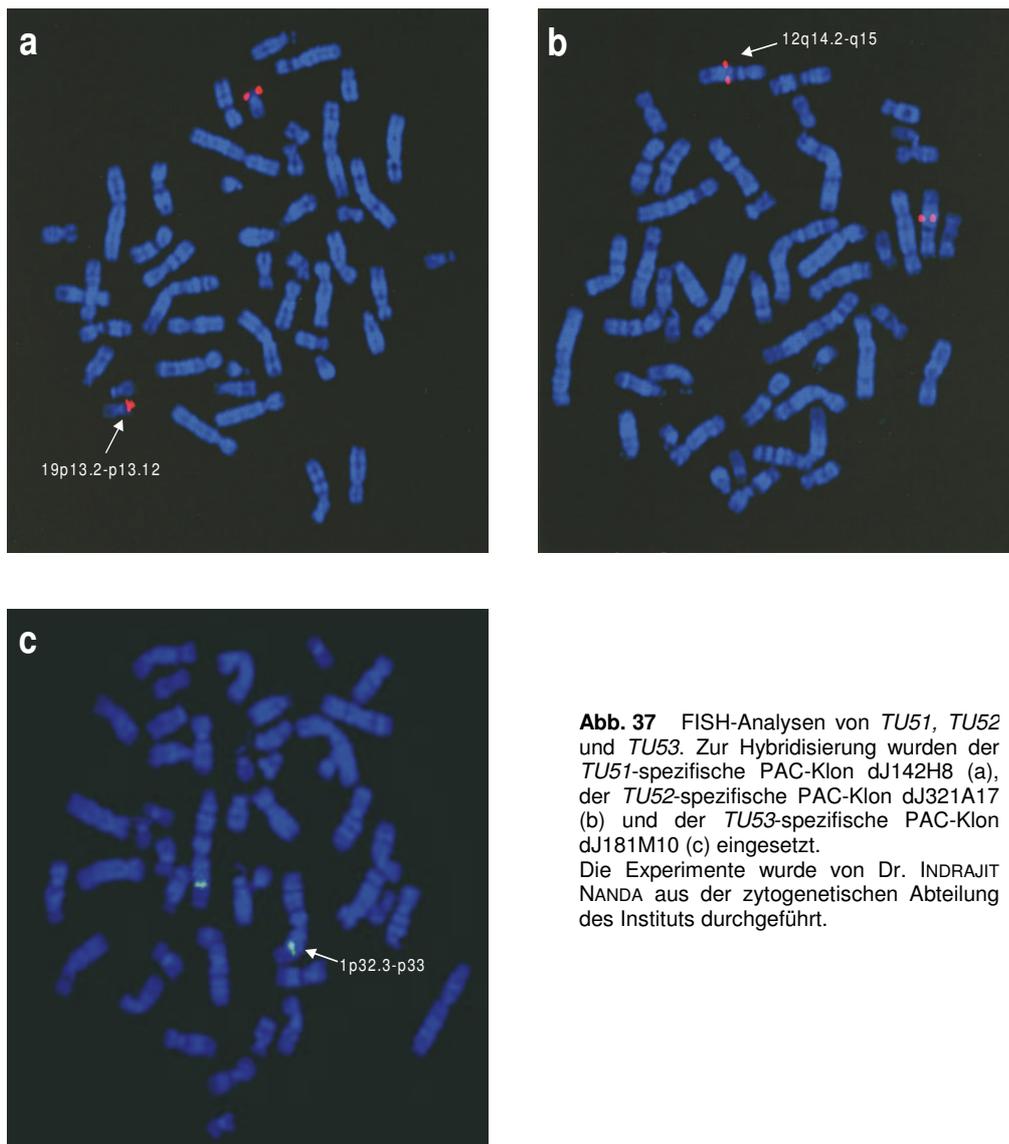
Wie zuvor erwähnt, lässt sich mit den Oligonukleotidprimern TU51-F2 und TU51-R (4.4.1.1.) ein Abschnitt der 3'-untranslatierten Sequenz von *TU51* aus genomischer DNA amplifizieren. Bei Verwendung der DNA-Extrakte der 'Radiation Hybrid'-Zelllinien zur PCR zeigt sich, dass ein entsprechendes Produkt ausschließlich aus den DNA-Extrakten amplifizierbar ist, die DNA des humanen Chromosoms 19 enthalten (vgl. Tab. 3; Abb. 36a; mit Ausnahme der Zelllinie SM-750 auf Spur 4, deren DNA-Extrakt generell nicht amplifizierbar schien). Durch Verwendung des gewonnenen PCR-Produkts zur Hybridisierung der PAC-Bank RPCI-1 konnte PAC-Klon dJ142H8 detektiert werden, welcher anschließend zur FISH-Analyse eingesetzt wurde und so die Feinkartierung von *TU51* auf 19p13.2-p13.12 ermöglichte (Abb. 37a).

Eine weitere Analyse des Hamster/Mensch-Hybrid-'Panels' wurde mit den Oligonukleotidprimern TU52-F und TU52-R (4.4.2.1.) vorgenommen. Hierdurch konnte *TU52* eindeutig Chromosom 12 zugeordnet werden (Abb. 36b). Das „s1“-Ende des *TU52*-spezifischen aber ungespleißten EST-Klons yr53b07 ist zudem identisch mit STS-Marker SHGC-33073, der in der 'NCBI Gene Map' in ein 11 cM großes Intervall zwischen D12S83 und D12S350 auf 12q13.3-14 kartiert wurde. Fast im Einklang hierzu steht das Ergebnis der FISH-Analyse mit PAC-Klon dJ321A17 als Hybridisierungssonde, wonach der Locus von *TU52* auf 12q14.2-q15 festzulegen wäre (Abb. 37b).

Eine *TU53*-spezifische PCR mit den Primern TU53-F3 und TU53-R3 (4.4.3.1.) führte zur Detektion des Gens auf Chromosom 1 (Abb. 36c). Die FISH-Analyse mit PAC-Klon dJ181M10 ermöglichte die Feinkartierung des Locus auf 1p32.3-p33 (Abb. 37c).



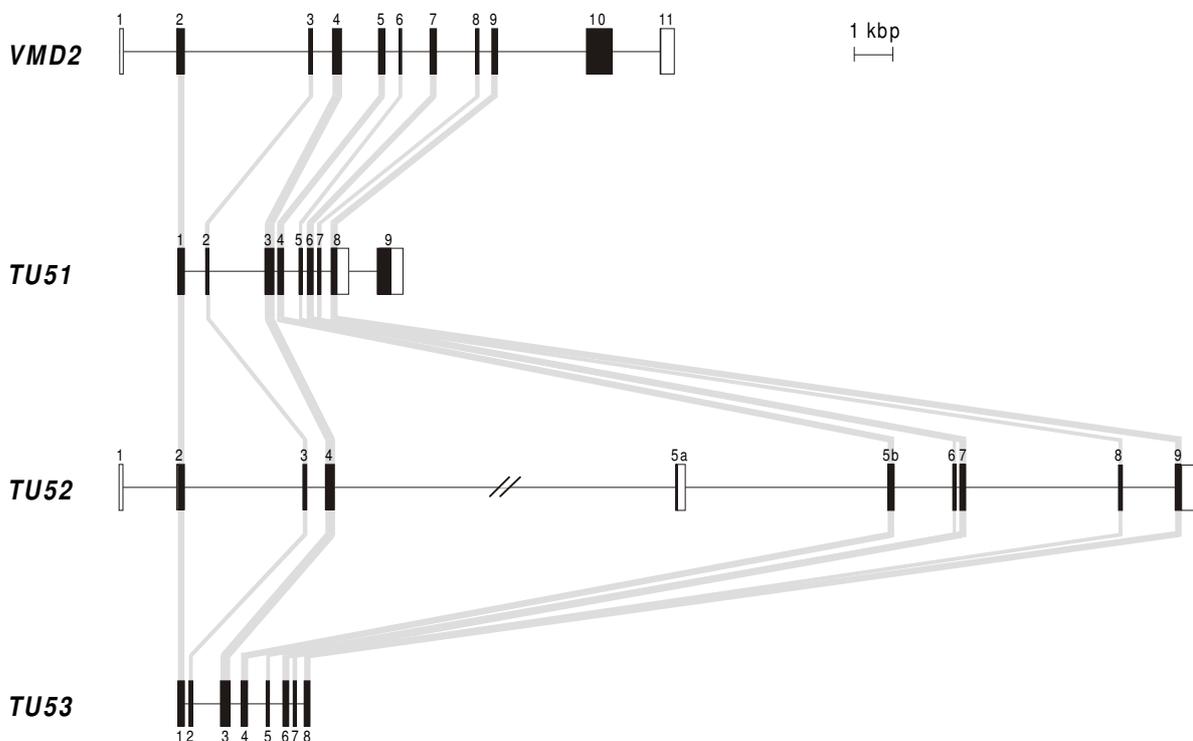
**Abb. 36** PCR-basierte Detektion von *TU51*, *TU52* und *TU53* im Hamster/Mensch-'Radiation Hybrid Panel' (BIOS Corp.). Der Vergleich mit Tabelle 3 belegt die chromosomale Lage der Gene auf den menschlichen Chromosomen 19 (a; *TU51*), 12 (b; *TU52*) und 1 (c; *TU53*).



**Abb. 37** FISH-Analysen von *TU51*, *TU52* und *TU53*. Zur Hybridisierung wurden der *TU51*-spezifische PAC-Klon dJ142H8 (a), der *TU52*-spezifische PAC-Klon dJ321A17 (b) und der *TU53*-spezifische PAC-Klon dJ181M10 (c) eingesetzt. Die Experimente wurde von Dr. INDRAJIT NANDA aus der zytogenetischen Abteilung des Instituts durchgeführt.

#### 4.4.5. Sequenzidentitäten in der *VMD2*-Genfamilie

Präzise Angaben zur Sequenzidentität von *VMD2*, *TU51*, *TU52* und *TU53* können aufgrund der Vielzahl möglicher Transkripte, vor allem von *TU52*, nicht gemacht werden. Generell lässt sich die Sequenzidentität auf Proteinebene aber bei 55-66% ermitteln. Beim Vergleich der Exon-Intron-Strukturen aller vier Gene wird das konservierte Spleiß-Muster innerhalb der Genfamilie sichtbar, wobei zu beachten ist, dass für *TU51* und *TU53* bisher kein untranslatiertes erstes Exon bekannt ist, so dass die Numerierung der Exons hinsichtlich derer von *VMD2* und *TU52* abweicht. Abbildung 38 soll helfen, die Exon-Paralogien noch einmal kenntlich zu machen. Besonders deutlich wird hierbei, dass zu Exon 5a von *TU52* keine sequenzähnlichen Exons in *VMD2*, *TU51* oder *TU53* vorliegen. Vielmehr ist es Exon 5b, das die Paralogie zu *VMD2*, *TU51* und *TU53* zeigt.



**Abb. 38** Proportionschema der Sequenzparalogien in den Genstrukturen von *VMD2*, *TU51*, *TU52* und *TU53*.

Wie auch im Falle der drei Fettsäuredesaturasen *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* darf die hohe Sequenzidentität und die evolutionäre Konservierung der Spleiß-Stellen innerhalb der *VMD2*-Genfamilie als klares Indiz für eine evolutionäre Genduplikation angesehen werden, mit dem Unterschied, dass *VMD2*, *TU51*, *TU52* und *TU53* nicht in unmittelbarer genomischer Nachbarschaft zueinander lokalisiert sind.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Die untersuchte chromosomale Region

Bei dem analysierten Abschnitt auf Chromosom 11q12-q13.1 handelt es sich um eine sehr genreiche Region des menschlichen Genoms. Mit wenigstens zehn Genen ist besonders das detailliert analysierte, auf der Sequenz von BAC-Klon CIT-HSP-311e8 und PAC-Klon dJ466A11 basierende, etwa 290 kbp große Intervall aus dem Kern der *VMD2*-Kandidatenregion reich an kodierenden Elementen. Nachdem *FTH1* und *FEN1* bereits bekannt waren, gelang es mit der Identifizierung von *VMD2*, *FADS1*, *FADS2*, *FADS3*, *RAB3IL1*, *C11orf9*, *C11orf10* sowie *C11orf11* insgesamt acht neue Gene zu charakterisieren.

Aufgrund der hohen Dichte sind die einzelnen Gene relativ klein. So überspannt das in vier Exons unterteilte Gen *C11orf10* gerade einmal 3.5 kbp an genomischer Sequenz. Auch *FEN1* (2 Exons, 4.3 kbp) und *FTH1* (4 Exons, 3.3 kbp) sind nicht bedeutend größer. Mit 39.1 kbp genomischer Spannweite ist *FADS2* das größte Gen der Region aber mit nur 12 Exons weniger komplex als das 33.1 kbp umfassende Gen *C11orf9*, welches in 26 Exons unterteilt ist. Auch die intergenischen Abstände sind teilweise auffällig klein. So liegt *C11orf9* beispielsweise lediglich 613 bp proximal zu *C11orf10* und dieses wiederum nur 249 bp proximal zu *FEN1*. (vgl. Abb. 9) Besonders beeindruckend ist die Nähe der Gene, wenn man berücksichtigt, dass *C11orf10* und *FEN1* in 'head to head'-Orientierung zueinander lokalisiert sind, sich also in 249 bp genomischer Sequenz die noch unbekannt Promotorsequenzen bzw. transkriptionsregulierenden Elemente beider Gene befinden. Ebenfalls bemerkenswert ist die enge genomische Nachbarschaft von *VMD2* und *FTH1*. Beide Gene überlappen einander revers-komplementär mit 146 bp in den 3'-untranslatierten Sequenzen, was PETRUKHIN *et al.* (1998) gar zu Spekulationen über einen möglichen funktionellen Zusammenhang der Gene hinsichtlich einer 'antisense'-Expressionsregulation durch die Ausbildung von RNA-RNA-Hybriden verleitete.

Obwohl die zehn Gene insgesamt nur etwa 165 kbp an genomischer DNA überspannen, ist die Existenz weiterer, größerer, also aus mehreren Exons bestehender Gene im untersuchten chromosomalen Intervall aus folgenden Gründen unwahrscheinlich: Erstens lassen sich mit der gängigen 'gene prediction'-Software keine zusätzlichen multiexonischen Gene vorhersagen. Zweitens ist der Anteil an repetitiven Elementen, wie z.B. solchen der Alu-Familie, in den intergenischen Abschnitten der Region sehr hoch und engt somit den Raum für größere Genstrukturen erheblich ein. Besonders auffällig ist hier der enorme Anteil an repetitiven Sequenzen in dem ca. 42 kbp großen Abschnitt zwischen *RAB3IL1* und *VMD2*, der bei über 50% liegt (vgl. Abb. 9). Es ist hingegen nicht auszuschließen, dass bei der Analyse der Region kleine oder 'single-exon'-Gene übersehen wurden. So lassen sich an verschiedenen Positionen vereinzelte EST-Klone kartieren (Daten nicht gezeigt), die prinzipiell Hinweise auf weitere kodierende Sequenzen geben. Meist kann jedoch weder ein offener Leserahmen identifiziert werden, noch lässt sich eine Genstruktur in den flankierenden

Sequenzen vorhersagen. Desweiteren beinhalten die betreffenden EST-Klone häufig repetitive Sequenzelemente der Alu-Klasse und wurden daher wahrscheinlich aufgrund der Bindung des zur cDNA-Synthese verwendeten Oligo-d(T)-Primers an den poly(A)-Abschnitt eines genomischen Alu-'Repeats' amplifiziert. Es würde sich bei diesen EST-Klonen demnach nicht um cDNA-Sequenzen handeln, sondern um genomische, nichttranskribierte Sequenzen.

## 5.2. *VMD2*

Nachdem sich mehrere der in der untersuchten Region befindlichen Gene durch SSCP-Analysen und direkte Sequenzierung von Fragmenten mit auffälligen 'band shifts' als nichtassoziiert mit Morbus Best erwiesen hatten, nämlich *C11orf9*, *C11orf10*, *FADS1*, *FADS2*, *FADS3* und *RAB3IL1*, war mit *TU15B* schließlich das *VMD2*-Gen gefunden. Da die physiologische Funktion des als „Bestrophin“ bezeichneten Translationsprodukts noch immer unbekannt ist, bleibt lediglich festzustellen, dass es sich um ein Membranprotein mit 3-5 Transmembrandomänen handelt, welches hauptsächlich im RPE des Menschen exprimiert wird. MARMORSTEIN *et al.* (2000) lokalisierten das *VMD2*-Protein in der basolateralen Plasmamembran der RPE-Zellen.

Neben dem untranslatierten ersten Exon sowie der Überlappung der 3'-untranslatierten Region mit der von *FTH1* ist der selbstkomplementäre Sequenzabschnitt innerhalb der *VMD2*-mRNA erwähnenswert. Etwa  $\frac{2}{3}$  der Nukleinsäuresequenz von Exon 6 und der Anfang von Exon 7 zeigen deutliche Sequenzidentität zu einem reverskomplementären Abschnitt der 3'-untranslatierten Region (Abb. 11). Durch die mögliche Rückfaltung der Sequenz dürfte eine sehr stabile Sekundärstruktur, ein 'hairpin loop', ausgebildet werden. Diesem Phänomen eine funktionelle, ggf. genregulierende Bedeutung beizumessen, wie sie z.B. FUNG *et al.* (1986) in einem ähnlichen Fall für den 5'-Bereich des Apolipoproteins E der Ratte diskutieren, wäre allerdings zu spekulativ. Immerhin lässt sich aber erklären, warum es sich recht schwierig gestaltete, die *VMD2*-cDNA vollständig, mittels einer einzigen RT-PCR zu amplifizieren. Da die cDNA-Synthese bei nur 42°C oder, unter Verwendung einer weniger temperatursensitiven reversen Transkriptase, bei 50-60°C durchgeführt wird, könnte sich eine stabile Selbstfaltung der mRNA negativ auf die Effizienz der Amplifikation auswirken.

Einzugehen ist auch auf zwei Spleißvarianten von *VMD2*. So repräsentiert der in der GenBank-Datenbank vorhandene, aus Neuronen isolierte EST-Klon zq47a06.r1 (Abb. 10) eine cDNA-Variante des Gens, bei der die Exons 7, 8 und 9 herausgespleißt sind. Das resultierende Transkript ist damit deutlich verkürzt und kodiert für nurmehr 270 statt 585 Aminosäuren. Durch den direkten Übergang von Exon 6 auf Exon 10 wird der Leserahmen verschoben und ein frühes Stopp-Kodon beendet die Translation. Weder durch die 'Northern blot'-Analyse von *VMD2* noch durch vorgenommene RT-PCR-Experimente (Daten nicht gezeigt) konnten bislang Anzeichen dafür gefunden werden, dass ein entsprechendes mRNA-Transkript tatsächlich in höherem Maße in der Zelle transkribiert wird. Natürlich könnte der Klon ein Neuron-spezifisches Transkript repräsentieren, jedoch wurden für die genannten Experimente zur *VMD2*-Expression auch RNA-Extrakte aus Hirn bzw. Kleinhirn

eingesetzt. Vielleicht stellt der EST-Klon lediglich ein seltenes 'nonsense'-Transkript von *VMD2* dar. Die Vermutung, dass in sehr geringen Anzahl funktionslose mRNA-Transkripte in der Zelle angelegt werden könnten, wird noch bei der Besprechung der *VMD2*-verwandten Gene, vor allem von *TU52*, gestützt werden.

Eine weitere Transkriptionsvariante von *VMD2* wurde von PETRUKHIN *et al.* (1998) durch RT-PCR-Analysen gefunden. Es wird ein alternativ gespleißtes Transkript des Gens mit einem verlängerten Exon 7 beschrieben, bei dem der Spleiß-Donor um 203 bp strangabwärts versetzt liegt (Genbank-Nr.: AF057170). Erneut basierend auf einer Verschiebung des Leserahmens und daraus resultierendem, vorzeitigem Translations-Stopp, würde somit ein verkürztes Protein von 435 Aminosäuren Länge synthetisiert. Aufgrund der Tatsache, dass diese Variante von Exon 7 aber ein 'in frame-Alu-Repeat' enthält, welches in der (normalerweise) intronischen Sequenz hinter Exon 7 lokalisiert ist, gehen die Autoren davon aus, dass nur bei Verwendung der regulären Variante von Exon 7 ein funktionell aktives Protein translatiert wird. Eventuell wird also auch hier ein Spleiß-Artefakt von *VMD2* beschrieben.

### 5.3. Mutationen in *VMD2*

Da Morbus Best einem dominanten Erbgang folgt, reicht die Mutation eines Allels zur Entstehung des charakteristischen Phänotyps aus. Es sind jedoch zwei familiäre Fälle dokumentiert, in denen die Erkrankung nur mit geringer oder keiner Penetranz auftritt (WEBER *et al.*, 1994<sup>c</sup>; GRAFF *et al.*, 1997). Berücksichtigt man zudem die generell variable Expressivität des *VMD2*-Phänotyps (siehe Einleitung), kann nicht endgültig ausgeschlossen werden, dass auch andere, ggf. nichtgenetische Faktoren in die Entwicklung des Krankheitsbildes involviert sind.

Derzeit liegen neun Publikationen vor, in denen Mutationen in *VMD2* beschrieben werden (MARQUARDT *et al.*, 1998; PETRUKHIN *et al.*, 1998; CALDWELL *et al.*, 1999; BAKALL *et al.*, 1999; ALLIKMETS *et al.*, 1999; PONJAVIC *et al.*, 1999; KRÄMER *et al.*, 2000; PALOMBA *et al.*, 2000; LOTERY *et al.*, 2000). Es wurden inzwischen 68 Punktmutationen, eine Spleiß-Mutation, eine 2 bp-Deletion ('frame shift'-Mutation) und drei 3 bp-Deletionen in Morbus Best-Patienten nachgewiesen. Die meisten Mutationen liegen dabei in den Exons 2, 4, 6 und 8. Keine Mutation wurden bislang im untranslatierten Exon 1, Exon 9 und dem kodierenden Teil von Exon 11 (kodiert allerdings nur für fünf Aminosäuren) gefunden. Für das mit 639 bp verhältnismäßig große Exon 10 (kodiert 212 Aminosäuren) wurde lediglich eine Mutation, die oben genannte 2 bp-Deletion, beschrieben. Die resultierende Verschiebung des Leserahmens hat einen Abbruch der Peptidkettensynthese an Aminosäureposition 513 zur Folge (CALDWELL *et al.*, 1999).

Die Verteilung der *VMD2*-Mutationen ist in Abb. 39 und 40 veranschaulicht. Der aktuelle Stand der Mutationsanalyse von *VMD2* kann über eine eingerichtete Online-Datenbank unter Internetadresse <http://www.uni-wuerzburg.de/humangenetics/vmd2.html> eingesehen werden. Zudem sind hier alle derzeit bekannten Polymorphismen des Gens einschließlich ihrer Frequenz aufgeführt.

Übertragen auf die korrespondierende Aminosäurepositionen des *VMD2*-Translationsprodukts ist festzustellen, dass besonders in der Region zwischen den Aminosäurepositionen 293 und 311 (kodiert von Exon 8) zahlreiche Mutationen detektiert wurden. Gerade hier konnten für viele Aminosäuren zudem zwei oder mehr unabhängige Alterationen ermittelt werden. Beispielsweise wurde die Deletion  $\Delta I295$  bereits siebenmal gefunden, für Aminosäureposition E300 bereits neunmal die 'missense'-Mutation E300D und dreimal E300K und für Position D301 zwei Deletionen ( $\Delta D301$ ), drei 'missense'-Mutationen D301E und eine 'missense'-Mutation D301N (MARQUARDT *et al.*, 1998; CALDWELL *et al.*, 1999, ALLIKMETS *et al.*, 1999; KRÄMER *et al.*, 2000; LOTERY *et al.*, 2000). Interessant ist auch, dass die beiden Aminosäurepositionen R218 und Y227 mittlerweile neunmal bzw. siebenmal mutiert gefunden wurden (sechsmal R218C, zweimal R218S und einmal R218H; fünfmal Y227N und zweimal Y227C).

Nach Aufklärung der kodierenden Nukleinsäuresequenz der drei *VMD2*-paralogen Gene *TU51*, *TU52* und *TU53* ist festzustellen, dass fast alle *VMD2*-Alterationen Aminosäurepositionen betreffen, die evolutionär konserviert sind. Auf den ersten Blick scheint es dabei zwar eine Reihe von Ausnahmen zu geben, jedoch, bei genauerer Betrachtung von Abbildung 39 zeigt sich, dass die von Mutationen betroffenen Aminosäuren zwar nicht immer identisch in den orthologen Genen von *Drosophila* oder *Caenorhabditis* vorliegen, in der Regel aber zumindest innerhalb der Genfamilie des Menschen konserviert wurden, wie z.B. Q293 oder R141. Nur zwei Mutationen, T91I und G135S, betreffen Aminosäurepositionen, die tatsächlich *VMD2*-spezifisch sind und in den putativen Translationsprodukten von *TU51*, *TU52* und *TU53* auch nicht durch strukturell und/oder funktionell ähnlich zu klassifizierende Aminosäuren besetzt sind.

Es ist anzunehmen, dass Abfolgen konservierter Aminosäuren die für die Funktion entscheidenden Domänen des *VMD2*-Proteins markieren. Mutationen innerhalb dieser Domänen führen offensichtlich selbst dann zur Ausbildung des für Morbus Best charakteristischen Phänotyps, wenn vermeintlich konservative Aminosäuresubstitutionen stattgefunden haben, also Austausch von Aminosäuren ähnlicher Struktur und/oder Funktion, wie z.B. D104E, D301N, D301E oder E306D. Die Beurteilung darüber, wie sich eine Mutation im jeweiligen Falle auswirkt, kann aber natürlich nicht allein über die Feststellung erfolgen, ob es sich bei der substituierten Aminosäure um eine evolutionär konservierte Peptidposition handelt oder nicht, sondern ist vielmehr abhängig von der präzisen Funktion der einzelnen Aminosäure. Derzeit ist nur für wenige *VMD2*-Mutationen die Auswirkung auf das Protein abschätzbar. Dies trifft auf alle Mutationen zu, bei denen Cystein durch Substitution ersetzt (C221W) oder hinzugeführt wird (F17C, W24C, R92C, W93C, R218C, Y227C), da mit der Entfernung oder Einführung von  $\text{CH}_2\text{-SH}$ -Seitenketten in die Peptidkette Möglichkeiten zur Ausbildung strukturstörender Disulfidbrücken innerhalb des Proteins entstehen. Desweiteren sind die potentiell helixdestabilisierenden Mutationen innerhalb der Transmembrandomänen zu nennen, beispielsweise die nichtkonservative 'missense'-Mutation Y85H oder die Deletion  $\Delta F281$ .

Abb. 39

```

5 33 1 1 2 13 1 3 1 1 1
VMD2 1 MTLTYTSCVANAR.LGSSFSLLLCWRGSIYKLLMGEFLIFLQYIIRFYRL..ATEEQOLMFEKTLTYCDYSIQIPLPSFVLGFYVT
TU51 1 MTVTYTRAVANAR.FGGSOLLMLWRGSIYKLLMRELFVAVLYTALSLVYRL..LTGVQKRYFEKLSIYCDRYAEQIPVTFVLGFYVT
TU52 1 MTVTYSKVANATFFG.FHRLLLKWRGSIYKLLMRELFVAVLYTALSLVYRL..LTGVQKRYFEKLSIYCDRYAEQIPVTFVLGFYVT
TU53 1 MTVSYLKVAEAR.FGGSGLLRWRGSIYKLLMKEFLFAGIYAVLSITVYRL..LTQEQRYVMAQVARYCNRSADLIPLSFVLGFYVT
Dm_AAF32327 1 MTLTYTGEVATCRGFGCFLLKLLRWRGSIYKLVWLDLAFLLTIYYANMIVYRF..GNPAQKRETFEAVVOYCDYSRELIPLSFVLGFYVS
Dm_AAF49648 1 MTVSYTAEVATCSHFQGFQKLLMRWRASIKYIIVVDLAFLLSCEYFMAVLYRY..ALRDVDPKPVFEDVMYCHSYSNLIPKFLVGVG
Ce_P34672 1 MTINYNLAVSTSPWT.LFLLKLLKWRGSIYKLLAFLLAVLVLYGILSVYRT..ANPGQORTFERVVOYCDYRSLSYIPLNFMFLGFYVT
Ce_Q17528 1 MTNRYHKEHMTSHPTT.FFLLEFMKSGIYKAVMETIFFLICYGILSVYRT..AGGESSORTFESVVRVFDKRLSYIPLFVFLGFYVT
Ce_P34577 1 MTVSYNQSVASRPWT.FLALIFRWRGSIYKLLIQYVSVLGLVFLVSAIYRF..ISAYQQQFVVRVVDVNSRMSYVPLDWMFLGFYTA
Ce_Q21973 1 MTVNYNLDVSSASIFS.FLRLQLRWRGSIYKLLKELFMFTIAEITVSSVYRSNLI.GEKRKIKVDFNFAALFDQNMDFIPLIFLGFYVT

122 1 221 1 1 2 12
VMD2 88 LVVTRWNNQYENIPWDRMLMSLVSGFVEGKDEQGRLLRRTLRVANEGNVLILRSVSTAVYKRFPSAQHLYOAGFMTPAEIKQLKISLP
TU51 88 LVVNRWWSQYLCMPLDMLMCVVAGTVHGRDRGRLYRRTLMRYAGSAVLIILRSVSTAVYKRFPTIDHVVEAGFMTREBRKKEFNINSS
TU52 88 LVVNRWNNQYVNLPPDRMLMFLSSSVHGSDERGLLRRTLMRYVNLISLIFRSVSTAVYKRFPTMDHVVEAGFMTTDERKLENIHKSP
TU53 88 LVVNRWWSQYTSIPLPDQLMCVYASVHGSDERGLLRRTLRVANASVLIILRSVSTRVLYKRFPTMHHVVDAGFMSQEEKKEISLXSD
Dm_AAF32327 89 IVVTRWNNQYTSIPWDPDIAVYVSSNVHGODERGRMRRITMRVVOCLTIVLANVSPRVYKRFPGLNINVEAGLNDNEKTIITITNKNA
Dm_AAF49648 89 IIVTRWNNQYITIPWDPDIAVYVSAIVRGQDEGRLLRRTLMRYVOCALTMVLSMISVPIKRRFPPTIOLLEVGLLNANEANIMKAVYK
Ce_P34672 88 AVVNRWQTYLQITIGFDNIAGLAAEYVGRTEQARMYRRNIVRYCELAQVLFVFDISMRTRRRFPPTLTVVAAAGFMPHELELDELQYK
Ce_Q17528 88 TVVNRWTKLYQITIGFDNVGLNANCYIRGATEKARIVRRNIMRYCELVQVLFVFDISMRTRRRFPPTMETHVVAAGFMPKHELELNSYDTK
Ce_P34577 88 GVTRRWYLYYDITIGFDNIACSTATYIRGDSERAKQYRRNIVRYCELTQVLFVFDISMKAQRFPPTLTVVAAAGFMPHELELDELQYQYN
Ce_Q21973 90 IIVRRWNDIIVANIGVVENTAITVANYIRGDDRRMIRRNIVRYVMAQVLFVFDICSTQVYKRFPTMESIVASGFSQCLGSSATEYY..

2 1 2 2 9 11 3 7 1 1 1 5
VMD2 178 ...H..NMVWVFWFANLSMKAWLGRIRPILQSLINEMNLLRQCCHLYAYDWSIPLVYTVQVTVAVYSFILTCLVGRQFLNPAK
TU51 178 ...Y..NKYVWVPCVWFSNLAAQARRERGRIRDNALKLVLEELNFRGKCGMLFHYDWSIPLVYTVQVTVAVYSFILTCLVGRQFLDPAQ
TU52 178 ...H..LKYVWVPIWFGNLTAKARNEGRIKSDVLDQSLMTEMNRYRSWCSLLFGYDWMGIPLVYTVQVTVAVYSFIFACLGRQFLDPTK
TU53 178 F....NKYVWVPCVWFNLAAQARRRGRIRDDIALCLLELNKVRKACSMLFHYDWSIPLVYTVQVTVAVYSFALSFLVGRQFVEPEA
Dm_AAF32327 179 FRRP..SKHNLPIVWAASITTRARKEGRIRDDFAVKTIDELNFKFRGCGLLISYDTHSIPLVYTVQVTVAVYSYFIFCCGQQITDGKV
Dm_AAF49648 179 FPKH..PKYVWVPIVWAASIVTRARKEGRIRDDFSLKSMIDELNFKFRAGCNMLIHYDTHSIPLVYTVQVTVAVYSYFVASIFGHQWIDRDI
Ce_P34672 178 YS....KYVWVPCVWFSLTYEARKKGLIESDYQVQVQDEIKKFRFGLAWFCNYDWWPIPELWYBOLVCLAVHYFVCLLARQVWV..S
Ce_Q17528 178 YNSKLGTKYVWIPANWALCMYKARKKGYIESDYFKAQMEGERTRTNIEWVCNYDWWPIPELWYBOLVCLAVNYFVSTIARQVVI..E
Ce_P34577 178 YN....KYFLPFWAWALVYNARKEGLIEGDYVTVISDIDKFRFGLAWFCNYDWWPIPELWYBOLVCLAVHYFVCLLARQVWV..G
Ce_Q21973 178 .....WSTGLVLDARAEGKIAADLLMNEIGKHIEFRKMLALLSNYDWWPIPLAWPQVVFVAVRSYFMAIARQVSLLDG

1 1 1 713 1 621 241 2
VMD2 263 ...AYPG.....HDLDIVP..VFTLQFFFYVWGLKVAEQLINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMHHQDLPRMEIDM
TU51 263 ...GYKD.....HDLDLVCP..FTLQFFFYVWGLKVAEQLINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMYYDDLAVLEKDL
TU52 263 ...GYAG.....HDLDLYHP..FTLQFFFYVWGLKVAEQLINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMHHMSLPRMKKDI
TU53 263 GAAKQKLLKPGQEPAPALGEPDNYVP..FTLQFFFYVWGLKVAEQLINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMYYQNLPPAEKQD
Dm_AAF32327 267 VGNNTYL.....NKVDLYFP..VFTLQFFFYVWGLKVAESLINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMHHHDPBLIKDQ
Dm_AAF49648 267 ...KHYN.....NIVSYF..FSTLQFFFYVWGLKVAEQLINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMHHNDHPQLVARDQ
Ce_P34672 261 .EHADNK.....TEIDLFP..FMSLQFFFYVWGLKVAEAMINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMYYQNLPPAEKQD
Ce_Q17528 266 .KHK.MV.....DEVNYFP..VMTLQFFFYVWGLKVDVDMINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMYYQNLPPAEKQD
Ce_P34577 261 .SEID.P.....DMIDLFP..FMTSLOFFFYVWGLKVGELINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMYYQNLPPAEKQD
Ce_Q21973 254 .KEPEQP.....SILYPTVVFVMSILQFIEVWGLKVAESMINPFGEDDDDFETNMLDRNLQVSLIIVDEMYYQNLPPAEKQD

VMD2 337 YWIKPEPQPPYTAASA.QFRRASFMGSTFNLISNKEEMEFQPNQDEEDAHAGIIGRFLGLQSHDHHPPRANSRTKLLWPKRESLLHEGL
TU51 337 YWDAAEARAPYTAATVFLRQPSFGSTFDITLAKEDMQFQ....RLDGLDGMPEAGPDFLQRLPAGAGMVAGGPLGRRLSFL...L
TU52 337 YWDDSAARPPYTTAAAD.YCIPSFLGSTVQMG
TU53 352 YWDEDQPPYTVTAAESLRPSFLGSTFNL
Dm_AAF32327 344 YWDEVFPNELPYTIAERFRENHEPESTARKEVPKNAAMPSTVSSVRIEMADDASGIHFAGNGKMRDSSPSLVSVSGTLRSRVNTVAS
Dm_AAF49648 341 YWDEVFPALPYAVEADR..AEHPEASTARKEVPKVVPVMTKSEVSLVNDFTFEDDEDEYNPEVTRIFARREFSWKSSVSVSYSDNQ
Ce_P34672 337 FWDH.EV.BILYSEETAIPNNPLKGSVSDVKPEYVHE.IKVVPHCDASPLVPGDEMRRRRVSVVPKPSDQHHHHGHRTSLGNIC
Ce_Q17528 340 FYDVEDV.BILYSEESNIPNHHYHGSVSEVREIQKGNAPVMMPHSQSAANLRRMMSFKSVDEDEKINAFMSHDDARMNRWREVS LD
Ce_P34577 336 FWDHTVW.BILYSEASAHEKRYHQGGSLAHIKGRSVSQ.VRMVPRDGRRASIV....KERIVNVKPVWLARKSEK
Ce_Q21973 331 FWCA.DV.BILYSVETAMIPKNPQIGSAANYDVKVDEE.VMMPHMDDVLDLFD....FESTNNLIPRKTFVSIISQRPFGSRASLARS

VMD2 426 PKNHKAQKQNVRGQEDNKAWKLVKAVDAFKSAPLYQRPYYAPQTPLSPTPMFPPLEPSAPSKLHSVGTIDTKDKSLKTVSSGAKKSFEL
TU51 419 RKNSCVSEASTGASCSCAVVPEGAAPCCSGDPLDPLG.PEPEAPPAGEPELTLIPGVEPFSIVTMPGPRGAPPWLPSPIGEEEBN
Dm_AAF32327 434 ALKRFLLSRDSSRPGSATPSQDQPYKFPASASSASLGAVVGSATSAGKPAGSLRITQQVIEEVDEQATITSMRANDPRPNVMDIFAQTS
Dm_AAF49648 429 SIDTLDKVDENEGDTRTLDSRNKDDFRLRLKEKRDRERNVNRQQAALAMELKG....DLASNGGARSRSRTNVPKN.SDV..QDTR
Ce_P34672 424 EMFRSFKNIERSFSKPHLHDDLGRKTFVSHGMLNEMFEFEGSNTNIADGSHANNNSFTNSAFVNSGEDLSNKRIDTSSSQPLATGKRGSE
Ce_Q17528 429 SSFLADLNE.NKEWKIPTNPQKF
Ce_Q21973 413 K.....RSMMPDQLRGRITAKKQHRSNMFPNSVQSAS.....LHYFESQAPSEINLSTLEMTPARKRSKTKGLGSMNVAAE..Q

VMD2 516 LSESDGALMEHPEVSQVRRKTVEFNLTDMPEIPENHLKEPLEQSPNTIHTTLKDHMDPYWALENRDEAHS
TU51 508 LA
Dm_AAF32327 524 GAGTSGPLQPPPAHSEVPDIPSRPPSYNRAQSQYEPNLFPPGGVDALLSTAPAGGSP.LLSNAATAPSSPVGESSKSLYDPQKASRE
Dm_AAF49648 512 SYLSQKKRKEEDTDNDKDSDESKK
Ce_P34672 514 HPFQHVLDVLEDDDESLENQLTIRKSSVLPQAITLVERFNEATGQLETEVVRDE....KKKKEEELREEDNGKKEK.NKEDKKE
Ce_Q21973 484 HKLSAEVLPVIEEEDERSKMLEKDKNKNA

Dm_AAF32327 613 TVESMDLRSSTDLLGDAAVQPEDEGDDFDKLAEREKELMRQKNIARTISTAPGMEATAVPMVPMVNVAVQQAQLQPVASSADLLA
Ce_P34672 597 EQDRPSRPTRPFFIGVVRSESEDHSHPLRPPTKFE

Dm_AAF32327 703 GGDQFSNSTMKSEDAINGS

```

**Abb. 39** Multisequenz-'Alignment' der Translationsprodukte von *VMD2*, der drei sequenzverwandten Gene *TU51*, *TU52* und *TU53* sowie ausgewählten Proteinen von *Drosophila melanogaster* (abgekürzt als Dm) und *Caenorhabditis elegans* (Ce) incl. der GenBank-Zugangsnummern. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, Aminosäuren ähnlicher chemischer Eigenschaft/Struktur erscheinen grau unterlegt. Ebenfalls angegeben sind die Konsensus-Positionen von drei potentiellen Transmembrandomänen (graue Balken) und die Lage des invarianten RFP-Motives (schwarzer Balken; Beschreibung siehe 4.1.6.). Position und Anzahl der im *VMD2*-Gen gefundenen Mutationen (hier ausschließlich die in Morbus Best-Patienten detektierten Mutationen) sind durch Zahlen markiert. Punkte kennzeichnen die vom 'Alignment'-Programm MultAlign (CORPET, 1988) eingefügten Lücken zur Darstellung maximaler Sequenzübereinstimmung.

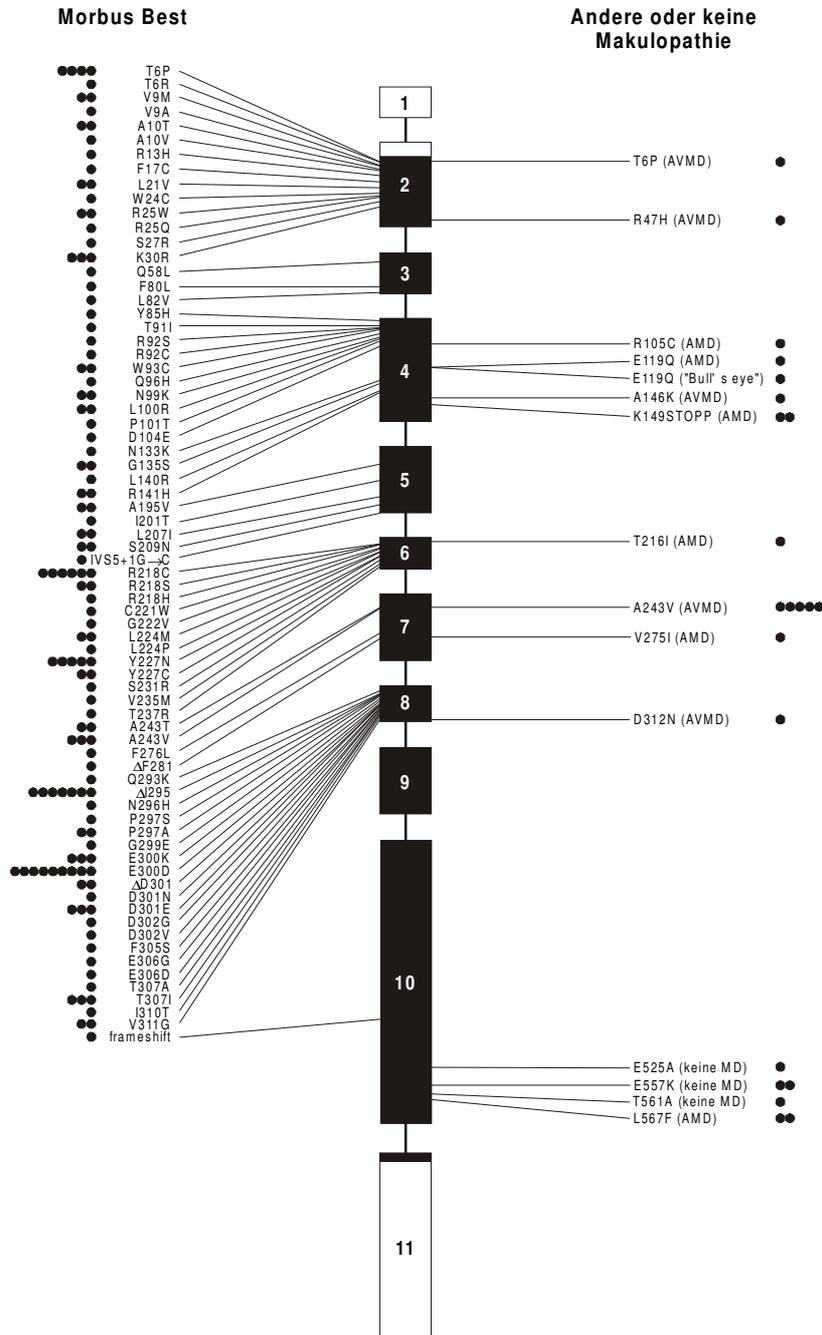
Um die Komplexität der Abbildung möglichst gering zu halten, wurden nicht alle alternativen Translationsprodukte der Gene *TU51* und *TU52* einbezogen. Vielmehr sind 'best fit'-Sequenzen angegeben. Gemeint ist hiermit, dass die gezeigten Aminosäuresequenzen Translationsprodukte darstellen, die bei Berücksichtigung aller verfügbarer *VMD2*-paraloger Exons und Anwendung eines *VMD2* entsprechendem Spleiß-Musters abgeleitet werden können. Die zugrunde liegenden Transkripte konnten in dieser 'full length'-Sequenz bisher weder für *TU51* noch für *TU52* nachgewiesen werden und sind daher noch hypothetisch.

Inzwischen sind drei Fälle komplexer Mutationshaplotypen beschrieben (KRÄMER *et al.*, 2000), bei denen nicht eindeutig definiert werden kann, welche der Alteration krankheitsverursachend ist. Einer der untersuchten Patienten (B-32) trägt sowohl die Spleißstellen-Mutation IVS5+1G→C als auch die 'missense'-Mutation R141H, während in zwei weiteren Patienten (B-29 und B-30) jeweils die beiden 'missense'-Mutationen L21V und S209N vorliegen. Im ersten Falle mag man dazu tendieren, die Alteration der Spleißstelle als schwerwiegender einzuschätzen, da es sich bei der genannten Punktmutation R141H um einen eher konservativen Austausch zweier polarer, ungeladener Aminosäurereste handelt. Andererseits ist hier eine der konservierten Positionen im Protein betroffen. Im letzteren Falle könnte L21V eine folgenschwere Mutation darstellen, da ebenfalls eine eindeutig konservierte Aminosäure betroffen ist. Allerdings ist die Substitution L21V als konservativ einzustufen, während S209N einen nichtkonservativen und daher vermeintlich gravierenderen Aminosäureaustausch darstellt. Es zeigt sich die generelle Problematik bei der Bewertung von Mutationen, wenn keine präzise Kenntnis der funktionell aktiven Domänen des betroffenen Proteins vorliegt.

In diesem Rahmen sollen auch Forschungsarbeiten zur Assoziation von *VMD2*-Mutationen und anderen Makulopathien ähnlichem Phänotyps angeführt werden. Sowohl die im Alter häufigste Makulopathie, die AMD, als auch die seltenere altersbedingte vitelliforme Makuladystrophie (AVMD) haben mit *VMD2* einige phänotypische Merkmale gemeinsam, wie z.B. eine abnormale, subretinale Akkumulation von Lipofuskin oder eine choroidale Neovaskularisierung, wie sie im Spätstadium von *VMD2* auftritt. Nach der Identifizierung des *VMD2*-Gens lag nahe, sowohl Patienten mit AMD als auch solche mit AVMD auf Mutationen in *VMD2* hin zu untersuchen. Entsprechende Forschungen wurden bislang von ALLIKMETS *et al.* (1999) und LOTERY *et al.* (2000) durch die Analyse von 30 AVMD-Fällen und 259 bzw. 321 Fällen von AMD sowie von KRÄMER *et al.* (2000) mit der Prüfung von 200 AMD-Fällen und 32 AVMD-Fällen durchgeführt. LOTERY *et al.* (2000) fanden mit einer Frequenz von 1.5% in fünf der untersuchten AMD-Patienten *VMD2*-Mutationen. Dies sind die 'missense'-Mutationen R105C, E119Q und V275I sowie zwei Stopp-Mutationen an Position K149 (Abb. 40). Die Autoren geben dabei zu bedenken, dass es sich bei der

betroffenen Fraktion der Patienten eventuell nicht um AMD-Fälle, sondern um 'late-onset'-Fälle von VMD2 handeln könnte. ALLIKMETS *et al.* (1999) berichten von drei VMD2-Mutationen in AMD-Patienten (T216I, zweimal L567F). In diesem Zusammenhang ist aber zu berücksichtigen, dass mit etwa gleicher Häufigkeit auch in der Kontrollgruppe, also bei Personen ohne erkennbare Makulopathie, Mutationen im VMD2-Gen nachgewiesen wurden. Dies sind die 'missense'-Mutationen E525A, E557K und T561A. Wie in Abbildung 40 verdeutlicht ist, liegen diese Mutationen, wie auch die Mutation L567F, am Ende von Exon 10, also im C-Terminus des VMD2-Proteins, welcher vermutlich von geringerer funktioneller Bedeutung ist, wenn man berücksichtigt, dass bei Morbus Best-Patienten bislang lediglich eine Mutation in Exon 10 detektiert wurde, nämlich die genannte 2bp-Deletion. Bei L567F könnte es sich also um einen seltenen Polymorphismus mit Aminosäuresubstitution handeln und nicht um eine physiologisch relevante Mutation. Weiterhin stellen die Autoren eine Mutation vor (E119Q), die in einem von 30 Patienten mit 'Bull's eye'-Makulopathie detektiert wurde und die Mutation A146K eines von 30 untersuchten AVMD-Patienten. Keine der genannten Mutationen wurde bislang bei VMD2-Patienten diagnostiziert. Aufgrund der geringen Frequenz schließen die Autoren eine Assoziation von VMD2-Mutationen mit AMD aus. Auch KRÄMER *et al.* (2000) konnten keine Signifikanz für eine Prädisposition von VMD2-Mutationen für AMD ermitteln. Bei der Untersuchung von 200 AMD-Fällen wurde nicht nur keine Mutation detektiert, sondern es ließ sich durch die Analyse von vier häufigen, intragenischen Polymorphismen von VMD2 ( 221T→C, IVS4-24C→T, IVS-del(TCC)<sub>3</sub> und 1410A→G) auch keine Assoziation der entsprechenden Allele zu AMD ermitteln. Bei der Untersuchung von AVMD-Fällen fanden sich in acht von 32 nichtverwandten Patienten die vier 'missense'-Mutationen T6P, R47H, A243V (fünfmal gefunden) und D312N. Hierbei sind die Mutationen T6P und A243V bereits aus Untersuchungen von VMD2-Patienten bekannt und wurden dort mittlerweile viermal bzw. dreimal nachgewiesen. Auffällig ist die Häufung von A243V in den AVMD-Patienten, jedoch wird erneut auf möglicherweise falsche Diagnosen bei der augenärztlichen Untersuchung hingewiesen. Zwar verliefen EOG-Ableitungen an den von der Mutation A243V betroffenen AVMD-Patienten bis auf eine Ausnahme normal, wiesen also nicht auf einen verringerten Hellanstieg nach Dunkeladaption hin, wie er für VMD2 charakteristisch wäre, aber es wird berichtet, dass auch VMD2-Patienten mit der entsprechenden Mutation keinen deutlich abnormalen EOG-Verlauf zeigen. Bei A243V könnte es sich also um eine Mutation milderer Auswirkung handeln, die eine zweifelsfreie Differenzierung von VMD2 und AVMD mittels EOG erschwert. Stimmen die ärztlichen Diagnosen jedoch und es handelt sich tatsächlich um Fälle von AVMD, so wäre der Untersuchung nach, mit einer Frequenz von 8/32 (25%), eine signifikante Anzahl von AVMD-Fällen auf Mutationen im VMD2-Gen zurückzuführen, ein ätiologischer Zusammenhang beider Erkrankungen also naheliegend. Von AVMD ist bekannt, dass die Erkrankung in etwa 18% der Fälle durch Mutationen im *RDS/Peripherin*-Gen ('retinal degeneration slow') verursacht wird (WELLS *et al.*, 1993; FELBOR *et al.*, 1997). Aufgrund der großen Anzahl von AVMD-Patienten ohne Mutation in *RDS/Peripherin* oder VMD2 dürfte an der Manifestation von AVMD in vielen Fällen ein drittes, noch unbekanntes Gen beteiligt sein.

Abb. 40



**Abb. 40** Vertikalschema der genetischen Organisation von *VMD2* und Verteilung aller bislang detektierte Mutationen des Gens in Patienten mit Morbus Best und Patienten mit anderen Makulopathien ähnlichem Phänotyps. Punkte geben die Häufigkeit der jeweiligen Mutation an. Die Exons sind in ihrer Länge proportional zueinander repräsentiert, während die Introns der Übersicht halber nichtproportional dargestellt sind (vgl. Abb. 10). Weiße Abschnitte kennzeichnen die 5'- und 3'-untranslatierten Abschnitte von *VMD2*.

#### 5.4. Die *VMD2*-Genfamilie

Durch die Identifizierung der Nukleinsäuresequenzen von *TU51*, *TU52* und *TU53* gelang die Etablierung einer weiteren Genfamilie des Menschen. Alle drei Gene zeigen eine signifikante Sequenzidentität untereinander und zu *VMD2*, so dass die Genfamilie derzeit aus insgesamt vier Genen besteht. Resultierend aus Untersuchungen des Genoms von *Caenorhabditis elegans* wurden inzwischen 14 sequenzähnliche Translationsprodukte des Fadenwurms isoliert (vier davon sind in Abb. 39 gezeigt) bzw. vorhergesagt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch der Mensch weitere, noch unbekannte Mitglieder der *VMD2*-Genfamilie besitzt. Obwohl die Sequenzidentität zwischen den beiden spezieeigenen Gruppen der Proteine relativ gering ist, sind dennoch einige konservierte Peptidmotive in den Proteinen von *C. elegans* erkennbar, die in ihrer Lage mit konservierten Abschnitten von *VMD2*, *TU51*, *TU52* und *TU53* übereinstimmen. Welche physiologische Funktion die Translationprodukte im dem Tier haben ist indes ebensowenig bekannt wie die des humanen *VMD2*-Proteins oder der putativen Proteine von *TU51*, *TU52* und *TU53*.

Wie gezeigt wurde, gestaltete sich die Expressionsanalyse der *VMD2*-verwandten Gene schwierig. Nachdem 'Northern blot'-Hybridisierungen ergebnislos geblieben waren (nur für *TU51* und *TU52* durchgeführt), wurden deutlich sensitivere RT-PCR-Experimente vorgenommen. Zwar waren hierdurch von allen drei Genen mRNA-Transkripte nachweisbar, genauer, partielle cDNA-Fragmente, jedoch hauptsächlich für die untersuchten Zelllinien, aus denen bekanntermaßen qualitativ hochwertige RNA extrahiert werden kann. Offenbar reicht die durchaus gute Qualität der aus nativem Gewebe isolierten RNA zumindest für den Nachweis entsprechender mRNA-Moleküle von *TU51* (Abb. 27) und *TU53* (Abb. 35) nicht aus. Bei der routinemäßigen Kontrolle mittels RNA-Gelelektrophorese konnten keine Hinweise auf übermäßige Degradation der aus Gewebe isolierten RNA gefunden werden. Außerdem ließ sich aus allen RNA-Extrakten cDNA synthetisieren, die geeignet war, mittels RT-PCR ein Fragment der  $\beta$ -Glucuronidase-mRNA zu amplifizieren, einem erwiesenermaßen gering exprimierten „Haushaltsgen“ (KARGES *et al.*, 1994). Untersuchungen zur Expression in Mäusen lassen darauf schließen, dass dieses Gen z.T. sogar nur mit 1-2 mRNA-Kopien pro Zelle vorliegt (BRACEY und PAIGEN, 1987). Demgegenüber ließen sich für *TU52* lediglich in zwei der Gewebeproben Transkripte nachweisen, nämlich in Prostata und temporalem Cortex.

*TU52* ist allerdings in ganz anderer Hinsicht interessant, denn anstelle eines dem *VMD2*-Gen paralogen Transkripts konnten für das Gen hauptsächlich alternativ gespleißte Transkripte nachgewiesen werden. Vor allem ein vergleichsweise leicht zu amplifizierendes, offenbar abundantes Transkript des Gens, das durch RT-PCR mit den Oligonukleotidprimern TU52-F7 und TU52-R detektiert werden kann (Abb. 31), ist bemerkenswert, da hier die Exons 2 und 3 herausgespleißt sind. Exon 2 enthält aber, analog zum Exon 2 von *VMD2*, das putative Translationsstart-Kodon ATG von *TU52*. Es stellt sich also die Frage, ob und welches ATG-Motiv stattdessen die Translation initiiert. Das nächstmögliche 'in frame'-ATG-Motiv liegt erst 72 bp strangabwärts des Spleiß-Akzeptors von Exon 4. Würde dieses Kodon als Translationsstartpunkt genutzt, käme es zur Synthese eines nur 72 Aminosäuren umfassenden Proteins, denn das hier beschriebene Transkript

von *TU52* ist auch im 3'-gelegenen Bereich keineswegs identisch strukturiert wie *VMD2*. Statt des erwarteten paralogenen Exons (als Exon 5b bezeichnet) folgt auf die Sequenz von Exon 4 ein alternatives, in eine untranslatierte Region übergehendes Exon 5a (vgl. Abb. 38), das keine Sequenzidentität zu *VMD2*, *TU51* oder *TU53* aufweist. Bei der Besprechung des Transkripts darf aber nicht unerwähnt bleiben, dass durch die RT-PCR mit den Primern TU52-F8 und TU52-R auch eine Variante nachweisbar ist, bei der sehrwohl Exon 2 und 3 in die Sequenz integriert sind (gefunden in Prostata und Zelllinie HS683; Abb. 36). Doch auch dieses Transkript endet vorzeitig mit dem zuvor genannten 3'-UTR direkt strangabwärts von Exon 5a. Auffällig ist, dass nur diese beiden Transkripte von *TU52* bislang durch EST-Sequenzen in der dbEST-Datenbank bestätigt sind und zwar durch die beiden Klone nx56g12 und zf24a04. Bei einem Volumen der Datenbank von mehr als 1.8 Millionen EST-Klonen aus diversen menschlichen Geweben, ist erstaunlich, dass von *TU52* bisher kein anderes mRNA-Molekül nachgewiesen wurde. Selbst das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen ist mit über 100 EST-Klonen deutlich stärker in der Datenbank präsent.

Auf die weiteren detektierten Spleißvarianten von *TU52* und den für Exon 9 gefundenen alternativen Spleiß-Akzeptor, wie er in vergleichbarer Form auch für *TU51* nachweisbar ist, soll nicht intensiver eingegangen werden. Nichtzuletzt aufgrund der scheinbar extrem geringen Expression von *TU52* sind zumindest einige der vorgestellten Transkripte womöglich am leichtesten durch natürlich auftretende Fehler beim 'mRNA processing' zu erklären. Es mag sich um Transkripte handeln, die nicht translatiert werden oder zur Synthese funktionsloser Peptidketten führen. Nicht vergessen werden darf auch, dass trotz der grundsätzlich hohen Sensitivität einer RT-PCR-Analyse jeweils zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen angesetzt werden mussten, um überhaupt cDNA-Fragmente in durch eine Gelelektrophorese nachweisbarer Menge zu amplifizieren. Dies gilt nicht nur für *TU52*, sondern ebenso für *TU51* und *TU53*, aber nicht für den Nachweis des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob und welche der vielfältigen *TU52*-Transkripte eine physiologische Funktion erfüllen. Immerhin sind inzwischen zahlreiche Gene mit extrem variablem Spleißmuster bekannt. Z.B. isolierten HULL *et al.* (1994) acht alternativ gespleißte mRNA-Transkripte vom *CFTR*-Gen ('cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene'), von denen einige auch durch zwei PCR-Runden nur schwach amplifizierbar waren. Ebenfalls acht alternative Transkripte fanden KERN *et al.* (1999) für den Thrombospondin-Rezeptor CD36. Beschrieben wird hier ein 'exon skipping' von bis zu 10 von 12 Exons. Zudem wurde bei fünf der Transkripte die Verwendung alternativer Spleiß-Akzeptoren beobachtet. Die unterschiedlichen mRNA-Moleküle werden als möglicherweise genregulierend diskutiert. Als letztes Beispiel soll das menschliche *CTNND1*-Gen ('p120<sup>ctn</sup> catenin gene') dienen, für dessen Translationsprodukt KEIRSEBILCK *et al.* (1998) bis zu 32 Isoformen aufgrund alternativem mRNA-Spleißens und Verwendung von vier potentiellen Translationsstart-Signalen vorhersagen. Nicht ohne Grund wird das alternative Spleißen von Genen generell als Mechanismus diskutiert, der in hohem Maße zur Protein-Diversität eines Organismus' beiträgt (z.B. NADAL-GINARD *et al.*, 1991; LOPEZ, 1998).

Trotz der grundsätzlich geringen Expression von *TU51*, *TU52* und *TU53* könnten die Gene natürlich mit einer Makulopathie oder einer anderen Erkrankung des Menschen assoziiert sein, wie eben das sequenzverwandte *VMD2*-Gen. Dies wurde bislang nicht untersucht. In diesem Zusammenhang soll *VMD1*, die atypischen vitelliforme Makuladystrophie, nicht unberücksichtigt bleiben. Es ist allerdings noch nicht schlüssig bewiesen, dass die Erkrankung auf einem distinkten Gendefekt basiert. Nach Stand der Analysen dürfte in jedem Fall ausgeschlossen werden, dass *TU51*, *TU52* oder *TU53* in die Pathologie von *VMD1* involviert sind, da die Loci der Gene auf Chromosom 19p13.2-p13.12, 12q14.2-q15 bzw. 1p32.3-p33 nicht in Einklang mit dem derzeit vermuteten *VMD1*-Locus auf Chromosom 16p (FERRELL *et al.*, 1983) oder 8q24 (OMIM-Eintrag 153840) stehen.

### 5.5. Die Fettsäuresaturase-Gene *FADS1*, *FADS2* und *FADS3*

Mit *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* stammen drei der charakterisierten Gene aus dem untersuchten Intervall auf Chromosom 11q12-q13.1 aus der Familie der Fettsäuresaturasen.

Der Sättigungsgrad einer Fettsäure wird über die Anzahl ihrer Kohlenstoffdoppelbindungen (C=C) bestimmt. Durch die Aktivität spezifischer Desaturasen werden diese Doppelbindungen in die entsprechenden 'Precursor'-Fettsäuren integriert und dadurch gesättigte Fettsäuren in einfach- oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren überführt. Ungesättigte Fettsäuren sind für jeden Organismus von elementarer Bedeutung und haben in Abhängigkeit von der Anzahl und Position ihrer C=C-Bindungen vielfältige Funktionen. Sie dienen beispielsweise als Ausgangsstoffe für die Biosynthese der Prostaglandine. Auch haben zahlreiche Untersuchungen gezeigt, dass ungesättigte Fettsäuren und deren Derivate an Prozessen der Genregulation beteiligt sind (z.B. CLARKE und JUMP, 1996; SESSLER und NTAMBI, 1998; BLACK *et al.*, 2000). Eingebunden in die Phospholipide liegt eine ihrer wichtigsten Aufgaben aber sicherlich in der Strukturierung biologischer Membranen, denn der Anteil an ungesättigten Fettsäuren und der Grad ihrer jeweiligen Desaturierung haben starken Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften einer Zellmembran und bestimmen ihre Stabilität (SINGER und NICOLSON, 1972; STUBBS und SMITH, 1984). Beispielsweise ist die vierfach ungesättigte Arachidonsäure eine sehr häufige Komponente membranbildender Phospholipide. Eine andere Fettsäure, die sechsfach ungesättigte Docosahexaensäure, findet man spezifisch angereichert in der Retina und dem retinalen Pigmentepithel der Vertebraten. Sie ist ein wesentlicher Bestandteil der Membranstapel in den Photorezeptoren und macht Analysen zufolge in den Phospholipiden der äußeren Segmente der Sehstäbchen bis zu 50% aller dort integrierten Fettsäuren aus (FLIESLER und ANDERSON, 1983).

Die Position der C=C-Bindung in einer Fettsäure wird entweder vom Carboxyl-Ende her definiert (Delta-Fettsäuren) oder aber ausgehend vom Methyl-Ende (Omega-Fettsäuren). Die Benennung der involvierten Desaturasen wird entsprechend abgeleitet. Der Übersicht halber werden die Enzyme in dieser Arbeit ausschließlich der Delta-Nomenklatur folgend bezeichnet, also als „ $\Delta 5$ -Desaturase“; „ $\Delta 6$ -Desaturase“ etc. Grundsätzlich lassen sich drei Klassen von Fettsäuresaturasen unterscheiden: Acyl-CoA-Desaturasen haben an Coenzym A gebundene Fettsäuren zum Substrat, Acyl-ACP-

Desaturasasen modifizieren an Acyl-'Carrier'-Proteine gebundene Fettsäuren und Acyl-Lipid-Desaturasasen führen Doppelbindungen in lipidgebundene Fettsäuren ein (LOS und MURATA, 1998). Den beiden letzten Gruppen gehören die Desaturasasen von Pflanzen und Cyanobakterien an, während die Fettsäuredesaturierung im tierischen Organismus hauptsächlich von Acyl-CoA-Desaturasasen katalysiert wird.

Die Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren basiert auf einem alternierenden Prozess aus Elongation und Desaturierung der Kohlenstoffkette. Linolsäure (18:2<sup>Δ9,12</sup>) und α-Linolensäure (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) dienen hierbei als 'Precursor'-Moleküle für die Synthese der (n-6)- bzw. (n-3)-Gruppen der tierischer Fettsäuren (n definiert die Position der letzten C=C-Bindung vor dem Methyl-Ende der Kohlenstoffkette) und werden hauptsächlich in Arachidonsäure (20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>, auch zu schreiben als 20:4[n-6]), Docosahexaensäure (22:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>, 22:6[n-3]) und Eicosapentaensäure (20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>, 20:5[n-3]) umgewandelt. Als Beispiel für den Metabolismus soll die Arachidonsäure dienen. Sie entsteht aus Linolsäure (18:2<sup>Δ9,12</sup>) durch Δ6-Desaturierung, Kettenverlängerung des Intermediates γ-Linolensäure (18:3<sup>Δ6,9,12</sup>) und einer abschließenden Δ5-Desaturierung der Dihomo-γ-Linolensäure (20:3<sup>Δ8,11,14</sup>) zum Endprodukt 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup> (COOK, 1991).

Im Gegensatz zu Pflanzen und Pilzen sind Tiere in der Regel nicht in der Lage C=C-Bindungen jenseits der Δ9-Position in eine Fettsäure zu integrieren. Aufgrund der detektierbaren Fettstoffwechselprodukte wird angenommen, dass in tierischen Organismen lediglich Δ4-, Δ5-, Δ6- und Δ9-Desaturasasen exprimiert werden. Aus diesem Grund werden Linolsäure (18:2<sup>Δ9,12</sup>) und α-Linolensäure (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>) auch als essentielle Fettsäuren bezeichnet. Sie enthalten C=C-Bindungen oberhalb der Δ9-Position und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Beide Fettsäuren gehören zur Gruppe der C18-Acyl-Ketten und werden in der Pflanze unter Beteiligung von Δ9-, Δ12- und Δ15-Desaturasasen synthetisiert (HARWOOD, 1996). Wie immer bestätigen Ausnahmen die Regel. Für Schaben, Grillen und mehrere Mottenarten wurden inzwischen Δ11- und Δ12-Desaturaseaktivitäten nachgewiesen, bzw. bereits entsprechende Gene isoliert (BORGESON *et al.*, 1990; CRIPPS *et al.*, 1990, KNIPPLE *et al.*, 1998). Die Enzyme sind in den Insekten an der Synthese von Pheromonen auf Basis von Fettsäuren beteiligt (ARSEQUELL *et al.*, 1990; JURENKA, 1997). Erst kürzlich konnte auch aus dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* eine Δ12-Desaturase isoliert werden (PEYOU-NDI *et al.*, 2000). Aus höhergeordneten tierischen Organismen wurden bisher allerdings ausschließlich Gene für Δ5-, Δ6- und Δ9-Desaturasasen bekannt. Hierunter sind sowohl die Δ6- und Δ9-Desaturasasen von Ratte und Maus (THIEDE *et al.*, 1986; NTAMBI *et al.*, 1988; KAESTNER *et al.*, 1989; CHO *et al.*, 1999<sup>a</sup>; AKI *et al.*, 1999) als auch die menschlichen Δ5-, Δ6- und Δ9-Desaturasasen (CHO *et al.*, 1999<sup>b</sup>; CHO *et al.*, 1999<sup>b</sup>; MARQUARDT *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1999). Die Existenz einer distinkten Δ4-Desaturase ist derzeit noch nicht bewiesen.

Seit Jahren gilt den mehrfach ungesättigten Fettsäuren und damit auch den an ihrer Synthese beteiligten Enzymen erhöhte Aufmerksamkeit bezüglich ihrer potentiellen Rolle in der Pathologie unterschiedlichster Erkrankungen des Menschen. Hierzu zählen z.B. chronische Herzerkrankungen (HORROBIN, 1995), entzündliche Immunerkrankungen (CALDER, 1998; FAN und CHAPKIN, 1998;

GRIMBLE und TAPPIA, 1998), Abnormalien der Haut (HORROBIN, 1989; GRATTAN *et al.*, 1990), Bluthochdruck (RUSSO *et al.*, 1997; CHI und GUPTA, 1998), Diabetes (MORI *et al.*, 1997), Asthma (LEICHSENRING *et al.*, 1995; VILLANI, *et al.*, 1998; HODGE *et al.*, 1998), rheumatische Arthritis (JAMES und CLELAND, 1997; ARIZA-ARIZA *et al.*, 1998), die Alzheimer-Krankheit (NAKADA *et al.*, 1990; CORRIGAN *et al.*, 1991) und die Schizophrenie (HELENIAK und LAMOLA, 1986).

Mit der Entdeckung von *FADS1*, *FADS2* und *FADS3* schienen auch in Bezug auf VMD2 vielversprechende Kandidatengene gefunden, da sich die für die Erkrankung charakteristische lipofuskinähnliche Ablagerung im Bereich des retinalen Pigmentepithels zu beträchtlichen Anteilen aus diversen Lipiden zusammensetzen dürfte, wie sie üblicherweise in den altersbedingten Lipofuskinablagerungen des Auges gefunden werden. Eine Störung des Fettsäuremetabolismus durch die Mutation einer der beteiligten Desaturasen war als mögliche Ursache einer abnormalen Akkumulation von Fettstoffwechselprodukten also nicht unwahrscheinlich. Durch die vorgenommenen Mutationsanalysen konnte eine Assoziation mit Morbus Best allerdings für jedes der drei Gene ausgeschlossen werden.

Nachdem *FADS1* und *FADS2* die menschlichen  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Desaturasen repräsentieren (4.2.4.), ist derzeit einzig die spezifische Aktivität von *FADS3* unbekannt. An dieser Stelle sei noch einmal erwähnt, dass auch die  $\Delta 9$ -Desaturase des Menschen bereits kloniert wurde (ZHANG *et al.*, 1999). Sie zeigt allerdings keinerlei Sequenzähnlichkeit zu *FADS1*, *FADS2* oder *FADS3*. Es scheint, als würden  $\Delta 9$ -Desaturasen aus phylogenetischer Sicht generell eine distinkte Gruppe von Fettsäuredesaturasen bilden (vgl. Abb. 19). Das entsprechende humane Gen, *SCD-1*, liegt auf Chromosom 10, besteht aus sechs Exons und kodiert ein Protein von 359 Aminosäuren. Auch in diesen Aspekten unterscheidet sich die  $\Delta 9$ -Desaturase also deutlich von den *FADS#*-Genen.

Betrachtet man die Proteinsequenzidentitäten innerhalb der drei klonierten Fettsäuredesaturasen, erscheint es zunächst unwahrscheinlich, dass es sich bei *FADS3* um eine weitere  $\Delta 6$ - oder  $\Delta 5$ -Desaturase des Menschen handelt, da die Sequenzähnlichkeiten hierzu vermeintlich zu gering sind. Immerhin vermuten aber sowohl MARZO *et al.* (1996) als auch RODRIGUEZ *et al.* (1999) aufgrund von Experimenten zur Umsetzung der (n-6)- und (n-3)-Serien von Fettsäuren, dass es eine zweite  $\Delta 6$ -Desaturase im menschlichen Organismus geben könnte. In diesem Zusammenhang mag also interessant sein, dass *FADS3* in der Aminosäuresequenz eher der  $\Delta 6$ -Desaturase *FADS2* ähnelt, als der  $\Delta 5$ -Desaturase *FADS1*:

*FADS1* ( $\Delta 5$ ) - *FADS3*: 52% Identität

*FADS2* ( $\Delta 6$ ) - *FADS3*: 62% Identität

Bei *Dictyostelium discoideum* wurde erst kürzlich ein Desaturase-Isoenzym gefunden, hier allerdings eines der  $\Delta 5$ -Desaturase (SAITO *et al.*, 2000). Beide Enzyme sind auf Proteinebene nur zu 66% identisch, was belegt, dass die Existenz entsprechender Isoenzyme, bei relativ geringer Sequenzidentität, auch für den Menschen nicht ausgeschlossen werden kann. Da sich bisher in der

dbEST-Datenbank kein menschlicher EST-Klon mit homologer Sequenz findet, der nicht zweifelsfrei einem der drei *FADS*-Gene zugeordnet werden kann, ist zur Zeit davon auszugehen, dass es keine vierte Fettsäuredesaturase des Menschen mit verwandter Sequenz gibt. Es käme demnach also nur *FADS3* als potentielles Isoenzym von *FADS1* oder *FADS2* in Betracht.

Repräsentiert *FADS3* aber weder eine zweite  $\Delta 6$ -Desaturase, noch eine weitere  $\Delta 5$ -Desaturase des Menschen, so könnte es sich stattdessen um eine  $\Delta 4$ -Desaturase handeln. Leider wurde bislang noch keine einzige natürlich vorkommende  $\Delta 4$ -Desaturase isoliert, so dass unbewiesen ist, dass die generell postulierte  $\Delta 4$ -Desaturaseaktivität im tierischen Organismus auf ein distinktes Enzym zurückzuführen ist. VOSS *et al.* (1991) zeigen z.B. für die Umsetzung von Docosapentaensäure ( $22:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$ ) zu Docosahexaensäure ( $22:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ ) in Rattenleber einen alternativen, von einer  $\Delta 4$ -Desaturierung unabhängigen Prozess auf.

Isoliert und eindeutig funktionell charakterisiert wurden hingegen bereits mehrere  $\Delta 8$ -Desaturasen (vgl. Abb. 19), zu denen *FADS3* (und auch *FADS1* und *FADS2*) aber eine ähnlich signifikante Sequenzidentität aufweist wie zu  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Desaturasen (22-27% auf Proteinebene), so dass allein auf Basis der phylogenetischen Analysen keine Vorhersage zur Funktion von *FADS3* gemacht werden kann. Obwohl sich in einigen älteren Publikationen durchaus Anzeichen für  $\Delta 8$ -Desaturierungsprozesse in tierischen Organismen finden lassen, wie z.B. bei der Katze (SINCLAIR *et al.*, 1981), der Ratte (ALBERT und CONIGLIO, 1977) oder auch dem Menschen (NAKAZAWA *et al.*, 1976), ist es dennoch eher unwahrscheinlich, dass *FADS3* eine humane  $\Delta 8$ -Desaturase repräsentiert, da aufgrund heutiger Kenntnisse des Fettsäurestoffwechsels die Existenz von  $\Delta 8$ -Desaturasen in tierischen Organismen ausgeschlossen wird (COOK, 1991). So wurden entsprechende Enzyme bisher auch ausschließlich aus Pflanzen isoliert.

Als Fazit wäre also zu ziehen, dass *FADS3* eventuell tatsächlich ein Isoenzym der  $\Delta 6$ -Desaturase *FADS2* oder der  $\Delta 5$ -Desaturase *FADS1* ist. Für eine mögliche  $\Delta 6$ -Aktivität von *FADS3* sprechen dabei die höhere Sequenzidentität beider Desaturasen und die Hinweise anderer Forscher auf die Existenz einer zweiten humanen  $\Delta 6$ -Desaturase, während für die  $\Delta 5$ -Aktivität spräche, dass bereits entsprechende Isoenzyme in einem anderen Organismus, nämlich dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, nachgewiesen werden konnten. Durch die baldige funktionelle Charakterisierung von *FADS3* wird diesen Spekulationen ein Ende bereitet werden.

## 5.6. Weitere Gene aus der VMD2-Kandidatenregion

Mit *RAB3IL1* ('Rab interacting protein-like 1') liegt ein Gen im analysierten chromosomalen Intervall, dessen Funktion relativ gut vorhersagbar ist, da die ableitbare Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit mit Rabin3 ('Rab3-interacting protein 3') von *Rattus norvegicus* zeigt. Rabin3 wurde von BRONDYK *et al.* (1995) über das 'Yeast two-hybrid system' isoliert und als Protein charakterisiert, das spezifisch mit den Ras-ähnlichen GTPasen Rab3A und Rab3D interagiert. Rab3A wiederum wurde als assoziiert mit den Membranen von Sekretionsvesikeln gefunden und spielt offenbar eine Rolle bei der regulierten Zellsekretion (DARCHEN *et al.*, 1990; HOLZ *et al.*, 1994). Die genaue Funktion des

Rab3A-bindenden Rabin3 ist in diesem Zusammenhang zwar noch unbekannt, aber dennoch war mit *RAB3IL1* ein passabler Kandidat für die genetische Ursache von Morbus Best gefunden, da inzwischen bereits zwei andere Makulopathien des Menschen auf Defekte in GTPase-bindenden Proteinen zurückgeführt werden, nämlich die X-chromosomale Retinitis pigmentosa (MEINDL *et al.*, 1996) und die ebenfalls X-gebundene Chorioideremie (VAN BOKHOVEN *et al.*, 1994; SEABRA *et al.*, 1995). Die begonnene Mutationsanalyse von *RAB3IL1* deutete bereits darauf hin, dass auch in diesem Gen wahrscheinlich nicht die Ursache der Erkrankung liegen würde, als in parallelen Untersuchungen das tatsächliche *VMD2*-Gen identifizieren werden konnte.

Mit *C11orf9*, *C11orf10* und *C11orf11* sind drei weitere Gene in der *VMD2*-Kandidatenregion lokalisiert, deren Funktion noch gänzlich unbekannt ist. *C11orf9* schien aufgrund des ermittelten Expressionsprofils ebenfalls ein guter Kandidat für *VMD2* zu sein, ließ sich für dieses Gen doch eine abundante Expression in der vom retinalen Pigmentepithel abgeleiteten Zelllinie ARPE-19 (DUNN *et al.*, 1996) nachweisen. Damit stand *C11orf9* lange Zeit im Fokus der Analysen, konnte jedoch nach der vollständigen genetischen Charakterisierung und einer umfangreichen Mutationsanalyse definitiv als genetische Ursache von Morbus Best ausgeschlossen werden (STÖHR *et al.*, 2000).

Die bereits länger bekannten Gene *FTH1* und *FEN1* (BOYD, *et al.*, 1984; HENTZE *et al.*, 1986; DHAR *et al.*, 1994; HIRAOKA *et al.*, 1995) kamen aufgrund der Funktion ihrer Translationsprodukte nicht in Betracht, in die Pathologie von Morbus Best involviert zu sein. *FTH1* kodiert die schwere Kette vom Ferritin ('ferritin heavy chain 1'), also die Untereinheit eines eisenspeichernden Proteins, das ubiquitär im Körper exprimiert wird. Es war schwer vorstellbar, dass eine mutationsbedingte Modifikation der Menge oder Aktivität von Ferritin spezifisch eine Makuladegeneration verursacht, ohne dass weitere auffällige Symptome bei den betroffenen Patienten erkennbar werden. Ähnlich verhält es sich mit *FEN1*, einem Gen, das die 'flap endonuclease 1' kodiert. Diese ist u.a. an den grundlegenden Prozessen der zellulären DNA-Replikation und DNA-Reparatur beteiligt. Wie erwähnt wurden die cDNA-Sequenzen von *FTH1* und *FEN1* bereits vor den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen isoliert. Der Vollständigkeit halber wurde auch die chromosomale Organisation auch dieser beiden Gene vorgestellt, zumal sie im Falle von *FEN1* zuvor noch nicht publiziert wurde.

## 6. LITERATUR

ADAMS, M.D., CELNIKER, S.E., HOLT, R.A., EVANS, C.A., GOCAYNE, J.D., AMANATIDES, P.G., SCHERER, S.E., LI, P.W., HOSKINS, R.A., GALLE, R.F., GEORGE, R.A., LEWIS, S.E., RICHARDS, S., ASHBURNER, M., HENDERSON, S.N., SUTTON, G.G., WORTMAN, J.R., YANDELL, M.D., ZHANG, Q., CHEN, L.X., BRANDON, R.C., ROGERS, Y.H., BLAZEJ, R.G., CHAMPE, M., PFEIFFER, B.D., WAN, K.H., DOYLE, C., BAXTER, E.G., HELT, G., NELSON, C.R., GABOR MIKLOS, G.L. *et al.*, SMITH, H.O., GIBBS, R.A., MYERS, E.W., RUBIN, G.M., VENTER, J.C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**: 2185-95.

AKEO, K., HIRAMITSU, T., KANDA, T., YORIFUJI, H. OKISAKA, S. (1996) Comparative effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxide on growth and morphology of bovine retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Curr. Eye Res.*, **15**: 467-476.

AKI, T., SHIMADA, Y., INAGAKI, K., HIGASHIMOTO, H., KAWAMOTO, S., SHIGETA, S., KAZUHISA, O., SUZUKI, O. (1999) Molecular cloning and functional characterization of rat  $\Delta$ -6 fatty acid desaturase. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **255**: 575-579.

ALBERT, D.H., CONIGLIO, J.G. (1977) Metabolism of eicosa-11,14-dienoic acid in rat testes. Evidence for delta8-desaturase activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **489**: 390-396.

ALLIKMETS, R., SEDDON, J.M., BERNSTEIN, P.S., HUTCHINSON, A., ATKINSON, A., SHARMA, S., GERRARD, B., LI, W., METZGER, M.L., WADELIUS, C., CASKEY, C.T., DEAN, M., PETRUKHIN, K. (1999) Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies. *Hum. Genet.*, **104**: 449-453.

ANDERSON, M.J., VIARS, C.S., CZEKAY, S., CAVANEE, W.K., ARDEN, K.C. (1998) Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics*, **47**: 187-199.

ARSEQUELL, G., FABRIAS, G., CAMPS, F. (1990) Sex pheromone biosynthesis in the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* by  $\Delta$ -13 desaturation. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **14**: 47-56.

BAKALL, B., MARKNELL, T., INGVAST, S., KOISTI, M.J., SANDGREN, O., LI, W., BERGEN, A.B., ANDREASSON, S., ROSENBERG, T., PETRUKHIN, K., WADELIUS, C. (1999) The mutation spectrum of the bestrophin protein - functional implications, *Hum. Genet.*, **104**: 383-389.

BASCOM, R.A., LIU, L., HUMPHRIES, P., FISHMAN, G.A., MURRAY, J.C., MCINNES, R.R. (1993) Cloning of the human and murine *ROM1* genes: Genomic organization and sequence conservation. *Hum. Mol. Genet.*, **2**: 385-391.

BATES, G.P., VALDES, J., HUMMERICH, H., BAXENDALE, S., LEPASLIER, D.L., MONACO, A.P., TAGLE, D., MACDONALD, M.E., ALTHERR, M., ROSS, M., BROWNSTEIN, B.H., BENTLEY, D., WASMUTH, J.J., GUSELLA, J.F., COHEN, D., COLLINS, F., LEHRACH, H. (1992) Characterization of a yeast artificial chromosome contig spanning the Huntington's disease gene candidate region. *Nature Genet.*, **1**: 180-187.

BAZAN, H.E., BAZAN, N.G., FEENEY-BURNS, L., BERMAN, E.R. (1990) Lipids in human lipofuscin-enriched subcellular fractions of two age populations. Comparison with rod outer segments and neural retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **31**: 1433-1443.

BAZAN, N.G., GORDON, W.C., RODRIGUEZ DE TURCO, E.B. (1992) Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **318**: 295-306.

BEST, F. (1905) Über eine hereditäre Maculaaffektion: Beitrag zur Vererbungslehre. *Z. Augenheilkd.*, **13**: 199-212.

BIRNDORF, L.A., DAWSON, W.W. (1973) A normal electrooculogram in a patient with a typical vitelliform macular lesion. *Invest. Ophthalmol.*, **12**: 830-833.

BLACK, P.N., FAERGEMAN, N.J., DI RUSSO, C.C. (2000) Long-chain acyl-CoA-dependent regulation of gene expression in bacteria, yeast and mammals. *J. Nutr.*, **130** Suppl.: 305-309.

BORGESON, C.E., DE RENOBALLES, M., BLOMQUIST, G.J. (1990) Characterization of the  $\Delta 12$  desaturase in the American cockroach, *Periplaneta americana*: the nature of the substrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **1047**: 135-140.

BOYD, D., JAIN, S.K., CRAMPTON, J., BARRETT, K.J., DRYSDALE, J. (1984) Isolation and characterization of a cDNA clone for human ferritin heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 4751-4755.

BRACEY, L.T., PAIGEN, K. (1987) Changes in translational yield regulate tissue-specific expression of  $\beta$ -glucuronidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9020-9024.

- BRALEY, A.E., SPIVEY, B.E. (1964) Hereditary vitelline macular degeneration: a clinical and functional evaluation of a new pedigree with variable expressivity and dominant inheritance. *Arch. Ophthalmol.*, **72**: 743-762.
- BREATHNACH, R., CHAMBON, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**: 349-383.
- BRONDYK, W.H., MCKIERNAN, C.J., FORTNER, K.A., STABILA, P., HOLZ, R.W., MACARA, I.G. (1995) Interaction cloning of Rabin3, a novel protein that associates with the Ras-like GTPase Rab3A. *Mol. Cell. Biol.*, **15**: 1137-1143.
- BUCKLER, A.J., CHANG, D.D., GRAW, S.L., BROOK, J.D., HABER, D.A., SHARP, P.A., HOUSMAN, D.E. (1991) Exon amplification: A strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 4005-4009.
- CALDER, P.C. (1998) Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**: 467-490.
- CALDWELL, M.G., KAKUK, L.E., GRIESINGER, I.B., SIMPSON, S.A., NOWAK, N.J., SMALL, K.W., MAUMENEE, I.H., ROSENFELD, P.J., SIEVING, P.A., SHOWS, T.B., AYYAGARI, R. (1999) Bestrophin gene mutations in patients with Best vitelliform macular dystrophy, *Genomics*, **58**: 98-101.
- CHENG, J.F., BOYARTCHUK, V., ZHU, Y. (1994) Isolation and mapping of human chromosome 21 cDNA: progress in constructing a chromosome 21 expression map. *Genomics*, **23**: 75-84.
- CHI, Y., GUPTA, R.K. (1998) Alterations in membrane fatty acid unsaturation and chain length in hypertension as observed by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Am. J. Hypertens.*, **11**: 340-348.
- CHO, H.P., NAKAMURA, M.T., CLARKE, S.D. (1999<sup>a</sup>) Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian  $\Delta$ -6 desaturase. *J. Biol. Chem.*, **274**: 471-477.
- CHO, H.P., NAKAMURA, M.T., CLARKE, S.D. (1999<sup>b</sup>) Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human  $\Delta$ -5 desaturase. *J. Biol. Chem.*, **274**: 37335-37339.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.
- CHURCH, G.M., GILBERT, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 1991-1995.

CHURCH, D.M., STOTLER, C.J., RUTTER, J.L., MURRELL, J.R., TROFATTER, J.A., BUCKLER, A.J. (1994) Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. *Nature Genet.*, **6**: 98-105.

CLARKE, S.D., JUMP, D.B. (1996) Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Lipids*, **31** Suppl.: 7-11.

CLAVERIE, J.-M. (1997) Computational methods for the identification of genes in vertebrate genomic sequences. *Hum. Mol. Genet.*, **6**: 1735-1744.

COLLINS, F.S. (1992) Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nature Genet.*, **1**: 3-6.

COOK, H.W. (1991) Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. 141-169 in *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. VANCE, D.E., VANCE, J.E. (Editoren), Elsevier Amsterdam, London, New York.

COOPER, P.R., NOWAK, N.J., HIGGINS, M.J., SIMPSON, S.A., MARQUARDT, A., STÖHR, H., WEBER, B.H.F., GERHARD, D.S., DE JONG, P.J., SHOWS, T.B. (1997) A sequence-ready high-resolution physical map of the Best macular dystrophy gene region in 11q12-q13. *Genomics*, **41**: 185-192.

COOPER, P.R., NOWAK, N.J., HIGGINS, M.J., CHURCH, D.M., SHOWS, T.B. (1998) Transcript mapping of the human chromosome 11q12-q13.1 gene-rich region identifies several newly described conserved genes. *Genomics*, **49**: 419-429.

CORPET, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, **16**: 10881-10890.

CORRIGAN, F.M., VAN RHIJN, A., HORROBIN, D.F. (1991) Essential fatty acids in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **640**: 250-252.

CRIPPS, C., BORGESON, C., BLOMQUIST, G.J., DE RENOBLES, M. (1990) The  $\Delta$ 12-desaturase from the house cricket, *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae): characterization and form of the substrate. *Arch. Biochim. Biophys.*, **278**: 46-51.

DAILEY, H.A., STRITTMATTER, P. (1980) Characterization of the interaction of amphipathic cytochrome b5 with stearyl coenzyme A desaturase and NADPH:cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.*, **255**: 5184-5189.

- DATSON, N.A., DUYK, G.M., VAN OMMEN, J.B., DEN DUNNEN, J.T. (1994) Specific isolation of 3'-terminal exons of human genes by exon trapping. *Nucl. Acids Res.*, **22**: 4148-4153.
- DARCHEN, F., ZAHRAOUI, A., HAMMEL, M.P., MONTEILS, M.P., TAVITIAN, A., SCHERMAN, D. (1990) Association of the GTP-binding protein Rab3A with bovine adrenal chromaffin granules. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **87**: 5692-5696.
- DEN DUNNEN, J.T. (1999) Cosmid-based exon trapping. *Meth. Enzymol.*, **303**: 100-110.
- DHAR, M., CHAUTHAIWALE, V., JOSHI, J.G. (1993) Sequence of a cDNA encoding the ferritin H-chain from an 11-week-old human fetal brain. *Gene*, **126**: 275-278.
- DONTSOV, A.E., GLICKMAN, R.D., OSTROVSKY, M.A. (1999) Retinal pigment epithelium pigment granules stimulate the photo-oxidation of unsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**: 1436-1446.
- DUNN, K.C., AOTAKI-KEEN, A.E., PUTKEY, F.R., HJELMELAND, L.M. (1996) ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.*, **62**: 155-169.
- FAN, Y.Y., CHAPKIN, R.S. (1998) Importance of dietary gamma-linolenic acid in human health and nutrition. *J. Nutr.*, **128**: 1411-1414.
- FELBOR, U., SCHILLING, H., WEBER, B.H.F. (1997) Adult vitelliform macular dystrophy is frequently associated with mutations in the peripherin/RDS gene. *Hum. Mutat.*, **10**: 301-309.
- FERRELL, R.E., HITNER, H.M., ANTOSZYK, J.H. (1983) Linkage of atypical vitelliform macular dystrophy (VMD-1) to the soluble glutamate pyruvate transaminase (GPT1) locus. *Am. J. Hum. Genet.*, **35**: 78-84.
- FITCH, W.M. (2000) Homology. A personal view on some of the problems. *TIG*, **16**: 227-231.
- FLIESLER, S.J., ANDERSON, R.E. (1983) Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.*, **22**: 79-131.
- FORSMAN, K., GRAFF, C., NORDSTROM, S., JOHANSSON, K., WESTERMARK, E., LUNDGREN, E., GUSTAVSON, K.H., WADELIUS, C., HOLMGREN, G. (1992) The gene for Best's macular dystrophy is located at 11q13 in a Swedish family. *Clin. Genet.*, **42**: 156-159.

FOUNTAIN, J.W., WALLACE, M.R., BRERETON, A.M., O'CONNELL, P., WHITE, R.L., RICH, D.C., LEDBETTER, D.H., LEACH, R.J., FOURNIER, R.E., MENON, A.G., GUSELLA, J.F., BARKER, D., STEPHENS, K., COLLINS, F.S. (1989<sup>a</sup>) Physical mapping of the von Recklinghausen neurofibromatosis region on chromosome 17. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**: 58-67.

FOUNTAIN, J.W., WALLACE, M.R., BRUCE, M.A., SEIZINGER, B.R., MENON, A.G., GUSELLA, J.F., MICHELS, V.V., SCHMIDT, M.A., DEWALD, G.W., COLLINS, F.S. (1989<sup>b</sup>) Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis. *Science*, **244**: 1085-1087.

FROHMAN, M.A., DUSH, M.K., MARTIN, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 8998-9002.

FUNG, W.-P., HOWLETT, G.J., SCHREIBER, G. (1986) Structure and expression of the rat apolipoprotein E gene. *J. Biol. Chem.*, **261**: 13777-13783.

GRAFF, C., FORSMAN, K., LARSSON, C., NORDSTROM, S., LIND, L., JOHANSSON, K., SANDGREN, O., WEISSENBACH, J., HOLMGREN, G., GUSTAVSON, K.H., WADELIUS, C. (1994) Fine mapping of Best's macular dystrophy localizes the gene in close proximity to but distinct from the D11S480/*ROM1* loci. *Genomics*, **24**: 425-434.

GRAFF, C., ERIKSSON, A., FORSMAN, K., SANDGREN, O., HOLMGREN, G., WADELIUS, C. (1997) Refined genetic localization of the Best disease gene in 11q13 and physical mapping of linked markers on radiation hybrids. *Hum. Genet.*, **101**: 263-270.

GRATTAN, C., BURTON, J.L., MANKU, M., STEWART, C., HORROBIN, D.F. (1990) Essential-fatty-acid metabolites in plasma phospholipids in patients with ichthyosis vulgaris, acne vulgaris and psoriasis. *Clin. exp. Dermatol.*, **15**: 174-176.

GREEN, E.D., RIETHMAN, H., DUTCHIK, J., OLSON, M.V. (1991) Detection and characterization of chimeric yeast artificial chromosomes. *Genomics*, **11**: 658-669.

GREENE, A.L., SNIPE, J.R., GORDENIN, D.A., RESNICK, M.A. (1999) Functional analysis of human *FEN1* in *Saccharomyces cerevisiae* and its role in genome stability. *Hum. Mol. Genet.*, **8**: 2263-2273.

GRIMBLE, R.F., TAPPIA, P.S. (1998) Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Z. Ernährungswiss.*, **37**: 57-65.

HARSHMAN, K., BELL, R., ROSENTHAL, J., KATCHER, H., MIKI, Y., SWENSON, J., GHOLAMI, Z., FRYE, C., DING, W., DAYANANTH, P. (1995) Comparison of the positional cloning methods used to isolate the BRCA1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, **4**: 1259-1266.

HARWOOD, J.L. (1996) Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**: 7-56.

HELENIAK, E.P., LAMOLA, S.W. (1986) A new prostaglandin disturbance syndrome in schizophrenia: delta-6-pyroluria. *Med. Hypotheses*, **19**: 333-338.

HENTZE, M.W., KEIM, S., PAPADOPOULOS, P., O'BRIAN, S., MODI, W., DRYSDALE, J., LEONARD, W.J., HARFORD, J.B., KLAUSNER, R.D. (1986) Cloning, characterization, expression, and localization of a human ferritin heavy-chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 7226-7230.

HIRAOKA, L.R., HARRINGTON, J.J., GERHARD, D.S., LIEBER, M.R., HSIEH, C.L. (1995) Sequence of human FEN-1, a structure-specific endonuclease, and chromosomal localization of the gene (*FEN1*) in mouse and human. *Genomics*, **25**: 220-225.

HISAMA, F.M., OSHIMA, J., YU, C.E., FU, Y.H., MULLIGAN, J., WEISSMAN, S.M., SCHELLENBERG, G.D. (1998) Comparison of methods for identifying transcription units and transcription map of the Werner syndrome gene region. *Genomics*, **52**: 352-357.

HOLZ, R., BRONDYK, W.H., SENTER, R.A., KUIZON, L., MACARA, I.G. (1994) Evidence for involvement of Rab3A in  $CA^{2+}$ -dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, **280**: 1-6.

HODGE, L., SALOME, C.M., HUGHES, J.M., LIU-BRENNAN, D., RIMMER, J., ALLMAN, M., PANG, D., ARMOUR, C., WOOLCOCK, A.J. (1998) Effect of dietary intake of omega-3 and omega-6 fatty acids on severity of asthma in children. *Eur. Respir. J.*, **11**: 361-365.

HOFMANN, K., STOFFEL, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **347**: 166.

HORROBIN, D.F. (1989) Essential fatty acids in clinical dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **20**: 1045-1053.

HORROBIN, D.F. (1995) Abnormal membrane concentrations of 20 and 22-carbon essential fatty acids: a common link between risk factors and coronary and peripheral vascular disease? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **53**: 385-396.

- HOU, Y.C., RICHARDS, J.E., BINGHAM, E.L. PAWAR, H., SCOTT, K., SEGAL, M., LUNETTA, K.L., BOEHNKE, M., SIEVING, P.A. (1996) Linkage study of Best's vitelliform macular dystrophy (VMD2) in a large North American family. *Hum. Hered.*, **46**: 211-220.
- HULL, J., SHACKLETON, S., HARRIS, A. (1994) Analysis of mutations and alternative splicing patterns in the CFTR gene using mRNA derived from nasal epithelial cells. *Hum. Mol. Genet.*, **3**: 1141-1146.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**: 860-921.
- ISHIKAWA, K., NAGASE, T., SUYAMA, M., MIYAJIMA, N., TANAKA, A., KOTANI, H., NOMURA, N., OHARA, O. (1998) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins *in vitro*. *DNA Res.*, **5**: 169-176.
- JAMES, M.J., CLELAND, L.G. (1997) Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.*, **27**: 85-97.
- JURENKA, R.A. (1997) Biosynthetic pathway for producing the sex pheromone component (Z,E)-9,12-tetradecadienyl acetate in moths involves a  $\Delta$ 12 desaturase. *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**: 501-505.
- KARGES, W.J., GAEDIGK, R., DOSCH, H.M. (1994) Quantitative analysis of gene expression in different tissues by template-calibrated RT-PCR and laser-induced fluorescence. *PCR Methods Appl.*, **4**: 157-159.
- KEIRSEBILCK, A., BONNÉ, S., STAES, K., VAN HENGEL, J., NOLLET, F., REYNOLDS, A., VAN ROY, F. (1998) Molecular cloning of the human p120<sup>ctn</sup> catenin gene (CTNND1): Expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics*, **50**: 129-146.
- KENNEDY, C.J., RAKOCZY, P.E., CONSTABLE, I.J. (1995) Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: A review. *Eye*, **9**: 763-771.
- KERN, P., KOLOWOS, W., HAGENHOFER, M., FRANK, C., KALDEN, J.R., HERRMANN, M. (1999) Alternatively spliced mRNA molecules of the thrombospondin receptor (CD36) in human PBMC. *Eur. J. Immunogenet.*, **26**: 337-342.
- KLEIN, R., KLEIN, B.E., LINTON, K.L. (1992) Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*, **99**: 933-943.

- KNIPPLE, D.C., ROSENFELD, C.L., MILLER, S.J., LIU, W., TANG, J., MA, P.W., ROELOFS, W.L. (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a pheromone gland-specific acyl-CoA  $\Delta^{11}$ -desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 15287-15292.
- KOBAYASHI, M., ADACHI, N., KOYAMA, H. (1998) Characterization of the 3' untranslated region of mouse DNA topoisomerase II $\alpha$  mRNA. *Gene*, **215**: 329-337.
- KOZAK, M. (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm. Genome*, **7**: 563-574.
- KRÄMER, F., WHITE, K., PAULEIKHOFF, D., GEHRIG, A., PASSMORE, L., RIVERA, A., RUDOLPH, G., ANDRASSI, M., LORENZ, B., ROHRSCHEIDER, K., BLANKENAGEL, A., JURKLIES, B., SCHILLING, H., SCHÜTT, F., HOLZ, F.G., WEBER, B.H.F. (2000) Mutations in the *VMD2* gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. *Eur. J. Hum. Genet.*, **8**: 286-292.
- KROCZEK, R.A., SIEBERT, E. (1990) Optimization of Northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation. *Anal. Biochem.*, **184**: 90-95.
- LEDERER, F. (1994) The cytochrome b5-fold: An adaptable module. *Biochimie*, **76**: 674-692.
- LEE, T.N., SINGER, M.F. (1986) Analysis of LINE-1 family sequences on a single monkey chromosome. *Nucl. Acids Res.*, **14**: 3859-3870.
- LEICHSENRING, M., KOCHSIEK, U., PAUL, K. (1995) (n-6)-Fatty acids in plasma lipids of children with atopic bronchial asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **6**: 209-212.
- LEONARD, A.E., KELDER, B., BOBIK, E.G., CHUANG, L.-T., PARKER-BARNES, J.M., THURMOND, J.M., KROEGER, P.E., KOPCHICK, J.J., HUANG, Y.-S., MUKERJI, P. (2000) cDNA cloning and characterization of human  $\Delta^5$ -desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem. J.*, **347**: 719-724.
- LICHTER, P., TANG, C.J., CALL, K., HERMANSON, G., EVANS, G.A., HOUSMAN, D., WARD, D.C. (1990) High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science*, **247**: 64-69.
- LOPEZ, A.J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: Developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.*, **32**: 279-305.

- LOS, D.A., MURATA, N. (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1394**: 3-15.
- LOTERY, A.J., MUNIER, F.L., FISHMAN, G.A., WELEBER, R.G., JACOBSON, S.G., AFFATIGATO, L.M., NICHOLS, B.E., SCHORDERET, D.F., SHEFFIELD, V.C., STONE, E.M. (2000) Allelic variation in the *VMD2* gene in Best disease and age-related macular degeneration. *IOVS*, **41**: 1291-1296.
- LOVETT, M., KERE, J., HINTON, L.M. (1991) Direct selection: A method for the isolation of cDNAs encoded by large genomic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **88**: 9628-9632.
- MARMORSTEIN, A.D., MARMORSTEIN, L.Y., RAYBORN, M., WANG, X., HOLLYFIELD, J.G., PETRUKHIN, K. (2000) Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (*VMD2*), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **97**: 12758-12763.
- MARQUARDT, A., STÖHR, H., PASSMORE, L.A., KRÄMER, F., RIVERA, A., WEBER, B.H.F. (1998) Mutations in a novel gene, *VMD2*, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **7**: 1517-1525.
- MARQUARDT, A., STÖHR, H., WHITE, K., WEBER, B.H.F. (2000) cDNA cloning, genomic structure and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, **66**: 175-183.
- MARZO, I., ALAVA, M.A., PINEIRO, J.N. (1996) Biosynthesis of docosahexaenoic acid in human cells: evidence that two different  $\Delta 6$ -desaturase activities may exist. *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**: 263-272.
- MEINDL, A., DRY, K., HERRMANN, K., MANSON, F., CICCODICOLA, A., EDGAR, A., CARVALHO, M.R., ACHATZ, H., HELLEBRAND, H., LENNON, A., MIGLIACCIO, C., PORTER, K., ZRENNER, E., BIRD, A., JAY, M., LORENZ, B., WITTEW, B., D'URSO, M., MEITINGER, T., WRIGHT, A. (1996) A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nature Genet.*, **13**: 35-42.
- MITCHELL, A.G., MARTIN, C.E. (1995) A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* delta-9 fatty acid desaturase. *J. Biol. Chem.*, **270**: 29766-29772.

- MOHLER, C.W., FINE, S.L. (1981) Long-term evaluation of patients with Best's vitelliform dystrophy. *Ophthalmology*, **88**: 688-692.
- MORI, Y., MURAKAWA, Y., KATOH, S., HATA, S., YOKOYAMA, J., TAJIMA, N., IKEDA, Y., NOBUKATA, H., ISHIKAWA, T., SHIBUTANI, Y. (1997) Influence of highly purified eicosapentaenoic acid ethyl ester on insuline resistance in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous non-insuline-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, **46**: 1458-1464.
- MOUNT, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucl. Acids Res.*, **10**: 459-473.
- NADAL-GINARD, B., SMITH, C.W., PATTON, J.G., BREITBART, R.E. (1991) Alternative splicing is an efficient mechanism for the generation of protein diversity: contractile protein genes as a model system. *Adv. Enzyme Regul.*, **31**: 261-286.
- NAKADA, T., KWEE, I.L., ELLIS, W.G. (1990) Membrane fatty acid composition shows delta-6-desaturase abnormalities in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, **1**: 153-155.
- NAKAZAWA, I., MEAD, J.F., YONEMOTO, R.H. (1976) In vitro activity of the fatty acyl desaturases of human cancerous and noncancerous tissues. *Lipids*, **11**: 79-82.
- NAPIER, J.A., SAYANOVA, O., STOBART, A.K., SHEWRY, P.R. (1997) A new class of cytochrome b5 fusion proteins. *Biochem. J.*, **328**: 19995-20000.
- NAPIER, J.A., HEY, S.J., LACEY, D.J., SHEWRY, P.R. (1998) Identification of a *Caenorhabditis elegans*  $\Delta$ 6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **330**: 611-614.
- NICHOLS, B.E., BASCOM, R., LITT, M., MCINNES, R., SHEFFIELD, V.C., STONE, E.M. (1994) Refining the locus for Best vitelliform macular dystrophy and mutation analysis of the candidate gene *ROM1*. *Am. J. Hum. Genet.*, **54**: 95-103.
- NORDSTRÖM, S., THORBURN, W. (1980) Dominantly inherited macular degeneration (Best' disease) in a homozygous father with 11 children. *Clin. Genet.*, **18**: 211-216.
- PALOMBA, G., ROZZA, C., ANGIUS, A., PIEROTTET, C.O., ORZALESI, N., PIRASTU, M. (2000) A novel spontaneous missense mutation in *VMD2* gene is a cause of a Best macular dystrophy sporadic case, *Am. J. Ophthalmol.*, **129**: 260-262.

PARIMOO, S., PATANJALI, S.R., SHUKLA, H., CHAPLIN, D.D., WEISSMAN, S.M. (1991) cDNA selection: efficient PCR approach for the selection of cDNAs encoded in large chromosomal DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 9623-9627.

PENOTTI, F.E. (1991) Human pre-mRNA splicing Signales. *J. theor. Biol.*, **150**: 385-420.

PETRUKHIN, K., KOISTI, M.J., BAKALL, B., LI, W., XIE, G., MARKNELL, T., SANDGREN, O., FORSMAN, K., HOLMGREN, G., ANDREASSON, S., VUJIC, M., BERGEN, A.A.B., MCCARTHY-DUGAN, V., FIGUEROA, D., AUSTIN, C.P., METZKER, M.L., CASKEY, C.T., WADELIUS, C. (1998) Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nature Genet.*, **19**: 241-247.

PEYOU-NDI, M.M., WATTS, J.L., BROWSE, J. (2000) Identification and characterization of an animal  $\Delta 12$  fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **376**: 399-408.

PONJAVIC, V.B., EKSANDH, L.B., ANDREASSON, S.B., SJOSTROM, K.B., BAKALL, C.B., INGVAST, C.S., WADELIUS, C., EHINGER, B. (1999) Clinical expression of Best's vitelliform macular dystrophy in Swedish families with mutations in the bestrophin gene. *Ophthalmic Genet.*, **20**: 251-257.

RESZKA, K., ELDRED, G.E., WANG, R.-H., CHIGNELL, C., DILLON, J. (1995) The photochemistry of human retinal lipofuscin as studied by EPR. *Photochem. Photobiol.*, **62**: 1005-1008.

RODRIGUEZ, A., SARDA, P., BOULOT, P., LEGER, C.L., DESCOMPS, B. (1999) Differential effect of N-ethyl maleimide on  $\Delta 6$ -desaturase activity in human fetal liver toward fatty acids of the n-6 and n-3 series. *Lipids*, **34**: 23-30.

ROMMENS, J.M, LIN, B., HUTCHINSON, G.B., ANDREW, S.E., GOLDBERG, Y.P., GLAVES, M.L., GRAHAM, R., LAI, V., MCARTHUR, J., NASIR, J., THEILMANN, J., MCDONALD, H., KALCHMAN, M., CLARKE, L.A., SCHAPPERT, K., HAYDEN, M.R. (1993) A transcript map of the region containing the Huntington disease gene. *Hum. Mol. Genet.*, **2**: 901-907.

RUSSO, C., OLIVIERI, O., GIRELLI, D., GUARINI, P., PASQUALINI, R., AZZINI, M., CORROCHER, R. (1997) Increased membrane ratios of metabolite to precursor fatty acid in essential hypertension. *Hypertension*, **29**: 1058-1063.

RYCHLIK, W., RHOADS, R.E. (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.*, **17**: 8543-8551.

- SAMBROOK, T., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup> edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- SAITO, T., MORIO, T., OCHIAI, H. (2000) A second functional  $\Delta 5$  fatty acid desaturase in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 1813-1818.
- SAYANOVA, O., SMITH, M.A., LAPINSKAS, P., STOBART, A.K., DOBSON, G., CHRISTIE, W.W., SHEWRY, P.R., NAPIER, J.A. (1997) Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta-6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 4211-4216.
- SCHRAERMAYER, U., HEIMANN, K. (1999) Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment. Cell. Res.*, **12**: 219-236.
- SEABRA, M.C., HO, Y.K., ANANT, J.S. (1995) Deficient geranylgeranylation of Ram/Rab27 in choroideremia. *J. Biol. Chem.*, **270**: 24420-24427.
- SELLERI, L., EUBANKS, J.H., GIOVANNINI, M., HERMANSON, G.G., ROMO, A., DJABALI, M., MAURER, S., MCELLIGOTT, D.L., SMITH, M.W., EVANS, G.A. (1992) Detection and characterization of „chimeric“ yeast artificial chromosome clones by fluorescent *in situ* suppression hybridization. *Genomics*, **14**: 536-541.
- SESSLER, A.M. NTAMBI, J.M. (1998) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J. Nutr.*, **128**: 923-926.
- SHANKLIN, J., WHITTLE, E., FOX, B.G. (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochem.*, **33**: 12787-12794.
- SHEETS, M.D., OGG, S.C., WICKENS, M.P. (1990) Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation *in vitro*. *Nucl. Acids Res.*, **18**: 5799-5805.
- SINCLAIR, A.J., SLATTERY, W., MCLEAN, J.G., MONGER, E.A. (1981) Essential fatty acid deficiency and evidence for arachidonate synthesis in the cat. *Br. J. Nutr.*, **46**: 93-96.
- SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**: 720-731.

SOUTHERN, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517.

STÖHR, H., WEBER, B.H.F. (1995) A recombination event excludes the *ROM1* locus from the Best's vitelliform macular dystrophy region. *Hum. Genet.*, **95**: 219-222.

STÖHR, H., MARQUARDT, A., RIVERA, A., KELLNER, U., WEBER, B.H.F. (1998<sup>a</sup>) Refined mapping of the gene encoding the p127 kDa UV-damaged DNA-binding protein (DDB1) within 11q12-q13.1 and its exclusion in Best's vitelliform macular dystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.*, **6**: 400-405.

STÖHR, H., MARQUARDT, A., RIVERA, A., COOPER, P.R., NOWAK, N., SHOWS, T.B., GERHARD, D. AND WEBER, B.H.F. (1998<sup>b</sup>) A gene map of the Best's vitelliform macular dystrophy region in chromosome 11q12-q13.1, *Genome Res.*, **8**: 48-56.

STÖHR, H. (1998<sup>c</sup>) Die Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (VMD2): Molekulargenetische Untersuchungen zur Identifizierung des genetischen Defekts. *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

STÖHR, H., MARQUARDT, A., WHITE, K., WEBER, B.H.F. (2000) cDNA cloning and genomic structure of a novel gene (*C11orf9*) localized to chromosome 11q12→q13.1 which encodes a highly conserved, potential membrane-associated protein. *Cytogenet. Cell Genet.*, **88**: 211-216.

STONE, E., NICHOLS, B.E., STREB, L.M., KIMURA, A.E., SHEFFIELD, V.C. (1992) Genetic linkage of vitelliform macular degeneration (Best's disease) to chromosome 11q13. *Nature Genet.*, **1**: 246-250.

STUBBS, C.D., SMITH, A.D. (1984) The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta*, **779**: 89-137.

TELENIUS, H., CARTER, N.P., BEBB, C.E., NORDENSKJOLD, M., PONDER, B.A., TUNNAcliffe, A. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, **13**: 718-725.

THE EUROPEAN CONSORTIUM ON MEN1 (1997) Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. *Hum. Mol. Genet.*, **6**: 1177-1183.

THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**: 971-983.

THIEDE, M.A., OZOLS, J., STRITTMATTER, P. (1986) Construction and sequence of cDNA for rat liver stearoyl coenzyme A desaturase. *J. Biol. Chem.*, **261**: 13230-13235.

THYLEFORS, B., NEGREL, A.D., PARARAJASEGARAM, R., DADZIE, K.Y. (1995) Global data on blindness. *Bull World Health Organ.* **73**: 115-121.

TROFATTER, J.A., MCCOLLIN, M.M., RUTTER, J.L., MURRELL, J.R., DUYAO, M.P., PARRY, D.M., ELDRIDGE, R., KLEY, N., MENON, A.G., PULASKI, K., HAASE, V.H., AMBROSE, C.M., MONROE, D., BOVE, C., HAINES, J.L., MARTUZA, R.L., McDONALD, M.E., SEIZINGER, B.R., SHORT, M.P., BUCKLER, A.J., GUSELLA, F.J. (1993) A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell*, **72**: 791.

QIN, S., NOWAK, N.J., ZHANG, J., SAIT, S.N.J., MAYERS, P.G., HIGGINS, M.J., CHENG, Y., LI, L., MUNROE, D.J., GERHARD, D.S., WEBER, B.H.F., BRIC, E., HOUSMAN, D.E., EVANS, G.A., SHOWS, T.B. (1996) A high-resolution map of human chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 3149-3154.

VALDES, J.M., TAGLE, D.A., COLLINS, F.S. (1994) Island rescue PCR: A rapid and efficient method for isolating transcribed sequences from yeast artificial chromosomes and cosmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 5377-5381.

VAN BOKHOVEN, H., VAN DEN HURK, J.A.J.M., BOGERD, L., PHILIPPE, C., GILGENKRANTZ, S., DE JONG, P., ROPERS, H.-H., CREMERS, F.P.M. (1994) Cloning and characterization of the human choroideremia gene. *Hum. Mol. Genet.*, **3**: 1041-1046.

VILLANI, F., COMAZZI, R., DE MARIA, P., GALIMBERTI, M. (1998) effect of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids on bronchial hyperreactivity in subjects with seasonal asthma. *Respiration*, **65**: 265-269.

FEINBERG, A.P., VOGELSTEIN, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **137**: 266-267.

VOSS, A., REINHART, M., SANKARAPPA, S., SPRECHER, H. (1991) The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J. Biol. Chem.*, **266**: 19995-20000.

VULPE, C., LEVINSON, B., WHITNEY, S., PACKMAN, S., GITSCHIER, J. (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet.*, **3**: 7-13.

- WADELIUS, C., GRAFF, K., FORSMAN, A., ERIKSSON, O., SANDGREN, J., WEISSENBACH, J., HOLMGREN, G. (1996) Genetic and physical mapping of the gene for Best's macular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, **59**: 1384.
- WAJIMA, R., CHATER, S.B., KATSUMI, O., MEHTA, M.C., HIROSE, T. (1993) Correlating visual acuity and electrooculogram recordings in Best's disease. *Ophthalmologica*, **207**: 174-181.
- WANG, N., ANDERSON, R.E. (1992) Enrichment of polyunsaturated fatty acids from rat retinal pigment epithelium to rod outer segments. *Curr. Eye Res.*, **11**: 783-791.
- WANG, N., ANDERSON, R.E. (1993) Synthesis of docosahexaenoic acid by retina and retinal pigment epithelium. *Biochemistry*, **32**: 13703-13709.
- WARD, D.C., BOYLE, A., HAAF, T. (1995) Fluorescence in situ hybridization techniques. 184-191 in Human Chromosome. VERMA, R.S., BABU, A. (Editoren). *McGraw-Hill Inc.*
- WEBER, B.H.F., WALKER, D., MÜLLER, B., MAR, L. (1994<sup>a</sup>) Best's vitelliform dystrophy (VMD2) maps between D11S903 and PYGM: No evidence for locus heterogeneity. *Genomics*, **20**: 267-274.
- WEBER, B.H.F., VOGT, G., STÖHR, H., SANDER, S., WALKER, D., JONES, C. (1994<sup>b</sup>) High-resolution meiotic and physical mapping of the Best vitelliform macular dystrophy (VMD2) locus to pericentromeric chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.*, **55**: 1182-1187.
- WEBER, B.H.F., WALKER, D., MÜLLER, B. (1994<sup>c</sup>) Molecular evidence for non-penetrance in Best's disease. *J. Med. Genet.*, **31**: 388-392.
- WELEBER, R.G. (1989) Fast and slow oscillations of the electro-oculogram in Best's macular dystrophy and retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.*, **107**: 530-537.
- WELLS, J., WROBLEWSKI, J., KEEN, J. (1993) Mutations in the human retinal degeneration slow (RDS) gene can cause either retinitis pigmentosa or macular dystrophy. *Nature Genet.*, **3**: 213-218.
- WILLIAMSON, M.P. (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.*, **297**: 249-260.
- WILSON, G.M., SUN, Y., SELLERS, J., LU, H., PENKAR, N., DILLARD, G., BREWER, G. (1999) Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the untranslated region. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4056-4064.

WU, C., SHIGUI, Z., SIMPSON, S., DE JONG, P. (1996) DOP-vector PCR: a method for rapid isolation and sequencing of insert termini from PAC clones. *Nucl. Acids Res.*, **24**: 2614-2615.

YATES, J.R., MOORE, A.T. (2000) Genetic susceptibility to age related macular degeneration. *J. Med. Genet.*, **37**: 83-87.

ZANEN, J., RAUSIN, G. (1950) Kyste vitelliforme congénital de la macula. *Bull. Soc. Belge Ophthalmol.*, **79**: 544-549.

ZHANG, L., LAN, G.E., PARIMOO, S., STENN, K., PROUTY, S.M. (1999) Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem.*, **340**: 255-264.

## 7. VERÖFFENTLICHUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DER VORLIEGENDEN WISSENSCHAFTLICHEN ARBEIT

### 7.1. Publikationen

COOPER, P.R., NOWAK, N.J., HIGGINS, M.J., SIMPSON, S.A., MARQUARDT, A., STOEHR, H., WEBER, B.H., GERHARD, D.S., DE JONG, P.J. AND SHOWS, T.B. (1997) A sequence-ready high-resolution physical map of the best macular dystrophy gene region in 11q12-q13. *Genomics*, **41**: 185-192.

MARQUARDT, A., STÖHR, H., PASSMORE, L.A., KRÄMER, F., RIVERA, A. AND WEBER, B.H.F. (1998) Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best' disease). *Hum. Mol. Gen.*, **7**: 1517-1525.

MARQUARDT, A., STÖHR, H., WHITE, K. AND WEBER, B.H.F. (2000) Cloning, genomic structure and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*, **66**: 175-183.

STÖHR, H., MARQUARDT, A., RIVERA, A., KELLNER, U., WEBER, B.H.F. (1998a) Refined mapping of the gene encoding the p127 kDa UV-damaged DNA-binding protein (DDB1) within 11q12-q13.1 and its exclusion in Best's vitelliform macular dystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.*, **6**: 400-405.

STÖHR, H., MARQUARDT, A., RIVERA, A., COOPER, P.R., NOWAK, N., SHOWS, T.B., GERHARD, D. AND WEBER, B.H.F. (1998) A gene map of the Best's vitelliform macular dystrophy region in chromosome 11q12-q13.1. *Genome Res.*, **8**: 48-56.

STÖHR, H., MARQUARDT, A., WHITE, K., WEBER, B.H.F. (2000) cDNA cloning and genomic structure of a novel gene (*C11orf9*) localized to chromosome 11q12→q13.1 which encodes a highly conserved, potential membrane-associated protein. *Cytogenet. Cell Genet.*, **88**: 211-216.

WHITE, K., MARQUARDT, A. AND WEBER, B.H.F. (1999) VMD2 mutations in vitelliform macular dystrophy (Best' s disease) and other maculopathies. *Hum. Mutat.*, **15**: 301-308.

### 7.2. Kongressbeiträge

MARQUARDT, A. (1999) Genomic characterization of 11 genes in 11q12-q13.1, 11. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Nürnberg, Deutschland. (Vortrag)

MARQUARDT, A., STÖHR, H., COOPER, P., NOWAK, N.J., SHOWS, T.B., GERHARD, D.S., WEBER, B.H.F. (1997) Physical map of the Best's disease candidate region in 11q12-q13.1, 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Innsbruck, Österreich. (*Posterpräsentation*)

MARQUARDT, A., STÖHR, H., KRÄMER, F., RIVERA, A., WEBER, B.H.F. (1998) Best's vitelliform macular dystrophy: Refinement of the chromosomal locus and analysis of candidate genes, 10. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Jena, Deutschland. (*Posterpräsentation*)

MARQUARDT, A., STÖHR, H., KRÄMER, F., RIVERA, A., WEBER, B.H.F. (1998) Genomic characterization of 9 novel genes within the core region of the Best's disease locus in 11q12-q13.1, 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Denver, USA. (*Posterpräsentation*)

MARQUARDT, A., STÖHR, H., WHITE, K., WEBER, B.H.F. (2000) Cloning, genomic structure and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family, 12. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Lübeck, Deutschland. (*Posterpräsentation*)

STÖHR, H., MARQUARDT, A., WEBER, B.H.F. (1997) Towards cloning of the Best's disease gene: Generation of a high-density transcription map of the chromosomal region 11q12-13.1, 9. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Innsbruck, Österreich. (*Posterpräsentation*)

STÖHR, H., RIVERA, A., MARQUARDT, A., WEBER, B.H.F. (1998) A transcript map of the Best's vitelliform macular dystrophy region in 11q12-13.1: Isolation and characterization of candidate genes, 10. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Jena, Deutschland. (*Posterpräsentation*)

## 8. WEITERE PUBLIKATIONEN

FELBOR, U., GEHRIG, A., SAUER, C.G., MARQUARDT, A., KÖHLER, M., SCHMID, M., WEBER, B.H.F. (1998) Genomic organization and chromosomal localization of the interphotoreceptor matrix proteoglycan-1 (IMG1) gene: a candidate for 6q-linked retinopathies. *Cytogenet. Cell. Genet.*, **81**: 12-17.

SAUER, C.G., GEHRIG, A., WARNEKE-WITTSTOCK, R., MARQUARDT, A., EWING, C.C., GIBSON, A., LORENZ, B., JURKLIES, B., WEBER, B.H.F. (1997) Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nature Genet.*, **17**: 164-170.

WARNEKE-WITTSTOCK, R., MARQUARDT, A., GEHRIG, A., SAUER, C.G., GESSLER, M., WEBER, B.H.F. (1998) Transcript map of a 900-kb genomic region in Xp22.1-p22.2: Identification of 12 novel genes. *Genomics*, **51**: 59-67.

## 9. ANHANG

### 9.1. GenBank-Zugangsnummern

<i>VMD2</i> :	AH006947
<i>FADS1</i> :	AF084558
<i>FADS2</i> :	AF084559
<i>FADS3</i> :	AF084560

### 9.2. Bezugsquellen für Chemikalien

AGS, AMERSHAM-USB, BIO-RAD, BIOMOL, BIOZYM, DIFCO, FLUKA, GIBCO-BRL, MERCK, PHARMACIA, ROTH, SERVA, SIGMA.

### 9.3. Bezugsquellen für Enzyme

SAP (alkalische Phosphatase aus Shrimps)	AMERSHAM-USB
Exonuklease I	AMERSHAM-USB
KLENOW-DNA-Polymerase	GIBCO/BRL
Restriktionsendonukleasen	AMERSHAM-USB, GIBCO, NEB
Reverse Transkriptase (SuperScript™ II)	GIBCO-BRL
RNase A	SIGMA
RNase H	GIBCO-BRL
T4 DNA-Ligase	AMERSHAM-USB, GIBCO-BRL
T4 Polynukleotidkinase	AMERSHAM-USB
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	GIBCO-BRL
Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase	AMERSHAM/USB

### 9.4. Kits

5'RACE Kit, Rev. 2	GIBCO-BRL
AmpliTaq® FS Dye Terminator	ABI
Centri-Sep®	PRINCETON SEPARATIONS
Nucleospin®	MACHEREY-NAGEL
Nucleospin® Extract 2 in 1	MACHEREY-NAGEL
pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit	STRATAGENE
QIAex® II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAprep® Spin Plasmid Kit	QIAGEN
TA Cloning® Kit	INVITROGEN
Thermo Sequenase radiolabeled terminator cycle sequencing kit	AMERSHAM-USB

### 9.5. Vektoren

pBluescript® II KS (+)	STRATAGENE
pCR-Script™ Amp SK (+)	STRATAGENE
pCR™ II	INVITROGEN

**9.6. Bakterienstämme**

<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	GIBCO-BRL
<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue	STRATAGENE

**9.7. Antibiotika**

Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin	SIGMA
Fungizone, Penicillin	GIBCO

**9.8. Längenstandards**

100 bp Ladder	GIBCO-BRL
1 kb Plus DNA Ladder	GIBCO-BRL

**9.9. Sonstiges Material**

Einweghandschuhe	ASID
Einwegspritzen	BECTON-DICKINSON
Einweg-Plastikpipetten	ELKAY
Filter	SCHLEICHER & SCHÜLL
Falcon <sup>®</sup> -Röhrchen	BECTON-DICKINSON
Fluoreszenzmarker	STRATAGENE
Glaswolle	BOEHRINGER
Kryoröhrchen	NUNC
Küvetten	INVITROGEN
Mikrotiterplatten	NUNC
Nylonmembran Hybond <sup>®</sup> -N <sup>+</sup>	AMERSHAM-USB
Nylonrundfilter	DuPONT
Petrischalen	GREINER
Reaktionsgefäße	EPPENDORF
Röntgenfilme X-OMAT <sup>™</sup>	KODAK
Röntgenfilme A3 NIF 100	KONICA
Sterilfilter	MILLIPORE
Zellkulturflaschen	NUNC

**9.10. Geräte**

Agarosegel-Kammer	GIBCO, PHARMACIA
Filmentwicklermaschine	KODAK
GEIGER-MÜLLER-Zähler	MINI-INSTRUMENTS
Geltrockner	BIO-RAD
Gene Pulser	BIO-RAD
Hybridisierungsöfen	BACHOFER
Inkubator	HERAEUS-SEPATECH
Magnetrührer	JANKE & KUNKEL
Mikrowellengerät	NEFF
PCR-Maschinen	BIOMETRA, BIO-MED, PERKIN-ELMER
pH-Meter	WTW
Pipetten	EPPENDORF, GILSON
Polyacrylamidgel-Kammer	GIBCO
Schüttler	GFL

Spannungsgeräte	GIBCO, PHARMACIA
Speed Vac Concentrator	SERVANT
Sterilbank	SCHOLZEN, HERAEUS-SEPATECH
Heizblock	LIEBISCH
Ultra-Turrax T25	IKA-LABORTECHNIK
UV-Handlampe	SCHLEICHER & SCHÜLL
UV-Crosslinker	STRATAGENE
UV-Transilluminator	BACHOFER
Vacuum-Blotter VacuGene™	PHARMACIA
Vortex L46	HEIDOLPH
Waage	CHYO
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	DuPONT, EPPENDORF, HERAEUS-SEPATECH, HETTICH

### 9.11. Online-Software

GenBank BLAST	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/nuclei_acid-search.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/nuclei_acid-search.html</a> <a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi">http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi</a>
RepeatMasker	<a href="http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker">http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker</a>
TIGR	<a href="http://www.tigr.org/">http://www.tigr.org/</a>
Gene Map	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/</a>
GENATLAS	<a href="http://bisance.citi2.fr/GENATLAS/">http://bisance.citi2.fr/GENATLAS/</a>
GeneCards	<a href="http://www.rzpd.de/cards/">http://www.rzpd.de/cards/</a>
BLASTP, SwissProt	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/protein-search.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/protein-search.html</a>
TMpred	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/struc-predict.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/struc-predict.html</a> <a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>
SOSUI	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/struc-predict.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/struc-predict.html</a>
TopPred	<a href="http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/">http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/</a>
ProDom	<a href="http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html">http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html</a>
GRAIL, FGENES	<a href="http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/gene-search.html">http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/gene-search.html</a>
MultAlign	<a href="http://www.toulouse.inra.fr/multalign.html">http://www.toulouse.inra.fr/multalign.html</a>
CLUSTALW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>
BOXSHADE	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html</a>
OMIM	<a href="http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/">http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/</a>

### 9.12. Sonstige Software

McVector 4.1.4. (KODAK)  
 Gene Runner 3.0 (HASTINGS SOFTWARE INC.)  
 TREECON 1.3b (YVES VAN DE PEER)  
 NAR (RYCHLIK und RHOADS, 1989)  
 Word 2000 (MICROSOFT)  
 CorelDraw 8.0 (COREL CORP.)  
 Photopaint 8.0 (COREL CORP.)  
 Communicator 4.7 (NETSCAPE)

### 9.13. Abkürzungsverzeichnis

AAP	'abridged anchor primer'
AHNAK	Desmoyokin (Nukleoprotein)
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APS	Ammoniumpersulfat
AUAP	'abridged universal anchor primer'
AVMD	adult-vitelliforme Makuladystrophie
BAC	'bacterial artificial chromosome'
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD5	membrangebundenes Glycoprotein von Lymphozyten
CD6	membrangebundenes Glycoprotein von Lymphozyten
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CoA	Coenzym A
cps	'counts per second'
DDB1	'UV-damaged DNA-binding protein 1'
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP	degenerierter Oligonukleotidprimer
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	EPPSTEIN-BARR-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOG	Elektrookulogramm
ERG	Elektroretinogramm
EST	'expressed sequence tag'
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FADS#	'fatty acid desaturase #'
F	Farad
FEN1	'flap endonuclease 1'
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FKS	Fötale Kälberserum
FTH1	'ferritin heavy chain 1'
g	Gramm
GSP#	'gene specific primer' #
h	Stunde
HBSS	HANK's gepufferte Salzlösung
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
$\lambda$ GT10HRET	Retinale cDNA-Bank (Vektor: Phage $\lambda$ GT10)
LINE	'long interspersed nuclear element'
M	molar
m	milli
Mbp	Megabasenpaare
$\mu$	mikro
min	Minute
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
n	nano
N	Normalität
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte
$\Omega$	Ohm

ORF	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAC	'phage artificial chromosome'
PCR	'polymerase chain reaction'
PGA	Pepsinogen A
PNK	Polynukleotidkinase
RAB3IL1	'Rab interacting protein-like 1'
RACE	'rapid amplification of cDNA ends'
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
mRNA	'messenger'-Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
ROM1	'rod outer membrane protein 1'
ROS	'rod outer segment'
RPCI	'Roswell Park Cancer Institute'
RPCI-1	PAC-Bank (erstellt am RPCI, s.o.)
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	'rounds per minute'
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RZPD	'Resource Center Primary Database'
SCD-1	Stearoyl-CoA-Desaturase 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SINE	'short interspersed nuclear element'
SSCA	'single-stranded conformational analysis'
STGD1	Stargardt'sche Makuladystrophie 1
STS	'sequence tag site'
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU#	Transkriptionseinheit #
U	Einheit
UGB	Uteroglobin
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
VMD2	Vitelliforme Makuladystrophie Typ 2
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactosid
YAC	'yeast artificial chromosome'

## LEBENS LAUF

ANDREAS MARQUARDT

geboren am 04.01.1967 in Bremen

---

1973 - 1977	Grundschule an der Melanchthonstraße, Bremen
1977- 1978/79	Orientierungsstufe der Schule an der Helgolander Straße, Bremen
1979 - 1983	Gymnasium an der Helgolander Straße, Bremen
1983 - 1986	Gymnasiale Oberstufe am Schulzentrum des Sekundarbereichs II Walle, Bremen (Leistungskurse: Biologie und Mathematik)
04.06.1986	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

---

02.03.1987 - 31.10.1988	Zivildienst beim DRK Wachmannstraße, Bremen
-------------------------	---

---

1988/89 - 1995	Biologiestudium an der Universität Bremen
17.06.1991	Erwerb des Vordiploms
1994 - 1995	Diplomarbeit bei Prof. Armin Hildebrandt, Labor für Bioanalytik, Universität Bremen. Titel der Arbeit: "Erstellung einer cDNA-Bank der Süßwassermuschel <i>Dreissena polymorpha</i> ."
27.07.1995	Erhalt der Diplomurkunde
01.03.1996 - 30.04.2000	Promotion bei Prof. Bernhard Weber, AG für Ophthalmologie und Onkologie, Institut für Humangenetik, Universität Würzburg. Titel der Arbeit: "Positionsklonierung des Morbus Best-Gens <i>VMD2</i> : Analyse zweier Genfamilien."

---

seit dem 01.10.2000	Scientist in Genomics bei der INGENIUM AG, Martensried/München
---------------------	--