

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Klonierung und Charakterisierung des
murinen *Mlc1*-Gens**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät**

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Verena Steinke

aus Hammelburg

Würzburg, Dezember 2006

Referent: Prof. Dr. med. K.-P. Lesch
Koreferent: Prof. Dr. med. M. Gessler
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Steinke V, Meyer J, Syagailo YV, Ortega G, Hameister H, Mossner R, Schmitt A, Lesch KP:

The genomic organization of the murine Mlc1 (Wkl1, KIAA0027) gene.

J Neural Transm. 2003 Apr; 110(4):333-43

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Das Krankheitsbild der Schizophrenie..... | 1 |
| 1.2 | Hypothesen zur Entstehung der Schizophrenie | 1 |
| 1.3 | Die Periodische Katatonie..... | 2 |
| 1.4 | Das Krankheitsbild der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC)..... | 3 |
| 1.5 | Das Gen <i>KIAA0027/ WKL1/ MLC1</i> | 4 |
| 1.6 | Zugang zu Gensequenzen über öffentliche Datenbanken | 5 |
| 1.7 | Ausblick..... | 5 |
| 1.8 | Fragestellung..... | 6 |
| 2 | Material und Methoden..... | 7 |
| 2.1 | Material | 7 |
| 2.1.1 | Patientenstichprobe | 7 |
| 2.1.2 | Mäuse | 7 |
| 2.1.3 | Bakterienstämme | 7 |
| 2.1.4 | Bibliotheken | 7 |
| 2.1.5 | cDNA-Datenbank..... | 8 |
| 2.1.6 | Oligonukleotide..... | 8 |
| 2.1.7 | Enzyme..... | 14 |
| 2.1.8 | Platten und Medien..... | 14 |
| 2.1.9 | Puffer und Lösungen | 14 |
| 2.1.10 | Chemikalien..... | 15 |
| 2.1.11 | Reagenziensätze | 17 |
| 2.1.12 | Geräte | 17 |
| 2.1.13 | Gebrauchswaren | 18 |
| 2.1.14 | Software..... | 19 |
| 2.2 | Methoden..... | 19 |
| 2.2.1 | Gewinnung von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen | 19 |
| 2.2.1.1 | Isolation von DNA aus humanen Leukozyten | 19 |
| 2.2.1.2 | Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen..... | 19 |
| 2.2.2 | Durchsuchen der elektronischen cDNA-Datenbank | 21 |
| 2.2.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 21 |
| 2.2.3.1 | Amplifikation vom DNA-Fragmenten mittels PCR..... | 21 |
| 2.2.3.2 | RT-PCR zur Gewinnung von cDNA..... | 23 |
| 2.2.3.3 | 5'-RACE..... | 24 |
| 2.2.4 | Gelelektrophorese..... | 27 |
| 2.2.4.1 | Agarosegele | 27 |
| 2.2.4.2 | Polyacrylamidgele | 28 |
| 2.2.5 | Isolation von DNA aus Agarose-Gelen..... | 29 |
| 2.2.6 | Reinigung von DNA mittels Ethanol fällung | 29 |
| 2.2.7 | Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA | 30 |
| 2.2.8 | Sequenzierung von DNA..... | 30 |
| 2.2.9 | Durchsuchen der genomischen Maus-Bibliothek..... | 32 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2.10 | Bakterienkulturen | 32 |
| 2.2.10.1 | Bakterienplattenkulturen | 32 |
| 2.2.10.2 | Bakterienflüssigkulturen | 33 |
| 2.2.11 | Isolation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus Bakterien | 33 |
| 2.2.11.1 | Präparation nach dem <i>QIAGEN-Miniprep</i> -Protokoll | 33 |
| 2.2.11.2 | Präparation nach dem <i>QIAGEN-Midi- und Maxiprep</i> -Protokoll | 34 |
| 2.2.11.3 | Präparation nach dem <i>NucleoBond</i> -Protokoll | 34 |
| 2.2.12 | Restriktionsfragmentanalyse von DNA..... | 35 |
| 2.2.13 | Southern-Blot-Analyse von DNA-Fragmenten..... | 36 |
| 2.2.13.1 | Übertragung der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran..... | 36 |
| 2.2.13.2 | Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten..... | 37 |
| 2.2.13.3 | Hybridisierung der DNA | 37 |
| 2.2.14 | Klonierung von DNA-Fragmenten..... | 38 |
| 2.2.14.1 | Ligation | 38 |
| 2.2.14.2 | Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation..... | 39 |
| 2.2.14.3 | Selektion transformierter Zellen..... | 40 |
| 3 | Ergebnisse | 41 |
| 3.1 | Durchsuchen einer Maus-EST-Datenbank nach <i>MLC1</i> -homologen Sequenzen..... | 41 |
| 3.2 | Sequenzierung der <i>Mlc1</i> -cDNA..... | 42 |
| 3.3 | Isolierung und Kartierung von genomischen Klonen des <i>Mlc1</i> -Gens | 42 |
| 3.4 | Versuch einer Isolation des Klon 2-Inserts | 45 |
| 3.5 | Erweiterung des 5'-Bereichs der cDNA | 46 |
| 3.6 | Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch 5'-RACE | 46 |
| 3.7 | Beschreibung der <i>Mlc1</i> -cDNA und des resultierenden Proteins..... | 48 |
| 3.8 | Vergleich des humanen und des murinen Proteins..... | 50 |
| 3.9 | Klonierung des 3'-Endes der cDNA..... | 51 |
| 3.10 | Analyse der genomischen Organisation des <i>Mlc1</i> -Gens | 52 |
| 3.11 | Untersuchung der Promotorregion von <i>Mlc1</i> | 56 |
| 3.12 | Sequenzierung des <i>MLC1</i> -Gens bei einem nicht erkrankten Träger der C1121A-Mutation in Exon 11..... | 58 |
| 3.13 | Untersuchung der humanen <i>MLC1</i> -cDNA auf alternatives <i>Splicing</i> | 58 |
| 4 | Diskussion | 62 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 72 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 73 |
| 7 | Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole..... | 78 |
| 8 | Anhang | 80 |

1 Einleitung

Seit die Menschen mit dem abstrakten Denken begonnen haben, versuchen Wissenschaftler und Philosophen zu verstehen, wie der Verstand beschaffen ist und funktioniert. Faszinierend waren in diesem Zusammenhang die krankhaften Geisteszustände, die verschiedensten Formen des „Wahnsinns“. Die Epilepsie wurde lange Zeit als „göttliche Krankheit“ angesehen, Epileptiker galten als von Gott beseelt, was einem ersten Erklärungsversuch für die Entstehung dieser neurologischen Erkrankung entspricht. Heute wissen wir zwar, dass der Verstand seinen Sitz nicht etwa im Zwerchfell hat, wie die Griechen glaubten, sondern im zentralen Nervensystem mit seinen Neuronen und Nervenbahnen, doch viele der komplexen Funktionen dieses besonderen Organs bleiben nach wie vor im Verborgenen. Gerade die Pathogenese der neurologischen Erkrankungen ist noch weitgehend unerforscht.

1.1 Das Krankheitsbild der Schizophrenie

Eine der häufigsten Formen dieser Fehlfunktionen des Verstandes ist die Schizophrenie, die mit einer Lebenszeitprävalenz von 1 % auftritt. Dabei handelt es sich bei der Schizophrenie nicht um ein einheitliches Erkrankungsbild, sondern viel mehr um eine Gruppe von Erkrankungen, der gewisse Grundmerkmale gemeinsam sind. Der Begriff „Schizophrenie“ wurde von dem Psychiater Eugen Bleuler geprägt. Er bezeichnet eine Spaltung (von griech. „σχίζειν“, abspalten) der Seele (von griech. „φρην“, Zwerchfell, Seele), des Denkens, des Handelns und der Gefühlswelt. Typisches Symptom ist der Wahn, der z.B. als Verfolgungswahn oder als Wahnidee in Erscheinung treten kann. Zusätzlich treten akustische Halluzinationen, Denkstörungen und Verflachung der Gefühlswelt auf. Die Erkrankung beginnt meist zwischen der Pubertät und dem dreißigsten Lebensjahr und verläuft häufig schubweise. Die Erkrankten ziehen sich von der Außenwelt zurück, nicht selten kommt es zum Suizid.

1.2 Hypothesen zur Entstehung der Schizophrenie

Das klinische Bild der Schizophrenie ist wahrscheinlich auf unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen zurückzuführen. Eine gängige Theorie für die Entstehung ist die neurale Entwicklungshypothese. Bei diesem Modell geht man davon aus, dass äußere Einflüsse wie beispielsweise Hypoxie unter der Geburt zu einer

Störung der Gehirnentwicklung führen und so eine Funktionsstörung nach sich ziehen können. Durch psychosoziale Auslöser soll es schließlich zum Auftreten der schizophrenen Symptomatik kommen.

Es gibt zahlreiche klinische Hinweise dafür, dass für die Entstehung des Krankheitsbildes hirnorganische Funktionsstörungen verantwortlich sein können. So wurden schizophrene Symptome im Zusammenhang mit hohem Fieber, Ezehalitiden, traumatischen Einwirkungen und hypoxischen Zuständen beobachtet. Allgemein bekannt sind auch die Effekte von halluzinogenen Substanzen wie beispielsweise LSD oder Mescaline. Die Ausbildung schizophrener Symptome scheint daher eine Reaktion des Gehirns auf bestimmte Funktionsstörungen zu sein.

Allerdings fällt auf, dass in einigen Familien eine deutliche Häufung von schizophrenen Erkrankungen zu beobachten ist. Neben exogenen Faktoren scheint es auch genetische Faktoren zu geben, die für die Ausbildung der Krankheitssymptome verantwortlich sind. Die familiäre Häufung von Krankheitsfällen stellt aus wissenschaftlicher Sicht eine interessante Situation dar, aus der wertvolle Informationen über die genetischen Ursachen der Erkrankung gewonnen werden können. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Kopplungsanalysen in Familien mit Schizophrenieerkrankungen durchgeführt (Riley und McGuffin, 2000 u.a.). Hierbei konnte eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert werden, deren Veränderung bei der Krankheitsentstehung möglicherweise eine Rolle spielt. Schmidt-Kastner und Mitarbeiter zeigten zuletzt, dass die Expression von vielen dieser Gene durch Hypoxie reguliert wird (Schmidt-Kastner *et al.*, 2006). Denkbar wäre, dass ein primärer durch Mutation des Gens bedingter Ausfall eines Proteins in der Gehirnentwicklung einen ähnlichen Effekt hat wie die hypoxische *Down-Regulation* der Genexpression während der Entwicklungszeit der Neurone.

Insgesamt geht man heute bei der Pathogenese der Schizophrenie von einem multifaktoriellen Modell aus, bei dem neben äußeren Einflüssen und psychosozialen Auslösern auch genetische Faktoren eine Rolle spielen.

1.3 Die Periodische Katatonie

Eine familiäre Häufung fällt besonders bei einer seltenen Unterform der Schizophrenie, der Periodischen Katatonie, auf. Sie gehört laut Leonhard (Leonhard, 1995) zu den unsystematischen Schizophrenien und ist vor allem durch qualitative Veränderungen der Psychomotorik gekennzeichnet. Neben hyperkinetischen Phasen mit psycho-

motorischer Erregung, Iterationen und Stereotypien treten hypo- oder akinetische Phasen mit Stupor, Negativismus, Haltungstereotypien und Perseverationen auf. Zusätzlich kommen häufig Halluzinationen, Wahnvorstellungen, depressive Verstimmungen und Aggressivität hinzu. Verwandte von Patienten, die an Periodischer Katatonie erkrankt sind, haben ein deutlich höheres Risiko, ebenfalls zu erkranken als die Normalbevölkerung (Stöber *et al.*, 1995). Offensichtlich ist eine genetische Komponente bei der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt. Die Würzburger Forschergruppe führte daher eine Kopplungsanalyse in Familien mit Periodischer Katatonie durch. Sie fanden einen Genort auf Chromosom 15 (15q15), welcher sehr wahrscheinlich mit der Erkrankung gekoppelt vererbt wird (Stöber *et al.*, 2000). Gleichzeitig gab es, vor allem basierend auf den Daten einer großen Familie mit 7 erkrankten Mitgliedern, Hinweise auf eine Kopplung mit einem weiteren Genort auf dem langen Arm von Chromosom 22. Mitarbeiter unserer Forschungsgruppe untersuchten daraufhin das Genom der Patienten auf das Vorhandensein von Mutationen in dieser Region. Sie führten hierzu eine Sequenzanalyse von verschiedenen in dieser Region gelegenen Genen durch. Eines dieser Kandidatengene war *KIAA0027*, ein aus 12 Exons bestehendes und etwa 28 Mb umfassendes Gen (Nomura *et al.*, 1994). Die Sequenzanalyse des Gens *KIAA0027* im Genom der an Periodischer Katatonie erkrankten Patienten erbrachte schließlich eine Mutation in der kodierenden Sequenz dieses Gens, welche mit der Krankheit vererbt wurde (Meyer *et al.*, 2001). Der Austausch von Cytosin zu Adenin (C1121A) in Exon 11 dieses Gens führt zum Ersatz der Aminosäure Leucin an Position 309 des Proteins durch Methionin (Leu309Met).

1.4 Das Krankheitsbild der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC)

Wenig später veröffentlichten Leegwater und Mitarbeiter eine Arbeit, in der sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen Veränderungen im *KIAA0027*-Gen und einer anderen Erkrankung des zentralen Nervensystems beschrieben, der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (Leegwater *et al.*, 2001). Diese Erkrankung wurde erstmalig 1995 von van der Knaap beschrieben und auch nach ihr benannt (van der Knaap, 1995). Es handelt sich bei dieser Erkrankung um eine autosomal-rezessiv vererbte Form der Leukoenzephalopathie, die bereits im frühen

Kindesalter beginnt. Sie ist gekennzeichnet durch einen langsam progredienten Verfall der motorischen Funktionen mit Ataxie und Spastik, zusätzlich treten häufig epileptische Anfälle auf. Die intellektuellen Fähigkeiten werden erst Jahre nach Krankheitsbeginn und meist in geringem Ausmaß beeinträchtigt. Als morphologisches Korrelat zeigt sich in der MRT-Bildgebung bereits vor dem Auftreten der ersten Symptome eine hemisphärische Zystenbildung der weißen Substanz, vor allem im anterior-temporalen Bereich. In Gehirnbiosaten von Patienten fanden sich spongiforme Veränderungen der weißen Substanz mit Vakuolen zwischen den äußeren Lamellen der Myelinscheiden (van der Knaap, 1996).

Die Forscher um Leegwater fanden insgesamt 13 verschiedene Mutationen von *KIAA0027*, welche zur Ausprägung des MLC-Phänotyps führen. Sie benannten das Gen daher „*MLC1*“. Mittlerweile sind in der Literatur an die 50 verschiedene Mutationen beschrieben. Bei etwa 20 % der MLC-Patienten konnte jedoch keine Mutation in *MLC1* nachgewiesen werden. Ilja Boor und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Erkrankung in einigen Familien unabhängig vom *MLC1*-Lokus vererbt wird, was dafür spricht, dass bei der Entstehung der Erkrankung noch ein weiteres Gen beteiligt ist. (Ilja Boor *et al.*, 2006) Die Forschergruppe um Montagna führte zuletzt funktionelle Studien an bekannten *MLC1*-Mutationen durch. Sie konnten jedoch keinen Zusammenhang zeigen zwischen den einzelnen Mutationen, dem klinischen Krankheitsbild bei den einzelnen Patienten und der Expression des mutierten Proteins an der Plasmamembran (Montagna *et al.*, 2006). Denkbar ist, dass für die Entstehung der MLC und den Ausprägungsgrad der klinischen Erkrankung, ähnlich wie man bei der Schizophrenie vermutet, neben genetischen Faktoren auch exogene Auslöser eine Rolle spielen können.

1.5 Das Gen *KIAA0027/ WKL1/ MLC1*

Das Gen *KIAA0027* wurde zuerst von Nomura und Mitarbeitern beschrieben als eines von 40 neuen Genen, welche die Forschergruppe durch Sequenzierung von cDNA-Klonen einer unreifen myeloiden Zelllinie identifizierte (Nomura *et al.*, 1994). Die Northern-Blot-Analyse zeigte eine relativ hohe Expression des Gens im Gehirn, in geringerem Maße auch in weißen Blutkörperchen und in der Milz, ferner auch in Ovar, Plazenta, Prostata, Thymus und Lunge. Über die Funktion des von *KIAA0027* kodierten Proteins ist bislang wenig bekannt. Wie oben beschrieben konnte unsere Forschungsgruppe einen Gendefekt in *KIAA0027* nachweisen, der in einer großen Familie mit der

Periodisch Katatonen Schizophrenie gekoppelt vererbt wird. Das Gen wurde von unserer Forschungsgruppe in „*WKL1*“ umbenannt. Leegwater *et al.*, zeigten wenig später einen Zusammenhang zwischen Mutationen in *KIAA0027* und dem Auftreten von Megalenzephaler Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC) (Leegwater *et al.*, 2001). Nach dieser Erkrankung erhielt das Gen durch das Nomenklatur-Komitee der *Human Genome Organisation* (HUGO) seinen endgültigen Namen „*MLC1*“.

1.6 Zugang zu Gensequenzen über öffentliche Datenbanken

Die Gensequenz von *MLC1* wurde in der *GenBank*-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), einer Unterorganisation des *National Institute of Health* (NIH), veröffentlicht. Jeder Eintrag in dieser Datenbank wird durch eine Zugriffsnummer (*GenBank Accession No.*) identifiziert und ist allgemein zugänglich. Das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) ermöglicht den Vergleich einer gegebenen Sequenz mit den Einträgen der Datenbank.

In dieser Datenbank befinden sich unter anderem auch die Einträge der cDNA-Bibliothek des I.M.A.G.E.-Konsortiums (*Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression*), das 1993 mit dem Ziel gegründet wurde, die Ergebnisse der Genforschung zu sammeln, zu ordnen und allgemein zugänglich zu machen (Lennon *et al.*, 1996). Das Konsortium stellt eine große Sammlung von cDNA-Klonen für die weitere Forschung zur Verfügung, mit der Bedingung, dass die auf der Grundlage dieser Klone gewonnen Informationen wieder öffentlich zugänglich gemacht werden. Jeder Klon wird durch eine I.M.A.G.E.-Identifikationsnummer gekennzeichnet, die davon abgeleiteten Sequenzen werden in den öffentlich zugänglichen Datenbanken gespeichert. Da die Sammlung neben humanen Sequenzen auch eine Vielzahl von Klonen anderer Spezies wie Maus, Ratte, Zebrafisch und Fugu beinhaltet, wird es so möglich, zu einem bekannten humanen Gen homologe Gene bei anderen Spezies zu ermitteln.

1.7 Ausblick

Nach bisherigem Stand der Forschung sind Veränderungen des *MLC1*-Gens verantwortlich für die Erkrankung an MLC, einer schweren Form der Leukodystrophie. Unsere Forschungsgruppe konnte außerdem einen Zusammenhang zwischen Mutationen im *MLC1*-Gen und dem Auftreten der Periodisch Katatonen Schizophrenie

aufzeigen. Über die Funktion des resultierenden Proteins dieses gehirnspezifisch exprimierten Gens ist jedoch nach wie vor wenig bekannt. Die Analysen der Proteinsequenz sprechen für ein Transmembranprotein mit prädiktiv 6 Transmembrandomänen. Strukturell hat das Protein eine geringe Ähnlichkeit zu dem spannungsabhängigen Kaliumkanal *KCNA1* (Meyer *et al.*, 2001). Es ist denkbar, dass es sich bei MLC1 ebenfalls um einen spannungsabhängigen Kaliumkanal handelt.

Um weitere Erkenntnisse über MLC1, seine Funktionen und biochemischen Eigenschaften zu gewinnen, und vielleicht die Pathogenese der beschriebenen Krankheitsbilder aufzudecken, bieten sich Untersuchungen am Mausmodell an. Ein erster Schritt zu diesem Vorhaben ist, zunächst das dem menschlichen homologe Gen der Maus zu identifizieren und genauer zu beschreiben. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse werden weitere Untersuchungen am Mausmodell ermöglicht, um die Funktion von MLC1 im Zellstoffwechsel und für die Entwicklung des zentralen Nervensystems zu verstehen.

1.8 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung des murinen *Mlc1*-Gens ausgehend von der Sequenz des humanen Gens. Die Ergebnisse wurden anschließend den Erkenntnissen über das humane Gen gegenübergestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenstichprobe

Für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen genetischen Veränderungen und dem klinischen Krankheitsbild der Periodischen Katatonie, einer Untergruppe der schizophrenen Erkrankungen, wurden DNA-Proben einer Familie aus dem mainfränkischen Raum („Familie 21“) verwendet, in der über Generationen Fälle von Periodischer Katatonie aufgetreten waren. Die Patientensammlung war durch Beckmann und Stöber (Stöber *et al.*, 1995 und 2000) durchgeführt worden. Die Auswahl erfolgte entsprechend den Leonhard-Kriterien für die Periodische Katatonie (Leonhard, 1995), wobei die Diagnose anhand von semi-strukturierten klinischen Interviews und anamnestischen Daten gestellt wurde. Für die molekulargenetischen Untersuchungen der Schizophreniepatienten lag die Zustimmung des Ethikrates der Universität Würzburg vor.

2.1.2 Mäuse

Für die Gewinnung der murinen RNA wurden Mäuse der Art *Mus musculus domesticus* C57-BL/6 verwendet.

2.1.3 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Vektoren wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

E. coli XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

E. coli DH5 alpha (RZPD, Berlin)

2.1.4 Bibliotheken

Murine genomische Cosmid-Bibliothek des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin): *Library 129/ola mouse cosmid* (Nr. 121, RZPD)

Genomische DNA: Milz, *Mus musculus*

Vektor: Lawrist 7

Wirtszelle: *E. coli* DH5 alpha, Kanamycin-resistent

Im Einzelnen wurden folgende Klone für weitere Untersuchungen verwendet:

| | |
|---------|------------------|
| Klon 1 | MPMGc121J07458Q2 |
| Klon 2 | MPMGc121I0931Q2 |
| Klon 3 | MPMGc121L02149Q2 |
| Klon 4 | MPMGc121F05569Q2 |
| Klon 5 | MPMGc121K08537Q2 |
| Klon 6 | MPMGc121H11670Q2 |
| Klon 7 | MPMGc121C15510Q2 |
| Klon 8 | MPMGc121I15490Q2 |
| Klon 9 | MPMGc121C18319Q2 |
| Klon 10 | MPMGc121B18468Q2 |
| Klon 11 | MPMGc121N20764Q2 |
| Klon 12 | MPMGc121E21760Q2 |

2.1.5 cDNA-Datenbank

mouse EST database des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*

2.1.6 Oligonukleotide

Die Bezeichnung der Primer richtet sich zum Teil nach einer inzwischen veralteten Bezeichnung für *Mlc1* und wird hier aus dokumentarischen Gründen beibehalten.

Primer für das humane *MLC1*-Gen

Die optimierte *Annealing*-Temperatur für die Primerpaare ist angegeben.

| | | |
|----------|----------------------------------|--------|
| Exon 1 F | 5'-ACA CCT GAC AAC ATC CAT CG-3' | 58,2°C |
| Exon 1 R | 5'-CCC CTT CCT TTC CTA GTT GG-3' | |
| Exon 2 F | 5'-GCA GTC CGT CAC CAG AGG-3' | 59,5°C |
| Exon 2 R | 5'-ATC TCA CCC TGA ACC CAG AC-3' | |
| Exon 3 F | 5'-GAC AGC CAT GAG CCA CTG-3' | 62,5°C |
| Exon 3 R | 5'-GCA GAA GTT GAA GGG TCA GG-3' | |
| Exon 4 F | 5'-TGG GCA GGA GCT TTA CTG TC-3' | 57,9°C |
| Exon 4 R | 5'-TGG AAG CGC AAA TGT TAG AG-3' | |
| Exon 5 F | 5'-CCA CCT ATT TCC AGC TCA AC-3' | 59,5°C |
| Exon 5 R | 5'-AGT GAA TGG CCT GAA GTG TG-3' | |

| | | |
|--------------|--------------------------------------|--------|
| Exon 6 F | 5'-AGG AGA GAG GGG TCT CAT GG-3' | 58,3°C |
| Exon 6 R | 5'-CCT GGA TGG GAA AAG TGG-3' | |
| Exon 7 F | 5'-AGC CAA CTC TTC GCC AAC TC-3' | 58,3°C |
| Exon 7 R | 5'-AAG GCG GTC TCG CAT CTA C-3' | |
| Exon 8 F | 5'-ACG CAG GAT CTG AGC AGT G-3' | 62,3°C |
| Exon 8 R | 5'-AAT CTG GGG GTG TCT CCA C-3' | |
| Exon 9 F | 5'-CAC CAA GGG AGG GCT AGG-3' | 58,3°C |
| Exon 9 R | 5'-TGC ATG GAG GGG TCA CTG-3' | |
| Exon 9v3 F | 5'-GAG AAC AGT CCC TGC TGA GCG-3' | 62,4°C |
| Exon 9v3 R | 5'-TGC ACT TCT TCG ACT ATT TCC TC-3' | |
| Exon 10 F | 5'-CTG GAG CTG TCC CTG GAG-3' | 63,3°C |
| Exon 10 R | 5'-AAA GGC AGA GGT TTC AGC AG-3' | |
| Exon 11v2 F | 5'-CCT TGC ACT GAC CTT GAA GC-3' | 61,0°C |
| Exon 11v2 R | 5'-GCA CCT GCT CTT TGT GAA GG-3' | |
| Exon 12-10 F | 5'-CTC GGC CTG GGA AGT TG-3' | 61,4°C |
| Exon 12-10 R | 5'-TCT GAA CGC TGG CTG CTC-3' | |

Primer für *MLC1*-cDNA (alternatives *Splicing*)

| | | |
|-------------------|----------------------------------|--------|
| ex2-ex1 (Ende) F | 5'-TCC TCT CTG AAT GGC TCC TG-3' | 59,4°C |
| ex2-ex1 (Ende) R | 5'-TCT CCT TCC CCT GCC TTC-3' | 58,2°C |
| ex2 (Mitte)-ex1 F | 5'-ATA GCT GGC GGG GTC TTG-3' | 58,2°C |
| ex2 (Mitte)-ex1 R | 5'-AGA CCA GTG CTC CCA ACG-3' | 58,2°C |
| ex3-ex2 (Mitte) F | 5'-CAT CTC AGC CGG GAA CAC-3' | 58,2°C |
| ex3-ex2 (Mitte) R | 5'-CTG GCC TAT GAC CGG ATG-3' | 58,2°C |
| ex4-ex2 F | 5'-ACA TTG GCG TTC CTC CTG-3' | 56,0°C |
| ex4-ex2 R | 5'-TGC TTC AGC CAC AAG ACG-3' | 56,0°C |
| ex6-ex3 F | 5'-AGG AGC AGC AGG ATG AGG-3' | 58,2°C |
| ex6-ex3 R | 5'-GTG TTC CCG GCT GAG ATG-3' | 58,2°C |
| ex8-ex5 F | 5'-GCC TGC GAT TAC CTC GAC-3' | 58,2°C |
| ex8-ex5 R | 5'-CTA GTC CTG AAC CCA TCA GC-3' | 59,4°C |
| ex10-ex7 F | 5'-GAC GTG AGG CTG CTT ATG G-3' | 58,8°C |
| ex10-ex7 R | 5'-TGC TCG GGT CCT GAA ATC-3' | 56,0°C |

| | | |
|------------|-------------------------------|--------|
| ex11-ex9 F | 5'-TGC AGC AGG AGC ACT AGC-3' | 58,2°C |
| ex11-ex9 R | 5'-GCC ATT GCC AGT CAT GTG-3' | 56,0°C |

Primer für *Mlc1*-cDNA

| | | |
|------------------|---|--------|
| mWKL1cDNA-1F | 5'-CAA CCG CCG GAC GAC AGC AG-3' | 65,5°C |
| mWKL1cDNA-1R | 5'-CAG AAT GTT AGA GCC ATC GGA GATG-3' | 63,0°C |
| | <i>Annealing</i> -Temperatur des Primerpaares | 62,0°C |
| mWKL1cDNA-2F | 5'-GAA GAA GGG TTC CAT CTC CGA TGG-3' | 64,4°C |
| mWKL1cDNA-2R | 5'-CCA GGC TTT CTC TTT GTC AAA CTC C-3' | 63,0°C |
| | <i>Annealing</i> -Temperatur des Primerpaares | 62,0°C |
| mWKL1cDNA-3F | 5'-GTG GTC CGA GGC CCC CTC AAG-3' | 67,6°C |
| mWKL1cDNA-3R | 5'-CCC TCC TCA CTT CCT GGT GAA TGA G-3' | 66,3°C |
| mWKL1cDNA-3nestF | 5'-GAG GTG GTC CGA GGC CCC CTC-3' | 69,6°C |
| mWKL1cDNA-ex12R | 5'-GCA AGT TAG CAT TTA TTG CTC AAG C-3' | 59,7°C |
| | <i>Annealing</i> -Temperatur des Primerpaares | 65,5°C |
| mWKL1cDNAint1R | 5'-TCC CCT CCA AGA AAG CAA TTC C-3' | 60,3°C |
| mWKL1ex12 F1 | 5'-GGT ACA AAT GGC CCA GTG AC-3' | 59,4°C |
| mWKL1ex12 R1 | 5'-AAG CGG ATG GCT TGT CAG-3' | 56,0°C |
| mWKL1ex12 F2 | 5'-CAA GGT GGC TTT TCG GTT C-3' | 56,7°C |
| mWKL1ex12 R2 | 5'-TCC TGG CAG TCG TGT GTA TC-3' | 59,4°C |
| mWKL1ex12 F3 | 5'-ACC TGG TGT TCT GGC CTT AG-3' | 59,4°C |
| mWKL1ex12 R3 | 5'-CCA TTG ATA CCC CAG CTC AG-3' | 59,4°C |
| RTex1For | 5'-TTA TGC GGC CTG ACG AAG GAG-3' | 61,8°C |
| RTex2Rev | 5'-CGT CCT GCA TCC TGC CGA CC-3' | 65,5°C |

Primer für *Mlc1* Exon 10-Sonde

| | | |
|-------------|----------------------------------|--------|
| mWKL1ex10 F | 5'-CCA CTG TTG GTC TTT GGG TC-3' | 54,0°C |
| mWKL1ex10 R | 5'-AGC GGG GAC AGA ATC AAC AC-3' | 54,0°C |

Primer für *Mlc1*-Promotor

| | | |
|------------------|----------------------------------|--------|
| mWKL1 int0->Prom | 5'-GCC CCG AAC AGA AAA CTC TC-3' | 59,4°C |
| mWKL1 ex1->int0 | 5'-GGC GCT CTG CTG TCG TC-3' | 60,0°C |

| | | |
|---------------|----------------------------------|--------|
| mWKL1-Prom-F1 | 5'-AGC AGG CAG TGC TCT TAA CC-3' | 59,4°C |
| mWKL1-Prom-F2 | 5'-GGG ACA GTT TGG GTG AAT TG-3' | 57,3°C |

Primer für *Mlc1* 5'-RACE

| | | |
|---------|---|--------|
| mRACE 1 | 5'-GCT CAC TAG CCA GGT GGA TGT CTT G-3' | 66,3°C |
| mRACE 2 | 5'-CTA AGG ATA GGA GAG TCC AGC GCT G-3' | 66,3°C |
| mRACE 3 | 5'-TCC TTC GTC AGG CCG CAT AAA CC-3' | 64,2°C |
| mRACE 4 | 5'-AAG CTG GCC CTT GAA CTG CTG G-3' | 64,0°C |

Primer für *mMlc1*-Introns

Intron 1

| | | |
|-----------------|-----------------------------------|--------|
| mWKL1 ex1->int1 | 5'-AAA ATT CAG GAA GCT GTG TGC-3' | 55,9°C |
| mWKL1 int1->ex2 | 5'-GAT GAA GGC TGA GTG TGC TG-3' | 59,4°C |
| mWKL1 ex2->int1 | 5'-GTC CTT GGG CTT TGA GTC AG-3' | 59,4°C |

Intron 2

| | | |
|-------------------|----------------------------------|--------|
| mWKL1 ex2->int2 | 5'-GTT GCC CCC GTG CTT CAG-3' | 60,5°C |
| mWKL1 int2->ex2/2 | 5'-GCC TCT GCA GAA ACT GAT CC-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int2->ex2 | 5'-AAC AGC ACA ACC CAA GGA AC-3' | 57,3°C |
| mWKL1 ex3->int2 | 5'-GAG CGA AAA CCC AGA GGT C-3' | 58,8°C |

Intron 3

| | | |
|-------------------|-------------------------------------|--------|
| mWKL1 ex3->int3 | 5'-TGT TCC CCT CCG AGA TG-3' | 55,2°C |
| mWKL1 int3->ex4 | 5'-CCA TCA AGG GAC TTC TAG GG-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int3->ex4/2 | 5'-CCT GTG TGG TTC CGA TTA TTG-3' | 57,9°C |
| mWKL1 int3->ex4/3 | 5'-GGG TTC ATA GGT TTC CGT TG-3' | 57,3°C |
| mWKL1 int3->ex3 | 5'-GGT GCA GCT CAG GGT TAG AG-3' | 61,4°C |
| mWKL1 ex4->int3 | 5'-TCC TCC CTA CAG CGA AGC-3' | 58,2°C |
| mWKL1 ex4->int3/2 | 5'-TGA CAT TTC TCC TCC CTA CAG C-3' | 60,3°C |
| mWKL1 ex4->int3/3 | 5'-CGC ACT GAC ATT TCT CCT CCC-3' | 61,8°C |

Intron 4

| | | |
|-----------------|---------------------------------|--------|
| mWKL1 ex4->int4 | 5'-GCT TCG CTG TAG GGA GGA G-3' | 61,0°C |
| mWKL1 ex5->int4 | 5'-CAC AGC GAA CGT GGA AAC-3' | 56,0°C |

Intron 5

| | | |
|---------------------|--------------------------------------|--------|
| mWKL1 ex5->int5 | 5'-CGT GTT TGA TCT GGT TTG G-3' | 54,5°C |
| mWKL1 ex5->int5/2 | 5'-TCC ACG TTC GCT GTG ACT AC-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int5->ex6 | 5'-CTG TGC TTC TGA AGG AAT CG-3' | 57,3°C |
| mWKL1 int5->ex6/2 | 5'-GTT GGT TGT AAG GCA CAC ACA C-3' | 60,3°C |
| mWKL1 int5->ex5/2 | 5'-AGG AGC TAA AGG GAT CTG CAA C-3' | 60,3°C |
| mWKL1 int5->ex5 | 5'-GAA CTA ACT AGT ACC CCC AGA GC-3' | 62,4°C |
| mWKL1 ex6->int5 | 5'-CTC CAA CAG CAG GAG CAG-3' | 58,2°C |
| mWKL1 ex6->int5/2 | 5'-TCT TCT TGC AGG GCT CCT C-3' | 58,8°C |
| mWKL1 ex6->int5/3 | 5'-TCT TGC AGG GCT CCT CAC-3' | 58,2°C |
| mWKL1 int5 intern F | 5'-CAG GTC ACA GTG AGA GGC TTC C-3' | 64,0°C |

Intron 6

| | | |
|-------------------|-----------------------------------|--------|
| mWKL1 ex6->int6 | 5'-CCC GGT CCA GTG AGG AG-3' | 60,0°C |
| mWKL1 ex6->int6/2 | 5'-TCA ACC TCA TCC TGC TCC TG-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int6->ex7 | 5'-TGT TCC TCC ACA CTG AAA AGC-3' | 57,9°C |
| mWKL1 int6->ex7/2 | 5'-GGG AAA TGT CTG CCT TTG AG-3' | 57,3°C |
| mWKL1 int6->ex6 | 5'-TGC AAC TGA GCT TAC CAA CAG-3' | 57,9°C |
| mWKL1 ex7->int6 | 5'-CCA GAA TGT TAG AGC CAT CG-3' | 57,3°C |

Intron 7

| | | |
|-------------------|-----------------------------------|--------|
| mWKL1 ex7->int7 | 5'-TGA AGT GAC GTT TCC TGC TC-3' | 57,3°C |
| mWKL1 ex7->int7/2 | 5'-TCC GAT GGC TCT AAC ATT CTG-3' | 57,9°C |
| mWKL1 ex8->int7 | 5'-CCG AGG ACA GCG GAG AC-3' | 60,0°C |
| mWKL1 ex8->int7/2 | 5'-GAG AGA TGT GGA CCC GAG AC-3' | 61,4°C |

Intron 8

| | | |
|-------------------|----------------------------------|--------|
| mWKL1 ex8->int8 | 5'-TCG GGT CCA CAT CTC TCG-3' | 58,2°C |
| mWKL1 int8->ex9 | 5'-TCC TAA AGA CTC CGG GAA CC-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int8->ex9/2 | 5'-CGG GAA CCG AGG ACT AAA TG-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int8->ex8/3 | 5'-CAA ACT GGG GTT TCC TTG TG-3' | 57,3°C |
| mWKL1 int8->ex8/2 | 5'-CTG CAT AGG GGT GTC CTT TG-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int8->ex8 | 5'-TCC ACA TCC CCT AGT TGA CC-3' | 59,4°C |
| mWKL1 ex9->int8 | 5'-GGG ACA TTC CGC TGT CAC-3' | 58,2°C |

Intron 9

| | | |
|------------------|----------------------------------|--------|
| mWKL1 ex9->int9 | 5'-GCC AGC CAT GTG ACA GC-3' | 57,6°C |
| mWKL1 int9->ex9 | 5'-TGG AAA ACA ATC AGC ACC TG-3' | 55,3°C |
| mWKL1 ex10->int9 | 5'-AGC AGT GGG GAT GTG AGG-3' | 58,2°C |

Intron 10

| | | |
|----------------------|---------------------------------------|--------|
| mWKL1 ex10->int10 | 5'-TCC TTC AGT GTG ATG AGA GTC G-3' | 60,3°C |
| mWKL1 ex10->int10/2 | 5'-CTG CTA TTC ACT GCC TCT GG-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int10->ex11 | 5'-CTG TGG GTG GAG TGG ACT G-3' | 61,0°C |
| mWKL1 int10->ex11/2 | 5'-GCC TGT CTT AGC TCA GCT CTG-3' | 61,8°C |
| mWKL1 int10->ex11/3 | 5'-ACC TTC CAG GGC TTC CTC AG-3' | 61,4°C |
| mWKL1 int10->ex10rev | 5'-GAA CTG TGG GTC TCT CCT GCT C-3' | 64,0°C |
| mWKL1 int10 nest F | 5'-GCT GAC TTG ACA TCG TAG GTG C-3' | 62,1°C |
| mWKL1 int10 nest R | 5'-CGA TCC GAC TGC CGT AGG GAA GAG-3' | 67,8°C |
| mWKL1 int10->ex10 | 5'-GAG CAG GAG AGA CCC ACA GTT C-3' | 64,0°C |
| mWKL1 ex11->int10 | 5'-CAG CAA CAG GAG CAG CAG-3' | 58,2°C |
| mWKL1 ex11->int10/2 | 5'-GAA GCT CAC ACA CTG GAT GG-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int10 intern F | 5'-CAG GGC ATG ACC AGC ACT GAA GG-3' | 66,0°C |

Intron 11

| | | |
|-------------------|-------------------------------|--------|
| mWKL1 ex11->int11 | 5'-ATC CTG GGA CCC CCA GTC-3' | 60,5°C |
|-------------------|-------------------------------|--------|

| | | |
|---------------------|----------------------------------|--------|
| mWKL1 ex11->int11/2 | 5'-CCA TCC AGT GTG TGA GCT TC-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int11->ex12 | 5'-GGC TAC AGG GTT TTC AGC TC-3' | 59,4°C |
| mWKL1 int11->ex11 | 5'-TTC TGG GAT CTG GAA TCT GG-3' | 57,3°C |
| mWKL1 ex12->int11 | 5'-CAG AGC TCT CCA GGC TTT CT-3' | 59,4°C |
| mWKL1 ex12->int12 | 5'-GAC CCT CAT TCA CCA GGA AG-3' | 59,4°C |

2.1.7 Enzyme

| Enzym | Puffer |
|------------------------------|--------------------------|
| <i>PvuII</i> (10 U/ μ l) | 10x G+ (+BSA) |
| <i>ApaI</i> (10 U/ μ l) | 10x <i>REact 4</i> |
| <i>NcoI</i> (10 U/ μ l) | <i>Sure/Cut Buffer H</i> |
| <i>SalI</i> (20 U/ μ l) | <i>Sure/Cut Buffer H</i> |
| <i>SfiI</i> (10 U/ μ l) | NEB2+BSA |

2.1.8 Platten und Medien

LB-Agar

10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 15 g Agar
 auf 1000 ml H₂O

LB-Medium

10 g Bacto-Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl
 auf 1000 ml H₂O

2.1.9 Puffer und Lösungen

Lauf-und Lösungspuffer

1x TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat
 1 mM EDTA
 (pH 8,0)

1x TBE-Puffer:

89 mM Tris-Borat
 2 mM EDTA
 (pH 8,0)

TE-Puffer:

10 mM TrisHCl (pH 8,0)
 0,1 mM EDTA
 (pH 8,0)

DNA-Extraktion aus frischem Blut

Lysispuffer:

155mM NH₄Cl
 10 mM KHCO₃
 0,1 mM EDTA
 (pH 7,4)

Kernlysispuffer:

10 mM TrisHCl (pH 8,0)
 400 mM NaCl
 2 mM Na₂EDTA-Puffer
 (pH 8,2)

Polymerasekettenreaktion

PCR-Puffer

500 mM KCl
 100 mM Tris-HCl (pH 8,3)
 0,25 % (v/v) Tween 20
 0,25 mg/ml BSA
 10 mM oder 15 mM MgCl₂

Ladepuffer

0,25 % Bromphenolblau
 0,25 % Xylen Cyanol FF
 30 % Glycerol in Wasser

Hybridisierung von radioaktiven Sonden an membrangebundene DNA

Hybridisierungslösung

500 mM NaPO₄ (pH7,2)
 7 % SDS
 1 mM EDTA

Waschpuffer (hochstringent)

20 mM NaPO₄
 1 % SDS

Waschpuffer (niedrigstringent)

200 mM NaPO₄
 1 % SDS

2.1.10 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden die Standardchemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich, Steinheim und Applichem, Darmstadt bezogen.

Acrylamid

Merck, Darmstadt

Agar

Difco, Detroit, USA

Ampicillin

Sigma-Aldrich, Steinheim

Ammoniumpersulfat 10%

Applichem, Duderstadt

Apal

Gibco BRL, Karlsruhe

| | |
|--|---|
| <i>Bam</i> HI | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| BSA, <i>purified</i> (10 mg/ml) | Biolabs |
| DNase I (RNase-frei) | Roche, Mannheim |
| dNTP-Sets (dGTP, dATP, dTTP, dCTP, je 100 mM) | Genecraft, Münster |
| Entwickler <i>Neopress HC</i> | Tetanal Photowerk, Norderstedt |
| Ethanol | Baker, Deventer, NL |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| <i>ExpressHyb Hybridization Solution</i> | Clontech, Palo Alto, USA |
| Fixierer <i>Superfix</i> | Tetanal Photowerk, Norderstedt |
| <i>Genetic Analyzer Buffer with EDTA</i> | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Glycerol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| <i>GoldstarTM Taq-DNA-Polymerase</i> (5 U/μl) | Eurogentec, Seraing, Belgium |
| HPLC-Wasser <i>LiChrosolv</i> | Merck, Darmstadt |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Kanamycin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumacetat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| <i>Nco</i> I | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| N´N´-Methylbisacrylamid | Merck, Darmstadt |
| <i>PeqGold 100 bp DNA-Leiter Plus</i> | Peqlab, Erlangen |
| <i>PeqGold 1 kb DNA-Leiter</i> | Peqlab, Erlangen |
| POP6-Polymer | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| <i>Pvu</i> II | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Radionukleotide [α^{32} P]-dCTP | Hartmann Analytik, Braunschweig |
| RNA Isolator | Sigma-Genosys Biotechnologie Ltd., Cambridge |
| <i>Sal</i> I | BioLabs, Beverly, MA |
| <i>SeaKem LE</i> Agarose | Biozym Diagnostik, Olendorf |
| <i>Sfi</i> I | BioLabs, Beverly, MA |
| <i>Sure/Cut Buffer H</i> | Boehringer, Mannheim |

| | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| TEMED | Merck, Darmstadt |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tris-Acetat, Tris-Borat, Tris-HCl | Merck, Darmstadt |
| X-Gal | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Xylen Cyanol FF | Sigma-Aldrich, Steinheim |

2.1.11 Reagenziensätze

| | |
|--|---|
| <i>Advantage 2 PCR Kit</i> | Clontech, Palo Alto, USA |
| <i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit</i> | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| <i>Expand High Fidelity PCR System</i> | Roche Diagnostics, Basel, Schweiz |
| <i>NucleoBond PC-500 Kit</i> | Macerey-Nagel, Düren |
| <i>pGEM-T-Vector System</i> | Promega, Mannheim |
| <i>Prime-a-Gene Labeling System</i> | Promega, Mannheim |
| <i>QIAGEN Plasmid Mini Kit</i> | Qiagen, Hilden |
| <i>QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit</i> | Qiagen, Hilden |
| <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> | Qiagen, Hilden |
| <i>SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit</i> | Clontech, Palo Alto, USA |
| <i>ThermoscriptTM RT-PCR System</i> | Life Technologies, Gaithersburg, USA |

2.1.12 Geräte

| | |
|--|--|
| Autoklav Modell <i>HA-240MII</i> | Wolf, Geislingen |
| Kapillarsequenzierer <i>ABI Prism 310</i> | PE Applied Biosystem, Foster City, USA |
| Bakterienbrutschrank | WT-Binder, Bottmingen, Schweiz |
| Bakterienschüttler | A. Hartenstein GmbH, Würzburg |
| Photometer <i>BioPhotometer</i> | Eppendorf, Hamburg |
| Elektroporationsgerät <i>Gene Pulser</i> | Bio-Rad, München |
| <i>Gelsystem Perfect Blue Mini S und L</i> | PeqLab, Erlangen |
| Gelsystem für PAA-Gele | PeqLab, Erlangen |
| Geiger-Müller-Zählrohr | Berthold Technologies, Bad Wildbad |
| Geiger-Müller-Zählrohr | Morgan, Burnham-on-Crouch, England |
| Heizrührplatte | GLW, Würzburg |
| Hybridisierungsofen | MWG Biotech, Ebersberg |

| | |
|--|------------------------------------|
| Hybridisierungsöfen | Heraeus Instruments, Osterode |
| Sorvall-Zentrifuge Typ RC5C | Kendro, Hamburg |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Gelkammera <i>Polaroid-GelCam</i> | Polaroid, Offenbach |
| PAA-Gelelektrophoresekammer | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| Thermocycler <i>T1</i> | Biometra, Göttingen |
| Thermocycler <i>T-GRADIENT</i> | Biometra, Göttingen |
| Tischzentrifuge <i>Biofuge pico</i> | Heraeus, Hanau |
| Ultraviolet Transluminator | UVP, Upland, CA |
| Vakuumbzentrifuge <i>Univapo 150 H</i> | Uniequip, Martinsried |
| Waage <i>PM 300</i> | Mettler, Gießen |
| Waage <i>Toledo</i> | Mettler, Gießen |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |
| Zentrifuge <i>Mikroliter</i> | Hettich Tuttlingen |
| Zentrifuge <i>Rotanta 96RS</i> | Hettich, Tuttlingen |
| Zentrifuge <i>Megafuge 1.OR</i> | Heraeus Instruments, Osterode |

2.1.13 Gebrauchswaren

| | |
|---|---|
| Elektroporationsküvetten | Bio-Rad, München |
| Erlenmeyerkolben (500 ml) | A. Hartenstein GmbH, Würzburg |
| <i>Fuji Medical X-Ray-Film</i> | Fuji, Düsseldorf |
| <i>310 Genetic Analyzer capillary, 47 cm</i> | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| <i>310 Genetic Analyzer capillary, 61 cm</i> | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| <i>Genetic Analyzer sample tubes, 0,5 ml</i> | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| <i>Genetic Analyzer septa for 0,5 ml sample tubes</i> | PE Applied Biosystems, Foster City, USA |
| <i>Hybond-N-Membran</i> | Amersham, Braunschweig |
| Petrischalen | Greiner Nunc, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Polaroid-Film Typ 667 | Polaroid, Offenbach |
| Reaktionsgefäße <i>PCR Softubes</i> 0,2 ml | Biozym, Oldendorf |
| Reaktionsgefäße <i>Safe Lock</i> 0,5 und 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg |

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Röntgenfilmkassetten <i>X-OMAT AR</i> | Kodak, Stuttgart |
| Whatman-Papier 0,3 mm | Schleicher & Schüll, Dassel |

2.1.14 Software

Primerauswahl: *Primer3* (Steve Rozen and Helen J. Skaletzsky, 2000)

Automatische Sequenzierung: *ABI Prism 310 Data Collecting V2.0*

ABI Prism DNA Sequencing Analysis V3.4

Promotorsuche: *PROSCAN V1.7* (<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan/>)

Datenbanksuche: *NCBI BLAST V2.1.3*

Sequenzvergleiche: *MacMolly Tetra*, V1.0, Soft Gene GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen

2.2.1.1 Isolation von DNA aus humanen Leukozyten

Die Isolierung genomischer DNA aus Blutlymphozyten erfolgte nach Baas (1984). 10 ml frisches Blut wurden mit 30 ml gekühltem Lysispuffer (4°C) versetzt. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Lösung mehrfach vorsichtig gemischt wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension für 15 Minuten bei 1500 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet mit Kernlysispuffer gespült. Die im Pellet enthaltenen Zellen wurden in 10 ml Kernlysispuffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 660 µl 10 % SDS und 500 µl Pronase E (20 mg/ml) hinzugegeben und das Gemisch über Nacht bei 37°C und unter leichtem Schütteln inkubiert. Die gelösten Proteine wurden durch Hinzufügen von 3,4 ml gesättigter 6 M NaCl-Lösung und anschließendes kräftiges Schütteln für 15 Sekunden ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (4000 rpm, 2 x 10 min, RT). Die Fällung der DNA erfolgte mit ca. 7,5 ml 2-Propanol. Die DNA wurde mit einer Pasteurpipette gefischt, in ein Eppendorfröhrchen überführt, mit 70 % EtOH gewaschen und nach leichtem Antrocknen in 400 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.2 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolation von RNA aus Gehirngewebe wurde mit der RNA Isolator-Lösung der Firma Sigma-Genosys (Cambridge) entsprechend den Angaben des Herstellers

durchgeführt. Eine geringe Menge Gehirngewebe wurde hierzu mit RNA Isolator-Lösung (1 ml/ 50-100 mg Gewebe) homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Lösung der Nukleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Homogenisat hinzu gegeben, das Gemisch vorsichtig geschüttelt, bis sich eine milchig-rosa Farbe zeigte und für 2-15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Hierdurch wurde eine Phasentrennung erreicht in eine untere organische, eine DNA und Proteine enthaltende Interphase und eine obere wässrige Phase, welche die gelöste RNA enthält. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert, wobei, um Durchmischungen zu vermeiden, ein kleiner Rest zurückgelassen wurde. Aus der wässrigen Phase wurde dann in einem neuen Gefäß die RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml verwendeter RNA Isolator-Lösung ausgefällt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Lösung erneut bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten inkubiert und dann für 10 Minuten bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet vorsichtig mit 75 % Ethanol (1 ml pro ml RNA-Isolator Lösung) durch mehrmaliges Invertieren gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 4°C und 7.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet für 5-10 Minuten luftgetrocknet. Die RNA wurde anschließend in 100 µl sterilem 1xTE-Puffer aufgenommen und für 5-10 Minuten im Wasserbad bei 55-60°C resuspendiert.

Vor der weiteren Verwendung der RNA wurden eventuelle DNA-Verunreinigungen durch Behandlung mit DNase I entfernt. Zu der RNA-TE-Lösung wurden 10 µl DNase-Puffer sowie 2 µl DNase hinzugegeben und die Mischung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 100 µl einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isopropanol (25:24:1) hinzugefügt und für 5 Minuten bei 4°C und 7.500 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und die RNA mit gekühltem 100 % Ethanol gefällt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet bei Raumtemperatur etwas angetrocknet und anschließend in 100 µl sterilem 1 x TE-Puffer resuspendiert. Die gewonnene RNA wurde photometrisch auf ihre Reinheit und Konzentration hin überprüft und für die cDNA-Herstellung verwendet.

2.2.2 Durchsuchen der elektronischen cDNA-Datenbank

In der *NCBI mouse EST*-Datenbank werden Sequenzen von kurzen cDNA-Stücken (*expressed sequence tags/ ESTs*) veröffentlicht, die häufig nach dem Zufallsprinzip aus der gesamt cDNA einer Zelllinie sequenziert worden sind. Diese Datenbank wurde unter Verwendung des BLASTN-Programmes durch Eingabe der zu vergleichenden Basenfolge durchsucht. Das Programm sucht die in der Datenbank enthaltenen Sequenzen heraus, die ganz oder teilweise der gesuchten Sequenz entsprechen, geordnet nach dem Prozentgrad der Übereinstimmung.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Mit Hilfe der *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ist es möglich, DNA-Fragmente *in-vitro* zu amplifizieren, wenn die flankierenden Sequenzen bekannt sind (Saiki *et al.*, 1985, Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Man benötigt hierzu zwei Oligonukleotide, die so genannten „Primer“, die jeweils komplementär zum 3'-Ende der beiden Stränge der zu amplifizierenden Region sind. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe des „Primer3“-Programms (Krawetz *et al.*, 2000) ermittelt. Zur Amplifikation wird die hitzestabile Polymerase I des Mikroorganismus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) verwendet, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Die Reaktion läuft in Zyklen ab. Innerhalb eines Zyklus wird die doppelsträngige DNA zunächst bei 94°C denaturiert, anschließend erfolgt die Anlagerung der Primer (*Annealing*) und schließlich die Synthese der komplementären DNA-Stränge (*Elongation*). Die *Annealing*-Temperatur (T_a) muss der Schmelztemperatur der Primer (T_m) angepasst werden, die sich wie folgt errechnet: $T_m = 4x(G+C)+2x(A+T)$.

Im Allgemeinen wird eine Temperatur von 1-2°C unter dieser Temperatur gewählt. Liegt sie zu hoch, erfolgt keine Hybridisierung der Primer an die DNA, liegt sie zu niedrig, erfolgen zunehmend auch fehlgepaarte Anlagerungen. Die Primerbindung wird außerdem durch die Magnesiumkonzentration beeinflusst. Die optimalen Bedingungen für die einzelnen Primerpaare wurden durch eine Optimierungs-PCR mit variablen Bedingungen bezüglich *Annealing*-Temperatur und Magnesiumkonzentration ermittelt. Die Produkte dieser PCR wurden auf einem Agarosegel mit Ethidiumbromid analysiert. Optimale Bedingungen lagen dann vor, wenn die Produkte auf dem Gel eine

einheitliche klare Bande zeigten und möglichst keine Nebenprodukte zu erkennen waren.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Standardansatz enthielt im Einzelnen:

| | |
|---------|--|
| 1,0 µl | dNTP-Mix (je 2 mM für jedes Nukleotid) |
| 2,5 µl | MgCl ² -Puffer (7,5-15 mM) |
| 1,0 µl | Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl) |
| 1,0 µl | Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl) |
| 1,0 µl | <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl) |
| 1,0 µl | DNA- <i>Template</i> (50 – 100 ng) |
| 17,5 µl | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 25,0 µl | Gesamtvolumen |

Die Reaktion wurde in einem Biometra T-Gradient Thermocycler bzw. Biometra T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zwischen 50 und 3000 bp wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

| PCR-Schritt | | Zeit | Temperatur |
|---------------------------------|-------------------|--------|----------------|
| Anfangs-Denaturierung | | 3 min | 95°C |
| Zyklusschritte: 35 Zyklen | Denaturierung | 45 sec | 95°C |
| | <i>Annealing</i> | 45 sec | T _a |
| | <i>Elongation</i> | 45 sec | 72°C |
| Abschließende <i>Elongation</i> | | 3 min | 72°C |

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten ab einer Größe von 3 kb, wurde das *Expand High Fidelity PCR-System* (Roche diagnostics, Basel, Schweiz) verwendet. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden zunächst zwei getrennte Ansätze nach folgendem Pipettierschema erstellt:

Master Mix 1:

| | |
|--------|--|
| 4,0 µl | dNTP-Mix (je 2 mM für jedes Nukleotid) |
| 1,5 µl | Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl) |

| | |
|---------|------------------------------------|
| 1,5 µl | Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl) |
| 3,0 µl | DNA- <i>Template</i> (100 pmol/µl) |
| 15,0 µl | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 25,0 µl | Gesamtvolumen |

Master Mix 2 (auf Eis):

| | |
|----------|---|
| 10,0 µl | 10 x <i>Expand HF</i> Puffer (mit 15 mM MgCl ₂) |
| 0,75 µl | <i>Expand High Fidelity</i> PCR Systemenzyme Mix |
| 39,25 µl | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 50,0 µl | Gesamtvolumen |

Jeweils 12,5 µl des Master Mix 1 wurden mit 12,5 µl des Master Mix 2 in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipetiert. Die anschließende PCR wurde in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

| PCR-Schritt | | Zeit | Temperatur |
|---------------------------------|-------------------|--------|------------|
| Anfangs-Denaturierung | | 2 min | 94°C |
| Zyklusschritte: 35 Zyklen | Denaturierung | 15 sec | 94°C |
| | <i>Annealing</i> | 30 sec | 60°C |
| | <i>Elongation</i> | 6 sec | 68°C |
| Abschließende <i>Elongation</i> | | 2 min | 68°C |
| Abkühlen und Aufbewahren | | x min | 4°C |

2.2.3.2 RT-PCR zur Gewinnung von cDNA

Die Reverse Transkriptase ist ein retrovirales Enzym, welches die Fähigkeit besitzt, zu einem bestehenden RNA-Strang einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Mit Hilfe dieses Enzyms ist es möglich, cDNA-Klone zu erstellen, die in ihrer Sequenz der mRNA einer Zelle entsprechen und zur weiteren molekulargenetischen Untersuchung geeignet sind. Die Reverse-Transkriptase-PCR wurde mit dem *ThermoscriptTM RT-PCR System* der Firma Life Technologies (Gaithersburg, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für die cDNA-Synthese wurden zunächst 5 µg Gesamt-RNA mit 5 pmol Oligo (dT)₂₀-Primer in 10 µl DEPC-Wasser für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Durch diesen Schritt

werden Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst, welche für die cDNA-Synthese in voller Länge hinderlich sein können. Der Ansatz wurde anschließend auf Eis gekühlt und nach folgendem Schema vervollständigt:

| | |
|---------|---|
| 10,0 µl | RNA- und Oligo(dT) ₂₀ -Primer-Ansatz |
| 4,0 µl | 5x cDNA Synthesepuffer |
| 1,0 µl | DTT (0,1 M) |
| 2,0 µl | dNTP-Mix (10 mM) |
| 1,0 µl | RNASEOUT (40 U/µl) |
| 1,0 µl | THERMOSKRIPT RT (15 U/µl) |
| 1,0 µl | DEPC-behandeltes Wasser |
| <hr/> | |
| 20,0 µl | Gesamtvolumen |

Der Reaktionsansatz wurde für 50 Minuten bei 53°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Erhitzen auf 85°C über 5 Minuten beendet. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 5'-RACE

Die *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) ist eine Methode, die eingesetzt wird, um ausgehend von einem bekannten Sequenzteil die Enden einer cDNA zu amplifizieren (Siebert *et al.* 1995, Chenchik *et al.* 1996). Zur Amplifikation des 5'-Endes der *mMlc1*-cDNA wurde das *SMART RACE cDNA Amplification Kit* der Firma Clontech benutzt. Diese Form der RACE verwendet die so genannte SMART-Technik, wobei „SMART“ für „*switching mechanism at 5' end of RNA transcript*“, steht (Chenchik *et al.*, 1996). Sie beruht auf der Eigenart bestimmter Varianten der MMLV Reversen Transkriptase, bei der Erststrangsynthese, ausgehend von Oligo-(dT)-Primern (*5'-RACE cDNA Synthesis Primer = 5'-CDS*), noch einige zusätzliche Basen (vorwiegend dC) am 3'-Ende des Transkripts anzuhängen. Ein spezielles Oligonukleotid (SMART II Oligonukleotid) mit einer Reihe von Guanosin-Basen am 3'-Ende kann sich so komplementär an den Erststrang anlagern und anschließend selbst als weitere Matrize für die Verlängerung des Erststrangs dienen. Mittels genspezifischer Primer (GSP) und Primern, die dem 5'-Bereich des SMART II Oligonukleotids entsprechen (Universalprimer/ UP), kann nun die Amplifikation des 5'-Endes der cDNA

vom Erststrang ausgehend erfolgen. Die einzelnen Schritte werden in **Abbildung 1** verdeutlicht.

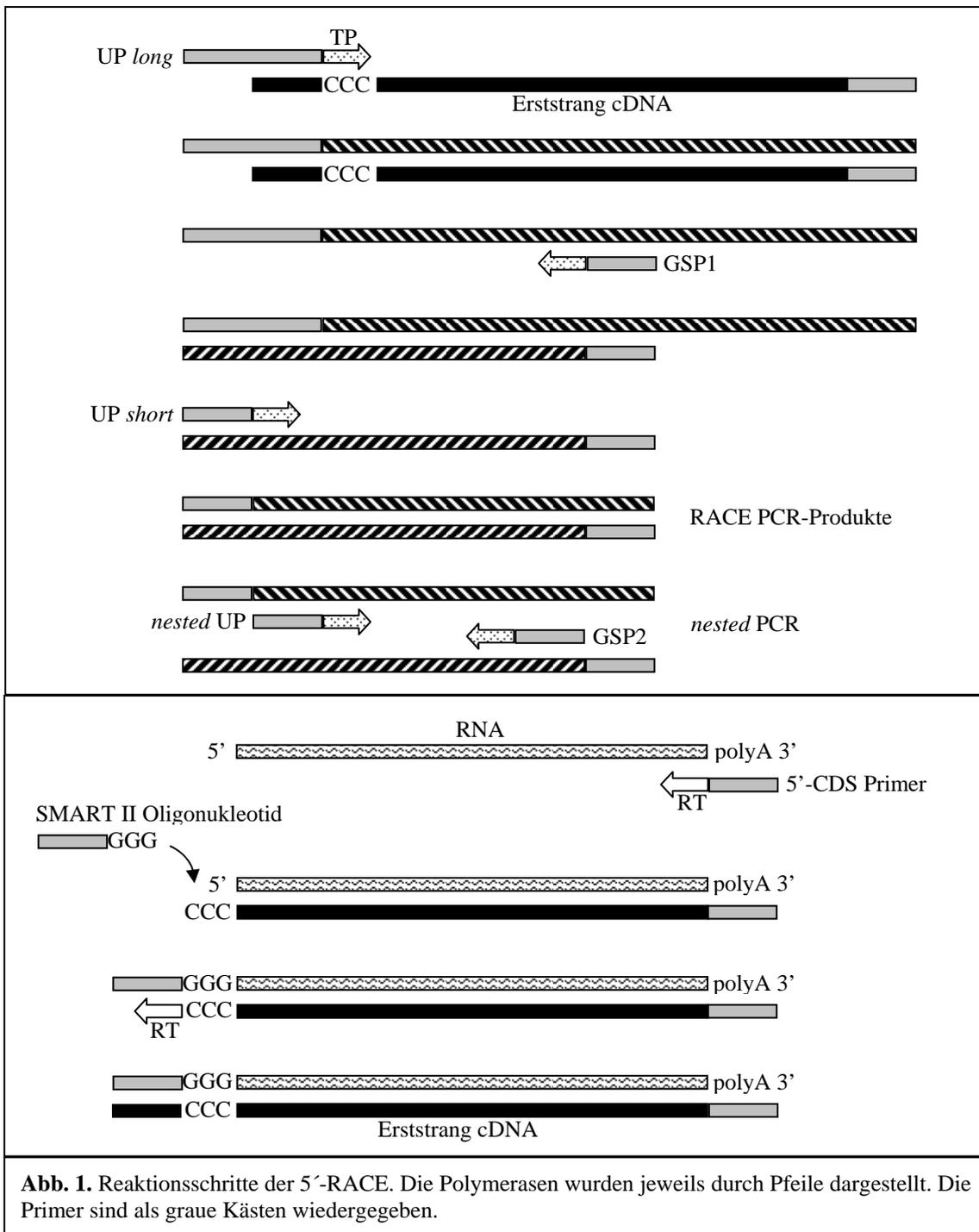


Abb. 1. Reaktionsschritte der 5'-RACE. Die Polymerasen wurden jeweils durch Pfeile dargestellt. Die Primer sind als graue Kästen wiedergegeben.

Die Reaktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Erststrangsynthese wurde zunächst folgender Ansatz erstellt:

| | |
|-------------|--------------------------------|
| 3,0 μ l | Gesamt-RNA (874,5 ng/ μ l) |
| 1,0 μ l | 5'-CDS Primer |
| 1,0 μ l | <i>SMART II Oligo</i> |
| <hr/> | |
| 5,0 μ l | Gesamtvolumen |

Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz zunächst für 2 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend für 2 weitere Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die weiteren Komponenten wie folgt hinzugefügt:

| | |
|--------------|---|
| 5,0 μ l | Reaktionsansatz |
| 2,0 μ l | 5 x <i>First-Strand buffer</i> |
| 1,0 μ l | DTT (20 mM) |
| 1,0 μ l | dNTP Mix (10 mM) |
| 1,0 μ l | MMLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l) |
| <hr/> | |
| 10,0 μ l | Gesamtvolumen |

Dieser Reaktionsansatz wurde erneut gemischt und für 1,5 Stunden im Wärmeschrank bei 42°C inkubiert. Mit 40 μ l Tricine-EDTA wurde der Ansatz anschließend im Verhältnis 1:5 verdünnt und für 7 Minuten auf 72°C erhitzt. Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Zur Kontrolle des Syntheserfolges wurde von 5 μ l der cDNA-Verdünnung eine PCR mit einem genspezifischen Primerpaar („RTex1For“/„RTex2Rev“) durchgeführt, welches den Bereich von Exon 1 bis Exon 2 des *Mlc1*-Gens amplifiziert. Die Probe wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Die eigentliche RACE-PCR wurde leicht abgewandelt zu den Angaben des Herstellers entsprechend folgendem Schema erstellt. Als genspezifische Primer (GSP) wurden die Primer „RACE1“, „RACE2“, „RACE3“ und „RACE4“ verwendet.

| | |
|-------------|----------------------------|
| 2,5 μ l | 10x <i>Buffer</i> |
| 0,5 μ l | dNTP Mix |
| 2,5 μ l | Universal Primer Mix (UPM) |

| | |
|---------|-----------------------------|
| 1,0 µl | GSP (10 pmol/µl) |
| 0,5 µl | 50 x <i>Advantage 2 Taq</i> |
| 5,0 µl | Erststrang cDNA |
| 13,0 µl | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 25,0 µl | Gesamtvolumen |

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler unter den nachfolgenden Bedingungen.

| PCR-Schritt | | Zeit | Temperatur |
|------------------------------|-------------------|--------|------------|
| Anfangs-Denaturierung | | 3 min | 95°C |
| Zyklusschritte: 38 Zyklen | Denaturierung | 30 sec | 94°C |
| | <i>Annealing</i> | 30 sec | 68°C |
| | <i>Elongation</i> | 3 min | 72°C |

Eine *nested* PCR wurde unter gleichen Bedingungen ausgehend von den Produkten der ersten RACE-PCR mit dem im Kit enthaltenen *Nested Universal Primer* sowie mit genspezifischen Primern durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen, die Banden ausgeschnitten und gereinigt. Die Fragmente wurden anschließend in den *pGEM-T*-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert und durch Sequenzierung analysiert.

Bei einem zu hohen PCR-Hintergrund wurde vor der Klonierung eine zweite PCR mit dem *Nested Universal Primer* und einem zweiten, im PCR-Produkt liegenden genspezifischen Primer vom PCR-Produkt durchgeführt. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen des ersten Durchgangs, nur dass eine niedrigere *Annealing*-Temperatur von 60°C gewählt wurde.

2.2.4 Gelelektrophorese

2.2.4.1 Agarosegele

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels horizontaler Flachgelelektrophorese, wobei Elektrophoresekammern in zwei Größen (*Perfect Blue Gelsystem Mini S* und *Mini L*, Qiagen, Erlangen), verwendet wurden. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit unterschiedlicher Konzentration von *SeaKem-Agarose LE* (Biozym, Oldendorf) eingesetzt. Kleinere PCR-Produkte mit

einer Größe von etwa 400-2.000 bp wurden in 1-prozentigen Agarosegelen aufgetrennt, größere DNA-Fragmente in 0,5-prozentigen Gelen. Das Volumen der Gele betrug je nach Größe der verwendeten Elektrophoresekammer 50 ml bzw. 100 ml. Entsprechende Mengen Agarose wurden in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle schlierenfrei gelöst und nach dem Abkühlen auf etwa 50°C in einen Gelschlitten mit Taschenkamm gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1 x TAE-Puffer, als Ladepuffer wurde *Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye & Soution* (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V/cm Elektrodenabstand. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde dem Gel vor dem Gießen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1-0,5 µg/ml Gel zugesetzt. Ethidiumbromid lagert sich als interkalierender Farbstoff in die DNA ein und fluoresziert unter UV-Licht. Die DNA-Banden innerhalb des Gels konnten so auf einem UV-Schirm (312 nm) sichtbar gemacht werden.

Das Bandenmuster wurde gegebenenfalls mittels einer *Polaroid-Gelcam* (Polaroid, Offenbach) und Sofortbild-Filmen vom Typ 667 (Polaroid, Offenbach) aufgenommen. Als Größenstandard für DNA-Fragmente auf dem Gel wurden die *PeqGold 100 bp DNA-Leiter Plus* und die *PeqGold 1 kb DNA-Leiter* der Firma PeqLab (Erlangen) verwendet.

2.2.4.2 Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit geringen Größeunterschieden wurden Polyacrylamidgele verwendet. Zur Herstellung eines 10-prozentigen PAA-Gels wurden 49 g Acrylamid mit 1 g N'N'-Methylbisacrylamid zur Lösung gebracht und nach Zugabe von 500 µl TEMED mit 0,5 x TBE-Puffer auf 500 ml aufgefüllt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 750 µl einer 10 % Ammoniumpersulfatlösung pro 75 ml Acrylamidlösung (entsprechend der Menge für ein Gel) ausgelöst und die Lösung in eine vertikale Gelapparatur (50 x 35 x 0,08 cm) gegossen. Das Acrylamidgel polymerisierte unter dem Abzug innerhalb von 30-40 Minuten. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Jeweils 5 µl der DNA-Proben wurden mit 2 µl Ladepuffer in die Geltaschen eingefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur unter einer Spannung von 70 V über 6 Stunden. Zur Darstellung der DNA-Banden wurde das Gel anschließend für etwa 30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (2,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE-Puffer) unter leichtem Schwenken gefärbt. Die Banden

wurden anschließend auf einem UV-Licht-Schirm betrachtet und ggf. für die weitere Untersuchung ausgeschnitten und gereinigt.

2.2.5 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die gebrauchsfertigen Reagentien des *QIAquick Gel-Extraktions-Kits* (Qiagen, Hilden) verwendet. Das *QIAquick*-Prinzip beruht auf der Eigenschaft von Silicatmembranen bei hohen Salzkonzentrationen und saurem pH ($\leq 7,5$) DNA selektiv zu binden, während Verunreinigungen ausgewaschen werden. Die Reaktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die zu eluierende DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und die dreifache Volumenmenge (100 mg \sim 100 μ l) an Puffer QG zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Um die Lösung des Agarosegels zu verbessern, wurde der Ansatz während der Inkubation alle 2-3 Minuten gemischt. Nachdem sich der Agaroseblock vollständig gelöst hatte, wurde die einfache Volumenmenge an Isopropanol hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend auf eine *QIAquick*-Säule überführt und für eine Minute zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 μ l Puffer QC wurde erneut für eine Minute zentrifugiert. Zum Waschen der Säule wurden 750 μ l Puffer PE auf die Säule gegeben und nach 2-5 Minuten wiederum für eine Minute zentrifugiert. Um die DNA-Fragmente zu eluieren wurden 30 μ l dH₂O in die Mitte der Säule pipettiert, eine Minute bei RT inkubiert und eine Minute bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die isolierten Fragmente wurden für die Ligation und Klonierung sowie für die Sequenzierung verwendet.

2.2.6 Reinigung von DNA mittels Ethanolfällung

Um Verunreinigungen aus der DNA-Lösung zu entfernen oder auch um die Konzentration einer DNA-Lösung zu erhöhen, wurde die DNA selektiv gefällt. Hierzu wurden 20 μ l DNA-Lösung (meistens als PCR-Produkt) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 80 μ l dH₂O vermischt. Nach Zugabe von 10 μ l 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 μ l Ethanol (100 %) wurde die DNA für 15 min bei 15000 rpm abzentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde anschließend mit 250 μ l Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde

die DNA für 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl dH₂O aufgenommen.

2.2.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration von gelöster DNA wurde mit einem *BioPhotometer* der Firma Eppendorf durchgeführt. Für die Messung wurden jeweils 2 µl der Probe mit 48 µl Wasser verdünnt. Das Gerät misst die optische Dichte der Lösung bei 260 nm Wellenlänge. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Dieser Wert lässt jedoch eine mögliche Verunreinigung der Probe durch Proteine außer Acht. Um diese mit einzubeziehen wird zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm bestimmt, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum der in den Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren liegt. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ gilt als Maß für die Reinheit der DNA. Sein Wert sinkt mit zunehmender Verunreinigung der DNA durch Proteine ab. Er sollte für molekular-genetische Versuche möglichst über 1,7 liegen.

2.2.8 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde modifiziert nach der Kettenabbruchmethode von Sanger und Coulson (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Bei dieser Methode werden einem PCR-Ansatz neben den vier Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) auch unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in geringer Menge beigefügt. Letztere werden bei der PCR zufällig in den DNA-Strang eingebaut und führen an dieser Stelle zum Kettenabbruch. Es entstehen auf diese Weise DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils mit einem der vier markierten Didesoxynukleotide enden. Trennt man nun die Fragmente durch Elektrophorese der Länge nach auf, so ist es möglich, mittels eines Detektors für die vier Fluoreszenzmarkierungen die Position der verschiedenen Nukleotide im ursprünglichen DNA-Molekül zu ermitteln.

Für die zyklische Sequenzierung wurde das *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Der im Kit enthaltene *Terminator Ready Reaction-Mix* enthält neben den vier dNTPs auch ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff markiert), sowie die *Ampli-Taq-DNA-Polymerase* und Reaktionspuffer. Um nur einen DNA-

Strang zu amplifizieren, wird für die PCR nur ein Primer verwendet. Ein Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR für die Sequenzierung vom PCR-Produkt enthielt im Einzelnen:

| | |
|---------|---|
| 4,0 µl | <i>BigDye Terminator Ready Reaction Mix</i> |
| 3,0 µl | Primer (2,5 pmol/µl) |
| 3-6 µl | DNA (ca. 250 ng) |
| x µl | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 20,0 µl | Gesamtvolumen |

Die Reaktion erfolgte in einem *TI*- bzw. *T-GRADIENT*-Thermocycler (Biometra, Göttingen) unter folgenden Bedingungen:

| PCR-Schritt | | Zeit | Temperatur |
|------------------------------|-------------------|--------|----------------|
| Zyklusschritte: 25 Zyklen | Denaturierung | 10 sec | 96°C |
| | <i>Annealing</i> | 30 sec | T _m |
| | <i>Elongation</i> | 4 min | 60°C |

Für die Sequenzierung von Plasmiden und Cosmiden wurden die Bedingungen angepasst:

| | |
|---------|---|
| 8-12 µl | <i>BigDye Terminator Ready Reaction Mix</i> |
| 1,5 µl | Primer (10 pmol/µl) |
| x µl | Cosmid/Plasmid-DNA (1500-2000 ng) |
| y µl | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 20,0 µl | Gesamtvolumen |

Die Programmschritte des Thermocyclers wurden ebenfalls abgewandelt:

| PCR-Schritt | | Zeit | Temperatur |
|------------------------------|-------------------|--------|----------------|
| Zyklusschritte: 30 Zyklen | Denaturierung | 5 sec | 95°C |
| | <i>Annealing</i> | 30 sec | T _m |
| | <i>Elongation</i> | 4 min | 50°C |

Die Reaktionsprodukte wurden nach der PCR durch Fällung mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurde die Sequenzanalyse unter Verwendung eines automatischen

Kapillarsequenzierers des Modells *ABI Prism 310* (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) mit der *ABI Prism 310 Data Collecting V2.0*-Software durchgeführt. Je nach Länge des zu sequenzierenden DNA-Strangs wurden Kapillaren von 47 cm (mit dem *rapid sequencing protocol*) bzw. 61 cm (mit dem *long read sequencing protocol*) verwendet. Als Gelmatrix für die Auftrennung diente das Polymer *POP-6* (PE Applied Biosystems), als Laufpuffer der *Genetic Analyzer Buffer* (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Elektrophorese erfolgte bei 1500 V und 6 μ A bei 50°C für 55 min. Für die Auswertung der Sequenzen wurde das Programm *ABI Prism DNA Sequencing Analysis 3.4* verwendet.

Ein Teil der Sequenzierungen wurde durch MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt.

2.2.9 Durchsuchen der genomischen Maus-Bibliothek

Um zu einem genomischen Klon von *Mlcl* zu gelangen, wurde die 129/ola Maus-Cosmid-Bibliothek (No. 121) des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) durchsucht. Die Bibliothek beruht auf dem Cosmid „Lawrist 7“, in welches Teile genomischer DNA aus murinen Milzzellen inkloniert wurden. Der Vektor wurde in Wirtszellen des *E. coli*-Stammes DH5 alpha vermehrt.

Die einzelnen Klone sind auf *high density*-Filtern fixiert, wobei die Position der einzelnen Klone durch ein Koordinatennetz bestimmt ist. Die Filter wurden durch Herrn Dr. Jobst Meyer mit einer 32 P-markierten Sonde hybridisiert und auf Röntgenfilmen (*Kodak X-OMAT AR*, Kodak, Stuttgart) exponiert. Anhand der Koordinaten der positiven Signale war es möglich, die entsprechenden Klone zu bestimmen, welche anschließend in Bakterienkulturen bestellt und für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

2.2.10 Bakterienkulturen

2.2.10.1 Bakterienplattenkulturen

Um Einzelkolonien einer Bakteriensuspension zu erhalten, wurde diese mittels eines Glasspatels auf einem LB-Agar ausplattiert. Dem Agar wurden zuvor je nach den Eigenschaften der zu vermehrenden Bakterienkultur verschiedene Antibiotika zugesetzt. Die Bakterien wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Von einzelnen Bakterien-

kolonien des Agars konnten mit Hilfe einer Impföse weitere Verdünnungsausstriche angefertigt werden.

2.2.10.2 Bakterienflüssigkulturen

Kleinere Bakterienflüssigkulturen (2,5-3 ml LB-Flüssigmedium in sterilen Reagenzröhrchen) wurden durch die Übertragung von Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze beimpft. Für größere Mengen an LB-Medium (100 ml) wurden Einzelkolonien aus einem Agar mit einer sterilen Öse ausgestochen und zu dem Medium gegeben. Die Kulturen wurden im Wasserbad bei 37°C über Nacht geschüttelt.

2.2.11 Isolation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus Bakterien

2.2.11.1 Präparation nach dem *QIAGEN-Miniprep*-Protokoll

Die Präparation von geringen Mengen Plasmid-DNA (bis 20 µg) wurde nach dem Protokoll des *QIAGEN Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Prozedur basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim et Doly, 1979) und der Eigenschaft des Anionenaustauscherharzes der *QIAGEN*-Säulen, DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen zu adsorbieren.

Jeweils 5 ml LB-Kulturmedium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde abzentrifugiert und die Bakterien in 300 µl Puffer P1 mit RNase resuspendiert. Zur Lyse der Bakterienzellen wurden 300 µl des alkalischen Puffers P2 hinzugefügt, die Lösung vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten stehen gelassen. Nach Zugabe von 300 µl gekühltem Puffer P3 wurde der Ansatz sofort durch Invertieren gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Mit diesem Schritt wurde die Lösung neutralisiert und eine hohe Salzkonzentration erzeugt, in der Proteine und bakterielle DNA ausfallen, während die kleineren Plasmide in Lösung bleiben. Durch Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 10 Minuten wurden die ausgefallenen Proteine aus der Lösung entfernt. Der Überstand mit den gelösten Plasmiden wurde auf eine mit 1 ml Puffer QBT äquilibrierte *QIAGEN*-Säule überführt und 60 Sekunden zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 1 ml Puffer QC gewaschen und 60 Sekunden zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird anschließend mit 800 µl Puffer QF eluiert. Durch Zugabe von 0,56 ml Isopropanol wurde die DNA gefällt, anschließend bei 10.000 rpm erneut für 30 Minuten

zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das entstehende Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 10 µl HPLC-Wasser resuspendiert. Die gewonnene Plasmid-DNA konnte anschließend für die Sequenzierung genutzt werden.

2.2.11.2 Präparation nach dem *QIAGEN-Midi- und Maxiprep*-Protokoll

Für die Präparation größerer Mengen Cosmid-DNA wurden die Reagenzien des *QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kits* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Reaktionen wurden in leichter Abwandlung zu den Angaben des Herstellers durchgeführt. In Klammern sind jeweils die Mengenangaben für die Maxipräparation angegeben. Für die Präparation nach dem *QIAGEN Plasmid Midi (Maxi)*-Protokoll wurden 100 µl (500 µl) LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskulturen wurden bei 6.000 rpm und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und die Bakterien anschließend in 4 ml (10 ml) Resuspensionspuffer P1 aufgenommen und gut durch-mischt. Nach Zugabe von 4 ml (10 ml) Lysepuffer P2 wurde durch Invertieren vorsichtig gemischt und die Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 4 ml (10 ml) Eis gekühlter Neutralisationspuffer P3 wurden hinzugefügt, erneut vorsichtig gemischt und der Ansatz für 15 Minuten auf Eis gelagert. Die ausgefällten Proteine wurden bei 10.000 rpm und 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert. (Anstelle der Zentrifugation wurden bei der Maxipräparation die im Kit enthaltenen Filterspritzen verwendet.) Die *QIAGEN*-Säulen wurden mit jeweils 4 ml (10 ml) Puffer QBT äquilibriert und der Überstand auf die Säule appliziert. Nachdem die Lösung die Säule mittels Schwerkraft passiert hatte, wurde zweimal mit jeweils 10 ml (30 ml) Puffer QC gewaschen und die DNA anschließend mit 5 ml (15 ml) Puffer QF eluiert. Zur DNA-Präzipitation wurden 5 ml (10,5 ml) Isopropanol hinzugefügt und gemischt. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 90 Minuten bei 4.500 rpm pelletiert, der Überstand abgegossen und die DNA im Röhrchen für eine Stunde über Kopf getrocknet. Das Pellet wurde anschließend mit 100 µl dH₂O überschichtet, über Nacht stehen gelassen und schließlich durch vorsichtiges Mischen im Wasser gelöst.

2.2.11.3 Präparation nach dem *NucleoBond*-Protokoll

Für die Isolation von Cosmid-DNA wurde zum Teil auch das *NucleoBond PC-500 Kit* (Macerey-Nagel, Düren) verwendet. Die Reaktionen wurden entsprechend den

Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Eine Über-Nacht-Bakterienkultur wurde bei 6000 g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet vorsichtig in 12 ml Puffer P1 mit RNaseA resuspendiert. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S2 wurde vorsichtig durch Invertieren gemischt und das Gemisch bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden 12 ml gekühlter Puffer S3 hinzugefügt und die Lösung nach Invertieren für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die *NucleoBond AX 500*-Säulen wurden mit 6 ml Puffer N2 äquilibriert. Die Bakterien-suspension wurde dann bei 12.000 g für mindestens 40 Minuten bei 4°C zentrifugiert, bis sich keine Präzipitate mehr im Überstand zeigten. Der Überstand wurde auf die vorbereitete Säule gegeben und passierte diese durch Schwerkraft. Die Säule wurde dann mit 32 ml Puffer N3 gewaschen. Die Cosmid-DNA wurde mit 15 ml Puffer N5 eluiert und mit 11 ml Isopropanol vermengt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 15.000 g und 4°C für 30 Minuten. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 15.000 g und Raumtemperatur für 10 Minuten wurde der Überstand dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur Luft getrocknet (10-20 Minuten). Die Cosmid-DNA wurde anschließend in destilliertem Wasser resuspendiert.

2.2.12 Restriktionsfragmentanalyse von DNA

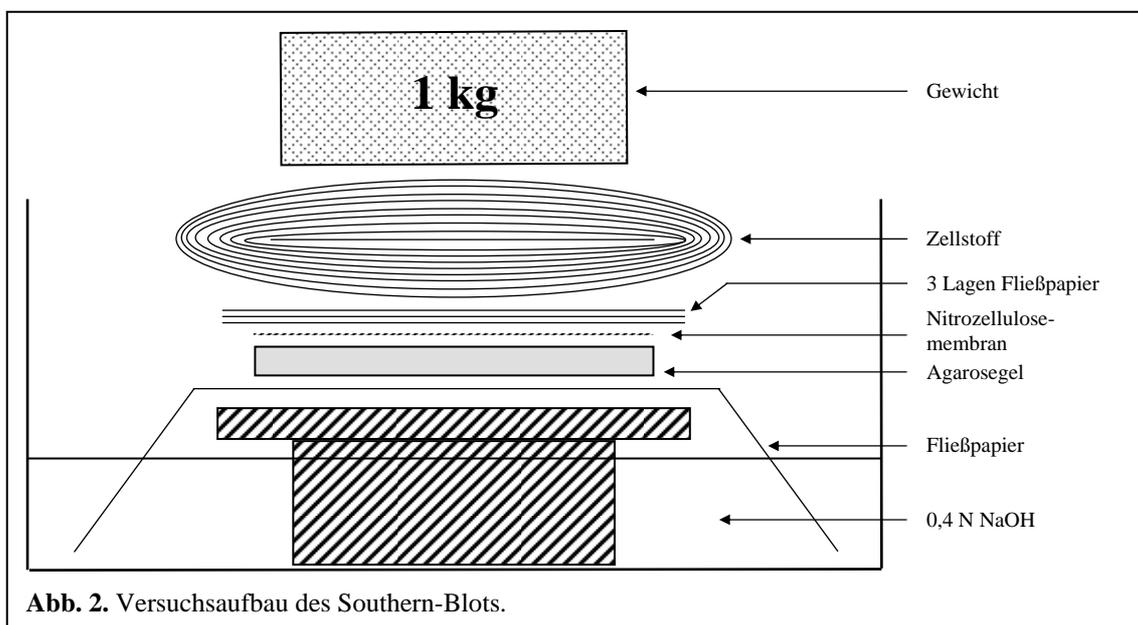
Restriktionsendonukleasen schneiden DNA an bestimmten Basensequenzen. Dabei ist die Erkennungssequenz für jedes Enzym spezifisch, so dass ein charakteristisches Bandenmuster entsteht. Für die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde im Allgemeinen der vom Hersteller mitgelieferte Puffer verwendet und die Reaktion entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für den gleichzeitigen Einsatz zweier Enzyme wurden der *Sure/Cut Buffer H* (Boehringer, Mannheim) oder der *OPA-Puffer* (BioLabs, Beverly, MA) verwendet und für beide Enzyme passende Bedingungen gewählt. Pro µg DNA wurden 3-5 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Das Volumen des Enzyms sollte dabei 1/10 des Gesamtvolumens des Reaktionsansatzes nicht überschreiten. Die DNA wurde mit dem Enzym und dem entsprechenden Puffer für 1-2 Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt.

2.2.13 Southern-Blot-Analyse von DNA-Fragmenten

2.2.13.1 Übertragung der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran

Der Southern-Blot ist eine 1975 von Edwin Southern entwickelte Methode zur Übertragung von DNA-Banden aus einem Agarosegel auf eine positiv geladene Nitrozellulosemembran. Man bedient sich hierbei der Eigenschaft der Nitrozellulose, einzelsträngige DNA fest zu binden. Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen in den Banden nachzuweisen.

Nach Auftrennung der durch Restriktionsenzyme gewonnenen DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese, wurde das Gel zunächst unter UV-Licht (312 nm) fotografiert und anschließend für den DNA-Transfer vorbereitet. Hierzu wurde das Gel zunächst für 2 x 10 Minuten mit 0,25 M HCl übersättigt, um eine Depurinisierung und Fragmentierung der DNA zu erreichen, die den Transfer erleichtert. Anschließend wurde das Gel kurz in dH₂O gewaschen und die DNA für 2 x 15 Minuten mit 0,4 N NaOH denaturiert. Der Transfer der DNA auf die Nitrozellulosemembran erfolgte durch Kapillarkräfte. Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 2** dargestellt.



Bei dem Versuchsaufbau wurde besonders darauf geachtet, dass Fließpapier (Schleicher & Schuell, Dassel), Gel und Nitrozellulosemembran (*Hybond-N*-Membran von Amersham, Braunschweig) luftblasenfrei aufeinander lagen und ein direkter Kontakt der oberen und unteren Fließpapierschicht durch dazwischen liegende Folien verhindert wurde. Die Kapillarkräfte entstanden durch die unter Druck begünstigte Saugwirkung

der Zellstofftücher. Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die Geltaschen auf der Membran markiert, die Membran vorsichtig vom Gel gelöst, kurz in 1 M NaPO₄-Puffer gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren bei 80°C für eine Stunde getrocknet.

2.2.13.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Für die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde das *Prime-a-Gene Labeling System* (Promega, Mannheim) verwendet. Das System beruht auf der 1983 von Feinberg und Vogelstein beschriebenen Methode des *Random priming* (Feinberg, Vogelstein, 1983), bei der zufällige Hexanukleotide als Initiatoren für die DNA-Synthese von DNA-Einzelsträngen durch Klenow-Polymerasen dienen. Zur Markierung wurde [α -³²P]dCTP verwendet.

Vor Beginn der Reaktion wurde die DNA-Probe bei 95-100°C für 2 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers nach folgendem Schema durchgeführt:

| | |
|--------------|--|
| 10,0 μ l | 5x Reaktionspuffer |
| 2,0 μ l | dNTP-Mischung der nicht markierten Nukleotide |
| 2,0 μ l | Nuklease-freies BSA |
| 5,0 μ l | [α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol, 50 μ Ci/ μ l) |
| 1,0 μ l | Klenow-Fragment (5 U/ μ l) |
| x μ l | DNA (25-100 ng) |
| y μ l | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 50,0 μ l | Gesamtvolumen |

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion anschließend durch Erhitzen auf 95-100°C für 2 Minuten beendet.

2.2.13.3 Hybridisierung der DNA

Zur Hybridisierung der transferierten DNA mit radioaktiv markierten Sonden wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit ca. 10 ml Hybridisierungslösung (*ExpressHyb Hybridization Solution*, Clontech, Palo Alto, USA) in eine Hybridisierungsröhre gegeben und für 15 Minuten bei 68°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert. Die

Lösung wurde anschließend verworfen. Dieser erste Schritt dient dazu, freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran zu besetzen. Die radioaktiv markierte Sonde wurde dann für 10 Minuten im Wasserbad erhitzt und mit 5 ml frischer Hybridisierungslösung zu der Membran in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungsöfen bei 68°C über Nacht. Nach Beendigung der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran in zwei bis drei Durchgängen für jeweils eine Stunde mit Waschpuffer bei 68°C gewaschen. Die kurz angetrocknete Membran wurde anschließend in Klarsichtfolie verpackt und auf *Kodak X-OMAT AR*-Röntgenfilmen (Kodak, Stuttgart) exponiert, wobei sich die Dauer der Exposition nach der Stärke des radioaktiven Signals richtete.

Damit die Southern-Blot-Membran für die Untersuchung mit einer weiteren Sonde genutzt werden konnte, musste zunächst die alte Probe entfernt werden, ein Vorgang, der als „Strippen“ bezeichnet wird. Dazu wurde die Membran für 2 x 15 Minuten in einer Schale mit 0,4 N NaOH geschüttelt und anschließend mit 1 M NaPO₄-Puffer neutralisiert.

2.2.14 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.14.1 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung eines zu klonierenden DNA-Fragments mit einem Vektormolekül. Ein sehr einfaches Prinzip der Ligation beruht auf der Eigenschaft bestimmter *Taq*-Polymerasen, am 3'-Ende des amplifizierten DNA-Fragments eine überhängende Base (meist Adenosin) anzubringen. So ist es möglich, dieses Fragment in einen entsprechend mit Thymidin-Überhängen versehenen Vektor einzubringen. Die klebrigen Enden („*sticky ends*“) lagern sich durch Wasserstoffbrückenbildung aneinander und ermöglichen es so der T4-Ligase, einem aus *E. coli*-Bakterien gewonnenen Enzym, diese Enden miteinander zu verknüpfen. Der Begriff „Rekombination“ bezeichnet in diesem Zusammenhang den Einbau von Fremd-DNA in ein Vektormolekül.

Das für die Reaktion verwendete *pGEM-T Vector System* der Firma Promega (Mannheim) basiert auf diesem Prinzip. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für ein möglichst gutes Ligationsergebnis sollte das

molare Verhältnis von Vektor-DNA zu PCR-Produkt zwischen 1:1 und 1:3 liegen. Der Ligationsansatz bestand im Einzelnen aus:

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| 5,0 μ l | <i>Rapid Ligation Buffer</i> |
| 1,0 μ l | <i>pGEM-T Vector</i> (50 ng/ μ l) |
| X μ l | PCR-Produkt (50-150 ng) |
| 1,0 μ l | T4 DNA Ligase (3 U/ μ l) |
| X μ l | dH ₂ O |
| <hr/> | |
| 10,0 μ l | Gesamtvolumen |

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

2.2.14.2 Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA-Molekülen in kompetente Zellen, z.B. die Aufnahme eines Plasmid-Vektors in Bakterien. Kompetente Zellen sind Zellen, die durch entsprechende Behandlung zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigt sind.

Für die DNA-Aufnahme durch einen elektrischen Impuls (Elektroporation) wurden Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) in folgender Weise vorbereitet: 1 Liter LB-Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur des genannten *E. coli*-Stammes angeimpft und diese bis zu einer OD₅₉₀ von 0,5 bis 0,6 hochgezogen. Die Bakterien wurden dann für 10 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4000 x g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien erst mit 1 l, dann mit 500 ml eiskaltem 10 % Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 250 ml Eis gekühltem 10 % Glycerin resuspendiert und erneut durch Zentrifugation sedimentiert. Die Bakterien wurden in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin gelöst und in Mengen von jeweils 50 μ l in flüssigem Stickstoff gefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -70°C aufbewahrt.

Bei der Methode der Elektroporation werden die Zellen einem elektrischen Stromstoß ausgesetzt, der wahrscheinlich für eine kurze Zeit Poren in der Zellmembran entstehen lässt, durch welche DNA-Moleküle in die Zelle aufgenommen werden können. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus.

55 µl der kompetenten *E. coli*-Kultur wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1 µl des Ligationsansatzes (siehe oben) wurde vorsichtig gemischt und die Kultur luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. In einem Elektroporationsgerät (BioRad, München) wurden die Zellen für 4,5 bis 5 msec. bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm (2,5 kV, 25 µF und 200 Ω) einem Stromstoß ausgesetzt. Anschließend wurden sofort 800 µl LB-Medium hinzu gegeben, die Kultur nach Mischen in ein 1,5 ml Reaktions-gefäß überführt und für 1-2 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

2.2.14.3 Selektion transformierter Zellen

Um festzustellen, ob die transformierten Zellen auch rekombinant waren, d.h. ob der Vektor mit eingebauter Fremd-DNA aufgenommen war (nicht nur der selbstligierte Vektor), wurde die so genannte Blau-Weiß-Selektion angewendet. Der *pGEM-T-Vektor* enthält neben dem Ampicillin-Resistenzgen auch das *LacZ'*-Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Unter Anwesenheit des Aktivators IPTG (Isopropylthio-galactosid) baut dieses Enzym X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) zu einem dunkelblauen Farbstoff ab. Auf einem Agar, dem 40 µl X-gal (20 mg/ml) und 4 µl IPTG (250 mg/ml) zugesetzt wurden, färben sich die transformierten aber nicht rekombinanten Kolonien daher blau. Durch den Einbau von Fremd-DNA in den Vektor wird das *LacZ'*-Gen zerstört. Die rekombinanten Kolonien erscheinen daher weiß.

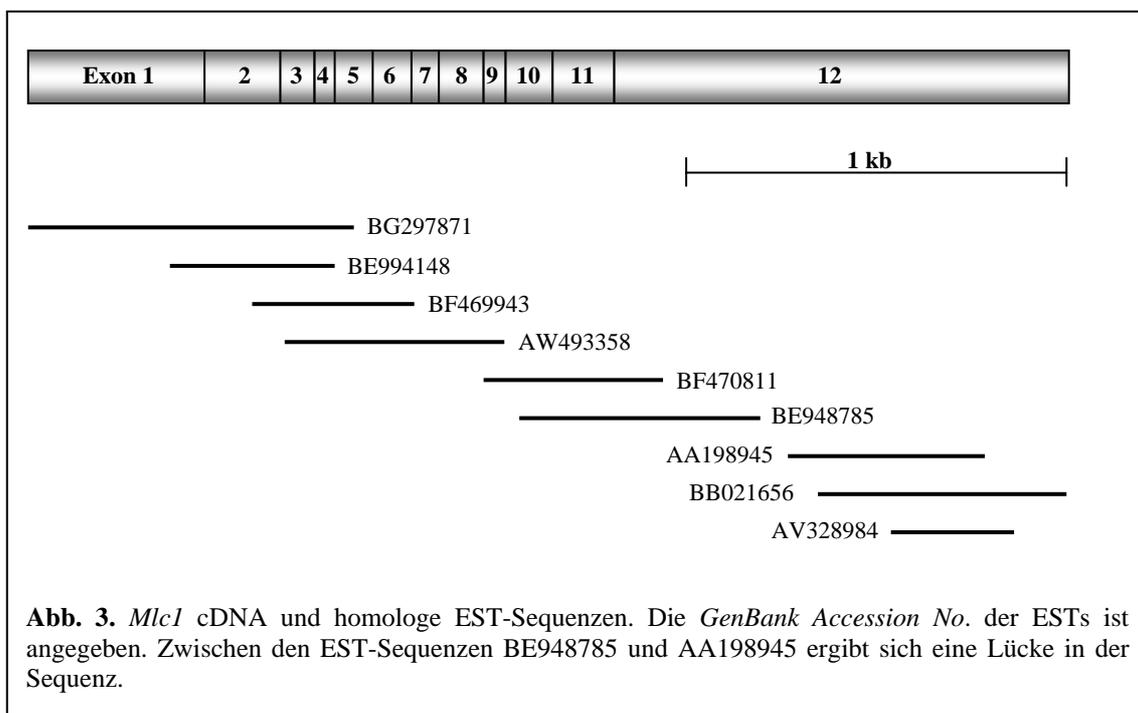
In Einzelfällen wurde als zusätzliche Kontrolle ein Schnelltest durchgeführt. Dazu wurden die weißen Kolonien der X-gal-Platten sowie eine blaue Kolonie als Negativkontrolle mit einer Öse auf einen neuen Ampicillin-Agar übertragen. Die Platte wurde vorher mit einem nummerierten Koordinatengitter versehen, so dass später eine Zuordnung der einzelnen Kolonien möglich war. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert. Von den einzelnen Kolonien wurde jeweils ein Teil mit einer heißen Öse aus der Platte ausgegraben und in einem Reaktionsgefäß mit 40 µl einer Phenol/Chloroform-Mischung (im Mischverhältnis 1:1) sowie 40 µl TE-Puffer überschichtet. Das Gemisch wurde anschließend für 7 Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert, die wässrige Phase vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und auf ein 1-prozentiges Agarosegel aufgetragen. Bei den Kolonien, in welchen das Insert erfolgreich eingebaut worden war, zeigte die T-Vektor-Bande eine etwas kürzere Laufstrecke.

3 Ergebnisse

3.1 Durchsuchen einer Maus-EST-Datenbank nach *MLC1*-homologen Sequenzen

Um ein dem humanen *MLC1* homologes murines Gen aufzuspüren, wurde zunächst die cDNA-Sequenz des humanen Gens (*GenBank Accession No.* AF319633) mit Sequenzen der *NCBI mouse EST database* mittels des BLASTN-Programmes verglichen. Der Vergleich erbrachte eine Reihe von überlappenden EST-Klonen mit großer Ähnlichkeit zur humanen *MLC1*-Sequenz, aus welchen die angenommene Sequenz der murinen *Mlc1*-cDNA konstruiert wurde. **Abbildung 3** zeigt die Lage der wesentlichen ESTs zueinander. Im 3'-Bereich konnte an einer Stelle keine überlappende Sequenz der EST-Klone gefunden werden, so dass hier zunächst eine Lücke in der Basenfolge bestehen blieb. Die Sequenz des am weitesten im 5'-Bereich gelegenen ESTs (*GenBank Accession No.* BG297871) wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit veröffentlicht und stand daher für die folgenden Untersuchungen noch nicht zur Verfügung.

Neben den oben erwähnten ESTs erbrachte die Datenbanksuche außerdem eine kurze genomische murine Sequenz (*GenBank Accession No.* AZ351634), deren Mittelteil eine sehr hohe Ähnlichkeit zum humanen Exon 10 besitzt. Diese Sequenz wurde später für die Isolation genomischer *Mlc1*-DNA aus einer Cosmid-Bibliothek genutzt.



3.2 Sequenzierung der *Mlc1*-cDNA

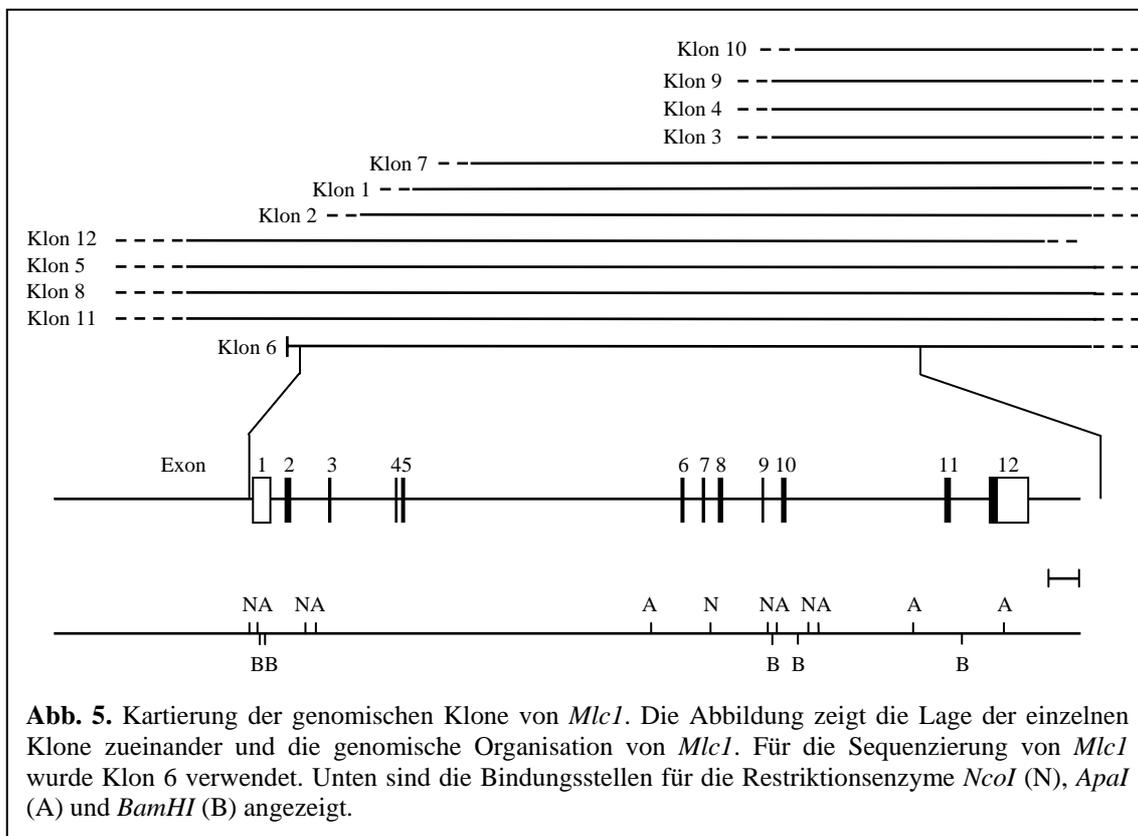
Um die Richtigkeit der ermittelten cDNA-Sequenz zu beweisen und die Lücke im 3'-Bereich zu schließen, wurden Untersuchungen an muriner cDNA durchgeführt. Die cDNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase aus Gesamt-mRNA von murinen Hirnzellen gewonnen. Mit drei aus der putativen Sequenz abgeleiteten Primerpaaren, „mWKL1cDNA-1F“/„mWKL1cDNA-1R“, „mWKL1cDNA-2F“/„mWKL1cDNA-2R“ und „mWKL1cDNA-3nestF“/„mWKL1cDNA-ex12R“, wurden drei DNA-Fragmente amplifiziert, dem 3'-Bereich, dem Mittelteil und dem 5'-Bereich des Gens entsprechend, und anschließend sequenziert. Für die Sequenzierung des 3'-Endes wurden zusätzlich die Primer „mWKL1ex12 F1“, „mWKL1ex12 F2“, „mWKL1ex12 F3“, „mWKL1ex12 R1“, „mWKL1ex12 R2“ und „mWKL1ex12 R3“ verwendet. Die Sequenzierung bestätigte im Großen und Ganzen die Richtigkeit der angenommenen cDNA-Sequenz von *Mlc1*. Lediglich an zwei Stellen wich die Basenfolge der ESTs von der sequenzierten Basenfolge ab (vgl. **Abbildung 7**). Da die murine cDNA eine starke Homologie zur humanen Sequenz zeigte, wurden die Grenzen zwischen den einzelnen Exons zunächst entsprechend den Exons im humanen *MLC1*-Gen gesetzt. Ihre Lage wurde später durch Untersuchungen an genomischer Maus-DNA bestätigt.

3.3 Isolierung und Kartierung von genomischen Klonen des *Mlc1*-Gens

Zur Identifikation von genomischen Klonen des murinen *Mlc1*-Gens wurde die 129/ola Maus-Cosmid-Bibliothek des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) durchsucht. Die Bibliothek enthält murine genomische DNA aus Milzzellen. Als Vektor wurde das Cosmid „Lawrist 7“ verwendet, welches in Wirtszellen des *E. coli*-Stammes DH5 alpha vermehrt wurde. Cosmide sind eine Form von Bakterienplasmiden, in welche zusätzlich Merkmale der Phagen-DNA (die so genannten *cos*-Sequenzen) eingebaut wurden, die eine bessere Verpackung der DNA ermöglichen. Ein Cosmid-Vektor kann so bis zu 40 kb Fremd-DNA aufnehmen. Die einzelnen Cosmidklone werden auf *high density*-Filtern in einem Koordinatennetz fixiert.

Die Filter der Cosmid-Bibliothek wurden durch Herrn Dr. Jobst Meyer mit einer ³²P-markierten Sonde hybridisiert. Als Sonde wurde die in der EST-Datenbank gefundene genomische murine Sequenz mit hoher Homologie zum humanen Exon 10 (*GenBank*

Primerpaaren „mWKL1cDNA-1F“/ “mWKL1cDNA-1R“, „mWKL1cDNA-2F“/ “mWKL1cDNA-2R“ und „mWKL1cDNA-3nestF“/ “mWKL1cDNA-ex12R“). Auf diese Weise war es möglich, festzustellen, ob ein Klon nur einen Teil des *Mlc1*-Gens oder aber das gesamte Gen enthält, je nachdem auf welche der drei Sonden sich ein positives Signal zeigte. Wurde die Vektorbande durch eine Sonde markiert, so wurde davon ausgegangen, dass der entsprechende Anteil von *Mlc1* am Rand des Inserts liegt und folglich nicht durch das Restriktionsenzym vom Vektor getrennt wurde. Die Ergebnisse der Restriktionsschnitte und der Southern-Blot-Hybridisierungen wurden verwendet, um eine Karte der Klone zu erstellen. Die **Abbildung 5** zeigt die Lage der einzelnen Klone zueinander.



Einen Sonderfall stellte Klon 2 dar. Bei diesem Klon zeigte die Vektorbande sowohl auf die 3'-Region wie auch auf die 5'-Region ein positives Signal, während mit der Sonde des Mittelteils nur Fragmentbanden angefärbt wurden. Dieser Klon wurde daher für weitere Untersuchungen herangezogen.

Da Klon 6 sowohl auf die Probe der 3'- wie auch der 5'-Region ein positives Signal aufwies, wurde dieser Klon im Wesentlichen für die Amplifikation der genomischen *Mlc1*-Sequenz, insbesondere der Exon- und Intronsequenzen, sowie der untranslatierten

Region am 3'-Ende verwendet. Für die Untersuchung der regulatorischen Sequenzen im 5'-Bereich wurde zusätzlich Klon 5 hinzugezogen, dessen Sequenz weiter in die 5'-flankierende Region des Gens reicht.

3.4 Versuch einer Isolation des Klon 2-Inserts

In den Southern-Blot-Analysen des Klons 2 wurde in den *ApaI*-Schnitten die Vektorbande sowohl durch die Probe der 3'- als auch der 5'-Region radioaktiv markiert. Dies legte die Annahme nahe, dass dieser Klon nur ein relativ kleines *Insert* besitzt, mit Beginn im 5'-Bereich des *MlcI*-Gens und Ende im 3'-Bereich des Gens. Ein derartiger Vektor wäre hilfreich um eine funktionsuntüchtige Variante des *MlcI*-Gens zu erzeugen, die beispielsweise für die Herstellung einer *Knock-out-mouse* verwenden finden könnte. Klon 2 wurde daher eingehender untersucht.

Aus den vorausgegangenen Untersuchungen war bekannt, dass mehrere Schnittstellen für das Enzym *ApaI* innerhalb des *MlcI*-Gens liegen. Der Vektor *Lawrist 7* enthält jedoch keine *ApaI*-Erkennungssequenz. Durch einen Schnitt mit diesem Enzym sollte es folglich möglich sein, der Mittelteil des *Inserts* so herauszuschneiden, dass der offene Vektor mit einem Teil des *MlcI*-Anfanges auf der einen und einem Teil des *MlcI*-Endes auf der anderen Seite übrig bleibt. Durch Religation würde ein Vektor mit einem funktionsuntüchtigen *MlcI*-Gen entstehen.

Der Klon 2-Vektor wurde zunächst erneut mit *ApaI* geschnitten, anschließend religiert und durch Elektroporation in *E. coli*-Bakterien vom Typ XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) eingebracht. Aus diesen Kulturen wurde erneut der Vektor gereinigt und durch weitere Enzymschnitte untersucht. Im erneuten Schnitt mit *ApaI* zeigte sich wie erwartet eine einzelne Bande, so dass von einer erfolgreichen Religation ohne Einbau weiterer Fragmente ausgegangen werden konnte.

Von dem religierten Vektor wurden außerdem Schnitte mit dem Enzym *SfiI* sowie mit *ApaI* und *SfiI* gleichzeitig angefertigt. Der Vektor *Lawrist 7* besitzt in seinen Randbereichen jeweils eine *SfiI*-Erkennungssequenz, so dass das Insert auf jeder Seite von einer *SfiI*-Schnittstelle gesäumt wird. Durch einen Schnitt mit *SfiI* sollte also das Insert herausgeschnitten werden, so dass zwei Fragmente entstehen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente zeigte sich jedoch beim Schnitt mit *SfiI* das gleiche Bandenmuster wie beim gleichzeitigen Schnitt mit beiden Enzymen, nämlich drei Banden bei etwa 1500, 3000 und 6500 bp. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre,

dass sich im Insert eine weitere *SfiI*-Schnittstelle direkt neben der *ApaI*-Schnittstelle befindet. Auch eine Verunreinigung der Enzyme bzw. ist als Ursache denkbar. Ein Pipettierfehler wurde durch nochmalige Durchführung des Versuches mit den gleichen Ergebnissen ausgeschlossen.

Zur Kontrolle wurden erneute Southern-Blot-Analysen des religierten Vektors durchgeführt. Hier zeigte der religierte Vektor jedoch kein Signal mehr auf die Probe des 3'-Bereichs. Wahrscheinlich hatte in den ursprünglichen Southern-Blots ein unvollständiger *ApaI*-Schnitt vorgelegen, der zu der Vermutung geführt hatte, das *Insert* von Klon 2 sei deutlich kleiner als das *Insert* der anderen Klone.

3.5 Erweiterung des 5'-Bereichs der cDNA

Im Verlauf der Arbeit wurde ein zusätzliches EST veröffentlicht (*GenBank Accession No.* BG297871), welches eine Überlappung zu dem zuvor im 5'-Bereich randbildenden EST zeigte und den 5' Bereich der cDNA um etwa 450 bp vergrößerte. Um sicherzustellen, dass es sich bei diesem EST um cDNA und nicht um eine genomische Sequenz handelte, wurden weitere Untersuchungen der murinen cDNA durchgeführt. Es wurden hierzu zwei Primer ausgewählt, von denen der erste („RTex1For“) im 5'-Bereich des neuen ESTs, also im Bereich des vermuteten Transkriptionsstarts, lag. Der zweite Primer („RTex2Rev“) wurde im Bereich von Exon 2 gewählt. Die PCR-Reaktion mit diesem Primerpaar von muriner cDNA erbrachte ein etwa 500 bp großes Produkt, passend zu der Länge der EST-Sequenz. Durch Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass auch die Basenfolge des PCR-Produkts mit der des ESTs übereinstimmte. Zusätzlich wurde mit den gleichen Primern eine PCR von genomischer DNA durchgeführt, wobei das Cosmid von Klon 6 als Vorlage verwendet wurde. Hierbei ergab sich ein 950 bp großes DNA-Fragment, welches ebenfalls sequenziert wurde. In diesem Fragment war zusätzlich die Sequenz des ersten Introns enthalten.

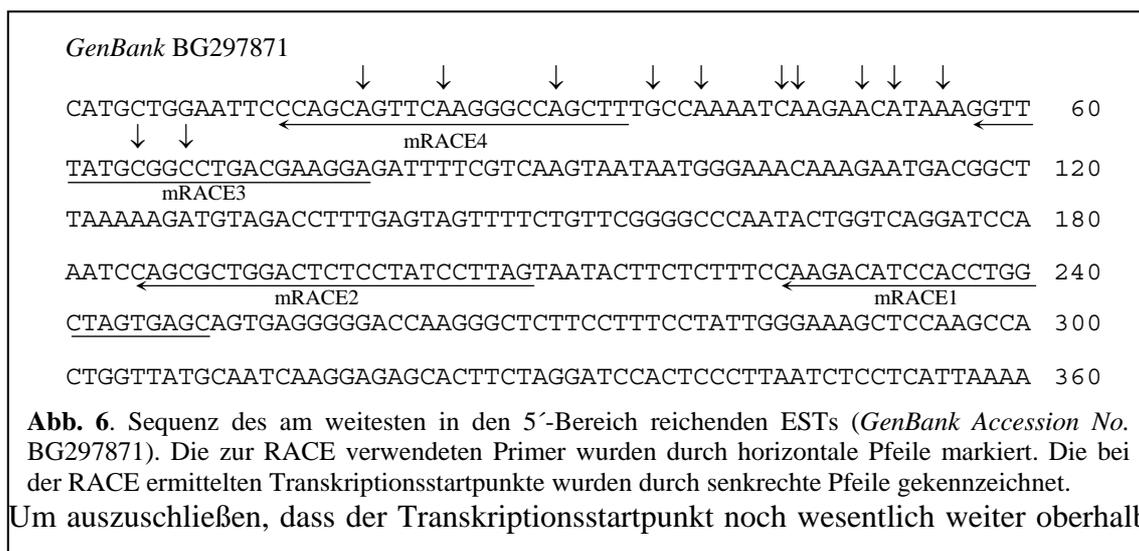
3.6 Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch 5'-RACE

Um den Transkriptionsstart von *Mlc1* zu bestimmen wurde in Zusammenarbeit mit Yana Syagailo eine 5'-RACE durchgeführt. Es wurden 2,6 µg Gesamt-RNA aus Hirngewebe adulter Mäuse eingesetzt. Für die Reaktionen wurde das *SMART RACE cDNA Amplification Kit* der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet. Als

genspezifische Primer wurden „mRACE1“, „mRACE2“, „mRACE3“ und „mRACE4“ ausgewählt, die alle im Exon 1 von *Mlc1* gelegen sind.

Zunächst erfolgte die Synthese von cDNA aus mRNA in einer Reverse-Transkriptase-PCR. Zur Kontrolle wurde von einer kleinen Menge des Reaktionsproduktes eine PCR mit den bereits oben erwähnten Primern „RTex1For“ und „RTex2Rev“ durchgeführt, die wie erwartet ein Produkt von etwa 500 bp Größe erbrachte. Von der cDNA wurden DNA-Fragmente unter Verwendung des im Kit enthaltenen Universalprimer sowie eines genspezifischen Primers amplifiziert. Die Reaktionsprodukte des ersten Durchgangs wurden anschließend als Matrize für eine so genannte *Nested-PCR* verwendet, bei der neben dem „*Nested universal primer*“ des Kits ein weiterer genspezifischer Primer eingesetzt wurde. Die entstehenden DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und gereinigt. Die Produkte wurden anschließend in den *pGEM-T*-Vektor (Promega) inkloniert, in *E. coli*-XL1-Blue (Stratagene) vermehrt und unter Verwendung der zum *pGEM-T*-Vektor gehörigen Universalprimer sequenziert.

In den Sequenzen zeigten sich unterschiedlich lange DNA-Fragmente mit Transkriptionsstartpunkten bei den Positionen +19, +24, +31, +37, +40, +45, +46, +50, +52, +55, +65 und +68, bezogen auf den Startpunkt des am weitesten in 5'-Richtung reichenden Transkripts des Klons IMAGE:4507666 (*GenBank Accession No.* BG297871). Dieser wurde daraufhin als Position 1 der gesamten cDNA bestimmt. Die Lage der genspezifischen Primer sowie die Transkriptionsstartpunkte der RACE-PCR-Produkte wurden in **Abbildung 6** wiedergegeben.



bereich („mWKLPromF1“) und einem zweiten auf Exon 2 („mWKL1 ex2->ex1“) oder Exon 3 („mWKL1 ex3->int2“) von cDNA aus Gehirnzellen adulter Mäuse durchgeführt. In der anschließenden Gelelektrophorese zeigte sich eine Vielzahl von Banden unterschiedlicher Größe, die jedoch allesamt kleiner waren als der Abstand zwischen den Primerpaaren der cDNA. Ein Transkriptionsstart im oberen 5'-Bereich ist daher unwahrscheinlich.

Die gesamte cDNA-Sequenz wurde in der *GenBank* Datenbank unter der *Accession No.* AF449425 veröffentlicht. Die Sequenz mit den zugehörigen Primern ist in **Abbildung 7** wiedergegeben.

3.7 Beschreibung der *Mlc1*-cDNA und des resultierenden Proteins

Das *Mlc1*-Transkript umfasst nach den vorangegangenen Untersuchungen eine gesamte Länge von 2786 bp, darin sind 496 bp 5'-untranslatierte Region und 1141 bp 3'-untranslatierte Region enthalten. Anders als im humanen *MLC1*-Gen gibt es im murinen Gen verschiedene mögliche Startpunkte für die Translation, von denen jedoch die meisten nach kurzer Strecke von einem Stoppkodon gefolgt sind. Die Sequenzanalyse zeigte ein offenes Leseraster, welches für 382 Aminosäuren kodiert und durch ein Stoppkodon bei Position 1643 terminiert wird. Als Startpunkte der Transkription kommen zwei ATG-Triplets bei Nukleotidposition 425 und 497 in Frage. Keine dieser Sequenzen erfüllt jedoch Kozaks Consensus (ACCATGG) vollständig. Der wahrscheinlichste Transkriptionsstart wurde daher bei Position 497 angenommen, analog zu der Lage des Startkodons im humanen Gen. Somit werden 382 Aminosäuren kodiert, beginnend mit dem ATG-Kodon bei Position 497 und terminiert durch das TGA-Kodon bei Position 1643. Die ermittelte Aminosäuresequenz ist zusammen mit der cDNA-Sequenz in **Abbildung 8** wiedergegeben. Die unter 3.2 beschriebenen Polymorphismen bei Position 1395 (C/A) und 1565 (G/A) führen jeweils zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Glutamin an Position 300 der Aminosäurekette und von Glycin zu Arginin an Position 357.

```

1  CATGCTGGAA  TTCCAGCAG  TTCAAGGGCC  AGCTTTGCCA  AAATCAAGAA  CATAAAGGTT  TATGCGGCCT  GACGAAGGAG
81  ATTTTCGTCA  AGTAATAATG  GGAACAAGG  AATGACGGCT  TAAAAAGATG  TAGACCTTTG  AGTAGTTTTC  TGTTCGGGG
161  CCAATACTGG  TCAGGATCCA  AATCCAGCGC  TGGACTCTCC  TATCCTTAGT  AATACTTCTC  TTTCCAAGAC  ATCCACCTGG
241  CTAGTGAGCA  GTGAGGGGGA  CCAAGGGCTC  TTCCTTTCCT  ATTGGGAAAG  CTCCAAGCCA  CTGGTTATGC  AATCAAGGAG
321  AGCACTTCTA  GGATCCACTC  CCTTAATCTC  CTCATTAAAA  TTCAGGAAGC  TGTGTGCCTG  CCCCTGGCTG  AAGTGCAGTT
401  TGGCTGAGAG  CTTTTGTTC  ACTTATGAAT  ACTTCTTGCT  GGAAGTCCAT  CACCCAGAGG  CCAGCTTTCC  CAACCGCCGG
      ↗ Exon 2
481  ACGACAGCAG  AGCGCCATGA  CACGGGAGGG  GCAGTTCAGG  GAGGAAGTGG  GCTATGACCG  GATGCCACA  CTGGAGAGGG
561  GTCGGCAGGA  TGCAGGACGG  CAGGACCCAG  GCAGCTACAC  CCCTGACTCA  AAGCCCAAGG  ACCTGCAGCT  GTCGAAGAGG
      ↗ Exon 3
641  TTGCCCCCGT  GCTTCAGCTA  CAAGACATGG  GTGTTCTCTG  TGTTAATGGG  GAGCTGCCTT  CTTGTGACCT  CTGGGTTTTC
      ↗ Exon 4
721  GCTCTACTTG  GGAACGTGT  TCCCTCCGA  GATGGATTAT  TTGCCTGTG  CAGCAGGCTC  TTGCATCCCC  TCAGCAATTG
      ↗ Exon 5
801  TGAGCTTCGC  TGTAGGGAGG  AGAAATGTCA  GTGCGATTCC  CAACTTTCAG  ATATTGTTTG  TTTCCACGTT  CGCTGTGACT
      ↗ Exon 6
881  ACTACGTGTT  TGATCTGGTT  TGGGTGTAAA  CTGATCCTGA  ATCCTTCAGC  CATAAACATT  AATTTCAACC  TCATCTCTCT
      Exon 7 ↗
961  CCTGTGTTG  GAGTCCTCA  TGGCAGCCAC  GGTGATCATT  TCGGCCCGGT  CCAGTGAGGA  GCCCTGCAAG  AAGAAGAAGG
      ↗ Exon 8
1041  GTTCATCTC  CGATGGCTCT  AACATTCTGG  ATGAAGTGAC  GTTTCCTGCT  CGGGTCTTAA  AGTCTACTC  TGTGGTAGAA
      ↗ Exon 9
1121  GTAATTGCTG  GTGTCTCCGC  TGTCTCCGGT  GGGGTGATCG  CTCTAAACGT  AGAGGAAGCT  GTCTCGGGTC  CACATCTCTC
      ↗ Exon 10
1201  GGTGACGTT  TTTTGGATT  TAGTGGCTTG  TTTTCCAGT  GCCATTGCCA  GCCATGTGAC  AGCGGAATGT  CCCAGCAAGT
      ↗ Exon 11
1281  GTCTGGTTGA  GGTGCTGATA  GCCATCAGCA  GCCTCACATC  CCCACTGCTA  TTCCTGCCTC  CTGGATATCT  GTCCTTCAGT
      A
1361  GTGATGAGAG  TCGTGGAGAT  TTTTAAAGAT  TACCCGCCAG  CCATCAAATC  TTATGATGTT  CTCCTGCTGC  TCCTGTTGCT
      * BF470811 / BE948785
1441  GCTGTGCTG  CTTACAGGGG  GACTCAACAC  TGGCACCGCC  ATCCAGTGTG  TGAGCTTCAA  AGTCAGCGCC  CGGCTGCAGG
      A Exon12 ↗ mWKL1cDNA-3nestF
1521  CTGCATCCTG  GGACCCCCAG  TCCTGTCCCC  AGGAGCGGCC  AGCAGGGGAG  GTGGTCCGAG  GCCCCCTCAA  GGAGTTTGAC
      * BF470811
1601  AAAGAGAAAG  CTTGGAGAGC  TGTGGTGGTA  CAAATGGCCC  AGTGACTACA  GGATAAAGAG  ACTGAGTCTG  GGTGTCTGCC
      mWKL1cDNA-2R
1681  CGGACCCAG  CGTGTCCAC  CGTACGGACT  CTAACCATTG  CACGGCTACT  GCTTTCTAAC  ATACTATTTT  CCTCCTGTGA
1761  GGGCAGCCCA  GGCTGCAAGG  TGGCTTTTCG  GTTCTGTGCG  TAGTTTAACT  TGAAACAGG  AAAATATTGA  GTGTTGGGCC
1841  CTATTAGGTC  TCAGTGTGTG  CACCTCAGGT  GACCTGACG  GCCTGGGTG  TGCTTTTTTT  TCCAGCCCTC  CTCACCTCTT
1921  GGGTTGACCC  TCATTACCA  GGACCTGGTG  TTCTGGCCTT  AGGGCACTTC  CATGCCTTCT  CATGCTTGCC  ACAGTGCAGG
2001  GATAGTTTGG  CTGTGAGACT  CACAGATAGT  TTGTATATCA  CCTCCCAGG  CCCCAGAAGA  CAGCTGGACT  CTCCCAGCTA
2081  ACCAGAGAAT  CAAGGAACCT  ATAGTAAGTT  GGGTCCTTTG  TGAAGCTGGG  GATCATTTTA  GGAATTGCTT  TCTGGGAGGG
2161  GAGCCTCTGT  GCTTGGGAAG  ACAGCGAGCG  TGCTTTACT  GAGCTGGGGT  ATCAATGGGT  TCCCTTCCAG  GAAGAGGTAT
2241  ATTCTGTGCC  TCAGAAGAGC  TGCCAGGGTC  AGGAGAGAG  TGAAAATCCT  TCTAGGCAGC  TCACTTGTAG  ATACACACGA
2321  CTGCCAGGAC  TCAGGAAAAG  CGTGGCCATT  TTCAAACAGA  GGGATGCAAG  GATGGCACCT  GACAGGGATC  ATGTAGGAGC
2401  AAAGTGGCCC  GCCTCCAGT  GTCGGGGACT  TCCGGTCTG  TCTCCATTCT  CTGCAGCCTG  CCCTAAATGA  GAGATCATCT
2481  TTGCTTGCTT  ATGTGCGGAG  CCCAATGGGC  TTGGGGTCTT  CTGCAGCTCT  ATATACCACA  CGCTATTGGG  TGGGAAGGGA
2561  GTGGTGGTCC  CACTGGGCTG  ACAAGCCATC  CGCTTTCAGG  ACCTGGGCTT  TCAGGACCAG  AATGAGCGCG  CAAGAGGATT
2641  GCTGCCAGCT  TGCATTCTA  ATTTAGAGG  GATGTTTTGT  TTTTAACTGA  CTCATATAAG  TGGGGTCTGA  AAATCGTCTC
2721  TTGTATACTT  TTGCTGTGTA  TAGATTAATA  TGCTTGAGCA  ATAAATGCTA  ACTTGCAAA  GTTGAG
      ↗ mWKL1cDNA-ex12R

```

Abb. 7. Nukleotidsequenz der *Mcl1* cDNA (*GenBank Accession No.* AF449425). Der Beginn der einzelnen Exons wurde durch kurze Pfeile angezeigt. Der Translationsstart (ATG), das Stoppkodon (TGA) und das Polyadenylierungssignal (AATAAA) sind unterstrichen. Die beiden Positionen, an denen die sequenzierte Basenabfolge von der EST-Sequenz abweicht, wurden durch einen Stern mit der jeweiligen EST-Nummer gekennzeichnet und die Base der EST-Sequenz über der eigentlichen Sequenz angegeben. Die Primer wurden durch lange Pfeile markiert.

| | | | | | | | |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|
| m | MTREGQFREE | LGYDRMPTLE | RGRQDAGRQD | PGSYTPDSKP | KDLQLSKRLP | PCFSYKTVWF | 60 |
| | | | | | | | |
| h | MTQE_PFREE | LAYDRMPTLE | RGRQD_____ | PASYAPDAKP | SDLQLSKRLP | PCFSHKTWVF | 54 |
| m | SVLMGSCLLV | TSGFSLYLG N | VFPSEMDYLR | CAAGSCIPSA | IVSFAVGRRN | VSAIPNF QIL | 120 |
| | | | | | | | |
| h | SVLMGSCLLV | TSGFSLYLG N | VFPAEMDYLR | CAAGSCIPSA | IVSFTVSRRN | ANVIPNF QIL | 114 |
| m | FVSTFAVTTT | CLIWFGCKLI | LNPSAININF | NLILLLLLLEL | LMAATVIIISA | RSSEEPCKKK | 180 |
| | | | | | | | |
| h | FVSTFAVTTT | CLIWFGCKLV | LNPSAININF | NLILLLLLLEL | LMAATVIIAA | RSSEEDCKKK | 174 |
| m | KGSISDGSNI | LDEVTFPARV | LKSYSVVEVI | AGVSAVLGGV | IALNVEEAVS | GPHLSVTFFW | 240 |
| | | | | | | | |
| h | KGSMSDSANI | LDEVPPPARV | LKSYSVVEVI | AGISAVLGGI | IALNVDDSVS | GPHLSVTFFW | 234 |
| m | ILVACFPSAI | ASHVTAECPS | KCLVEVLIAI | SSLTSPLLFT | ASGYLSFSVM | RVVEIFKDYP | 300 |
| | | | | | | | |
| h | ILVACFPSAI | ASHVAAECPS | KCLVEVLIAI | SSLTSPLLFT | ASGYLSFSIM | RIVEMFKDYP | 294 |
| m | PAIK_SYDVL | LLLLLLLLLL | QGGLNTGTAI | QCVSFKVSAR | LQAASWDPQS | CPQERPAGEV | 539 |
| | | | | | | | |
| h | PAIKPSYDVL | LLLLLLVLLL | QAGLNTGTAI | QCVRFKVSAR | LQGASWDTQN | GPQERLAGEV | 354 |
| m | VRGPLKEFDK | EKAWRVVVQ | MAQ | | | | 382 |
| | | | | | | | |
| h | ARSPLKEFDK | EKAWRVVVQ | MAQ | | | | 377 |

Abb. 8. Vergleich der Aminosäuresequenzen des murinen Mlc1-Proteins und des humanen MLC1-Proteins. Die murine Sequenz ist jeweils in der oberen, mit „m“ gekennzeichneten Zeile wiedergegeben, die humane in der jeweils untern, mit „h“ gekennzeichneten Zeile. Übereinstimmungen wurden durch senkrechte Linien markiert. Die angenommenen Transmembrandomänen wurden fett gedruckt.

3.8 Vergleich des humanen und des murinen Proteins

Mit Hilfe des *Align*-Programmes *MacMolly* wurden die Aminosäuresequenzen des humanen und des murinen MLC1-Proteins miteinander verglichen. Während für das murine Protein wie oben ausgeführt eine Länge von 382 Aminosäuren angenommen wurde, ist das putative MLC1-Protein um 5 Aminosäuren kürzer. Insgesamt haben beide Proteine 336 Aminosäuren gemeinsam. Dies entspricht einer Homologie von 89,1 % für das gesamte Protein. Zur Berechnung wurde die Zahl der gemeinsamen Aminosäuren durch die Aminosäurezahl des humanen Proteins geteilt. Legt man der Berechnung jedoch nur die putativen Transmembranregionen zu Grunde, so finden sich sogar 96,7 % gemeinsame Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz von *MLC1* ist daher als hoch konserviert zwischen den beiden Spezies anzusehen. Den direkten Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt **Abbildung 9**.

Mlc1 cDNA

```

1  catgctggaattccagcaggttcaagggccagctttgccaaaatcaagaacataaaagtttatgcccctgacgaaggagattttcgtca
91  agtaataatgggaaacaaagaatgacggcttaaaaagatgtagacctttgagtagttttctgttcggggcccaataactggtcaggatoca
181  aatccagcgtctggactctcctatccttagtaataacttctcttccaagacatccacctggctagttagcagtgagggggccaaggctc
271  ttcctttctattgggaaagctccaagcactgggttatgcaatcaaggagagcacttctaggatccactcccttaatctcctcattaaaa
361  ttcaggaagctgtgtcctgcccctggctgaagtgacgtttggctgagagcttttgttccacttatgaaataacttcttctgctggaagtcac
451  caccagagggccagctttccaaccgccgacagcagagcgccatgacacgggaggggagcttcaggagggaactgggctatgaccg
M T R E G Q F R E E L G Y D R 15
541  gatgccccacactggagaggggtcggcaggatgcaggacggcaggaccagggcagctacaccctgactcaaagcccaggacctgcagct
M P T L E R G R Q D A G R Q D P G S Y T P D S K P K D L Q L 45
631  gtogaagaggttgccccctgcttcagctacaagacatgggtgttctctgtgttaatggggagctgccttctgtgacctctgggttttc
S K R L P P C F S Y K T W V F S V L M G S C L L V T S G F S 75
721  gctcacttggggaacgtgttcccctccgagatggattatgtgcctgtgacagcagctcttgcacccctcagcaattgtgagcttcgc
L Y L G N V F P S E M D Y L R C A A G S C I P S A I V S F A 105
811  ttagggagggagaatgtcagtcgcatcccaactttcagatattgtttgtttccacgttcgctgtgactactacgtgtttgatctgggtt
V G R R N V S A I P N F Q I L F V S T F A V T T T C L I W F 135
901  tgggtgtaaactgatcctgaatccttcagccataaaacttaatttcaacctcatcctgctcctgctgttggagctcctcatggcagccac
G C K L I L N P S A I N I N F N L I L L L L L E L L M A A T 165
991  ggtgatcatttccggcccggtccagtgaggccctgcaagaagaagggttccatctccgatggctcctaacttccgatgaagtgc
V I I S A R S S E E P C K K K K G S I S D G S N I L D E V T 195
1081  gtttctgctcgggtcctaaagtccactctgtggttagaagtaattgctgggtctcctcggctgctcctcgggggagctcctctaaactg
F P A R V L K S Y S V V E V I A G V S A V L G V I A L N V 225
1171  agaggaagctgtctcgggtccacatctctcggtagcgttctttggatttttagtggcttggtttccagtgccattgccagccatgtgac
E E A V S G P H L S V T F F W I L V A C F P S A I A S H V T 255
1261  agcgaatgtcccagcaagtgtctggttaggtgctgtagccatcagcagcctcacatcccactgctattcactgcctctggatatact
A E C P S K C L V E V L I A I S S L T S P L L F T A S G Y L 285
1351  gtccttcagtgatgagagctcgtggagatttttaagattaccgccacatcaaatcttatgatgttctcctgctgctcctgttctgct
S F S V M R V E I F K D Y P P A I K S Y D V L L L L L L 315
1441  gctgctgctgcttcagggggactcaacactggcaccggccatccagtggtgtagcttcaaagtccagcggccggctgagggctgcatcctg
L L L L Q G G L N T G T A I Q C V S F K V S A R L Q A A S W 345
1531  ggacccccagctcctgtcccaggagcggccagcaggggaggttccagggcccccctcaaaggatttgacaaagagaaagcctggagagc
D P Q S C P Q E R P A G E V V R G P L K E F D K E K A W R A 375
1621  tgtgggtgatacaaatggcccagtgactacagagataaagagactgagctcgtgggtgctgcccggaccccagcgtgctccaccgtacggact
V V V Q M A Q 382
1711  ctaaccattgcacggctactgctttctaacataactatccctcctgtgaggggagcccaggctgcaaggtggcttttcggttcctgtgc
1801  tagtttaacttgaacaggaaatattagtggttggccctatttaggtctcagtggtgacacctcaggtgacctgacggcctgggtgt
1891  tgctttttttccagccctcctcaacttctgggttgacctcaatcaccaggacctgggttctggccttagggcacttccatgccttct
1981  catgctgcccagctgagggatagtttggctgtgagactcagagatagttgtatatacctcccaggcccccagaaagacagctggact
2071  ctcccagctaacagagaatcaaggaacctatagtaagttgggtcctttgtgaagctggggatcatttttaggaattgcttctgggaggg
2161  gagcctctgtgcttgggaagacagcagcagcgtgcttactgagctgggtatcaatgggttcccttccaggaagaggtatattctgtgcc
2251  tcagaagagctgcccagggctcagggagagagtgaaaaatccttctaggcagctcactttagatatacacacagctgcccagggactcagga
2341  cgtggcattttcaaacagagggatgcaaggatggcactgacagggatcatgtaggagcaaaagtgcccccctcagctgctcggggact
2431  tccggctcctgctcattctcagcctgcccctaaatgagagatcatcttggctgacctatgtcgggagcccattgggcttggggctcct
2521  ctgagctctatataccacacgctatgggtgggaaagggagtggtgggtcccactgggctgacaagccatccgctttcaggacctgggctt
2611  tcaggaccagatgagccggaagaggtgctgcccagctgcaacttctaatttttagagggatgtttgttttaactgactcataaag
2701  tggggtctgaaaatcgtctcctgtataacttttctggttatagattaatagcttgagcaataaatgctaaactgcaaatgttag

```

Abb. 9. Nukleotidsequenz der *Mlc1* cDNA (*GenBank Accession No.* AF449425). Das Startkodon (ATG), das Stoppkodon (TGA) sowie das Polyadenylierungssignal (AATAAA) sind unterstrichen. Der ebenfalls im Leseraster gelegene zweite mögliche Transkriptionsstartpunkt wurde fett gedruckt. Unterhalb der kodierenden Sequenz wurde die abgeleitete Aminosäuresequenz angegeben.

3.9 Klonierung des 3'-Endes der cDNA

Für *in situ*-Hybridisierungen wurde ein etwa 1,2 kb großes PCR-Produkt vom 3'-Ende des *Mlc1*-Gens mit den Primern „mWKL1cDNA-3nestF“ und „mWKL1cDNA-ex12R“ amplifiziert, in den *pGEM-T*-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert und anschließend durch Elektroporation in *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) eingebracht. Zur Kontrolle, ob das Insert erfolgreich in den Vektor eingebaut wurde, wurden Kolonien auf X-Gal-Platten gezüchtet. Kolonien, in deren Vektor kein Insert eingebaut wurde, bilden, befähigt durch das *LacZ'*-Gen, einen blauen Farbstoff. Durch den Einbau eines Inserts wird das *LacZ'*-Gen zerstört, so dass die Kolonien weiß

erscheinen. Von den so identifizierten positiven Kolonien wurde zusätzlich ein Schnelltest wie unter 2.2.14.3 beschrieben durchgeführt. Einer der positiven Klone wurde zufällig ausgewählt, in einer Flüssigkultur über Nacht weiter vermehrt und die T-Vektor-DNA dieses Klons durch Aufreinigung gewonnen.

Zur Kontrolle der Insertgröße wurde die Vektor-DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten. Da sich im T-Vektor auf beiden Seiten des Inserts eine *PvuII*-Schnittstelle sowie auf einer Seite des Inserts eine *SallI*- und auf der anderen Seite eine *NcoI*-Erkennungssequenz befindet, konnte sowohl mit einem *PvuII*-Schnitt sowie mit einem gleichzeitigen *NcoI*- und *SallI*-Schnitt das Insert aus dem Vektor herausgetrennt und seine Größe auf einem Agarosegel bestimmt werden. Die Größe der Fragmente entsprach den Erwartungen, wobei sich beim Schnitt mit *PvuII* auf Grund einer im Insert gelegenen *PvuII*-Schnittstelle zwei Insert-Fragmente zeigten.

Der T-Vektor enthält außerdem auf einer Seite des Inserts eine *ApaI*-Erkennungssequenz. Da auch im Randbereich des Inserts, etwa 270 bp vom 5'-Ende des Inserts entfernt, eine *ApaI*-Schnittstelle vorhanden ist, war es möglich nach Restriktionsschnitt mit *ApaI* aus der Größe der Fragmente die Orientierung des eingebauten Inserts im Vektor zu bestimmen. Wurde im *ApaI*-Schnitt nur ein kleineres DNA-Fragment von etwa 300 bp Größe herausgetrennt, so musste die *ApaI*-Schnittstelle des Inserts der des Vektors zugewandt sein. Bei einem größeren Fragment von etwa 1000 bp Größe verhielte es sich entsprechend umgekehrt.

Bei dem untersuchten Klon zeigte sich nach dem Schnitt mit *ApaI* in der Gelelektrophorese neben der Vektorbande eine Bande bei etwa 1000 bp. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Polyadenylierungssequenz des Inserts (welche weiter von der *ApaI*-Erkennungssequenz des Vektors entfernt lag) der *ApaI*-Schnittstelle des Vektors zugewandt war.

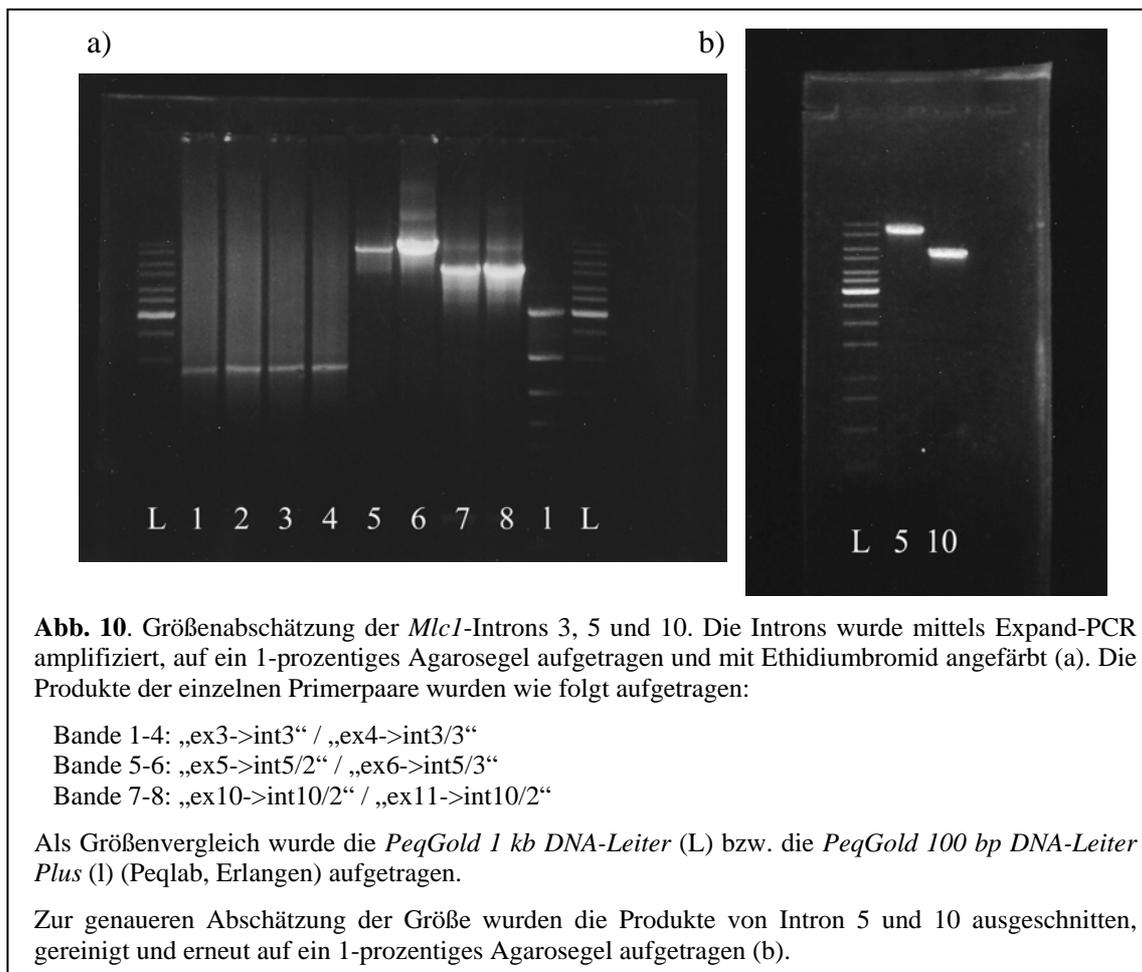
3.10 Analyse der genomischen Organisation des *MlcI*-Gens

In den Restriktionsfragmentanalysen hatte Klon 6 auf die Sonden von Anfang, Mitte und Ende der *MlcI*-cDNA ein positives Signal gezeigt. Es wurde daher angenommen, dass dieser Klon das gesamte *MlcI*-Gen enthält. Klon 6 wurde daher als Matrize für die weiteren Untersuchungen der genomischen Sequenz verwendet.

Zur Bestimmung der Intronsequenzen wurden ausgehend von der putativen cDNA-Sequenz Primerpaare ausgewählt, von denen jeweils der erste Primer auf dem 5'-, der

zweite auf dem 3'-flankierenden Exon des zu untersuchenden Introns lag. Zur Auswahl der Primer wurde das Programm *Primer3* verwendet. Es wurde zunächst versucht, mit den Primerpaaren ein PCR-Produkt des jeweiligen Introns zu gewinnen. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, gereinigt und sequenziert.

Durch die Sequenzierung wurde die Basenfolge des Exon/Intron-Überganges und des angrenzenden Intronbereichs bestimmt. Ausgehend von der ermittelten Intronsequenz wurden jeweils neue Primer bestimmt, von denen aus weiter in das Intron hinein sequenziert wurde. Mit dieser als *Primer-walking* bezeichneten Methode gelang es, die Basenfolge der meisten Introns vollständig zu ermitteln. Bei größeren Introns erfolgte die Sequenzierung nicht vom PCR-Produkt aus, sondern direkt von der Cosmid-DNA (Klon 6). Die Sequenzierbedingungen wurden entsprechend abgewandelt.



Bei einigen Introns (Intron 3, 5 und 10) war es jedoch nicht möglich, unter den Standard-PCR-Bedingungen ein einheitliches PCR-Produkt zu erhalten. In wiederholten

Versuchen mit unterschiedlichen Puffer-, Primer- und DNA-Konzentrationen wurden immer wieder nur unspezifische Banden nachgewiesen. Unter der Annahme, dass diese Introns deutlich größer seien als im menschlichen Gen, wurde eine PCR mit dem *Expand High Fidelity PCR System* (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt, die besonders für die Amplifikation von großen DNA-Fragmenten geeignet ist. Nach der elektrophoretischen Auftrennung zeigte sich bei den Produkten von Intron 5 und Intron 10 jeweils eine stark angefärbte Bande mit gering gefärbten Banden von Nebenprodukten. Die stärksten Banden wurden jeweils ausgeschnitten, gereinigt und auf beiden Seiten ansequenziert. Die Sequenzen bestätigten, dass es sich bei den Fragmenten um Intron 3, Intron 5 bzw. Intron 10 handelte. Die Größe der Introns wurde anhand von Größenstandards (*peqGOLD 1 kb DNA-Leiter* von PeqLab, Erlangen) auf 8,5 kb für Intron 5 und 5 kb für Intron 10 bestimmt (vgl. **Abbildung 10**). Das PCR-Produkt von Intron 3 zeigte auf dem Agarosegel unter UV-Licht nur eine schwach leuchtende Bande mit einem breiten Spektrum von unspezifischen Nebenprodukten. Die Bande wurde ebenfalls ausgeschnitten, gereinigt und mit Primern von beiden Seiten des Introns ansequenziert. Es konnte hierdurch bestätigt werden, dass es sich um das richtige PCR-Produkt von Intron 3 handelte. Seine Größe wurde auf 1,9 kb festgelegt.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Größe der einzelnen Exons und Introns, sowie über die Beschaffenheit der Exon/Intron-Übergänge.

Tab. 1. *Mcl1* Exon/Intron-Übergänge

| Exon | Exongröße (bp) | Exon/Intron-Übergänge | | |
|------|----------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------|
| | | 5' <i>Splice Donor Site</i> | Introngröße (bp) | 3' <i>Splice Acceptor Site</i> |
| 1 | 492 | GCAGAG gt aagc | 518 | atgcctgtttcc ag CGCCAT |
| 2 | 199 | ATGGGG gt gagt | 1206 | ttgctcttttgc ag AGCTGC |
| 3 | 90 | GGCTCT gt aagc | ~1900 | tggctctctttac ag TGCATC |
| 4 | 54 | AGTGCG gt aagt | 137 | ctttgtttttcc ag ATTCCC |
| 5 | 102 | ATAAAC gt gagt | ~8500 | tgtttcctttgc ag ATTAAT |
| 6 | 102 | AAGAAG gt gggt | 382 | ttccctttctct ag GGTTC |
| 7 | 72 | TACTCT gt aaga | 443 | tttttttacc ag GTGGTA |
| 8 | 117 | GTGGCT gt gagt | 1173 | tgctctcttcc ag TGTTTT |
| 9 | 57 | TGTCTG gt aggt | 611 | tgctttcctgcc ag GTTGAG |
| 10 | 123 | ATCAAA gt acgt | ~5000 | ctccttctctg ag TCTTAT |
| 11 | 162 | GGGGAG gt gagt | 967 | ttctttcatcac ag GTGGTC |
| 12 | 1216 | | | |

Mit dieser Tabelle werden die fehlerhaften Angaben in unserer Veröffentlichung (Steinke *et al.*, 2003) korrigiert.

Mcl1-Intron 3

```

gtaagcacgatcctcagccacaccagcaccctgactctcccattgtgggtccgaggetct
gtgatctgggggttcataggtttccggttgactactctcgtgacttagcaggtctgactcct
gggtgagaaacagcactttgttcctggcatgttgtggtgctgtggtgctcctggatgcca
tcaagggacttctagggttaggggagctccttgtatccg
  gtagattgacaatgaccgctgtgcctgtgtggttccgattatt
  gtagattgacaacgatgatgtgcctgtgtggttccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgatgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggttccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggt°ccgattatt
  gtagattgacaacgatg°tgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatg°tgtgcctgtgtggt°ccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggt°ccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  ...
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatg°tgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggt°ccgattatt
  gtagattgacaacgatg°tgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatg°tgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatg°tgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgattatt
  gtagaagcttgaacattgcaacacatgattgtccttagttttatgctgagctgagttaaaa
  ctcaaacgtcttcagcttggtaggcaaaagctctaaccctgagctgcacctggccgcaa
  tgcattgggtttcagggtagcatcatgtccaggacacaagactcaggtgaactcttggtc
  acttgggttctcgttctctttacag

```

Abb. 11. Sequenz des *Tandem-Repeats* im Intron 3 des *Mcl1*-Gens. Die repetitive Sequenz wurde jeweils von den flankierenden Sequenzen ausgehend so weit wie möglich sequenziert. Die Positionen, an denen sich Abweichungen von der Consensus-Sequenz finden, wurden fett gedruckt. Stellen, an denen die Sequenz heterozygot vorliegt, sind durch zwei Buchstaben auf einer Position gekennzeichnet. Die *Splice-Sites* von Intron 3 sind unterstrichen.

Aufgrund der Größe der Introns 3, 5 und 10 war eine vollständige Sequenzierung nicht möglich. Bei der Sequenzierung von Intron 3 wurde zudem ein *Tandem-Repeat* (*variable number of tandem repeats/ VNTR*) gefunden (vgl. **Abbildung 11**). Eine repetitive Einheit besteht aus 42 Nukleotiden mit einer Consensus-Sequenz von GTAGATTGACAACGATGCTGTGCCTGTGTGGTCCCGATTATT. Möglicherweise erschwerte das Vorhandensein dieses *Tandem-Repeats* die PCR-Amplifikation. Im Vergleich zum murinen Gen findet sich in Intron 3 des humanen *MLC1* keine VNTR-Region.

3.11 Untersuchung der Promotorregion von *Mlc1*

Als Promotor wird die in 5'-Richtung an ein Gen angrenzende DNA-Sequenz bezeichnet, welche von Proteinen (Transkriptionsfaktoren) erkannt werden kann und die Transkription des zugehörigen Gens reguliert. Er ist durch bestimmte Strukturmerkmale wie die TATA-Box oder CAAT-Boxen, für die eine Consensussequenz besteht, gekennzeichnet. Die Sequenz der Promotorregion des *Mlc1*-Gens wurde mit der Methode des *Primer-walking* ausgehend von der cDNA-Sequenz bestimmt. Als genomische Matrize diente das Cosmid von Klon 5, welches nach den Untersuchungen zur Kartierung der Klone relativ weit in den 5'-Bereich hineinzureichen schien. Die Sequenz der 5'-flankierenden Region des *Mlc1*-Gens ist in **Abbildung 13** wiedergegeben.

Die strukturellen Untersuchungen der 5'-flankierenden Sequenz wurden von Dr. Jobst Meyer durchgeführt. Diese Sequenz wurde mit dem PROSCAN-Programm auf das Vorhandensein von Promotormerkmalen überprüft. Die Analyse sagte keinen Promotor in der 5'-flankierenden Region des *Mlc1*-Gens voraus. Es fanden sich lediglich zwei CAAT-Boxen in diesem Bereich. Die üblicherweise etwa 30 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts gelegene TATA-Box fehlte ganz. Ein für eukaryotische Gene typischer Promotor konnte daher nicht ermittelt werden.

Im Datenbankvergleich fiel zudem eine etwa 140 bp vom Transkriptionsstart entfernt gelegene *Alu*-Sequenz auf, welche dem *Alu-J* Element ähnelte.

Der Sequenzvergleich mit der *NCBI*-Datenbank zeigt außerdem eine hohe Ähnlichkeit des ab etwa 800 bp stromaufwärts gelegenen Sequenzbereichs zu dem murinen Homolog des *HSPC014*-Gens (RIKEN *Mus musculus* cDNA 2510048006; *GenBank Accession No.* NM025624). Da für das im 5'-Bereich von *Mlc1* gelegene Gen keine Promotorregion gefunden werden konnte und das Gen einige Mutationen im Vergleich zur Datenbanksequenz aufweist, handelt sich wahrscheinlich um ein Pseudogen. Darunter versteht man eine Version eines Gens, welches während der Entwicklung im Genom amplifiziert wurde, und in der Folge seine Funktion verloren hat.

5'-regulatorische Region von *Mlc1*

Polyadenylierungssignal des transkribierten Pseudogens *Hspc014*

CTCTAAGGTTACAGCAAAGCCTAAATTCTGAAAATTTGTTTCTTATAAATGTTACAAAAA - 81

TGCAGGAGCCTCCTTGAGAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAAAGAAAAACACAGGAGAATT - 721

CAATCCAGTTGGATCCACTCCCATGATTTTTACTGATCATTTAAGAACTCAGGAAATTTG - 661

GGAGTTTCTCAACACATTTGAAAGAAGTTCTAGATGTCTCAGGGGACAGTTTGGGTGAA - 601

TTGTTTCTTTTTCTAATTTTATTTTTATTTTTGTGTGTATGGGTGCTTTGCCTGTATGCAT - 541

GTGTACCCTGTGTGTACCTTATGTCCACAGAGGCCATAGAAGAGGGTGTTAGATCCCCCTG - 481

GAACTAGAGTTGTAGACAGTTGTGAGCTGCCATGTAGGTGCTGGAATTGTAAGTCACCAT - 421

ATGGACGCTGGGAACTGAACCCAGATGCTGTGGAAGAGCAGGCAGTGCTCTTAACCTCTG - 361

Alu-J-ähnliches Element

AGCCATCTCTCCAGCCCTGGGTGAATTGTTCCGAATCCTTCCTGTTTGGTTGACAAGCTA - 301

AGATAACCAACCATCCCTGATTAGAAACCAGTGGCTGAGCCTAGGCTGCGTGGGGTTCTG - 241

CTGTTCAAAGGAGCTGGGGGGGGGGGGTTGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCCC - 181

AAGTACTCTGGGCTGAGCCTTTTTTGCAATGTGCACAAAGAAATTGTTGCTGTAATTGCC - 121

CAAT-Box **Pit-1** **GR**

AGGGTGCCAATGTCTCCAGGCAAATGAAGCACATTCATGTCCCTTTTCTCTGCCTACTGA - 61

CAAT-Box **CAAT-Box**

GCAGGAATAAAGGCTGCAGTGGGACCATTCCCTGCCAATCCTTGGGGCTGCCATGGGAACC - 1

↪ **Mcl1** **EcoRI**

CATGCTGGAATTCCCAGCAGTTCAAGGGCCAGCTTTGCCAAAATCAAGAACATAAAGGTT 60

TATGCGGCCTGACGAAGGAGATTTTCGTCAAGTAATAATGGGAAACAAAGAATGACGGCT 120

Abb. 13. 5'-regulatorische Region von *Mcl1*. Die Sequenz von *Mcl1* ist fett gedruckt wiedergegeben, der Transkriptionsstart wurde durch einen Pfeil markiert. Ein *Alu*-Element ist durch eine gepunktete Linie angezeigt. Das Polyadenylierungssignal des angrenzenden Pseudogens, Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sowie eine *EcoRI*-Schnittstelle sind unterstrichen.

3.12 Sequenzierung des *MLC1*-Gens bei einem nicht erkrankten Träger der C1121A-Mutation in Exon 11

In einer Familie, in der mehrere Mitglieder an Periodisch Katatoner Schizophrenie erkrankt waren, hatte unsere Forschungsgruppe eine Mutation im Exon 11 von *MLC1* nachweisen können. Alle erkrankten Familienmitglieder sind Träger dieser Mutation. In der Familie gibt es jedoch auch Familienmitglieder, welche zwar die Mutation in ihrem Genom aufweisen, jedoch nicht an Periodischer Katatonie erkrankt sind. Um

auszuschließen, dass bei diesen Personen noch eine weitere Mutation im *MLC1*-Gen vorliegt, welche den Effekt der C1121A-Mutation abschwächt, wurde das *MLC1*-Gen aus dem Genom eines nicht erkrankten Merkmalsträgers sequenziert. Hierzu wurden die einzelnen Exons jeweils mit in den angrenzenden Introns gelegenen Primerpaaren durch PCR amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend sequenziert.

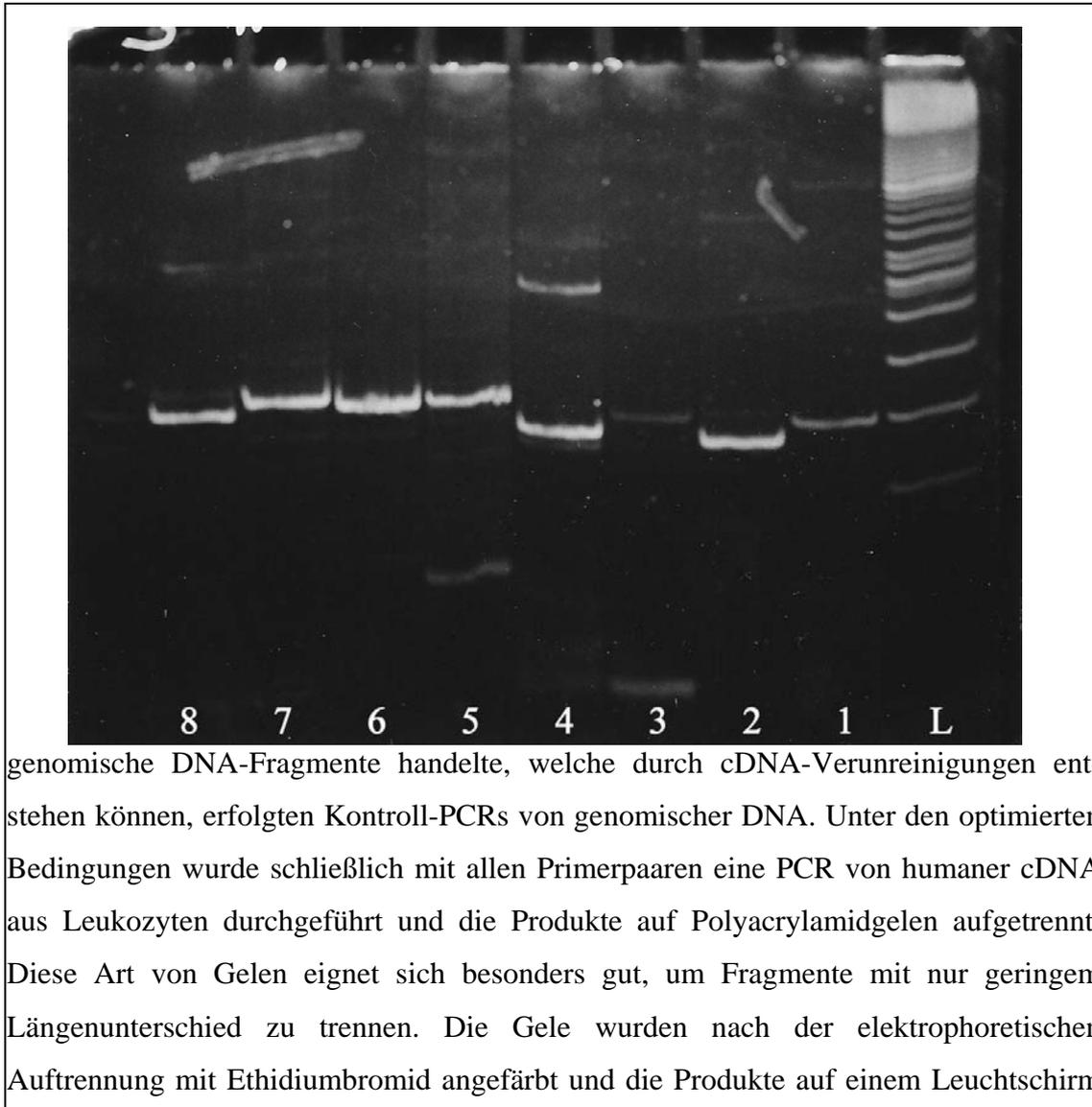
In den Sequenzen konnten neben der bekannten C1121A-Mutation in Exon 11 keine weiteren Veränderungen im *MLC1*-Gen gefunden werden.

3.13 Untersuchung der humanen *MLC1*-cDNA auf alternatives *Splicing*

Als alternatives *Splicing* bezeichnet man den Vorgang, dass aus einer prä-mRNA durch *Splicing* nicht nur eine mRNA sondern verschiedene mRNA-Produkte entstehen können. Hierbei können ganze Exons ausgetauscht oder hinzugefügt werden oder aber ganz wegfallen.

In den Amplifikationen der *MLC1*-cDNA hatten sich bislang jeweils PCR-Produkte einheitlicher Länge ergeben. Zur Untersuchung, ob es verschiedene Formen der *MLC1*-mRNA gibt, die sich nur durch wenige Basenpaare unterscheiden, wurden die folgenden weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Es wurden Primerpaare auf der cDNA-Sequenz so ausgewählt, dass die einzelnen PCR-Produkte 2-3 Exons überspannten und eine ähnliche Größe von etwa 200 bp hatten. Die optimalen PCR-Bedingungen wurden in mehreren PCR-Durchgängen von cDNA ermittelt. Um zu prüfen, dass es sich bei den amplifizierten Produkten nicht um



genomische DNA-Fragmente handelte, welche durch cDNA-Verunreinigungen entstehen können, erfolgten Kontroll-PCRs von genomischer DNA. Unter den optimierten Bedingungen wurde schließlich mit allen Primerpaaren eine PCR von humaner cDNA aus Leukozyten durchgeführt und die Produkte auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Diese Art von Gelen eignet sich besonders gut, um Fragmente mit nur geringem Längenunterschied zu trennen. Die Gele wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Ethidiumbromid angefärbt und die Produkte auf einem Leuchtschirm zur Darstellung gebracht. Die Fotografie des Gels ist in **Abbildung 14** wiedergegeben.

Abb. 14. Produkte der PCR zum Nachweis alternativer *Splice*-Produkte von *MLC1* auf PAA-Gel. Die Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt. Die PCR wurde jeweils mit humaner Gesamt-cDNA aus Leukozyten durchgeführt, die Banden enthalten im Einzelnen die Produkte der folgenden Primerpaare:

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Bande 1: „ex2-ex1 (Ende) F/R“ | Bande 2: „ex2 (Mitte)-ex1 F/R“ |
| Bande 3: „ex3-ex2 (Mitte) F/R“ | Bande 4: „ex4-ex2 F/R“ |
| Bande 5: „ex6-ex3 F/R“ | Bande 6: „ex5-ex3 F/R“ |
| Bande 7: „ex 10-ex7 F/R“ | Bande 8: „ex11-ex9 F/R“ |

Ganz rechts im Bild wurde die *PeqGold 100 bp DNA-Leiter Plus* (Peqlab, Erlangen) als Größenvergleich aufgetragen.

Die Produkte aller Primerpaare zeigten eine deutliche Bande bei etwa 200 bp. Zusätzlich waren zahlreiche sehr schwache Banden sichtbar, die wahrscheinlich unspezifischen Produkten entsprachen. Im den Produkten des Primerpaares, welche den Bereich von Exon 2 bis Exon 4 überspannten, fand sich eine mäßig stark angefärbte Bande bei etwa 500 bp.

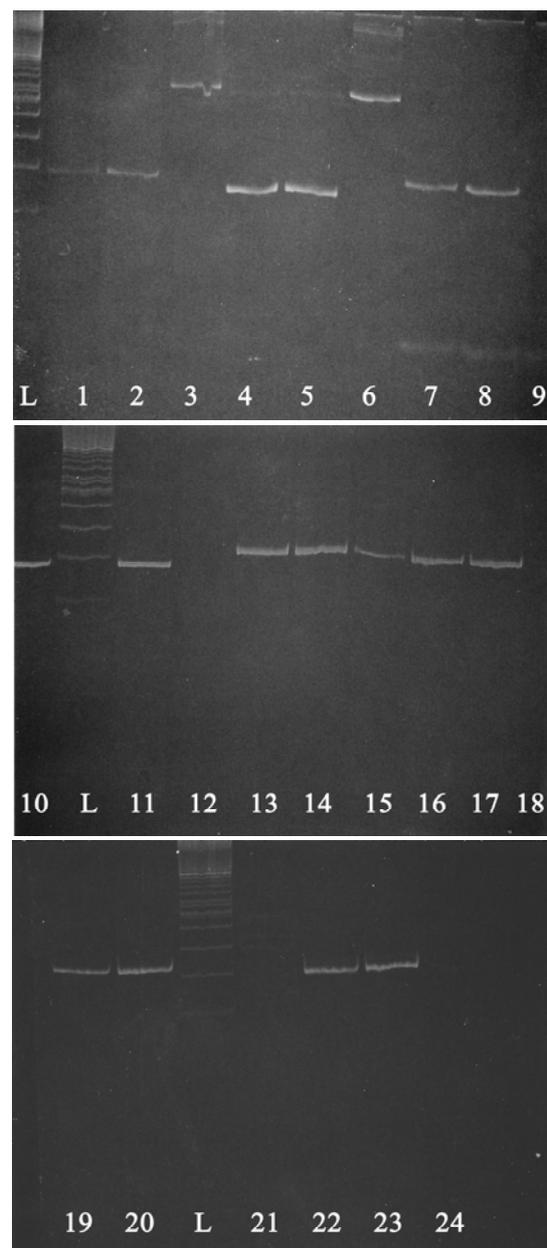


Abb. 15. Produkte der *PCR* zum Nachweis alternativer *Splice*-Produkte von *MLC1* in Hippocampus und Cerebellum. Die *PCR* wurde mit jedem Primerpaar jeweils mit humaner cDNA aus Hippocampuszellen und aus Zellen des Cerebellums sowie zur Kontrolle mit genomischer DNA durchgeführt. Die Banden wurden auf PAA-Gele aufgetragen und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Banden enthalten im Einzelnen die Produkte der folgenden Primerpaare:

| | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Bande 1-3: „ex2-ex1 (Ende) F/R“ | Bande 4-6: „ex2 (Mitte)-ex1 F/R“ |
| Bande 7-9: „ex3-ex2 (Mitte) F/R“ | Bande 10-12: „ex4-ex2 F/R“ |
| Bande 13-15: „ex6-ex3 F/R“ | Bande 16-18: „ex5-ex3 F/R“ |
| Bande 19-21: „ex 10-ex7 F/R“ | Bande 22-24: „ex11-ex9 F/R“ |

In den mit „L“ bezeichneten Bahnen wurde jeweils die *PeqGold 100 bp DNA-Leiter Plus* (Peqlab, Erlangen) als Größenvergleich aufgetragen.

Diese Bande war auch in den Optimierungs-PCRs nachweisbar und wurde mit zunehmender *Annealing*-Temperatur schwächer. Das genomisches DNA-Fragment dieser Region hätte eine Größe von über 2000 bp besitzen müssen. Das Vorliegen einer alternativen Variante der mRNA mit 300 zusätzlichen Basenpaaren hätte bereits in den im Vorfeld durchgeführten Amplifikationen auffallen müssen und wurde daher ausgeschlossen. Wahrscheinlich handelte es sich um unspezifische Produkte.

Im PCR-Produkt des Primerpaares „ex6-3F“ und „ex6-3R“ zeigte sich eine schwache, bei etwa 50 bp laufende Bande. Diese war auch in Kontrollen der PCR mit Auftrennung auf Agarosegelen unverändert nachweisbar. Die Bande wurde daher aus dem Gel ausgeschnitten, die PCR-Produkte gereinigt und weiter untersucht. Die Sequenzierung direkt vom PCR-Produkt erbrachte keine verwertbare Sequenz. Daher wurden die Fragmente in den *pGEM-T-Vektor* (Promega) kloniert und anschließend vom Plasmid sequenziert. Es konnten einzelne kurze Sequenzen gewonnen werden, die jedoch keine Ähnlichkeit mit der *MLC1*-Sequenz aufwiesen. Es handelt sich daher auch hier am ehesten um eine Bande unspezifischer Produkte.

Um zu verifizieren, dass bei *MLC1* keine alternativen *Splice*-Produkte entstehen, wurde mRNA aus humanem Hippocampus-Gewebe und Cerebellum-Gewebe aus der Würzburger Gehirnbank (erstellt von Gsell *et al.*, 1999) gewonnen und daraus unter Verwendung des *SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech) cDNA hergestellt. Mit diesen cDNA-Proben wurde eine erneute PCR mit den oben beschriebenen Primerpaaren durchgeführt. Mit jedem Primerpaar wurden jeweils drei Proben angesetzt, eine mit Hippocampus-cDNA, eine mit Cerebellum-cDNA und eine Kontrolle mit genomischer DNA. Lediglich die Proben des Primerpaares „ex2 (Mitte)-ex1 F/R“ zeigten eine zweite Bande bei etwa 600 bp, die am ehesten auf eine genomische Verunreinigung zurück-zuführen ist, da das entsprechende Produkt von genomischer DNA die gleiche Größe hat. Bei den Produkten des Paares „ex3-ex2 (Mitte) F/R“ waren außerdem Banden bei etwa 20 bp darstellbar, die überschüssige Primer zeigen dürften. Für alle weiteren cDNA-Proben konnte jeweils nur eine Produktbande nachgewiesen werden (vgl. **Abbildung 15**).

Insgesamt konnte das Vorliegen von alternativen *Splicing*-Varianten ähnlicher Größe nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

MLC1 ist ein gehirnspezifisch exprimiertes Gen, über dessen Rolle für die Entwicklung und die Funktion des zentralen Nervensystems noch sehr wenig bekannt ist. Es kodiert für ein Transmembranprotein, welches eine entfernte Ähnlichkeit zu *KCNA1*, einem spannungsabhängigen Kaliumkanal aufweist. Unsere Forschungsgruppe konnte zeigen, dass eine *Missense*-Mutation in *MLC1* mit dem Auftreten der Periodisch Katatonen Schizophrenie in einer großen Familie gekoppelt ist (Meyer *et al.*, 2001). Diese Form der Schizophrenien gehört nach Leonhard zu den unsystematischen Schizophrenien und ist vor allem durch psychomotorische Symptome (Stupor, Rigidität) gekennzeichnet. Einige Mitglieder der untersuchten Familie waren zwar heterozygote Träger der Mutation, zeigten jedoch keine Krankheitssymptome. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *MLC1*-Gen einer dieser Personen beispielhaft für die anderen sequenziert, um auszuschließen, dass eine weitere Mutation in dem gleichen Gen vorliegt, welche den Effekt der ersten Mutation aufhebt. Es konnte bei dieser Person zwar die bekannte Mutation nachgewiesen werden, es fanden sich jedoch keine weiteren Sequenzveränderungen. Eine mögliche Erklärung für das Vorkommen von nicht erkrankten Mutationsträgern ist, dass die betroffenen erst zu einem späteren Zeitpunkt an der Periodischen Katatonie erkranken werden. Auch eine unvollständige Penetranz der Erkrankung, die möglicherweise der Triggerung durch äußere Einflüsse bedarf, scheint denkbar. Vielleicht ist auch nicht die C1121A-Mutation alleine für die Erkrankung verantwortlich, sondern es bedarf eines weiteren Defekts in einem anderen Gen, welches funktionell mit *MLC1* gekoppelt ist, um die Krankheit auszulösen.

Eine indische Forschergruppe fand in einem Kollektiv von Schizophreniekranken und Patienten mit bipolaren Störungen insgesamt 33 *MLC1*-Varianten sowie 3 neue Mutationen (Verma *et al.*, 2005). Einige der häufigen Varianten zeigten in einzelnen Familien Assoziationen zum Auftreten der Erkrankung. Kaganovich und Mitarbeiter fanden bei der Untersuchung von 117 Schizophreniekranken einer israelisch-jüdischen Population keine Assoziation der Erkrankung mit der Leu309Met-Mutation (Kaganovich *et al.*, 2004).

Einige Autoren zweifeln mittlerweile an, ob eine Veränderung in *MLC1* überhaupt eine Rolle bei der Entstehung der Periodischen Katatonie spielt. Devaney und Mitarbeiter

untersuchten das Genom von 43 Schizophreniekranken, darunter 15 Personen mit Periodisch Katatoner Schizophrenie, auf Mutationen im *MLC1*-Gen (Devaney *et al.* 2002). Nur bei einer Kontrollperson aus der bekannten Familie (Meyer *et al.*, 2001) konnte die *Missense*-Mutation Leu309Met nachgewiesen werden. Die anderen Probanden wiesen lediglich verschiedene Polymorphismen auf. McQuillin und Mitarbeiter sequenzierten Exon 11 des *MLC1*-Gens bei 174 britischen Schizophreniepatienten, von denen 22 an Periodisch Katatoner Schizophrenie erkrankt waren (McQuillin *et al.*, 2002). Sie konnten eine Reihe von Polymorphismen identifizieren, die in gleicher Häufigkeit bei den erkrankten Personen und in einer Kontrollgruppe gefunden wurden. Die Leu309Met-Mutation konnte bei keinem Patienten nachgewiesen werden. Die Autoren beider Artikel schlussfolgerten daher, dass Veränderungen in *MLC1* wahrscheinlich keine Rolle bei der Pathogenese der Periodischen Katatonie spielen.

Die Arbeitsgruppe um Rubie und Stöber konnte in einer weiteren Familie mit Periodischer Katatonie die Mutation Leu309Met nachweisen (Rubie *et al.*, 2003). Sie fanden außerdem bei Patienten mit katatoner Schizophrenie und Kontrollprobanden eine Vielzahl von Polymorphismen und Varianten des *MLC1*-Gens sowie einen 33 bp Insertions/Deletions-Polymorphismus in Exon 11, die keine Assoziation zum Auftreten der Erkrankung zeigten. Aufgrund der Tatsache, dass ein erkranktes Familienmitglied die Leu309Met-Mutation von seinem nicht betroffenen Elternteil geerbt hatte, schlossen sie jedoch einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der Mutation und der Erkrankung aus. Sie ließen dabei das in der Psychologie beobachtete Phänomen außer Acht, dass sich Personen mit der gleichen Erkrankung aufgrund ähnlicher Lebensumstände häufig als Paar zusammenfinden (*assortative mating*). Daher sollte der nicht betroffene Elternteil, welcher die Mutation trägt, nochmals auf das Vorliegen von Krankheitssymptomen untersucht werden. Vielleicht liegt bei dieser Person eine schwächere Ausbildung der Symptomatik vor, so dass die Krankheit bislang nur nicht diagnostiziert wurde. Möglicherweise sind mehrere Gendefekte oder auch die Kombination aus verschiedenen Defekten, die einen ähnlichen physiologischen Funktionsdefekt mit Summationseffekt bewirken und zu dem gleichen klinischen Krankheitsbild führen, für die Periodische Katatonie ursächlich. Ob weitere Hinweise

für einen Zusammenhang mit Mutationen im *MLC1*-Gen gefunden werden, bleibt abzuwarten.

Bei einer weiteren neurologischen Erkrankung, der Megalenzephaler Leukoencephalopathie mit subkortikalen Zysten (*MLC*), konnte eine Assoziation mit Veränderungen in *MLC1* zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt und geht mit einer Zystenbildung und spongiformen Veränderung der weißen Substanz einher, wobei vor allem die anterior-temporalen Hemisphärenanteile betroffen sind. Die Forschergruppe aus Leiden um Leegwater und van der Knaap fanden in 13 Familien mit *MLC* insgesamt 12 verschiedene Mutationen des gleichen Gens. Dieses Gen, welches vorher als „*KIAA0027*“ bezeichnet wurde, wurde daraufhin vom HUGO-Nomenklatur-Komitee „*MLC1*“ benannt. Zusätzlich untersuchten Leegwater und Mitarbeiter das Gen auf das Vorliegen von alternativen *Splice*-Formen. Sie konnten keinen Anhalt für ein alternatives *Splicing* von *MLC1* finden. Die Ergebnisse sind damit vereinbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Mittlerweile wurden an die 30 verschiedene Mutationen in *MLC1* bei Patienten mit Megalenzephaler Leukoencephalopathie mit subkortikalen Zysten (*MLC*) durch verschiedene Arbeiten beschrieben (Riel-Romero *et al.*, 2005; Rubie *et al.*, 2003; Tsujino *et al.*, 2003; Leegwater *et al.*, 2001 und 2002). Ben-Zeev und Mitarbeiter beschrieben drei neue Mutationen in *MLC1* bei *MLC*-Kranken unter libyschen Juden. Die häufigste Mutation, p.G59E, wurde mit einer Heterozygotenfrequenz von 1/40 auch in der normalen Population libyscher Juden auf, was auf einen Gründereffekt schließen lässt (Ben-Zeev *et al.*, 2002). Auch Patrono und Mitarbeiter konnten in einem Kollektiv vom *MLC*-Patienten ein breites Spektrum an pathogenen Mutationen im *MLC1*-Gen nachweisen (Patrono *et al.*, 2003). Sie berichteten jedoch auch von 5 Patienten, die in ihrem Genom keine *MLC1*-Mutation aufwiesen. Eine genetische Heterogenität der *MLC*-Erkrankung ist daher anzunehmen.

Sowohl bei Patienten mit *MLC* wie auch bei Schizophreniekranken wurden Veränderungen der weißen Substanz gefunden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass *MLC1* am Aufbau und Stoffwechsel der weißen Substanz, bzw. der Gliazellen maßgeblich beteiligt ist. Die genaue Funktion von *MLC1* und seine biochemischen Eigenschaften sind jedoch noch weitestgehend unklar. Um diese zu entschlüsseln sind weitere Untersuchungen beispielsweise anhand von Mausmodellen erforderlich. Das

Hauptziel dieser Arbeit war es daher, ausgehend von der Sequenz des humanen Gens das murine Homolog zu *MLC1* zu identifizieren, zu charakterisieren und, soweit möglich, zu sequenzieren.

Um ein murines Homolog des *MLC1*-Gens zu finden, wurde zunächst die Sequenz der humanen *MLC1*-cDNA mit Sequenzen der *NCBI mouse EST database* verglichen. Aus den überlappenden EST-Sequenzen, die dieser Vergleich erbrachte, konnte eine putative Sequenz der *Mlc1*-cDNA konstruiert werden. Lediglich im 3'-Bereich blieb eine Lücke zwischen zwei benachbarten ESTs bestehen, für die kein übergreifendes EST gefunden werden konnte. Ausgehend von dieser Sequenz wurden drei Primerpaare ausgewählt, mit welchen die cDNA in drei überlappenden Fragmenten amplifiziert wurde. Für die Sequenzierung des 1,2 kb großen 3'-Bereichs der cDNA wurden zusätzliche Primer hinzugezogen. Durch die Sequenzierung konnte die Richtigkeit der angenommenen Basenfolge von *Mlc1* bestätigt und gleichzeitig wurde die im Konstrukt bestehende Lücke im 3'-Bereich geschlossen werden. Damit war es gelungen, das zum humanen *MLC1* homologe murine Gen zu identifizieren.

Im Vergleich der sequenzierten Basenfolge mit der Sequenz der ESTs, aus denen die putative Sequenz konstruiert worden war, zeigte lediglich an zwei Stellen eine Abweichung, die in einem Austausch eines einzelnen Nukleotids bestand. Hierbei handelt es sich am ehesten um Polymorphismen, die jedoch in der angenommenen Proteinsequenz einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. Die Grenzen zwischen den einzelnen Exons wurden zunächst analog den Grenzen im menschlichen Gen gelegt. Die Lage wurde später durch die Sequenzierung der genomischen DNA bestätigt.

Neben den oben erwähnten cDNA-Sequenzen erbrachte der Vergleich der humanen *MLC1*-Basenfolge mit der *NCBI mouse EST database* zusätzlich eine kurze genomische murine Sequenz (*GenBank Accession No. AZ351634*), welche im Mittelteil eine hohe Homologie zu Exon 10 des humanen Gens zeigte. Unter der Annahme, dass es sich bei dieser Sequenz um den genomischen Bereich um das Exon 10 des entsprechenden Maus-Gens handelt, wurde eine genomische Maus-Cosmid-Bibliothek mit dieser Sequenz als Sonde untersucht. Insgesamt zeigten 12 Klone ein positives Signal auf diese Sonde. Sie wurden für weitere Untersuchungen herangezogen. Zunächst wurde mittels Restriktionsanalysen und Southern-Blot-Hybridisierungen eine Karte erstellt, welche die vermutete Lage der Klon-Inserts zueinander und zu dem *Mlc1*-Gen zeigte.

Zusätzlich wurden in die Karte die Schnittstellen der verwendeten wichtigsten Restriktionsenzyme aufgenommen. Die Kartierung der Cosmid-Klone ließ vermuten, dass das Insert von Klon 6 die gesamte genomische Sequenz des murinen *Mlc1* enthielt. Dieser Klon wurde daher als Matrize für die weitere Aufklärung der genomischen Struktur von *Mlc1* verwendet.

Ein wesentliches Merkmal im Aufbau eukaryotischer Gene ist die Struktur der Exon/Intron-Übergänge. Sie wurde durch Sequenzierung ausgehend von der bekannten Sequenz der Exons in Richtung der vermuteten Introns ermittelt. Auf diese Weise wurde auch der Nachweis geführt, dass die Lage der Grenzen zwischen den einzelnen Exons der im humanen Gen entspricht.

Für die Bestimmung der intronischen Sequenz wurden die kleineren Introns zunächst durch PCR amplifiziert, und anschließend das Produkt sequenziert. Bei größeren Introns wurde direkt vom Cosmid (Klon 6) sequenziert. Die Sequenzierung vom Cosmidvektor gestaltete sich zu Anfang schwierig. Da mit bestimmten Proben von Klon 6 deutlich bessere Ergebnisse erzielt wurden als mit den anderen, lag eine Verunreinigung der Cosmid-DNA durch Proteine nahe. Die Cosmid-DNA wurde daher nach der Aufreinigung entsprechend dem *QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit*-Protokoll (Quiagen, Hilden) einer weiteren Reinigung durch Ethanol-fällung unterzogen. Durch dieses Verfahren konnte die Qualität der Sequenzen deutlich angehoben werden. Eine nochmalige Verbesserung wurde durch die Verwendung des *NucleoBond PC-500*-Reinigungskits (Macerey-Nagel, Düren) erzielt werden.

Ausgehend von den ermittelten Intronsequenzen wurden weitere Primer ausgewählt, von denen aus die Sequenzierung fortgesetzt wurde. Durch diese als *Primer-Walking* bezeichnete Methode wurde die Sequenz der meisten Introns sowie der 5'-flankierenden Region von *Mlc1* ermittelt. Bei den drei größten Introns, Intron 3 (~1,9 kb), Intron 5 (~8,5 kb) und Intron 10 (~5,0 kb), war eine vollständige Sequenzierung zu aufwändig. Diese Introns wurden mit dem *Expand High Fidelity PCR-System* (Roche, Basel, Schweiz) amplifiziert und ihre Größe anhand von Größenstandards auf einem Agarosegel abgeschätzt.

Bei der Sequenzierung fiel im Intron 3 des murinen Gens zusätzlich eine Region mit einer variablen Anzahl von *Tandem-Repeats* (*variable number of tandem repeats*, VNTR) auf, die im menschlichen Gen fehlt. Jede Wiederholungseinheit besteht aus

etwa 42 bp mit der Consensus-Sequenz GTA GAT TGA CAA CGA TGC TGT GCC TGT GTG GTC CCG ATT ATT. Die Länge der VNTR-Region wurde daher anhand der ermittelten Größe des Introns 3 und der flankierenden Regionen ermittelt. Nach der Schätzung liegen etwa 36 Wiederholungen der repetitiven Einheit vor.

Zusammengefasst zeigte die bisherige Analyse der genomischen Sequenz, dass der kodierende Bereich von *Mlc1* wahrscheinlich, wie auch der des humanen *MLC1*, aus 12 Exons besteht, deren Größe zwischen 54 und 1.216 bp liegt. Alle Exon/Intron-Übergänge erfüllen die Consensus-Sequenz für die *Donor* (GT) und die *Acceptor Splice Site* (AG). Unklarheit bestand jedoch weiterhin über den Transkriptionsstartpunkt von *Mlc1*. Eine erneute Datenbanksuche im Verlauf der Arbeit erbrachte eine weitere zu *Mlc1* homologe EST-Sequenz (*GenBank Accession No.* BG297871) einer cDNA, welche im 5'-Bereich um etwa 450 bp über den beim Menschen angenommene Transkriptionsstartpunkt hinausreichte. Dies ließ vermuten, dass das erste Exon bei der Maus deutlich größer ist als beim Menschen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde zunächst eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt, von denen der erste im oberen Bereich des 5'-ESTs („RTex1For“) und der zweite auf Exon 2 („RTex2Rev“) gewählt wurde. Bei der Amplifikation von cDNA zeigte sich ein wie erwartet etwa 500 bp großes Produkt; durch Sequenzierung konnte die EST-Sequenz bestätigt werden. Die Amplifikation von muriner genomischer DNA (Klon 6) mit dem gleichen Primerpaar erbrachte ein etwa 950 bp großes Produkt, welches zusätzlich das 492 bp große Intron 1 enthält. Auch dies konnte durch Sequenzierung bestätigt werden.

Zur endgültigen Klärung des Transkriptionsstartpunktes wurde eine 5'-RACE durchgeführt. Diese erbrachte PCR-Produkte unterschiedlicher Länge mit verschiedenen Transkriptionsstartpunkten, von denen jedoch keiner stromaufwärts der Position 1 des ESTs mit der *GenBank Accession No.* BG297871 lag. Diese wurde daher auch als Position 1 und Transkriptionsstart von *Mlc1* definiert. Aufgrund dieser Untersuchungsbefunde scheint es jedoch eine Unsicherheit bei der Initiation der Transkription von *Mlc1* zu geben, die zu Transkripten unterschiedlicher Länge führt.

Die Transkription eukaryotischer Gene wird durch regulatorische Sequenzen im 5'-flankierenden Bereich des Gens, dem so genannten Promotor, reguliert. Die 5'-flankierende Region des *Mlc1*-Gens wurde mit der Methode des *Primer-walking* sequenziert und mit der *PROSCAN*-Software auf das Vorhandensein von

Promotormerkmalen überprüft. Die Analyse sagte keinen Primer in diesem Bereich voraus. Eine TATA-Box konnte nicht gefunden werden, es zeigten sich lediglich zwei CAAT-Boxen. Außerdem fand sich ein *Alu*-Element, ähnlich dem *Alu-J* Consensus. Ein für eukaryotische Gene typischer Promotor konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise dient diese Region dennoch der Regulation der Transkription des *Mlc1*-Gens. Die Hauptaufgabe der TATA-Box im Promotor besteht darin, die Position des Transkriptionsstarts exakt festzulegen. Sie dient als Positionierungselement des Startkomplexes. Veränderungen der TATA-Box könnten daher zu Unsicherheiten in der Anlagerung des Startkomplexes führen. Die Folge wäre ein Transkriptionsstart bei unterschiedlichen Startpunkten, wie ihn auch die RACE-Analyse hatte vermuten lassen. Theoretisch ist auch die Möglichkeit zu erwägen, dass *Mlc1* ein weiteres Exon in 5'-Richtung besitzt und der Transkriptionsstart damit weit oberhalb des bisher angenommen liegt. Die Ergebnisse der RACE-Analysen und das Vorhandensein des Pseudogens sprechen jedoch dagegen.

In der 5'-flankierenden Region von *Mlc1* fand sich ein *Alu*-Element, ähnlich dem *Alu-J* Consensus. Etwa 800 bp in 5'-Richtung von *Mlc1* entfernt erbrachte die Sequenzanalyse eine hohe Ähnlichkeit der Region zu dem *Mus musculus*-Ortholog des humanen Gens *HSPC014*. Die mRNA-Sequenz des murinen *Hspc014* wurde unter der *GenBank Accession No.* NM025624 veröffentlicht (abgeleitet vom RIKEN *Mus musculus* cDNA-Klon 2510048006). Dem in der Nachbarschaft von *Mlc1* gelegenen Gen fehlt jedoch eine Promotorsequenz, außerdem finden sich einige Unterschiede zu der Sequenz von *Hspc014*. Es ist daher zu vermuten, dass es sich um ein transkribiertes Pseudogen (*Mus musculus* cDNA-Klon 4921504G13, *GenBank Accession No.* AV253704) handelt, welches durch reverse Transkription von mRNA und anschließendem Einbau in das Genom entstanden ist.

Das *HSPC014*-Gen des Menschen liegt nicht in der Nachbarschaft von *MLC1*, sondern wurde auf Chromosom 13 lokalisiert. Interessanterweise kodiert es nach bisherigen Erkenntnissen für die β -Untereinheit eines spannungsabhängigen Kaliumkanals (Desir und Tian, 2000, nicht publiziert). Möglicherweise bilden die Proteine *Mlc1* und *Hspc014* eine funktionelle Einheit. Eine gemeinsame Regulation der Transkription von *Mlc1* und des *Hspc014*-Pseudogens durch einen noch nicht identifizierten Promotor wäre in diesem Zusammenhang vorstellbar.

Insgesamt zeigten die bisherigen Ergebnisse, dass die Struktur des murinen und des humanen *MLC1*-Gens sich in weiten Bereichen sehr ähnlich sind. Durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, welche von Herrn Prof. Horst Hameister in Ulm durchgeführt wurde, konnte das Gen bei der Maus auf Chromosom 15 E-F lokalisiert werden. Diese Region entspricht strukturell dem Chromosom 22q13-Bereich des Menschen, in welchem *MLC1* liegt. Beide Gene enthalten 12 Exons, wobei die Größe der einzelnen Exons weit gehend identisch ist. Lediglich das erste Exon des murinen Gens ist, wie bereits oben beschrieben, um etwa 450 bp größer, als das humane, wohingegen das humane Exon 12 um etwa 1 kb größer ist, als das der Maus. Die Größe der Introns variiert jedoch stark zwischen den beiden Spezies. Insgesamt sind die Introns des murinen Gens deutlich größer, als beim Menschen. Zusätzlich ist in Intron 3 des murinen Gens die oben beschriebene *VNTR*-Region enthalten, die beim Menschen fehlt. Anders als im humanen Gen gibt es im murinen Gen zwei mögliche Startkodons für den Beginn der Transkription, die 72 bp auseinander liegen. Beide liegen im gleichen Leseraster, die kodierten Proteine unterscheiden sich lediglich durch das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein der ersten 24 Aminosäuren. Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen humanem und murinem Gen wurde der Transkriptionsstartpunkt bei dem weiter innerhalb des 1. Exons gelegenen ATG-Triplett gewählt, das analog zum Startkodon von *MLC1* liegt.

Der Vergleich der aus der humanen und der murinen cDNA abgeleiteten Proteine zeigte, dass auch die Aminosäuresequenz des Mlc1-Proteins zwischen Mensch und Maus stark konserviert ist. Beide Proteine weisen an 337 Positionen die gleiche Aminosäure auf, was einer Ähnlichkeit von 88,2 % entspricht. Betrachtet man hingegen nur die putativen Transmembrandomänen, so liegt der Grad an Homologie sogar bei 96,7 %.

Wie bereits anfangs erwähnt weist *MLC1* eine entfernte Ähnlichkeit zu *KCNA1*, einem spannungsabhängigen Kaliumkanal, auf (Meyer *et al.*, 2001; Leegwater *et al.*, 2001). Browne und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Mutationen in *KCNA1* ursächlich für episodische Ataxie und Myokymie sind (Browne, 1995; Browne *et al.*, 1996). Veränderungen von Kaliumkanalproteinen wurden auch im Zusammenhang mit anderen neurologischen Erkrankungen nachgewiesen. So fanden Bowen und Mitarbeiter bei einem Schizophreniepatienten eine Mutation in dem für den Kaliumkanal *KCNN3*

kodierenden Gen (Bowen *et al.*, 2001). Die Forschergruppe um Singh konnte nachweisen, dass Mutationen in den spannungsabhängigen Kaliumkanälen KCNQ2 und KCNQ3 ursächlich für die Entstehung der benignen familiären neonatalen Konvulsionen (BFNC), einer autosomal dominanten Form der generalisierten Epilepsien sind (Singh *et al.*, 1998 und 2003). In einer weiteren Studie führten Mutationen in dem Kaliumkanal Kcnj10, welcher in Oligodendrozyten vorkommt, zu motorische Störungen in *Kcnj10-knockout*-Mäusen (Neusch *et al.*, 2001). Als Korrelat auf zellulärer Ebene fanden sich eine Hypomyelinisierung mit schwerer spongiformer Vakuolisierung sowie eine Schwellung und Degeneration der Axone. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass *Kcnj10* eine entscheidende Rolle bei der Myelinisierung spielt.

In diesem Zusammenhang ist es gut denkbar, dass es sich bei MLC1 ebenfalls um einen gehirnspezifisch exprimierten Kaliumkanal handelt, dessen Mutation durch eine Störung der Myelinisierung zu neurologischen Erkrankungen führt. Bei der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten wurden wie bereits beschrieben deutliche Veränderungen der weißen Substanz gefunden. Dazu passen auch die Ergebnisse der *Diffusion tensor imaging*-Studie von Agartz und Mitarbeitern (Agartz *et al.*, 2001), die Veränderungen der weißen Hirnsubstanz bei Schizophreniepatienten nachweisen konnten. Hakak und Mitarbeiter konnten außerdem in Microarrays zeigen, dass bei Schizophreniepatienten das Expressionsmuster vom einigen an der Myelinisierung beteiligten Genen verändert ist (Hakak *et al.*, 2001).

Dass auch *Mlc1* in Gliazellen exprimiert wird, zeigten die jüngsten Ergebnisse unserer Forschungsgruppe (Schmitt *et al.*, 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Sequenz von *Mlc1* wurde für die Untersuchungen verwendet. Durch *in-situ*-Hybridisierung konnte die *Mlc1* mRNA ausschließlich in Gliazellen des adulten Gehirns von Mäusen, insbesondere in Astrozyten, Bergmann-Glia und Ependymzellen, lokalisiert werden. Weitere Untersuchungen wie die Northern-Blot-Analyse und die *Real-time-PCR* wiesen eine über das gesamte Gehirn verteilte Expression von *Mlc1* auf, wobei im Cerebellum und im Bulbus olfactorius die höchsten Konzentrationen der mRNA gefunden wurden. Das Expressionsmuster änderte sich während der Gehirnentwicklung. Die Ergebnisse von Teijido und Mitarbeitern bestätigen, dass es sich bei *Mlc1* um ein Membranprotein handelt, welches im Gehirn adulter Mäuse

exprimiert wird (Teijido *et al.* 2004). Durch *in-situ*-Hybridisierung und immunhistochemische Untersuchungen konnten sie MLC1 im axonalen Anteil von Neuronen, sowie in Gliazellen, insbesondere der Bergmann-Glia, Ependymzellen, der *Pia mater* und in Astrozyten nachweisen. Auffälligerweise wurde das Protein zumeist an Grenzbereichen zwischen verschiedenen Zellen oder Geweben lokalisiert. Die Wissenschaftler zeigten weiterhin, dass Mutationen in *MLC1* zu einer Störung der Tertiärstruktur des Proteins führten. Dieser Effekt wurde *in vitro* durch Zugabe von Curcumin, einem Inhibitor der Ca²⁺-ATPase, aufgehoben. Diese Ergebnisse könnten einen ersten Therapieansatz bieten für Patienten, die an MLC erkrankt sind. Auch die Daten von Boor und Mitarbeitern (Boor *et al.*, 2005) stützen die Annahme, dass *MLC1* im Wesentlichen in Gliazellen an Grenzregionen von verschiedenen Geweben exprimiert wird. Sie vermuteten eine Beteiligung von MLC1 an Transportvorgängen durch die Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke.

Möglicherweise spielt *MLC1* auch bei der Entstehung maligner Erkrankungen außerhalb des ZNS eine Rolle. In einer neuen Arbeit konnte eine vermehrte Expression von *MLC1* in Leberkarzinomzellen nachgewiesen werden (Dong-Dong, 2005). *In vitro* bewirkte eine Überexpression von *MLC1* hier auch ein verbessertes Zellwachstum. Es bleibt abzuwarten, ob die kommenden Arbeiten diese Ergebnisse bestätigen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche die Struktur und die Sequenz des murinen Homologs von *MLC1* aufzeigen, ermöglichen nun die Durchführung weiterführende Untersuchungen. Das langfristige Ziel wird die Erzeugung einer *Knockout*-Maus sein. Von diesem Modell erhofft man sich weitere Aufschlüsse über die Funktion von MLC1 und auch die Pathogenese der assoziierten Erkrankungen. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Entstehung der neurologischen Krankheiten zu verstehen und vielleicht sogar weitere Therapieansätze zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Das humane *MLC1*-Gen, ebenfalls als *KIAA0027* oder *WKL1* bezeichnet, kodiert für ein gehirnspezifisch exprimiertes Transmembranprotein, welches Ähnlichkeit zu dem Kaliumkanal *KCNA1* aufweist. Es konnte vor allem in Astrozytenfortsätzen der Myelinscheiden nachgewiesen werden. Die Funktion von *MLC1* ist jedoch noch unklar. Veränderungen in *MLC1* wurden bei Patienten gefunden, die an Megalenzephaler Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten erkrankt sind. Außerdem gibt es Hinweise, dass eine *Missense*-Mutation in *MLC1* ursächlich ist für das Auftreten der Periodisch Katatonen Schizophrenie in einer großen Familie. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun das zum humanen *MLC1*-Gen homologe murine Gen kloniert und charakterisiert werden. Das murine Gen besteht wie das humane aus 12 Exons, alle Exon-Intron-Übergänge erfüllen den GT/AG Consensus und liegen ortholog zu den Exongrenzen im humanen Gen. Das prozessierte Transkript hat eine Länge von etwa 2,8 kb und enthält neben den Exons die 496 bp große 5'-untranslatierte Region und die 1141 bp große 3'-untranslatierte Region. Exon 1 und die 5'-untranslatierte Region sind somit deutlich größer als beim humanen Gen. *Mlc1* kodiert für ein 382 Aminosäuren großes Protein. Die Aminosäuresequenz ist zwischen dem murinen und dem humanen Protein hoch konserviert, insbesondere im Bereich der angenommenen Transmembrandomänen. Die genomische Sequenz von *Mlc1* umfasst etwa 20 kb. Die Größe der Introns ist zwischen Mensch und Maus sehr verschieden, in Intron 3 des murinen Gens ist zudem ein *Tandem-Repeat* enthalten, der im menschlichen Gen fehlt. Die Untersuchung der 5'-flankierenden Region von *Mlc1* zeigte einige Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, insbesondere CAAT-Boxen, ein eindeutiger Promotor konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Charakterisierung des murinen Gens wird über die Herstellung transgenetischer Mausmodelle weitere Untersuchungen der Funktion und der biochemischen Eigenschaften von *MLC1* ermöglichen. Auf diese Weise wird es möglich sein, weitere Einsicht in die Pathogenese der hirnorganischen Erkrankungen, insbesondere der MLC, zu gewinnen und vielleicht sogar Therapieansätze für betroffene Patienten zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- Agartz I, Andersson JL, Skare S: Abnormal brain white matter in schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Neuroreport*. 2001; 12: 2251-2254.
- Ben-Zeev B, Levy-Nissenbaum E, Lahat H, Anikster Y, Shinar Y, Brand N, Gross-Tzur V, MacGregor D, Sidi R, Kleta R, Frydman M, Pras E: Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; a founder effect in Israeli patients and a higher than expected carrier rate among Libyan Jews. *Hum Genet*. 2002; 111(2): 214-218.
- Boor PK, de Groot K, Waisfisz Q, Kamphorst W, Oudejans CB, Powers JM, Pronk JC, Scheper GC, van der Knaap MS: MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005; 64(5): 412-419.
- Bowen T, Williams N, Norton N, Spurlock G, Wittekindt OH, Morris-Rosendahl DJ, Williams H, Brzustowicz L, Hoogendoorn B, Zammit S, Jones G, Sanders RD, Jones LA, McCarthy G, Jones S, Bassett A, Cardno AG, Owen MJ, O'Donovan MC: Mutation screening of the KCNN3 gene reveals a rare frameshift mutation. *Mol Psychiatry*. 2001; 6: 259-260.
- Birnboim H, Doly J: A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res*. 1979; 7: 1523-1522.
- Boor PK, de Groot K, Waisfisz Q, Kamphorst W, Oudejans CB, Powers JM, Pronk JC, Scheper GC, van der Knaap MS: MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005; 64(5): 412-419.
- Browne DL: Identification of two new KCNA1 mutations in episodic ataxia/myokymia families. *Hum Mol Genet*. 1995; 4: 1671-1672.
- Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, Litt M: Episodic ataxia/myokymia is associated with point mutations in the human potassium gene KCNA1. *Nat Genet*. 1994; 8: 136-140.
- Chenchik A, Diachenko L, Moqadam F, Tarabykin V, Lukanov S, Siebert PD: Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques*. 1995; 21: 526-34.

- Devaney JM, Donarum EA, Brown KM, Meyer J, Stober G, Lesch KP, Nestadt G, Stephan DA, Pulver AE: No missense mutation of WKL1 in a subgroup of probands with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2002; 7(4): 419-423.
- Dong-Dong L: Up-regulation expression of MLC1 in human liver cancer tissue and enhanced SMMC7721 cell tumorigenesis in vivo and vitro. *Hepatogastroenterology*. 2005; 52(64): 1186-1190.
- Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1983 Jul 1;132(1):6-13.
- Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, Haroutunian V, Fienberg AA: Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 4746-4751.
- Ilja Boor PK, de Groot K, Mejaski-Bosnjak V, Brenner C, van der Knaap MS, Scheper GC, Pronk JC: Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum Mutat*. 2006; 27(6):05-512.
- International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing of the human genome. *Nature*. 2001; 409: 860-921.
- Kaganovich M, Peretz A, Ritsner M, Bening Abu-Shach U, Attali B, Navon R: Is the WKL1 gene associated with schizophrenia? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004; 125(1): 31-37.
- Krawetz S, Misener S (eds): *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totawa, NJ. 2000; 365-386.
- Leegwater PA, Yuan BQ, van der Stehen J, Mulders J, Konst AA, Boor PK, Mejaskin-Bosnjak V, van der Maarel SM, Frants RR, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, van der Knaap MS: Mutations of MLC1 (KIAA0027) encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: 831-838.
- Leegwater PA, Boor PK, Yuan BQ, van der Stehen J, Visser A, Konst AA, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, van der Knaap MS: Identification of novel

- mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Genet.* 2002; 110(3): 279-83.
- Lennon GG, Auffray C, Polymeropoulos M, Soares MB: An Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression. *Genomics.* 1996; 33: 151-152.
- Leonhard K: Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart, 7. Auflage. 1995.
- McQuillin A, Kalsi G, Moorey H, Lamb G, Mayet S, Qusted D, Baker P, Curtis D, Gurling HM: A novel polymorphism in exon 11 of the WKL1 gene shows no association with schizophrenia. *Europ J Hum Genet.* 2002; 10: 491-494.
- Meyer J, Huberth A, Ortega G, Syagailo YV, Jatzke S, Mössner R, Strom TM, Ulzheimer-Teuber I, Stöber G, Schmitt A, Lesch KP: A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol Psychiatry.* 2001; 6: 302-306.
- Montagna G, Teijido O, Eymard-Pierre E, Muraki K, Cohen B, Loizzo A, Grosso P, Tedeschi G, Palacin M, Boespflug-Tanguy O, Bertini E, Santorelli FM, Estevez R: Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum Mutat.* 2006; 27(3): 292.
- Mullis KB, Faloona, FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155: 335-350.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P: Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *Neurosci.* 2001; 21: 5429-5438.
- Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tabata S: Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The Coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res.* 1994; 1: 27-35.
- Patrono C, Di Giacinto G, Eymard-Pierre E, Santorelli FM, Rodriguez D, De Stefano N, Federico, A, Gatti R, Benigno V, Megarbane A, Tabarki B, Boespflug-Tanguy O, Bertini E: Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology.* 2003; 61(4): 534-537.

- Riel-Romero RM, Smith CD, Pettigrew AL: Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two siblings owing to two novel mutations: case reports and review of the literature. *J Child Neurol.* 2005; 20(3): 230-234.
- Riley BP, McGuffin P: Linkage and Associated Studies of Schizophrenia. *Am J Med Genet.* 2000; 97: 23-44.
- Rozen S, Skaletzsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000; 132:365-86.
- Rubie C, Lichtner P, Gärtner J, Siekiera M, Uziel G, Kohlmann B, Kohlschütter A, Meitinger T, Stöber G, Bettecken T: Sequence diversity of KIAA0027/MLC1: are megalencephalic leukoencephalopathy and schizophrenia allelic disorders? *Hum Mutat.* 2003; 21(1): 45-52.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487-491.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230: 1350-1354.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1977; 74: 5463-5467.
- Schmidt-Kastner R, van Os J, W M Steinbusch H, Schmitz C: Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophr Res.* 2006; 84(2-3): 253-271.
- Schmitt A, Gofferje V, Weber M, Meyer J, Mössner R, Lesch KP: The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia.* 2003; 44(3): 283-95.
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA: An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 1087-1088.
- Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A,

- Anderson VE, Leppert M: A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nature Genetics*. 1999; 18(1): 25-29.
- Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson VE, Sanguinetti MC, Leppert MF, BFNC Physician Consortium: *KCNQ2* and *KCNQ3* potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain*. 2003; 126(12): 2762-2737.
- Stöber G, Franzek E, Lesch KP, Beckmann H: Periodic catatonia: A schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation. *Eur Arch Psychiat Clin Neurosci*. 1995; 98: 153-157.
- Stöber G, Saar K, Rüschemdorf F, Meyer J, Nürnberg G, Jatzke S, Franzek E, Reis A, Lesch KP, Wienker TF, Beckmann H: Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15q15. *Am J Hum Genet*. 2000; 67: 1201-1207.
- Tejjido O, Martinez A, Pusch M, Zorzano A, Soriano E, Antonio des Rio J, Palacin M, Estevez R: Localization and functional analyses of the *MLC1* protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Mol Genetics*. 2004; 13: 2581-2594.
- Tsujino S, Kanazawa N, Yoneyama H, Shimono M, Kawakami A, Hatanaka Y, Shimizu T, Oba H: A common mutation and a novel mutation in Japanese Patients with van der Knaap disease. *J Hum Genet*. 2003; 48: 605-608.
- Van der Knaap MS, Barth PG, Stroink H, van Nieuwenhuizen O, Arts WFM, Hoogenraad F, Valk J: Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann Neurol*. 1995; 37: 324-334.
- Van der Knaap MS, Barth PG, Vrensen GF, Valk J: Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropath*. 1996; 92: 206-212.
- Verma R, Mukerji M, Grover D, B-Rao C, Das SK, Kubendran S, Jain S, Brahmachari SK: *MLC1* gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. *Biol Psychiatry*. 2005; 58(1): 16-22.

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|--|---|
| μF | Mikrofarad |
| μl | Mikroliter |
| $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ | ^{32}P -markiertes Desoxycytosintriphosphat |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius |
| μl | Mikroliter |
| ^{32}P | Phosphor-Isotop 32 |
| A | Adenosin |
| Abb. | Abbildung |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>Bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin) |
| C | Cytosin |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA) |
| CTP | Cytosin-5'-triphosphat |
| ddNTP | Didesoxynucleosid-5'-triphosphat |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure) |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | 2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EST | <i>expressed sequence tag</i> |
| <i>et. al.</i> | <i>et alteri</i> |
| G | Guanosin |
| g | Gramm / Erdbeschleunigung |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HPLC | <i>high performance liquid chromatography</i> |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| kb | Kilobasenpaare (1000 bp) |
| l | Liter |
| LB-Medium | Luria-Bertoni-Nährmedium |
| M | molar (mol/l) |
| mA | Milliamper |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| MMLV | Moloney Murine Leukemia Virus |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| N | normal |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|----------------|---|
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| OD260 | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm |
| OD590 | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 590 nm |
| Oligo (dT) | Desoxythymidil-Oligonukleotid |
| PAA | Polyacrylamid |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline-Lösung |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| pmol | Picomol |
| RACE | <i>rapid amplification of cDNA ends</i> |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| RZPD | Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH |
| SDS | <i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| sec. | Sekunden |
| T | Thymidin |
| T _a | Annealing-Temperatur |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| T _m | Schmelztemperatur der Primer |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan |
| TTP | Thymidin-5'-triphosphat |
| U | <i>unit</i> |
| UTR | untranslatierte Region |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| VNTR | <i>variable number of tandem repeats</i> |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

8 Anhang

Genomische Sequenz von *Mlc1*

In der Folge ist die gesamte im Rahmen dieser Arbeit ermittelte genomische Sequenz von *Mlc1* und der 5'-flankierenden Region wiedergegeben. Die Introns wurden in Kleinbuchstaben wiedergegeben, die *Mlc1*-Exons und das Pseudogen im 5'-Bereich in Großbuchstaben und Fett gedruckt. Die nicht sequenzierten Wiederholungen des *Tandem-Repeats* in Intron 3 wurden durch eine Reihe von R ersetzt, die nicht ermittelte Sequenz in Intron 5 und Intron 10 wurde durch eine Reihe von N markiert. Die *Splice-Sites* sowie das Start- und Stoppkodon sind unterstrichen.

```

GTCTGTTTTGCTCCCCTGAAGCTACAGATGGAGCTTCTCCTGTTTTCTCCCGAGCTCAAACC Hspc014
TCTCACTGGATATTTTTGAGGGGCGAGCGATGAGACCATTGGTTTTGAGGATATTC'TTAATG Pseudogen
ATCCATCACAAAGTGAAC'TAATGGGCGAGCCCTACTTGGATGGTGGAAACATAAGCTGGGCT
TGCTGTAATACAGGGACCCGACACAAGAAGGAACAACGGTTGTGCTCTGTATAGTTGCC'TG
CTATAGTCTGATGTTTATGGCATTAAAGTACTGAGAGGATTGCTGGGCCATGTGGAAGTG
TTTTGGGCTTGGTTTTGGGTTGTGAGTCAGTTGAGAGCCTAGAGGTGGTTTTCTAAGCTCT
AAGGTTACAGCAAAGCCTAAATTTCTGAAAATTTGTTTTCTTATAAATGTTACAAAAATGCA
GGAGCCTCCTTGagaaaaaaaaaaaaaagaaagaaagaaagaaaaacacaggagaattcaat
ccagttggatccactcccattgatTTTTactgatcatttaagaactcaggaaatttgggag
tttctcaacacatttgaaagaagtctagatgtctcaggggacagtttgggtgaattgt
ttcttttctaattttatTTTTtattttgtgtatgggtgctttgcctgtatgcatgtgt
accctgtgtgaccttatgtccacagaggccatagaagagggtgtagatcccctggaac
tagagttgtagacagttgtgagctgccatgtaggtgctggaattgtaagtaccatattgg
acgctgggaactgaaccagatgctgtggaagagcaggcagtgctctaacctctgagcc
atctctccagccctgggtgaattgttccgaatccttctgtttggttgacaagctaagat
aaccacactccctgattagaaccagtggtgagcctaggctgctggtgggttctgctgt
tcaaaggagctgggggggggggggttggTTTTgttttgttttgttttgtttcccaagt
actctgggctgagcctTTTTtgcaatgtgcacaaagaaattgttgcctgtaattgccaggg
tgccaatgtctccaggcaaatgaagcacattcatgtcccttttctctgcctactgagcag
gaataaaggctgcagtgaggaccattcctgccaatccttggggctgccatgggaaccCATG Mlc1
CTGGAATTCCCAGCAGTTCAAGGGCCAGCTTTGCCAAAATCAAGAACATAAAGGTTTTATG Exon 1
CGGCCTGACGAAGGAGATTTTCGTCAAGTAATAATGGGAAACAAAGAATGACGGCTTAA
AAGATGACACTTTGAGTAGTTTTCTGTTCCGGGGCCCAATACTGGTCAGGATCCAAATC
CAGCGTGGACTTCTTATCCTTAGTAATACTTCTCTTTCCAAGACATCCACCTGGCTAG
TGAGCAGTGAGGGGGACCAAGGGCTCTTCCCTTCCCTATTGGGAAAGCTCCAAGCCACTGG
TTATGCAATCAAGGAGAGCACTTCTAGGATCCACTCCCTTAATCTCCTCATTAAAATTCA
GGAAAGCTGTGTGCTGCCCTGGCTGAAGTGCAGTTTGGCTGAGAGCTTTTGTCCACTT
ATGAATACTTCTTGCTGGAAGTCCATCACCCAGAGGCCAGCTTTCCCAACCGCCGGACGA
CAGCAGAGgtaagcattaagacattaaactgcaaagttaggggctcttttgtaatctcat
gttcccattttgtgttgaataggagaagctcacctctgtttgggactcatagagttgctg
gtggaagctgaaatgtactatatctaagagctcagatgaaggctgagtgctgctgaatcta
gatgagtttgggtggctttatTTatgttgagagttaggggttgttccctctttaagttca
cagccctagagtatgagtatattcctctaagacagtgtttgcttaagccagacatgatag
tgtttaccaggtagacgtttaagccagcctgggcccacacagtgatactttgtctcaaga
aaaaattttccgaagcatttcatgataaccacttactacaattagagggttttcagttg
tcaaagtcctgatgatttcaactgcataggagggaaatgggtggtctgagctctgttcacaag
gctcagctttgggtgtgtgctcactctcagtagcatgctgtttccagCGCCATGACACGGG Exon 2
AGGGGCAGTTCAGGGAGGAACTGGGCTATGACCGGATGCCACACTGGAGAGGGGTCCGC
AGGATGCAGGACGGCAGGACCCAGGCAGCTACACCCCTGACTCAAAGCCCAAGGACCTGC
AGCTGTGCAAGAGGTTGCCCCCGTGTCTCAGCTACAAGACATGGGTGTTCTCTGTGTTAA
TGGGGgtgagttaactcaatactggctcaggggacagtgctggtccagtgctcccttcagtg
ctggtcatgccctgtagagcacaagcccgatagactgggaatcactccgtccctttcctt
ttttctctttctctctttctttttttttttttttttccagtttttggagacagtttct
ctgtgtagccctggctgtcctagaacttgctctgtagaccaggctggtctcagactcaga
gaccacactgcctctgcctcccaagtgtctgggattaaggcgtgagccaccactgccacc

```

gatggcatttcttttgtttgtgcctatcagttacttttctcagtatctgccacgggagc
ctatgcccctaaattgtacttctcctgaggccacaggttacctgtgaccacatgccagca
taccctgcacatgctgatctgtgaaggctggaggccaacctcatgcttcagggtagct
ctatggagtgactaacaagagttctggccacagctgggggtcaagacctggattgggaaa
gactacagaagccatgggactatgggactatggggaccacgggaaggataagttggg
tgtagctacagagcggagccacgcaagccagggtgaagcagtgccatgtgggggtgccag
gacactgtacacagctcttgcggatagataagcaattgggatgcttaaagcatcactggg
ccctgagtgccacacagctacttgaggaccagatgttgcaggggttttctatggaaggag
ctgggttttgtgcggctcctagtctgagaatgttcagacagggacctctccctttccagat
tctattttggatcagtttctgcagaggcaataggtcagccactgtttcataggctctga
ccccagacctgggactcttgaatcccctggtaaaacttccctctccccaccggacaagtt
tggtagcttctactctggcagcagaggtgggaaagggtcggttccctgggttgtgc
tgttctacaaaaggacctgcagtcacacaggaccagccataggcagataaataactg
ggagacttgggttaatatgggaaacaatgagcttgcagtcacagggtgggtgttgcctcc
accctccctgcaagtgcttaccatcagacagagccgttataacctgagctatgttg
ctcttttgcagAGCTGCCTTCTTGTGACCTCTGGGTTTTTCGCTCTACTTGGGGAACGTGT
Exon 3
TCCCCTCCGAGATGATTATTTGCGCTGTGCAGCAGGCTCTgtaagcagcatcctcagcc
acaccagcaccctgactctccatgtgggtccgaggctctgtgatctggggtcatagg
tttccgttgactactctcgtgacttagcaggtctgactcctgggtgagaaacagcacttt
gttccctggcatgttgtgggtcctgtggtccttggatgccatcaagggtctctagggt
aggggagctccttgtatccggtagattgacaatgacgctgtgcctgtgtggttccgatta
ttgtagattgacaacgatgatgtgcctgtgtggttccgattattgtagattgacaacgat
gctgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgatgtgcctgtgtggtcc
cgattattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggttccgattattgttagattgac
aacgatgctgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtg
tggttccgattattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtNccgattattgtag
attgacaacgatgNtgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgctgtg
cctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgNtgtgcctgtgtggtNccgatta
ttgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtNccgattattgttagattgacaacgat
gctgtgcctgtgtggtcccgatattRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
RRRRRRRRRgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgac
aacgatgctgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtg
tggttcccgatattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgatattgttag
attgacaacgatgNtgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgctgtg
cctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtNccgatta
ttgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgat
gNtgtgcctgtgtggtcccgatattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcc
cgattattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtNccgattattgttagattgac
aacgatgctgtgcctgtgtggttccgatattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtg
tggttccgattattgttagattgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcccgatattgttag
attgacaacgatgctgtgcctgtgtggtcagattattgtagaagcttgaacattgcaac
acatgattgtcttagttttatgctgagctgagttaaaactcaaagctcttcagcttggta
ggcaaaagctcaaccctgagctgcacctggcccgaatgcatggtttcagggttagcat
catgtccaggacacaagactcaggtgaactcttggctcacttgggttctgggtctctttac
agTGCATCCCCTCAGCAATTGTGAGCTTCGCTGTAGGGAGGAGAAATGTCAGTGCGgttaa
gtgaagccttccggagcagcctttgcagccttggacccctcccctcccaggactgaagtg
tggaaagcagatgttgtctttatcttttaggttttttaagaaggaaatgcctcctgc
tttgtttttccagATTCCCAACTTTCAGATATTGTTTTGTTTTCCACGTTTCGCTGTGACTAC
Exon 5
TACGTGTTTTGATCTGGTTTGGGTGTAAACTGATCCTGAATCCTTCAGCCATAAACgtgag
tcgctggaaggggatgtgggtcacagagggtttccctgttttcatctgagctcttgtcttt
gctctgctatcaaatgctgctctcaccgagcaggggtgaagccttgggtttcctgtgcttc
tgaaggaatcgtcttttctgaattttgagctattccattggacaaatctattgatcgat
gacatttttagtgtttatctccaacagagataggcctgggggtgcagctccatgttaaaat
acacacaggccacacacacacaccacaacacaatagcaatatactactgtatttcatcaaa
tctgtgataactgttgggtgtaaggcacacacacaccacaaaataacaacatactattgta
ttcatcaaatcgatgatgctattgatttttaagaaattctgtcatcttatgtgctactgag
aaaagtgagaaaaatttactcaaatgtgtagctcaatgaaaagaaatggcccaggaata
aagatgtcctNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNcccaaaccntccacNccactNccctacct
aNccactcccactttttggcccaggcttcccctggactggggcatataaagtttgcaaaa
ccaatgggctcctcttccactgatggcgactaggccaccttctgatacatatgtagcta
gagacacgagctctgggggtactagttagttcatattgttgttccacctatagggttgca
gatccctttagctccttgggtactttctctagctcctccactgggggacctgtgatcgtg
atggcatgatttattcaggcctgtgacaaggagagcagagctggactagccagctggag
aagatgaccactttctggaggaaggactagcttggctgaggtatgtgttcttcttgcagA
TTAATTTCAACCTCATCTGCTCTGCTGTTGGAGCTCCTCATGGCAGCCACGGTGATCA
TTTCGGCCCGGTCCAGTGAGGAGCCCTGCAAGAAGAAGgtgggtctcccacagctac
Exon 6

42 bp
Tandem-
Repeat

Exon 4

Exon 5

Exon 6

cccctcatgccctgagctgggctcgatgccggaggccacgggtgggaggggggctggc
 agggctgagggactgttagtcaagcctagggaggcaatggcagctacacagcctccag
 tgccttcccacactgctgctgctttaggagtgctactggaacacgggttctacaaaac
 tgttggaagctcagttgcaatgactgggcacatccactcacaggggaaatgtctgcctt
 tgagtgttccctccacactgaaaagctgtaacgctaaggcttttagaagtaataccctg
 ccaatggcaaccagcaccatgcccctgcttccagggtccacaagtattccctttctc
taagGGTTCATCTCCGATGGCTCTAACATTCTGGATGAAGTGACGTTTCCTGCTCGGGTC **Exon 7**
CTAAAGTCTACTCTGtaagaaaagcctcctccttctttctctgtttcattttgacaca
 gtctggctatgtagcctagggtttgactgaaccatcaaccttctggctcagcctccat
 gtctgtatcattgacgtgcaactgcatcactgtatcggactgggtgatgctaacgacta
 ggggaactccaagttcattccagttaggctctacccatgagcttccctgtgggtcaggtg
 gggccccccacactccactccttagccttcaactagtgtattctccacggtaacactg
 aacagaccagagaagggtctgagccccaggcctaccttggggaaaggttatactgtacac
 tgcattttggaacttcaagggtgtctcttctcctctgaggacatagaccatctgtgtgg
 tggcctaccaagctaactgtgttttttttacccaagGTGGTAGAAGTAATTGCTGGTG **Exon 8**
TCTCCGCTGTCTCGGTGGGGTGATCGCTCTAAACGTAGAGGAAGCTGTCTCGGGTCCAC
ATCTCTCGGTGACGTTCTTTGGATTTTAGTGGCTgtgagtcttctggatggtcacct
 gtccatgaatagctagctagacatggctacagccacagttctggacttccctccttagac
 cctatatggctgttggttgttggctgctgctgctgttggttgttttggcttcacaat
 gttggtaaacattcagataagaaaagcacacaggagagaaccccttctcctaaagactccg
 ggaaccgaggactaaatgtatttgtatgaaatcttatccttaactgctagtactataccac
 ttacctatttttctaagaaaatccaatgttcttagttagggttttactgctgtgatgggc
 acctgaccaaggcaactctataaaaggacaacgtttaattggggctggcttacaggttc
 agcggttcagtcattatcatcatgggtgggaaacatggcagcatgcaggcagaaatagtg
 ctgggaaggagctgagagttctgcatcttgattcgaaggcagccaggaggagactctct
 ctcccacattggatagaacttgagcaccaggagccctcagagcctgctacacagtgaca
 cacctcctccaacaagatcacacctcctaataagtgccacttcccacggggccaagcatat
 tcaaagcaccacaccaattatattttaaacycttgtgtgaagctcagggctccatgtctc
 agggaagccatgaagggtgccagaggtcaaaggacaccctatgcagagagattgacaag
 gaggcacaaggaacccagtttgggttttagatcacaagcaagagatctctctcctata
 ttgaccttgggacaactgactgggtgctgcagatagatctgcatttgactctactgcactc
 tgttgcctgagtatgtagcacatggccaagtactgggctgaaagcagagactacagaac
 atgacagatgtaccaaggtcaactaggggatgtggaatgtcacctgtcattcatgtgg
 cctttctacaggaaacttgactggttaaacaatggttgagcaacaagcagctaccaaac
 ctgtgagaggtgtcatgagcctaggacacttgcagcctgaggcagccctggctttct
 tctactagatagaatggtaaatcatcacagcaggagtaacaagcttagcctttctgtct
 ctccccaagTGTTTTCCAGTGCCATTGCCAGCCATGTGACAGCGGAATGTCCAGCAAGT **Exon 9**
GTCTGttaggtgaagctcagaccttccattatgccatgggtcacactttgggtgtagctc
 aacaagggttacaaggagaggccacgggggaccagtagcagcggccagggcaggtcca
 ctgcccaggagaggatccacaactgttctggggcccagtgggccaagatgtttctgaaaa
 caaaacccgaacactagggtttgcaagtcaagaagttcctgtagctaagcaaggggtggagg
 aagagagacacatcctttagcttcatcccctctcctgtggggctgcttagctgttagcag
 ctgttggccactgttggcttttgggtctaactgatctgccaatgagctgtgtgctgggtt
 tccggccctgacacaggttgggggaggttagaagaacagatcttagaagagtgagggaac
 tgagtgcacacaggtgctgattgttttccatcacattagagcactacatgtgatgttca
 aaaactcccagttatacccggcactgagtgagcagagtttatcgagaccacatagcga
 gcagtcaccactcacaacttgaaggcagtaaatgctggccacacgtactaccgacag
 tctgctttcctgcaagGTTGAGGTGCTGATAGCCATCAGCAGCCTCACATCCCCACTGCT **Exon 10**
ATTAACCTGCTCTGGATATCTGTCTTCAGTGTGATGAGAGTCGTGGAGATTTTTAAAGA
TTACCCGCCAGCCATCAAAgtacgtgtccattctatctttaaactccttggaaacgggac
 ctgaggggttggctatgggggatctgctgtatttctggcagtagtcagaacaaatggcca
 cccacctggacaaagtggctttgcccagtttctgtgggtggagtgactgagtgaggag
 cgaggtgggatccaatttgccttttccgtgtgatctgtccccgctggctgctctgggt
 tctgttcatgtcttgggtttccccgcttatttttttttctgectgtcttagctcagc
 tctgtactggacctcatttcttcatcgttaactggggcttccctctgtcttctgaccac
 ccatgggcatctcaagcgcagtcacagatcgcaggagaccactgggacctcagtc
 gccttgcattaagttcatagatggacctgaggggttgacgtggctcactttctaccatt
 cacataggatcgtttcctctggggccccagcaccttccagggttccctcaggtcaa
 acacacacagctgactgacatcgtagggtcttgggtatttggttccaggatgagagctc
 tccttcacNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtgggtctcNctgctctttgcaegaccctc
 aagcagagcctcaggaaatctcatatgctctcttccctacggcagtcggatcgNaag
 gggcggaaagaaatacaacctgggtcctctgtatgcttactcattaaatggaaggcagcag
 aattggttgaaatggaatgtgtgtctcagattaccgaagcataagaagcctgtgtgaat
 gtccagggccccgtgctcatcaagggcgcctgtgaaaccttaggcgaggggagaagtt
 gcaggcgtctgctgtgggtctgttcacatctcgctccttccctgtaagTCTTATGATGTT **Exon 11**
CTCTGCTGCTCCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTTCAGGGGGGACTCAACACTGGCACCGCC

ATCCAGTGTGTGAGCTTCAAAGTCAGCGCCCGGCTGCAGGCTGCATCCTGGGACCCCCAG
TCCTGTCCCCAGGAGCGGCCAGCAGGGGAGgtgagttagcctgccttccccgggtgccccca
tcctgggtcctcagaggggtccttgtgaggttatggatccttccactaatgtcctttgatg
tttgctgtgatgttttgaagtttgttttatttggcagtattaaaaataaagtttgaactag
gttcttttttaacacacactaaatgagtacaaaaccattcatgaaaaataccgtggctaca
gggttttcagctccactctacagacacagaaaaagccttccaaagactcccacagatgcc
atgctttgtagtggagggctgccctgcttggcctggttaggctcctgcaaccagacatt
cctattctgtgaccagtgaggctgagtcacctggatggtagtctcctgcctatcctacc
ccatcctatgttctgatacccccaccctgaggttgggctgctaacttcgcccctgagcca
tctatgcctgtagtgtcctcctgggcaaactcgcccactgccatcaaggaagtggcctgg
ttgttcgggtcccaaggagatgttcaggcaggcttccatctctgtcctgggtctgtgtcc
tgaccagcaggccacagagccagatgaataagttgccagattccagatcccagaactgac
catcttaggagatgagagtaagtgtgcaagctgctgtcgccatctcatgtctggaggtg
tgtgtctgcctctgctgtcctttactctcagctacacatccatcttaaagtcacccccac
tgcacaaagacagacactatgggaagggatgtgggaatgtctaagatgcttcggctcctg
cccgggagcgtgtcctccttctccgttctttctcatgtaaagaagtttacattcaggaa
cacatcagatgccacacagactcagccgaatctgctgccttccctccagggtccgaccctg
gtgaggtgacattgtccttgtcctttctttcatcagGTGGTCCGAGGCCCCCTCAAGGA
GTTTGACAAAAGAGAAAGCCTGGAGAGCTGTGGTGGTACAAATGGCCCAGTACTACAGGA
TAAAGAGACTGAGTCTGGGTGTCTGCCCGACCCCAGCGTGTCCACCGTACGGACTCTA
ACCATTGCACGGCTACTGCTTTCTAACATACTATTTCCCTCCTGTGAGGGCAGCCCAGGC
TGCAAGGTGGCTTTTCGGTTCCTGTTCGTAGTTTAACTTTGAAACAGGAAAATATTGAGTG
TTGGGCCCTATTAGGTCTCAGTGTGTGCACCTCAGGTGACCCTGACGGCCTGGGTGTTGC
TTTTTTTTTCCAGCCCTCCTCACTTCCCTGGGTTGACCCCTATTACCAGGACCTGGTGTTC
TGGCCTTAGGGCACTTCCATGCCTTCTCATGCCTTGCCACAGTGCAGGGATAGTTTGGCTG
TGAGACTCACAGATAGTTTGTATATCACCTCCCCAGGCCCCAGAAGACAGCTGGACTCTC
CCAGCTAACAGAGAATCAAGGAACCTATAGTAAGTTGGGTCTTTTGTGAAGCTGGGGAT
CATTTTAGGAATTGCTTTCTGGGAGGGGAGCCTCTGTGCTTGGGAAGACAGCGAGCGTGC
CTTTACTGAGCTGGGGTATCAATGGGTTCCCTTCCAGGAAGAGGTATATTCTGTGCCTCA
GAAGAGCTGCCAGGGTCAGGGAGAGTGAAAAATCCTTCTAGGCAGCTCACTTGTAGATA
CACACGACTGCCAGGACTCAGGAAAAGCGTGGCCATTTTCAAACAGAGGGATGCAAGGAT
GGCACCTGACAGGGATCATGTAGGAGCAAAGTGGCCCCGCCCTCCAGTGTGCGGGACTTCC
GGTCTGTCTCCATTCTCTGCAGCCTGCCCTAAATGAGAGATCATCTTTGCTTGCCTATG
TGCGGAGCCCAATGGGCTTGGGGTCCCTCTGCAGCTCTATATAACCACACGCTATTGGGTGG
GAAGGGAGTGGTGGTCCCACTGGGCTGACAAGCCATCCGCTTTTCCAGGACCTGGGCTTTCA
GGACCAGAATGAGGCGGCAAGAGGATGCTGCCAGCTTGCACCTTCTAATTTTAGAGGGAT
GTTTTGTTTTTAACTGACTCATATAAGTGGGGTCTGAAAATCGTCTCTTGTATACTTTTG
TCTGTTATAGATTAATATGCTTGAGCAATAAATGCTAACCTTCAAATGTTGAG

Exon 12

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Laborräume bedanken, sowie für die Möglichkeit, erste Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten zu bekommen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Jobst Meyer, unter dessen fachkundiger und engagierter Anleitung diese Arbeit entstanden ist und der in vielen anregenden Diskussionen meine Begeisterung für die Genetik geweckt hat.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Frau Gabriela Ortega bedanken, die mir in praktischen Dingen immer zur Seite stand und von der ich auch menschlich viel gelernt habe. Ohne sie wäre diese Doktorarbeit niemals zustande gekommen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Angelika Schmidt und Yana Syagailo, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und mir bei vielen kleinen und großen Dingen geholfen haben.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.