

**Identifizierung und Charakterisierung von
neuen Genen für die Entwicklung des
cerebralen Cortex**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Joachim Glaubitz

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2006

Dekan: Prof. Dr. Stefan Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Gruss

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Diese Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,
Karl-Friedrich-Bonhoeffer-Institut,
Abteilung: Molekulare Zellbiologie,
Direktor: Prof. Dr. Peter Gruss,
in Göttingen durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN, BEGRIFFSKLÄRUNG	7
DANKSAGUNG	8
EINLEITUNG	9
Allgemeine Embryogenese.....	10
Gehirnentwicklung und Genese des cerebralen Cortex.....	11
Gemeinsamkeiten in der Entwicklung von Nerven und Blutgefäßen.....	20
Anatomie des Blutgefäßsystems in der Embryonalentwicklung	22
Allgemeine Eigenschaften der TRIM-Genfamilie.....	26
ERGEBNISSE	32
DNA-MICROARRAY-SCREEN.....	32
Vorhersage neuer Marker-Gene mit regionalisierter Expression im Cortex	37
In-situ-Hybridisierungen zur Überprüfung der Expressions-Vorhersagen	40
Klon 137 – bisher uncharakterisiertes Gen <i>Nse1</i>	40
Klon 149 – unbekanntes Gen.....	43
Klon 103 – Gen <i>Etv5</i> aka <i>ERM</i>	46
Klon 133 – Gen <i>Klf12</i> aka <i>AP-2rep</i>	48
Positivkontrolle – Klone 59 und 65 – Gen <i>Nfi/x</i>	49
DAS GEN <i>TRIM46</i> ALS KANDIDAT FÜR EINE DETAILLIERTE ANALYSE	50
NORTHERN-BLOT-ANALYSE FÜR DAS <i>TRIM46</i> -GEN.....	52
BESTIMMUNG VON SPLICEVARIANTEN DES <i>TRIM46</i> -GENS.....	53
Exon-Intron-Struktur auf der genomischen Sequenz.....	53
Übersicht der 8 Splicevarianten von <i>TRIM46</i>	57
Bestimmung des 5'-Endes der mRNA von <i>TRIM46</i> durch Intron-Überbrückung	58
PHYLOGENETISCHE POSITION VON <i>TRIM46</i> IN DER TRIM-FAMILIE.....	62
ANNOTATION DER PROTEIN-DOMÄNEN VON <i>TRIM46</i>	66
SUBZELLULÄRE LOKALISATION DES <i>TRIM46</i> -GENS	72
SUCHE NACH PROTEIN-INTERAKTIONSPARTNERN VON <i>TRIM46</i> MIT <i>YEAST-TWO-HYBRID</i>	75
VERIFIKATION DER PROTEIN-INTERAKTIONEN MITTELS <i>GST-PULLDOWN</i>	81
HERSTELLUNG EINER KNOCK-OUT-MAUS FÜR DAS GEN <i>TRIM46</i>	84
λ-Phagen-PCR-Screen.....	85
Klonierung des KO-Konstruktes	87
Gentransfer in ES-Zellen und ES Zell-Screen.....	91
Morula-Aggregation von ES-Zellen, Keimbahntransfer und Genotypisierung der transgenen Mäuse	93
EXPRESSIONSANALYSE DES <i>TRIM46</i> -GENS.....	94
<i>TRIM46</i> in EST-Datenbanken (virtueller Northern).....	94
Abschätzung antigener Regionen des <i>TRIM46</i> -Proteins	96
Expression im <i>Whole-Mount</i> -Embryo auf Organebene.....	96
Vergleich von ISH, Immunfärbung und <i>lacZ</i>	96
<i>TRIM46</i> Expression im gesamten Embryo verschiedener Entwicklungsstadien	100
<i>TRIM46</i> im <i>Whole-Mount</i> -Gehirn verschiedener Entwicklungsstadien	113
Genauere Lokalisation der <i>TRIM46</i> -Expression im Gehirn mittels ISH und <i>lacZ</i> -Färbungen auf Schnitten	116
Genauere Lokalisation der <i>TRIM46</i> -Expression im Embryo mittels <i>lacZ</i> -Färbungen auf Schnitten.....	119
Arterien.....	119
Innenohr.....	122
Auge	123
Magen, Duodenum, Pankreas, Darm	123
Plexus choroideus	124
Niere	125
Harnblase	127
Herz	128

Lunge	128
Negativkontrollen zu den Expressionsfärbungen	129
PHÄNOTYP DES KNOCK-OUTS IM VERGLEICH ZUM WILDTYP	130
Veränderungen des Lungengewebes mit zunehmendem Alter	130
<i>lacZ</i> -Färbung in Tumorgewebe von <i>TRIM46</i> -KO	131
Veränderungen des Urins	131
Melanocytenwucherung auf der Gehirnoberfläche	132
DISKUSSION	133
Microarray-Analyse ermöglicht Identifizierung neuer Gene mit regionalisierter Expression im cerebralen Cortex der Maus zum Stadium E18,5	133
Verifizierung der Chip-Daten mittels ISH gibt eine erste Charakterisierung für neu gefundene Gene	134
Auswahl des Gens <i>TRIM46</i> zur detaillierteren Analyse	138
ZUSAMMENFASSUNG.....	147
MATERIALIEN UND METHODEN	149
MATERIALIEN.....	149
Chemikalien	149
Lösungen	150
Kits	152
Sonderzubehör	152
Verwendete Plasmide, Marker, PCR-Primer, Oligonukleotid-Sonden, Antikörper	153
Verwendete Zelllinien	160
METHODEN.....	161
Herstellung einer transgenen Maus	161
Präparation und mitotische Inaktivierung von Neomycin-resistenten Fibroblasten	161
Kultivierung embryonaler Stammzellen	161
DNA-Transfer in embryonale Stammzellen durch Elektroporation	161
Selektion von ES-Zellen zur Gewinnung von Einzelklonen	162
Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	162
Gewinnung von Morulae für die Morula-Aggregation	163
Vorbereitung von ES-Zellen für die Morula-Aggregation	163
Aggregation der Morulae mit ES-Zellen	163
Uterustransfer der Blastocysten in pseudoschwangere Empfängermäuse	164
Chimären und Keimbahntransfer	164
Zellkultur-Techniken	164
Splitten von Zellen durch Trypsinisieren	164
Transfektion mit Lipofektamin2000	164
Affymetrix-Microarray-Screen	165
Gewebe-Präparation und RNA-Isolation	165
cDNA-Synthese	165
Synthese biotinylierter RNA und Ausbeuteberechnung	166
Fragmentierung der biotinylierten RNA	166
Herstellung der Hybridisierungskontrollen	167
Hybridisierung der Microarrays	167
Hybridisierungscocktail (300 µl):	167
Waschen und Färben der Microchips	167
Scannen der Microarrays und Auswertung der Daten	168
DNA-Techniken	169
Herstellung elektrokompetenter Bakterien	169
DNA-Präparation	169
Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	169
Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	169
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung	170
Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion	170
Ethanol-fällung	170

λ-Phagen-PCR-Screen	170
Vorbehandlung der Wirtsbakterien	170
Durchführung des λ-Phagen-PCR-Screens	170
Ausplattieren der Phagenbibliothek	171
Aufreinigen positiver Phagen und Anlegen eines Phagenstocks	171
DNA-Isolierung aus λ-Phagen	171
Aufbereitung der KO-Konstrukt-DNA für ES-Zell-Elektroporation	172
RT-PCR	172
PCR	173
Isolation genomischer DNA	173
Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	173
Klonierung von DNA-Fragmenten	173
Vektorpräparation	173
Präparation von Restriktionsfragmenten	174
Präparation von PCR-Fragmenten	174
Blunt end-Klonierung	174
Ligation	174
Agarose-Gelelektrophorese	175
Isolation von DNA aus dem Agarosegel	175
Sequenzierung	175
Southern-Blot	176
Radioaktives <i>Labeln</i> von Hybridisierungssonden	176
RNA-Techniken	177
Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIzol	177
Isolierung von Gesamt-RNA mit RNeasy Total RNA Isolation Kit	177
Aufreinigung von poly-A ⁺ RNA aus Gesamt-RNA	177
Northern-Blot-Analyse	177
Protein-Techniken	178
<i>Yeast-Two-Hybrid-Screen</i>	178
<i>GST-Pulldown-Essay</i>	180
Affinitätsaufreinigung eines rekombinant exprimierten <i>GST</i> -Fusionsproteins	180
Bradford-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung	181
In-vitro-Transkription und Translation	181
<i>SDS-PAGE</i>	181
Histologie	182
Anfertigung von Cryo-Schnitten	182
Anfertigung von Paraffinschnitten	182
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	182
β- <i>Galactosidase</i> -Enzymhistochemie (<i>lacZ</i> -Färbung)	183
Protokoll für Cryo-Schnitte	184
Protokoll für Doppelfärbung <i>lacZ</i> + Immunhistochemie	184
Protokoll für Whole-Mount-Embryonen oder Gehirne	184
Immunhistochemische Färbungen	185
Protokoll für Cryo-Schnitte	185
Protokoll für Paraffinschnitte ohne Antigen-Unmasking	185
Protokoll für Paraffinschnitte mit Antigen-Unmasking	186
Protokoll für Whole-Mount-Immunfärbungen	186
<i>Tunnel Staining</i> gegen Apoptose	186
In-situ-Hybridisierung von RNA-Sonden	187
Herstellung von Digoxigenin markierten RNA-Sonden	187
Protokoll für ISH auf Cryo-Schnitten	188
ANHANG	189
LITERATURVERZEICHNIS	189
PUBLIKATIONEN	195
AKADEMISCHE LEHRER	196
LEBENS LAUF	197

Abkürzungen, Begriffsklärung

AK:	Antikörper.
bp:	Basenpaar, als Maßeinheit auch kbp oder Mbp, Kilo-, Megabasenpaare.
cDNA:	Copy-DNA.
cpm:	Counts per million.
DEPC:	Diethylpyrocarbonat.
E9, E12, usw.:	<i>Embryonalstadium</i> 9, 12 usw. Tage nach der Befruchtung einer Mauszygote. Bis E19, wo die Geburt erfolgt. Ab dann <i>Postnatal</i> -Stadien P1, P2 usw.
ISH:	In-situ-Hybridisierung.
KO:	Knock-out. Maus, in der ein Gen oder Teile davon aus dem Genom entfernt wurden.
<i>lacZ</i> :	<i>β-Galactosidase</i> . <i>lacZ</i> -Färbung: <i>β-Galactosidase</i> -Enzymhistochemie.
P1, P2, usw.:	<i>Postnatal</i> -Stadien P1, P2 usw. von Mäusen nach der Geburt.
pfu:	Plaque forming units.
rpm:	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“).
RT:	Raumtemperatur.
ÜN:	über Nacht.
<i>X-Gal</i> :	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid.

In dieser Arbeit wurden Anglizismen wenn möglich vermieden und mit vergleichbaren deutschen Begriffen ausgetauscht, jedoch beibehalten, wenn sie in dem Rank von Eigenbegriffen standen und auch im deutschen Sprachgebrauch üblich sind, d.h. an deutschen Universitäten und Lehrbüchern so verwendet werden wie beispielsweise „Southern-“ oder „Northern-Blot“. Diese Regelung folgt der Promotionsordnung der Fakultät für Chemie- und Pharmazie der Universität Tübingen, wonach Dissertationen in Deutsch oder Englisch verfasst werden können.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Peter Gruss für die Ehre seines in mich gesetzten Vertrauens, an diesem interessanten und verantwortungsvollen Forschungsprojekt arbeiten zu dürfen. Seine visionäre Konzeption hatte mich von Anfang an begeistert und sein stetes Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit motiviert.

Professor Dr. Rammensee danke ich sehr für die Übernahme des Korreferats und sein Interesse an meiner Arbeit. Das angenehme Betreuungsverhältnis schon seit meiner Diplomarbeit in Tübingen und sein Engagement für uns Studenten gab mir den nötigen Rückhalt, um auch diese Doktorarbeit durchführen zu können.

Den Mitgliedern des Promotions-Ausschusses und Dekanats der Fakultät für Physiologie und Chemie der Universität Tübingen danke ich für ihr Entgegenkommen und die Ermöglichung dieser Arbeit in Göttingen.

Ganz besonders danke ich Dr. Kamal Chowdhury, der mit seinen fachlichen und technischen Hinweisen maßgeblich zum Gelingen des Projektes beitrug und darüber hinaus mir auch in schwierigen Zeiten stets zur Seite stand und mir ein Vorbild war.

Frau Dr. Anastassia Stoykova danke ich für die Verfügungstellung ihres Fachwissens über die Cortextentwicklung insbesondere bei der Auswertung und Interpretation von den Ergebnissen.

Der große Microarray-Screen mit 5 verschiedenen Hirnregionen zum Entwicklungsstadium E18,5 (Embryo 18,5 Tage nach der Befruchtung) wurde gemeinsam mit einer anderen Doktorandin, Frau Yuh-Shin Chang durchgeführt. Die dabei erhaltenen neuen Ergebnisse wurden für die jeweiligen Doktorarbeiten entsprechend aufgeteilt und danach getrennt weiter ausgearbeitet, lediglich Kontrollexperimente teilweise gemeinsam verwendet. Ein anderes Zweier-Team von Doktoranden führte einen analogen Screen mit dem Entwicklungsstadium E16 durch und eine weitere Gruppe bearbeitete E14. Die Resultate wurden so abgeglichen, dass in den jeweiligen Arbeiten keine Dubletten vorkommen und die Ergebnisse unabhängig voneinander veröffentlicht werden können. Eine zusätzliche gemeinsame Veröffentlichung diskutiert die Korrelationen zwischen den verschiedenen Zeitpunkten, währenddessen bei den Einzelarbeiten die räumliche Expression im Vordergrund steht. Für die Durchführung der Experimente zur Verifikation der Microarray-Vorhersagen mittels in-situ-Hybridisierung erhielten wir technische Unterstützung von Martina Daniels, Sequenzierungen wurden von Sigurd Hille durchgeführt.

Die Arbeiten mit ES-Zellen wurden von Sharif Mahsur und Ullrich Franke nach dem Konzept von Prof. Dr. Ahmed Mansouri (Mansouri 2001) durchgeführt, da dies als Serviceleistung in der Abteilung so eingerichtet war und deren Spezialisierung eine hohe Reproduktionssicherheit und Effizienz darstellte. Die Techniken zur Herstellung einer transgenen Maus einschließlich praktischer Erfahrung mit ES-Zellkultivierung konnte ich allerdings auch persönlich in einem Laborkurs der IBA GmbH (Institut für Bioanalytik, Göttingen) kennen lernen und anwenden, weshalb sie im Methoden-Teil auch ausführlich dargestellt sind.

Die tägliche Versorgung der Mäuse mit Futter, Sauberhaltung der Käfige sowie Ansetzen von Verpaarungen nach Anweisung wurde von den Tierpflegerinnen Alexandra Driehorst und Heike Fett unter der Aufsicht der Tierärztin Frau Dr. Ulrike Teichmann gewährleistet, bei denen ich mich herzlich bedanke.

Einleitung

Ziel dieser Arbeit war das Auffinden neuer genetischer Faktoren, die für die Unterteilung des cerebralen Cortex in funktionale Regionen während der Entwicklung eine Rolle spielen, bzw. allgemeiner gehirnspezifischer und cortexspezifischer Gene, die dortige Funktionen beeinflussen.

Der Arbeit liegt ein interdisziplinärer Ansatz zugrunde, in dem die entwicklungsbiologische Fragestellung mit modernen Methoden aus anderen Fachgebieten, insbesondere der Molekularbiologie, Anatomie, Bioinformatik wie aber auch Verhaltensforschung angegangen wurde. Die folgende Einleitung soll ebenso Lesern mit verschiedenen interdisziplinären Hintergründen eine Einführung in das Thema der Cortexentwicklung geben, um die später in dieser Arbeit präsentierten und diskutierten Resultate verfolgen zu können. Von einer kurzen allgemeinen Übersicht der Embryonalentwicklung wird zur Gehirn- und Cortexentwicklung übergeleitet. Da während der Arbeit gefundene Gene einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung von Nervensystem und Blutgefäßsystem aufzeigten, wird der aktuelle Stand dieser Forschung ebenso zusammengefasst. Die Übersicht über die Anatomie der Blutgefäßsystementwicklung erleichtert das Verständnis der späteren Expressionsergebnisse für das neue Gen *TRIM46*, welches in den beiden Systemen exprimiert ist und im Rahmen dieser Arbeit durch Anfertigung einer transgenen Maus näher charakterisiert wurde. Zum Verständnis der Genfunktion in der Diskussion schließt die Einleitung mit Hintergrundinformationen zu der TRIM-Genfamilie.

Allgemeine Embryogenese

Die Embryonalentwicklung beginnt nach der Befruchtung der Eizelle von einem Spermium mit der Furchung, in der sich die Eizelle schrittweise in kleinere Furchungszellen (Blastomeren) aufteilt. Über ein Morula-Stadium (lockerer Zellhaufen; Morula) bildet sich durch Auseinanderweichen der Zellen eine Blastula (Blasenkeim), bei Säugern die Blastocyste. Durch Einstülpung der Blastulawand an einer Stelle (Invagination) oder durch Delamination und andere Prozesse entsteht der zunächst zweischichtige Becherkeim (Gastrula). Seine Organisationsstufe entspricht derjenigen der Hohltiere.

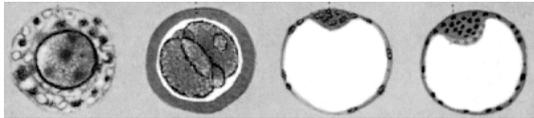
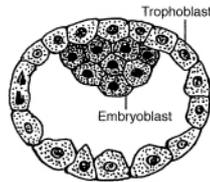


Abbildung 1: Die ersten Entwicklungsstadien: Eizelle, Morula, Blastula bzw. Blastocyste.

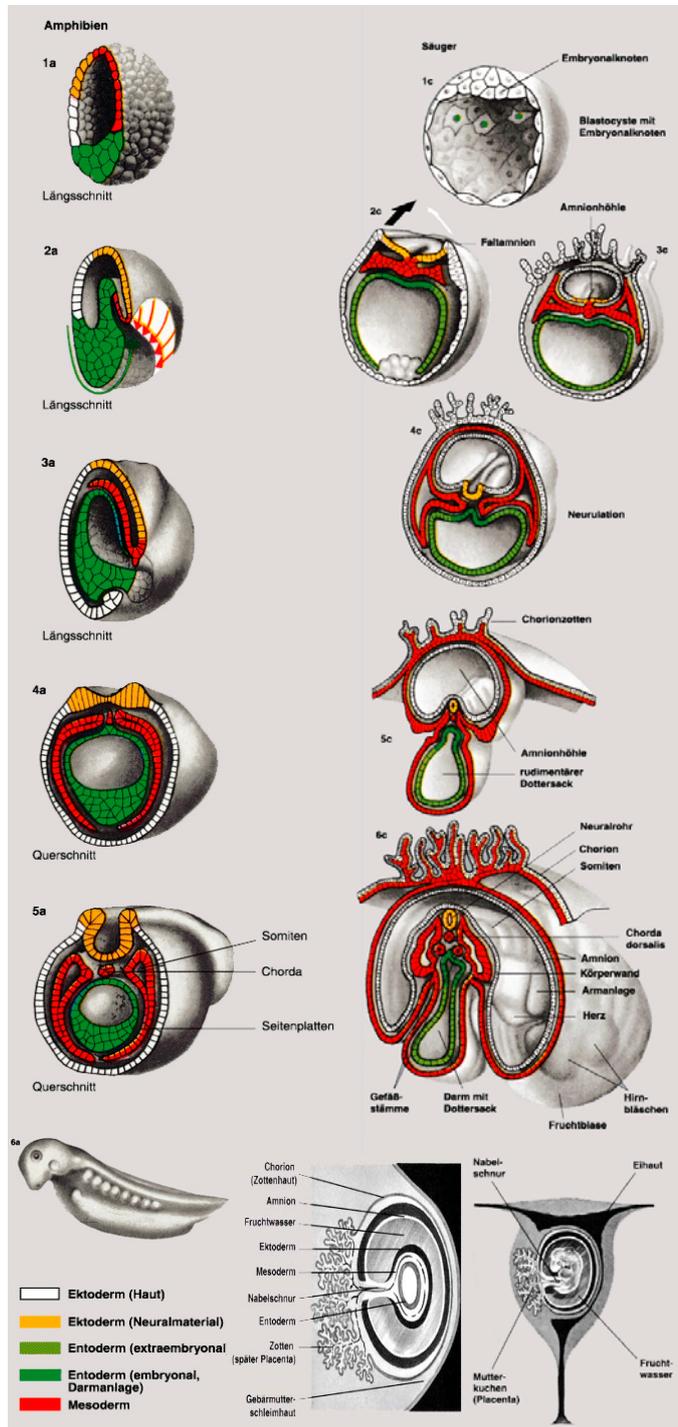
Die Blastocyste nistet sich bei Säugetieren in der Gebärmutter ein. Ein Teil ihrer Zellmasse bildet über den Trophoblasten den Kontakt zum mütterlichen Gewebe aus und vermittelt die Nährstoffversorgung des Embryos.



Bei den Bilateria wird der Keim im Laufe der Gastrulation dreischichtig. Die Bildung der 3 Keimblätter kann bei verschiedenen Tiergruppen über unterschiedliche Mechanismen erfolgen: Invagination (Einstülpung), Immigration (Gastrulation), Delamination (Ausbildung zweier übereinander liegender Zellschichten aus einer Schicht durch Teilung von Zellen parallel zur Schichtebene und Auswanderung der Zellen) sowie Epibolie (Wortstamm = Bedeckung, Umwachsen einer Zellschicht).

Aus der äußersten Zellschicht der Blastocyste entwickelt sich die äußere Embryonalhülle (Chorion). Im Embryonalknoten entsteht die Amnionhöhle, die den Embryo mit stoßdämpfender und eiweißreicher Flüssigkeit umhüllt.

Auf die Ausbildung der Keimblätter folgt die Organogenese, in der sich die einzelnen Organanlagen absondern und ausformen (z.B. Neurulation).



Spektrum Lexikon der Biologie 2005

Gehirnentwicklung und Genese des cerebralen Cortex

Die Neurulation ist ein Formbildungsvorgang im Anschluss an die Gastrulation im Chordatenkeim, der die Anlage des Zentralnervensystems liefert. Dabei entsteht das Neuralrohr. Chordatiere sind dabei diejenigen Tiere (Manteltiere, Lanzettfische, Schädeltiere), die zeitlebens oder während eines bestimmten Abschnittes ihrer Ontogenese eine Chorda dorsalis besitzen. Chordatiere (oder Wirbeltiere) unterscheiden sich grundsätzlich von Wirbellosen in der Lage von Nervensystem und Herz (z.B. Bauchmark der Insekten versus Rückenmark). Das Nervensystem der Chordaten besteht stets aus einem über der Chorda dorsalis gelegenen Zentralnervensystem (ZNS) und einem peripheren Nervensystem (PNS), das von dort in den Körper ausstrahlt. Im PNS können mehr oder weniger selbständige Nervennetze in der Haut oder in den inneren Organen vorkommen.

Das ZNS der Chordaten lässt sich in Gehirn und Rückenmark untergliedern. Es entsteht ontogenetisch aus einem besonderen Bezirk im Ektoderm, der sich durch Induktion aus dem Chorda-Mesoderm verdickt und eine Neuralplatte bildet, die sich durch Abfaltung (Neurulation) aus dem oberflächlichen Ektoderm in die Tiefe verlagert sowie U-förmig aufwölbt, so dass sich die Neuralrinne bildet. Durch Schließen entsteht das Neuralrohr, wodurch das ZNS der Chordaten (Neuralrohr) innere Hohlräume (Ventrikelsystem) enthält. In diesen Hohlräumen findet sich eine wasserhelle Flüssigkeit, die Cerebrospinalflüssigkeit, darüber hinaus enthalten sie einen Proteinfaden (Reissner-Faden, Subcommissuralorgan), der im Gehirn erzeugt wird und der den Zentralkanal des Rückenmarks durchspannt.

Genetische Faktoren für die Identität und Ausbildung von Neuroektoderm aus dem Ektoderm sind *Fgf* (*Fibroblast Growth Factor*)-Proteine und *Bmp* (*Bone Morphogenetic Protein*)-Antagonismus (Streit, Berliner et al. 2000).

Bei der größten Gruppe der Schädeltiere (den Vertebrata, zu denen auch der Mensch gehört) wird die Chorda dorsalis im Laufe der Ontogenese durch die Wirbelsäule ersetzt, so dass bei ihnen auch das Rückenmark in eine knorpelige oder knöcherne Hülle eingeschlossen ist. Das Rückenmark behält zeitlebens die Grundgestalt eines Rohrs bei allerdings verdicken sich seine Wände gegenüber denen des Neuralrohrs mächtig und sein zentraler Ventrikelraum - der Zentralkanal - kann vollständig verschlossen werden, so etwa beim Menschen.

Die Anlage des Gehirns am Vorderende des Neuralrohrs ist zunächst ebenfalls mehr oder weniger rohrförmig allerdings vor der Spitze der Chorda dorsalis scharf nach ventral abgeknickt (Mittelhirnbeuge). Das Neuralrohr des späteren Hirnbereichs erweitert sich rasch und entwickelt Einschnürungen und Auftreibungen, die als die Hirnbläschen bezeichnet werden. Die zunächst zweiblasige (Archencephalon und Deuterecephalon), in der Mittelhirnbeuge geknickte Gehirnanlage wandelt sich dabei sukzessive über drei (Prosencephalon, Mesencephalon, Rhombencephalon) schließlich zu fünf (Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon, Myelencephalon) blasenartigen Hirnabschnitten (Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon, Myelencephalon) um. So bildet sich ein mehr oder weniger gestrecktes Gehirn. Jeder dieser Hirnabschnitte besteht seinerseits aus einer verschiedenen Zahl von Unterabschnitten (Neuomere), die genetisch spezifiziert sind (Hox-Gene). Im Zuge der Bildung dieser fünf großen Abschnitte wird die ursprünglich rohrförmige Gestalt des Gehirns stark verändert, indem verschiedene Hirngebiete unterschiedlich schnell an Volumen zunehmen. An vielen Stellen der ursprünglich rohrförmigen Gehirnanlage ergeben sich so Ausstülpungen (Evaginationen), Einstülpungen (Invaginationen) und Verdrehungen (Rotationen) des Wandmaterials des Neuralrohrs.

Genetische Faktoren für die anteriore Identität von Neuralrohrabschnitten zur Bildung des Gehirnes sind der sekretorische Faktor *Cerberus* und *Otx2*. Das Ausschalten dieser Gene führt zum Verlust von Gehirn- und Kopfstrukturen (Bouwmeester, Kim et al. 1996).

Die relativen Größen und Differenzierungen der einzelnen Abschnitte in den erwachsenen Gehirnen variieren beträchtlich. Die kompliziert gestalteten inneren Hohlräume (Ventrikelsystem), die sich aus dem

Lumen des Neuralrohres ableiten, sind mit Cerebrospinalflüssigkeit gefüllt, die von gefäßreichen Gewebslappen produziert wird (Adergeflecht, Plexus choroideus), welche in oder an diesen Hohlräumen liegen. Nur bei wenigen Schädeltieren (z.B. im Telencephalon und Diencephalon von Schleimaalen) gehen die Ventrikelräume sekundär wieder verloren, so dass dort der Eindruck eines soliden Organs entsteht. Das Telencephalon (Endhirn) der Schädeltiere besteht stets aus einem vorderen oberen paarigen Teil, den Hemisphären, die die Seitenventrikel enthalten, und aus einem hinteren unteren unpaaren Teil, dem Telencephalon impar.

An ihrem rostralen Ende tragen die Hemisphären aller Schädeltiergehirne paarige Riechkolben (Bulbi olfactorii), die die Axone der Riechschleimhaut aus der Nase aufnehmen. Die Axone der Zellen in den Riechkolben ziehen als sekundär-olfaktorische Bahnen zu den paarigen Hemisphären des Telencephalon, wo sie mehr oder weniger große Areale bedecken. In den Telencephali aller Schädeltiere gibt es aber Areale, die von Eingängen aus den Bulbi olfactorii frei bleiben, am mächtigsten sind diese nicht-olfaktorischen Areale bei Knorpelfischen, Vögeln und manchen Säugetieren entwickelt. In diese nicht-olfaktorischen Areale des Telencephalon strahlen aufsteigende Fasern aus dem Diencephalon ein, über die verschiedenste sensorische Informationen das Telencephalon erreichen. In vielen Tiergruppen (Knorpelfische, Vögel, Säugetiere) erreicht das Telencephalon eine beträchtliche Größe, bei den Säugetieren ist es der größte Hirnabschnitt. Es sind vor allem die dorsalen Teile des Telencephalons (nämlich die verschiedenen Abschnitte des Palliums), die zu dieser Größenzunahme beitragen. In ihnen entwickelt sich bei Säugetieren der mächtige Cortex, allerdings ist die Entwicklung von Cortices kein auf die Säugetiere beschränktes Phänomen: Schleimaale, Reptilien und Vögel besitzen ebenfalls Cortices in ihren Pallien.

Im Telencephalon, besonders in seinen lateralen und ventralen Wänden, bildet sich an der Grenze der Matrix- und Mantelschicht die subventrikuläre Zone, in der immer wieder neue Neurone des Cortex und der Basalganglien gebildet werden. Das Dogma, dass Nervenzellen nicht ersetzt werden könnten, gilt also nicht immer und überall. Die Gehirne von Fischen wachsen, ebenso wie die Fische selbst, zeitlebens an Größe und an Zahl von Nervenzellen. Aber auch die Gehirne der erwachsenen Säugetiere zeigen eine Neubildung von Neuronen: Die subventrikuläre Zone

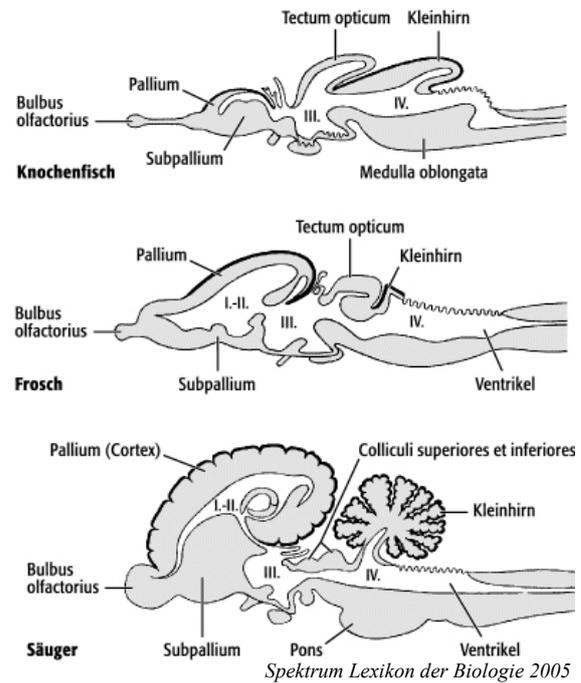


Abbildung 2: Gehirne von verschiedenen Vertebraten im Querschnitt mit ihren durch die Art der Neuralrohrbildung erhalten gebliebenen Hohlräumen, den Ventrikeln. Das Pallium (Mantel, Hülle) ist die äußere Schale des Telencephalons der Wirbeltiere. Das Pallium einiger Tierarten wie Säugern und Vögeln bildet einen Cortex aus.

Dieser verleiht den Tieren ein höheres Maß an Plastizität in ihrem Verhalten und verbesserte Lernfähigkeit, was in einer sich wandelnden Umwelt von Vorteil ist. Zwar sind Grundfunktionen wie Sehen, Riechen, Hören in den Tieren ohne Cortex auch vorhanden, jedoch bietet die weitere Verarbeitung solcher Informationen im Cortex die Möglichkeit zusätzlicher assoziativer Verknüpfungen und im Zusammenspiel mit dem Hippocampus zum Lernen und Vorausplanen, währenddessen die Verhaltensweisen der cortexlosen Tiere viel stärker durch genetische Vorgaben in Form von Instinkten und Reflexen im Hier und Jetzt direkt vorgegeben sind und sich schwerer oder kaum von aktuellen Ereignissen modifizieren lassen. Als Beispiel sei genannt, warum als Haustiere oder in Zirkusdressuren vornehmlich Säugetiere (und Vögel) statt Reptilien, Fischen oder Insekten Verwendung finden, um artifizell erlernte Verhalten zum Teil auf Kommando darzubieten. In den wenigen Fällen, wo in künstlerischen oder artistischen Darbietungen Reptilien wie Schlangen verwendet werden, sieht man auch keine einstudierten Verhaltensweisen dieser Tiere, sondern mehr den Umgang von Menschen mit den natürlichen Verhaltensweisen dieser Tiere, insbesondere wenn diese sich in einem gesättigten Zustand befinden.

bleibt im rostralen und lateralen Telencephalon lebenslang erhalten. Aus den rostralen Abschnitten dieser Zone entstehen Neuroblasten, die permanent in den Bulbus olfactorius einwandern (*rostral migratory stream*). Auch laterale Anteile der subventrikulären Zone bleiben erhalten, denn auch im Hippocampus der Säugetiere findet lebenslänglich eine Neubildung von Nervenzellen statt.

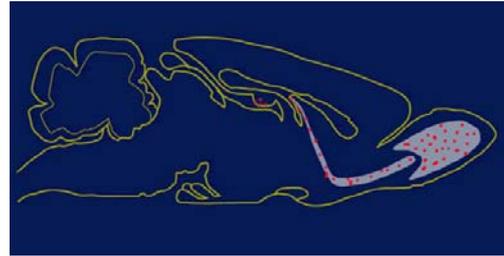


Abbildung 3: **Bereiche mit fortlaufender Neubildung von Neuronen** auch im erwachsenen Tier rot gepunktet: **Hippocampus** und **rostral migratory Stream** zum Bulbus olfactorius. (Bildquelle: Unsere Arbeitsgruppe)

Der cerebrale Cortex kommt in seiner 6-schichtigen Form nur in Säugetieren vor (Vögel beispielsweise haben nur einen 3-schichtigen) und zeigt eine besonders extensive interne Verknüpfung der Nervenzellen. Durch die vielen Einfaltungen erreicht er bei manchen Tierarten eine immense Oberflächenvergrößerung von bis zu 1000 cm² wie beim Menschen. Dabei wiegt er ca. 500 Gramm, ist 2,5 mm dick, enthält ungefähr 2x10¹⁰ Zellen, 10¹⁴ Synapsen und Nervenfasern mit einer Gesamtlänge von 2x10⁶ km, was 5 Mal der Distanz von der Erde zum Mond entspricht (Braitenberg 1998).

Die beiden Cortex-Hemisphären werden über das Corpus callosum miteinander verbunden. Die meisten Axone und Synapsen verbinden corticale Neurone untereinander. Doch sind es die Verbindungen zu anderen Bereichen, die Verbindung zur Außenwelt herstellen und die Ausübung von Kontrolle des Cortex auf seine Umgebung erlauben. Die olfaktorischen Afferenzen von der Nase repräsentieren wahrscheinlich ursprüngliche Strukturen, aus denen der Cortex hervorgegangen ist. Sie gehen direkt zur außen gelegenen Zellschicht 1. Demgegenüber verlaufen die Zugänge des Tastsinns, Hörens, Sehens durch vorgeschaltete thalamische Kerne, zu denen auch viele Fasern des Cortex zurück laufen.

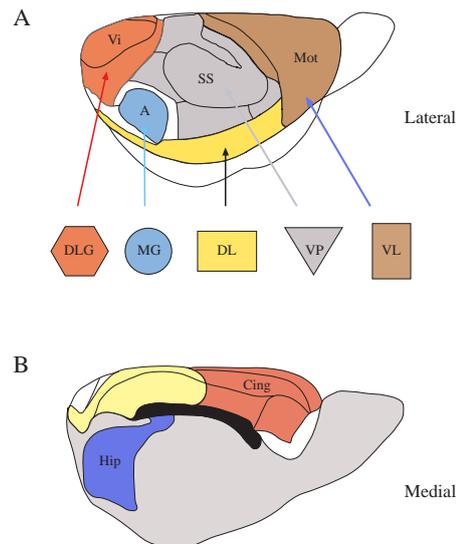


Abbildung 4: Seitliche (A) und mediale (B) Ansicht des cerebralen Cortex der Maus. Die wichtigsten funktionalen Regionen sind farblich unterlegt: Motor- (M), somatosensorischer (SS), visueller (V), cingulärer (Cgl) Cortex sowie der Hippocampus. In Bild A sind zudem die Projektionen von spezifischen sensorischen Kernen des Thalamus in die entsprechenden Cortexregionen dargestellt. VL: ventral-lateraler Kern, VP: ventral-posteriorer Kern, DL: dorso-lateraler Kern, MG: medial genicularer Körper, DLG: dorsal-lateraler genicularer Körper. (Bildquelle: Unsere Arbeitsgruppe)

Ein wichtiger Ausgabeweg entspringt dem motorischen Cortexgebiet für intentionale Bewegungen, der mit dem Cerebellum verbunden ist, das ebenso Kontrolle über muskuläre Bewegungen ausüben kann und gemeinsam mit dem Cortex in der Evolution stark angewachsen ist.

Ein weiteres Set von Ein- und Ausgabepfaden passiert durch zwei den 6-schichtigen Cortex angrenzende Regionen, den Archicortex und Paleocortex, die selber nur noch 3-schichtig sind. Der Paleocortex enthält das Rhinencephalon (Riechhirn) und ist an weitere Regionen angebunden, die für Stimmung und Emotion eine Rolle spielen. Der Archicortex formt den Hippocampus, der für Lernen und Gedächtnis zentrale Funktion hat und neben dem Cortex ebenso mit Regionen für Stimmung, Emotion und endokrine Kontrolle verbunden ist.

Bei der Suche nach den molekularen und genetischen Grundlagen für die Gehirn- und Cortexentwicklung hat sich angesichts des astronomischen Missverhältnisses von der Zellzahl und deren Verknüpfungen zu der Zahl an nach den

Genomprojekten bekannt gewordenen Genen (ca. 30000 bei Säugetieren) eine ökonomische Strategie offenbart. Diese zeichnet sich durch eine hohe Konservierung von molekularen und genetischen Faktoren über Spezies- und größere taxonomische Grenzen hinweg aus. Spezifische Genexpression auf der Ebene einzelner Neurone wäre viel zu aufwändig für das Genom, stattdessen erfolgt die Spezifikation der einzelnen funktionalen Zonen durch kombinatorische und überlappende Expression von Genen. Diese Strategie wurde zuerst bei der Kopfentwicklung von *Drosophila* anhand der HOM-C-Homeobox-Gene entdeckt, die nachgeschaltete Gene je nach überlappendem Zusammenwirken regulieren und Strukturen anterior-posterior segmentieren. Die vertebraten Homologen zu diesen Genen sind die Hox-Gene, welche Segmentierung vom Rückenmark über das Gehirn bis hin zum olfaktorischen Bulbus bewirken (Keynes and Krumlauf 1994).

Die Struktur des Cortex ist insgesamt ziemlich einheitlich, insbesondere cytologisch, so dass die Frage gestellt wurde, ob seine Unterteilung in verschiedene funktionale Regionen das epigenetische Resultat der verschiedenen Eingänge ist oder ob die Regionen bereits für die Verarbeitung der unterschiedlichen Eingangsdaten vorbereitet und optimiert sind, insbesondere hinsichtlich unterschiedlicher genetischer Determination. Dieses **Protocortex-Modell**, auch „Tabula rasa“ (O’Leary 1989), schreibt den während der Corticogenese einwachsenden Axonen des Thalamus die strukturierende Funktion für die corticalen Regionen zu.

Demgegenüber steht die Beobachtung, dass die Neuroblasten des Cortex aus einer Zellschicht der ventrikulären Zone entstammen, um von dort zu ihren Positionen in dem 6-schichtigen Cortex entlang der Fasern radialer Gliazellen von innen nach außen zu wandern, wobei diese ventrikuläre Zone nicht gleichmäßig in ihrer molekularen Identität oder Geschwindigkeit der Neurogenese ist (Levitt, Barbe et al. 1997). Die wandernden Neuroblasten können die Positionsinformation von der inhomogenen ventrikulären Zone mitnehmen und dadurch regionen-spezifisch differenzieren bevor schon Axone des Thalamus eintreffen. Dies wird als das **Protomap-Modell** (Rakic 1988) dem Protocortex-Modell gegenübergestellt.

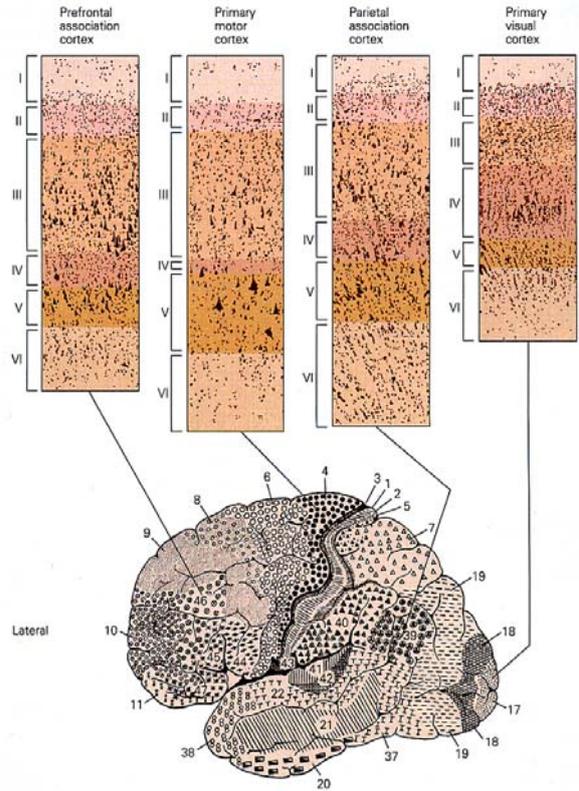


Abbildung 5: Das menschliche Gehirn mit seinem ausgeprägten cerebralen Cortex und dessen funktionalen Domänen. Die 6 Schichten des Cortex sind je nach Region unterschiedlich stark dick. (Cajal 2000)

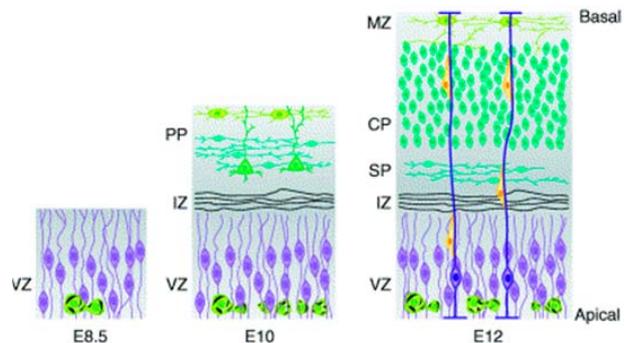


Abbildung 6: Bildung der 6 Schichten des Cortex durch Wanderung von Neuroblasten entlang der Fasern radialer Glia-Zellen von innen nach außen, d.h. innerste Schicht Nr. 6 zuerst. VZ: Ventrikuläre Zone, SP: Sub-Platte, CP: Corticale Platte. MZ: Marginal-Zone. IZ: Intermediäre Zone. PP: Preplatte. Quelle: www.wikipedia.de

Die thalamischen Innervationen in den Cortex sind sehr spezifisch und mosaikhaft, währenddessen die Mehrheit der Verbindungen innerhalb des Cortex einfachen Regeln folgt, wie etwa mit den Neuronen aus der Nachbarschaft verbunden zu sein (Scannell, Blakemore et al. 1995).

Für das Protomap-Modell gibt es immer mehr auch genetische Hinweise (Grove and Fukuchi-Shimogori 2003). Mäuse, denen der Transkriptionsfaktor *Gbx2* fehlt, bilden die thalamo-corticalen Projektionen nicht aus, dennoch entstehen wohldefinierte Genexpressionsdomänen (z.B. markiert durch *Cadherin6*, *Id2* = *Inhibitor of differentiation 2*, *EphrinA-7* und *RZR-β* = *retinoid Z receptor β*) (Miyashita-Lin, Hevner et al. 1999). Ähnliche Beobachtungen wurden bei Mäusen gemacht, die nicht den Transkriptionsfaktor *Mash-1* besitzen (Nakagawa, Johnson et al. 1999).

Das Protomap-Modell wirft die Frage nach den molekularen Ursachen für die Ausbildung der regionspezifischen Identitäten auf, wenn diese nicht durch die thalamischen Afferenzen induziert werden sollen. Hierzu konnten **Signalzentren** identifiziert werden, die den Cortex mit Morphogen-Gradienten entlang der anterior-posterioren und medial-lateralen Achse überspannen. *Fgf8* (*Fibroblast Growth Factor*) wird in dem anterioren (rostralen) Zentrum ANR (anteriore Neuralleiste) sekretiert. Experimentelle Überexpression von *Fgf8* führt zu einer Verschiebung der corticalen Areale, indem nahe liegende sich erweitern und entferntere schrumpfen (Fukuchi-Shimogori and Grove 2001). Neben ANR gibt es ein zweites Signalzentrum mit sozusagen orthogonalen Gradienten von *Bmp*- und *Wnt*-Proteinen, die von einer Position am medialen Rand des Cortex zwischen dem Hippocampus und Plexus choroideus ausgehen, der „cortical hem“ (corticaler Saum) bezeichnet wird. Grundlage dieses Signalzentrums ist der Transkriptionsfaktor *Gli3*, Ortholog des *Drosophila melanogaster*-Gens "*cubitus interruptus*" (*Ci*). Es reguliert bei *Drosophila* die Expression von *Wingless* (Von Ohlen and Hooper 1997). Einer natürlichen *Gli3*-Mutante in Mäusen fehlt das „cortical hem“ (Grove, Tole et al. 1998).

Verlust des *Bmp-Rezeptors 1a* (*Bmpr1a*) führt zu Reduktion des Plexus choroideus. Demgegenüber führt Expression von konstitutiv aktivem *Bmpr1a* zu einer Ausdehnung des choroidalen Plexus und einer Reduktion des cerebralen Kortex (Panchision, Pickel et al. 2001). In *Wnt3a*-defizienten Mäusen fehlt die Hippocampusformation fast ganz. Es wird davon ausgegangen, dass *Wnt*-Signale nicht die Spezifizierung der hippocampalen Identität, sondern die Expansion eines bereits vorliegenden Hippocampusprimordiums bewirken (Galceran, Miyashita-Lin et al. 2000).

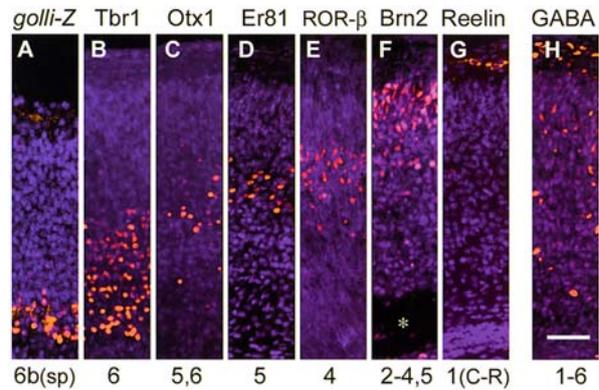


Abbildung 7: Gene mit spezifischer Expression in corticalen Schichten. Defekte im *Reelin*-Gen führen zu einer Inversion der Schichtung des Cortex mit den äußeren Schichten dann innen, da das von den Cajal-Retzius-Zellen der obersten so genannten Marginalzone sekretierte *Reelin*-Protein ein Stop-Signal für wandernde Neuroblasten darstellt und diese von den radialen Gliazellen ablösen lässt, um Dendriten zu bilden und sich zu differenzieren. (Bildquelle: Prof. Dr. Magdalena Götz, München)

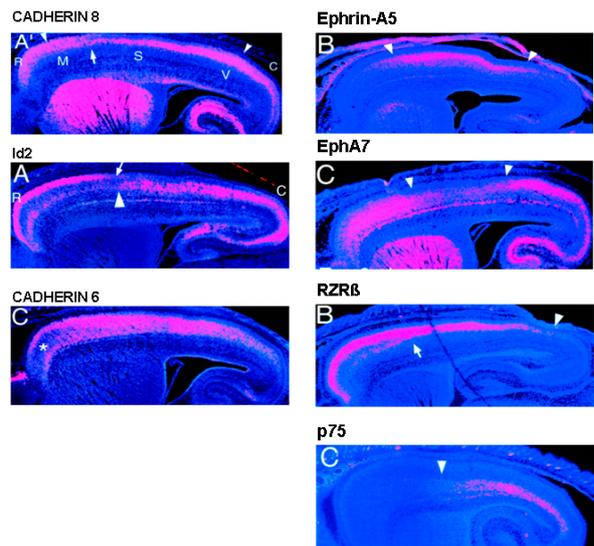


Abbildung 8: Markergene mit spezifischer Expression in bestimmten Schichten des Cortex sowie unterschiedlichen Regionen, die sich unabhängig von thalamischen Innervationen exprimieren (Bishop, Rubenstein et al. 2002).

Sonic hedgehog (shh) wird im medial-ventralen Bereich des Telencephalons exprimiert und gilt als sekretiertes Signalmolekül zur medial-ventralen Musterbildung im Telencephalon. Ein Verlust von *shh* bei Mäusen führt zu Holoprosencephalie (Chiang, Litingtung et al. 1996), eine Missbildung des Gehirns, die durch eine fehlende Aufspaltung des Telencephalons in der Mitte in zwei Hemisphären gekennzeichnet ist.

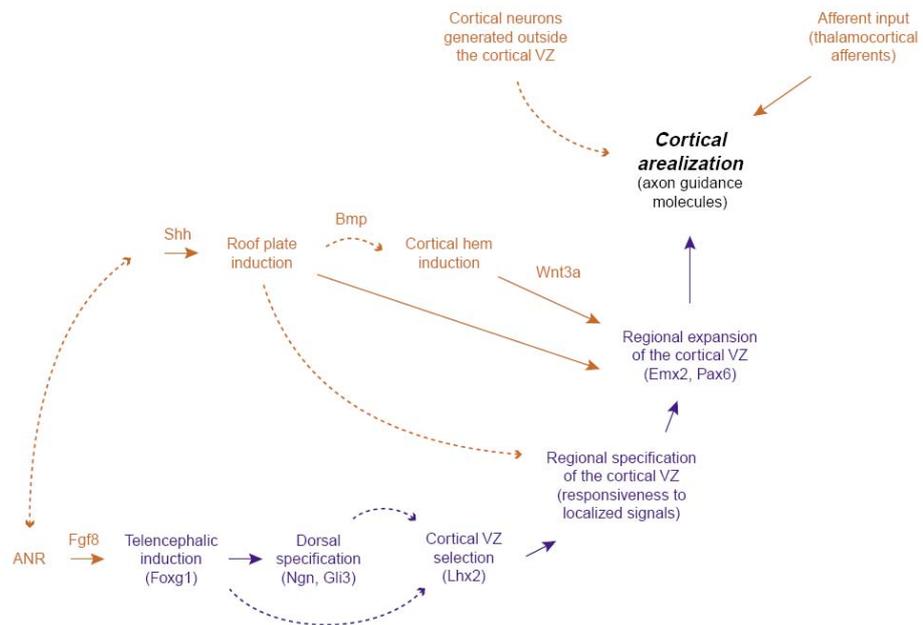


Abbildung 9: Übersicht der wichtigsten bisher bekannten Signalzentren und Signalwege für die Cortex-Regionalisierung (Walsh 2001) wie sie im Text besprochen werden.

Die unterschiedlichen Morphogenkonzentrationen bewirken regionale Expression von Transkriptionsfaktoren und deren "downstream"-Genen, wodurch die lokale regionenspezifische Differenzierung der Gewebe umgesetzt wird.

Der Homeobox-Transkriptionsfaktor *Emx2* (Ortholog des *Drosophilagens* "empty spiracles") und der Paired-Homeobox Transkriptionsfaktor *Pax6* wirken in gegenläufigen Gradienten entlang der anterior-posterioren-Achse des Cortex. *Emx2* kommt in der corticalen Ventrikulärzone in einem caudomedialen nach rostralateralen Gradienten vor (Mallamaci, Iannone et al. 1998), wogegen der Gradient von *Pax6* entgegengesetzt verläuft (Stoykova and Gruss 1994). Verlust von *Pax6* führt zu einer Verschiebung corticaler Areale nach rostral, während *Emx2*-Defizienz einen gegensätzlichen Effekt zeigt (Bishop, Rubenstein et al. 2002). Beide Gene spielen eine entscheidende Rolle für die Regionalisierung des Cortex entlang der anterior-posterioren Achse.

Die Gradienten von *Pax6* und *Emx2* scheinen zum einen auf Signalmoleküle aus den Signalzentren zurückzuführen zu sein, wechselwirken allerdings auch selber auf die Ausbildung von Signalzentren zurück. So konnte gezeigt werden, dass einerseits *Fgf8* die Expression von *Emx2* herunterreguliert, was den Abfall des Gradienten zum anterioren Pol in Richtung des ANR-Signalzentrums erklärt, andererseits aber *Emx2* die *Fgf8*-Quelle selber auf den anterioren Pol der Hirnanlage beschränkt. Von beiden Interaktionen wird die letztere als primär angesehen, d. h. *Emx2*

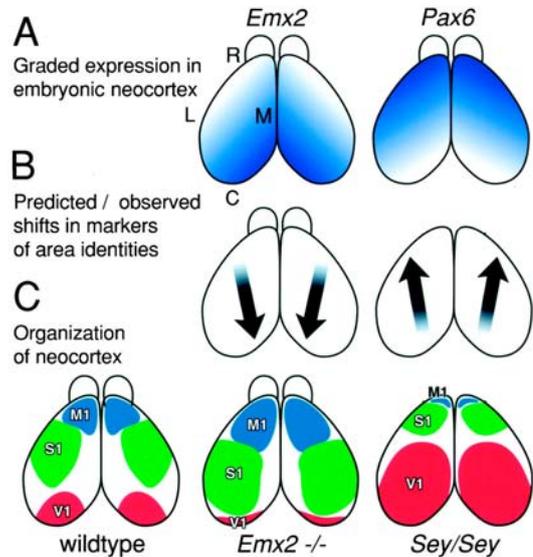


Abbildung 10: Graduelle Expression von entwicklungsbiologischen Schlüsselgenen des Cortex. Wegfall der Genexpression führt zu Verschiebungen der Expressionen nachgeschalteter Gene und schließlich zu verschobenen Positionen und Ausdehnungen der funktionellen corticalen Regionen (Bishop, Rubenstein et al. 2002).

Die Gradienten von *Pax6* und *Emx2* scheinen zum einen auf Signalmoleküle aus den Signalzentren zurückzuführen zu sein, wechselwirken allerdings auch selber auf die Ausbildung von Signalzentren zurück. So konnte gezeigt werden, dass einerseits *Fgf8* die Expression von *Emx2* herunterreguliert, was den Abfall des Gradienten zum anterioren Pol in Richtung des ANR-Signalzentrums erklärt, andererseits aber *Emx2* die *Fgf8*-Quelle selber auf den anterioren Pol der Hirnanlage beschränkt. Von beiden Interaktionen wird die letztere als primär angesehen, d. h. *Emx2*

reguliert die Etablierung des *Fgf8*-exprimierenden anterioren Signalzentrums (Fukuchi-Shimogori and Grove 2003). Neben der Regionalisierung entlang der anterior-posterioren Achse spielt *Emx2* eine wichtige Rolle für die Ausprägung medialer Hirnstrukturen. *Emx2*-defiziente Mäuse bilden nur ansatzweise einen Gyrus dentatus aus (Tole, Goudreau et al. 2000). Im medialen Cortex scheint *Emx2* dem dortigen Signalzentrum „cortical hem“ untergeordnet und von den *Bmp*- und *Wnt*-Signalen abhängig zu sein. *Emx2*-Expression fehlt in der *Gli3*-Mutante, welche kein „cortical hem“-Signalzentrum ausbildet (Theil, Aydin et al. 2002).

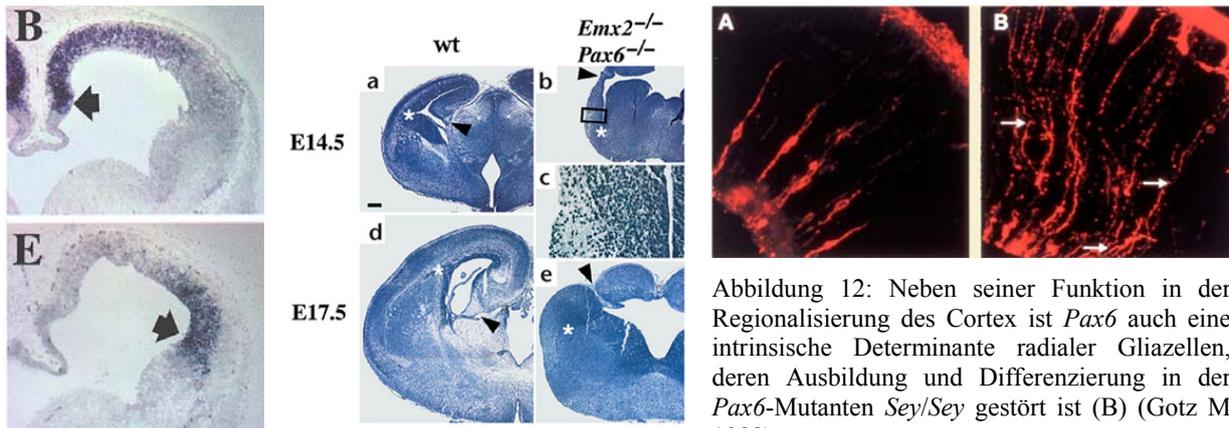


Abbildung 11: **Doppelmutanten von *Emx2* (B) und *Pax6* (E) entwickeln überhaupt keinen Cortex.** Die Vorläuferzellen des Cortex bleiben auf der Ebene der Vorläuferzellen für die Basalganglien stehen (Muzio, DiBenedetto et al. 2002).

Abbildung 12: Neben seiner Funktion in der Regionalisierung des Cortex ist *Pax6* auch eine intrinsische Determinante radialer Gliazellen, deren Ausbildung und Differenzierung in der *Pax6*-Mutanten *Sey/Sey* gestört ist (B) (Gotz M 1998).

Die Neurone in den 6 Schichten des Cortex sind morphologisch einheitlich gestaltet. Man unterscheidet nur 2 Typen von Zellen. Pyramidenzellen (Golgi Typ I Neurone) und deren leichte Modifizierungen auf der einen Seite sind von dreieckiger Gestalt (pyramidenförmig) und haben ein Axon, das seine Rindenregion verlässt, um in andere Rindenbereiche oder subcorticale Zonen zu projizieren. Auf der anderen Seite sind nicht-pyramidale Neurone (Golgi Typ II Neurone) ausschließlich innerhalb der eigenen Rindenregion verknüpft, wirken als Interneurone und verlassen das Rindengebiet nicht.

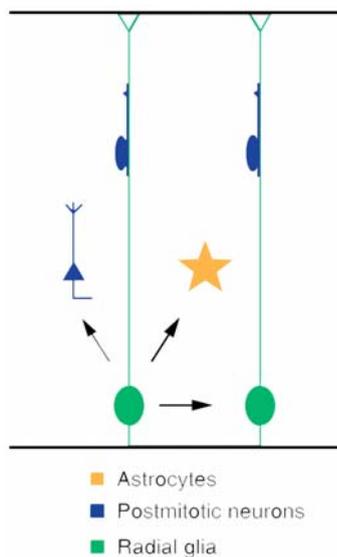


Abbildung 13: Radiale Gliazellen sind im sich entwickelnden ZNS ubiquitär und leiten die wandernden Neurone. Darüber hinaus sind sie die Vorläuferzellen von Astrozyten und vermögen auch Neurone zu bilden, was nicht mehr geht in *Pax6*-Mutanten. In den entsprechenden Cortices finden sich nur noch halb so viele Neurone wie bei intakter *Pax6*-Funktion. Diese anderen Neurone entstammen anderen neuronalen Stammzellen, die durch *Pax6* nicht beeinflusst werden. Zwar gehen sie auch aus radialen Gliazellen hervor, jedoch unter Herunterregulation von *Pax6* und Hochregulation des T-Domänen-Transkriptionsfaktors *Tbr2*. Der Ursprung der radialen Gliazellen lässt sich auf embryonale Stammzellen zurückführen, die durch Retinsäure zur Differenzierung veranlasst werden (Liour SS 2006), (Englund C 2005).

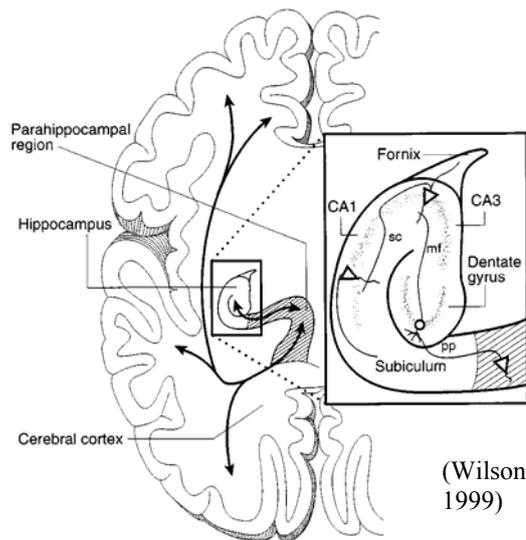
Transplantationsexperimente von einem corticalen Gebiet zu einem anderen in frühen Stadien der Entwicklung offenbaren eine hohe Plastizität des corticalen Gewebes, welches sich an die Aufgaben der Zielregion anpassen kann (O'Leary, Schlaggar et al. 1992). Dabei zeigen die mit der Verarbeitung von primären sensorischen Daten beschäftigten Cortexregionen (z.B. visueller, auditorischer Cortex) eine

frühere und stärkere Spezialisierung und weniger Plastizität für andere Aufgaben als dies beim frontalen und parietalen Cortex der Fall ist.

Die Verbindungen zwischen Cortexarealen werden früh während der Entwicklung festgelegt, währenddessen sich die intracorticalen Verknüpfungen besonders mit den ersten Umwelterfahrungen ausprägen und innerhalb einer speziesspezifischen kritischen Phase von Tagen, Wochen (z.B. Katzen) oder Jahren (Mensch) für den Rest des Lebens manifestieren. Allerdings bleiben diese Verknüpfungen auch danach unter dynamischen Veränderungen durch Umwelterfahrungen, Erwartungen und Verhaltenskontexten, was sich morphologisch anhand von neuen Axonspaltungen und Synaptogenese niederschlägt, lassen sich jedoch nicht mehr so vollständig neu arrangieren wie in der kritischen Phase. Als Beispiel soll hier das Erlernen eines Dialektes in der Sprache oder die Entwicklung von Augendominanz genannt sein (Hubel, Wiesel et al. 1977).

Jedes Gebiet des sensorischen Cortex besitzt eine Repräsentation der sensorischen Oberfläche auf der Cortexoberfläche. So hat der somatosensorische Cortex eine Repräsentation des Körpers (Somatotopie), der auditorische Cortex von der Cochlea (Tonotopie), der visuelle Cortex von der Retina (Visutopie). Diese Organisation ist abhängig von sensorischer Stimulation. Denn fehlt diese, wie beispielsweise bei einer Amputation oder Läsion in der Retina, so verändern die nicht mehr benötigten korrespondierenden corticalen Areale ihre Repräsentation und übernehmen Aufgaben der bisher umliegenden Gebiete. Diese Plastizität ist auch eine Ursache für die Möglichkeit einer begrenzten Genesung nach einem Schlaganfall, indem umliegende corticale Areale die Funktionen des ausgefallenen übernehmen. So kommt es innerhalb von Monaten oder Jahren zu topologischen Verschiebungen von bis zu einem Zentimeter innerhalb des Cortexgewebes.

Eine zentrale Struktur für die insbesondere durch Lernen bedingte Plastizität des Cortex ist der **Hippocampus**. Er ist eine **Konvergenzstelle für die Outputs von vielen corticalen Arealen** und verfügt über ebensolche Rückprojektionen. Dabei erreichen die Projektionen aus den Cortexgebieten zunächst die parahippocampale Region mit dem perirhinalen, parahippocampalen und entorhinalen Cortex (Burwell, Witter et al. 1995), die dann zum Hippocampus selber weiterleiten. Der Hauptfluss von Information durch den Hippocampus erfolgt über serielle Verbindungen vom Gyrus dentatus zu der Region CA3 und von CA3 zu CA1 und weiter zum Subiculum (Witter, Van Hoesen et al. 1989). Hierbei finden insbesondere im Bereich CA3 Dissoziationen und Assoziationen der verschiedenen Inputstränge statt. Vom Subiculum wie auch zu kleinerem Teil von CA1 erfolgt Rückprojektion zu der parahippocampalen Region und von da weiter zu den neocortischen und olfaktorischen Arealen, die Ausgangspunkte des Inputs waren.



(Wilson 1999)

Die Bildung von neuen Assoziationen ist insbesondere in den Bereichen CA1 und Gyrus dentatus anhand synaptischer Plastizität und durch Langzeitpotenzierung erforscht. Amnesien, die durch Ausfall des Hippocampus bedingt sind, verhindern die Bildung neuer Gedächtnisinhalte, wohingegen der Abruf von bereits bestehenden nicht gestört ist und auch das Kurzzeitgedächtnis funktioniert. Daher nimmt man an, dass der Hippocampus die Festlegung von Langzeitgedächtnis aus den Inhalten des Kurzzeitgedächtnisses bewirkt. Das eher unbewusst ablaufende Erlernen von Bewegungsabläufen oder Konditionierung hingegen wird davon nicht beeinflusst. Londoner Taxifahrer, die in ihrem Beruf den Stadtplan auswendig lernen müssen, um eine Lizenz zu bekommen, haben nachgewiesenermaßen einen vergrößerten Hippocampus.

Im Cortex besitzt der Hippocampus folglich eine zentrale hierarchische Stellung hinsichtlich der Informationsverarbeitung, Speicherung und multimodalen Assoziation gegenüber anderen corticalen Gebieten.

Neben dem Hippocampus ist die Amygdala ein weiteres Konvergenzgebiet von Projektionen aus vielen corticalen Gebieten und unterhält selber weitere Verbindungen zum Thalamus, Hypothalamus, Striatum und Hirnstammgebieten. Die Amygdala gehört selber nicht mehr zum Cortex, sondern zu den Basalganglien, liegt aber dem Hippocampus an. Die Amygdala ist also ähnlich wie der Hippocampus zentral für den Eingang von sensorischen Informationen aus corticalen Gebieten und dem Thalamus positioniert. Ihre Funktion ist es, diese emotional zu bewerten und in Folge dessen Reaktionen und grundlegende Verhalten auszulösen, insbesondere Angst und Flucht. Ratten mit entfernter Amygdala zeigen keinerlei solche Angstverhalten mehr und scheinen keine Angst mehr zu haben.

Ziel in dieser Doktorarbeit und des gesamten Cortex-Projektes der übrigen Arbeitsgruppe war es, neue Gene zu finden, die spezifisch für die unterschiedlichen Cortexregionen sind und für diese Spezifizierung während der Entwicklung eine Rolle spielen oder für die Aufrechterhaltung der Funktion in späteren Stadien. Es wird in dem Diskussionskapitel interessant sein, die gefundenen Ergebnisse mit den hier aus der Einleitung dargelegten bisher bekannten Fakten über die Cortexentwicklung zu vergleichen und zu sehen, ob sich bei den gefundenen Genen auch eine Hierarchie der corticalen Regionen oder eine Sonderstellung bestimmter Strukturen wie dem Hippocampus widerspiegelt.

Die nächsten beiden Kapitel der Einleitung betrachten Gemeinsamkeiten bei der Entwicklung von Nervensystem und Blutgefäßsystem wie sie in den letzten Jahren festgestellt wurden. In dem Ergebnis- und Diskussionsteil der hier vorliegenden Arbeit wurde ein neues Gen genauer beschrieben, das ebenso im Cortex wie aber auch in Blutgefäßen vorkommt, so dass es sinnvoll für das spätere Verständnis ist, sich einen kurzen Überblick über Parallelen des Nervensystems zum Blutgefäßsystem zu verschaffen, so dass die spätere Diskussion vor diesem Hintergrund erfolgen kann.

Gemeinsamkeiten in der Entwicklung von Nerven und Blutgefäßen

Blutgefäße und Nerven sind beide lebenswichtige Kanäle von und zu den Geweben. Neueste Beobachtungen zeigen, dass sie weit mehr gemeinsam haben als bisher angenommen wurde. So benutzen sie ähnliche Prinzipien und bestimmte Signalmoleküle für die Differenzierung, Wachstum und Navigation zu ihren Zielgebieten. Es findet sogar eine wechselseitige Kommunikation statt. Die Wiederverwendung genetischer Pfade ist ein effektiver Mechanismus in der Evolution. Diese molekularen Vorgänge wurden bisher besser für das Nervensystem charakterisiert und erst in den letzten Jahren auch als bedeutsam für das Blutgefäßsystem erkannt. Ein zentrales Beispiel für diesen „Dual-Use“ ist das sekretierte Signalprotein *VEGF*, das zuerst nach seiner Funktion im Blutgefäßsystem als *Vascular Endothelial Growth Factor* bezeichnet wurde. Jedoch finden sich seine Rezeptoren auch auf vielen Nerven und dort hat es neuroprotektive Einflüsse oder kann Axonenwachstum steuern. In der subventrikulären und subgranulären Zone des hippocampalen Gyrus dentatus ist es notwendig für die durch Übung angeregte Neubildung von Neuronen unter Vermittlung des Rezeptors *VEGF-R2*. Über den gleichen Pfad vermittelt es Resistenz der Neurone gegenüber von Glutamat induzierter Toxizität. Alzheimerpatienten weisen Abnormalitäten der Gefäße auf und *VEGF*-Konzentration ist in deren Cerebrospinalflüssigkeit erhöht. Ein Mangel an ausreichender adulter Neurogenese bei Alzheimer, Parkinson und Huntington-Krankheit könnte durch *VEGF* bzw. deren Rezeptoren beeinflusst sein.

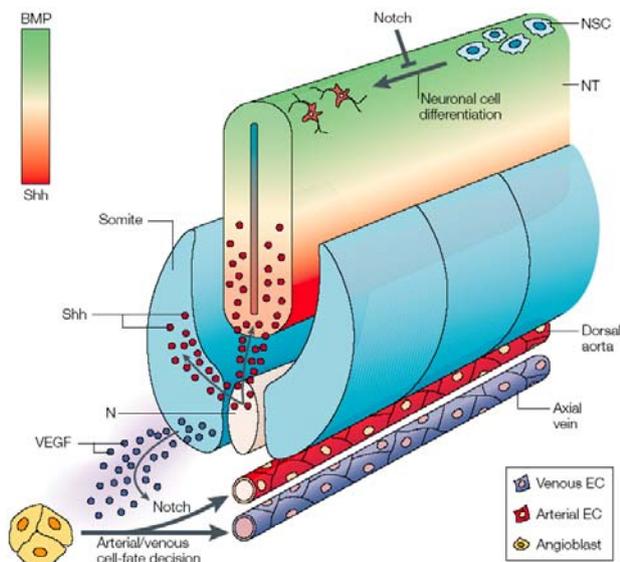


Abbildung 15: Die Entwicklung der dorsalen Aorta wird induziert durch Signale von Zellen in dem Neuralrohr. Diese bewirken Gefäßbildung durch **Vascularisation**, die Neuformung von Gefäßröhren aus freien Vorläuferzellen. Im Neuralrohr bewirkt laterale Inhibition von *Notch* den Erhalt neuroektodermaler Stammzellen (NSC). Geringe *Notch*-Konzentration erlaubt hingegen die Differenzierung zu Neuronen. Gradienten von *Sonic Hedgehog* (*Shh*) und *Bmp* (*Bone morphogenic protein*) bestimmen ventrale zu dorsale Identität der Neurone. *Shh* veranlasst die Somiten zur Sekretion von *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*), welches die Vascularisierung der Vorläuferzellen zu arteriellen Endothelzellen auf Kosten venöser Endothelzellen verursacht, so dass die dorsale Aorta an dem Notochord und Neuralrohr anliegt, während die axiale Vene davon weiter entfernt ventral entsteht. Die Unterscheidung der beiden Zelltypen wird wieder durch *Notch* sichergestellt. (Carmeliet 2003)

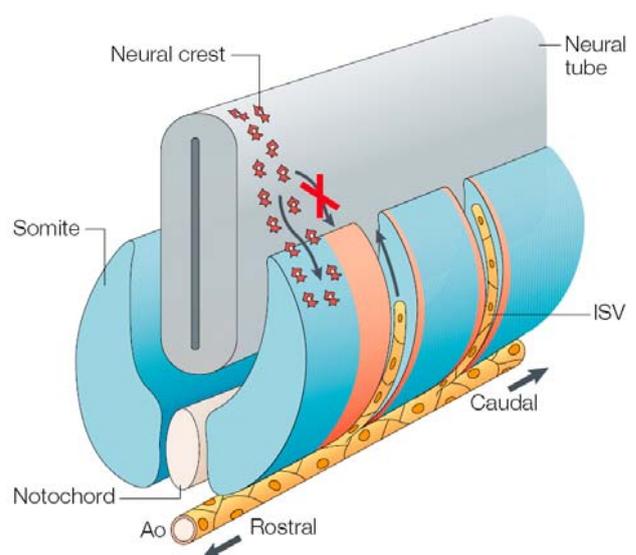


Abbildung 14: Nach der initialen Vascularisation der Hauptgefäße entwickelt sich das Blutgefäßsystem vornehmlich durch **Angiogenese** weiter, indem kleinere Gefäße absprossen. Dies geschieht bei der dorsalen Aorta in regelmäßigen Abständen zwischen den Somiten, wobei die Leitung der Wachstumsrichtung durch die intersomitischen Zwischenräume mittels der Signalmoleküle und -Rezeptoren *EphB/ephrin-B* erfolgt. Diese bewirken eine Abstoßung, so dass kein Einwachsen in die Somiten selber passiert. Das gleiche Signalsystem wirkt analog auf wandernde neuronale Zellen, die vom Neuralrohr in die Bereiche der Somiten einwandern, in denen keine repulsive *EphB/ephrin-B* Interaktion stattfindet. (Carmeliet 2003)

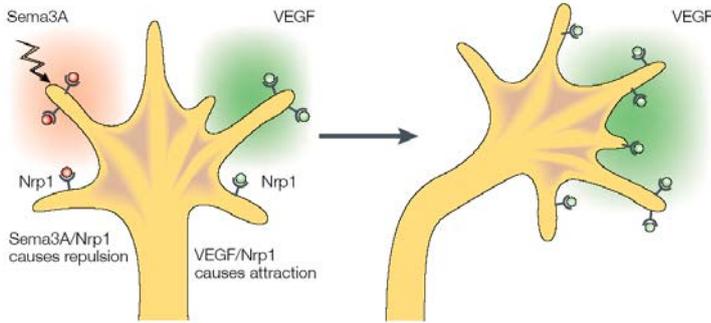


Abbildung 17: Das Semaphorin *Sema3A* und *VEGF* sind sekretierte Leitungsfaktoren auf sowohl Wachstumskegel von Nervenendungen als auch sprossenden Gefäßenden. Diese verfügen über die jeweiligen Rezeptoren wie *Neuropilin-1*. Dabei wirken *Sema3A* und *VEGF* konzentriert mit umgekehrten Vorzeichen, während die einen abstoßen, locken die anderen in ihre Richtung (oben). Wachsende Nerven und Gefäße können miteinander kommunizieren und sich gegenseitig leiten (rechts). a: *Artemin (ARTN)* ist ein neurotropisches Leitungssignal, das von den glatten Muskelzellen der Arterien gebildet wird und sympathische Nerven zur Verfolgung des durch das Gefäß vorgegebenen Pfades in das Zielgewebe veranlasst. b: *VEGF* wird von Schwann-Zellen um Nerven sekretiert und wirkt als Leitungssignal auf kleine Arterien, nicht jedoch auf Venen, um den Nerven zu folgen. (Carmeliet 2003)

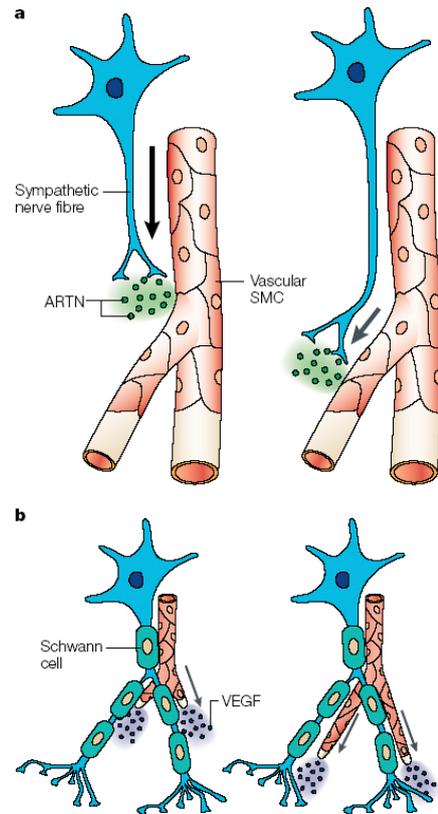
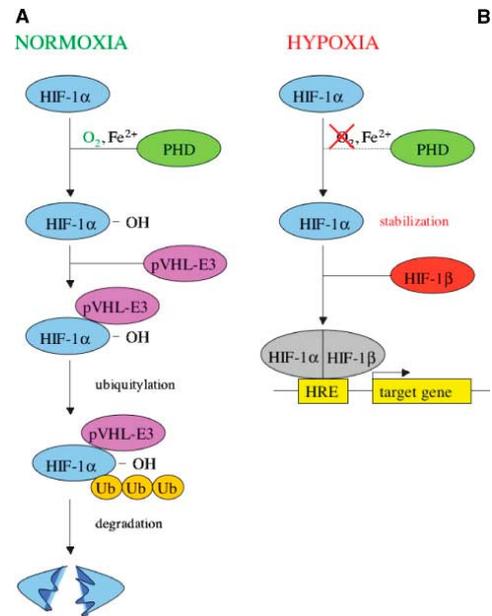


Abbildung 16: *VEGF* steht unter Kontrolle des von Sauerstoff abhängigen Transkriptionsfaktors *HIF (Hypoxia inducible factor)*, der *VEGF* in Geweben freisetzt, sobald diese unter Sauerstoffmangel leiden damit neue Gefäße hineinwachsen und die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen wieder sicherstellen. Dieser Prozess kommt während des Wachstums von Geweben in der Entwicklung und auch bei der Tumorbildung im Erwachsenen im Besonderen vor. Unter normoxischen Bedingungen (A) herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Proteinsynthese von der Isoform *HIF-1α* und seinem Abbau durch das Enzym *Prolinhydroxylase (PHD)*, welche mit dem Kosubstrat O_2 und dem Kofaktor Fe^{2+} Prolin-Reste am *HIF-1α* hydroxyliert. Diese dienen der E3-Ubiquitinligase *pVHL (Von-Hippel-Lindau-Faktor)* als Erkennung für die Ubiquitinierung von *HIF-1α*, welches zu dessen Degradation im Proteasom führt. Fehlt der Sauerstoff im Zustand der Hypoxie (B), so kann die Prolinhydroxylierung nicht mehr stattfinden und das Gleichgewicht der *HIF-1α*-Konzentration wird aufgrund der weiter ablaufenden Neusynthese zu mehr *HIF-1α* verschoben. Dieses kann dann mit einer anderen Isoform (*HIF-1β*) dimerisieren und in dieser Form an Promotoren für Zielgene binden, worunter insbesondere *VEGF* gehört.



Der ganze Pfad fungiert schließlich als Sauerstoff-Sensor für die Regulierung des Ausmaßes der Angiogenese. Wachstumsfaktoren wie *IGF* und *TGF* können die Synthese von *HIF-1α* direkt steuern und so unabhängig vom Sauerstoff wirken bzw. das Gleichgewicht verschieben. (Erik Storkebaum 2004), (Ji-Won Lee 2004)

Anatomie des Blutgefäßsystems in der Embryonalentwicklung

Gab der vorherige Abschnitt Einblick in die grundlegenden molekularen Mechanismen zur Ausbildung des Blutgefäßsystems, so soll hier eine **Übersicht über die makroskopische Anatomie der Gefäßbildung** während der Embryogenese gegeben werden.

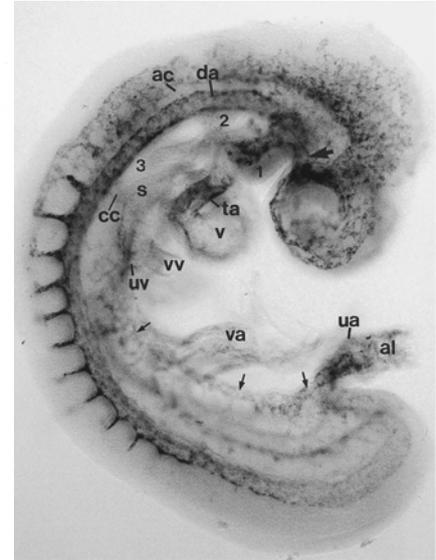
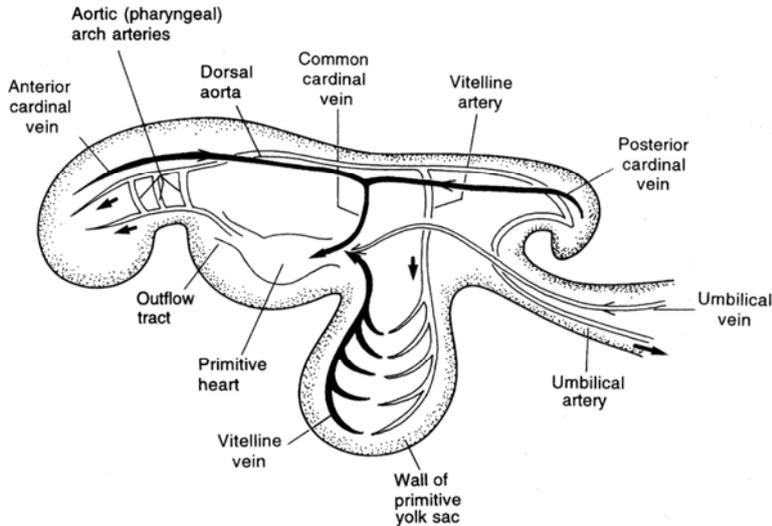


Abbildung 19: **Übersicht des Gefäßsystems** nach Beginn der einfachen Zirkulation über das Herz **zum Stadium E8.5**. Die dorsale Aorta ist im anterioren und posterioren Bereich paarweise angelegt, im mittleren Bereich zu einem einzigen Gefäß fusioniert. Sie geht in die umbilicale Arterie über, die desoxygeniertes Blut zur Placenta transportiert. Umgekehrt versorgt die umbilicale Vene den Embryo mit frischem, oxygeniertem Blut und mündet im Herzen. Aus diesem gelangt das Blut in die Aortic Arch Arterien, die sich später zu den carotid Arterien des Kopfes weiterentwickeln. (M.H. Kaufman 1999)

Abbildung 18: In diesem Mausembryo des Stadiums **E9** ist mRNA des Gens **CD34** durch in-situ-Hybridisierung gefärbt. Deutliche Expression ist in der **dorsalen Aorta (da)** zu erkennen, die in die umbilicale Arterie (**ua**) übergeht. **CD34** ist ein zelloberflächen Glykoprotein, das im haemato-poetischen System auf Vorläufer- und Stammzellen exprimiert ist, die über Vasculogenese die ersten Gefäße wie dorsale Aorta bilden und danach Angiogenese betreiben. Starke Expression auch im Truncus arteriosus (**ta**) und der ersten Aortic Arch Arterie (1), allerdings weniger oder keine Expression in der zweiten und dritten Aortic Arch Arterie (2, 3). Nur geringe oder keine Expression von **CD34** auf Gefäßen, die durch Koaleszenz gebildet werden, wie die cardinalen Venen, umbilicale Vene (**uv**, Pfeile), anteriore cardinale Vene (**ac**), common cardinal vein (**cc**), vitelline vein (**vv**), sinus venosus (**s**) (Heather B. Wood 1997).

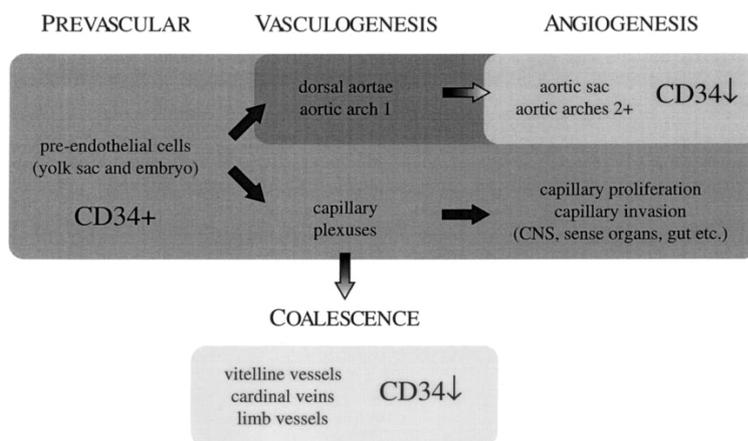


Abbildung 20: Es gibt **drei Hauptarten, nach denen Blutgefäße gebildet werden**. **Vaskularisierung** ist die Neuformung von Röhren aus freien Vorläuferzellen, so wie bei der Bildung der dorsalen Aorta. **Angiogenese** ist die Aussprossung kleinerer Gefäße wie Arterien und Arteriolen von den bestehenden größeren Gefäßen. Umgekehrt ist **Koaleszenz** die Verschmelzung kleinerer Gefäße, insbesondere Kapillaren, zu größeren, zumeist Venen. (Heather B. Wood 1997)

Arterien verkleinern sich im Durchmesser je weiter sie sich vom Herzen entfernen. Schließlich enden sie in Kapillaren, die nur noch einzelne Erythrozyten nacheinander durchlassen. Mit der Abnahme des Durchmessers verkleinert sich auch der Blutdruck. Venen bilden sich durch Verschmelzung aus Kapillaren und beinhalten ebenfalls Blut unter geringem Druck, so dass ihre Wände wesentlich dünner sind als die der großen Arterien, die hohem Druck standhalten müssen.

Es gibt Krankheiten wie Arterio-Venöse-Malformation (AVM), bei denen Arterien in großer Zahl direkt ohne ein Kapillarnetz in Venen übergehen, so dass diese sogleich mit einem hohen Druck konfrontiert werden, was zu Aussackungen (Aneurismen) und Platzungen führen kann, die zu Haemorrhagien führen, zudem zu einer Unterversorgung der Gewebe, die weniger Blut für ihre Kapillarnetze abbekommen.

Ein besonders fein regulierter Entwicklungsabschnitt des Blutgefäßsystems ist die **Entwicklung des Aortenbogens** (Aortic Arch) am Herzen, die in zwei Phasen unterteilt wird. Zuerst bilden sich dorsale Aorta und die Arch-Arterien, die in einer zweiten Phase remodelliert werden.

Die dorsale Aorta liegt in diesem Bereich paarweise vor, so wie auch im Abdomen. Dazwischen ist ein fusionierter Bereich, der sich im Laufe der Entwicklung ausdehnt auf Kosten der paarigen Abschnitte.

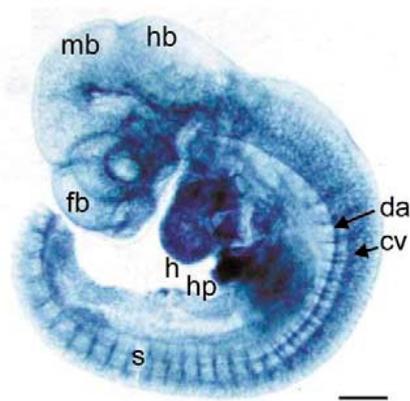


Abbildung 22: Expression des endothelialen Markergens *Endoglin* färbt in diesem E9.5-Embryo nicht nur die dorsale Aorta (*da*), sondern auch die cardinale Vene (*cv*), die das Blut aus den intersomitischen Abzweigungen wieder aufnimmt. (Leon Jonker 2002)

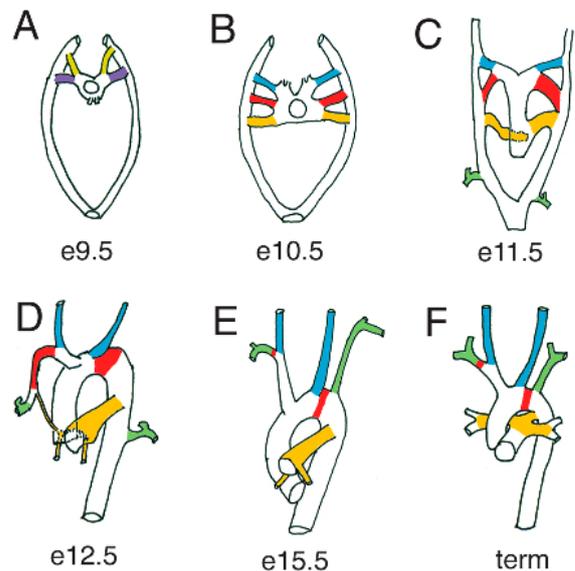


Abbildung 21: Im Stadium E9.5 kommunizieren die erste und zweite Arch-Arterie mit den dorsalen Aortae. Zum Stadium E10.5 verschwinden diese und stattdessen kommunizieren die dritte (blau), vierte (rot) und sechste (gelb) Arch-Arterie mit den dorsalen Aortae. Bei E11.5 vergrößern sich die vierte (rot) und sechste (gelb) Arch-Arterie. Der **Aortenbogen** bildet sich ab E12.5 durch Modellierung der linken dorsalen Aorta mit der linken vierten Arch-Arterie (rot). Im Stadium E15.5 verschwinden die rechte dorsale Aorta und die rechte sechste Arch-Arterie. Aus der sechsten Aortic-Arch-Arterie (gelb) gehen zum Ende die Pulmonal-Arterien hervor, die mit dem Aortenbogen über den Ductus arteriosus botall verbunden sind. Aus der dritten Arch-Arterie sind die Carotis-Arterien hervorgegangen (blau), und die subclavialen Arterien (grün) haben sich nach oben verschoben. (Kiyoshi Iida, Hidefumi Yoshioka et al. 1997)

Ein besonderer Mechanismus der Gefäßbildung liegt der **Entstehung der Herzkranzgefäße** zugrunde. Diese entstehen nicht durch Angiogenese von der Aorta in das Herzgewebe, sondern **durch Vascularisation** von Vorläuferzellen, die von außerhalb in das Herzgewebe eingewandert sind. Erst später erfolgt der Anschluss der neu gebildeten Kranzgefäße an die Aorta.

Abbildung 23: Darstellung der **Migration und Differenzierung von Zellen zur Bildung der Herzkranzgefäße** ausgehend vom pro-epicardialen Organ (PEO) und dem Leber-Parenchym (Robert E. Poelmann 2002).

$\alpha 4$ INT = alpha 4 integrins; bves = blood vessel epicardial substance; EPDC = epicardium-derived cells; FOG-2 = friend of GATA 2; PDGF = platelet-derived growth factor; TGF β = transforming growth factor-beta; RALDH2 = retinoic acid-synthetic enzyme; VCAM = vascular cell adhesion molecule; VEGF = vascular endothelial growth factor.

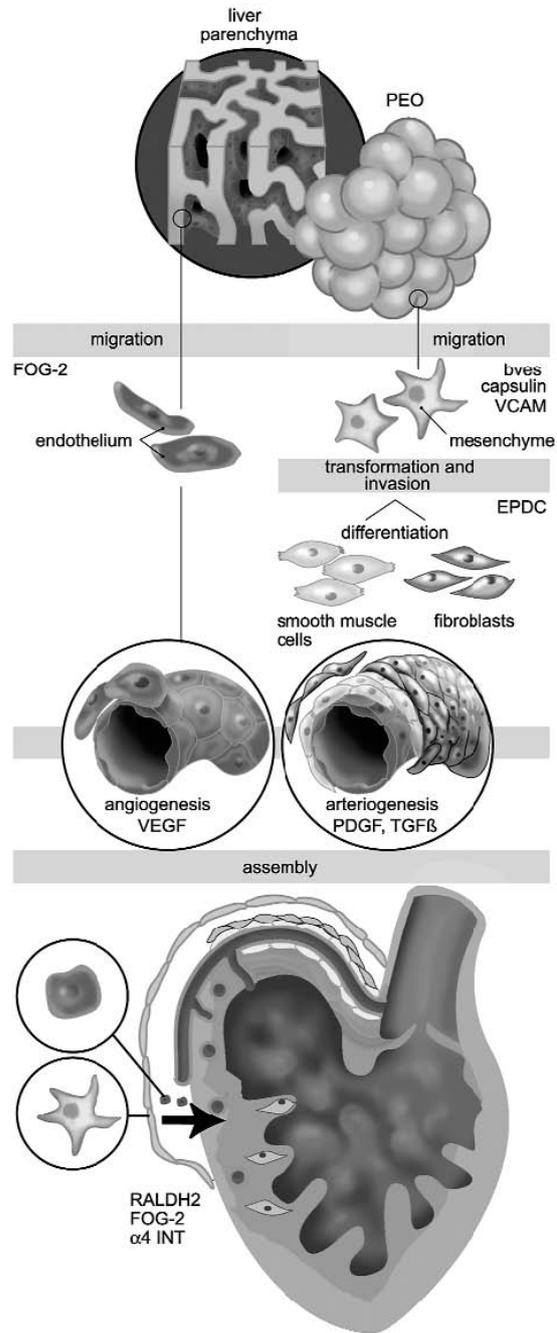
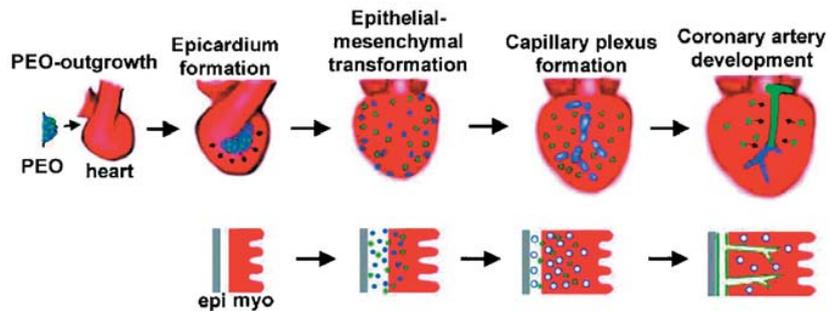


Abbildung 24: Anförmung des pro-epicardialen Organs **PEO** dorsal unterhalb des Herzes mit Antikörper gegen *HNK1*-Protein (Robert E. Poelmann 2002).

Abbildung 25: Der PEO ist ein Auswuchs der dorsalen Körperwand und wächst in Richtung und über den gedrehten Herzschlauch. Das gewanderte Epithel verbreitet sich einschichtig über das Herz und beginnt schließlich mit der **Bildung der Herzkranzgefäße** (Reese DE 2002).



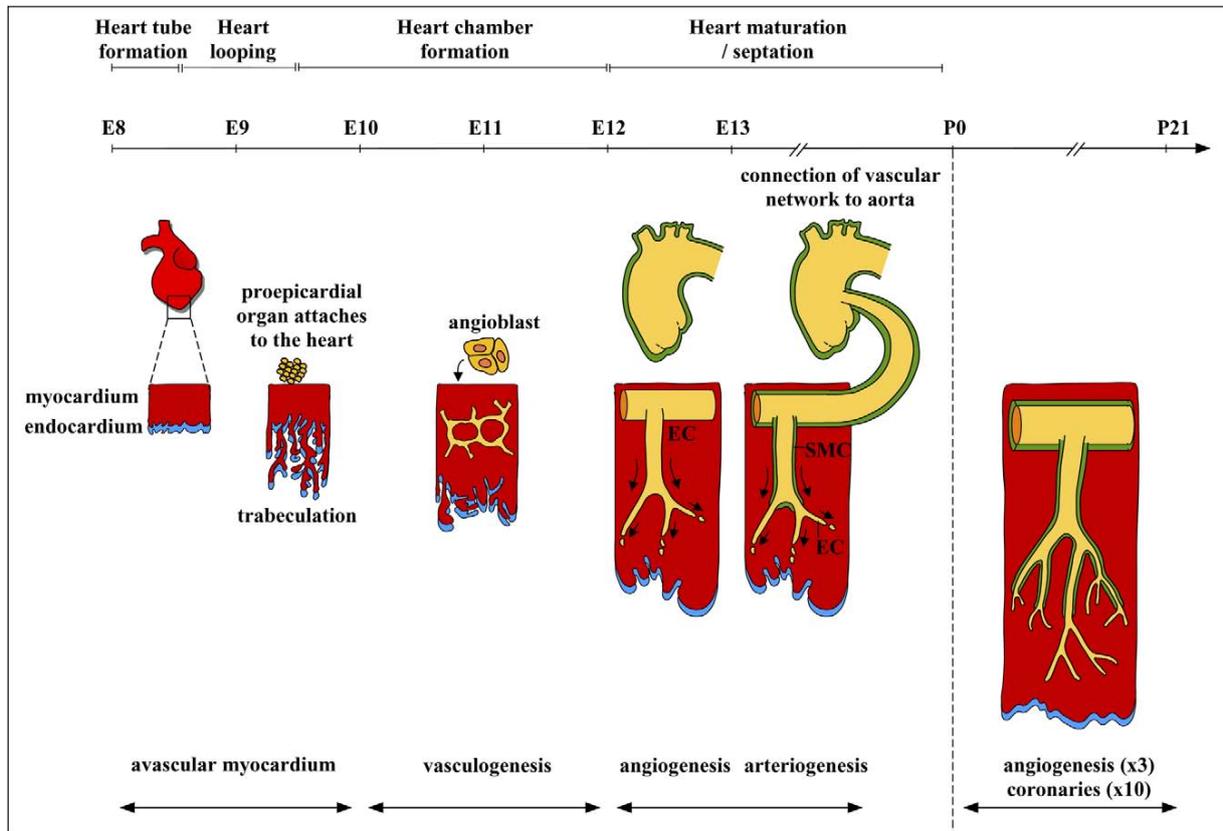
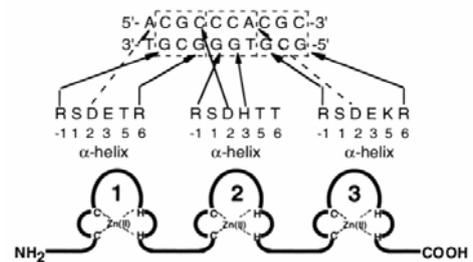
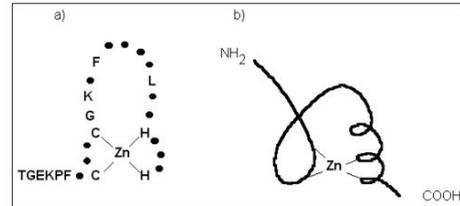


Abbildung 26: **In frühen Stadien** der Mausentwicklung (E8-E11) besteht das Mauserz aus einem die Innenwand auskleidenden Endothel (Endocard), welches von einem **gefäßlosen Myocard** umgeben ist. Die **Sauerstoffversorgung** erfolgt **über Diffusion**. Mit zunehmender Dicke des Myocards bilden sich darin Einfaltungen (Trabeculae) zur Verbesserung der Diffusion. Schließlich beginnen sich Gefäße zu formieren aus den Vorläuferzellen, die vom PEO und dem Leberparenchym in das Herz eingewandert sind und das Epicard ausbilden. Das primitive Gefäßnetz entwickelt sich durch Angiogenese weiter und nimmt ab ca. E13 Kontakt mit der Aorta auf. Ab jetzt werden die Gefäße mit glatten Muskelzellen (SMC) ummantelt (**Arteriogenese**). Nach der Geburt verdreifacht sich das Kapillarnetz im Herzen durch Angiogenese und die Ummantelung von Herzkranzgefäßen mit glatten Muskelzellen verzehnfacht sich. Endothelzellen (EC) (Aernout Lutun 2003).

Allgemeine Eigenschaften der TRIM-Genfamilie

In dieser Arbeit wurde ein Gen der TRIM-Genfamilie näher analysiert, so dass eine kurze Übersicht über Eigenschaften und Hintergründe dieser Gene gegeben werden soll.

Die **TRIM-Genfamilie ist eine der größten Gruppen unter den Zink-Finger-Proteinen**. Die Zink-Finger zählen zu den abundantesten Protein-Superfamilien überhaupt in Säuger-Genomen. Das gemeinsame Strukturmotiv ist dabei der Zink-Finger, wie er 1985 zum ersten Mal in *Xenopus laevis* in dem basalen Transkriptionsfaktor *TFIIIA* für 5S rRNA beschrieben wurde als Domäne mit dem Muster C2H2, d.h. 2 Mal Cystein und 2 Mal Histidin, die ein Zink-Ion tetrahedral koordinieren (Tso, Van Den Berg et al. 1986). Die relativ kleine Domäne besteht aus einer β -Haarnadelschleife gefolgt von einer α -Helix, die durch das Zink-Ion an ihrer Stelle gehalten wird. Mehrere solcher Zink-Finger-Domänen können in den verschiedenen Proteinen aneinandergereiht sein, wobei am Häufigsten 3-5 vorkommen, aber auch zwischen 3 bis 30 bekannt sind. Die Aminosäure-Sequenz TGEKPF ist zwischen zwei Zink-Fingern besonders konserviert und wird auch als HC-Link bezeichnet.



In dem Maus-Transkriptom mit mehr als 20000 proteinkodierenden Transkripten wurden 1573 (7,5%) als Träger des Zink-Finger-Stereotyps erkannt (Ravasi, Huber et al. 2003). Man unterteilt diese in 46 enger miteinander verwandte Zink-Finger-Subtypen. Die allgemeine Eigenschaft der Zink-Finger-Struktur ist dabei die einer Bindedomäne, je nach Subtyp kann es sich dabei um (sequenzspezifische) DNA-, RNA-, Protein- oder Lipidbindung handeln. Derart vielfältig sind auch die Funktionen für die Regulation von Transkription, mRNA-Stabilität und Prozessierung, Protein-Umsatz, insbesondere Abbau. Mutationen mit Defekten führen zu einem breiten Spektrum an Auffälligkeiten während der Entwicklung, Zelldifferenzierung, Tumorsuppression, Apoptose und Immunantwort. Die Varianz wird noch weiter erhöht durch alternatives Splicen, da Zink-Finger-Proteine generell eine modulare Ein-Exon-eine-Protein-domänen-Korrelation aufweisen. Die Evolution konnte hier nicht nur mittels Punktmutationen wirken, sondern insbesondere durch Duplikation ganzer Exons/Domänen mit anschließendem „Exon-Shuffling“ also dem Austausch und der Neukombination mit anderen zu neuen Genen.



Abbildung 27: Grundform des Zink-Finger-Stereotyps und Beispiel wie ein Transkriptionsfaktor mit seinen Zink-Fingern bestimmte DNA-Basen erkennt, wobei eine Domäne mit 3 bp interagiert. Zink-Finger vermögen DNA-Sequenzen asymmetrisch zu erkennen im Gegensatz zu anderen Motiven wie basischen Leucin-Zippern oder Helix-Schleife-Helix. In der Röntgenstrukturanalyse sieht man wie sich die α -Helices in die große Furche der DNA legen (*Zif268*) (Fairall, Schwabe et al. 1993).

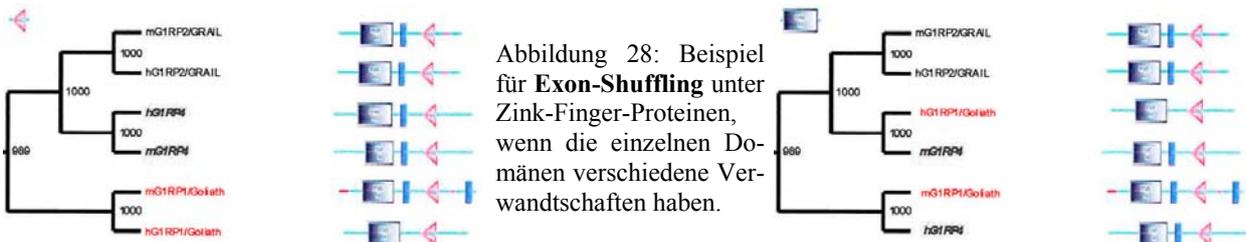


Abbildung 28: Beispiel für **Exon-Shuffling** unter Zink-Finger-Proteinen, wenn die einzelnen Domänen verschiedene Verwandtschaften haben.

Table 2. Frequencies of the Zinc Finger Domains in the Mouse Transcriptome

InterPro	Name	Total in the RTPS	Novel	Homolog to other organisms
IPR00882	C2H2 type	506	126	82
IPR001841	RING finger	196	64	25
IPR001909	KRAB	134	61	22
IPR001781	LIM	60	10	2
IPR001965	PHD finger	52	19	5
IPR002219	Protein kinase C phorbol ester/diacylglycerol binding	46	7	9
IPR001628	C ₂ -type steroid receptor	44	1	0
IPR000315	B-box	37	7	1
IPR000571	C ₂ H2-C ₂ S-C ₂ H type	32	14	3
IPR001878	Koussle, CCHC type	27	13	3
IPR000306	FYVE type	21	7	1
IPR003604	U1-like	20	8	1
IPR001164	GCS-type	18	4	4
IPR001876	Ran-binding protein	17	2	3
IPR001594	DRHC type	17	13	2
IPR002893	MYND type	14	5	3
IPR001379	GATA type	12	0	1
IPR000433	ZZ type	12	2	0
IPR001293	TRAF type	9	1	1
IPR001562	Tec/Btk domain	9	1	0
IPR000058	AN1-like	7	2	0
IPR004217	Tim10/DDP type	6	2	3
IPR002857	CXXC type	6	2	0
IPR003000	Silent information regulator protein Sir2	5	0	4
IPR002653	A2S-like	4	0	0
IPR004181	MZ type	4	0	0
IPR003957	Histone-like transcription factor	4	0	0
IPR001275	DNA DNA-binding	3	2	0
IPR004198	C3HC2 type	3	0	0
IPR002515	C2HC type	3	0	1
IPR001126	Zn-finger (putative), N-recogin	3	1	0
IPR003079	Nuclear receptor ROR	3	1	0
IPR003655	KRAB-related	3	3	0
IPR001510	NAD ⁺ ADP-ribosyltransferase	2	2	0
IPR000380	Prokaryotic DNA topoisomerase I	2	0	0
IPR001529	DNA-directed RNA polymerase, M15 ID subunit	2	1	0
IPR000192	TAZ finger	2	0	0
IPR000967	NF- κ B type	2	1	0
IPR002735	Translation initiation factor IF5	2	0	0
IPR004452	ZPR1 type	2	1	0
IPR000465	XPA protein	1	0	0
IPR003071	Ophiol nuclear receptor, HMIR type	1	0	0
IPR003656	BED finger	1	0	0
IPR000678	Nuclear transition protein 2	1	0	0
IPR000976	Wilms' tumor protein	1	0	0
IPR002906	Ribosomal protein S27a	1	0	0
Domains commonly associated with zinc finger domains				
IPR000210	BTB/POZ domain	124	50	25
IPR001214	SET-domain of transcriptional regulator	30	13	7
IPR003309	SCAN domain	22	6	2
IPR003879	Butyrophilin C-terminal DUF	14	2	1
IPR002099	Tusker domain	16	6	2
IPR001258	NHL repeat	10	3	3
TOTAL		1573	459	218

Table 3. Zinc Finger Protein Clusters Generated by All-Against-All BLAST Analysis

Cluster	Domains	Description	Proteins
Cluster 1	C2H2/KRAB/BTB	Transcriptional regulators with C2H2 core-binding domain	296
Cluster 2	C ₂ zinc finger	Steroid hormone receptors	44
Cluster 3	BTB/POZ/Kelch repeat	Actin-binding proteins	35
Cluster 4	RING-CH1B-box/coiled coil	Tripartite motif family	26
Cluster 5	Three C2H2 zinc finger	Sp/Krüppel-like factor family	25
Cluster 6	LIM/Homobox	LIM/homeobox family	18
Cluster 7	RING-H2	E3 ubiquitin-ligase family	14
Cluster 8	Four LIM domains	Four and a half LIM domain family	14
Cluster 9	Protein kinase C/Ser/Thr-type protein kinases	Protein kinase C	12
Cluster 10	C3HC2/puH	Jumonji family	7
Cluster 11	FYVE/PH	FYVE family	7
Cluster 12	RING-CH1B-box/coiled coil/fibronectin type III	B-box family	6
Cluster 13	Three LIM domain	Aluja family	6
Cluster 14	C1/Rho/GAP	Myosin IX family	6
Cluster 15	GATA type zinc finger	GATA family	6
Cluster 16	Four N-terminal C2H2 and two C-terminal C2H2	Ikaros family	5
Cluster 17	TRAF/RING-CH/MATH	TNF-receptor-associated factors	5
Cluster 18	C ₂ /PH/Btk	Ras GTPase family	5
Cluster 19	Zinc finger ZZ	Dystrophin family	5
Cluster 20	C1/PH/EF hand/DAGKc/GAGaa	Diacylglycerol kinase family	5
Cluster 21	PHD	Chromatin regulator family	5
Cluster 22	C2H2/Homoeodomain	Transcription factors developmentally related	4
Cluster 23	One N-terminal C2H2, six central C2H2, two C-terminal C2H2	Novel C2H2 family (NTR)	4
Cluster 24	RING-H2/PA	G1-related family	4
Cluster 25	SET/Chromodomain	Heterochromatin component proteins family	4
Cluster 26	MZ/Sap	Inhibitor of STAT family	4
Cluster 27	NHL repeat/EGF	O2/ten-m homolog family	4
Cluster 28	RING-CH1C2H2 zinc finger	Novel C2H2/RING finger family	4
Cluster 29	RING-CH/WWE	Deltex family	4
Cluster 30	PHD finger	Novel PHD-containing family	4
Cluster 31	LIM/PDZ	C-terminal LIM domain family	4
Cluster 32	Two PHD finger	Novel PHD-containing family	4
Cluster 33	CXXC finger/PHD/FYRN/bromodomain/SET	Chromatin regulator family	4
Cluster 34	C2H2 zinc finger/PH	Forkhead-related transcription factors	4
Cluster 35	C ₂ H ₂ zinc finger/RNA recognition domain	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor	4
Cluster 36	Three C2H2 C-terminal zinc fingers	EGR family	4
Cluster 37	Tyr Kinase/Sh2/Sh3/Btk/PH	Tyrosine protein kinase BTK family	4
Cluster 38	RING-CH	Polycomb family	4
Cluster 39	C2H2 zinc finger/Gap-p24	Gap family	3
Cluster 40	Three C2H2 zinc fingers	Novel C2H2 family	3
Cluster 41	Ar/Gap/PH	Centaurin family	3
Cluster 42	RHO/BTB	Novel BTB family	3
Cluster 43	DRHC zinc family	DRHC family	3
Cluster 44	Fourteen C2H2 zinc finger	Novel C2H2 family	3
Cluster 45	GCS-type zinc finger/Arfgap/Ank repeat	GCS-type zinc finger family	3
Cluster 46	GATA/SANT/ELM2/BAH	Metastasis-associated proteins	3

Abbildung 29: Klassifizierung der Zing-Finger-Domänen des Maus-Transkriptoms (Ravasi, Huber et al. 2003).

Bestimmte Zink-Finger-Domänen sind spezifisch für Vertebraten. So wurden Domänen des Transkriptionsrepressors *KRAB* oder des nuklearen Rezeptors *ROR* nicht in *D. melanogaster*, *C. elegans* oder *S. cerevisiae* wieder gefunden. Mehr als 30% der Zink-Finger in Maus und Mensch sind vom *KRAB*-Typ. *KRAB* ist die Abkürzung für *Krüppel assoziierte Box* und bindet an Silencer-Elemente der DNA und veranlasst die Packung in Heterochromatin durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen. Die *Krüppel*-Domäne selber kommt überall in der Natur vor, die *KRAB*-Domäne hingegen ist spezifisch für Tetrapoden, die vor 350 Mio. Jahren aufkamen. Insekten wiederum besitzen andere exklusive Domänen wie *C4DM* oder *ZAD*.

Die vierthäufigste Proteinfamilie der Zink-Finger ist die TRIM-Familie. TRIM steht für „tripartite motif“ und kommt daher, dass diese Proteine in der Regel aus 3 verschiedenen Zink-Finger-Domänen aufgebaut sind, wobei nur vereinzelt bestimmte davon fehlen. Die Hauptdomäne ist der **RING-Finger**, welcher aus 40 bis 60 Aminosäureresten besteht, die 2 Zink-Atome binden mit der Koordination C4HC3 oder C3H2C3. Die allgemeine Funktion besteht hier nicht oder seltener in DNA-Bindung, sondern der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Sie ist besonders charakteristisch für einen Typ der E3-Ubiquitin-Ligasen, welche Ubiquitin von einem E2-Enzym auf ein Substratprotein übertragen und dieses dann für den Abbau im Proteasom markieren (Regulation des Protein-Umsatzes).

Neben der RING-Finger-Struktur enthalten die TRIM-Proteine ein bis zwei Ausgaben des **B-Box**-Motivs, welches aus gut konservierten 40 Aminosäureresten mit hohem Cystein-Anteil besteht. Die B-Box ist ein Monomer mit 2 β -Faltblattsträngen, 2 α -Helices und 3 irregulären Schleifenregionen. Von 7 möglichen Zink-

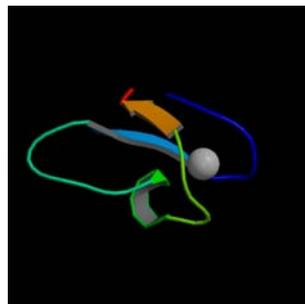


Abbildung 31: B-Box-Motiv (www.expasy.org).

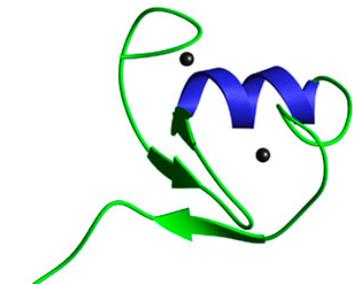
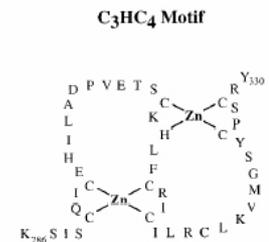


Abbildung 30: RING-Finger-Motiv.

Liganden werden 4 benutzt und binden ein einziges Zink-Ion tetrahedrisch nach C2H2-Arrangement. Die Domäne wurde zum ersten Mal 1995 in dem nuklearen Faktor *XNF7* von *Xenopus* gefunden.

Die Abfolge RING-B-Box1-B-Box2 bildet das Tripartite-Motiv. Damit assoziiert ist noch häufig eine **Coiled-coil-Domäne**. Diese fungiert in vielen TRIM-Proteinen zur Homo- oder Heteromerisierung. Sie ist auch Substrat für Proteine, die TRIM-Proteine selber zum Abbau ubiquitieren, wie z.B.: *SINA*, welches am Beginn der Augenentwicklung in *Drosophila* steht, indem es den Transkriptionsfaktor *tramtrack* sowie alle TRIM-Proteine degradieren lässt.

Neben diesen Haupt-Domänen verfügen die Mitglieder der TRIM-Familie über weitere Domänen, die allerdings größerer Variabilität unterworfen sind und auch durch alternatives Splicen innerhalb eines Gens variiert werden können. Eine Hauptfolge alternativen Splicens in der TRIM-Familie ist oft die Veränderung der subzellulären Lokalisation.

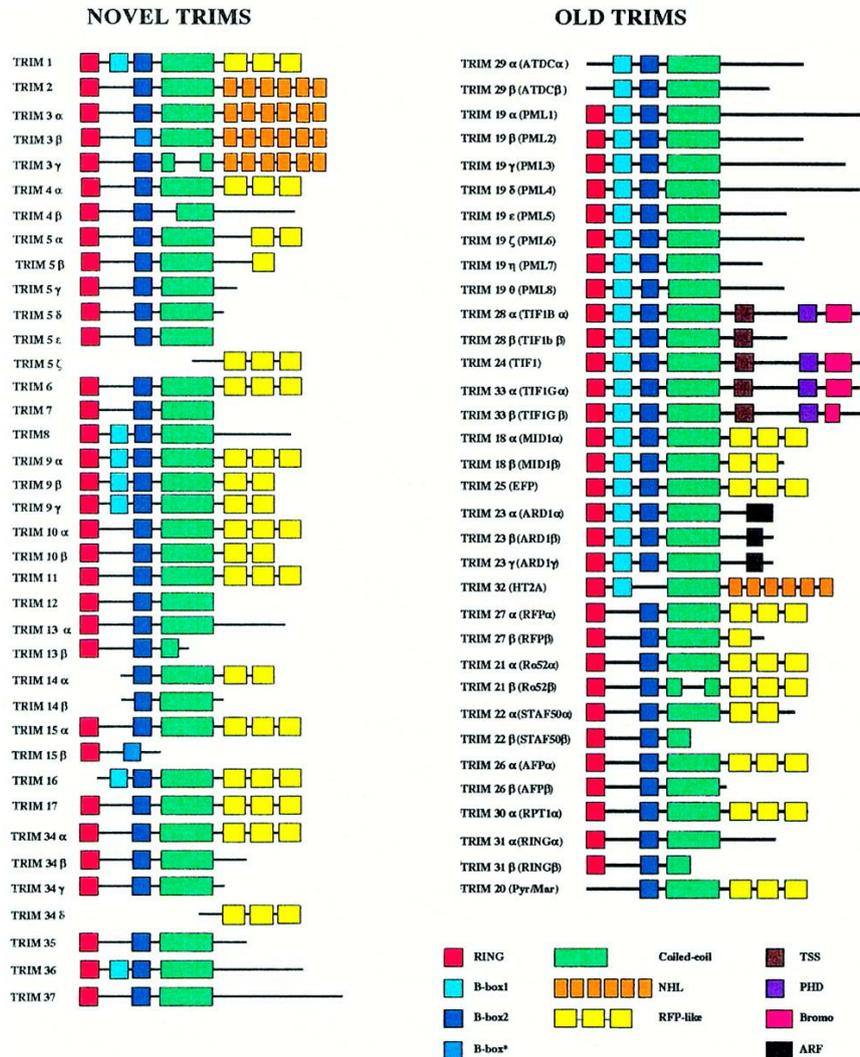


Abbildung 32: Übersicht der TRIM-Genfamilie (Reymond A 2001). Ende 2005 reicht die Zählung bereits bis TRIM70.

Das Expressionsmuster der verschiedenen TRIM-Familienmitglieder ist sehr heterogen und eher nicht überlappend. Es gibt auch kaum überlappende Immunfärbungen mit Markerproteinen für verschiedene Zellstrukturen wie Golgi-Apparat, endozytotische Vesikel, Mitochondrien, Spliceosomen, Tubulin, Intermediärfilamenten, so dass **die TRIM-Proteine eigene, neue Kompartimente zu definieren scheinen**. Eine Übersicht der Expression vieler TRIM-Proteine findet sich in einer Internet-Datenbank: www.tigem.it/TRIM/

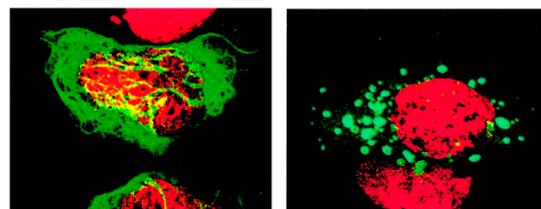


Abbildung 33: Subzelluläre Lokalisation von *TRIM2* (links) und *TRIM9* (rechts) in grün. Zellkern rot angefärbt. (Reymond A 2001)

Die TRIM-Proteine treten mit anderen Proteinen in Wechselwirkung und verändern deren Funktion, regulieren insbesondere durch die Ubiquitinierung das Vorhandensein anderer Proteine und stellen somit **eine eigene Ebene der Genregulation auf Proteomebene** dar, **gegenüber** Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Faktoren der Chromatinmodellierung auf **Genom-Ebene**, siRNA und miRNA auf der Ebene des **Transkriptoms**. Sie stehen somit an Schlüsselpositionen, wo Zellen von einem Zustand in einen anderen übergehen und dafür beispielsweise ein altes Muster des Proteinbestandes gegen ein neues austauschen, wobei die Produktion des neuen durch Transkriptionsfaktoren veranlasst werden mag, die Beseitigung der restlichen Proteine des alten Musters aber einer anderen Funktionsweise und -Ebene bedarf. Dieses Umschalten des Proteoms kann sehr langfristige Effekte haben wie in der Zelldifferenzierung, jedoch auch als Reaktion auf kurz- oder mittelfristige Signale erfolgen, wie hormoneller Informationseingang, Cytokinwirkung, allgemeine Signaltransduktion mit Reaktion der Zellen auf ihre Umgebung. Durch zielgerichtete E3-Ubiquitinligasen wie auch den TRIM-Proteinen bekommt die Lebensdauer von Zielproteinen eine klar umrissene und steuerbare Definition. Neben dieser **Schalterfunktion** können sie auch eine Rolle für die Homöostasis der Zellen spielen, um ein Gleichgewicht der Konzentration von Zielproteinen zusammen mit deren permanenten Proteinsynthese zu bilden, sozusagen als **Begrenzer** wirken, damit Zielproteinkonzentrationen nicht in eventuell toxische Bereiche abdriften.

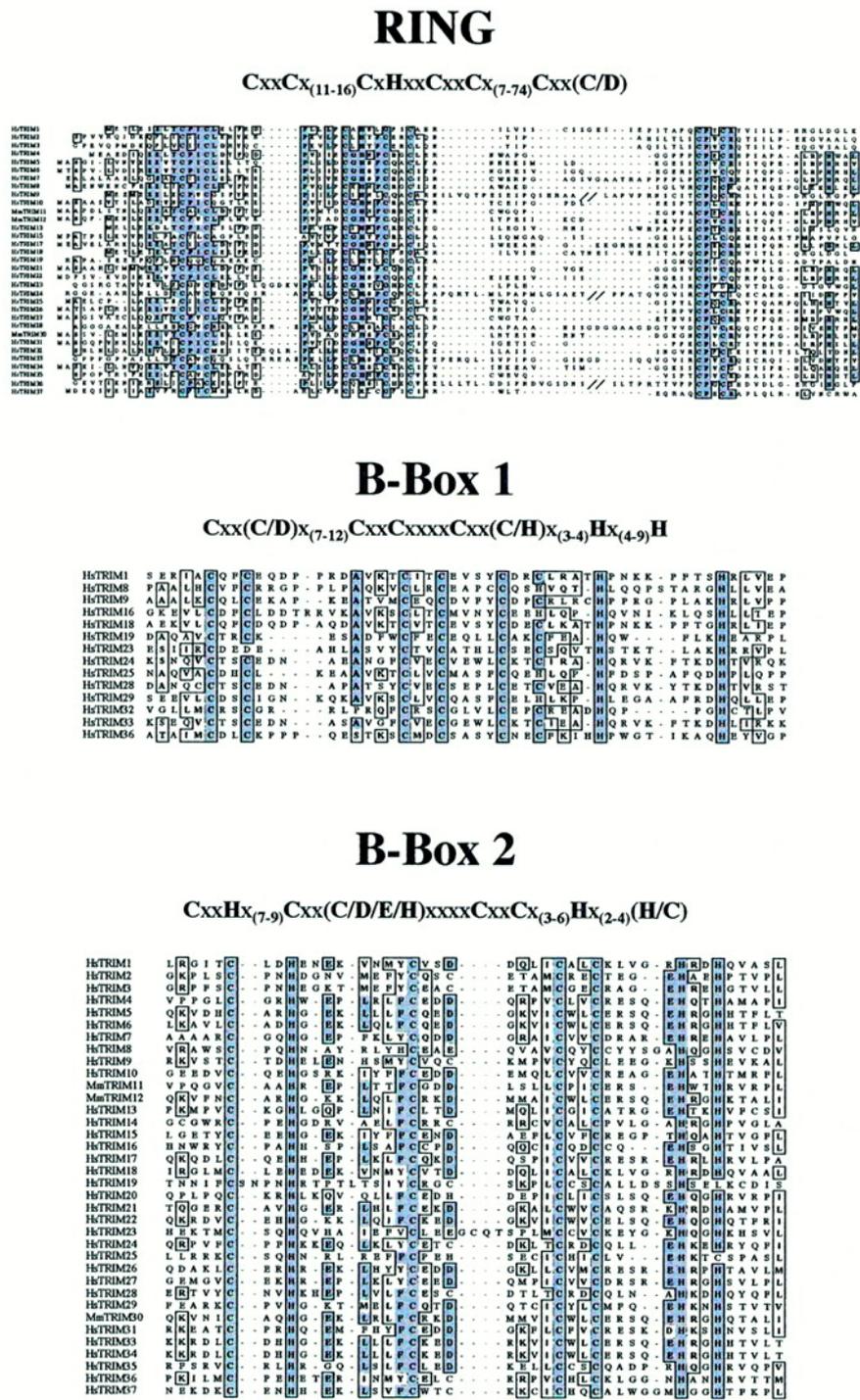


Abbildung 34: Konservierte Aminosäuren in den drei Hauptdomänen der TRIM-Proteinfamilie. (Reymond A 2001)

Viele TRIM-Gene sitzen an wichtigen Positionen innerhalb von Signaltransduktionswegen:

- **BERP**: Im *NGF*-Pfad mit Funktion für die Zelldifferenzierung.
- **EBBP/TRIM16**: Im *KGF*-Pfad mit Funktion für die Zelldifferenzierung.
- **GERP/Trim8**: Im *Interferon- γ* -Signalweg. Vermittelt Degradation im Proteasom von *SOCS* (*Suppressor of Cytokine Signalling*), was zur Zelldifferenzierung führt.
- **TRIM31**: Im *Retinsäure*-Pfad durch ein Retinsäure-Enhancer-Element in seinem Promotor. Wirkt anti-proliferativ und ist ein Zielprotein für die Leukämitherapie mit Retinoiden.
- **TRIM32**: Im *TNF*-Pfad (*Tumor Necrosis Factor*) wirkt es anti-apoptotisch durch Blockade der durch *TNF- α* induzierten Apoptose und lässt die Zellen dedifferenzierten und proliferativen Zustand aufrechterhalten, insbesondere in Keratinozyten-Tumorzellen.

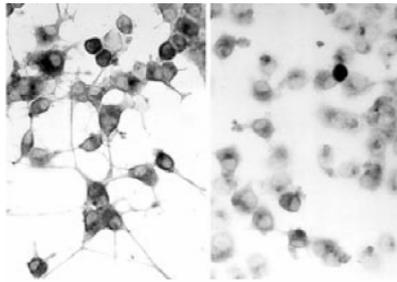


Abbildung 35: Beispiel für eine Schalterfunktion: **BERP** (*Brain Expressed Ring Protein*) ist ein **gehirnspezifisches TRIM-Protein**, das mit dem C-Terminus von *Myosin Typ V*, welches für den Transport von Organellen wichtig ist, wechselwirkt und mit ihm in Neuriten und Wachstumskegeln ko-lokalisiert. Mutiertes **BERP** verhindert das **Auswachsen von Neuriten als Reaktion auf NGF** (*Nerve Growth Factor*), so dass diese sich weiter teilen (**rechts**), statt sich zu differenzieren (**links**) (El-Husseini and Vincent 1999).

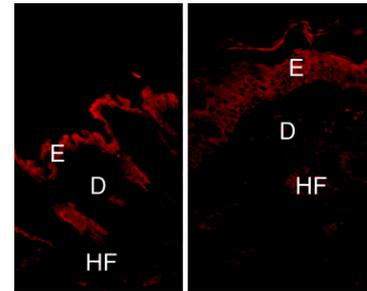
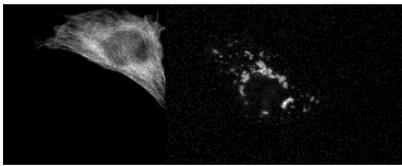
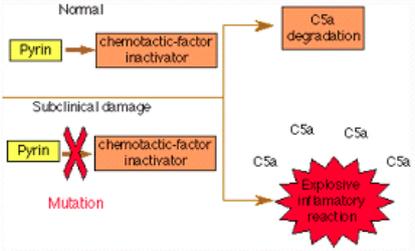


Abbildung 36: Beispiel für eine Begrenzer-Funktion in der **Homöostase**: **EBBP** (*Estrogen Responsive B-Box Protein*) spielt eine wichtige Rolle in differenzierenden Keratinozyten bei der **Hautentwicklung und Wundheilung**. Es wird herunterreguliert **als Reaktion auf KGF** (*Keratinocyte Growth Factor*), wodurch die stabil differenzierten Zellen wieder anfangen sich zu teilen, um z.B. eine Wunde zu schließen. Das Epithel solcher Wunden (**rechts**) ist hyperproliferativ und dicker als das normale (**links**), so dass das TRIM-Protein **EBBP** für die Balance zwischen Proliferation und Verbleib im differenzierten Zustand (Homöostase) wichtig ist (Beer, Munding et al. 2002).

Angesichts dieser **zentralen Funktionen von TRIM-Proteinen** ist es nicht überraschend, dass **viele Mitglieder dieser Genfamilie** bisher **als Ursachen verschiedener Krankheiten und Fehlfunktionen identifiziert** wurden, sollten sie und ihre Funktionen ausfallen beispielsweise durch Mutationen oder im Experiment durch gezielten „Knock-out“.

Übersicht bisher bekannter Funktionen verschiedener TRIM-Gene und Ursache für Krankheiten:

- **TRIM1**: alias *MID2*.
- **TRIM3**: **Verschiedene Arten von Krebstumoren** weisen Deletion dieses Gens auf.
- **TRIM7**: Initiation der Glykogen-Biosynthese in einem Komplex mit *Glykogenin* (*GYG1*, *GYG2*) und *Glykogen-Synthase* (*GYS1*, *GYS2*).
- **TRIM8**: alias *GERP* (***Glioblastoma Expressed Ring Finger Protein***), Regulator der *SOCS-1* Funktion.
- **TRIM13**: alias *RET-Finger Protein 2*. Tumor-Suppressor mit Folge von chronischer B-Zell-lymphozytischer **Leukämie** bei Ausfall.
- **TRIM16**: alias *EBBP*. Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten.
- **TRIM17**: Transkriptionelle Regulation der Spermatogenese.
- **TRIM11**: Degradiert *Humanin*, ein anti-apoptotisches Peptid, das Symptomen der Alzheimer-Krankheit entgegenwirkt.

- **TRIM18:** alias **MIDI1**. Assoziiert mit Mikrotubuli (Bild links) wohingegen eine Mutante davon abfällt (rechts). Dadurch kann **TRIM18** nicht mehr **Phosphatase 2A** ubiquitinieren, welche ebenfalls an den Mikrotubuli assoziiert ist und deren Dynamik während des Zellzyklus reguliert. Diese Mutation verursacht **Opitz-Syndrom** (Opitz-G-Syndrom und BB-Syndrom) mit Fehlern in der Musterbildung entlang der Körperachse (MID = Midline Defect), craniofacialen Anomalien, Herzfehlern, offenen Fontanellen, verzögerter Entwicklung, vorstehendem Vorderkopf, Agenesie des Corpus callosums und Sprachproblemen.
 
- **TRIM19:** alias **PML** (promyeloische Leukämie).
- **TRIM20:** alias **Pyrin**, **Krankheitsbild mit wiederkehrenden Fieberattacken (Familiäres Mediterranes Fieber)** im Peritoneum, Synovium, Pleura unter Schmerzen, Amyloidose mit Nierenversagen, Anstieg der IgD-Blutwerte, chronische rheumatoide Arthritis, autosomal rezessiv, aber manchmal auch heterozygot in Zusammenhang mit anderen Faktoren. Allgemeine **Störung im Bindegewebe**. Besonders häufig in arabischen und türkischen Populationen mit 1 Erkrankung pro 200 Personen. Das **Pyrin** wirkt als Aktivator für die Biosynthese eines Chemotaktischen-Faktor-Inaktivators. Ohne **Pyrin** wird der Inaktivator nicht produziert, was zu den autoimmunen Überreaktionen führt (Matzner, Abedat et al. 2000).
 
- **TRIM21:** Ursache des **Sjögren-Syndroms** benannt nach dem schwedischen Ophthalmologen Henrik Sjögren, der das im Jahre 1900 beschrieb. Eine **Autoimmunkrankheit**, die zu 90% Frauen betrifft und Entzündungen von Drüsen bewirkt, die durch weiße Blutzellen attackiert werden. So werden viele Organe betroffen (Lungenentzündung, Vagina), jedoch sind trockene Augen (Tränendrüsen) und trockener Mund (Speicheldrüsen) ein besonderes Kennzeichen, seltener kommen vor Vasculitis (Entzündung von Blutgefäßen), Anämie. Etwa 4 Millionen Patienten leiden darunter in Amerika.
- **TRIM22:** Involviert in der Transduktion der **antiviralen Wirkung** von **IFN**.
- **TRIM23:** Aktivator der katalytischen Untereinheit von **Cholera-Toxin**.
- **TRIM24:** Kommt als 5'-**TIF1A-RET-3'** Fusionsprotein in papillärem **Thyroidkarzinom** vor, als Fusionsprotein mit **FGFR1** in myeloproliferativem Syndrom. Inhibitor von **β -FTZ-F1**.
- **TRIM25:** Steigert seine Expression nach Östrogen-Einwirkung.
- **TRIM27:** alias **RFP (Ret Finger Protein)**. Bindet an den **Enhancer von Polycomb Protein EPC1** und ist wichtig in der Spermatogenese.
- **TRIM28:** KRAB-bindender Korepressor der Transkription.
- **TRIM29:** Defekt führt zu **Prostatakrebs**, Ataxia-Telangiectasia Gruppe D.
- **TRIM32:** Locus für **Limb-Girdle-Muskel-Dystrophie, Keratinozytoma** und gilt als mögliches Onkogen. Das Protein wurde in zytoplasmatischen Körperchen lokalisiert. Es kann aber auch im Zellkern lokalisiert sein, wo es mit der Aktivierungsdomäne des **HIV-1-TAT**-Proteins wechselwirkt, das die Transkription von HIV-1-Genen aktiviert.
- **TRIM33:** Papilläres **Thyroidkarzinom 7**.
- **TRIM34:** Mediator von Interferon-Aktivität.
- **TRIM35:** Von Makrophagen abgeleitetes Protein mit Apoptose-induzierender Eigenschaft („*hemopoietic lineage switch gene 5*“).
- **TRIM36:** alias **Haprin**, spielt eine Schlüsselrolle bei der **Akrosomenreaktion und Befruchtung**.
- **TRIM37:** alias **MUL** ist in den **Peroxisomen** lokalisiert und Defekt in der Domäne, die zu der peroxisomalen Lokalisation führt bewirkt **Mulibrey Nanismus** mit Muskelschwäche/Myopathie, angeborenen Fehlbildungen von Gesicht, Leber, Wachstumsstörungen, Kardiomyopathie.
- **TRIM47/GOA:** Verursacht **Astrozytoma**.
- **TRIM59:** alias **TSBF1**, **Tumor-Suppressor**.

Ergebnisse

DNA-Microarray-Screen

Seit ihrer Entwicklung sind DNA-Microarrays zu einer außergewöhnlich leistungsfähigen Methode zum Studium von Genexpressionsmustern in Geweben und für Krankheiten auf molekularer Ebene geworden. Im Vergleich zu anderen Methoden zur Analyse von Genexpressions-Profilen wie *Differential Display* (Liang and Pardee 1992), *Subtraktive Hybridisierung* (Diatchenko, Lau et al. 1996) und *Serielle Analyse der Genexpression (SAGE)* (Velculescu, Zhang et al. 1995) liegt der herausragende Vorteil der DNA-Microarray-Technologie in der Möglichkeit zur simultanen Betrachtung tausender Gene in einem bestimmten Gewebe.

Um neue Gene zu identifizieren, die in spezifischen Regionen des sich entwickelnden cerebralen Cortex der Maus exprimiert werden, führten wir in einem Team von 3 Gruppen zu je 2 Leuten einen Screen von 36000 Maussequenzen und ESTs mit DNA-Microarrays durch, wobei Gewebe aus fünf corticalen Regionen der Stadien E14,0 (vor dem Erreichen der thalamocorticalen Axone in die corticale Platte), E16,0 (nach dem Erreichen der thalamocorticalen Axone in die Subplatte) und E19 bzw. E18,5 (nach Invasion der thalamocorticalen Axone in die dichte corticale Platte) isoliert wurden. Jede Gruppe führte dabei die Experimente für jeweils eines der 3 Entwicklungsstadien durch. In der vorliegenden Arbeit betrifft das Stadium E18,5.

Neben den Hirngeweben wurde als Kontrolle embryonaler Körper ohne Gehirn, Rückenmark und Genitalien verwendet, um nicht-nervensystemspezifische Expression herausfiltern zu können (Restkörper). Es ist bekannt, dass Nervensystem und insbesondere männliche Geschlechtsorgane überlappende Gene besitzen. Um diese nicht zu verlieren, wurden daher auch die Genitalien entfernt.

Für den Screen kamen die von der Firma Affymetrix kommerziell erhältlichen Chips mit Sequenzen des Maus-Transkriptoms zum Einsatz. Unter der Kennung *MG_U74* wurde ein Set von 3 Microarrays verwendet, das 36000 Mausgene abdecken sollte. Der erste der 3 Chips, *MG_U74A*, beinhaltetete ca. 6000 Sequenzen der *Mouse UniGene Database*, die bis zu dem Zeitpunkt funktionell charakterisiert waren sowie ca. 6000 ESTs. Die übrigen beiden Arrays, *MG_U74B* und *MG_U74C*, beinhalteten 24000 EST Sequenzen.

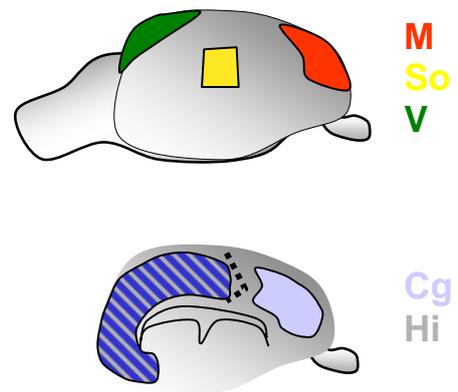


Abbildung 37: Seitliche (oben) und mediale (unten) Ansicht des cerebralen Cortex der Maus. Ein Stück aus der Mitte der Anlagen für den späteren Motor- (M), somatosensorischen (So), visuellen (V), cingularen (Cg) Cortex sowie den Hippocampus (Hi) wurden isoliert und für den DNA-Microarray Screen verwendet.

Die Hybridisierungen wurden zweifach durchgeführt, da die Firma Affymetrix uns einen Satz der Chips (V1) geliefert hatte, bei dem sich ca. 25% der Gene als komplementär zur tatsächlichen Sequenz erwiesen hatten. Mit dem korrigierten Satz (V2) wiederholten wir die Hybridisierungen.

Die aus den Geweben gewonnene Gesamt-RNA wurde mit T7-oligo-dT Primern revers transkribiert. Die gereinigte cDNA wurde in-vitro-transkribiert mit T7-RNA-Polymerase und einem Gemisch von unmarkierten sowie markierten biotinylierten NTPs. Nach Größenfragmentierung wurde die markierte cRNA von jedem Gewebe mit einem Set der Microarray-Chips hybridisiert (also 3 Arrays pro Gewebe).

Die Arrays wurden in der *GeneChip Fluidics Station 400* gewaschen, gefärbt mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) und von einem Laserscanner bei 570 nm ausgelesen.

Die Rohdaten wurden mit der Software *Affymetrix Microarray Suite 4.0* (Affymetrix) ausgewertet. Dabei wurden die Datensätze von jeder einem Gewebe entsprechenden Hybridisierung mit jedem anderen Gewebe abgeglichen, d.h. darauf normiert und die Expressionsunterschiede relativ bestimmt.

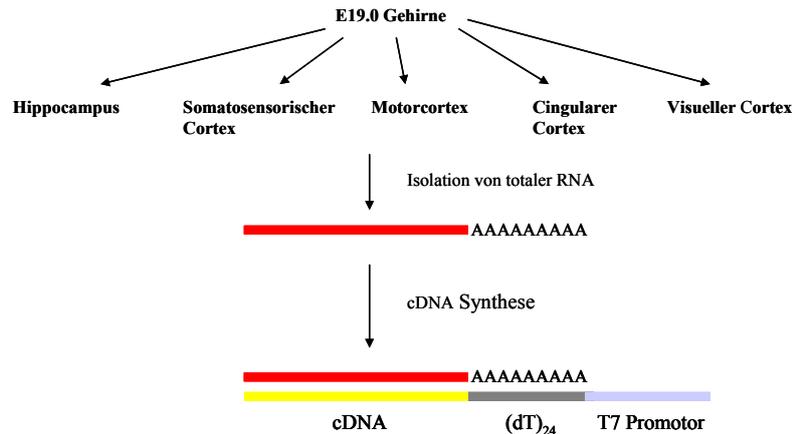
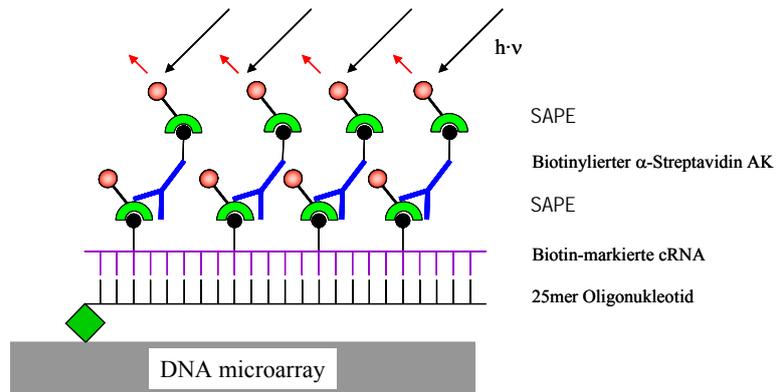
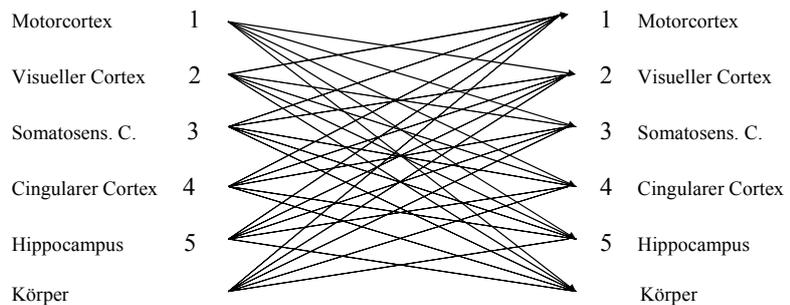


Abbildung 38: Schema der Vorgehensweise für den Microarray-Screen. Aus Mausgehirnen des Stadium E19 wurden Gewebe der verschiedenen Hirnregionen isoliert, daraus RNA gewonnen, die spezifisch für mRNA zur Synthese von cDNA eingesetzt wurde. Die cDNA diente als Template für die Herstellung von Biotin markierter cRNA, die an die Oligonukleotide auf den Microarray-Chips hybridisierte. An das Biotin konnte fluoreszierendes Streptavidin-Phycoerythrin binden, dessen Signal mit einem biotinylierten AK verstärkt wurde und am Ende von einem Laserscanner quantitativ ausgelesen wurde.



Kombinatorischer Vergleich zwischen allen isolierten Geweben



Mit Hilfe der Auswertungssoftware von Affymetrix sowie eigenen Algorithmen wurden die Gene nach ihren Messwerten in Gruppen eingeteilt („geclustert“). Die höchste Priorität erhielten jene Gene mit exklusiver Expression in einer der Regionen über einem Schwellenwert als Expressionsunterschied („*Fold Change*“) um den Faktor 2 gegenüber allen anderen. Zum Teil wurden Gene mit deutlich größeren Werten gefunden (siehe Tabellen später). Da bekannt ist, dass viele Gene im Gehirn in Form von Gradienten über verschiedene Hirnregionen exprimiert werden, wurden in der zweiten Prioritätsstufe solche Gene erfasst, die in 2 benachbarten der Hirnregionen besonders exprimiert sind, wobei ein *Fold Change* von Faktor 1,5 als Schwellenwert für das zweite Gewebe vorgegeben wurde. Das *Clustern* wurde fortgesetzt mit Kriterien für 3 Regionen, 4, sowie überhaupt gehirnspezifischen Genen, die im Körper nicht vorkommen.

1 probe set = 16-20 probe pairs

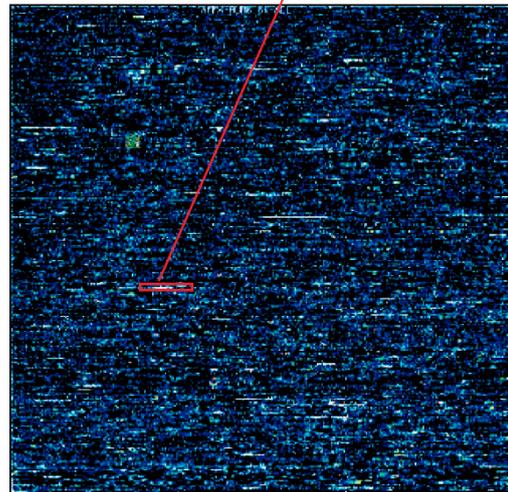
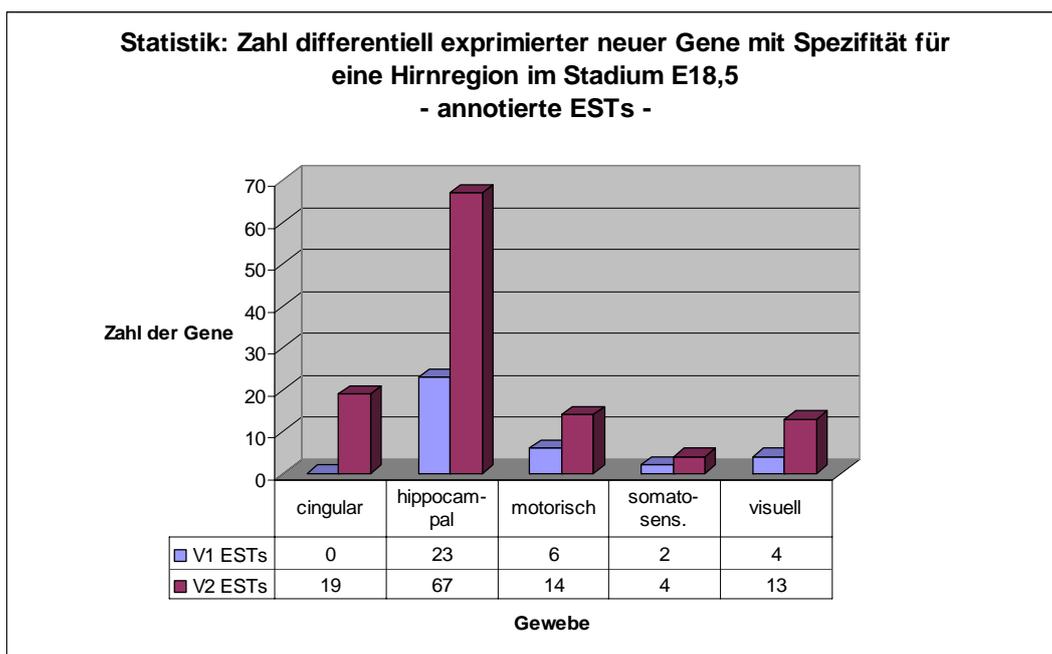
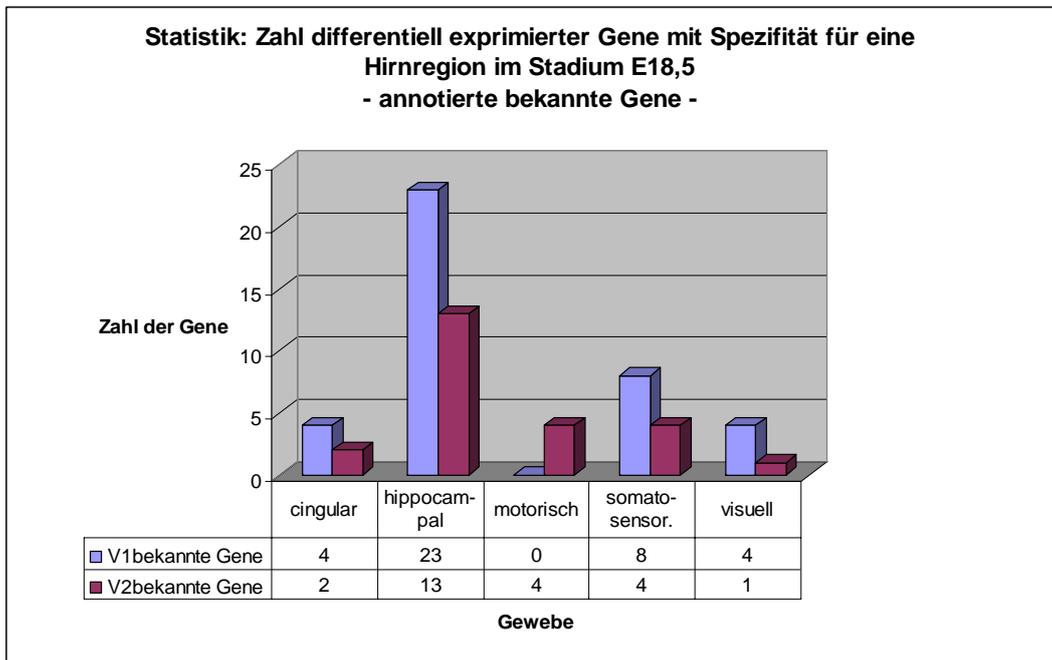


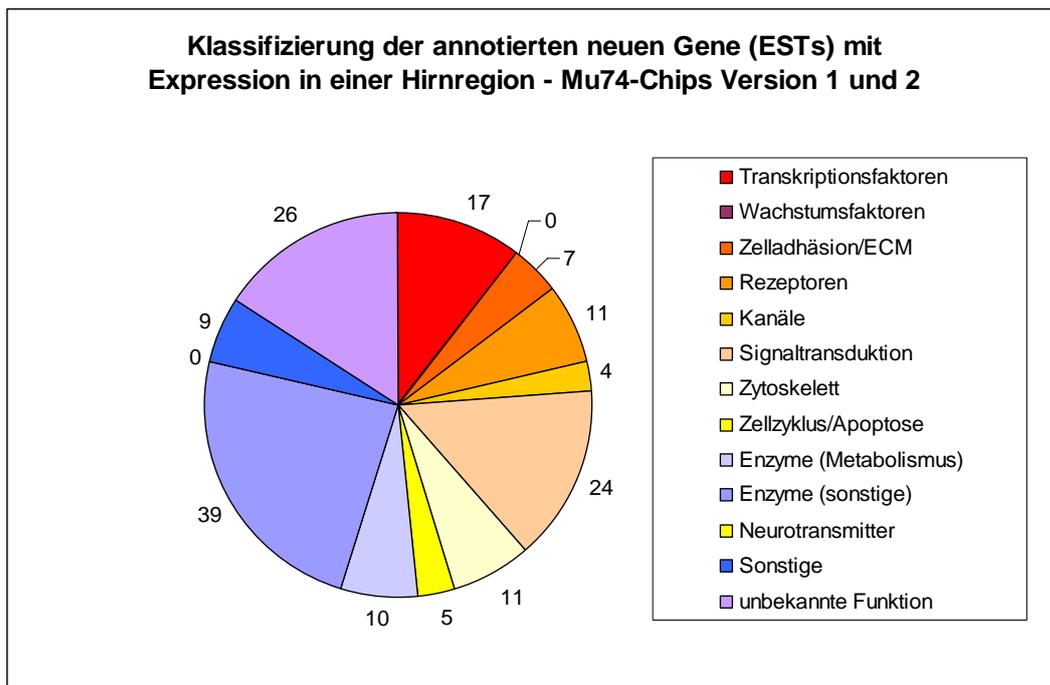
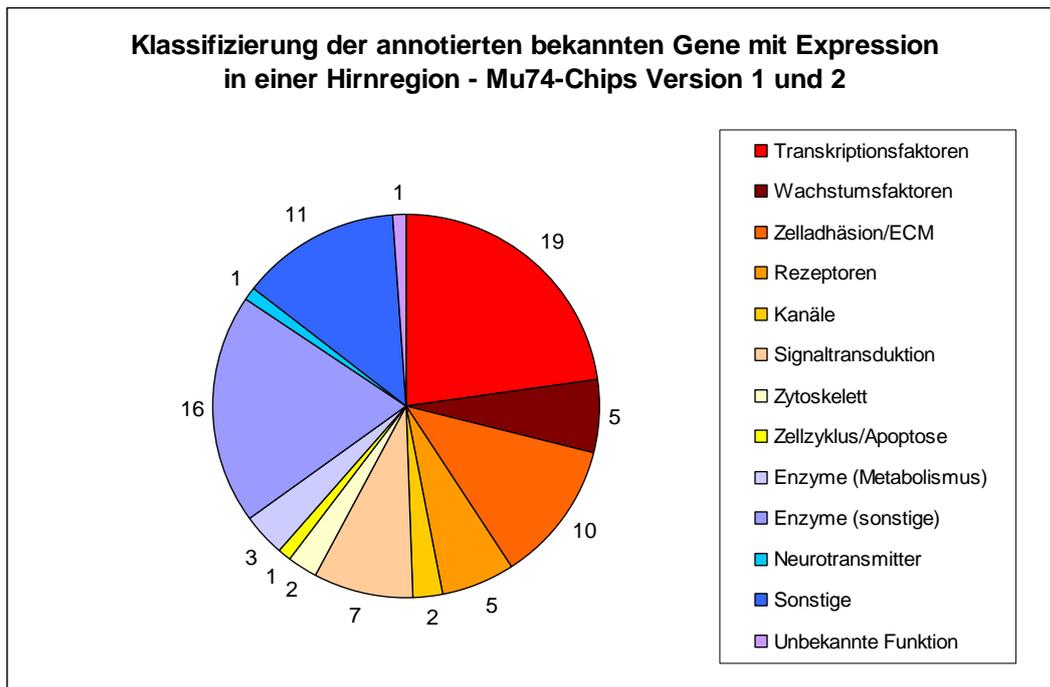
Abbildung 39: Fluoreszenzbild der Microarrays nach dem Ablesen im Laserscanner und die schematische Anordnung der Sonden („*probe pairs*“) auf dem Array. Ein *probe set* repräsentiert ein Gen oder EST und besteht aus 16-20 nicht redundanten *probe pairs*, welche Teilsequenzen des Gens oder ESTs sind. Ein *probe pair* besteht aus einer *probe cell* für die *perfect match* (PM) Sonde (25 bp Oligonukleotide, die exakt komplementär zur Referenz-Genesequenz sind) und einer *probe cell* für die korrespondierende *mismatch* (MM) Sonde (Negativkontrolle mit 1 Basenpaar Abweichung). Eine *probe cell* besteht wiederum aus Millionen von Oligonukleotiden.

Nach der Computerauswertung der Microarray-Daten wurden 126 neue Sequenzen für E14.0, 187 Sequenzen für E16.0 und 217 Sequenzen für E19 bzw. E18,5 erhalten, die spezifisch in einer bestimmten Region des Cortex exprimiert sein sollten. Diese Gene wurden für die individuellen Einzelarbeiten aufgeteilt, so dass in dieser Arbeit die Hälfte der aus dem Screen vom Stadium E19 bzw. E18,5 erhaltenen Ergebnisse dargestellt ist.

Ziel des ganzen Screens war es, Hinweise auf neue Gene zu finden, die dann mit weiteren Techniken wie ISH verifiziert und näher charakterisiert werden sollten, sowie eines dieser Gene für eine detailliertere Analyse mittels einer transgenen Maus auszuwählen. Die Anforderungen an die statistische Sicherheit der Microarray-Voraussagen waren daher begrenzt und der Screen erfüllte in erster Linie eine qualitative Aussage statt einer genauen Quantifizierung. Hierfür hätte mit deutlich mehr Chips hybridisiert werden müssen, um eine Statistik mit Fehlerabschätzung durchführen zu können. Tatsächlich erhielten wir eine Übereinstimmung von den Microarray-Vorhersagen zu den Verifikationen mittels ISH von 70%. Mehr dazu im Diskussionsteil.



Die meisten bekannten wie neuen Gene wurden im Hippocampus gefunden. V1 und V2 bezeichnet die beiden verwendeten Chip-Varianten von Affymetrix, wie auf den Seiten zuvor erklärt.



Die gemessenen Gene und ESTs wurden basierend auf dem "*Gene Ontology Mining Tool*" (Ashburner, Ball et al. 2000) nach ihrer Funktion klassifiziert.

Vorhersage neuer Marker-Gene mit regionalisierter Expression im Cortex

Die Tabelle gibt eine Übersicht der Klone nach der Auswertung gemäß im Kapitel zuvor genannten Kriterien. Die einzelnen Klone wurden anhand ihrer auf dem Microarray-Chip gesetzten Sequenz mittels der von Affymetrix angegebenen ID ermittelt und beim RZPD-Konsortium als cDNA-(IMAGE)-Klone bestellt, von denen dann Verifikation mittels ISH erfolgen konnte. Die cDNA-Klone wurden mit Hilfe der Celera-Datenbank annotiert. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Annotation von insbesondere ESTs mit der Zeit ändern kann und man mit Hilfe der bleibenden Accession-IDs jederzeit eine neue Annotation vornehmen könnte. **Einige Gene sind unter verschiedenen Klon-Nummern in der Tabelle mehrfach enthalten.** Die Werte für *Fold Change* sind zu verstehen als relative Änderung in Bezug auf das vorgenannte Gewebe. Ist das Expressionsmaximum beispielsweise für das Gewebe Hippocampus angegeben, so bedeuten die *Fold Changes* die relative Expression im Hippocampus zu den übrigen Geweben. Hierbei sind diese in der Reihenfolge H, M, V, K, S, C (Hippocampus, Motorcortex, visueller Cortex, Körper, somatosensorischer Cortex, cingularer Cortex) von links nach rechts angeführt, wobei das vorgenannte Gewebe fehlt, da hier der *Fold Change* des Expressionsmaximums zu sich selber relativ 1 ist. Im Falle des Hippocampus bezeichnet die Liste der *Fold Changes* also M, V, K, S, C, da H fehlt. Im Falle eines Gens mit Expressionsmaximum im visuellen Cortex wäre die Liste entsprechend H, M, K, S, C ohne V. Wo die Signale nicht messbar über dem Hintergrundrauschen lagen, sind keine Messwerte eingetragen. Werte mit einer Tilde (~) sind Schätzwerte gegenüber dem Hintergrundrauschen, wenn im Vergleich bei einem Gewebe keine Expression über dem Hintergrundrauschen messbar war, bei den anderen hingegen schon.

Tabelle 1

Klon-Nr.	IMAGE-ID	Lokalisation	Fold-Change	Fold-Change	Fold-Change	Fold-Change	Fold-Change	Annotation
1	1053872	Cing	2,3	2,2	2,4	2,2	1	SODIUM- AND CHLORIDE-DEPENDENT AMINO ACID TRANSPORTER
2	633764							zic2 of the cerebellum (Mus musculus)
3	520234	Hippocampus	3,6	2,9	2	3	1,4	Myc-related oncogen
4	330075	Hippocampus	2	1,6	2,5	1,4	36,3	AXONIN
5	585383	Hippocampus	1,7	2,8	2,2	-1,9	2	RING3
6	426351	Hippocampus	3,2	~7,2	3,1	2	~9,0	N-ACETYL GALACTOSAMINE-4-O-SULFOTRANSFERASE
7	553888	Hippocampus	2,1	2	~3,6	1,5	~6,3	no panther hit
8	616798	Som	1,2	1,7	2,3	3,9	2,2	mouse genes: hits <40-50
9	734337	Hippocampus	4	2,3	2	3,1	6	LYSOZYME C LYZ-RELATED
10	959909	Som	~1,8	~2,1	~2,1	~2,0	~2,4	no panther hit
11	1053872	Cing	2,3	2,2	2,4	2,2	1	SODIUM- AND CHLORIDE-DEPENDENT AMINO ACID TRANSPORTER
12	1065770							serologically defined breast cancer antigen NY-BR-81 [Homo sapiens]
13	1137280	Mot	2,3	1,5	4,8	3,4	8,4	HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN, chromosome organization and biogenesis, DNA bending, NLS BP
14	1152722	Cing	2,6	2,7	3,1	-2,6	2	KRUEPPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN, zinc finger transcription factor, Krab-box family, C2H2-domains
15	1244047	Vis	2,8	3,5	2	1,8	1,3	CD166-RELATED ANTIGEN PRECURSOR (ACTIVATED LEUKOCYTE-CELL ADHESION MOLECULE) (ALCAM) (DM-GRASP PROTEIN)
16	1245778	Hippocampus	3,1	2,9	1,4	2,9	47,3	ORPHAN NUCLEAR HORMONE RECEPTOR NOR
17	1247405	Vis	2,2	2,1	2	1,6	4,9	COILED-COIL Protein, cell communication, non-selective vesicle transport, endoplasmic reticulum membrane, integral plasma membrane protein
18	1380120	Hippocampus	1,9	1,6	2,7	2,3	2,9	COILED-COIL
19	1381589	Mot	2,4	1,4	1,8	3,8	2,7	nuclear receptor interacting protein 1, hits are weak, no specific domains
20	1382599	Hippocampus	2,2	3,1	3,5	1,7	2	CALCIUM-TRANSPORTING ATPASE PLASMA MEMBRANE
21	1399807	Mot	5,8	1,6	1,8	5	2,5	nuclear receptor interacting protein 1
22	1431329	Vis	1,5	~4,5	~4,1	1,6	~4,0	hypothetical protein F58B6.4 - Caenorhabditis elegans, weak similarity to krueppel-related zinc finger protein
23	2192293	Hippocampus	2,1	1,8	2,1	1,5	~25,2	uncharacterized; k1aa0455 protein [homo sapiens], phosphatidate phosphatase, protein phosphatase, integral plasma membrane protein
24	2649353	Mot	2	1,7	2,3	2,6	1,7	uncharacterized; Riken cDNA clone
25	585383							unnamed protein product [Homo sapiens], histogenesis and organogenesis, neuronal cell recognition, glycosaminoglycan binding, integral plasma membrane protein
26	585383	Hippocampus	1,7	2,8	2,2	-1,9	2	RING3, Mapkk cascade, transcription regulation, ligand-regulated transcription factor, histone acetyltransferase, TFIIID complex
27	475060	Hippocampus	~4,4	~2,3	~2,2	1,8	~2,9	dbj BAB24871.1 (AK007145) putative [Mus musculus], striated muscle contraction regulation, protein kinase, Serin rich domain
28	1247849	Hippocampus	5,4	4,6	2,7	5,8	5	LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR RECEPTOR
29	1152722	Cing + Hip	2,6	2,7	3,1	-2,6	2	KRUEPPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN, zinc finger protein 288; POZ/zinc

								finger transcription factor ODA-8 [Mus musculus], closely related
30	446030	Hippocampus	2,1	1,6	1,6	2,2	2,5	N-ACETYLGALACTOSAMINE-6-O-SULFOTRANSFERASE
31	1923373	Hippocampus	3,3	2,8	~4.4	1,7	3,3	ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR COUP-TF2
32	2158946	Mot	1,6	2	2,1	6,3	~6.1	putative [Mus musculus], Ras superfamily, no other specific assignment, related
33	1244397	Hippocampus	2,7	3	3,5	1,6	2,2	METASTASIS ASSOCIATED 1-RELATED
34	1277325	Hippocampus	2,2	2,8	2,2	1,8	2,9	MYOSIN I
35	1294594	Hippocampus	2,9	2,6	2,2	3,3	2	KISMET-RELATED, chromosome organization and biogenesis, ATP dependent DNA helicase, nucleotide excision repair factor 4
36	2182632	Hippocampus	16	9,7	4,2	9,2	13,5	KRUEPPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN
37	426084	Hippocampus	1,8	2,1	2	2,1	10	uncharacterized
38	1383155	Hippocampus	2,2	3,6	2,8	2,3	5,4	Ornithine decarboxylase antizyme 2
39	1923406	Hippocampus	1,9	3,3	2,7	2,7	1,8	cytokine inducible SH2-containing protein 2; STAT-induced STAT inhibitor 2; cytokine-inducible SH2 protein 2; suppressor of cytokine signaling 2 [Mus musculus]
40	1166973	Hippocampus	5,1	5	5,3	5,1	7,8	uncharacterized
41	1226040	Hippocampus	2,1	1,8	2,1	1,5	11,8	C2H2 Zinc finger related, KRUPPEL-LIKE FACTOR
42	1001321	Hippocampus	2,3	2,4	3	2,2	2,5	PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-BINDING PROTEIN
43	1429137	Hippocampus	1,7	2,7	1,9	2,1	2,8	CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1
44	2649364	Hippocampus	2	2,7	3,1	2,5	1,9	G10 protein homolog, zinc finger transcription factor
45	2645812	Cing	~5.6	2,3	~5.3	~5.8	~10.0	KRUEPPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN; NRAA: putative
46	1025562	Hippocampus	3,3	1,7	2,6	~6.2	~4.4	GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN ALPHA SUBUNIT; NRAA: guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide, G alpha q (Mus musculus)
46	1346439	Hippocampus						OCTAMER-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 3; NRAA: transcription factor Oct-3, short splice form, mouse
47	1617428	Mot	1,7	2	1,8	2,1	2	uncharacterized
48	1617428							CD166-RELATED; MOUSE CD166 ANTIGEN PRECURSOR (ACTIVATED LEUKOCYTE-CELL ADHESION MOLECULE) (ALCAM) (DM-GRASP PROTEIN)
49	421423	Vis	5	10,4	1,9	4,1	8,2	uncharacterized
50	419455	Vis	3,5	2,4	2,2	3,6	33,8	CTQ DOMAIN CONTAINING COMPLEMENT AND COLLAGEN; NRAA: Cer1_Rat cerebellin-like glykoprotein
51	2182169	Cing	6,5	4,4	2,6	2,2	7,8	MANNOSE-BINDING PROTEIN ASSOCIATED SERINE PROTEASE; NRAA: mannan-binding protein associated serine protease 1 (Mus musculus)
52	635134	Cing						UREA TRANSPORTER ; NRAA: solute carrier family 14 (urea transporter), member 2 (Mus musculus)
53	635134	Cing	7,1	7,1	6,1	2	6,5	5-HYDROXYTRYPTAMINE 7 RECEPTOR; NRAA: 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7 (Mus musculus)
54	IMAGp998A081802	Hippocampus	3,1	2,9	-4,8	2,3	2,1	KRUEPPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN;SET domain
55	IMAGp998D10817	Cingulate	1,8	3,9	1,7	6,7	2	bHLH Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein inhibitor of DNA binding
56	IMAGp998F112559	Visual	~2.5	~3.1	~2.8	~2.5	~3.4	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR HSF2
57	IMAGp998F171546							
58	IMAGp998J211390	Hippocampus	4,7	2,3	5,9	4	2,6	KRUEPPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN
59	IMAGp998M1613	Hippocampus	2,9	1,7	2,4	1,2	2,1	BASIC HELIX-LOOP-HELIX TRANSCRIPTION FACTOR, TWIST-RELATED
60	IMAGp998O0762	Hippocampus	2	2,3	15,4	-1	1,7	zinc finger homeobox 1b (SIP1), a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes
61	IMAGp998K03815	Moto	1	2,1	1	2		
62	IMAGp998N16954	Visual	2,6	~7.8	2,2	2,3		
63	IMAGp998H10986	Moto	2,6	2,2	2,2	1,3		
64	IMAGp998E22993	Cingulate	~1.7	~6.7	~5.8	~8.4		
65	IMAGp998N15999		2,9	1,7	2,4	1,2	2,1	BASIC HELIX-LOOP-HELIX TRANSCRIPTION FACTOR, TWIST-RELATED
66	IMAGp998F021048	Hippocampus	3,9	3,6	4,9	~5.3	4,2	UNCHARACTERIZED, LIM-Domäne DNA-Bindung
67	IMAGp998H181050	Moto	2,9	~4.5	3	3,6		
68	IMAGp998D171146	Hippocampus	2,4	2,4	2,5	1,6		
69	IMAGp998K231337	Somatosensory	1,9	3,5	2,8	1,8	~6.4	Unbekannt Domain Hit zink Finger
70	IMAGp998P101411		2	2,3	15,4	-1	1,7	zinc finger homeobox 1b (SIP1), a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes
71	IMAGp998I061493	Hippocampus	4	1,9	4,2	-1,4	1,9	FORKHEAD transcription, brain development
72	IMAGp998O061511	Visual	3	6,5	8	3,7		
73	IMAGp998J031542	Visual	~3.9	~6.3	~6.7	3,9		
74	IMAGp998O071543	Hippocampus	~3.3	~3.1	2	2,4		
75	IMAGp998B231602	Hippocampus	5,4	3,6	1,2	3,8	2,3	LIM/HOMEBOX PROTEIN LHX9
76	IMAGp998C101608	Visual	~8.0	3,7	~11.6	1,4	1,6	FRAGILE X MENTAL RETARDATION SYNDROME PROTEIN
77	IMAGp998P181762	Hippocampus	~3.2	~2.9	~3.2	~2.3	~2.7	Uncharakterisiert
78	IMAGp998N201847							PLECKSTRIN
79	IMAGp998C191849	Cingulate	1,9	~5.4	~4.9	-6,5		
80	IMAGp998O152027	Moto	~2.5	~2.8	~1.8	~2.3		
81	IMAGp998M152062		1,7	1,6	3,1	2	1,3	RING-Finger, zink-Finger-Domäne + Nuclear Localization
82	IMAGp998H112093	Hippocampus	1,8	2,1	1,3	2,1		
83	IMAGp998E032133	Hippocampus	3,1	3,1	1,8	2,6	2,8	ENHANCER OF ZESTE-RELATED
84	IMAGp998F012321	Moto	~4.3	3,2	2,9	-1,1	2,2	OXYSTEROL-BINDING PROTEIN
85	IMAGp998N232667	Visual	7	2,5	3,4	-1,2	2	FORK HEAD DOMAIN PROTEIN
86	IMAGp998P172851	Visual	4,5	4,4	8,9	2,9	1,2	HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN
87	IMAGp998D032892	Cingulate	-3,6	2,7	2,1	2,6	2,5	KRUEPPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN
88	IMAGp998O102921	Visual, Somatos	31,8	3,4	7,3	~38.9		
89	IMAGp998B062931	Hippocampus	2	1,6	3	1,9	1,5	NUCLEAR FACTOR 1-B

90	IMAGp998I113134	Hippocampus	-1,5	2,2	2,2	19,6		
91	IMAGp998L223181							T-CADHERIN, homophilic cell adhesion, post-translational membrane targeting, integral plasma membrane protein, calcium-dependent cell adhesion
92	IMAGp998K083261		~2.7	2,4	1,8	2	1,6	CHROMO (CHRmatin Organization MODifier) domain proteins that alter the structure of chromatin to the condensed morphology of heterochromatin
93	IMAGp998P243439	Somatosensory	2,9	2,2	2,5	-1,2	2,8	MAD 2
94	IMAGp998G073448	Hippocampus	1,8	2	-1	2,3	2	NEUROLIGIN
95	IMAGp998H063529	Somatosensory	~5.0	4,8	1,5	1,7	~5.7	DM DNA binding domain
96	IMAGp998M163665		-1,4	2,1	2,7	2,9	2,8	Semaphorin 3C; immune response, axon guidance, neurogenesis, cell growth and maintenance, cell adhesion, peripheral plasma membrane protein
97	IMAGp998O023742	Hippocampus	2,1	1,8	2,7	2,1	1,7	WD DOMAIN-CONTAINING PROTEIN, Zinc finger protein
98	IMAGp998G213747	Hippocampus	2,3	2,3	1,2	2,9	2,1	WD40 REPEAT PROTEIN
99	IMAGp998J184838	Somatosensory	4,8	1,5	1,1	4,1	2	MYOCYTE-SPECIFIC ENHANCER FACTOR 2C
100	IMAGp998K225146	Hippocampus	2,1	1,5	2	1,7	1,8	CCAAT-BINDING FACTOR
101	IMAGp998E015393	Cingulate	-4,2	3,7	2,1	3,3	2,2	KRUEPEL-RELATED C2H2-TYPE ZINC-FINGER PROTEIN
102	IMAGp998D225533	Somatosensory	~2.9	~3.9	2,1	3,2	1,1	DNA MISMATCH REPAIR PROTEIN
103	IMAGp998O096601	Cingulate	1,8	2,1	-1,1	1,8	2,5	ETS TRANSLOCATION VARIANT 1,4,5
104	IMAGp998D226610	Hippocampus	3,6	3,9	1,1	2,7	2,7	ZINC FINGER C2H2, Homeobox
105	IMAGp998C0910256	Cingulate	1,7	1,2	~2.1	~2.0		
106	IMAGp998B1210317	Visual	1,9	1,5	~24.0	1,6		
107	IMAGp952A1619	Cingulate	1,2	~11.4	~9.9	~5.5	~7.7	GNDF RECEPTOR ALPHA
108	IMAGp952H0521	Somatos	3,4	4,1	1,3	3	2,5	transforming growth factor, beta receptor I
109	IMAGp952H0128	Hippocampus	2,6	2,6	1,5	2,5	3,1	ZINC FINGER ZFP-36-RELATED gonadotropin inducible transcription repressor-2
110	IMAGp952B1440	Hippocampus	1,6	1,9	7,1	1,9	1,8	bHLH of basic-helix-loop-helix transcription factor ME2
111	IMAGp952F1646	Visual	2,4	2,8	6,5	1,1	1,8	homeobox 1b Zfx1b zinc finger
113	IRAPp965O146	Hippocampus	1,5	1,5	-1,2	1,6	1,8	ForkHEAD Transkriptionsfaktor checkpoint suppressor 1 [Homo sapiens]
114	IMAGp998K14798	Hippocampus	6,6	4,9	1,5	5,7	5,8	Zink PHD-Finger SET und HMG-Box Enhancer fo Zeste related
115	IMAGp998B11898	Cingulate	1,8	1,8	2,7	1,9	-1,2	trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development
116	IMAGp998L211101	Moto	1,3	2,3	6,4	1,7	1,9	NCAM Zell-Adhesion NEOGENIN
117	IMAGp998A151135	Cingulate	1,2	~11.4	~9.9	~5.5	~7.7	GNDF RECEPTOR ALPHA
118	IMAGp998G041292	Moto	2,7	4	1,4	3,2	2,7	transforming growth factor, beta receptor I
119	IMAGp998H201394	Moto,Cingulate	~6.3	4,6	2	1,4	~4.0	HMG HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN
121	IMAGp998O061511	Visual	3	6,5	8	3,7	-1,1	Cadherin hypothetical protein XP_007074 [Homo sapiens]
122	IMAGp998O061512	Cingulate	3,3	7,1	1,1	8,2	4,1	CADHERIN hypothetical protein XP_007074 [Homo sapiens]
122	IMAGp998E081563	Cingulate	3,6	2,2	1,2	~19.7	2,3	PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE REGULATOR-RELATED
123	IMAGp998K031762	Hippocampus	2,6	2,6	1,5	2,5	3,1	ZINC FINGER ZFP-36-RELATED gonadotropin inducible transcription repressor-2
123	IMAGp998O061513	Visual	2,2	~17.2	5,1	7,1	-1,1	CADHERIN hypothetical protein XP_007074 [Homo sapiens]
123	IMAGp998E081564	Visual	3,1	1,9	~17.0	1,9	-1,2	PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE REGULATOR-RELATED
124	IMAGp998B182098	Hippocampus	1,6	1,9	7,1	1,9	1,8	bHLH of basic-helix-loop-helix transcription factor ME2
124	IMAGp998O061514	Cingulate	2,5	~22.2	1,1	5,7	8,8	Cadherin hypothetical protein XP_007074 [Homo sapiens]
125	IMAGp998O061515	Cingulate	6,1	5,4	1,2	1,5	5,3	Cadherin 2 6 hypothetical protein XP_007074 [Homo sapiens]
126	IMAGp998A142363	Visual	2,4	2,8	6,5	1,1	1,8	homeobox 1b Zfx1b zinc finger
126	IMAGp998O061516	Cingulate	1,6	6,2	1,1	4,8	3,2	Cadherin 2 6 hypothetical Homo Sapiens
127	IMAGp998P243130	Somatos	2,1	2,1	1,1	25,3	2	IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY
128	IMAGp998F043616	Hippocampus	2,3	2,3	1,6	2,3	2,1	Zink PHD DOMAIN AUTOIMMUNE REGULATOR fetal Alzheimer antigen Fac1 [Homo]
128	IMAGp998P243131	Visual	2,1	2,1	25,2	-1,1	1,8	IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY PROTEIN
129	IMAGp998F243790	Visual	4,8	3	1,8	-1,3	6,2	Cell surface TGF beta Signal Transduction inhibin beta-A
130	IMAGp998M133794	Hippocampus	2,8	3,1	3,2	3,3	3,5	SEMAPHORIN 3C axon guidance
131	IMAGp998A024480	Moto	1	11,4	22,9	2,1	9,4	ORPHAN NUCLEAR RECEPTOR NURR1 Steroid-/Retinsäure-Rezeptor C4 Zink Finger
131	IMAGp998M133795	Hippocampus	2	1,8	1,9	2,2	1	SEMAPHORIN 3C axon guidance
132	IMAGp998C104532	Hippocampus	4,1	4	2,1	3,3	2,3	bZIP Basic Leucine Zipper fos-like antigen
132	IMAGp998M133796	Cingulate	-1	1,9	1,7	1,9	2,1	SEMAPHORIN 3C axon guidance
133	IMAGp998J054532	Hippocampus	2,3	2,3	1,5	2,3	2,1	Krab-box Zink Finger KRUPPEL-LIKE FACTOR 12 AP-2 transcription factor / repressor
134	IMAGp998D074840	Hippocampus	1,5	1,5	-1,2	1,6	1,8	ForkHEAD Transkriptionsfaktor checkpoint suppressor 1 [Homo sapiens]
135	IMAGp998M199515	Visual	2,7	2,5	~23.7	3,6	1,2	Neuronal SHC endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3
136	IMAGp998M199516	Cingulate	2,3	2,1	-1,2	~20.5	3,1	Neuronal SHC endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3
136	IMAGp952F0843	Moto	8,6	10,7	~28.9	2,3	3,6	Zink BTB POZ KELCH-RELATED Ankyrin (p53) RAT caa
137	IMAGp952I2061	Somatos	10,2	4,7	-1,2	17,9	2,1	unbekannt
138	IMAGp998D10817	Cingulate	1,8	3,9	1,7	6,7	2	bHLH Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein inhibitor of DNA binding
139	IMAGp998C19992	Visual	2,6	1,8	~24.0	1,3	1,7	Zink Finger Transkriptionsfaktor Png-1 nervous system-specific embryonic development
140	IMAGp998D071102	Hippocampus	2	2	1,9	2	1,8	Zink Finger Bbox Ring Finger
141	IMAGp998F011102	Moto	6,9	1,8	2,4	1,9	1,1	Homeobox HOX pre B-cell leukemia transcription factor 1 Homo s. fusion Pbx1
142	IMAGp998N121147	Somatos	6,2	2,9	1,6	231,1	10,1	NEUROPEPTIDE Y-RELATED
143	IMAGp998L191241	Visual	11,9	5,5	20,9	1,2	2,4	unbekannt
145	IMAGp998B201555	Hippocampus	3,9	1,3	2,1	2	2,2	bHLH PAS nuclear receptor coactivator 1
147	IMAGp998J191985	Cingulate	1,3	3,2	1,8	~21.2	1,9	T-Box -Transkriptionsfaktor EOMESODERMIN-RELATED Brachyury development
148	IMAGp998A172064	Hippocampus	2,4	1,9	2,2	3,5	3,4	bHLH BASIC HELIX-LOOP-HELIX TRANSCRIPTION FACTOR, TWIST-RELATED MIST1
149	IMAGp998H102132	Hippocampus	7,5	6,5	5,4	6,7	3,9	unbekannt (mRNA Capping Enzyme / T-Box related)
150	IMAGp998B132207	Moto	8,6	10,7	~28.9	2,3	3,6	Zink BTB POZ KELCH-RELATED Ankyrin (p53) RAT caa
151	IMAGp998G042503	Hippocampus	3,7	1,7	3	2,2	2,4	LIM-Domain HOMEBOX PROTEIN
153	IMAGp998B193746	Hippocampus	3,4	2,8	5,3	3,6	3,1	nuclear factor I/B Nf1b

In-situ-Hybridisierungen zur Überprüfung der Expressionsvorhersagen

Die Liste der in dem Microarray-Screen gefundenen Sequenzen wurde annotiert und die Vorhersagen mit bisher publizierten Genexpressionen verglichen, wobei sich eine Übereinstimmung zu den Chip-Vorhersagen von 70% ergab.

Anschließend wurden für als bisher unbekannt annotierte Gene und ESTs in-situ-Hybridisierungen zur eigenen Verifizierung der Chip-Vorhersagen angefertigt.

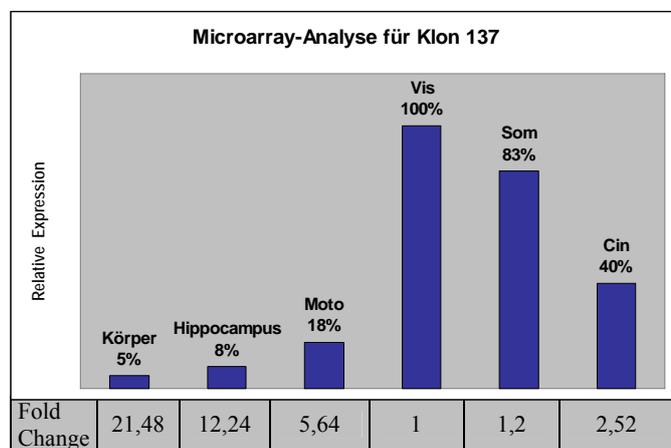


Abbildung 40: Vergleich der Chip-Vorhersage unseres Screens mit schon publizierten Daten, hier im Beispiel für das Gen *Neuropilin*. Dieses wurde im Hippocampus vorausgesagt mit den relativen Expressionswerten (*Fold Changes*) zu den anderen Geweben von 4; 3,1; 3,5; 2,2; 2,9 (Motorcortex, visueller Cortex, somatosensorischer und cingularer Cortex sowie Körper). Dies entspricht den veröffentlichten Daten von einer besonderen Expression im Hippocampus (Kawakami, Kitsukawa et al. 1996).

Klon 137 – bisher uncharakterisiertes Gen *Nse1*

Klon 137 annotiert zu dem Gen *Nse1*, das bisher hauptsächlich in Hefezellen charakterisiert ist und eine Rolle bei der DNA-Reparatur in dem *Smc5-Smc6*-Komplex hat (McDonald WH 2003). Die **Expression dieses Gens in Vielzellern ist bisher nicht publiziert**, vielleicht auch weil von einer ubiquitären Präsenz angesichts der annotierten Genfunktion ausgegangen wurde. Umso bemerkenswerter ist die hier festgestellte **Expression mit hoher regionaler Spezifität im Gehirn**, insbesondere dem Cortex und der fast nicht messbaren Aktivität im restlichen Körper.

Die für ISH von den Microarray-Chips abgeleitete Sequenz von Klon 137 stammt aus dem IMAGE-Klon IMAGp952I2061 von der RZPD-Datenbank.



Klon 137 wurde für visuellen und somatosensorischen Cortex vorhergesagt. ISH zeigte die stärkste Expression im parietalen Cortex, der zum somatosensorischen System gehört. Die Korrelation der ISH mit der Microarray-Vorhersage zeigt sich ferner an der fehlenden Expression im Hippocampus sowie im Körper. Es ergibt sich insgesamt ein lokalisiertes, aber auch komplexes Expressionsmuster mit weiterer Expression im baso-lateralen Telencephalon, insularischen Cortex, LMS, ab E18 Expression in der subventrikulären und ventrikulären Zone.

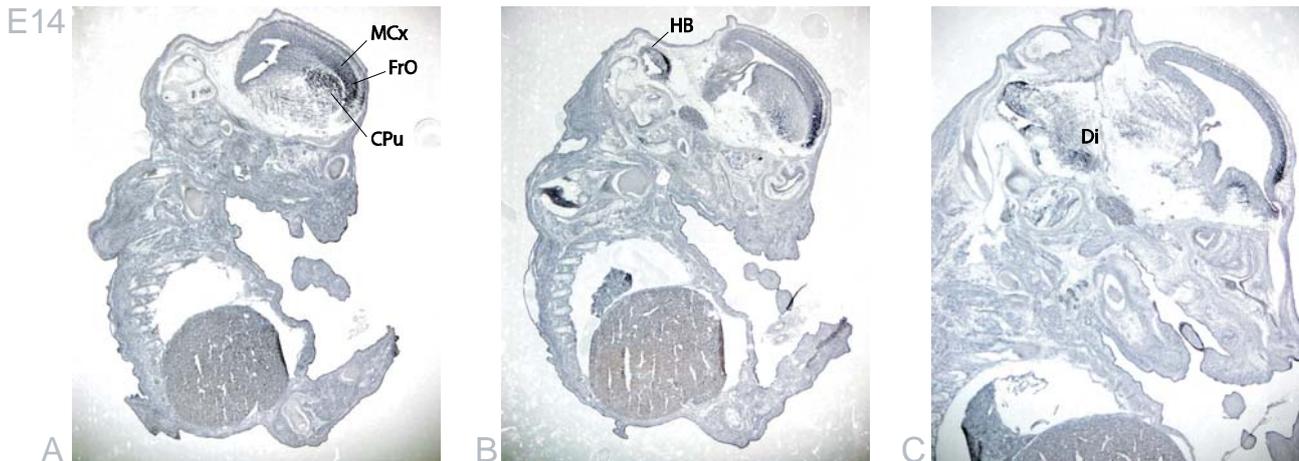


Abbildung 41: In-situ-Hybridisierung für mRNA von **Klon 137** zeigt in sagittalen Schnitten des Stadiums E14 noch wenig Übereinstimmung mit den Chip-Vorhersagen, die allerdings für das Stadium E18,5 ausgewertet wurden. Beachtenswert ist das Fehlen von signifikanter Expression im gesamten Körper. Expression findet sich ausschließlich in bestimmten sich entwickelnden Hirnstrukturen: Caudate Putamen (*CPu*), frontaler orbitaler Cortex (*FrO*), Motor Cortex (*MCx*), Hinterhirn (*Hindbrain, HB*), Diencephalon (*Di*).

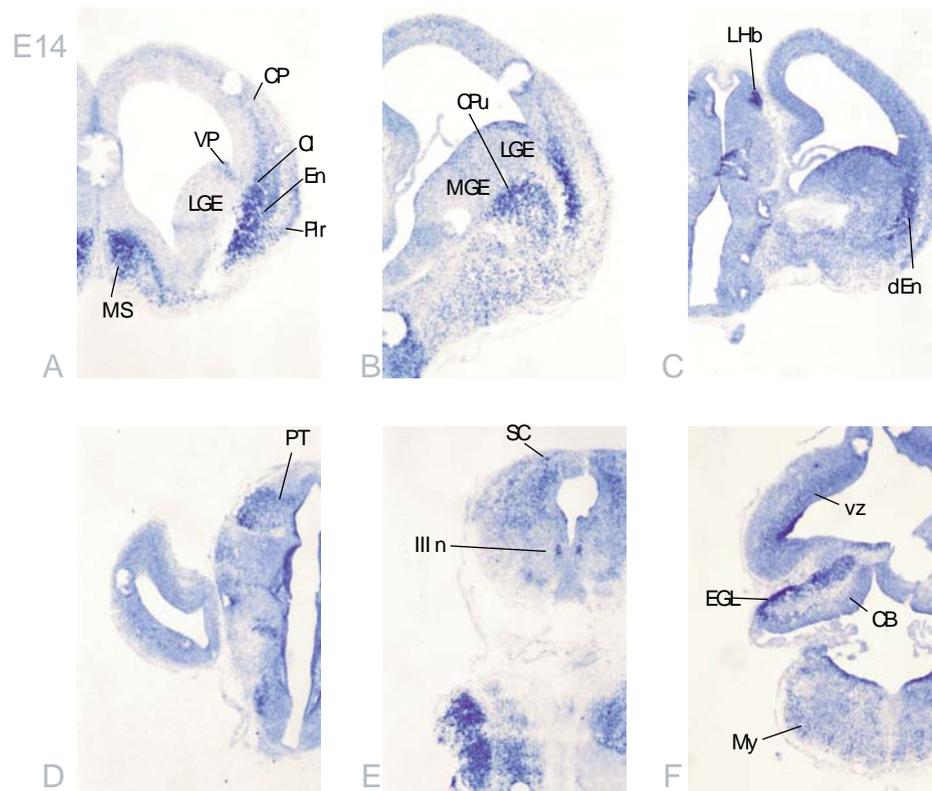


Abbildung 42: In Querschnitten des E14-Mausgehirnes werden weitere per in-situ-Hybridisierung angefärbte Strukturen sichtbar: Ventrales Pallium (*VP*), corticale Platte (*CP*), Claustrum (*Cl*), endopiriformer Cortex (*En*), piriformer Cortex (*Pir*), mediales Septum (*MS*), laterale ganglionäre Eminenz (*LGE*), mediale ganglionäre Eminenz (*MGE*), Caudate Putamen (*CPu*), lateraler habenularer Nucleus (*LHb*), dorsaler endopeduncularer Nucleus (*dEn*), Praetektum (*PT*), superiorer Colliculus (*SC*), Nucleus des dritten okulomotorischen Nervens (*III n*), Myelencephalon (*My*), externe germinale Schicht (*EGL*), Cerebellum (*CB*), ventrikuläre Zone (*vz*).

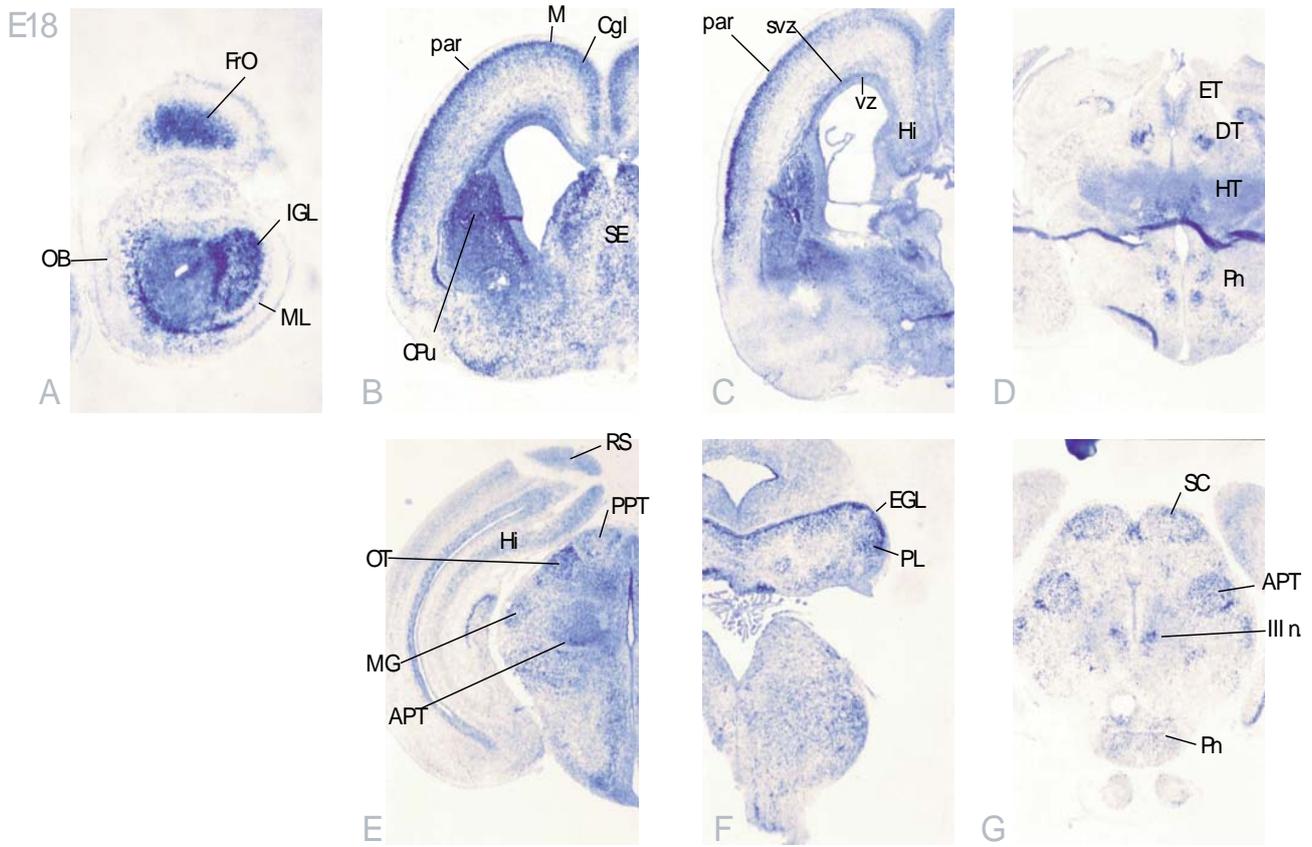


Abbildung 43: Die in-situ-Hybridisierung gegen **Klon 137** zeigt im Mausgehirn des Stadiums E18 eine Verschiebung der Expressionspeaks gegenüber E14. So ging die Expression im motorischen Cortex relativ zurück und wurde im parietalen Cortex stärker. Ferner kam Expression in weiteren Gebieten hinzu: Caudate Putamen (*CPu*), olfaktorischer Bulbus (*OB*), interne granuläre Schicht (*IGL*), frontaler orbitaler Cortex (*FrO*), mitrale Zellschicht (*ML*), parietaler Cortex (*par*), motorischer Cortex (*M*), Corpus geniculatum laterale (*Cgl*), Septum (*SE*), subventrikuläre Zone (*svz*), ventrikuläre Zone (*vz*), Hippocampus (*Hi*), Epithalamus (*ET*), dorsaler Thalamus (*DT*), Hypothalamus (*HT*), Pons (*Pn*), Nucleus des optischen Traktes (*OT*), retrospinaler Cortex (*RS*), posteriorer praetektaler Nucleus (*PPT*), medialer genicularer Nucleus (*MG*), anteriorer praetektaler Nucleus (*APT*), externe germinative Schicht des Cerebellums (*EGL*), Purkinje-Zellschicht des Cerebellums (*PL*), superiorer Colliculus (*SC*), Nucleus des dritten okulomotorischen Nervens (*III n*).

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die ISH zum Stadium E18 gut mit den Microarray-Vorhersagen desselben Stadiums übereinstimmt und sich eine erweiterte Expression gegenüber dem früheren Zeitpunkt E14 einstellt.

Klon 149 – unbekanntes Gen

Klon 149 zeigte eine hervorragende Übereinstimmung von der Microarray-Vorhersage zu der Verifikation mit ISH. Das Expressionsmaximum lag deutlich im Hippocampus. Es handelt sich um ein neues Gen, dessen Expression bisher noch nicht publiziert worden ist.

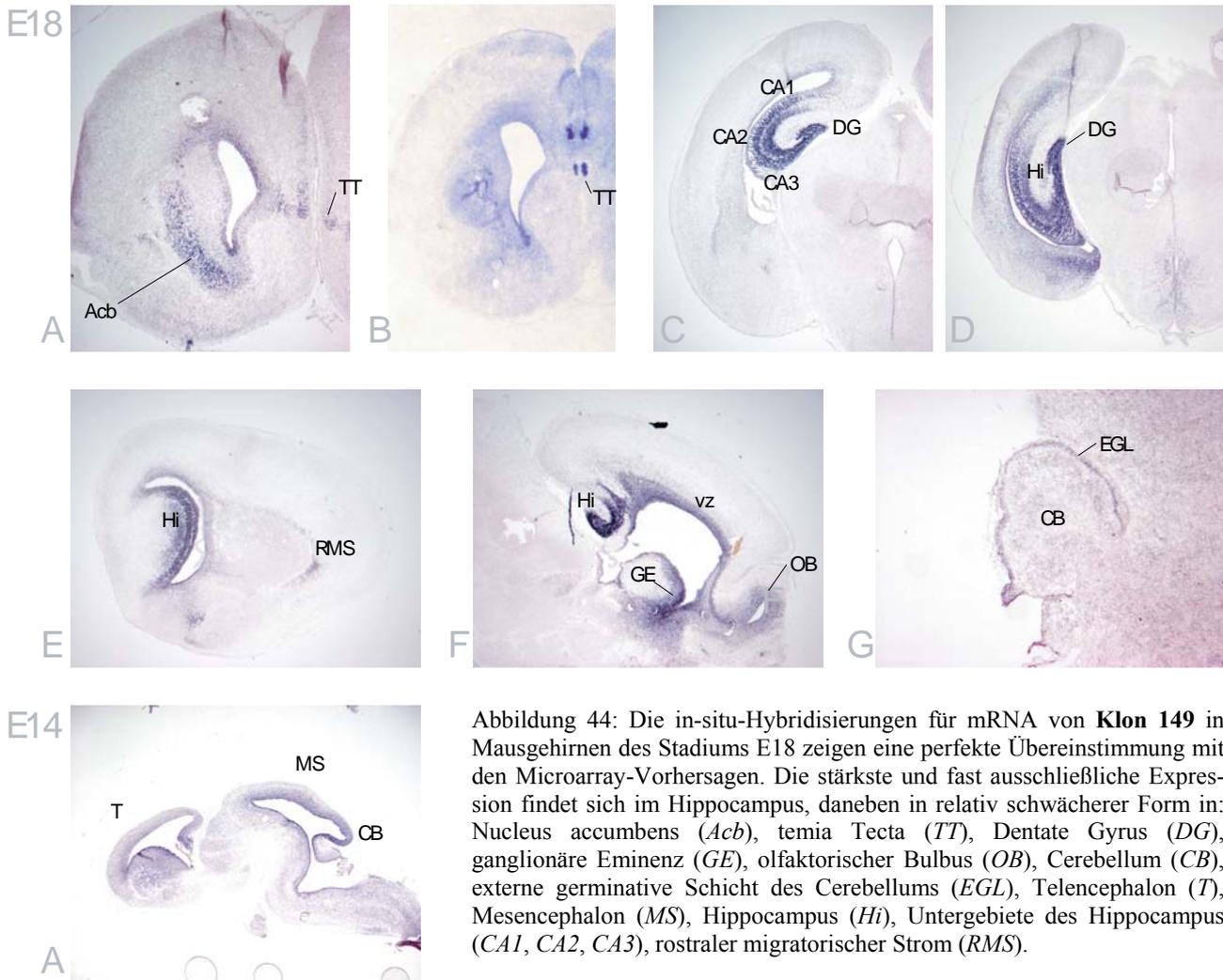
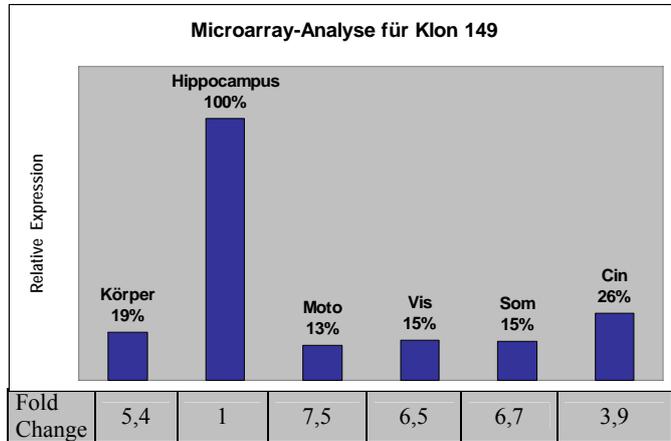
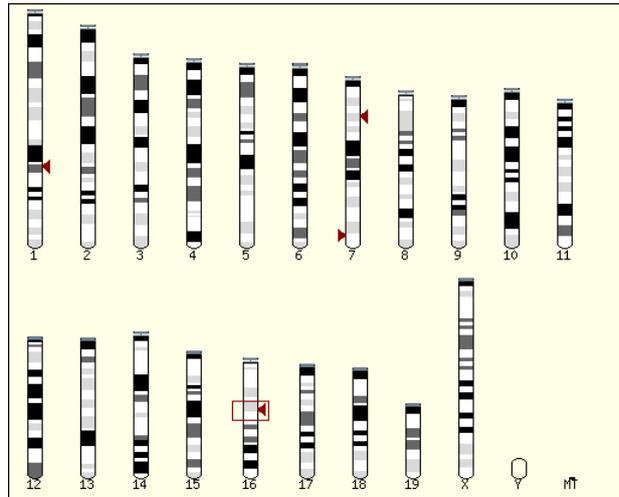


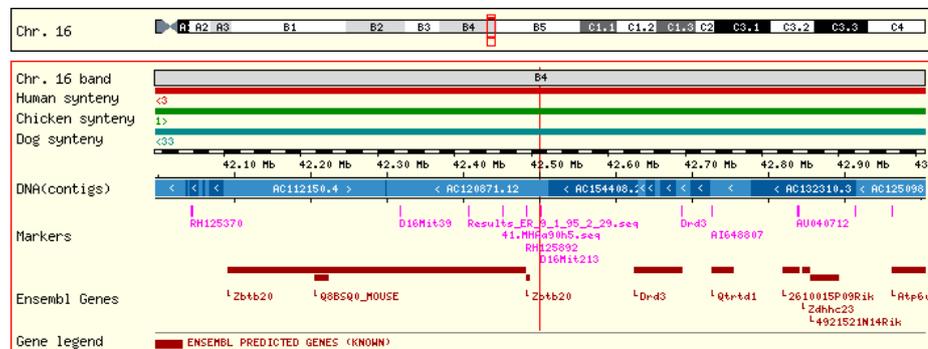
Abbildung 44: Die in-situ-Hybridisierungen für mRNA von **Klon 149** in Mausgehirnen des Stadiums E18 zeigen eine perfekte Übereinstimmung mit den Microarray-Vorhersagen. Die stärkste und fast ausschließliche Expression findet sich im Hippocampus, daneben in relativ schwächerer Form in: Nucleus accumbens (*Acb*), temia Tecta (*TT*), Dentate Gyrus (*DG*), ganglionäre Eminenz (*GE*), olfaktorischer Bulbus (*OB*), Cerebellum (*CB*), externe generative Schicht des Cerebellums (*EGL*), Telencephalon (*T*), Mesencephalon (*MS*), Hippocampus (*Hi*), Untergebiete des Hippocampus (*CA1*, *CA2*, *CA3*), rostraler migratorischer Strom (*RMS*).

Die auf den Microarray-Chips verwendete Sequenz von Klon 149 stammt aus dem IMAGE-Klon IMAGp998H102132 von der RZPD-Datenbank, Affymetrix ID 113738_at, IMAGE ID 860985. In der Tabelle die Accession-Nummer der für die ISH verwendeten Sequenz.

Accession No	Type	Length [bp]
AA512664 (gb)	5' EST	420
BX521247 (gb)	5' EST	523



Die für die ISH verwendete **Sondensequenz AA512664 lokalisiert auf dem Chromosom 16** der Maus (Abbildungen aus der Ensembl-Datenbank, <http://www.ensembl.org>). **Dort ist allerdings kein bekanntes Gen verzeichnet.** Das Alignment liegt zwischen den bekannten Genen *Zbtb20* und *Drd3* (Accili, Fishburn et al. 1996).



Durch Blast der Sondensequenz AA512664 gegen die NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) konnten Sequenzen mit höchster Homologie (E-Value als Wahrscheinlichkeit für zufällige Übereinkunft = 0.0) gefunden werden:

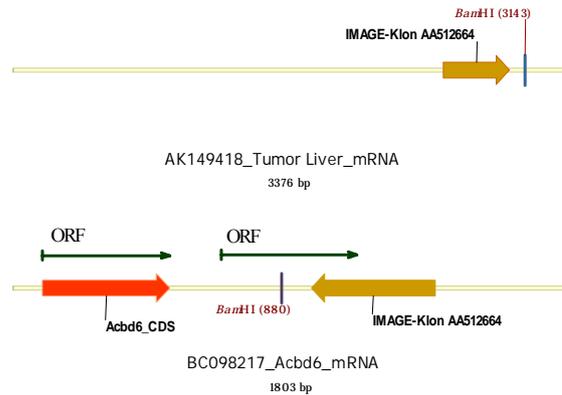
		E-Value
gi 55416049 gb AC120871.12 	Mus musculus chromosome 16, clone RP	733 0.0
gi 67514202 gb BC098217.1 	Mus musculus acyl-Coenzyme A bindi...	733 0.0
gi 74143622 dbj AK149418.1 	Mus musculus adult male liver tum...	733 0.0
gi 58652376 gb AC154408.2 	Mus musculus BAC clone RP24-259A5 fro	733 0.0
gi 21622663 gb AC093010.7 	Homo sapiens 3 BAC RP11-553L6 (Ros...	176 3e-41

Hierbei lokalisiert die Sequenz von AK149418 ebenfalls in dem Bereich auf Chromosom 16. Zusätzlich passt es zu einer exprimierten cDNA-Sequenz:

```

ACCESSION: AK149418
Mus musculus adult male liver tumor cDNA, RIKEN full-length
enriched library, product:unclassifiable, full insert sequence.
/cell_type="tumor"
/tissue_type="liver"
/dev_stage="adult"
    
```

Die 3376 bp lange cDNA-Sequenz weist keine zu bekannten Proteinen annotierbaren offenen Leseraster auf. Möglicherweise könnte es sich um ein RNA-Gen handeln. Die **Sondensequenz** innerhalb dieser mRNA ist markiert (rechts oben).



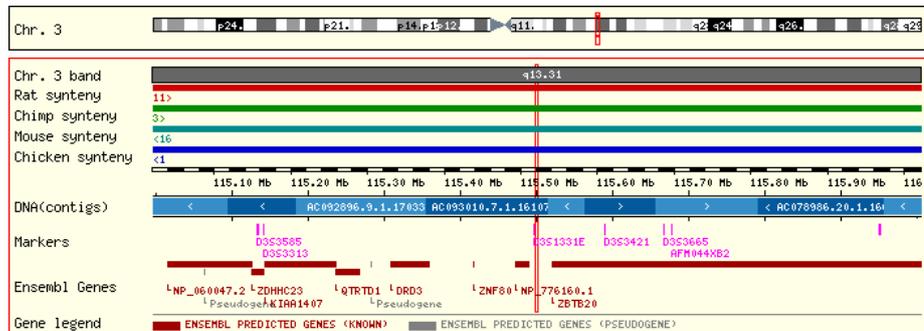
Neben dieser Homologie aligniert die **Sondensequenz** von Klon 149 gleichermaßen mit einem bekannten Gen, das auf Chromosom 1 lokalisiert ist und ein annotierbares offenes Leseraster enthält, das für das Protein **Acdb6** (*Acyl-CoA-Binding Diazepam Inhibitor*) kodiert (rechts unten).

```

ACCESSION   BC098217:
Mus musculus acyl-Coenzyme A binding domain containing 6, mRNA
(cDNA clone IMAGE:3465595), complete cds.
/tissue_type="Mammary gland, lactating mouse"
/gene="Acdb6"
/product="Acdb6 protein"
/translation="MATPFLPSGATTGDSGGELSSGDDSGDMESFQTPEAEGTRSLAELFEKAAAHVQGLVQVASREQ
LLYLYARFKQVKVGNCNTPKPNFFDFEGKQKWEAWKALGDSSPSQAMQEYIAAVKKLDPGWNPQVPALLEFLS"
    
```

Das Bemerkenswerte hier ist, dass die Sondensequenz sowohl auf Chromosom 16 als auch auf Chromosom 1 identisch ist, bis auf den Unterschied, dass sie jeweils komplementär orientiert ist. Da die ISH mit einer gerichteten Probe für die antisense-Sonde durchgeführt worden ist, mit sense-Probe als negativer Kontrolle, müssen die ISH-Bilder die Resultate für das unbekannte Gen AK149418 auf Chromosom 16 widerspiegeln.

Wenn man des Weiteren die Maus-Sequenzen mit dem Menschen vergleicht, so lässt sich eine Homologie zu diesem unbekanntem Gen wieder finden an konservierter Position bei *Zbtb20* und *Drd3* (Bild rechts). Im Gegensatz dazu enthält *Acdb6* im Menschen nicht mehr die oben verzeichnete Sondensequenz, welche in *Acdb6* des Menschen also nicht konserviert blieb. Die Konservierung des Lokus für das unbekannte Gen AK149418 spricht für die Realität dieses Gens.



```

Accession: NM_032360
1089 bp mRNA Homo sapiens acyl-Coenzyme A binding domain containing 6 (ACBD6),
/translation="MASSFLPAGAITGDSGGELSSGDDSGEVEFPSPHSEIEETSCLAELEKAAAHVQGLIQQVASREQ
LLYLYARYKQVKVGNCNTPKPSFFDFEGKQKWEAWKALGDSSPSQAMQEYIAVVKLDPGWNPQIPEKKGKEANTGFG
GPVISSLYHEETIREEDKNIFDYCRENNIDHITKAIKSKNVVDVNVKDEEGRALLHWACDRGHKELVTVLLQHRADINC
QDNEGQTALHYASACEFLDIVELLQSGADPTLRDQDGLPEEVTGCKTVSVLVLQRHTTGKA"
    
```

Klon 103 – Gen *Etv5* aka *ERM*

Klon 103 annotiert als das Gen *Etv5* (ETS variant gene 5), das synonym unter dem Namen *ERM* bekannt ist und ein bekannter **Transkriptionsfaktor der ETS-Familie** ist. Es steht unter der Kontrolle durch die Signaltransduktionskaskaden *MAPK* und *PKA*. Die nächsten Verwandten sind die Gene *ER81* und *PEA3*. **Die Expression im Gehirn des Stadiums E18 ist noch nicht beschrieben.** Bisherige Veröffentlichungen beschränkten sich auf frühe Entwicklungsstadien bis E15,5, wo die Entwicklung des cerebralen Cortex gerade erst begonnen hat (Anne Chotteau-Lelièvre 1997). Die auf den Microarray-Chips und ISH verwendete Sequenz von Klon 103 stammt aus dem IMAGE-Klon IMAGp998O096601 von der RZPD-Datenbank.

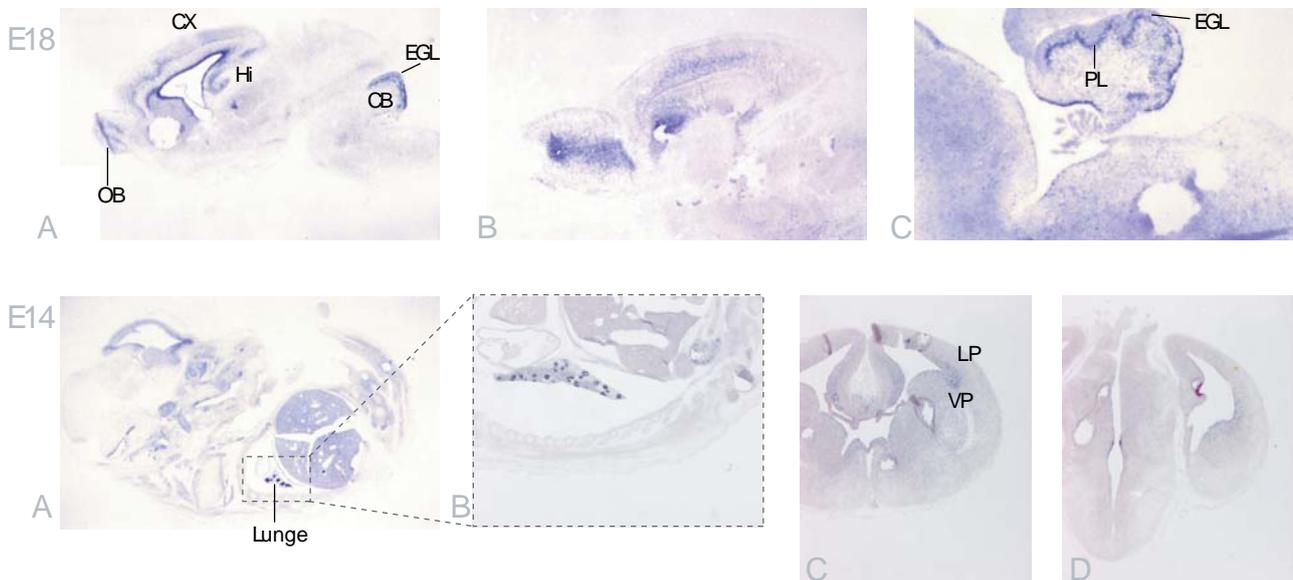
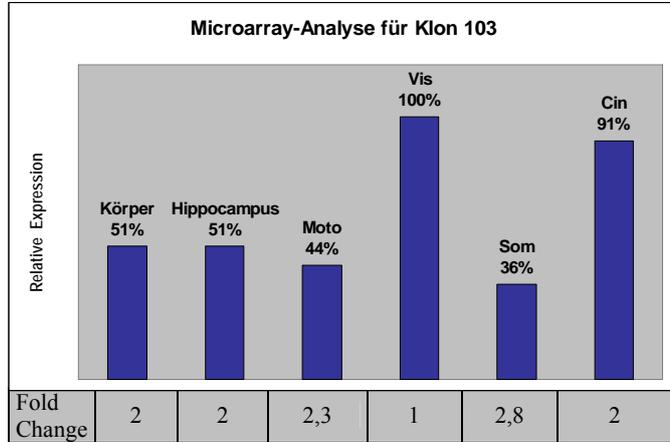


Abbildung 45: Die in-situ-Hybridisierungen für mRNA vom **Klon 103** in Mausgehirnen und Embryonen des Stadiums E18 zeigen ein interessantes Expressionsmuster, das sich an der Microarray-Vorhersage orientiert. Die Expression im Cortex ist hierbei nicht nur regionen-, sondern auch schichtenspezifisch (mehr dazu auf nächster Seite). Im restlichen Körper sieht man keine Anfärbung außer in der Lunge, was bereits bekannt ist. In einem Knock-out für *ERM* in der Lunge (Liu Y 2003) fehlen alveolare Epithelzellen vom Typ I. Weitere Expressionsgebiete im Gehirn sind: Cortex (*CX*), Hippocampus (*Hi*), olfaktorischer Bulbus (*OB*), Cerebellum (*CB*), externe germinative Schicht des Cerebellums (*EGL*).

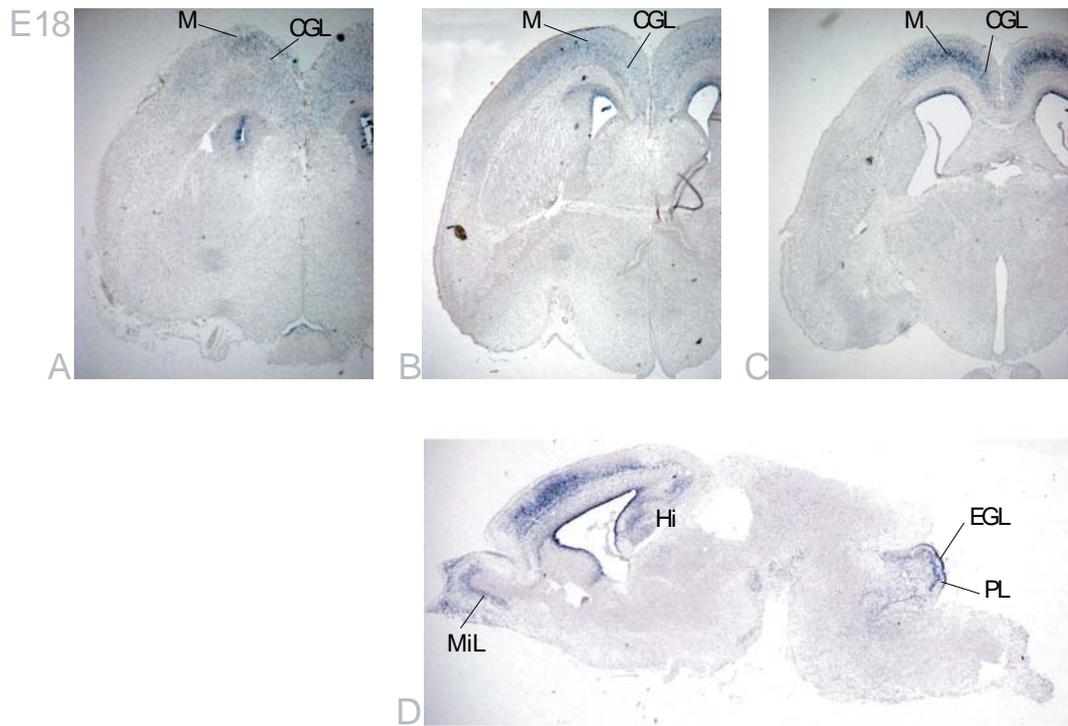


Abbildung 46: Im Gegensatz zur Microarray-Vorhersage zeigt die in-situ-Hybridisierung für mRNA von **Klon 103** ihr Expressionsmaximum in Mausgehirnen des Stadiums E18 im Motorcortex (*M*) statt im visuellen Cortex. Dabei fällt die schichtenspezifische Expression im Cortex auf und der Übergang der Expression zwischen Schichten entlang wechselnder Regionen. So erscheint im rostralen (frontalen) Cortex die Expression in allen corticalen Schichten, wohingegen im caudalen (posterioren) Cortex nur noch in den Schichten 5 und 6. Dies ist in Bild D deutlich zu erkennen. Weitere relativ schwächere Expression findet sich in: Hippocampus (*Hi*), mitrale Zellschicht (*MiL*), Corpus geniculatum laterale (*CGL*).

Klon 133 – Gen *Klf12* aka *AP-2rep*

Klon 133 entspricht dem bekannten Gen *Klf12*, das ein Repressor von dem Transkriptionsfaktor *AP-2* ist. Allerdings ist die Expression im Gehirn bisher noch nicht beschrieben worden, im Gegensatz zu *AP-2* selber. Bisherige Expressionsstudien befassten sich mit *Xenopus* sowie *Zebrafisch* in Frühstadien, wo kein Cortex vorhanden ist, z.B. (Maéno 2003).

Die auf den Microarray-Chips verwendete Sequenz von Klon 133 stammt aus dem IMAGE-Klon IMAGp998J054532 von der RZPD-Datenbank.

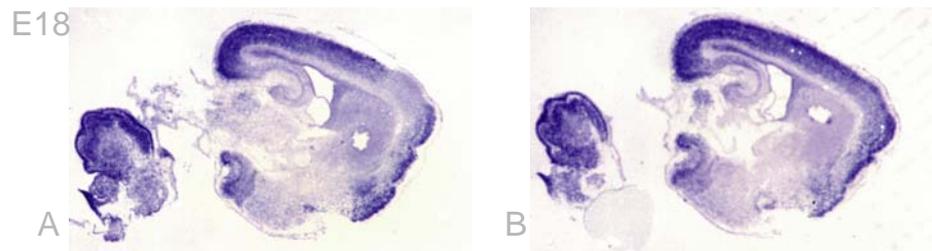
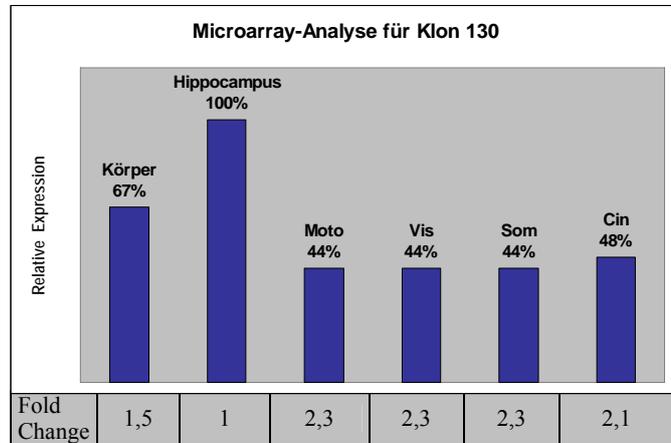


Abbildung 47: Die in-situ-Hybridisierung für mRNA von **Klon 133** im Mausgehirn des Stadiums E18 ist ein Beispiel für eine geringe Korrelation zur Microarray-Vorhersage, obgleich das Gen eine interessante Expression im Gehirn und auch im Cortex aufweist. Im Cortex ist es über mehrere Regionen und in allen Schichten weitläufig exprimiert und kommt zudem im Cerebellum intensiv vor.

Positivkontrolle – Klone 59 und 65 – Gen *Nfi/x*

Die auf den Microarray-Chips verwendeten Sequenzen von den Klonen 59 und 65 stammten aus den IMAGE-Klonen IMAGp998N15999 und IMAGp952M1613 von der RZPD-Datenbank und annotierten zu dem Gen *Nfi/x* (*Nuclear factor x*). Die beiden Klone entsprachen verschiedenen Bereichen dieses Gens. Unsere Versuche reproduzierten die schon bekannten Expressionsdaten insbesondere für das Gehirn, so dass es hier unter anderen als Positivkontrolle diente (Ali Z. Chaudhry 1997).

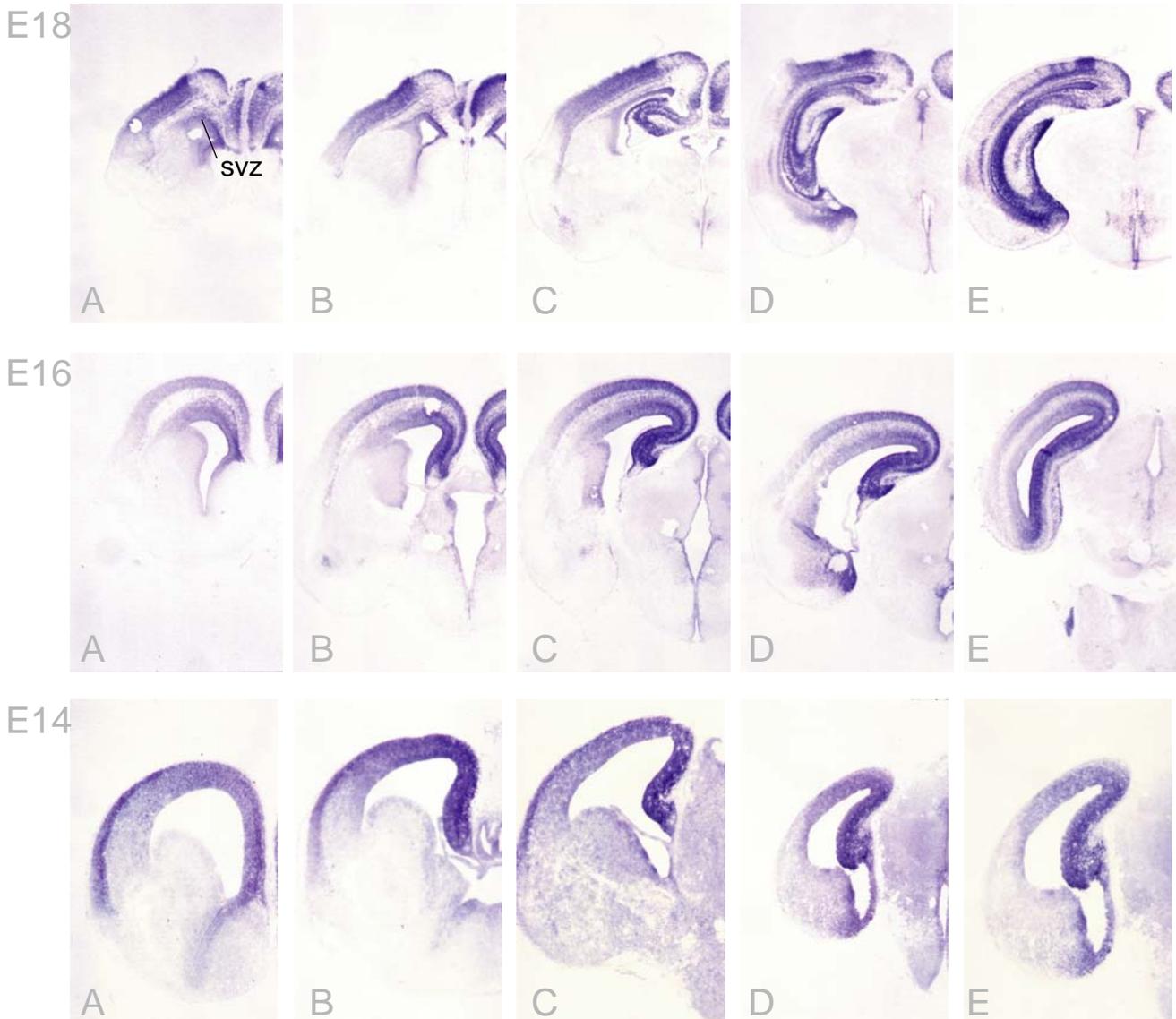
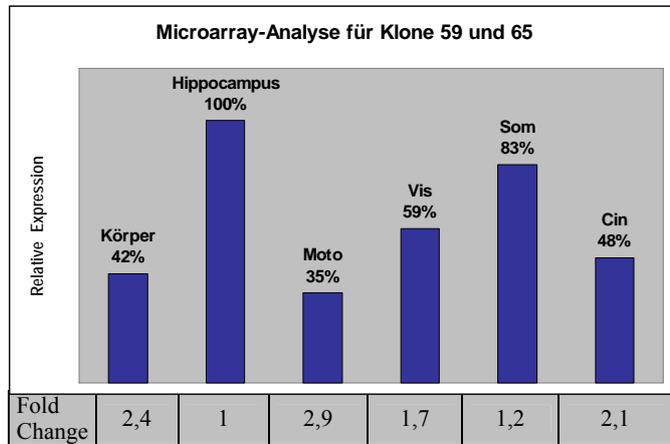
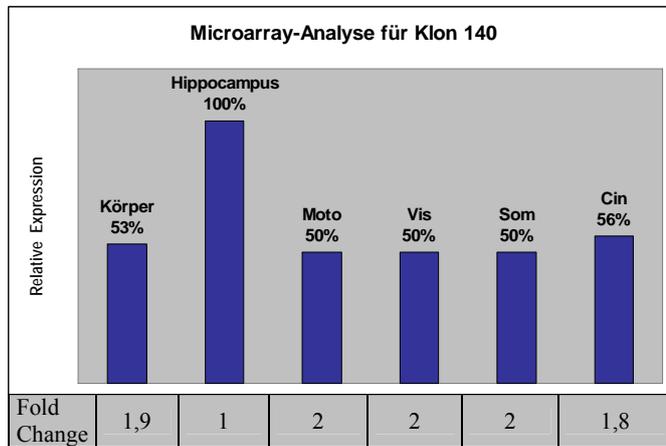


Abbildung 48: Die in-situ-Hybridisierung bestätigt die starke Expression im Hippocampus. Zusätzlich wird Expression in der subventrikulären Zone (svz) sichtbar. Interessant ist der Gradient vom Hippocampus zu anderen Cortexregionen.

Das Gen *TRIM46* als Kandidat für eine detaillierte Analyse

Der Klon 140 unseres Microarray-Screens zeigte in der Verifikation der Microarray-Vorhersagen durch in-situ-Hybridisierung (ISH) ein **interessantes Expressionsmuster im Gehirn** (siehe ab Seite 116) mit Expression **insbesondere im Hippocampus**, so wie auch von den Chip-Daten vorhergesagt. Zudem annotierte er als **ein bisher unbekanntes und uncharakterisiertes Gen der Benennung *TRIM46* von der ansonsten gut bekannten TRIM-Protein-Familie, aus deren Reihen viele Gene an Krankheitsbildern beteiligt sind und die in vielen wichtigen Prozessen eine Rolle spielen** (siehe ab Seite 26). Daher bot sich eine detailliertere Charakterisierung dieses Gens bis hin zur Herstellung einer transgenen Maus an.



Um eine erste Übersicht über das Gen und seinen Lokus auf dem Genom zu gewinnen, wurde die auf den Chips verwendete Oligonukleotid-Sequenz bestimmt und der zugrunde liegende cDNA-Klon (IMAGE-Klon) bei der RZPD-Datenbank bestellt, der zugleich auch als in-situ-Sonde verwendet werden konnte: IMAGp998D071102 (<http://www.rzpd.de>)
Des Weiteren konnten mit der in der RZPD-Datenbank erhältlichen Sequenz weitere Annotationen vorgenommen werden. **Da das Gen noch unbekannt war, wurde es nicht direkt beispielsweise mit Blast gefunden, sondern musste mit der Celera- oder ENSEMBL-Datenbank auf das Maus-Genom projiziert werden**, welches sich zurzeit in der Genomsequenzierung befand. Da Celera nicht mehr fortgeführt wird, werden hier die Daten von der **ENSEMBL-Genomdatenbank** dargestellt. Es zeigte sich eine wahrscheinliche **Lokalisierung der Sequenz von Klon 140 auf dem Maus-Chromosom 3**.

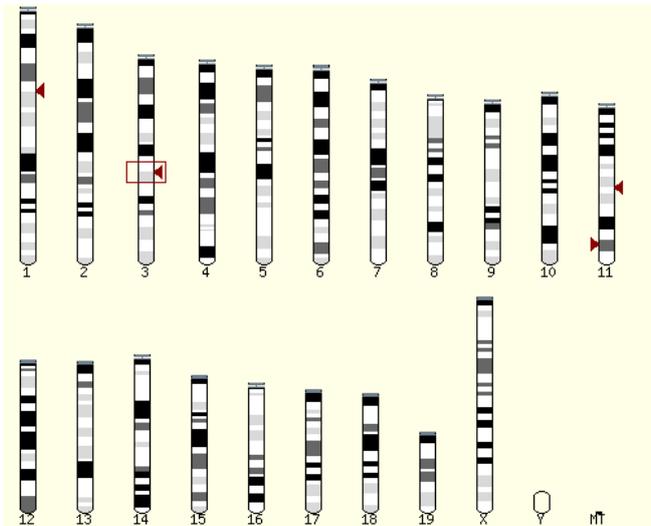


Abbildung 49: **Projektion** der Sequenz von Klon 140 bzw. dem späteren *TRIM46* auf **Maus-Chromosom 3** mittels ENSEMBL.

Die Sequenz des IMAGE-Klons projizierte auf einen Bereich zwischen zwei bioinformatisch vorhergesagten potentiellen Genen (*TRIM46* und *Krtcap2*), von denen es einem zugeordnet werden sollte. Hierzu wurden von anderen Sequenzabschnitten dieser beiden Gene Proben für in-situ-Hybridisierungen kloniert und mit dem Muster von Klon 140 verglichen. Dabei ergaben die verwendeten Sonden für *Krtcap2* keine verwertbaren Muster im Gehirn, währenddessen eine Sonde von *TRIM46* ebenfalls ein deutliches Muster wie erwartet im Hippocampus zeigte (siehe ab Seite 116), zudem noch deutlicher und mit weniger Hintergrund. Da *TRIM46* einer viel versprechenden Proteinfamilie angehört, währenddessen über *Krtcap2* (*Keratinocyten assoziiertes Protein 2*) so gut wie gar nichts bekannt war (und wir uns primär für das Gehirn und weniger Keratinozyten interessierten), war die Entscheidung nahe liegend, *TRIM46* für eine detaillierte Charakterisierung auszuwählen.

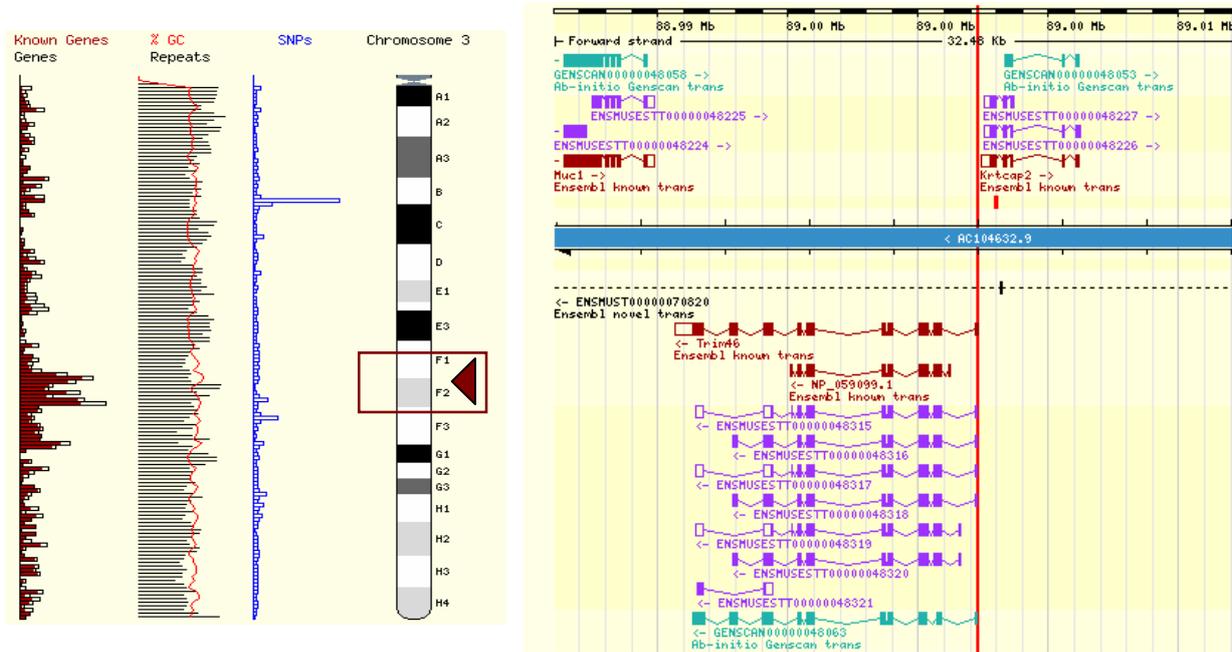
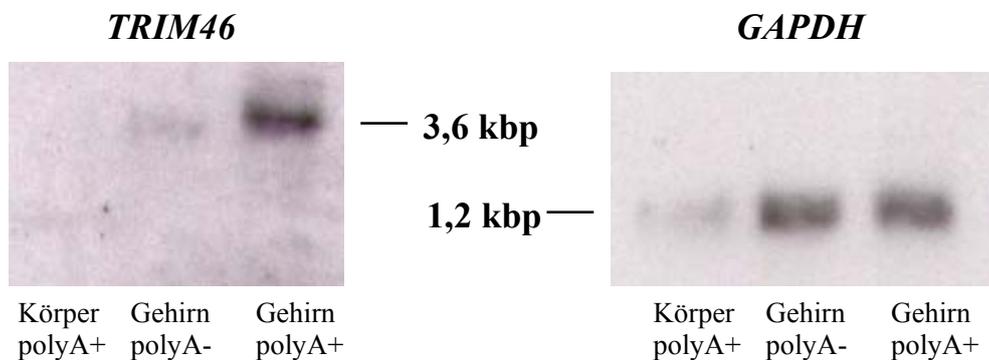


Abbildung 50: Das Chromosom 3 umfasst 158.945.675 bp, 1360 bekannte oder vorhergesagte Gene. Die projizierte Sequenz liegt in dem Bereich höchster Gendichte (ganz links). Rechts ein Ausschnitt des projizierten Bereiches mit vorhergesagten oder bekannten Genloci. Klon 140 stellt die rote senkrechte Linie dar zwischen *TRIM46* und *Krtcap2*. *TRIM46* wird hier von rechts nach links abgelesen, *Krtcap2* in umgekehrter Richtung. Im Chromosomendurchschnitt sollten alle 117.000 bp ein Genlocus kommen. In diesem Bereich findet sich alle 11.000 bp einer, also eine 10 Mal höhere Gendichte.

Northern-Blot-Analyse für das *TRIM46*-Gen

Hauptziel der Northern-Blot-Analyse war die empirische Überprüfung der aus den Gendatenbanken vorhergesagten tatsächlichen Größe der mRNA des *TRIM46*-Gens, um den späteren Knock-out planen zu können, da der auszuknockende Bereich die kodierende Region des Gens vollständig einschließen bzw. die fusionierte β -Galactosidase im ersten Exon platziert werden sollte (siehe Herstellung der Knock-out-Maus ab Seite 84).

Hierzu wurde Gewebe aus E18-Embryonen entnommen, die RNA extrahiert, die mRNA angereichert, geblottet und mit einer radioaktiv markierten komplementären Sonde aus dem 3'-UTR (siehe IMAGE-Klon des Vorkapitels) hybridisiert.



Die im Northern-Blot bestimmte Länge der mRNA von *TRIM46* stimmt mit 3,6 kbp mit der Vorhersage aus der Genomdatenbank überein. Zur Normierung wurde eine Sonde gegen das *Housekeeping*-Gen der Glykolyse *GAPDH* auf demselben Blot mithybridisiert, dessen Größe bereits bekannt ist. Ein RNA-Längenmarker wurde mit aufgetragen, der jedoch nicht direkt zu sehen ist, da nicht radioaktiv. Die Banden wurden vorher unter UV-Licht angeschaut und mit Bleistift auf dem Blot markiert, so dass der belichtete Röntgenfilm zur Größenbestimmung nur auf den Blot gelegt werden musste. Zusammenfassend sind die aus dem Marker gewonnenen Größen neben dem belichteten Röntgenfilm eingetragen.

Der Intensitätsvergleich zwischen den Proben aus Gehirn und Körper lässt hier keine eindeutige Schlussfolgerung zu, da zwar im Körper kein Signal von *TRIM46*-mRNA detektiert wurde, jedoch auch das *GAPDH*-Signal wesentlich schwächer ausfällt als in der Präparation für das Gehirn. Somit bewahrt das *GAPDH*-Signal vor einem Fehlschluss, da *TRIM46* sehr wohl auch im Körper in bestimmten Geweben vorkommt, wie die spätere Expressionsanalyse zeigt.

Die Spuren mit polyA⁺ enthalten angereicherte mRNA, während die Spuren mit polyA⁻ die vorausgehende gesamte RNA enthalten. Bei *TRIM46* zeigt sich erwartungsgemäß eine deutliche Anreicherung, wie es bei weniger abundanten mRNA-Spezies vorkommt. Hingegen fällt der Effekt bei *GAPDH* kaum ins Gewicht, wie es bei sehr abundanten mRNA-Spezies passieren kann, wenn die Affinitäts-Säule zur Anreicherung übersättigt wird.

Bestimmung von Splicevarianten des *TRIM46*-Gens

Für spätere Experimente zur Analyse des *TRIM46*-Proteins (Bestimmung der subzellulären Lokalisation, *Yeast-Two-Hybrid-Screening*) musste die von der mRNA abgeleitete cDNA kloniert werden. Dabei konnten zugleich verschiedene Splicevarianten festgestellt werden.

Von verschiedenen Gewebeproben der Maus, insbesondere E18-Gehirn und Körper des Embryos, wurde RNA mittels Trizol isoliert und davon die mRNA mit ihrem Poly-A-Ende über Poly-T⁺-Säulen angereichert (siehe RNA-Techniken, ab Seite 177). Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und durch **RT-PCR** amplifiziert (siehe Seite 172). Hierzu mussten Primer eingesetzt werden, denen schon eine Annahme über die mögliche zu erwartende Größe der mRNA zugrunde lag. Als Ausgangspunkt dienten hier die Größeninformationen aus dem Northern-Blot sowie die Genvorhersage aus der genomischen Sequenz von der Celera-Datenbank.

Der Vorwärts-Primer begann mit dem 5'-Ende der Genvorhersage an dem ATG des angenommenen Translationsstarts. Als Revers-Primer kamen zwei verschiedene aus dem nicht-kodierenden Bereich des 3'-UTR zum Einsatz. Einer der Revers-Primer wurde für die RT-Reaktion anstelle von Poly-T-Primern eingesetzt, um direkt in der RT-Reaktion eine Anreicherung durch Genspezifität zu erzielen, anstelle blind alle mRNAs zu vervielfältigen. Der zweite, sukzessive verschachtelte Primer wurde in der PCR-Reaktion nach der RT-Reaktion eingesetzt, um zusammen mit dem 5'-Primer die Spezifität für die Zielsequenz weiter zu erhöhen (**Nested-PCR**). Die genauen Primer-Sequenzen siehe ab Seite 153. Die beiden zuletzt verwendeten Primer wurden von den Restriktionsschnittstellen *Bam* HI und *Not* I flankiert, um die anschließende Klonierung zu erleichtern.

Die isolierten und gereinigten PCR-Produkte wurden zuerst in *pGEM-Teasy* einkloniert und dort sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden auf die durch die Genomprojekte bekannten genomischen Sequenzen projiziert und die Exon-Intron-Muster bestimmt.

Von 24 sequenzierten cDNA-Klonen ergaben sich dabei 8 verschiedene Splicevarianten für *TRIM46*, die zu 6 verschiedenen Proteinisoformen führten, von denen 2 Klassen am Häufigsten vorkamen. Ursache für die geringere Zahl der Proteinisoformen sind Unterschiede in nicht-kodierenden Bereichen.

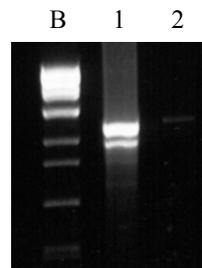


Abbildung 51: Ergebnis der RT-PCR-Reaktion. Agarose-Gel mit B-Marker, 1-, 2- RT-PCR-Produkte verschiedener Gewebeproben.

Exon-Intron-Struktur auf der genomischen Sequenz:

Zur genauen Charakterisierung ist ein Ausschnitt der genomischen Sequenz des Genlokus von *TRIM46* auf Chromosom 3 der Maus mit den markierten Exons dargestellt.

Konvention der Sequenz-Annotation:

- **Gelber Textmarker** für sequenzierte Exons der cDNAs.
- **Rote Schrift** für Sequenzen der Genvorhersage der Celera-Datenbank.
- *Kursive Buchstaben* markieren den Bereich der 5'- und 3'-Flanken, die für das spätere KO-Konstrukt verwendet wurden.
- Splice-Donor- und Akzeptor-Stellen sowie ATG und Stop-Codons und Poly-A-Signale in **fett**.
- CpG-Inseln unterstrichen.

ATGGGACTCTCATCTCACCAGCTGCATAGAGATGAGAGAATCTACTCTGCTGTAACATA
CCTGCAGGACTGTTGATAGGATCACAGGAGATGTTTCGTTATCTGGCTAAGCATGGTGGCG
CATGCCGTGAGCCCCAACACTTGGAGGGTAAATAAAGAGACTTGGAGGTTAAAGGCCAG
CCTGGGTACACAGGAAACTCTGCCTCAGAAAAGTTGTTTATTAACAAAAAAAAAAAAA
AAGTTGTTTTATG CAGGATGCTTTCTAGGAATGGGCGCAATGGTGAACAAAGGTGAA
CTCTATCACCATTGTTATACTATGAACTTAGGAAGTAAATGAAGGAGCAGTGTAGGCCA
TGGCCTGGTCAGCTACAATGCTTTAATGCCTAGTGTTCACCATTGGGTGGCGCTAGGG
AGCACATAAATGGTTCCGCTATTTCCACTTCCTTCTCATCTGACTGTGGAGATGATGGG
CAAGCAATGCTGTTAGGTCAGCATCCTTACACACACAGTGGCTGACTGTTTCATTATT
TTTTGCATCCCT**AGGTCGTGATGTGCCAGACCACAAGGAAGAGGTGACCCACTACTGT
AGACATGTCACAGACTGGTGTGCCAACTCTGCAGAGTACGGCGTACCACAGTGGGCACA
AGATCACACCAGTGTCTAGTGCCTACCAGGCCCTCAAG**GTAAAGACCCTTACCTCTCA
GCCCTAGCGCCAACACACACCACACACCTCTACTGACTTGCTTCTTG CAGAGCCAG
GATGATGCCACCTTTCTTTGCCCTT**AGGATAAGCTAACAAAGAGCTGGCATACATC
TTGGGAAATCAGGACTGTGCAGACCAGATTGTGAGCTGGAAGAGACCATCAGGCAC
ACTGAGGTGAGGAAGGCGCATGGACGTGCCCTTCACTCCCTC**GTGGGTGCCATGTCCCA
TTGCCCTTACTGCCAGTT CAGAGCCACAGGAGGAGGTTGTGTTGGTGGAGGCTCTGGT
TAAACTTCAATTGGCAAGAACACCAGTACCTGGGTTGGGCTGGAGCTGGGGCTGCAGGGA
GCGTAGGAGGCAATAGCTGGGGGCTAAGGAGCTCAAATATACTTAGATTCAACATGAGC
ACAACCATGAAGCTAGGGGTGGGGAACAGCCTTCTGTTGGGTTGTCTGAATTAGCGG
GCAGTCAATGGATGGTGTGATGGCACAGTACCAGTGTGCTGCAGCTAGTGGTCCACA
CGTGGACATTAGTG CAGTGTGGCGTGGCCTTTCTTATTTGGGTGAGATAAAAAAGATT
AAGACTATGAAGAGCTAGGGTAAATAATGAGCAGTTAGTGTAAATGGTGATTCAAGTTG
CAGTTGCTGGCAAACTGTAGGCTCAGAAAGGGCAGTTATTGCATTTCTGCATGTTATC
CAGATAGGCGGATATTTGGAAAAGGCCCTCTTCCACACTGAGGCCCCAGCACAGTCT
TGTTTGGCGGATCCTGGAACTAGGGCTGCAGTGTATCCAAATGACCAGCTATTTAAAGG
AGCTTTAAAGCTCCACTAGTTTGTAGCCTTTCCCTGTTGTCTCTTAGCAACATGGTTAG
GATCGACTACTCCAGCCGTAATCCACGTATCCCATATTTCTTCAAAATACAGTGCC
CTGGAATGGACGGGCTGTGGTGGGGCAGTGTGCATCTCCATCATGGGGGGGGGGGGG
GCACATGAGGGCTGGAGAGACGAGT CAGTGGCTAAGAGCACCTACTGCTTTGCAGAGGA
CCCAGGCTCAGTTCAGCAACTACAAGGCAGCTCATGATCACCTGGAATCTACTCCAGG
GCTCTGATACCCTCTGGGCTTCCACACACACACAACTCATATACACATACACACA
CACAAATGAATAGATATTTTAAAGTAAAAAATATGTTGAAGAGTAGGCATACCTTTT
GCTGCATTAGTACATGGTCAAGGCCAAAGTCCACCAAATAAAACACAAAAATGGCT
GGCAAAATTAATAAAAAAAGTTAAAAACGTAACAGTGGTGGTTGGTGGAGATGGCT
CAGTGATTAAGAACTGGCCGCTCTTACACAGGTCCGTAGTTCAATTTCCAGCAACCAC
ATAGTGGCTCAAACACCACATAAAGGGATCTGTGCCCTCTCTGGCATGCAGTCAAGG
TGCTACTAAATTTAATAAATAACTTAACTGCACTGTATTTTAGAATAACTCCT
CGGGTGTATGATGTGTGTGATGTGTCTGTGAGTGCACCCACGGGAGGGGTTGGCCC
ATGGAGTCCCAAGTACTACTCTCTGACCTGTCTATACAGGTCACTCGGCTACCTTTG
ATAGATGCTAAGAAAGTGTAGTCTAGCCCTGTCTCGGTGCTACTTTGCTCTCAGT
TATCTCTCCAGCACCTGAATTATCTTTTAAAAATTAATAAAGGGATGGAGAGTTG
GCTCAGTGGTTAAGAGGACTGGCTGCTCTCCAGAGAACCTGGGTTGATTTCAAGCACC
CACATGGCAGCTCAACAATATCTGTAACTCCCGCTTCAGGTTTCTGCACAGACATACA
TTCAGGCATAACACCAACGCACAAAAAATATAATTTTAAAAATTAATAAACGAATTA
TTGAATTTTAAAGTGGGTCAACGTGTCTTATGCTGTGATCCCAAGACTGGATAAAATGAA
GCAGGGGATCTCTCTT CAGTACACAGTGAAGTTCAAGGT CAGCCTGGGATCATGAAC
CTGTCTCTTATAGAGATCCCAATAAAGGCTGGAAGATAGATCAGTGGGTAGGAGCA
CTGGCTGTCTTTCCAGAAAGCCAGCGTCAACTCCAGCACCCACATGGTGGCTCACAAA
CATACGTAGTTCTCAGGTTACTGTATACCCTCTTCTAGCTCCACAGATAGCAGGCACACA
CTTGTCTCAGACACACATACAGGCAAACCCCTATGCACATACAATACTTTTAAAA
GATCCAGCCGGCAGTGGTGGCGCACACCTTTAAACCCAGCATTTAGGAGGCAGAAGCA
GGCAGATTTCTGAGTTCAAGGCCAACCTGGTCTACAGAGTGAAGTTCCAGGACATCCAGGA
CTACACAGAGAACCTGTCTCGAAAAAAGAAAAAAGATCTTAAAGTAGGTATAAAAT
AACAGGACTCTGCATTTTGTCTATATTTCAATTTGGCTTCTATATCAAGCCAAAAAT
CTAGGAAATAGAAGGGCTTTGCTTCCCTTTAGCCTACAGTTAACAATGTGAGCATCAGAA
AGTTAGTACAAATGGT CAGGAGGTGACCATATCTGTGTTATAGGTGCTTTGCCAGTCA
ATCTGGCCCCATAGAGGATAGATGAAATGAACAAAATCCCAAGGATAGTATGGTGTG
GTGTCTGGGGGCGGGTCAAGTGTGGTGAAGTCTCTTATTATTGGGTGTTCTTCT
TGGACAG**GTGAGTGTGTCAGCAAGCAAAAGAGGAGGTGTCAGCTGGTTCCGGGACTAGG
GGCTGTGCTGGAAGAGAAGCGGGCTCACTGCTTCAAGCCATTGAAGAATGCCAGCAAGA
GCGCTTATCCGGCTCAGCGCCAGATCCATGAACACCAGAGCCTGTGGAATGGCTCGGG
TCTGGTGGGTTATGCCAGGAAGTCTTAAAGGAAACAGACCAGCCTGTTTGTACAAGC
AGCCAAACAGCTGCATAACAG**GTACTGAGGGGATGGCACAAGGGAAGGTTGCAGGCTC
AGGGAGGTGGGCACCGTGGTGTCACTAACAGTAGTGAATAACAGGGTGGAGAGCTGT
TGCCTCAGGGGTTTCAATTGGCCAGCCTGATGCTAGTTTCTCAAGAGTAGGGAGCTCT
GATGCAGTGGCTC TAGGGATAGGTAGGGTAGGATGCCAGGGAGGGTTGCTGCCACCTG
ACAATACCTGACCCTTGCCTACCCGCTCT**AGGATTGGCCGAGCCACTGAGGCCCTCCAG
ACATTCGGCCAGCTGCCAGCTCTCTTCCGCCACTGCCAGCTGGATGTGGGGCGTGAG
ATGAAGCTGTGACCGAGCTTAGCTTCTTGAGAG**GTAAAGGAGTAGCCAGGCCCGTGTCC
AACAGAGCTTCTTCCCTTTCCCTTGCAGCGGACCCGGGGGGCAGCGCCACAGG
ACCTCTGGCTCTGCCTGGCTGGCCAGCCACTCCACCAGCCCAACCCGCGCACAC
CACACCTCCTACCGGCTCAGCCTGTCTCTCTCTCTTTGT**AGGCTGTGGCCACC
CCGGACTCTGCTCCGGAGCACCAG**GC**AAGT**CAGCAGCCCTGTCCGGGGCCCTGCCA
CCCGTGGGCCCTTCCCTATCTTCTTCTGCTCCACACAGCCTGGCCACCATATA
CTGCTTCTCTCTCTTAATGTACCTGAAATCTTGGCTTCCACCTCTCTCTTAGA
CTGTTCATAAACCTGGTCTCTGACCTTTCTGTATCTTGAACCTTGTCTGTGACTC
CCATTCTTCTCTTTGATGACCTTCAATGCACCGCTCGCTCGGAGCAGAGCTCGCTCC
CTCTGTCTTCTTGTGTTTCCGCTTGTGTGACCTGTACTTCCCTCCCAATCCTTCTA
CTCTCTTCCGCTCAGGCTCTCTTGCCTGGTTCCAGTGGCCCTTTGCCCTGCTCATT
TGGGCTCCTTCTTAACTCAAAGAGTCTCAGCCATGAGGGTCTCAGAATATTGGGT
TCATGTCTCATTTGACTGAAGAGAAACTGAGATCCAGAGAGGGAAGTGGCTCACTTC
AGGCCAAATTAGGGTAGTGCAAACTAGGACAGAGTTCGGGCTCTGCCCTGTCCGGT

Exon 3: War in allen cDNAs gleich und stimmte mit der Vorhersage überein.

Exon 4: War in allen cDNAs gleich und war etwas kürzer als vorhergesagt.

Exon 5: War in allen cDNAs gleich und stimmte mit der Vorhersage überein.

Exon 6: War in allen cDNAs gleich und stimmte mit der Vorhersage überein.

Exon 7b: Dieses Exon kam **nicht in allen cDNAs** vor. Wenn es da war, so veränderte es den Leserahmen für die folgenden Exons, so dass es zu einem frühzeitigen Stop der Proteinsequenz kam.

CTGCCCACCTTCTTCTCCTATGAGCCCTGCCTTGCCACCCAGTGCCCTAGAAAAGTTCTT
TTCCCCAGCTCCCTCACCTACACTCACCCCGGCTCCCGCTGCTTCTCTTTCTGCCC
TGAACCACTCTCCGTGCCAGGTCTGATGACCCATGTCTCTTCCAAACAGTGCCCGAG
GCGCCCGTCATAGACACCCACGACCTTTGGCTATGATCAAATCTTCTGTGTGGCGG
CTGCCCCCTCACTCACCCCTGCCTGGCATTACACCGTTGAGTTCCGGCCGACAGATGTG
CCCCCCAGCCAGGCCCTACCGCTGGCAGCCCGGGAGAGGTGAGGGGCCACCCAGCGCC
CTTCTTGAGAACCCCGACACGGGCTCTGTGTACGTGCTGCTGCCGTCCGTGGCTGCAACAAG
GCTGGTACCGAGAGTACAGTGAAGATGTGCACCTGCACACACCCCCAGCCCTGTGAG
TACACAGACAAAGAGGCTTCATGTGGTGGACAGAGATGTTACGCGAGAGGATGGATGG
CCCAGGTACTCAGTCAATCCCAATGGGCACCGAAGAGCAGTGCAATACAATTTAATTT
ATATAATTTGTACAATTTAATGTGTGAGTTGTACTCACTTCTCTAGAGCTAGACTGCC
AGGTTCTAAGCCCACTTTGCCCTTGACAACCTTGTCTTGAGCCACATTTTCTCCTTC
TTTGAACCTCAGAGTCTCTTCTACAGAAATAACAATAATAATTTAATAGAGTGGTTTGGT
AATGACACCATTATTAATGGTACATATAAAGACCTAGCTTCTAGCCAGGCATGGTGGCA
CACACCTTTAATCCGAGCACTCGGGAGGACAGTCTAGCCGATTTCTGAGTTTCGAGGCCA
GCATGGTCTACAGAGTGAATTCAGGACAGCCAGGGCTACACAGAGAACTCTGTCTCGA
AAAACCAAAAGAAAAAAGACCAAGCTTCTGCCTAGCTTCTGACTTATAGCAAGGG
CTCAGTCAATGTTAGGGAGTGGCTTGTCAAGTGTGTTGAGCACTCGGGTGAAGGGCTGG
GTTGAGGGGTGAGGTATGGGCACGGAGTGTGGGTGAAAGGTGACCGGCCGTGAAAGATG
GGACCAAGTGGAGCAGCATAGTGGAGATGGCCACAGGCAAAATCATGGAGAAATGGGT
TGCAGAAACATTGAGTTAGCTAGAGAAGGACACTGCTTCTCTGCCACCCGTCACCTT
TGGCTATTCTGGCTTCCCGGTGTCTGTTGGGATGCCTCTCTCTTCCCTATGTCTCTATT
TCAGTTTCCACGCCTTATTCCTGCGGCCCTGCCAGCTCTGTGACTGAATTCCTTG
ACAATTTGTTCCCTGTGCCAAAATTCAGTGTGTTGTGTGACACCCACAGTCCCCAG
TACCAGTCTGCTGAAAGTCTTCTCTGTCTCAACTCTGCTTCCAGTCTGCACT
TTCTCTTGATGGCCGCTGGGGTGGCAGCCGAGAGCGGTAGCCATCAGCAAGGACCGAG
GAGCGGTGCGGAGTATCCAGGGTCTCCCTTGCTGTGGTCTGAGCGGCTGTCAACCG
GCTGCCACCTGAGTGTGGCAGTGGTCTTGGGTGATGTGGCTGTGACCAGGGCCGAGCT
ACTGGCCCTGTGGGTAGACCCCTCCTACTTGGTCAAGTGGGGCTGGGGCTGGAGA
GCAAACTTCAGGAAAGCTTCAGGCGTCCCGGATGTGATCAGCCCGCATGCGCCCTT
CTGCAAGAGGGGTTGGGGAAATGAAGCCCTGGGAAAGAAGCTGGGTTGGTGAGGGTGG
TGACGGGGCTCCAGACTTTCGTAGGTGGGACTGGGGCTGGGTAAAGACAAAGGACATGGA
AGCCAGCCGAGAGGCTTGTGGACGGAAGAGATGTGGCTCAGCAGAAAGGACTTGGAGG
TTTTTCAGAGTGTATGGTTGGAAAAGGGTTGAGTATATAATAAGGCAGAGCTGTACCTC
TTCTTCCATCTGTGCTTGGGTCCAGTACAGCACCTGTCTAAGATCCCATGTCCCAAGA
TTCCCATGAAAAGTTTCTCCCTGAGACCTCTTCACTGCTTGTCAACATCTCCATG
TTCTTCTTTAAACAAATCTCCACAGCCGCTTTCCTCTCCGTGTCTCATTAACATCTC
CTCCACATTTGAGTCTGTAACCTTCTCTCCGAGCTCTCTTACACCCAGCATCCCATTT
CCTCAAGATGCTCTCCCAACACAGATTTCCCTTTGGAATTTCTGTGGCCGACTCCTG
TATCCCGCTAACATCTGTATGCCCCAAGCATCCCATCTCTTTCCCGATCTCATCACTTC
CGACAACCTTACTCTGCTGCTGCCCTCACCCCAAGGCTCTTAACTGAGGTGACCTATC
CTTCCAAACACCCCTGGCTGCCAAAGCCGTGCTCCCTAACCTGGTTTCCCTAGCACAGGAT
TCTCAGCACTTCTTATCTGACAAGACCCACATTTCTCCAGTGTGTGTAGCAACAGCC
GTCTCTTCTCCCAACACACCTTTCACGCACTCACCCTTCTTACACAGACAAAGCC
CGGAGCCTTACAGTGTAAACCCCTCAACATGTATTCACCTTAACTGCAACCGCTGT
CCCCCAACATCTTCAACATCCACCCGGCTCCCTGACCCCAACCCACTCCCTTCTCT
GCCTCCAGCATCTTCTTCTGGATTCCCCCTCACAGATAAGACCCCGGACAGTGGGCA
CGACAGCGGTGCCGAGGACGCTGCGGTGGAGGCTTACACCCCTTGGCTTTCTGACCAT
CGGCATGGGCAAGATCCTGCTGGGTTCCGGAGCGAGTTCCAAATGCAGGGCTGACAGGGAG
GGATGGCCCCACCGCCAGCTGCAAGTGGCCCTGCCACCCCGCTAGGTATCTGTTTGGGA
CTACGAGCGGGGGGGTCTCTTCTGATGCGGTGCTTCCGTTGGGCTGCTCGAGT
CCCCCTGGAATGCTCAGGCGCTGTGTGCTGCTTCTGCTTCAATGGGGTGGCGCTGT
TCAGCTGCAGAGCCGTTGGGCAACAAGCTGAGAGGAAGTCAACATGGGGGCTTTC
CAAACTGGAGTAGAGCGCTTAGGCCCCCTCTCAGACCTGAGTCTGTCTCCCAAGTCTCT
GGCATCGAGTTGTTTCCCAACAGCTTCTCTCCAGACTTTCCTAAACAATGTGGCCCT
GCCCCATACTTGGCAGCGGTGTCTTCCAGGGCTTCCCTGACTAAGGGAATTCCTCT
GCTTCTCTGGATGCTTCAATCTCTGTGTACCTGTGGCTAGGCCCGAGGCTCAT
CATGTCTCTGACCCAGGCCCGCCCTTGGCATCATAAACAAGGCATAGAAAAGCCCTGTTC
CGTCCCTGGCTGTCTCTGAGCCTTACTGGGAGGGAGGCACCTGGAACACTGGATAT
GACTAACAACTCTGCTTGCCTTGCCTTGCCTGCCCCCTGCCCCACTAATGCTGACTGCAGC
CTTGGCAGCCAGGCTTGGAGCCTCCAGTGAGACAGAGGAGAACCTATCTGTTTTATTT
GGGTCCCTATACCCTCAGCTGCATGTCCCTTCTGCTCCCTTCTCTCTTTGATGCTTT
ACCTATCCAGCACCATGCCAAAGTGCCTCCTTGGGAACTCAGTTAAGGCTGGT
GTCCCATTGGGTTGGGCAAGCTTAGGCTCTGGTGCCTGCTACTGCTCCGTACAGTGG
GCATTGCTAGGCTGTCTGAGCAACAGCTGTAATTTTATGTTTATAAACAATAAACT
GTGACACAGGCACATTTCTGTTTCTGGAGTGAACATTCTGGTAATTTCTGGTCT
GACCCATCGACACCAAGGTTAGGGGCTCTACTACACTAAGCCAGACTCCAACCGAC
TCTCACCAGGCGCCGACGACCCGACTGTAGCCTAGAATTTACCTTGGGTGTCTGG
ACCACAGACATGAACCTGAGGGATGTAACAGGGGTGTCATGTTGACCTAAAG
GGGTGAGGAACTAGAACCACTTCTCATTTCCGAGGGTGCAGAGACCCCAAGAGGC
AGTGGCGGGTGGGTGGCTGAGGCCAGGGCCGGTGCACAACAGCACCCGGATCTGTCCC
AGCCCTGGCTTACTGCTGTGTTGACTCTGCTACTGTTATCTGTGGTCCAAGATTG
CTTCAACCTGGACAGTTAAGAAATAGAGCTGCGTTAAGGGCACTGTGCCAGTCGGAGG
GGCAAGGGCTGGCCCTGGGAGAGAGTCAATGGGACAGCTGAGGCCAGGTCTGGGGGAG
CCCACTGGAGCCAGCTTAAGTTTCAATTTCTCCTTCTGAGGGCCGACAGCAGGAG
AGAGGCAATCTCTAGTCTTTCTCAGGCCACTCTGTGTCCCTGTGTCACCTCTTCCCC
ATATCCTGTTTTGCAATGAGGCCAGCCTTCAACCCCTCTGTGGCTCCTGCTTCCGGA
GTCTCCCGAAAGCCCTTCCAGGCCCTCAGTGTAGTCTGCGCCGCTCTGACCCA
AGAGTTGCAGATGAAAACCAAGCTGGCATATACTAACAGGAGGCCATCTTTTATTTCAGC
TATGTTGGGTTCCATCCCTGCTCCAGTTTCCAGGCCAGTCTCTGAGAGCCACCA

Exon 7a: War in allen cDNAs gleich und war etwas kürzer als die Vorhersage. **Sofern Exon 7b in der cDNA vorlag, wurde das offene Leseraster in diesem Exon mit dem Stop-Codon TAG (amber) beendet.**

CpG-Insel. Bioinformatische vorhersage mittels *Webgene*.
<http://125.itba.mi.cnr.it/cgi-bin/wwwcpg.pl>

Exon 8: Dieses Exon kam nicht in allen cDNAs vor. Ansonsten stimmte es mit der Vorhersage überein.

CpG-Insel. Bioinformatische vorhersage mittels *Webgene*.
<http://125.itba.mi.cnr.it/cgi-bin/wwwcpg.pl>

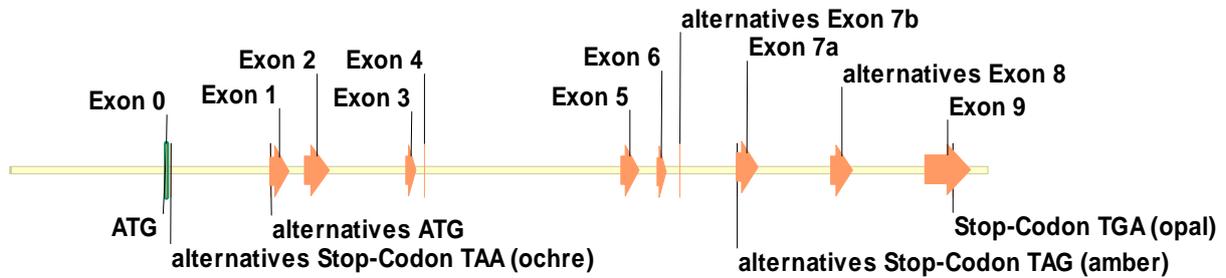
Exon 9: War in allen cDNAs gleich und etwas kürzer als die Vorhersage. Enthielt das **Stop-Codon TGA (opal)** und den 3'-UTR. Falls Exon 8 fehlen sollte, käme ein früheres TGA zum Einsatz, sonst das zweite.

Poly-A-Signal in fett, wie es bioinformatisch von *WebGene* vorhergesagt wurde.
<http://www.itb.cnr.it/sun/webgene/>

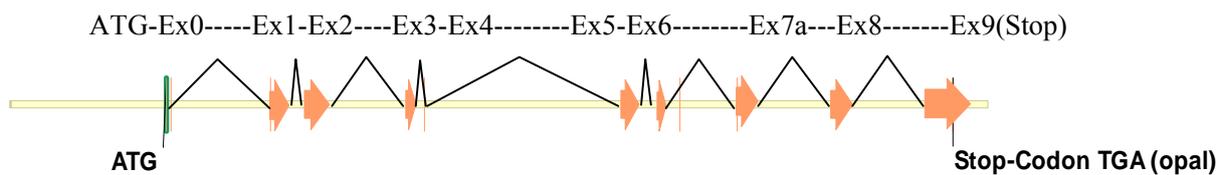
In *Kursiv* der Bereich der **3'-Flanke** für das spätere Knock-out-Konstrukt (nur ein kurzer Ausschnitt).

Übersicht der 8 Splicevarianten von *TRIM46*

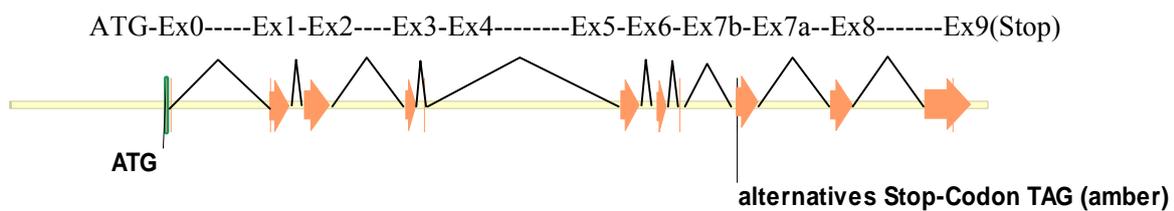
Trim46-Genlokus Exon-Intron-Struktur:



cDNA12 mit maximalem ORF:



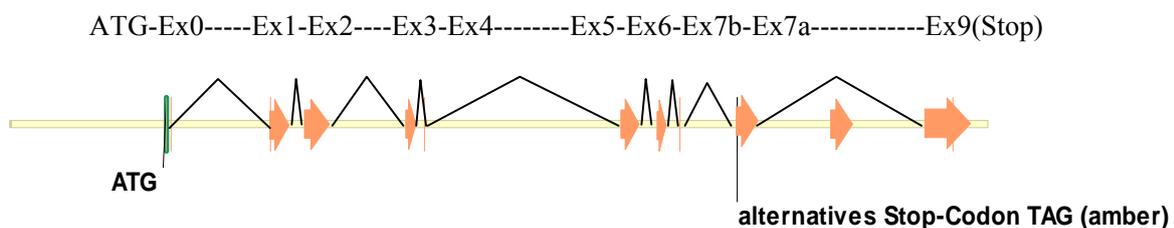
cDNA4 mit Exon 7b und vorzeitigem Ende:



cDNA12 und cDNA4 stellen die beiden am häufigsten gefundenen Splicevarianten dar von denen sich 2 Protein-Isoformen ableiten, je nach Lage des Stop-Codons.

Von cDNA4 gab es eine Variante ohne Exon 8, was für ein mögliches Protein jedoch irrelevant sein dürfte, da das Stop-Codon bereits im Exon 7a enthalten ist:

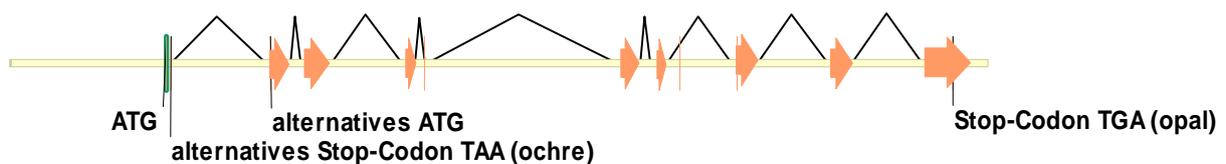
cDNA7 mit Exon 7b und vorzeitigem Ende ohne Exon 8:



Von den beiden Formen cDNA12 und cDNA4 gab es Varianten mit verlängertem Exon 0, was zu einem Stop-Codon in demselben führte, so dass hier kein sinnvolles Protein resultieren dürfte. Alternativ wäre es möglich, dass ein zweites ATG in Exon 1 die Funktion für den ORF erfüllen könnte, um das Protein zu ermöglichen.

cDNA14 wie cDNA12 aber mit alternativem Exon 0 und möglicher Benutzung eines alternativen ATGs :

ATG-Ex0lang--Ex1-Ex2---Ex3-Ex4-----Ex5-Ex6-----Ex7a---Ex8-----Ex9(Stop)



Für die 3 variablen Exons; Exon 0, Exon 7b und Exon 8 ergäben sich kombinatorisch 8 mögliche Spliceformen:

$$2 \times 2 \times 2 = 8$$

Jedoch wurden die Varianten von cDNA12 bzw. cDNA14 ohne das Exon 8 bei den 24 sequenzierten cDNAs nicht beobachtet, so dass hier 2 der 8 theoretisch möglichen Spliceformen nicht beobachtet wurden, weshalb nur 6 empirisch belegt sind.

Bemerkenswert an Exon 7b ist seine atypische Splice-Donor-Stelle GCAAGT, die zwar in der Literatur durchaus vorkommt, jedoch weit seltener (ca. 2%) als die Konsensus-Donor-Akzeptor-Paare GT-AG.

AGGCTGTGGCCACCGCGGACTCTGCTCCGGAGCACCCAGGCAAGT

Diese Exon-Sequenz war neben der Maus auch im Menschen konserviert, so dass von einer funktionellen Bedeutung auszugehen ist. Wenn sie vorhanden ist, führt das zu einem verkürzten Protein.

Bestimmung des 5'-Endes der mRNA von *TRIM46* durch Intron-Überbrückung

Bei der Bestimmung der Splicevarianten wurden Primer eingesetzt, denen eine Annahme von der Größe der mRNA von *TRIM46* zugrunde lag, die zum einen auf dem Northern-Blot basierte und zum anderen auf der bioinformatischen Genvorhersage der Celera-Datenbank.

Als mit Fortschreiten der Genomprojekte weitere Sequenzdaten verfügbar wurden, konnte **upstream des** bisher angenommenen **ATGs ein weiteres** ausgemacht werden, das **in demselben ORF** läge und diesen verlängerte. Um zu testen, ob diese vorhergesagte genomische Sequenz tatsächlicher Bestandteil der mRNA von *TRIM46* und somit des Exons 0 wäre, wurde RT-PCR mit entsprechenden Primern gemacht. Dabei wurde der Vorwärts-Primer jenseits in 5'-Richtung des bisherigen ATGs gesetzt und der reverse Primer so gewählt, dass die PCR ein Intron zu überspannen hatte, also in Exon 1 positioniert. Das Überspannen eines Introns war insofern bedeutsam, um sicherzustellen, dass das PCR-Produkt tatsächlich von einer mRNA stammte und die Kontamination von genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte.

Zur Übersicht ist noch mal ein kurzer Ausschnitt aus dem Genlokus von TRIM46 dargestellt:

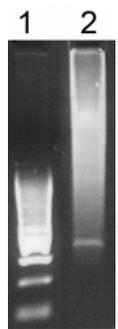
```
GAGGGACTGCAAAGCCCTTGCCACCCACTCCCGCCCATGTTCTGTTTCATACACCCCCCGCC
TCCCTTCCAGCGCGAGGAAGATACAGTCAGGGAGAAAGACGAAAAGGCGGGAGCCCGAGCA
GGCCCCCTGATGTTGAGCCACTCGGTGGAGGCGAGCTGGCGGCTGTAGATCTGCATGC
CAGCGAAGAGCAGCAGGAAGCAGGAGGAGGACAGCGCCAAGGAGGTCCTCCGGTACCGACTC
CTATAAATGAGAAAAGAGTCAAGCTAGGCTTAAGATTAGGCAGATTCAGTCCGGAGCTTGGCTC
ACCAACCACTTCCAAAGTCAGCCAGCCCCACCCACAGCGACTCCAGGAACCCACCGGCT
CCTGCACACCCCAAGTTCGGCCCTTCCGGAGGAAATGCTAGTTCACAGGACAGTCACTAGT
TTACCAGGGCTACGGAGAAAAGAGGACCCACCCCAACGCCACTCCCGCTAGAGCAGCCCG
GGCATCCCGCGGTGCGGTACCACATCACGCCCCGTCGGTGGTCCAAATCCGCTGCCCTGG
AGAAAAGAGGGAGCCAAAAGCCGGGCGGGTTGCTGTGACGAGCGTCCGGGGCCAACGTTG
ACTTGCTTTACTTCTTCTACGCGCCCTGGGGTGCAGCGCCCTCTGTTGGCAAGGAGGA
AATAATGCTTCTAAGAGCAATTCTAGGCCACCGCCCTGCTGGTCTCCAGCCCTTCTGTAGC
CAAGGCATCTGCTCTCTCTGGACAAGCTGCACACTCACTTTTCAATCATGATCCCATGGC
CTAGAGTCACTGTGCTTTCATTGCTATTCATGTCATCTCCCGTACAACCTCTCTCAGACC
TCCCTGACCCACTATAATGTCCTCAACAACCTCCGGAAGATATGTGCCACCAAGATGTAG
CACCCTCCACCTGGAGTCTTCTTCTGAAACGAGCTTCTGTGCTTTATGTGAGTATGA
CCAGGAATCGATGCAAGCTTCTAATAGGAGGAATGGTTCTCACTCAATACCTCCATG
TTACCCACCCCTTACAGCCCTTGGGAGAACTACGTGGGAAGAATAATTTCCACCCCCCT
ACCTCGACGAGCGCAGTTCGAAGCTAGTCCCTGGAGCATGCGCAGTGACATCTCACCGCTC
CCACCCCTCCCTTACCACCCCGGCTCCTGCATTAAGCCCCGGGTTCGCGAGCAGCAGC
CAGGATCGGGCACCCCGGGGCGGGGCGGGCACAGTAGGGCCATGGCTGAGGGTGGAGGATA
GCAGACCTTCACTTCCATCATGGATGCACTAGTCCCGCATCAGTGTGAGTTAAGGTTGGGGT
CAAGGGGAAGAGGGGGATGTAAGGGTTCGGGGCAAGCCAGACCCCTTGAAACAGGTGGGG
TCCAGAAAGAAATATGGATTATAGAGAAGGGATTAGTTAAGACAGAAATGACTGGGAGGGC
GGAGACGCAAGTGTTGGAGGGATCCTGGGACAGCCGAGTGGTGGAGACTCCCGTTTGCCTGG
GGCTAGGCAAGCAGGAAGCTGCCCCGACCCAGCGGGTAGGCTTGGGGTAGCTGCCAGGGC
TGCACAGGGCTATGAGAAGGGCATGTTGAGCTGGATGTTTTCAAGAAACTGAGGA
CAGGTGTGGCGGGGGTGGGGTGGGGTGATGAAAAAACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CCCTCCTTTGTGTCAGCTGCGCCCTTGACCGGATGGCTGCGAAGAGAGGACCAAGGTG
AGGTGTGGGGTGGGAATAGCCAGAAGACCCCTCACAAAAGGGGAGGGATACCTCCG
GTGGGAGGGGGCAGGTAGGGCGGGCGCTCCTCCTCCCAACCCCTAGATTGAGCAAAGG
GTTGAAACAGCCCGAATTTCTCCAGACTGGGCTGATAGCTCTAGATAGAAAGCAGCA
AGAGAGATGGTGTATTTGGGAGACTGGAAGAAATAGAATGAAGAATGGAGGATGGGT
GCTGGGCGCGCCGAGTCCAGCCGGTTCAGAGAGCTAGCGCACCCCTGGCCGCGGGGA
GCAGTATGCGCTTAAGGGTGTCTAGAGAAAAGGGGCGGGGGAACAACCCAGCTGTAGAA
TGGGTGGTGCCTTGAATAAATGCTATTAATCCAGAGATGGAGGGATGGAGACAGGTGA
GGCGGGAGGACTGCTGCAGCACTGCTGCAGCGGAGTGATGGGGTGGGGCGCGATGG
TGGGGAGGGCAGACTCCCACTGTACCTTCTTGGTGGACCTTAAGCTCCCCAAGAGGGG
CGCCGAAGCAGGAGACAGAGCTGGGGAGGTGTTGTAACCAACGAAGGCGGGTACTGGG
CCAAAGCAGTAGGTAGTGTGCTGCCCCTTCTGGCAGCCAGGGACCGGGCTGAGATT
GCCCAAGTGTCTAGCTCTCACAAACCTCCTGGTCCCCTCCAGACAAGCTAGAGAAC
ATGGAGAAGGAAGTCTGTGCCCCAGTGTGCGCAAGAGATGTACAAGCAGCCACTAGTGCTG
CCTTGTACCCCAAGGCTGTGC CAGGCCTGTGCCCGGGAGGTTTTGGGCCAGCAGGGGTC
ATAGGCCATGTTGGGGATCCGAGTTCGGAGCCACTTCTCCTGCTTCCACCCTTCTACC
CGCAGCCCCCGCTCTCTCGGAGAACTTCCCACCAAGCAGATCGCTTGGACCGGCTCCTT
AAGTCAGTGGGGTGGGGCCTGTGGGATGGGGTGGGGATGTAGAAAAGATGGAAGAGGGT
```

Mögliche TATA-Box-Konsensus-Sequenz erkannt (Programm: *Accelrys DS-Gene*).

Mögliches 5'-äußerstes ATG. In der Sequenz 5'-jenseits vom bisher angenommenen ATG wurde der 5'-Primer gesetzt:
TAGACCGCCCTTTGGGAGAACC (Gel unten links). Ein anderer 5'-Primer erweiterte die Sequenz (Gel unten rechts):
TGGAGAAAAGAGGGGAGCCAAAAG

Exon 0: Umfasste den angenommenen Translationsstart mit dem **ATG**.
Exon 0: Umfasste die durch PCR erweiterte Sequenz mit dem weiter upstream liegenden **ATG**. Ein noch früher upstream liegender Transkriptionsstart konnte nicht ausgeschlossen, jedoch auch nicht empirisch bestätigt werden.

Exon 1: Hier wurde zum Überbrücken des Introns der reverse Primer gewählt:
GCACACGTTGTGGGTACAAG
(Primer-Sequenz revers komplementär zur abgebildeten Sequenz links).



Die erwartete Größe der amplifizierten DNA wurde durch Gel-Elektrophorese bestätigt. Das Fragment von 377 bp (links) konnte nur nach korrektem Splicen der beiden das Intron flankierenden Exons resultieren. Somit musste sich das *Template* für die PCR von der mRNA ableiten. Wäre es hingegen genomische DNA gewesen, so hätte man eine Fragmentgröße von 1653 bp erwartet. Wäre die mRNA nicht tatsächlich länger als bis zu dem bisher angenommenen ATG, so hätte es mit diesen Primern keine Bande geben dürfen.

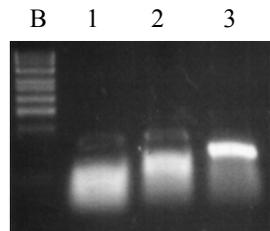


Abbildung 52: Agarose-Gel, aufgetragen von links nach rechts: B-Marker, 1-, 2-Primer zwischen TATAA-Sequenz und ATG, die nicht getan haben. 3- Primer zwischen TATAA und ATG, der das erwartete Produkt lieferte.

Abbildung 53:
1 – 100 bp Marker
2 – RT-PCR-Produkt

Mit Hilfe der Zusatzinformationen durch die vortastende PCR konnte in 5'-Richtung sowie durch Blast gegen Maus-EST-Datenbanken in 3'-Richtung hinsichtlich des Poly-A-Schwanzes ergänzt werden, so dass sich für die beiden von cDNA12 und cDNA4 abgeleiteten Haupt-Spliceformen folgende Gesamtsequenzen aufstellen ließen.

Haupt-Splicevariante 1 (enthält cDNA4 mit 5'- wie 3'- terminalen Ergänzungen):

TGGAGAAAGAGGGGAGCCAAAGCCGGCGCGTGTCTGTACGCAGGCGTTCGGGGCCAACGTGGACTTGCTTTACTTCTTCTCTACGCGCCTTGGGT
GCAGCGCCCTCTTGTGGCAAGGAGGAAATAATGCTTCTAAGAGCATTTAGGCCACCGCCCTGCTTGGTCTCCAGCCTTCTGTAGCCAAGGCATCTG
CTGTCTCTCTGGACAAGCTGCACTCATCTTTTCAGTCATGATCCCATGGCCCTAGAGTCACTGTGCCTTCAATGCTATTCATGTATCTCCCGTACAA
CTTCTCTCAGACCTCCTGACCCACTATAATTGCTCAACAACCTCCGAAGATATGTGCCACCAAGATGTAGCACCCTCACCTGGAGTTCTTCTTC
TGAAACGAGCTTCGTGCTTATGTGAGTAGTATGACCAGGAATCGATGCAAGCTTCTAATAGGAGGAATGGTTCCTACCTCAAATACCCCTCCATGTT
ACCCACCCCTTAGACCCCTTTGGAGAACCAGCTGGGAAGAAGTATTTCCACCCCTACCTCGACGGACGCAGTTCGAAGCTAGTCCCTGGAGCAT
GCGCAGTGACATCTCACCTCCCCACCCCTCCCTTACCCCCACCGGCTCCTGCATTAAGCCCCGGTTCGCAGCAGCAGCCAGGATCGGGCACCCG
GGGGCGGGGGCAGAGTAGGGCCATGGCTGAGGGTGAAGATATGCAGACCTTCACTTCCATCATGGATGCACACTAGTCCGCATCAGTACAAGCATGA
AGAACATGGAGAAGGAAGTGTGTGCCAGTGTGCCAAGAGATGTACAAGCAGCCACTAGTGTGCCTTGTACCCACAACGTGTGCCAGGCCTGTGC
CCGGAGGTTTGGCCAGCAGGGGTACATAGCCATAGGTGGGGATCCGAGTTCGGAGCCCACTTCTCTGCTTCCACCCCTTACCCGAGCCCC
CGCCTCTCTCGGAGAACTCTCCCAAGCCAGATCGCTTGGACCGGCTCCTTAAGTCAGGCTTTGGGACATACCCCTGGGCGGAAGCGTGGTGCCTTGC
ACCCCCAGACGATCCTATTTCCCGTGCACAGCCCTGCCAAGGCGATGTGGAGTTCGGGGGAGAGGGGCTTTCCGGGCTTTTCCGAAACCTGACCCTAGA
GCGAGTGGTGGAGAGTACCCGACAGTGTGAGTGTGGGAGGAGCCACTCTGTGCCAGTTGTGCAAGCCCCACCCTAGAGGCCACCAAGGGCTGC
ACAGAGTGTGAGCTACCTTCTGTAAAGAAATGCTTCAAGCTCTTCCACCCCTGGGGCACTCAGAAGGGCGCAGCATGAGCCCACTACCCACTCTTT
CATTCCGCCCAAGGGTCTGATGTGTCCAGACCACAAGGAAGAGGTGACCCACTACTGTAAGACATGTCAAGACTGGTGTGCCAAGCTTCTGCAGAGT
ACGGCGTACCCACAGTGGGCACAAGATCAACAGTGTCTCAGTGCCTACCAGGCCCTCAAGGATAAGCTAACAAGAGCCTGGCATAACATCTTGGGA
AATCAGGACACTGTGCAGACCCAGATTTGTGAGCTGGAAGAGACCATCAGGCACACTGAGGTGAGTGGTGCAGCAAGCAAAGAGGAGGTGTCCAGC
TGGTTCGGGACTAGGGGCTGTGTGGAAGAGAAGCGGGCTCACTGCTTACGGCCATTGAAGAAATGCCAGCAAGAGCGCTTATCCCGCTCAGCGC
CCAGATCCATGAACACCAGAGCCTGTGTGGATGGTTCGGGTCTGGTGGTGTATGCGCAGGAAGTCTTAAGGAAACAGACCAGCCTTGTGTTGTACAA
GCAGCCAAACAGCTGCATAACAGGATGCCCCGAGCCACTGAGGCCCTCCAGACATTTCCGGCCAGCTGCCAGCTCCTCTTCCGGCCACTGCCAGCTGG
ATGTGGGGCGTGAGATGAAGCTGTTGACCGAGCTTAGCTTCCCTGAGAGGCTGTGGCCACCGCGGACTCTGCTCCGGAGCACCCCACTGCCCCGAGGC
CCCGTCATAGACACCCAACGCACCTTTGCCTATGATCAAATCTTCTGTGTGGCGGCTGCCCCCTCACTCACCCACTGCCTGGCATTACACCGTTG
AGTTCCGGGCGCACAGATGTCCCGCCAGCCAGGCCCTTACACGCTGGCAGCGCCGGGAAGAGGTGAGGGGACCAGCGCCCTTCTTGAGAACCCTGA
CACGGGCTCTGTGTACGTGCTGCTGCTCCGTGGCTGCAACAAGGCTGGCTACGGAGAGTACAGTGAAGATGTGCACCTGCACACACCCCCAGCCCT
GTCTTGCACCTTCTTCTTGTATGGCGCTGGGGTGCAGCCGAGAGCGGCTAGCCATCAGCAAGGACCAGCGAGCGGTGCGGAGTATCCAGGGCTTC
CCTTGTCTGCTGGCTGCTGAGCGGCTGCTCACGGGCTGCCACCTGAGTGTGGACGTGGTCTTGGGTGATGTGGCTGTGACCAGGGCCGCGACTACTG
GGCCTGTGCGGTAGACCCCTGCCTCTACTTGTGTAAGGTGGCGCTGGGCTGGAGAGCAAACCTCAGGAAAGCTTCCAGGGTGCCTCCGATGTGATC
AGCCCCAGATACGACCCGACAGTGGGCACGACAGCGGTGCCAGGACGCTGCCGTGGAGGCGTTACCACCCCTTGTCTTCTGACCATCGGCATGG
GCAAGATCCTGTGGGTTCCGGAGCGAGTCCAAATGCAGGGCTGACAGGGAGGGATGGCCCGACCGCCAGCTGCACAGTCCCTGCCCCGCTCCACCCGCT
AGGTATCTGTTTGGACTACGAGCGGGGGCGGCTCCTTCTGGATGCCGTGTCTTCCGTGGGCTGCTCGAGTGCCTTGGACTGCTCAGGCCT
GTGTGCCCTGCCTTCTGCTTCAATGGGGGTGGCGCTGTTCACTGCAGGAGCCCGTGGGCAACAAGCCTGAGAGGAAAGTCAACATTGGGGGCTTTG
CCAACTGGACTGAGCCGTTCCAGCCCTCTCAGACCTGAGTTCCTGCTCCCAAGTCTCTGGCATCGAGTTGTTTCCCAACAGCTTCTCTCCCA
GACTTTCCTAACCATGTGGCCCTGCCCCATACTTGCAGCGGCTGCTTCCAGGGCTTCCCTTGAATAAGGACTTCTCTGCTTCTCTGGA
TGTCTTCACTTCTGTGTACCTGTTGGCCTAGGCCGAGGCTCATATGTCTCTGACCCAGGCCCGCCCTTGGCATATAACCAAGGCATAGAA
AGCCCTGTTCCGCTCCTGGCCTGTGCTCCTGAGCCTTACTGGGAGGGAGGGCACCTGGAACACTGGATATGACTAACAACCTTCCCTTGCCTTGC
AAGCCCCCTGCCCACTAATGCTGACTGCAGCCTTGGCAGCCAGGCTTTGAGCCTCCAGTGAACAGAGGAGAACCCTATCCTGTTTTATTGGGT
CCCTATACCCCTCAGCTGCATGTCCCTTCTGTCCCTTCTCTCTTGTGATGCTTTACCTATCCAGCACCATGCCAACGTGCCAAGTCTCCCTTGG
GAACTCAGTTAAGGCTGGTGTCCCATTTGGGTTGGGCAAGCTAGGCTCTGGTGCCTGCTACTGCTCCGTACAGTGGGCATTGCTAGCCCTGTGC
TGAGCAACAGCTGTAATTTTTCATGGTTTATAACAATAAACTGTGACACCAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

/translation="MQASNRNGSYLKYPPCYPPRPPLLENHVGRTISHLPRRTQFEASPWSMRSDISPSPLPS
PHPAPALSPGFAAAARIGHPGAGGHSRAMAEGEDMQTFISIMDALVRISTSMKNMEKELLCPVCQEMYKQP
LVLPCTHNVCQACAREVLGQQGYIGHGGDPSSEPTSPASTPSTRSPRLSRRTLPKPDRDLRLLKSGFGTYP
GRKR GALHPQTILFPCPACQGDVELGERGLSGLFRNLTLERVVERYRQSVSVGGAILCQLCKPPPLEATKG
CTECRATFCNECFKLFHPWGTQKAQHEPTLPTLSFRPKGLMCPDHKEEVTHYCKTCQRLVCQLCRVRRTHS
GHKITPVL SAYQALKDKLTKSLAYILGNQDTVQTQICELEETIRHTEVSGQQAKEEVSQLVRLGAVLEEK
RASLLQAIIECQQERLSRLSAQIHEHQSLLDGSGLVGYAQEVLKETDQPCFVQAAKQLHNR IARATEALQT
FRPAASSSFRHCQLDVGREMKLLTELSFLRGCGRHRLCSGAPQCPRRPS * "

537 AS-Reste.

Haupt-Splicevariante 2 (enthält cDNA12 mit 5'- wie 3'- terminalen Ergänzungen):

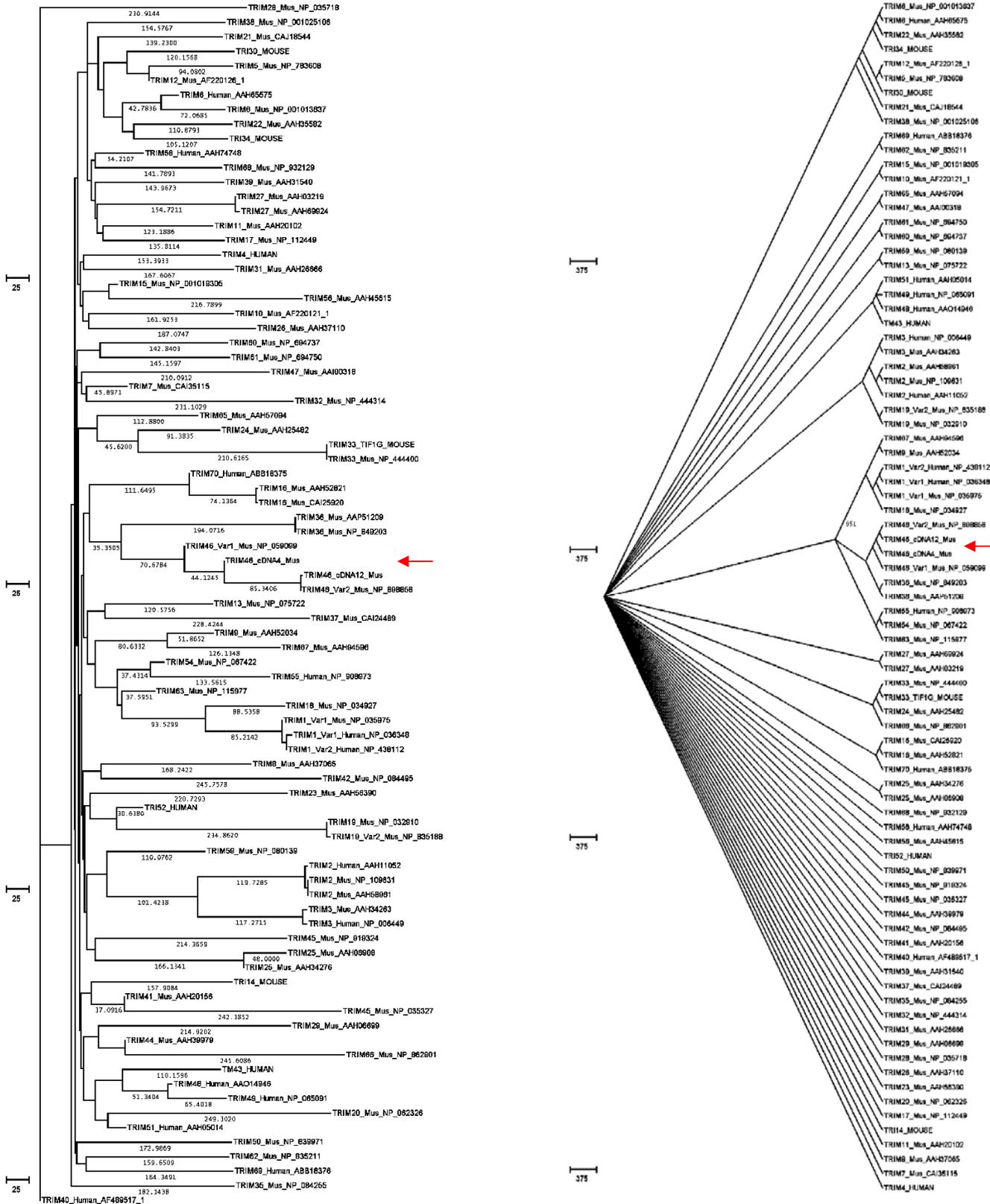
TGGAGAAAGAGGGGAGCCAAAGCCGGCGCGGTTGTCTGTACGCAGGCGTTCGGGGCCAACGTGGACTTGCTTTACTTCTTCTCTACGCGCCTTGGGT
GCAGCGCCCTCTTGTGGCAAGGAGGAAAATAATGCTTCTTAAGAGCATTCTAGGCCACCGCCCTGCTTGGTCTCCAGCCTTTCTGTAGCCAAGGCATCTG
CTGTCTCTCTGGACAAGCTGCACCTCATCTTTTCAGTCTATGATCCCATGGCCTAGAGTACCTGTGCCTTCATTGTATTCATGTCTATCTCCCGTACAA
CTTCTCAGACCTCCCTGACCCACTATAATTGCCTCAACAACCTCCCGAAGATATGTGCCACCCAAGATGTAGCACCCTCCACCTGGAGTTCTTCTTC
TGAAACGAGCTTCGTGCTTTATGTGAGTAGTATGACCCAGGAATCGATGCAAGCTTCTAATAGGAGGAATGGTTCCCTACCTCAAATACCTCCATGTT
ACCCACCCCTAGACCGCCTTTGGAGAACCACGTGGGAAGAACTATTTCCCACCCCTACCTCGACGGACGCAGTTCGAAGCTAGTCCCTGGAGCAT
GCGCAGTGACATCTCACCTCCCCACCCCTCCCTCACCCCCACCCGGCTCCTGCATTAAGCCCCGGGTTTCGCAGCAGCAGCCAGGATCGGGCACCCG
GGGGGGGGGGCAGTAGGGCCATGGCTGAGGGTGAAGATATGCAGACCTTCACTTCCATCATGGATGCACCTAGTCCGCATCAGTACAAGCATGA
AGAACATGGAGAAGAACTGCTGTGCCAGTGTGCCAAGAGATGTACAAGCAGCCACTAGTGTCTGCTTGTACCCACAACGTGTGCCAGGCCCTGTGC
CCGGAGGTTTTGGCCAGCAGGGGTACATAGCCATGGTGGGGATCCGAGTTCGGAGCCCACTTCTCCTGCTTCCACCCCTTACCCGCAGCCCC
CGCCTCTCTCGGAGAACTTCCCCAAGCCAGATCGCTTGGACCGGCTCCTTAAGTCAAGGCTTGGGACATACCCTGGGGGGAAGCGTGGTGCCTTGC
ACCCAGACGATCCTATTCCCGTGCCAGCCTGCCAAGCGGATGTGGAGCTGGGGGAGAGGGCCCTTTCGGGGCTTTCCGAAAACCTGACCCTAGA
GCGAGTGGTGGAGAGGTACCGCCAGAGTGTGAGTGTGGGAGAGCCATCCTGTGCCAGTTGTGCAAGCCCCACCACCTAGAGGCCACCAAGGGTGC
ACAGAGTGTGAGTACCTTCTGTAAACGAATGCTTCAAGCTTCCACCCCTGGGGCAGCTCAGAAGGCGCAGCATGAGCCACCGTACCCACTCTTT
CATTCCGCCCAAGGGTCTGATGTGTCCAGACCACAAGGAAGAGGTGACCCACTACTGTAAGACATGTCAACGACTGGTGTGCCAACTTGCAGAGT
ACGGCGTACCCACAGTGGGCACAAGATCACACCAGTGTCTAGTGCCTACCAGGCCCTCAAGGATAAGCTAACAAGAGCCTGGCATAACATCTTGGGA
AATCAGGACACTGTGCAGACCAGATTTGTGAGCTGGAAGAGACCACTCAGGCACACTGAGGTGAGTGGTCAAGCAAGAAAAGAGGGAGGTGTCCGAGC
TGGTTTCGGGACTAGGGCTGTGTGGAAGAGAAGCGGGCTCAGTGTTCAGGCCATTGAAGAATGCCAGCAAGAGCGCTTATCCCGCTCAGCGC
CCAGATCCAAGCAACCAGAGCCCTGTCTGGATGCTCGGGTCTGGTGGGTATGCGCAGGAAGTCTTAAGGAAAACAGACCAGCCTTGTTTGTACAA
CGAGCCAAACAGCTGCATAACAGGATGCCCCGAGCCACTGAGGCCCTCCAGACATTCCGGCCAGCTGCCAGCTCCTCCTTCCGCCACTGCCAGCTGG
ATGTGGGCGTGAGATGAAGCTGTTGACCGAGCTTAGTCTCCTGAGAGTGCACCCGAGGCCCGCTCATAGACACCCACCGCACTTTGCTATGATCA
AATCTTCTGTGCTGGCGGCTGCCCCCTCACTCACCCCTGCCTGGCATTACACCGTTGAGTTCGGGCGCACAGATGTCCCGCCAGCCAGGCCCT
ACACGCTGGCAGCGCCGGGAAGAGGTGAGGGGACCAGCGCCCTTCTTGAAGAACCCGACAGGGCTCTGTGTACGTGTCTGCTGCTCCGTGGCTGCA
ACAAGGCTGGCTACGGAGAGTACAGTGAAGATGTGCACCTGCACACACCCCGCCCTGTCTGCACCTTCTCCTTGTGAGTGGCCGCTGGGGTGCAG
CCGAGAGCGCTAGCCATCAGCAAGGACCCAGCGAGCGGTGCGGAGTATCCAGGGCTTCCCTTGTCTGCTGGCTGTGAGCGGCTGCTCACGGCTGC
CACCTGAGTGTGGAGGTGTCTTGGGTGATGTGGCTGTGACCCAGGGCCGACGTACTGGGCTGTGCGGTAGACCCTGCTCCTACTTGGTCAAGG
TGGGCGTGGGCTGGAGAGCAAACTTCCAGAAAGCTTCCAGGGTGCCTGGATGTGATCAGCCCCAGATACGACCCGGACAGTGGGCACGACAGCGG
TGCCGAGGACGCTGCGGTGGAGGGTTACCACCTTTGCTTTCTTGACCATCGGCATGGGCAAGATCCTGTGGGTTCCGGAGCGAGTTCCAATGCA
GGGCTGACAGGAGGGATGGCCCCACCGCCAGCTGCACAGTGCCTTGCACCCCGCTAGGTATCTGTTTGGACTACGAGCGGGGGGGGCTCTCT
TCCTGGATGCGGTGCTTCCGTGGGCTGCTCGAGTGCCTTGGACTGTCTCAGGCCTGTGTGCCTGCTTCTGCTTATTGGGGTGGCGCTGT
TCAGCTGCAGGAGCCCGTGGGCACCAAGCCTGAGAGGAAAGTCAACATGGGGGCTTTGCCAAAACCTGACTGAGCCGTTTCCAGCCCTCTCAGACC
TGAGTCTGCTCCCAAGTCTCTGGCATCGAGTTGTTTTCCCAACAGCTTCTCCTCCAGACTTTCCTAACCATGTGGCCCTGCCCATACCTTGC
CAGCGGTGTCTCCAGGGCTTCCCTTGACTAAGGGACTTTCTCTGCTTCTCTGATGTCTTCAATCTCTGTGTTACCTGTGGCTAGGCCG
CAGGCTCATCATGTCTGACCCAGGCCCCCGCTTGGCATATAACCAAGGCATAGAAAGCCCTGTTCCGTCCCTGGCTGTGCTCCTGAGCCTTA
CTGGGAGGGAGGGACCTGGAACACTGGATATGACTAACAACCTCTGCCCTTGCCTTGGCAAGCCCCCTGCCCACTAATGTGACTGCAGCCTTGG
CAGCCAGGCTTTGAGCCTCCAGTGGAGACAGAGGAGAACCTATCTGTTTTATTGGGTCCTATACCCTCCAGTGCATGTCCCTTCTGTCCCTCT
TCTCTCTTGCATGCTTTACCTATCCAGCACCATGCCAACGTGCCAAGTCTCCCTTGGGAACCTAGTAAAGGCTGGTGTCCCATTTGGGTTGGCC
AAGCTAGGCCTCTGGTGCCTGCTACTGCCTCCGTACAGTGGGCATTGCTAGGCCTGTGCTGAGCAACAGCTGTAATTTTCATGTTTATAAACATA
AACTGTGACACCAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

/translation="MQASNRNGSYLKYPYPPRPPLLENHVGRTISHPLPRRTQFEASPWSMRSDISPSPLPS
PHPAPALSPGFAAAARIHHPGAGGHSRAMAEGEDMQTFISIMDALVRISTSMKNMEKELLCPVCQEMYKQP
LVLPCTHNVCQACAREVLGQQYIGHGGDPSSEPTSPASTPSTRSPRLSRRTLKPDRLDRLKSGFGTYP
GRKRGALHPQITLFPACPACQGDVELGERGLSGLFRNLTLERVVERYRQSVSVGGAILCQLCKPPPLEATKG
CTECRATFCNECFKLFHPWGTQKAQHEPTLPTLSFRPKGLMCPDHKEEVTHYCKTCQRLVCQLCRVRRTHS
GHKITPVL SAYQALKDKLTKSLAYILGNQDVTQTOICELEETIRHTEVSGQQAKEEVSQLVRLGAVLEEK
RASLLQAIIECQQERLSRLSAQIHEHQSLLDGSLVGYAQEVLKETDQPCFVQAAKQLHNR IARATEALQT
FRPAASSSFRHCQLDVGREMKLLTELSFLRVPEAPVIDTQRTFAYDQIFLCWRLLPHSPPAWHYTFEFRRT
DVPAQPGPTRWRREEVRGTSALLENPDTSVYVLRVVRGCNKAGYGEYSEDVHLHTPPAPVLHFFLDGRWG
ASRERLAI SKDQRAVRSIPGLPLLLAERLLTGCHLSVDVVLGDVAVTQGRSYWACAVIDPASVYLVKVGVL
ESKLQESFQGAPDVISPRYDPDSGHDSGAEDA AVEALPPFAFLTIMGKILLGSGASSNAGLTGRDGPTAS
CTVPLPRLGICLDYERGRVSFLDAV SFRGLLECLPLDCSGPVCPAF CF IGGGAVQLQEPVGTKPERKVTIG
GFAKLD* "

849 AS-Reste.

Zwar weisen die **Proteine deutliche Größenunterschiede** (537 versus 849 AS) auf, die Längen der **mRNAs hingegen sind kaum verschieden**. cDNA12 lässt sich durch den Einschub des **38 bp** langen alternativen Exons 7b in cDNA4 überführen, was allerdings eine Verschiebung des Leserasters und ein vorzeitiges Stop-Codon bewirkt. Die etwas längere cDNA4 erzeugt dadurch das kürzere Protein. Ein Unterschied von 38 bp ist im **Northern-Blot** praktisch nicht auflösbar, so dass dort **nur eine Bande erwartet** würde (siehe Seite 52).

Phylogenetische Position von *TRIM46* in der TRIM-Familie



Auf der Seite davor sind Stammbäume der TRIM-Proteinfamilie zusammen mit den Proteinsequenzen von *TRIM46* dargestellt, um festzustellen, zu welchen anderen Proteinen *TRIM46* am meisten verwandt ist.

Es wurden die Proteinsequenzen von cDNA12 und cDNA4 verwendet sowie zwei kürzere schon in der NCBI-Gendatenbank vorhergesagte Sequenzen für die beiden *TRIM46*-Protein-Isoformen. Die Sequenzen der übrigen TRIM-Proteine wurden ebenso aus der NCBI-Datenbank entnommen, die Accession-Nummern sind mit angeführt.

Der **linke Baum** wurde mit der Software *Accelrys DS-Gene 1.5* unter Verwendung des **Neighbor Joining (NJ) Algorithmus** erstellt, der sein Distanzmaß durch den Abstand eines Punktes zu allen anderen normiert und somit nicht wie UPGMA von der Annahme einer konstanten Mutationsrate (molekularen Uhr) ausgehen muss.

Der **rechte Baum** wurde ebenfalls mit NJ erstellt, allerdings unter den zusätzlichen Parametern **Poisson-Correction** und Bootstrap 1000. Letzteres bewirkt eine statistische Absicherung des Ergebnisses, da NJ mit seinem Greedy-Algorithmus nicht zwangsläufig eine optimale Lösung erzeugt, sondern eine möglichst gute unter Berücksichtigung vom Rechenaufwand. Die Poisson-Correction bezieht die statistische Wahrscheinlichkeit von Rückmutationen mit ein. Das **Bootstrap-Verfahren** testet die Variabilität des durch NJ erzeugten Baumes, indem aus den vorliegenden Alignments zufällige Bereiche ausgewählt und vervielfältigt werden, um damit NJ zu wiederholen. Somit wird die Variabilität des Greedy-Verfahrens ausgelotet und Cluster, die trotzdem zusammenbleiben, entsprechend höher bewertet als solche, die nun anders zugeteilt werden. Am Ende bleiben die Cluster übrig, die die statistischen Kriterien überstanden haben (standardmäßig >95% der Fälle), so dass die am zuverlässigsten Zusammengehörigen herausgefiltert werden.

Die Bäume links und rechts zeigen deutliche Unterschiede in den Zuordnungen. Diese Instabilität des Baumes könnte ein Hinweis auf Evolution der Genfamilie durch **mögliches Exon-Shuffling** sein, wobei Exons aus eigentlich entfernter verwandten Genen neu kombiniert werden, ohne dass dazu Serien von Einzelmutationen nötig wären, was der Algorithmus für die Baumerstellung allerdings unterstellt und dann die falschen Schlüsse zieht, wie etwa ein solches zusammengesetztes Gen als Vorgänger seiner beiden Vorfahren anzunehmen. Die TRIM-Genfamilie ist mit ihrer Korrelation von Protein-Domänen zu Exons besonders geeignet oder anfällig hierfür. Daher ist sie auch Gegenstand anderer Forschergruppen (Maselli und Stupka, noch nicht publiziert; maselli@tigem.it), die sie als **Modellsystem für Exon-Shuffling** studieren.

Bezüglich *TRIM46* ergibt sich hier die Feststellung, dass es **phylogenetisch am ehesten mit *TRIM36* verwandt** ist. Hingegen wurde die Verwandtschaft zu *TRIM16* von NJ alleine zuvor überschätzt, das nach Bootstrapping jetzt weiter entfernt liegt. Die **weitläufigere Verwandtschaft zu *TRIM1*, *TRIM9*, *TRIM18*, *TRIM54*, *TRIM55*, *TRIM63* und *TRIM67*** blieb erhalten. Dieses Resultat ist aus dem Augenschein heraus einfach nachvollziehbar, wenn man es mit Abbildung 32 vergleicht. Dabei weisen die dargestellten *TRIM1*, *TRIM9*, *TRIM18* und *TRIM36* die einheitliche Domänenstruktur aus Ring-BBox1-BBox2 auf, wohingegen bei vielen anderen die BBox1 fehlt und *TRIM16* keine Ring-Domäne hat. Es gibt aber auch Fälle gleicher Domänenstruktur wie bei *TRIM8*, wo jedoch zu viele Abweichungen in der konkreten Sequenz vorliegen, um eine engere Verwandtschaft zu begründen, was ab einer Schwelle als unwahrscheinlicher bewertet wird als die Deletion einer Domäne.

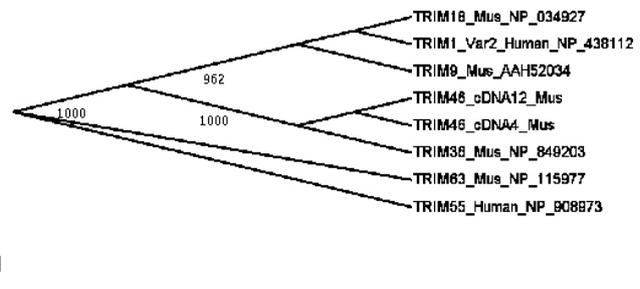
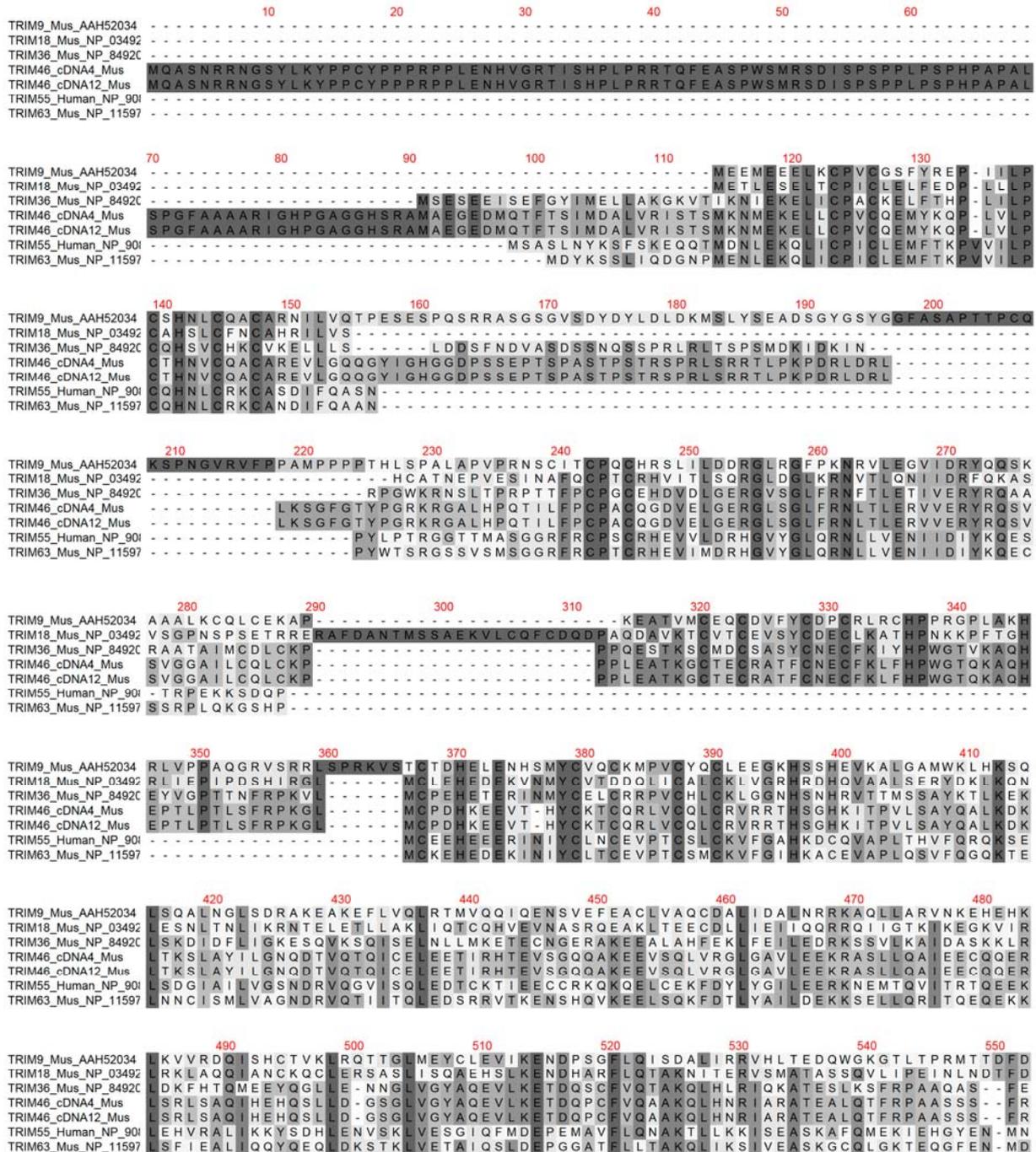


Abbildung 54: Phylogenie der engsten Verwandten von *TRIM46* mit Neighbor Joining unter Poisson-Correction und Bootstrapping.

Die Verwandtschaft könnte Hinweise auf gewisse ähnliche Eigenschaften oder Funktionen von *TRIM46* mit den genannten anderen TRIM-Proteinen geben, welche Anlass für neue Experimente zur Verifikation geben könnten. Umgekehrt birgt zu hohe Verwandtschaft das Risiko von Redundanz, was die Entdeckung eines Phänotyps von transgenen Mäusen erschweren könnte.

Das folgende **Alignment der verwandtesten Sequenzen von *TRIM46*** wurde mit *ClustalW* hergestellt und zeigt konservierte Bereiche, die von solchen größerer Varianz getrennt sind, was die Befürchtung auf Redundanz abschwächt:



```
TRIM9_Mus_AAH52034  LSLDNSPLLSQSIHQLDLFVQVKASSPVPA TPILQLEECCTHNSATLSWKQPPLSTVAADGYILELDDGS
TRIM18_Mus_NP_03492  TFDLDFSRKLLLECLDYLTAPNPPAIREELCTAS YDTITVHWTSSEDFSVVSYELQYTI FTGQANVFN
TRIM36_Mus_NP_8492C  DYVVNISKQTEVLGELSPFSSGIDIP EINEEQSKVYNNALIDWHHPKDKADSYVLEYRKINR--DEE
TRIM46_cDNA4_Mus    HCQLDVGREMKLLTELSFLRGCGRHGLCSGAPQCRRPS-
TRIM46_cDNA12_Mus   HCQLDVGREMKLLTELSFLRVPEAPVIDTQRTFAYDQIFLCWRLPPHSPPAWHYITVEFRRTDVPAPQPGP
TRIM55_Human_NP_90I HFTVNLNREKIIREIDFYREDEDEEEEGGEGEKEGEGEVGGEA VEVEEVENVQTEFPGEDENPEKAS
TRIM63_Mus_NP_11597 FFTLDLEHIADALRAIDFGTDEEEEFIEEEDQEEESTEGKEEGHQ-

TRIM9_Mus_AAH52034  GGQFREYVYGKEMCTVDGLHFNSTYNARVKAFNKTGVS PYSKTLVLOTSEGR-----
TRIM18_Mus_NP_03492  VACDGTCLLGSAGLCNSA-DSWMI VPNIKQNH YTVHGLQSGTKYIFTVKA INQAGSRSSPEPKLKTNSQ
TRIM36_Mus_NP_8492C  MISWNEIEVHGTSKVVSN-LESNSPYAFRVRAYRGSICSPCSRELILHTPPAPVFSFLFDEKCGYNT E H
TRIM46_cDNA4_Mus    TRWQRREEVRGTSALLEN-PDTGSVYVLRVRGCNKAGYGEYS EDVHLHTPPAPVLFHAEEDGRWGASRER
TRIM46_cDNA12_Mus   ELSQVELQAAPGALPVSS-PEPPPALVPAADAPV TQGEVVPTGSEQTTESETPVPAAAETADPLFLYPSW
TRIM63_Mus_NP_11597 -----

TRIM9_Mus_AAH52034  -----
TRIM18_Mus_NP_03492  PFRLDPKSAHRKLVSHDNLTV ERDDSSSKKSHAPERFAGGGSYGVAGNVFIDSGRHYWEVVTSGSTWY
TRIM36_Mus_NP_8492C  LLLNLKRDRVESRAGFNVLAAERIQVGHYTSLD--YIIGDVGVTKGKHFWACRVEPYSYLKVGVA S S
TRIM46_cDNA4_Mus    LAISKDQRAVRSIPGLPLLLAAERLLTGCHLSVD--VVLGDVAVTQGRSYWACAVDPASYLKVG VGL E
TRIM46_cDNA12_Mus   YKQQRKATTNPPCTPGSEGLGQIGPPGSEDSNV--RKA E VAAAAASERA AAVSGKET SAPAATSQIGFE
TRIM55_Human_NP_90I -----
TRIM63_Mus_NP_11597 -----

TRIM9_Mus_AAH52034  -----
TRIM18_Mus_NP_03492  AIGLAYRSAPKHEWIGKNAASWALCRCHNHWA VRHDGKETPIAP-
TRIM36_Mus_NP_8492C  DKLQEWLRSRDAASPRYEQDSGHDGSEDACFDSSSQPFTLV TIGMKKFFIPKSP TSSN-----EPE
TRIM46_cDNA4_Mus    SKLQESFQGAPDVISPRYDPPDSGHDSGAEDA AVEALPPFAFLTIGMKILLGSGASSNAGLTGRDGP T A
TRIM46_cDNA12_Mus   APPLQGQAAAPASGSGADSEPARHIFSF SWLNSLNE-----
TRIM55_Human_NP_90I -----
TRIM63_Mus_NP_11597 -----

TRIM9_Mus_AAH52034  -----
TRIM18_Mus_NP_03492  ---APHLRRVGVLLDYDNGSIAFYDALSSVHHTFHAAL AQPVCPTFTVWNKCLTIVTGLPIPDHLDCT
TRIM36_Mus_NP_8492C  NRVLPMP TSI G IFLDCDKGKVSFYDMDHMKCLYERQVDCSHTMYPAFALMGSGG I QLEEA I TAKYLEY E
TRIM46_cDNA4_Mus    SCTVPLP PRLGICLDYERGRV SFLDAV SFRGLLECPLDCSGPVC PAFCFI G GAVQLQEPVGT KPERKV
TRIM46_cDNA12_Mus   -----
TRIM55_Human_NP_90I -----
TRIM63_Mus_NP_11597 -----

TRIM9_Mus_AAH52034  -----
TRIM18_Mus_NP_03492  EQRP-----
TRIM36_Mus_NP_8492C  EDV-----
TRIM46_cDNA4_Mus    -----
TRIM46_cDNA12_Mus   TIGGF AKLD
TRIM55_Human_NP_90I -----
TRIM63_Mus_NP_11597 -----
```

In Übereinstimmung mit der hier aufgestellten Stammbaumanalyse ergeben sich beim **Blasten der Sequenz von TRIM46** neben TRIM46 die auch hier genannten weiteren Verwandten. Der E-Value gibt dabei die Wahrscheinlichkeit, dass die Sequenzähnlichkeit zufällig sein könnte (NCBI, blastp, nr):

Accession	Gene	Description	Score	E-Value
sp Q7TNM2	TRI46_MOUSE	Tripartite motif protein 46 (Tripartite...	812	0.0
sp Q80WG7	TRI36_MOUSE	Tripartite motif protein 36 (Haprin) (Acro	410	4e-114
sp P82458	TRI18_RAT	Midline-1 (Tripartite motif protein 18)	161	5e-39
sp Q9QUS6	TRIM1_MOUSE	Midline-2 (Midline defect 2) (TRIM 1	154	6e-37
sp Q91ZY8	TRIM9_RAT	Tripartite motif protein 9 (SNAP-25-inter...	145	3e-34
sp Q91Z63	TRI63_RAT	Ubiquitin ligase TRIM63 (Tripartite motif...	144	7e-34
sp Q9BYV2	TRI54_HUMAN	Tripartite motif protein 54 (Muscle-spe...	143	1e-33
sp Q9BYV6	TRI55_HUMAN	Tripartite motif-containing 55 (Muscle-..	141	4e-33

Annotation der Protein-Domänen von *TRIM46*

TRIM46 Proteinisoform 1 (cDNA4 mit 5'- wie 3'- terminalen Ergänzungen):

MQASNRNRNGSYLKYPYPPYPPRPPLENHVGRTISHPLPRRTQFEASPWSMRSDISPSPLPSPHPAPALSP
GFAAAARIGHPGAGGHSRAMAEGEDMQTFTSIMDALVRISTSMKNMEKELLCPVCQEMYKQPLVLPCTHNV
CQACAREVLGQQGYIGHGGDPSSEPTSPASTPSTRSPRLSRRTLPKPDRDLRLLKSGFGTY **PGRKRG** LHP
QTILFPCPACQGDVELGERGLSGLFRNLTLERVVERYRQSVSVGGAILCQLCKPPPLEATKGCTE **CRATFC**
NECFKLFHPWGTQKAQHEPTLPTLSFRPKGLMCPDHKEEVTHYCKTCQRLVCQLCRVRRTHSGHKITPVLS
AYQALKDKLTKSLAYILGNQDTVQTQICELEETIRHTEVSGQAKEEVSQLV RGLGAVLEEKRASLLQAIE
ECQERLSRLSAQIHEHQSLLDGSGLVGYAQEVLKETDQPCFVQAAKQLHNR IARATEALQTFRPAASSSF
RHCQLDVGREM KLL **TELSFLR** GCGHRGLCSGAPQCPRRPS*

537 AS-Reste.

TRIM46 Proteinisoform 2 (cDNA12 mit 5'- wie 3'- terminalen Ergänzungen):

MQASNRNRNGSYLKYPYPPYPPRPPLENHVGRTISHPLPRRTQFEASPWSMRSDISPSPLPSPHPAPALSP
GFAAAARIGHPGAGGHSRAMAEGEDMQTFTSIMDALVRISTSMKNMEKELLCPVCQEMYKQPLVLPCTHNV
CQACAREVLGQQGYIGHGGDPSSEPTSPASTPSTRSPRLSRRTLPKPDRDLRLLKSGFGTY **PGRKRG** LHP
QTILFPCPACQGDVELGERGLSGLFRNLTLERVVERYRQSVSVGGAILCQLCKPPPLEATKGCTE **CRATFC**
NECFKLFHPWGTQKAQHEPTLPTLSFRPKGLMCPDHKEEVTHYCKTCQRLVCQLCRVRRTHSGHKITPVLS
AYQALKDKLTKSLAYILGNQDTVQTQICELEETIRHTEVSGQAKEEVSQLV RGLGAVLEEKRASLLQAIE
ECQERLSRLSAQIHEHQSLLDGSGLVGYAQEVLKETDQPCFVQAAKQLHNR IARATEALQTFRPAASSSF
RHCQLDVGREM KLL **TELSFLRVPEAPVIDTQRTFAYDQIFLCWRLPPHSPPAWHYTVF **RRTDVPAQPGPT****
RWQRREEVV RGTSALENPDTGSVYVLRV RGCNKAGYGEYSEDVHLHTPPAPVLHFFLDGRWGASRERLAIS
DQRAVRSIPGLPLLLAAERLLTGCHLSVDVVLGDVAVTQGRSYWACAVDPASYLVKVGVGLESKLQESFQ
GAPDVISPRYDPDSGHDSGAEDA AVEALPPFAFLTIGMKILLGSGASSNAGLTGRDGPTASCTVPLPRL
GICLDYERGRVSFLDAVSFRGLLECPLDCSGPVCPAFCF IGGGAVQLQEPVGTKPERKVTIGGFAKLD*

849 AS-Reste.

Annotation von Motiven in den Proteinsequenzen:

CxxCx₍₁₁₋₁₆₎CxHxxCxxCx₍₇₋₇₄₎Cxx (C/D): RING-Domäne.

Cxx (C/D) x₍₇₋₁₂₎CxxCxxxxCxx (C/H) x₍₃₋₄₎Hx₍₄₋₉₎H: B-Box 1.

CxxHx₍₇₋₉₎Cxx (C/D/E/H) xxxxCxxCx₍₃₋₆₎Hx₍₂₋₄₎ (H/C): B-Box 2.

AVLEE...EMKLL: Coiled-Coil-Domäne.

TELSF...: Fibronectin-Typ III – FN3 -Domäne.

VRSIP... B30.2-like / Butyrophylin / **SPRY** -Domäne.

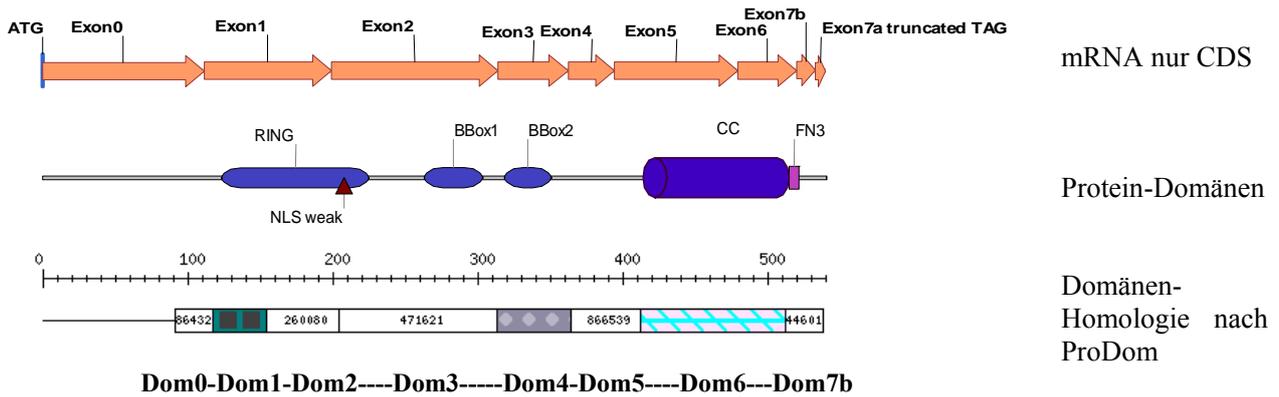
PGRKRG: Schwaches Kernlokalisations-Motiv (nach <http://psort.nibb.ac.jp>).

RRTDVPAQPGPTRWQR: Starkes bipartites Kernlokalisations-Motiv (nach <http://psort.nibb.ac.jp>).

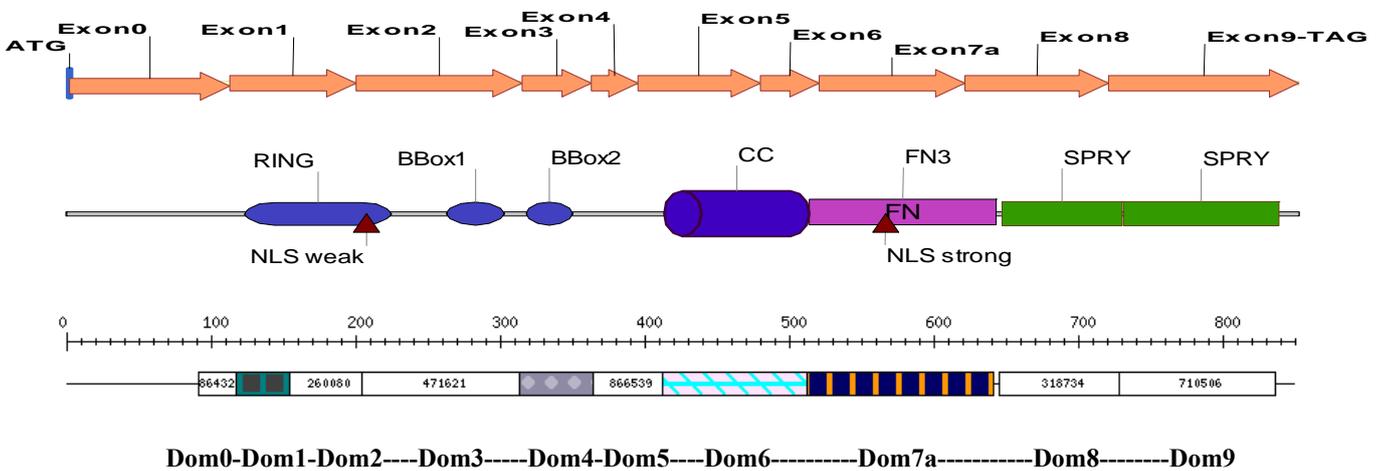
Die ProDom-Protein-Datenbank annotiert die Domänen hinsichtlich ihrer Homologie:

Daher ergeben sich etwas andere Grenzen als bei der direkten Annotierung der Konsensusmotive für RING, B-Box 1, B-Box 2, Coiled-Coil und anderer. Stattdessen eine Relation zu den Exons, was die Shuffling-Hypothese stützt.

TRIM-Proteinisoform 1 (cDNA4 mit 5'- wie 3'- terminalen Ergänzungen):



TRIM-Proteinisoform 2 (cDNA12 mit 5'- wie 3'- terminalen Ergänzungen):



Die beiden Proteinisoformen von *TRIM46* gleichen sich bis Dom6. Danach haben sie unterschiedliche C-Termini, wobei Isoform 2 (cDNA12) mit FN3 und SPRY Domänen hat, die annotierbar sind und möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (siehe *Yeast-Two-Hybrid-Screen* Seite 75). Der C-Terminus von Isoform 1 (cDNA4) hingegen ist völlig unbekannt. Genauso verhält es sich bei beiden Isoformen mit dem N-Terminus und der Dom0.

Für die einzelnen Domänen bestehen folgende Homologien zu bekannten Proteinen:

Quelle: ProDom <http://prodes.toulouse.inra.fr/>

Dom0: Spezifisch für *TRIM46*, keine Homologie in NCBI-Datenbank außer zu *TRIM46* anderer Spezies.

Dom1: RING-Domäne. Homologie zu *TRIM9*.

Dom2: RING-Domäne. Spezifisch für *TRIM46*, keine Homologie in NCBI-Datenbank außer zu *TRIM46* anderer Spezies.

Dom3: B-Box 1. Homologie zu *TRIM36* und *TRIM9*.

Dom4: B-Box 2: Homologie zur ganzen TRIM-Familie = stärkste konservierte Domäne der Familie.

Dom5: Spezifisch für *TRIM46*, keine Homologie in NCBI-Datenbank außer zu *TRIM46* anderer Spezies.

Dom6: Coiled-Coil-Domäne. Homolog zu *TRIM18 (MID1)*, *TRIM36*.

Dom7a: Fibronectin-Typ III – FN3 -Domäne. Homolog zu *TRIM36* und *TRIM9*.

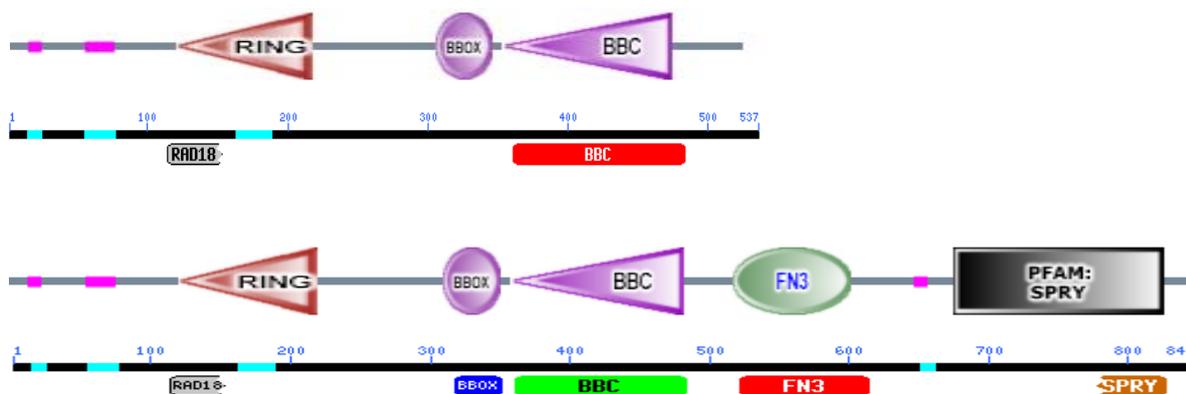
Dom7b: Spezifisch für *TRIM46-Isoform1*, keine Homologie in NCBI-Datenbank außer zu *TRIM46* anderer Spezies.

Dom8: SPRY –Domäne. Homolog zu *TRIM36*.

Dom9: SPRY –Domäne. Homolog zu *TRIM36*.

Funktionelle Annotation der Domänen von *TRIM46*:

NCBI-Protein-Blast sowie SMART-EMBL (<http://smart.embl-heidelberg.de>) erkennen die Domänen von TRIM-Isoform1 und –Isoform2 analog:



Für die einzelnen Motive gibt es folgende zusammengefasste **Hintergrundinformationen in den Datenbanken** von NCBI und Smart-EMBL, die hier zitiert werden sollen:

RING:

“**RAD18**, RING-finger-containing **E3 ubiquitin ligase** [Signal transduction mechanisms]”.

“E3 ubiquitin-protein ligase activity is **intrinsic to the RING domain** of c-Cbl and is likely to be a general function of this domain; Various RING fingers exhibit binding activity towards E2 ubiquitin-conjugating enzymes (Ubc' s)”.

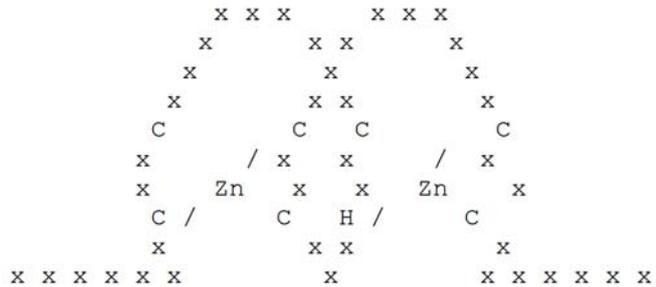
“**Quality control of intracellular proteins is essential for cellular homeostasis**. Molecular **chaperones recognise** and contribute to the refolding of **misfolded** or unfolded **proteins**, whereas **the ubiquitin-proteasome system mediates the degradation** of such abnormal proteins. **Ubiquitin-protein ligases (E3s) determine the substrate specificity for ubiquitylation** and have been classified into HECT, U-box and RING-finger families.”

“The **RING-finger is a specialised type of Zn-finger** of 40 to 60 residues that binds two atoms of zinc, and is probably involved in mediating protein-protein interactions.”

Bei *TRIM46* allerdings schien die RING-BBC1-BBC2-CC-Struktur alleine nicht auszureichen, um Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln, da mit Isoform 1 (cDNA4) im *Yeast-Two-Hybrid-Screen* keine Protein-Partner gefunden wurden, wohl aber für Isoform 2 (cDNA12, siehe ab Seite 75).

“There are two different variants, the **C3HC4-type** and a C3H2C3-type, which is clearly related despite the different cysteine/histidine pattern. The latter type is sometimes referred to as 'RING-H2 finger'.”

“Several 3D-structures for RING-fingers are known. The 3D structure of the zinc ligation system is unique to the RING domain and is referred to as the 'cross-brace' motif. The spacing of the cysteines in such a domain is C-x(2)-C-x(9 to 39)-C-x(1 to 3)-H-x(2 to 3)-C-x(2)-C-x(4 to 48)-C-x(2)-C. Metal ligand pairs one and three co-ordinate to bind one zinc ion, whilst pairs two and four bind the second, as illustrated”.



“Note that in the older literature, some RING-fingers are denoted as LIM-domains. The LIM-domain Zn-finger is a fundamentally different family, albeit with similar Cys-spacing”.

“**Diseases involved in mutations with the RING-Domain**”:

“Zellweger syndrome (Peroxisome Biogenesis Factor 10; PEX10, lethal diseases that are characterized by neuronal, hepatic, and renal abnormalities and severe mental retardation), Adrenoleukodystrophy neonatal, **Breast cancer-1** (Breast Cancer 1 Gene; BRCA1); Ovarian cancer; Breast-ovarian cancer; Papillary serous carcinoma of the peritoneum, Prostate cancer.”

BBox:

“The **B-box zinc finger** is an around 40 amino acids domain. **One or two copies of this motif are generally associated with a ring finger and a coiled coil motif to form the so-called tripartite motif.** It is found essentially **in transcription factors, ribonucleoproteins and protooncoproteins, but no function is clearly assigned to this domain.** It has been shown to be essential but not sufficient to localize the PML protein in a punctate pattern in interphase nuclei . Among the 7 possible ligands for the zinc atom contained in a B-box, only 4 are used and bind one zinc atom in a Cys2-His2 tetrahedral arrangement. The NMR analysis reveals that the B-box structure comprises two beta-strands, two helical turns and three extended loop regions different from any other zinc binding motif.”

“**Diseases involved in mutations with the BBox-Domain**”:

“Familial Mediterranean fever (Pyrin / Marenostin) is an autosomal recessive disorder characterized by recurrent attacks of fever and **inflammation** in the peritoneum, synovium, or pleura, accompanied by pain. Amyloidosis with renal failure is a complication and may develop without overt crises”.

BBC BBox-C-terminal:

“**Coiled coil region C-terminal to (some) B-Box domains.**

It is found in transcription intermediary factor 1-alpha, which associates with DNA-bound estrogen receptors; ring finger protein, a putative transcriptional regulator; and the GTP-binding protein Ard-1.”

FN3:

“**Fibronectins** are multi-domain glycoproteins found in a soluble form in plasma, and in an insoluble form in loose connective tissue and basement membranes. They contain multiple copies of 3 repeat regions (types I, II and III), which **bind to a variety of substances including heparin, collagen, DNA, actin, fibrin and fibronectin receptors on cell surfaces**. The wide variety of these substances means that fibronectins are **involved in a number of important functions**: e.g., wound healing; cell adhesion; blood coagulation; **cell differentiation and migration; maintenance of the cellular cytoskeleton; and tumour metastasis**. The role of fibronectin in cell differentiation is demonstrated by the marked reduction in the expression of its gene when neoplastic transformation occurs. Cell attachment has been found to be mediated by the binding of the tetrapeptide RGDS to integrins on the cell surface, although related sequences can also display cell adhesion activity.”

“Plasma fibronectin occurs as a dimer of 2 different subunits, linked together by 2 disulphide bonds near the C-terminus. The difference in the 2 chains occurs in the type III repeat region and is caused by alternative splicing of the mRNA from one gene. **The observation that, in a given protein, an individual repeat of one of the 3 types (e.g., the first FnIII repeat) shows much less similarity to its subsequent tandem repeats within that protein than to its equivalent repeat between fibronectins from other species, has suggested that the repeating structure of fibronectin arose at an early stage of evolution. It also seems to suggest that the structure is subject to high selective pressure.**”

“**The fibronectin type III repeat region is an approximately 100 amino acid domain**, different tandem repeats of which **contain binding sites for DNA, heparin and the cell surface. The superfamily of sequences believed to contain FnIII repeats represents 45 different families, the majority of which are involved in cell surface binding in some manner, or are receptor protein tyrosine kinases, or cytokine receptors.**”

“Approximately **2% of all animal proteins contain the FN3 repeat**; including extracellular and intracellular proteins, membrane spanning cytokine receptors, growth hormone receptors, tyrosine phosphatase receptors, and adhesion molecules. FN3-like domains are also found in bacterial glycosyl hydrolases.”

“**Diseases involved in mutations with the FN3-Domain**”:

“Affecting insulin-receptor: Leprechaunism (include enlarged breasts and clitorises in females and enlarged penises in males, as well as severe growth retardation. Sufferers are resistant to insulin. Early death is usual), Rabson-Mendenhall syndrome, Diabetes mellitus, insulin-resistant, with acanthosis nigricans”.

“Kallmann syndrome shows hypogonadotropic hypogonadism and anosmia. The gene responsible for the X-linked form of Kallmann syndrome, KAL1, encodes a protein, anosmin, that plays a key role in the migration of GnRH neurons and olfactory nerves to the hypothalamus.”

“Leptin Receptor LEPR morbid obesity is an adipocyte-specific hormone that regulates adipose-tissue mass through hypothalamic effects on satiety and energy expenditure, acts through the leptin receptor (LEPR), a single-transmembrane-domain receptor of the cytokine receptor family. The leptin receptor is found in many tissues in several alternatively spliced forms, raising the possibility that leptin exerts effects on many tissues including the hypothalamus. The leptin receptor is a member of the gp130 family of cytokine receptors that are known to stimulate gene transcription via activation of cytosolic STAT proteins”.

“Epidermolysis bullosa dystrophica - the causative mutation resides in the gene for type VII collagen or Integrin Beta-4; ITGB4. Hands, feet, elbows, and knees are sites of predilection. Bullae also develop on the mucosal surfaces and even the conjunctiva and cornea may be involved, fusion of all fingers and toes into mittenlike deformities and severe contractures of all 4 limbs. Spontaneous esophageal perforation and squamous cell carcinomas.”

“Neural Cell Adhesion Molecule L1, CAML1. Hydrocephalus due to aqueductal stenosis / MASA syndrome. The L1 cell adhesion molecule is one of a subgroup of structurally related integral membrane glycoproteins belonging to a large class of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules (CAMs) that mediate cell-to-cell adhesion at the cell surface. L1CAM is found primarily in the nervous system of several species and may be more aptly called a neural recognition molecule. Functions of L1CAM, including guidance of neurite outgrowth in development, neuronal cell migration, axon bundling, synaptogenesis, myelination, neuronal cell survival, and long-term potentiation.

Spasticity of the lower limbs, and all affected males have been reported to have increased reflexes. The features of spasticity have been referred to as complicated spastic paraplegia type 1 (SPG1). The adducted thumbs are thought to be caused by hypoplastic or absent extensor pollicis longus or brevis muscles. In affected males, the onset of speech is delayed”.

“Severe combined immunodeficiency (SCID), X-linked. The IL2RG gene encodes the gamma subunit of the interleukin-2 receptor (IL2R). Interleukin-2 (IL2) affects the growth and differentiation of T cells, B cells, natural killer cells, glioma cells, and cells of the monocyte lineage after specifically interacting with its receptors, earlier age at death, vulnerability to viral and fungal as well as bacterial infections, lack of delayed hypersensitivity, atrophy of the thymus, and lack of benefit from gamma globulin administration.”

“**B30.2-like / Butyrophilin / SPRY –Domain**”:

“The B30.2-like domain is a conserved domain of 160-170 amino acids which is found in nuclear and cytoplasmic proteins, as well as transmembrane and secreted proteins. It was named after the B30-2 exon which maps within the human class I histocompatibility complex region and codes for a 166-amino-acid peptide similar to the C-terminal domain of human **Sjogren's syndrome** nuclear antigen A/Ro (SS-A/Ro) and **ret finger protein (RFP)**, *Xenopus laevis* nuclear factor 7 (XNF7), and *Bos taurus* butyrophilin. The B30.2-like domain is found associated with different N-terminal domains: immunoglobulin domain in the case of butyrophilin, zinc-binding B-box domain in the case of RFP and SS-A/Ro and leucine zipper in the case of enterophilin. **The function of the B30.2-like domain is not known**, but the cytoplasmic B30.2-like domain of butyrophilin has been shown to **interact** with xanthine oxidase”.

“A group of proteins that contain the B-box motif also host a well conserved **domain of unknown function (DUF)**. The C-terminal portion of this region has been termed the **SPRY domain** (after SPLa and the RYanodine Receptor)”.

Subzelluläre Lokalisation des *TRIM46*-Gens

Die bioinformatische Annotation von Sequenzmotiven in den Exons des *TRIM46*-Gens (siehe Seite 50) offenbarte zwei Exons mit Lokalisationssequenzen für den Zellkern. In den alternativen Splicevarianten des *TRIM46*-Gens kamen diese Exons entweder beide vor oder eines von ihnen fehlte.

Zur Überprüfung der bioinformatischen Vorhersage für die subzelluläre Lokalisation, insbesondere also der möglichen Lokalisation im Zellkern, wurden *GFP*-Fusionskonstrukte von den unterschiedlichen Splicevarianten hergestellt (Sequenzen von cDNA12 und cDNA4 in den Vektor pEGFP-N2 im Leseraster mit dem enthaltenen *EGFP* kloniert) und in Zellkultur transfiziert. Da die verschiedenen Splicevarianten nach Translation zu nur 2 verschiedenen Protein-Isoformen führen – die anderen Splicevarianten sind redundant oder im nicht-kodierenden Bereich bzw. erzeugen trunkierte Proteine – genügte die Analyse von 2 Splicevarianten für diese beiden Protein-Isoformen. Die Fusion an *GFP* erfolgte dabei an dessen N-Terminus, so dass der 3'UTR von *TRIM46* abgeschnitten wurde und das *TRIM46*-Protein C-terminal an *GFP* fusioniert wurde.

Die Transfektion erfolgte in NIH3T3-Zellen, HeLa-Zellen und die Zelllinie Neuro2a (siehe Seite 160). Das Ergebnis war am deutlichsten in den NIH3T3-Zellen zu sehen, da diese die größten Zellkörper und – Kerne hatten.

cDNA12

- kodierender Bereich von 2.2 kbp ab zweitem ATG aus Exon 1 (siehe ab Seite 52).
- 9 Domänen entsprechend ihren Exons (siehe Seite 49).
- **2 bioinformatisch vorhergesagte Kernlokalisationssequenzen NLS** in den Domänen 1 und 7 (siehe Seite 65).



Abbildung 55: Expression von cDNA12-*GFP*-Fusionskonstrukt in NIH3T3-Zellen zeigt **Anreicherung im Zellkern**. Da sich *GFP* von sich aus nicht im Zellkern anreichern würde mangels Lokalisationssequenzen und aufgrund seiner Größe, muss es durch aktiven Transport über Erkennung von NLS dorthin gebracht worden sein.

cDNA4

- kodierender Bereich von 1.2 kbp ab zweitem ATG aus Exon 1 (siehe ab Seite 18).
- 7 Domänen, wobei Domäne 7b kleiner ist als 7a ohne deren NLS.
- **1 bioinformatisch vorhergesagte Kernlokalisationssequenz NLS** in Domänen 1 analog zu cDNA12.



Abbildung 56: Expression von cDNA4-*GFP*-Fusionskonstrukt in NIH3T3-Zellen zeigt Ausschluss aus dem Zellkern und Lokalisation im Cytoplasma. Offenbar reicht die eine verbliebene NLS in Domäne 1 alleine nicht aus, um die Kernlokalisation zu bewirken.

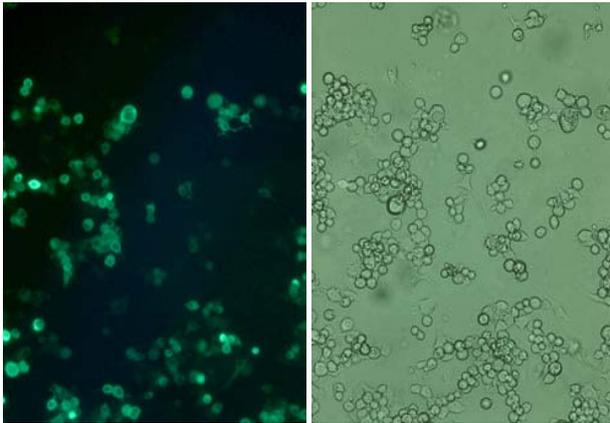


Abbildung 57: Übersicht der **Transfektionseffizienz** von > 80%, cDNA4-GFP in Neuro2a-Zellen mit Lipofectamin2000-Reagenz. Die Effizienzen der anderen Zelltypen waren auf vergleichbarem Niveau.

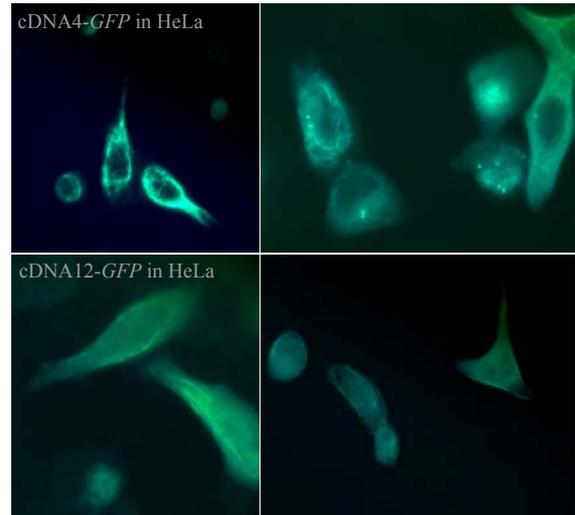


Abbildung 58: Transfektion von **cDNA4 (oben)** und **cDNA12 (unten)** als GFP-Fusionskonstrukte in **HeLa-Zellen**. Diese zeigen genauso wie bei NIH3T3-Zellen Ausschluss von cDNA4 vom Zellkern. Bei cDNA12 zeigt sich allerdings eher eine Gleichverteilung statt einer besonderen Anreicherung im Zellkern. Solche Lokalisationseffekte sind öfters zelltypabhängig (Cao, Borden et al. 1997), weswegen auch hier verschiedene Zelltypen getestet wurden.

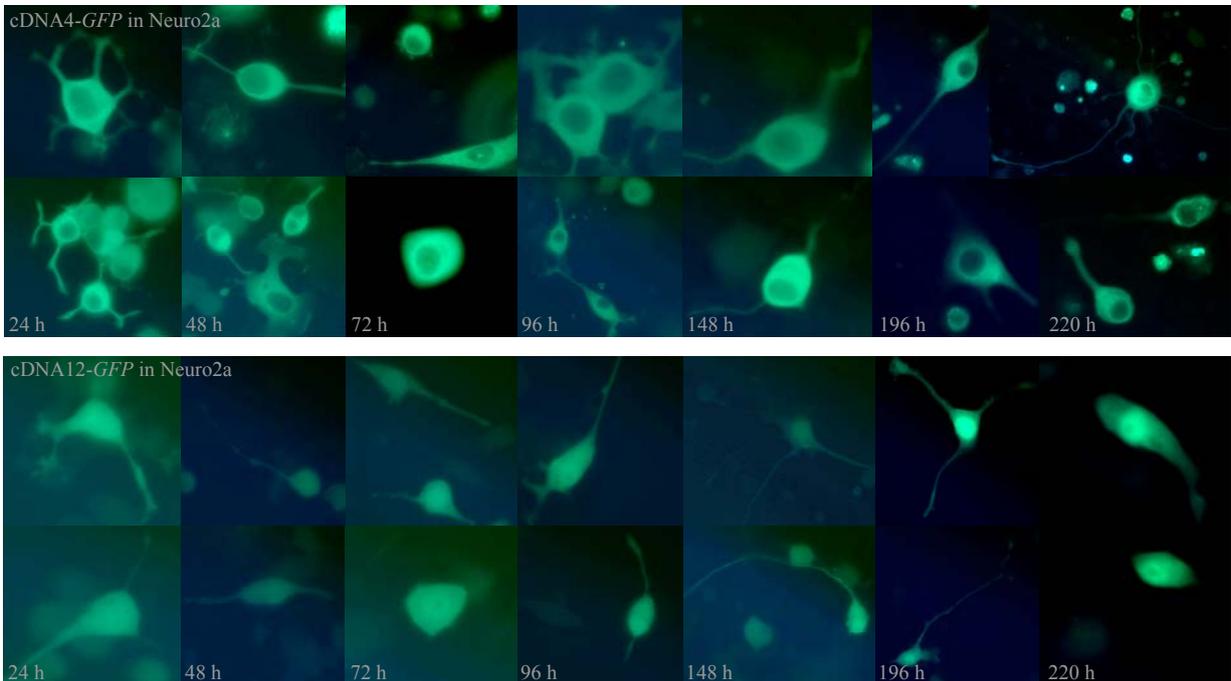


Abbildung 59: **Zeitreihe** der Transfektion von **cDNA4-GFP (obere Doppelreihe)** und **cDNA12-GFP (untere Doppelreihe)** in **Neuro2a-Zellen**. Jede Spalte entspricht von links nach rechts einem der folgenden Zeitpunkte: 24, 48, 72, 96, 148, 196, 220 h. Es ist zu erkennen, dass das Fusionsprotein von *TRIM46* in der Proteinisoform von cDNA4 zu allen Zeitpunkten vom Zellkern ausgeschlossen bleibt. Hingegen ist die Proteinisoform von cDNA12 zunächst eher gleichverteilt zwischen Zellkern und Zytoplasma, wobei sich ab 148 h eine deutliche Anreicherung im Zellkern abzeichnet.

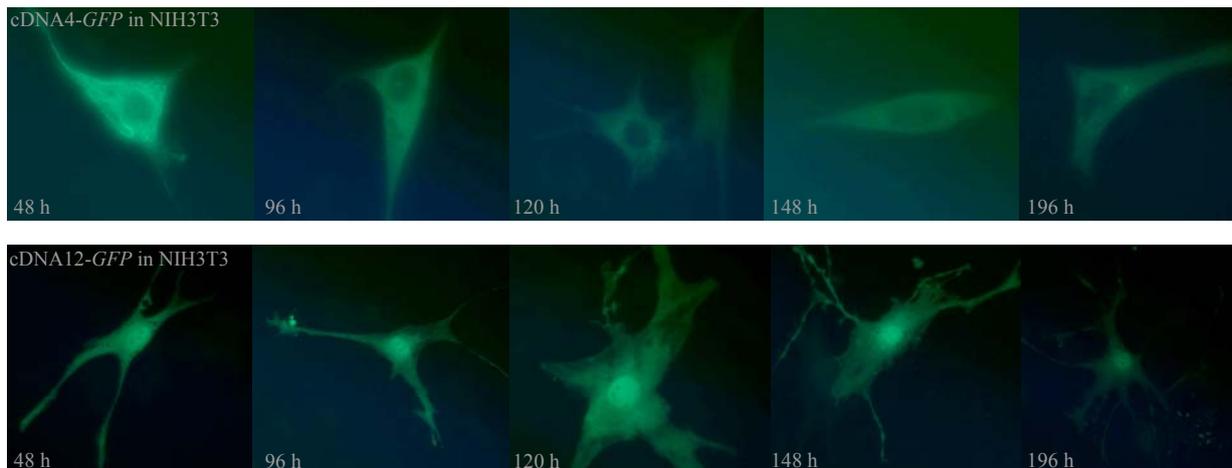


Abbildung 60: Zeitreihe der Transfektion von **cDNA4-GFP (obere Reihe)** und **cDNA12-GFP (untere Reihe)** in **NIH3T3-Zellen**. Jede Spalte entspricht von links nach rechts einem der folgenden Zeitpunkte: 48, 96, 120, 148, 196 h. Es ist zu erkennen, dass das Fusionsprotein von *TRIM46* in der Proteinisoform von cDNA4 zu allen Zeitpunkten vom Zellkern ausgeschlossen bleibt. Umgekehrt ist die Proteinisoform von cDNA12 schon früher als bei den Neuro2a-Zellen im Zellkern angereichert, wobei sich dieses mit der Zeit noch weiter verstärkt.

Insgesamt hat die Transfektion der Konstrukte von *cDNA4-GFP* und *cDNA12-GFP* in den drei verschiedenen Zelllinien HeLa, Neuro2a und NIH3T3 konsistente Ergebnisse gebracht. Dabei wurde das Proteinprodukt von cDNA4 konsequent zu allen Zeiten von der Lokalisation im Zellkern ausgeschlossen, während sich das Proteinprodukt von cDNA12 bei HeLa-Zellen gleichverteilt zwischen Zellkern und Cytoplasma, bei den Neuro2a-Zellen mit der Zeit nach 148 h deutlich sichtbar werdend im Zellkern anreicherte und bei NIH3T3-Zellen dieses noch früher bereits nach 48 h passierte. Möglicherweise haben die verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Geschwindigkeiten ihrer Kerntransportmaschinerie und vielleicht auch unterschiedliche Selektivitäten.

Um zu überprüfen, ob Phosphorylierung durch zelluläre Kinasen (Harbers, Nomura et al. 2001) wie *Protein-Kinase C (PKC)* einen Einfluss auf die Lokalisierung des *TRIM46*-Gens hat, wurden die oben dargestellten Zeitreihen-Experimente mit Zugabe von Staurosporin bzw. TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) durchgeführt, die jeweils den *PKC*-Signalpfad blocken bzw. aktivieren sollten. Dabei zeigten sich keine Unterschiede abgesehen von zunehmender Zytotoxizität aufgrund der zugesetzten Chemikalien, die jedoch auf *TRIM46* transfizierte Zellen genauso wirkte wie auf Kontrollzellen. Die negativen Ergebnisse sind hier nicht weiter abgebildet.

Suche nach Protein-Interaktionspartnern von *TRIM46* mit *Yeast-Two-Hybrid*

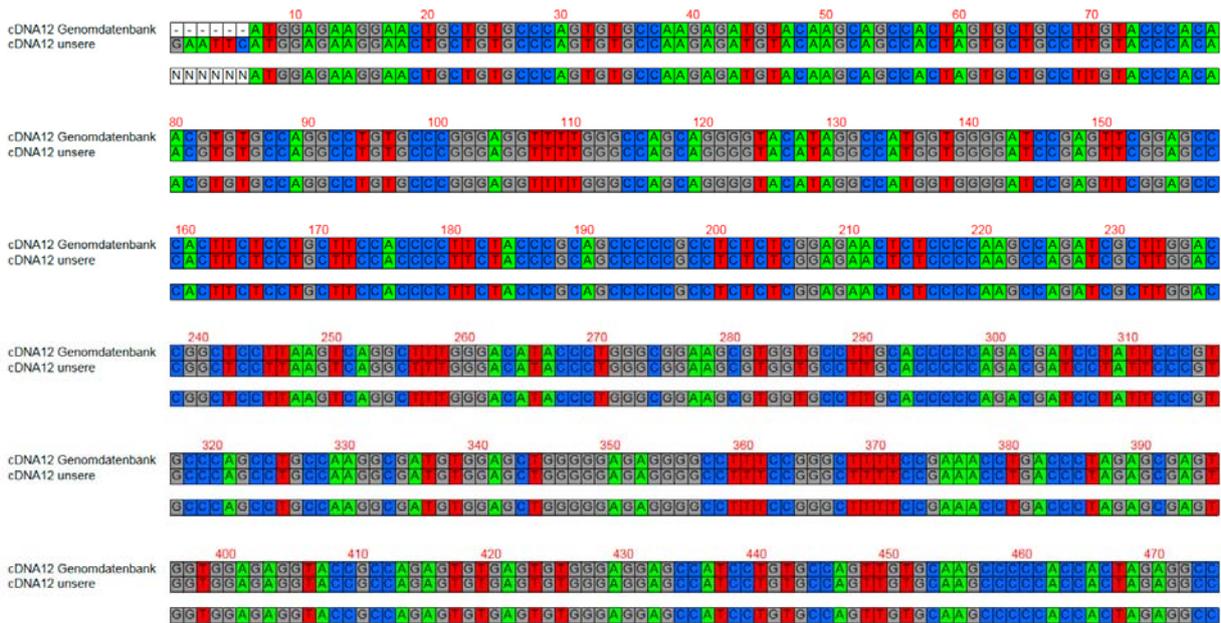
Um neben der deskriptiven Expressionsanalyse des *TRIM46*-Gens erste Hinweise auf die Funktion zu bekommen, wurden Protein-Interaktionspartner mittels *Yeast-Two-Hybrid-Screen* (siehe Seite 178) gesucht, da Gene der TRIM-Familie mit ihrer E3-Ubiquitin-Ligase-Funktionalität dafür bekannt sind, andere Proteine zu regulieren und dazu mit diesen zu interagieren.

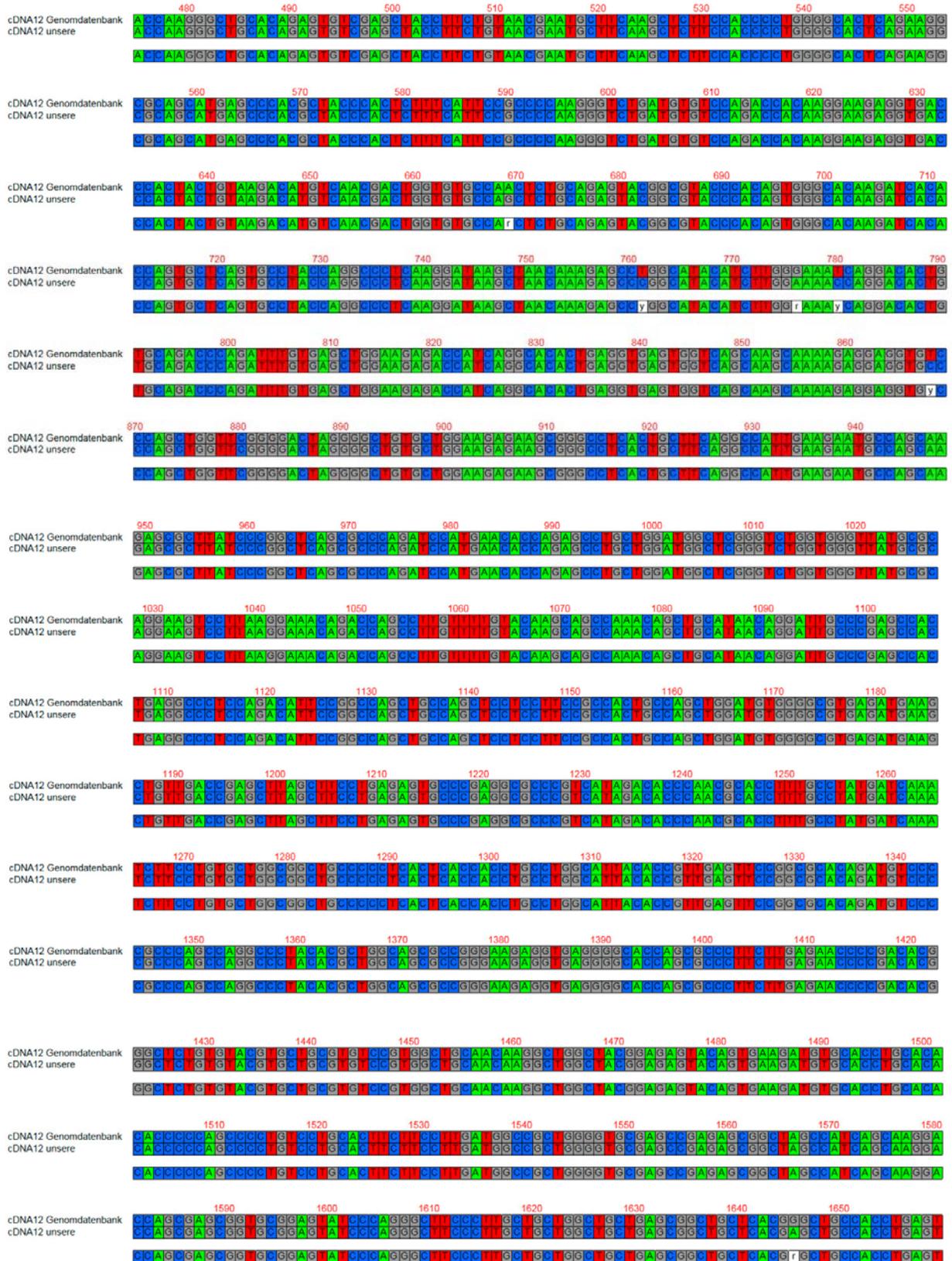
Beide Protein-Isoformen von *TRIM46* wurden auf ihre Protein-Interaktionsfähigkeiten gegen die beiden **cDNA-Bibliotheken von komplettem Mausembryo E19 und adultem Gehirn** von OriGene getestet. Dazu wurden die beiden Splicevarianten cDNA4 und cDNA12 in den *Bait*-Vektor pEG202 mit fortlaufendem Leseraster kloniert. Da für das Proteinprodukt von **CDNA4 keinerlei Proteininteraktionspartner gefunden** wurden, sind im Folgenden nur die Ergebnisse von cDNA12 ausführlich dargestellt. Offenbar **vermitteln die zusätzlichen Domänen von cDNA12 im Vergleich zu cDNA4 den Kontakt zu anderen Proteinen**.

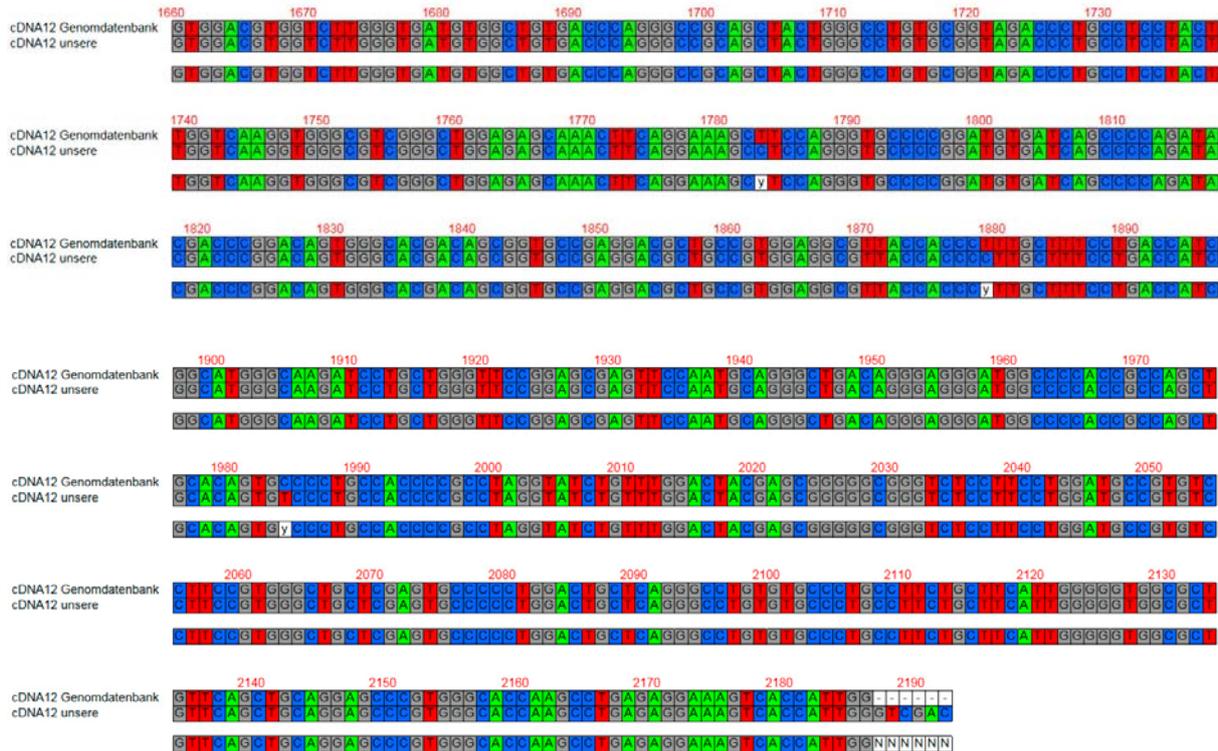
Es wurde die Sequenz der cDNA12 (siehe Seite 53) von Position 10 bis 2189 in den *Bait*-Vektor pEG202 unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Eco* RI und *Sal* I (**Überhänge in dem Alignment unten**) kloniert. Dazu wurden diese Restriktionserkennungssequenzen an Primer (siehe Seite 153) gegen cDNA12 angehängt, das gereinigte Amplifikat in *pGEM-Teasy*-Vektor zwischenkloniert und durch Sequenzierung überprüft, alsdann mit *Eco* RI und *Sal* I ausgeschnitten und in pEG202 (siehe Seite 153) eingefügt.

Alignment von unserer sequenzierten cDNA12 mit der vorhergesagten cDNA12 aus der Genomdatenbank Celera ergab einige abweichende Basen, die aber zu keiner Veränderung im ORF führten.

Alignment von cDNA12 mit vorhergesagter cDNA12 aus Genomdatenbank mittels *ClustalW*:







Die Abweichungen auf Basenebene führen zu Aminosäuresubstitutionen in der translatierten cDNA12-Sequenz:

- /note = AS change **P** for L compared to Celera at position 254
- /note = AS change **E** for G compared to Celera at position 259
- /note = AS change **P** for S compared to Celera at position 290
- /note = AS change **S** for G compared to Celera at position 549
- /note = AS change **L** for F compared to Celera at position 595
- /note = AS change **L** for F compared to Celera at position 627
- /note = AS change **S** for P compared to Celera at position 662

/translation="EFMEKELLCPCVQEMYKQPLVLPCTHNVCQACAREVLGQQGYIGHGGDPSSSEPTSPASTPSTRS
PRLSRRTLKPKPDRLLDKSGFGTYPGKRKRGALHPQTIILFPCPACQGDVELGERGLSGLFRNLTLERVVERYRQSVSV
GGAILCQLCKPPPLEATKGCTECRATFCNECFKLFHPWGTQKAQHEPTLPTLSFRPKGLMCPDHKKEEVTHYCKTCQRL
VCQLCRVRRTHSGHKITPVL SAYQALKDKLTKSPAYIL**EN**QDTVQTQICELEETIRHTEVSGQQAKEEVPQLVLRGLGA
VLEEKRASLLQAIIEECQERLSRLSAQIHEHQSLLDGSGLVGYAQEVLKETDQPCFVQAAKQLHNR IARATEALQTFR
PAASSFRHCQLDVGREMKLLTELSFLRVPEAPVIDTQRTFAYDQIFLCWRLPPHSPPAWHYTVFRRTDVPAQPGPT
RWQRREEVRGTSALLENPDTGSVYVLRVRCNKAGYGEYSEDVHLHTPPAPVLHFFLDGRWGASRERLAISKDQRAVR
SIPGLPLLLLAAERLLT**S**CHLSVDVVLGDVAVTQGRSYWACAVDPASYLVKVGVGLESKLQESLQAGADVISPRYDPDS
GHDSGAEDA AVEALPP**L**AFALTIGMKILLGSGASSNAGLTGRDGPTASCTVSLPRLGICLDYERGRVSFLDAVSFRG
LLECPDLCSPVCPAFCFIGGGAVQLQEPVGTGKPERKVTIG**S**"

Unterstrichen sind die von den Restriktionsenden angefügten Aminosäuren. Die Abweichungen offenbaren eine allelische Variation in den bei uns verwendeten Mäusen im Vergleich zu denen für die Sequenzierungen aus den Genomdatenbanken (hier Celera).

Gefundene Protein-Interaktionspartner für cDNA12

Tabelle 2

Klon	Library	Intensität	Klon-Abundanz	Blast-Annotation	Celera-ID	Sequenz
Y27, Y117, Y14, Y31, Y42, Y83, Y122, Y126, Y136	brain adult	2	9	G protein sorting associated DUF domain	mCG140093	ATGGCTCCCCATWCMAMTMAACATGATTGAGACATTATTGTCAAGTGTGTGAGGAGACACTTTCACATAGCGTGAATCCCT GAACAGCTAACTGGAATGAGGATGCTTAGACATCTCACTATAACTACTGACTACTACAGTACTGATTCGCAATACGTTCTGGGTTCT CGCCTTATAACACAGCGCATGCAAGAACCACTTCATGTTCTGAAAATGCTGTGAACCTGTCTGACAACTCGATGGGCAAAA AAACTATTCAAGTCCAAAGCTCATCAATATTGTGGGCTCTTAAACATGAGGAGACTAATGATAACCTGATGATTATTAATAAG TTTCAGAACATCAGTAATATTGAAAAAGTGGAGCGATGCTTCACTTGTAGATGATTTCAGTCTTGAAGCGCTGTTCTGCAATTCAT GAATTTGAGAGCTAGCTAAACAGCTGCGATCCAAATAGACAATCAAAATGATCCRRAGGAGGAGCAAAAGTATGATGATTAAAC CACCTGCCACTCATTGATGTTCCCAAAGAGTCCAAATAGTGTGTTGGTGTTCACAGCTGTCTGTGTGCAACTAAATTTTTAATG CTAATGTAAGTTCGA
Y134, Y101, Y138, Y125, Y130	brain adult	2	5	ferritin heavy chain	mCG1931	GACYACTCTAKGRKCGCCMGATTTATGTYCTCCCGAATTCGGCACGAGCCGAGATGATGGCTCTGAAGAACTTGCCAAATCT TTCTCCACCAATCTCATGAGGAGGAGGAGCATGCGGAGAACTGATGAGCTGCAGAACCCAGCGAGGTGGCCGAATCTCTCGCAG GATATAAAGAAACAGCCGATGACTGGGAGAGCGGCTGAATGCAATGGAGTGTGCACCTGGAAGAGAGTGTGAATCA GTCACTACTGGAACCTGCACAACTGGCTACTGACAAGATGATCCCCACTTATGTACTTATTGAGACGTATTATCTGAGTGAACAG GTGAATCCATTAAGAATCTGGTGAACAGCTGACCACTACGCAAGATGGGTGCGCCCTGAAGCTGGCAGTGCACATCTCTT GACAAGCACACCTGGGACAGGTTGATGAGAGCTAAGCTACTCCCAAAGCCAGCTGACTTACTGGTCACTGAGGAGGAGTCA GCATGTCAAGCTGCCTTCTCTTATAAGTGCACCAAAACATCTGCTTAAGTCTTAAATCTTAACTTCTGCAATTAAGAAT TTGGTACCACAAAAAACAAMCTCGAAGAGCTTTGGACTTCTCCGACAGAGTGGTGTCAAGTCCCAATCAAG GTGTGCGCTGTCTACCTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAGGGTCAATCGTTGGTAGAWACGTTGTGACACTCTTAATAG CGAATTTCTATGATTATGATTTWTATTAAAWAGTTATAAAAAAATAGTGWAAAAATTTAAGTAC
Y37, Y139, Y84, Y118	brain adult	3	4	SANT MYB DNA binding	mCG14923	CWTKCTYTTCCCGAAWYCMSGCCAGAGATTCAGCGACTTACCATGGCGCTACCAGTACCGGCAACGGCCATCCCCATGAT TGATGAGAATAACGATGTCAGCAGGAGGCGCTTGAGCTCTGACATTAAGAACTGAAGAGAGAGCATGACATGATGTGAAGGAGAT CTCCAGTAAATAGCAGAGGGCTACCMKGTGATGAGTGGARAGCATATCCCTCCCTCAGTACGACATGACATCAAGATG ATCAGAGTCTGCTGGGAGAGTGGTGTGACTCGAGGCGTTACCACCAAGGAGTATATACAGATTTTGAATCTAACTGAGGAGTCA TGACAGCTTCTGGAGATTTTCATCTACAGCCACAGGAGCAGGAGGAGGCGGATAAAGGAGAGCTAGACAGTWTGTTTCAT ATGTTTTTCAGATTTAAAGAGTGTAGAGGCGCTCCAAGTTGGGGTGGTCTAGAGAGAGGAGTATGGRRSGGTGGAT TGCAATGTTAAAGTCTCAACATCTGTGAGTGTGTGTGGYGTCCCTTTTAAATAAACATAGAGAGTCAAAAAA AAAAAATAACCGAAGCTTTGACTTCTCCGAGAGGTTGGTCAAGTCCCAATCARGGTTGTYSGGTGTCTACCTGGC AGAAATACRAAAGAKGRAAGGGTCAAACTGTTGGTAGATCGTKTSSCCCTTAAWAARCGATTTTATATTTTATGATTT TATTAATAAGTAAATAAARGTGTATMCAATTKWAAGKMYCTAGGTTAAAAAATAATTTATYCTGAGWACTCYTT CCGKMRGYAAGT
Y34, Y49, Y41, Y150	brain adult (3), E19 embryo (1)	3	4	ATPase, H+ transporting, V1 subunit	mCG5800	GACCTTAGGGRRCCCGCATGATTGYTCTCCSAAWACGGCACGAGGATCAGAGCAAAAGAAACAATGTAGCAGGTGTTACC TTCCAGTGTGTTGAACAATTACCACGAAGAACTGACAGCTATGAATGACCGGTGAGCCAGAGGTGGGAGCAGCTGGTCAACTA AAGCGGAATATGCCAAAGCAGTCACTACTGGTGAACCTGGCTCCCTCGACACTCCCTTTGATACCTGGTGAAGCAATAAAA TCACCAACAGCGCTGTTAAATGCAATGAGCATGTCTTCCCGGATGAACGCMCCCTTGCCTATATCATCACAAGAACTGGATGA GAGAGAGCGAAGAACTCTATAGTTAAGAAATAACAGGAAGAAAGAAATATCAAGGAAAAATTTGGAAGGACTGGAGCG CGCGAGAGCAGCTGGAGAGTGTAGGAGCTGCCAAGCTGCTGGCTGAARAGAGGATGAAGAGCTGTGTTGCAATAGCTGCCCT CATCTGCTCCCTCAGACTGAACATCAGCTCCTATGTAAGTGTASGTGTCGATGTGTTGATATTTTGGCATGAAAT TCTTGCTGTAAAGTTTATCAGAATGCCTTTAAAGACTTTTCTGCTCATATAATCACCACCCSRRAITTTGGAAAGCTGCCMG AACCTACAGAATTTCTGTGAAAAGTGTATATTTCTATTTACAATTTTGGACCAGGATCTTTAACTTAGGGAWWWGTTGAC TATGAACATMTGGTGMCGAGGGCRAAGGCTGKAGCAACCTTYTCTCCCTTGGAAACTTGTCGCCCKGTWCSGGCCGTA CCACATGGGGTTCATGGYTCATCTCACA
Y145, Y148, Y161	E19 embryo	1	3	P116 RHO-INTER-ACTING PROTEIN alike	hCG1998423	GAATWCGCACAGGCTTGTGGAAACCCCTGACCTCAAGACACAGAATGTCCASGTGGRRRTTGAGCAGCTTGGCATCAAGTGG AGACCACCCCTCTCAGGAGGAGAAACAGGTGCCATTGCCCTCTGCACTATCCTTGGAGAGCAGAAAGTGAAGCGGCTCTCCACA CATGCTCAGCTCTGCTAGAGAGGAGCTGGAGCAGAGCAGAAAGAGCTCGGATCTCTAGAGCAGAACCCGCTCTACA GGACAGTTAAGGGTGGCCCTGGCARRAAGCAAGTGCAGGGAGGGCTATGCTGCAAGCTACATGTGAGCAGGCTTTGCC GCCATGGAGGAGACATCARAAGAAAGATTGAAGACTCAGAGGCAACACAGCGGGAGCTAGAGAGCTGGCGGAGGAAAAA CCGCTCTCGGCTGGAGAGCAGCTGCCCAATATAGCCATTGAAGCATGAAGAATGCTCACCAGGAGGATGAAGCAGGAT TAGAAGAGAGCGAGGCTCTCAGTACAGCAGCATCAATTACAGACATGAAGACCCCTGAGGCGACAGTACTGGAGGAGCTGCAGTCA TGCAAGCGGAGCTGGARTTCTTTCAGAGCAGTACTCCAAAAGTGGCTGRRRTGCAACACCTGAGCCAGAGGAGCTGGACGRR CGTAGGCGCTGGGCAATKSCMGCTGARRACAGARCTTCACCSCMMCAACAGAGGCTGAATACACCCGCTGGCTGCGGAAA TAMCGTTCGCGACTTATGAYGGRCCGGGGGGGGKACCCTAGGGTGGCTCAGCAGGG
Y142, Y36	brain adult	1	2	MAP2K4 protein kinase	hCG1985145	TWCTGYCTTCYCCGAAWWMCSGGCAGAGTWAAGATGGAAGCTTCCAGGCTCAGAGAGMCTGCATTTGTTGATGATGAG MGGAGCAGCTTGTAAAGGAGGCTATGAAAGCCGCTCGGTGTAATGCCCTACAGCAGCAGAAAGTCAACCGTGGACCACTAA TGCTTAGAACAGACTTTGAGCAACTCACCACCTGGGAGAGCAATTAATAACATTGATGACCTGTGTGATCATGARAAGAAAGGGT GCTGGGTTACACTCGCAAGTCTCTGCTTGGGACAGCTCCACAGACGGAAGCTGCACAGTCCGATGGGAGAAAGAACCATGTA CTGCATCGTCACTCTCGACTCTCCATCTGACCACTTCCAGCCTCAGCCTCGTGGTCCGAGATTCCAGTCCATCTTAACCA CCAGCTATGTTGGGCAACCCCTCTCCTCAAGTGTCTGTTGGCCTCTMAAAAACCAATGACTCCCGAGTCAAGGAAACCATCA GACTTACGACAGATTAGAGCCASCTGTCTCTGAGCAGGAGGAGTACCACTGTCTTAACTGTCTTCCAAAGGTCTAAAACTCAA GTCTGCTGGTGAAGCAGCTCTACTTCTGAAATGATTCAGATACACTAATCTTCCACTACTTATTTCTTGAATAATAAATTTCA AATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA ACCTTGGCCMAAATTTMCRAAAGATGAAAGGGTCAACCKGTGATMCKTMMKGMAC
Y16, Y12	brain adult	1	2	Fhl2 Lim domains	mCG113685	TGAATGRACGTTGTCYGCWAAGGCTCGGCACATGGCAWGAASGTTGCTWMCATTTGTTCCCGGTGKGGAACTCRSTGGWGGAC AAGCCCTTGTGCTCCMCAAGGAAACAKYTGCTGTGACACRACCTGTATACCAATGAATACTCGTCAAAGTGCAGGAATCAWGA ACCATCATGCSAGGTACCCCMGAGTGAATACAAGGAGCAGCAGTGGACRAGACCTGCTTCAACCTGTWGGGCTGCCAGGRG CCATTGRAACCAAAAGCTTCACTAAGTAAKAGAACTCATACTCTGCTGGCTGTWGAAGAGCAAGTGGCCCTGGAGGCGTG CAGTGCAAAAGGCTCARTACCAAGGAGGTTACTACCCGGAAGCCCTGMCACAAAGGATGCTTTGAGTGCACAGCCTGA WYCCCTTTTGCCAGCTTCACACAGCGTGAAGATTTCCATACTGCTGACCCGCTCTGTGACATGTWCGCTAAAAATACTGG KTGACMAAACCATTTATGCTGGTGSACAAAAAATTTTTCGAAACCTCAGAAACAACTGTTAATTTGAATGGCCCT GTCTGGYKACAGGCWTCMAAAACAAAAACCAATVAACTGATRAATAAAGAACTTGAAGKCCACAAACCCCTCAGAAAAATTCAT GKTTTTTCAAAGGCTTATWTKTKTAGACTMTAC
Y33, Y15	brain adult	3	2	Tom70a translo- case of outer mitochon-	mCG129492	GACWATARAGGKRRWCKRMCCACATGCCTCCCGAATTCSSGACGAGGCTACTCAGGACTTCAAGTGGCTGGCAGATCGA TCCTATGAACCTGACGCTTTATCACCACGAGGAGCAGCTGAAAAATCTCTGGATCGTGGTGAAGAGCAGTGGCGGATTTGATGCA TGATCAGATTAAAGCAAAAGTTGCTTTGGCGCAGGCTCAGAAGTGTGTTGATTGATCGCAGGATATACAGMCAAACTOTT CGCAAGTCCAGGACATGAAGGTTTGAAGAGATCATAAAAGAAATTTCCAAGTGTGCTGAAGGACTGCATCTATGCCCAGGC ATTAACAGATCAACACAGTITGGTAAAGCTGATGAAATGATGATAAGTGTATGATTTGAAGAACAGAAATGATGCAACTATGTTCA TAAAGGTTACTTCAACTTCAMTGGGAAGAAAGATTGGAATAAAGGTTTGGAGCTTATCAGCAAGGCTATTGAAATGACACAAATGTA CTTGCATATGAGAACCTGGGACWRITGAAGTGCAGAGAGAAACRTGGAGAAAGCATTGACATGTTTCAACAAAGCTATCAACT GGCAAGTCCGAATGGAGTGGCTCATCTGTATTCACTTGTGATGCTCCATGCCAGACAGAGTGCAAAATACTCGAAATAAACCG CGACTTATAAACACRGGGAGACAGACTGACTCTTMAAAAAGTTTACCCTTTTMACTAACCCCTGRAGACACTKCAATAATGTT

					AATGGGATTGGWTCYATGGAATAATTWTGTTTCCGGAAAAWGGCTAATGGCARAGGYCATCTCTCTGTTGGCATATCTTCATAAATGAAAMCGAAAAACATYAAAWTCYTTTAAAAARTCYYYCCYTCG
Y112	brain adult	3	1	RACK1 receptor for activated protein kinase	mCG19409
Y100	brain adult	3	1	mediator RNA pol II (NCBI), Egl1 endothelial derived gene (Celera)	mCG21482
Y32	brain adult	2	1	periphilin similar	mCG51743
Y25	brain adult	2	1	Riken cDNA spectrin related	mCG7105
Y86	brain adult	4	1	prefoldin subunit 5	mCG8908
Y119	brain adult	3	1	Kif2a kinesin family member 2A	mCG9794
Y137	brain adult	1	1	Usp33 ubiquitin specific protease 33	mCG21832

Die **Abundanz** in der Tabelle gibt an, wie häufig ein solcher Klon in dem Screen gefunden wurde. Zusammen mit der durchschnittlichen relativen **GFP-Leuchtintensität** (1 sehr stark bis 4 sehr schwach) könnte man daraus Vermutungen über die Wahrscheinlichkeit oder Stabilität einer Protein-Interaktion aufstellen.

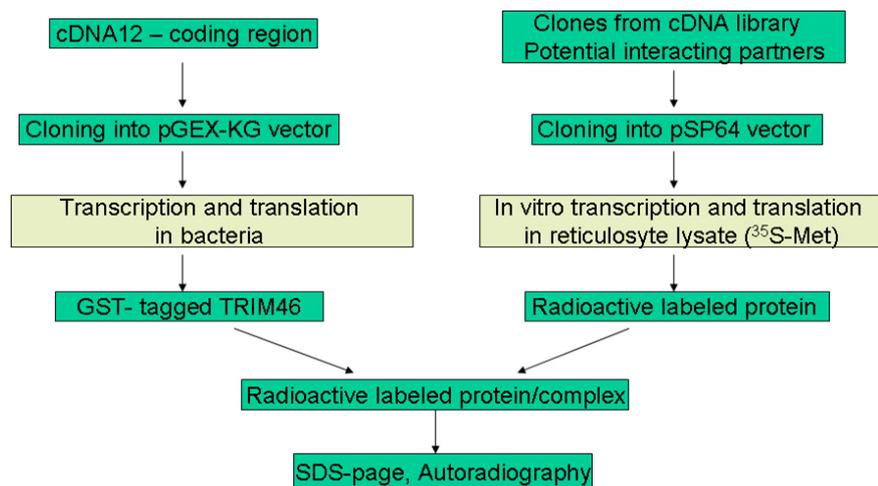
Die zur Annotation verwendeten Sequenzen sind hier mit angegeben, da die Celera-IDs unter Umständen eines Tages nicht mehr zugänglich sein könnten, um die Klone identifizieren zu können.

Mögliche Interpretationen der gefundenen Gene im Zusammenhang mit *TRIM46* werden im Diskussionskapitel besprochen.

Verifikation der Protein-Interaktionen mittels *GST-Pulldown*

Die mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid-Screens* gefundenen Protein-Interaktionspartner sollen im Allgemeinen durch unabhängige Methoden abgesichert werden. Hierzu wurde der *GST-Pulldown-Essay* eingesetzt (siehe Seite 180).

Die cDNA12 wurde aus dem Hefevektor pEG202 umklontiert in den Vektor pGEX-KG, der ein prokaryotischer Expressionsvektor ist und das *GST*-Tag als Fusionsprotein enthält, so dass das Protein in *E. coli* Bakterien des Stammes *BL21 DE3 C41* exprimiert werden konnte. Der Vektor pEG202 lässt sich zwar auch in Bakterien vermehren, exprimiert jedoch das Protein nicht.



Zur Klonierung von cDNA12 in pGEX-KG wurde cDNA12 aus pEG202 mit *Eco* RI und *Sal* I herausgeschnitten, dabei die *Eco* RI-Schnittstelle mit Klenow-Fragment *blunt* gemacht. Der Vektor pGEX-KG wurde mit *Xba* I und *Sal* I geschnitten, wobei die *Xba* I-Schnittstelle mit Klenow-Enzym *blunt* gemacht wurde. Auf diese Weise konnte cDNA12 im fortlaufenden Leseraster an den C-Terminus des *GST* im pGEX-KG fusioniert werden (siehe Plasmid-Karte ab Seite 153).

Blunten der *Eco* RI-Schnittstelle von cDNA12:



Blunten der *Xba* I-Schnittstelle von pGEX-KG:



Blunt-End-Ligation von cDNA12 und pGEX-KG mit fortlaufendem Leseraster:



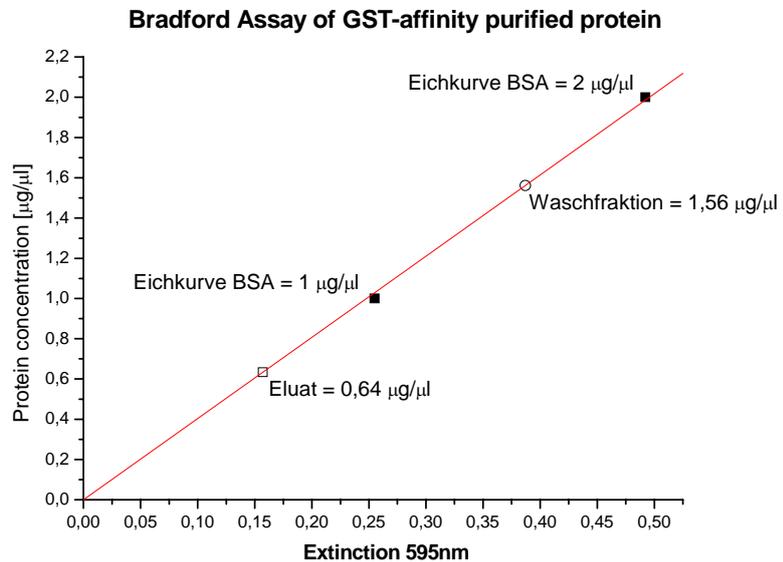
Das Klonierungsprodukt wurde zur Überprüfung sequenziert und enthielt den oben dargestellten korrekten Übergang im Leseraster sowie keine Abweichungen zu der zuvor beschriebenen Sequenz (siehe Seite 75).

Die DNA-Sequenzen der potentiellen Interaktionspartner wurden aus dem Hefevektor pJG4-5 mittels PCR herausamplifiziert (Primersequenzen siehe ab Seite 153), in *pGEM-Teasy*-Vektor zwischenklontiert und über beidseitigen *Not* I-Verdau herausgeschnitten, sodann mittels Klenow-Enzym *geblunted*.

Die so erhaltenen Insert-Sequenzen wurden in den zuvor mit *Hinc* II *blunt* linearisierten und dephosphorylierten (*CIP*-Enzym) pSP64-Vektor ligiert, wobei in 50% der Fälle eine korrekte Orientierung zu erwarten war, die dann durch Restriktionsverdau und Sequenzierung der Übergänge bestimmt wurde.

Die Primer für die Amplifikation der Inserts aus dem Hefvektor pJG4-5 wurden so gewählt, dass neben den Inserts der cDNA-Bibliotheken auch das vom Vektor stammende initiale ATG zusammen mit Kernlokalisationssequenz NLS und HA-Tag für Immunpräzipitation erhalten blieben.

Das *GST*-cDNA12-Fusionskonstrukt im pGEX-KG-Vektor wurde in *E. coli* Bakterien des Stammes *BL21 DE3 C41* exprimiert und als Protein über Glutathion-Affinitätschromatographie (Siehe Seite 180) aufgereinigt. Die Proteinmenge des Eluats wurde über Bradford bestimmt. Aus 100 ml Bakteriensuspension in der Sättigungsphase wurden 1280 µg Protein in 2 ml Volumen gewonnen.



Für einen *GST-Pulldown-Essay* wurden 50 µg des gereinigten *GST*-cDNA12-Fusionsproteins eingesetzt und mit Glutathion kovalent gebundener Agarose-*Beads* inkubiert. Für die Kontrollen wurde gereinigtes *GST*-Protein mit den Glutathion-Agarose-*Beads* inkubiert. Zu diesen Inkubaten wurde per in-vitro-Transkription und Translation hergestelltes ³⁵S-radioaktiv markiertes Proteinprodukt potentieller Interaktionspartner von dem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* gegeben und weiterinkubiert. Nichtbindende Proteine sollten in Waschschrinen entfernt werden, so dass nur solche übrig blieben, die tatsächlich mit *TRIM46* aus der cDNA12 interagierten. Diese gemeinsamen Eluate wurden per *SDS-PAGE* aufgetrennt und mit Autoradiographie sichtbar gemacht.

Resultate der GST-Pulldown-Essays von 6 Klonen des Yeast-Two-Hybrid-Screens:

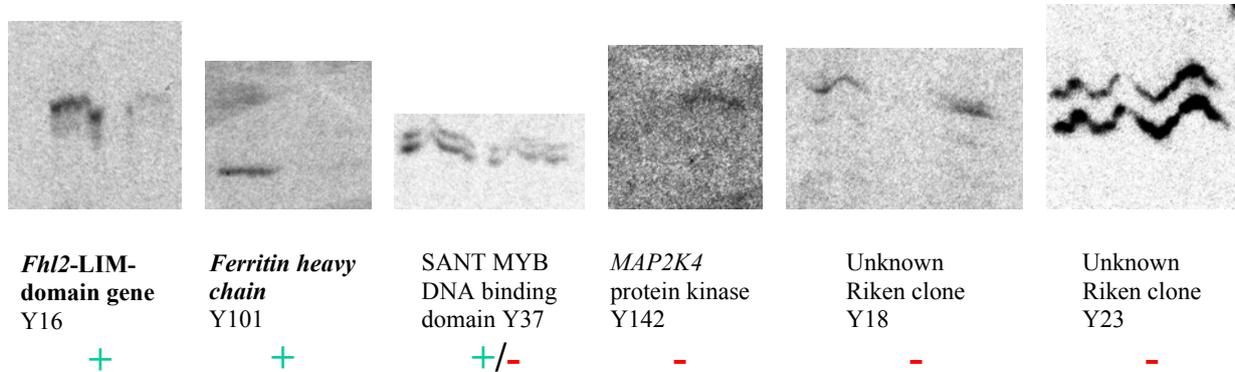


Abbildung 61: Auf der jeweils linken Spur wurde diejenige Proteinfraction auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen, die zuvor mit *TRIM46*-GST interagiert hatte, auf der rechten Spur diejenige Kontrolle, die nur mit GST alleine inkubiert wurde.

Die rekombinant exprimierten Proteine von *Fhl2* und *Ferritin Heavy Chain* zeigten eine eindeutige Interaktion mit *TRIM46* im Gegensatz zur Kontrolle. Bei dem Hefeklon Y37 mit der „SANT MYB DNA“-Bindedomäne war das Ergebnis nicht eindeutig interpretierbar und 3 der getesteten 6 Klone wiesen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf, so dass für diese die vom *Yeast-Two-Hybrid*-Screen vorausgesagte Interaktion nicht bestätigt werden konnte.

Es ist zu erwarten, dass die Analyse der restlichen Hefeklone mittels *GST-Pulldown-Essay* weitere vorhergesagte Interaktionen bestätigen würde, was somit Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein könnte.

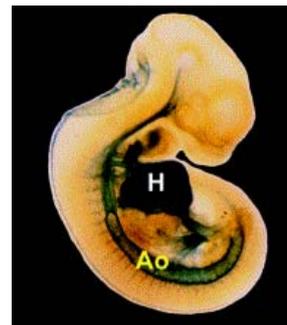


Abbildung 62: Neben dem *GST-Pulldown-Essay* ist **überlappende Expression mit *TRIM46*** ein weiteres Kriterium zur Überprüfung auf eine sinnvolle Protein-Interaktion. In dem Bild ist das Expressionsmuster von *Fhl2* im Mausembryo des Stadiums E8 zu sehen, was in der Aorta mit *TRIM46* überlappen würde (Chu, Ruiz-Lozano et al. 2000).

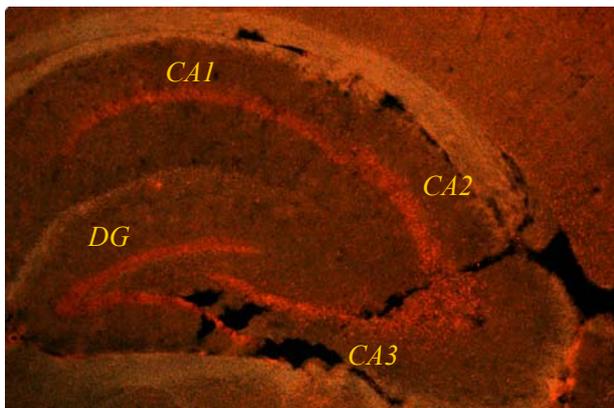
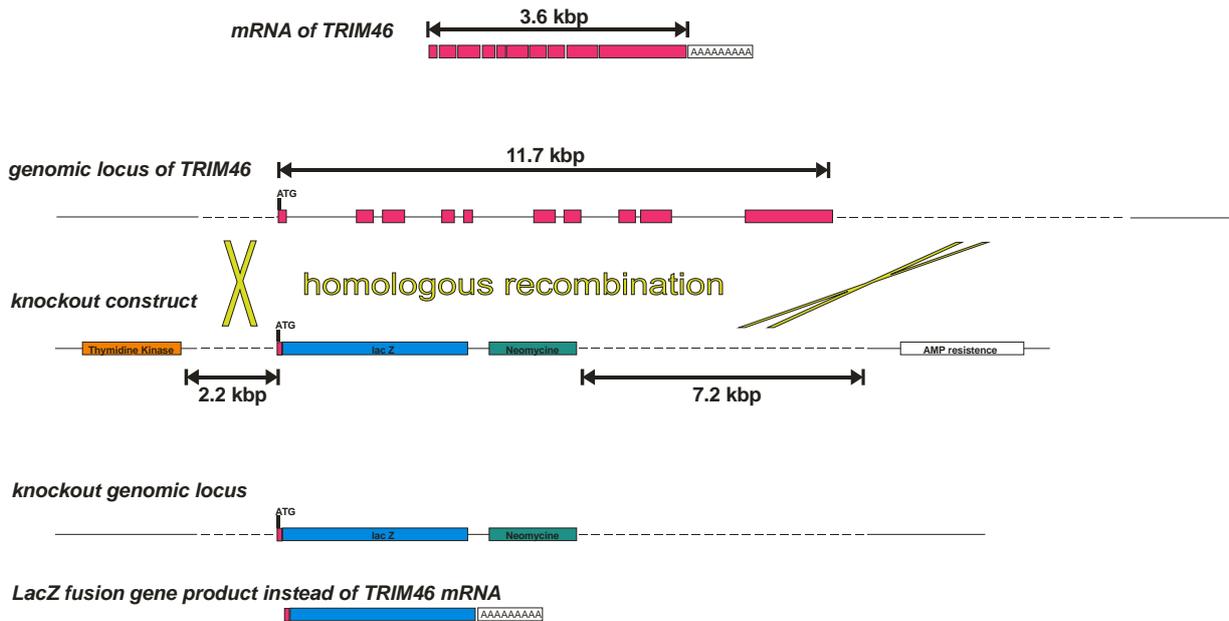


Abbildung 63: Expression von *Ferritin Heavy Chain*, dargestellt mit Immunfärbung in Rot, überlappt mit der Expression von *TRIM46* im Hippocampus des Gehirns (Vergleiche mit Seite 115). *Gyrus dentatus* (DG), Regionen des Hippocampus CA1, CA2, CA3.

Herstellung einer Knock-out-Maus für das Gen *TRIM46*

Um der Funktion des *TRIM46*-Gens genauer nachspüren zu können, wurde eine Knock-out-Maus mit der Methode der homologen Rekombination hergestellt, wobei nach dem abgebildeten Schema verfahren wurde:



Zuvor war die mRNA des *TRIM46* Gens durch RT-PCR bestimmt (siehe Seite 53) und die Sequenz auf das Maus-Genom projiziert worden, um die Größe des genomischen Lokus zu bestimmen. Dieser umfasste die kodierende Region mit 11,7 kbp. Für die homologe Rekombination mussten die flankierenden Regionen des Gens in ein Vektor-Konstrukt kloniert werden. Hierzu mussten die flankierenden Regionen aus einem λ -Phagen-PCR-Screen gewonnen werden (siehe Seite 170, Primer siehe ab Seite 153). Die Größe des Homologiebereichs ist für die Effizienz des Rekombinationsereignisses wichtig (Thomas and Capecchi 1987) und sollte etwa 10 kbp betragen. Die asymmetrische Größenverteilung (2,2 und 7,2 kbp) stellte keine Beeinträchtigung dar.

Für das Konstrukt wurde weiterhin die Sequenz für Neomycin-Resistenz samt Promotor kloniert, welche die positive Selektion der ES-Zellen (embryonale Stammzellen der Maus) auf Integration des Konstruktes nach der homologen Rekombination ermöglichte.

Zusätzlich wurde das bakterielle Enzym β -Galactosidase anstelle des *TRIM46* in den Lokus kloniert unter Berücksichtigung des fortlaufenden Leserahmens und Verwendung dessen ATG-Startsequenz, so dass Gewebe in den späteren KO-Mäusen mittels x-Gal dort blau gefärbt werden konnten, an denen die β -Galactosidase unter dem Promotor von *TRIM46* an dessen Stelle exprimiert wurde.

Thymidin-Kinase in dem Konstrukt erfüllte die Funktion einer negativen Selektion auf ES-Zellen, die zwar das Konstrukt integriert hatten, bei denen jedoch nicht die homologe Rekombination korrekt abgelaufen war, so dass die Sequenz der *Thymidin-Kinase* hätte hinaus geschnitten werden müssen, da sie außerhalb des homolog rekombinierbaren Bereiches lag. Damit sollten Zufallsintegrationen in das Genom unterdrückt werden.

Die Ampicillin-Resistenz erlaubte die Vermehrung des Konstruktes in *E. coli* Bakterien und Selektion nach erfolgreichen Zwischenschritten der Klonierungen.

λ-Phagen-PCR-Screen

Um die DNA mit den flankierenden Sequenzen des *TRIM46*-Genlokus zu erhalten, wurde ein λ-Phagen-PCR-Screen (siehe Seite 170) mit Primern (siehe Seite 157) aus dem zu bestimmenden Bereich durchgeführt. Da die Größe der λ-Phagen begrenzt ist, wurde jeweils ein Ansatz für die 5'-Flanke und einer für die 3'-Flanke durchgeführt und die Primer entsprechend aus diesen Bereichen gewählt. Am Ende wurden auch 2 überlappende λ-Phagen erhalten, die zur Kontrolle sequenziert wurden.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Fragmente aus den λ-Phagen umkloniert in den Vektor pBS-KS, da dieser im Gegensatz zu den Phagen Ampicillin-Resistenz hatte und die Inserts somit in *E. coli* einfacher vervielfältigt werden konnten.

Die Insert-Sequenzen lagen in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) des λ-Phagen zwischen den *Bam* HI-Schnittstellen, so dass sie beispielsweise mit *Not* I vollständig herausgeschnitten werden konnten.

Das 5'-flankierende Ende für das KO-Konstrukt konnte mit *Sal* I + *Spe* I herausgeschnitten werden, wobei zu beachten war, dass ein Teil von der MCS des λ-Phagens mitgenommen wurde, nämlich der zwischen *Sal* I und *Bam* HI mit den Schnittstellen *Not* I und *Eco* RI, die in der weiteren Klonierungsstrategie das Insert nicht versehentlich schneiden sollten. Es wurde in pBS II-KS eingefügt:

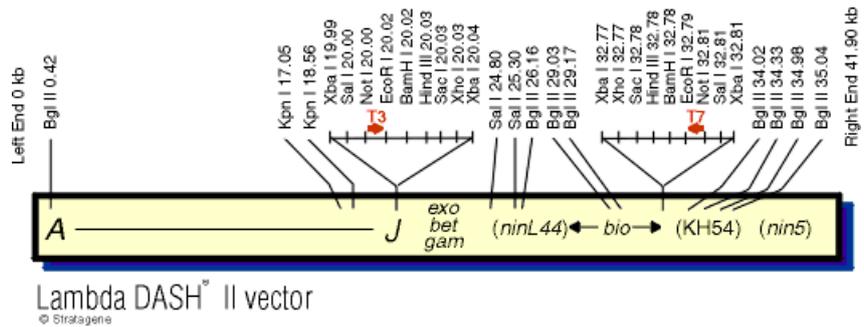
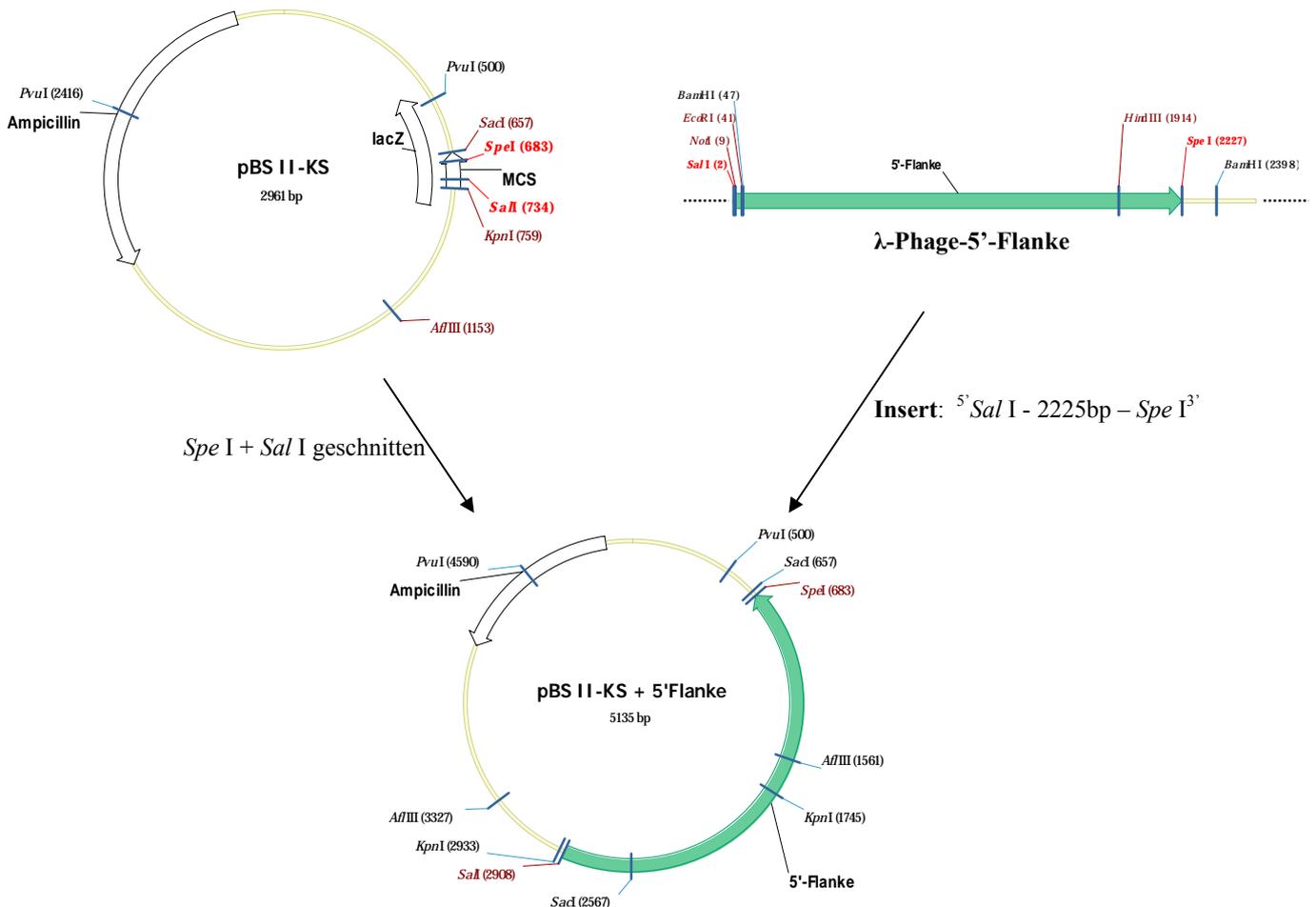
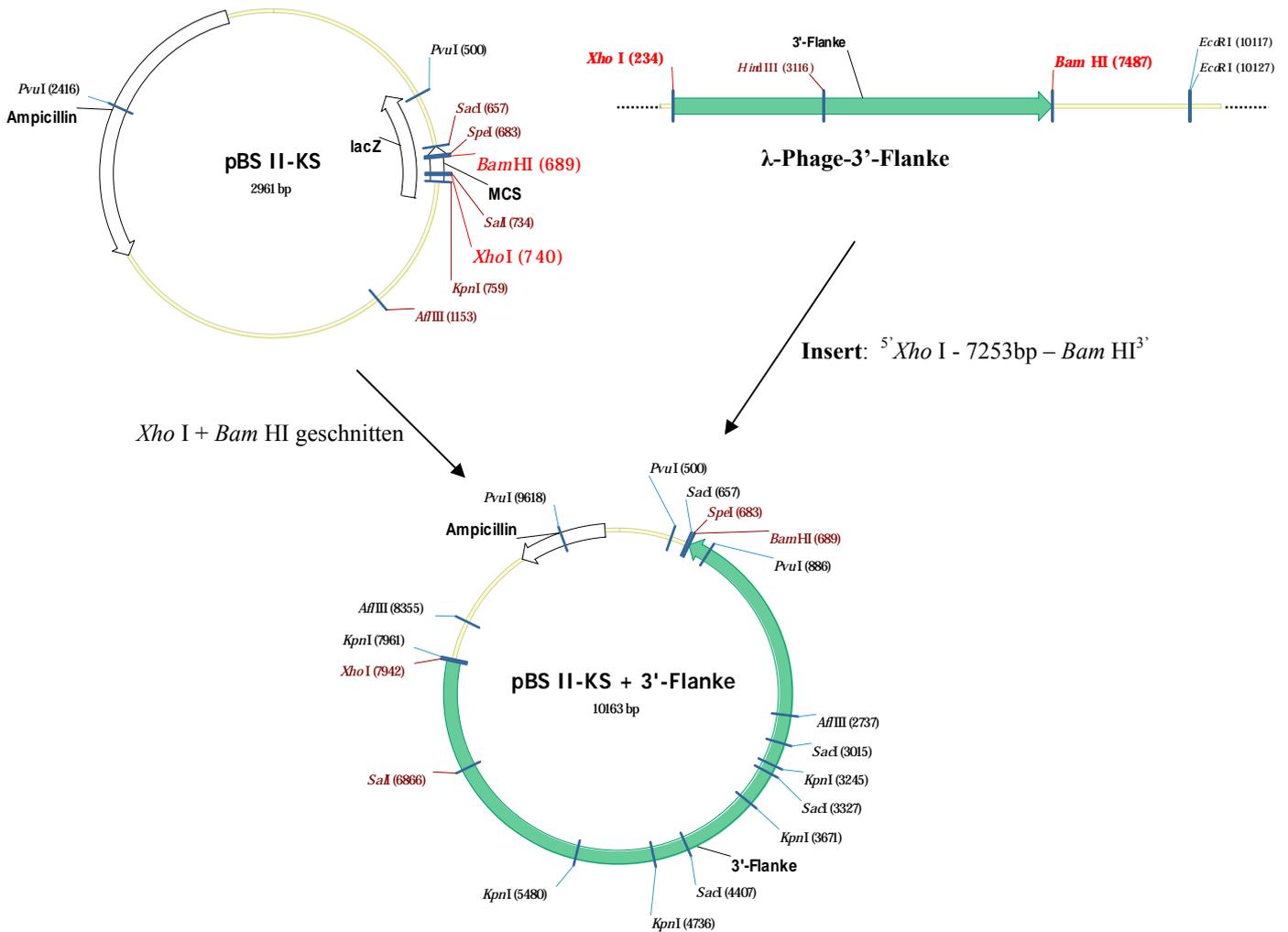


Abbildung 64: MCS des verwendeten λ-Phagens.



Ein Vorteil des Vektors pBS II-KS war das *lacZ*-Gen, welches die MCS überspannte und eine Blau/Weiß-Selektion auf erfolgreiche Klonierung eines Inserts erlaubte, da ein ausreichend großes Insert die Funktionsweise des *lacZ*-Gens stören sollte, so dass diese Kolonien unter Zusatz von x-gal weiß blieben statt blau zu werden.

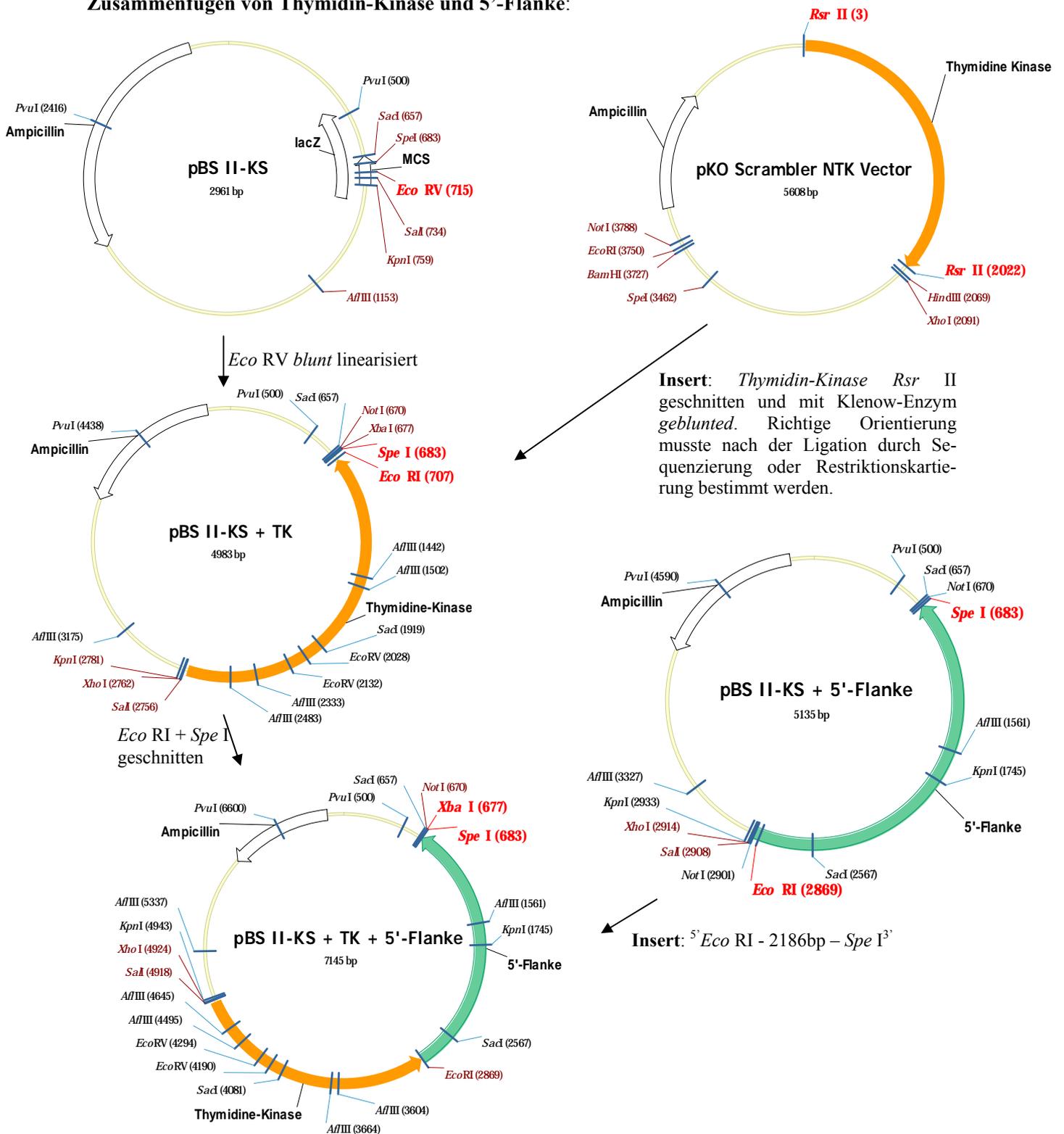
Das 3'-flankierende Ende wurde aus seinem entsprechenden λ -Phagen mit *Xho* I + *Bam* HI herausgetrennt. Dabei lagen beide Schnittstellen in dem Insert, so dass die MCS des λ -Phagen nicht weiter interessierte:



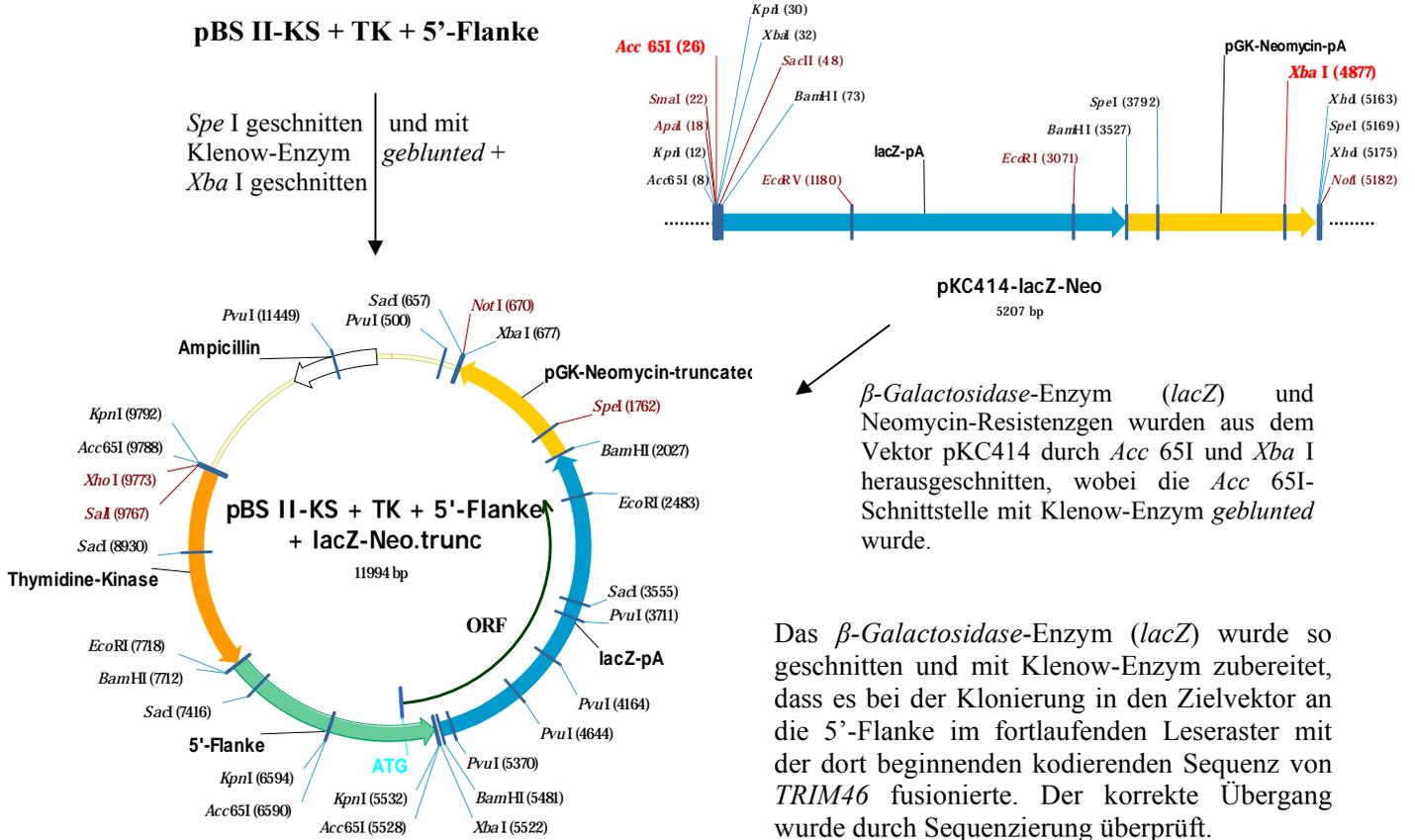
Klonierung des KO-Konstruktes

Ausgangspunkte für die Klonierung des KO-Konstruktes für das *TRIM46*-Gen waren die beiden in pBS II-KS-Vektoren vorliegenden flankierenden Fragmente des *TRIM46*-Genlokus aus den λ -Phagen, sowie die Vektoren pKO-Scrambler-NTK als Donor für die *Thymidin-Kinase* und der Vektor pKC414 als Donor für die Gene von *lacZ* und Neomycin-Resistenz.

Zusammenfügen von Thymidin-Kinase und 5'-Flanke:



Hinzufügen von *β*-Galactosidase-Enzym (*lacZ*) im fortlaufenden Leseraster und Neomycin-Resistenz:



Start des Gens *TRIM46* auf der genomischen Sequenz der 5'-Flanke:

5' ...**ATGGCTGAGGGTGAGGATATGCAGACCTTCACTTCCATCATGGATGC**ACTAGT**CCGCATCAGT**...3'

Schnittstelle *Spe* I:

5' ...**A**[^]**CTAG** T...3' => 5' ...**A** *blunt*: 5' ...**ACTAG**
3' ...**T** **GATC**[^]**A**...5' ...**TGATC** 3' ...**TGATC**

Anfang der *lacZ*-Sequenz in pKC414-lacZ-Neo:

5' ...GGGCCCCCGGG**GTTACCT**CTAGAATGCATTCCGCGGGTTTTTCATGTACCCAGC**ATGGGGGATCCCGT**
CGTTTTTA...3'

Schnittstelle *Acc* 65I:

5' ...**G**[^]**GTAC** C...3' => **GTACC**...3' *blunt*: **GTACC**...3'
3' ...**C** **CATG**[^]**G**...5' **G**...5' **CATGG**...5'

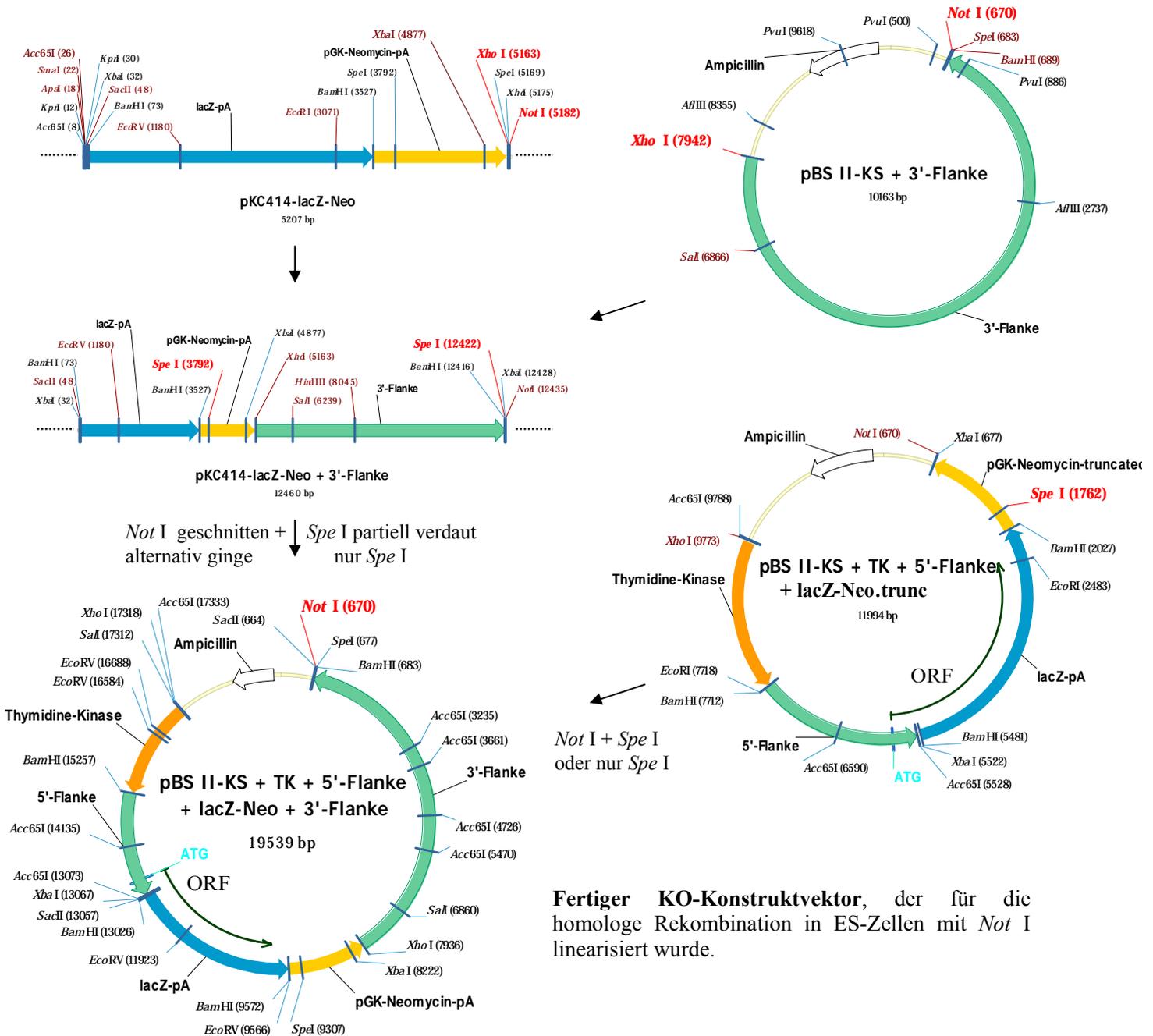
Ligation:

5' ...**ATGGCTGAGGGTGAGGATATGCAGACCTTCACTTCCATCATGGATGCAC**TAGGT**ACC**TCTAGAATGCA
TTCCGCGGGTTTTTCATGTACCCAGC**ATGGGGGATCCCGTCGTTTTTA**...3'

Fortlaufendes Leseraster:

5' ...**ATG . GCT . GAG . GGT . GAG . GAT . ATG . CAG . ACC . TTC . ACT . TCC . ATC . ATG . GAT . GCA . CTA .
GGT . ACC . TCT . AGA . ATG . CAT . TCC . GCG . GGT . TTT . CAT . GTA . CCC . AGC . ATG . GGG . GAT . CCC
. GTC . GTT . TTA**...3'

Hinzufügen der 3'-Flanke und Rekonstitution von Neomycin:



Fertiger KO-Konstruktvektor, der für die homologe Rekombination in ES-Zellen mit *Not I* linearisiert wurde.

Bei der ganzen Klonierung für das Konstrukt war darauf zu achten, dass bis zum Ende genügend geeignete Restriktionsschnittstellen übrig blieben und das Konstrukt für die homologe Rekombination linearisiert werden musste. In diesem Fall wurde die Planung per Hand vorgenommen, jedoch empfiehlt sich grundsätzlich die Verwaltung mittels einer Software, in der die ganzen Vektor- und Insertsequenzen vorliegen und die Klonierungsschritte zuerst in-silico geplant und in einer Datenbank dokumentiert werden können. Auf den vorigen Seiten wurde die hier durchgeführte Klonierungsstrategie mit dem Programm *Vector NTI9* zur Kontrolle noch einmal durchgerechnet, was zudem übersichtliche Grafiken geliefert hat.

Die **endgültige Kontrolle des Konstruktes** erfolgte **durch Sequenzierung** über die Ligationsstellen sowie **Restriktionsverdau**:

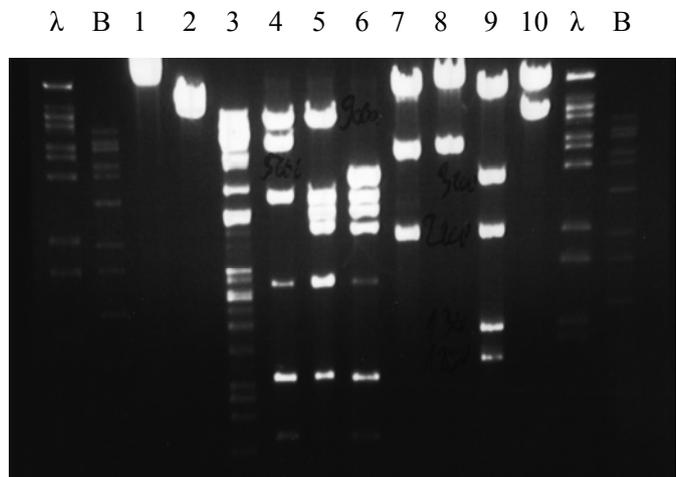
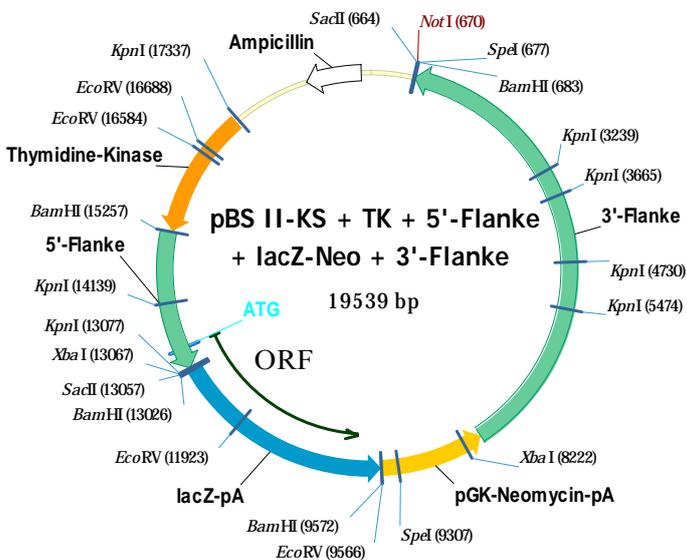
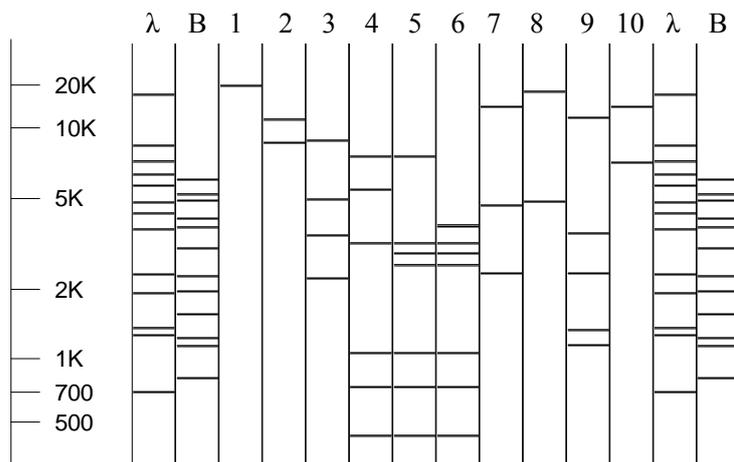


Abbildung 65: Verschiedene **Restriktionsverdau** zur **Kontrolle** der richtigen Klonierung. In der Plasmid-Grafik des KO-Konstruktvektors sind die ausgewählten Restriktionsschnittstellen eingetragen, welche zum Testen verwendet wurden. Oben rechts das tatsächliche Agarose-Gel mit den DNA-Fragmentlängenmarkern λ und B (siehe Abbildung 148) sowie den mit den entsprechenden Kombinationen von Restriktionsenzymen verdauten Proben des KO-Konstruktvektors. Unten rechts das aus der bekannten Sequenz des KO-Konstruktvektors mittels Software (*Vector NTI9*) vorhergesagte Muster der



Restriktionsfragmente. **1. Not I** -> linearisierte nur das KO-Konstrukt. **2. Spe I** -> schnitt 2 Mal und lieferte 2 Fragmente von 10909 bp und 8630 bp Größe. **3. Bam HI** -> sollte 4 Fragmente liefern, die man auch wieder findet, jedoch scheint das verwendete Enzym überaktiv geworden zu sein, weshalb unkontrollierte Schnitte entstanden oder es war verunreinigt. **4. Kpn I** -> lieferte das erwartete Fragmentmuster bis auf einen Größenunterschied zur Vorhersage, die auf einen Polymorphismus in der 3'-Flanke zurückzuführen ist (Schnittstelle *Kpn I* 4730 ist in der realen Sequenz der 3'-Flanke nicht vorhanden im Gegensatz zur Sequenz aus der Datenbank), was für das Konstrukt aber keine Bedeutung hatte. **5. Kpn I + Not I** -> zerlegten das zweitgrößte Fragment des alleinigen *Kpn I* -

Verdau von 5441 bp in zwei kleinere von 2872 und 2569 bp. **6. Kpn I + Spe I** -> waren wie 5. jedoch wurde zusätzlich das größte Fragment von *Kpn I* von 7603 bp zerlegt in zwei kleinere von 3833 und 3770 bp, die wie eine dicke Bande auf dem Agarose-Gel erscheinen. **7. Eco RV**, **8. Xba I** -> lieferten exakt die vorhergesagten Fragment-Muster. **9. Xba I + Eco RV** -> erwartungsgemäß wurden das größte und zweitgrößte Fragment von *Eco RV* von 12417 und 4661 bp durch *Xba I* auf 11073 und 3517 bp verkleinert, wodurch zwei kleinere Fragmente von 1344 und 1144 bp hinzukamen. **10. Sac II** -> lieferte erwartungsgemäß zwei Fragmente von 12393 und 7146 bp.

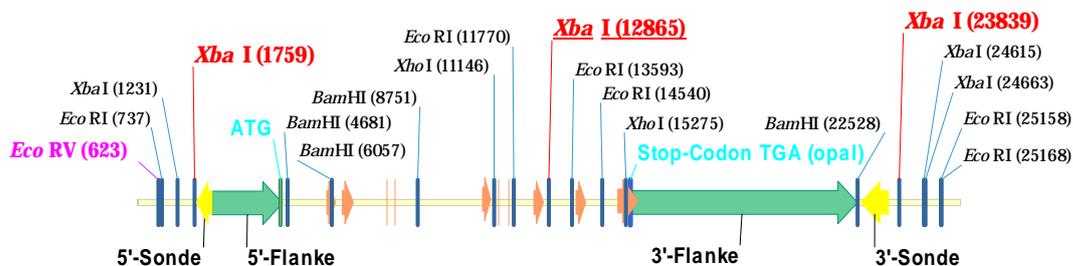
Gentransfer in ES-Zellen und ES Zell-Screen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) stammen aus der inneren Zellmasse der Mausblastocyste und können in Kultur auf *Feederzellen* gehalten werden. Die *Feederzellen* sind Mausfibroblastenzellen, die selber resistent für Neomycin sind, da sie aus transgenen Mäusen (CD-1.MTKNeo-2) gewonnen wurden. Zusätzlich wurden die Fibroblasten mitotisch inaktiviert mit Mitomycin-C, nachdem sie ihre Kulturschalen mit einem dichten Rasen bewachsen hatten. Auf diesem konnten die ES-Zellen kultiviert werden, welche durch Zugabe von LIF (Leukemia Inhibiting Factor) an der Differenzierung gehindert wurden. Das linearisierte Rekombinationskonstrukt wurde in die MPI-II-ES-Zelllinie (Mausstamm 129/Sv) (Doetschman, Eistetter et al. 1985) elektroporiert und auf das homologe Rekombinationsereignis selektiert. Es fand nacheinander eine Doppelsektion statt, wobei das Antibiotikum **Geneticin®G418** (verwandt mit Neomycin) der positiven und 24-48 h später **Gancyclovir** der negativen Selektion diente. Hierbei bewirkt das in dem Konstrukt enthaltene Neomycin-Resistenzgen die Inaktivierung des Antibiotikums G418, währenddessen etwaige vorhandene *Thymidin-Kinase* eine Umwandlung von Gancyclovir in ein Zellgift bewerkstelligte. Nach dieser Selektion wurden insgesamt 300 Klone isoliert, d.h. Einzelzellen, die die Selektion überlebt hatten.

Zur Identifizierung des homologen Rekombinationsereignisses wurde genomische DNA aus den ES-Zellen gewonnen für die **Southern-Blot-Analyse**.

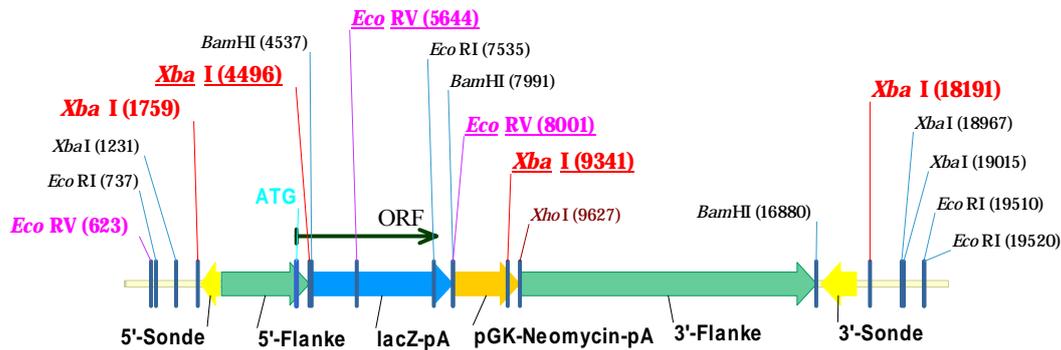
Die genomische DNA wurde dabei mit den Restriktionsenzymen *Xba I* bzw. *Eco RV* so verdaut, dass im Bereich des Genlokus von *TRIM46* unterschiedlich große Fragmente entstanden, je nachdem ob die genomische Originalsequenz geschnitten wurde oder die durch den KO substituierte Sequenz. Die geschnittenen Fragmente konnten elektrophoretisch aufgetrennt und nach Southern geblottet werden. Zur Identifizierung der Fragmente vor dem Hintergrund anderer genomischer Sequenzen wurden zwei radioaktiv markierte DNA-Sonden (siehe ab Seite 153) eingesetzt, die jeweils in dem gewünschten Bereich hybridisierten. Zusätzlich wurde eine Sonde gegen *lacZ* eingesetzt, die aus der zwischen *Eco RV* geschnittenen *lacZ*-Sequenz bestand.

Mit diesen 3 Sonden konnte auf erfolgreiche Integration an der 5'-Flanke sowie der 3'-Flanke und Vorhandensein des substituierten Inserts mit *lacZ* dazwischen geprüft werden.



Ausschnitt von Maus-Chromosom 3 mit TRIM46-Genlokus

25758 bp



Ausschnitt von Maus-Chromosom 3 mit TRIM46-Genloкус nach KO
20110bp

Die Situation an dem Genloкус von *TRIM46* vor und nach der homologen Rekombination zur Integration des KO-Konstruktes ist in obigen Grafiken dargestellt. Die jeweils hinzu oder hinweg gefallenen Schnittstellen sind unterstrichen.

Daraus folgt, dass beim Schneiden mit *Xba I* im Wildtyp ein Fragment von 11106 bp und eines von 10974 bp zu erwarten war, das jeweils entweder mit der 5'- oder der 3'-Sonde detektiert werden konnte. Nach erfolgreicher Integration des KO-Konstruktes wurden stattdessen ein Fragment von 2737 bp und eines von 8850 bp sichtbar. Zusätzlich würde sich mit der *lacZ*-Sonde ein Fragment von 4845 bp zeigen.

Beim Schneiden mit *Eco RV* sollte im Wildtyp gar kein Fragment von erfassbarer Größe auftreten, wohingegen bei KO-Integration jeweils mit der 5'- oder der *lacZ*-Sonde ein Fragment von 5021 bp bzw. von 2357 bp erscheinen sollte. Die 3'-Sonde wurde in diesem Falle nicht gebraucht.

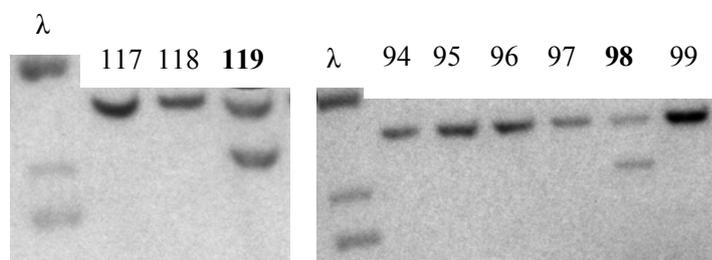


Abbildung 67: Ausgewählte ES-Zellklone, deren genomische DNA mit *Xba I* verdaut wurde. Die radioaktive 3'-Sonde zeigte bei den Klonen 119 und 98 das Knock-out-Fragment von 8850 bp zusätzlich zum heterozygot vorliegenden Wildtyp-Fragment von 10974 bp, was diese Klone positiv für den Knock-out auswies. Zum λ-Fragmentlängenmarker siehe Abbildung 148.

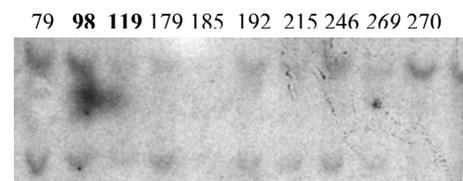


Abbildung 66: Ausgewählte ES-Zellklone, deren genomische DNA mit *Eco RV* verdaut wurde. Die 5'-Sonde zeigt das Fragment von 5021 bp und die *lacZ*-Sonde von 2357 bp außer bei den Klonen 185 und 270, die nicht vollständig sind.

Insgesamt wurden nach diesem Verfahren 300 mit dem KO-Konstrukt elektroporierte und selektierte ES-Zellklone untersucht, von denen 15 sich nach den oben genannten Kriterien positiv erwiesen, was einer Rekombinations-Frequenz von 1:20 entspricht. Die Klone 98, 119 und 269 wurden für die Herstellung transgener Mäuse weiterverwendet, die späteren Analysen wurden mit Mäusen durchgeführt, die auf Klon 98 zurückgehen.



Abbildung 68: Ausgewählte ES-Zellklone, deren genomische DNA mit *Xba I* verdaut wurde. Die radioaktive *lacZ*-Sonde zeigte eine erwartete Bande bei 4845 bp außer bei den Klonen 185 und 270 als Beispiele für Unvollständige.

Morula-Aggregation von ES-Zellen, Keimbahntransfer und Genotypisierung der transgenen Mäuse

Um chimäre Mäuse zu erhalten, wurden 3 positive ES-Zell-Klone (Klon-Nr. 98, 119, 269) vom Mausstamm 129/Sv (mit schwarzen Augen) mit Morulae aggregiert (siehe Seite 163), die aus dem NMRI-Mausstamm gewonnen wurden. Dazu musste den Morulae die Zona pellucida entfernt werden. Das Aggregat wurde 24 h bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen in scheinsschwangere (Schwangerschaftstag 2) Ammenmütter transferiert. Es wurden dafür diejenigen Embryonen ausgewählt, die bis zum Blastocysten-Stadium entwickelt waren. Sollten die Embryonen 17 Tage nach dem Retransfer nicht geboren werden, wurde per Kaiserschnitt entbunden.

Der Grad des Chimärismus ist an der Fellfarbe erkennbar. Je höher der Anteil an dunkler Fellfarbe ist (Mausstamm 129/Sv), desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die chimäre Maus die transgene Information auch in ihren Keimzellen trägt und somit diese Information an ihre Nachkommen weitergibt.

Nach sechs Wochen wurden die Chimären mit NMRI-Wildtypmäusen verpaart. Ein Keimbahntransfer konnte bei den Nachkommen anhand der Augenfarbe erkannt werden. Mäuse mit schwarzen Augen entstammten der Keimbahn den transgenen ES-Zellen (Stamm 129/Sv), wogegen Mäuse mit roten Augen von nicht-transgenen Keimbahn-Zellen (Stamm: NMRI) abstammten. Diese **F1-Generation der Chimären** war folglich **heterozygot für das Transgen**.

Heterozygote Tiere dieser Generation (F1) wurden miteinander verpaart, um homozygote Tiere zur Phänotyp-Analyse zu erhalten (genetischer Mischhintergrund).

Parallel wurde begonnen, Inzuchtlinien mit dem Stamm C57 BL/6 zu züchten, der für neuronale Fragestellungen als besonders geeignet gilt, sowie mit dem Stamm 129/Sv, der den identischen genetischen Hintergrund wie die ES-Zellen aufwies, sowie mit CD-1. Für die Phänotypanalyse wurde im Wesentlichen die Zucht mit dem Stamm 129/Sv verwendet.

Zur Planung und Verwaltung der Zuchtlinien wurde eine am Institut selber entwickelte Datenbanksoftware eingesetzt. Die geborenen Tiere wurden genotypisiert, indem aus Biopsie-Material der Schwanzspitze genomische DNA gewonnen wurde, die mittels PCR auf Wildtyp, Heterozygotie- und Homozygotie des Transgens getestet wurden. Die PCR lieferte die gleiche Information wie die zuvor gezeigte Southern-Blot-Analyse mit radioaktiven Sonden, war für Genotypisierungen vieler Hundert Tiere aber schneller und nach initialer Verifikation durch Southern-Analyse auch zuverlässig.

Dabei kamen Primer (siehe ab Seite 153) zum Einsatz, die spezifisch für die *lacZ*-Gensequenz waren, so dass sie eine Bande von 415 bp Größe nur in homo- oder heterozygoten transgenen Tieren zeigen sollten.

Ein weiteres Primer-Paar amplifizierte ein Fragment von 646 bp aus dem *ausgeknockten* Bereich des *TRIM46*-Genlocus, so dass es nur bei Wildtypen sowie heterozygoten Transgenen auftauchen sollte.

Beide Primerpaare konnten in jeweils demselben PCR-Ansatz zugleich eingesetzt werden (**Multiplex-PCR**), so dass es möglich war, aus dem Bandenmuster auf das Vorliegen von Wildtypen, heterozygoten und homozygoten Transgenen zu schließen.

Beim Design der 4 Primer war auf ähnliche *Annealing*-Temperaturen zu achten, zudem musste die Schmelztemperatur auf 95°C (Standard 94°C) gesetzt werden, wegen der genomischen DNA.

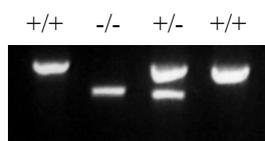


Abbildung 69: Das Bild zeigt ein Agarose-Gel mit den **PCR-Produkten einer Genotypisierung**: Ein kleineres Fragment von 415 bp von den *lacZ*-Primern, ein größeres Fragment von 646 bp von den Primern für die interne Bindestelle in dem *TRIM46*-Genlocus. Das Vorkommen beider Fragmente deutete auf heterozygote Tiere (+/-), das größere obere Fragment alleine auf Wildtypen (+/+), das kleinere untere Fragment alleine auf homozygote Transgene (-/-).

Expressionsanalyse des *TRIM46*-Gens

TRIM46 in EST-Datenbanken (virtueller Northern)

Expressed Sequence Tags (EST) sind sequenzierte Sequenzstücke von cDNA-Banken, die aus mRNAs verschiedener Gewebe gewonnen wurden. Sie sind unter anderem eine bioinformatische Ressource bei der Generkennung in Genomen, dem Vergleich von Splicevarianten oder der Kontrolle, ob die eigene Sequenz eines Gens vollständig ist. Auch geben sie erste Hinweise, ob das Gen überhaupt exprimiert ist und wo in welchen Geweben.

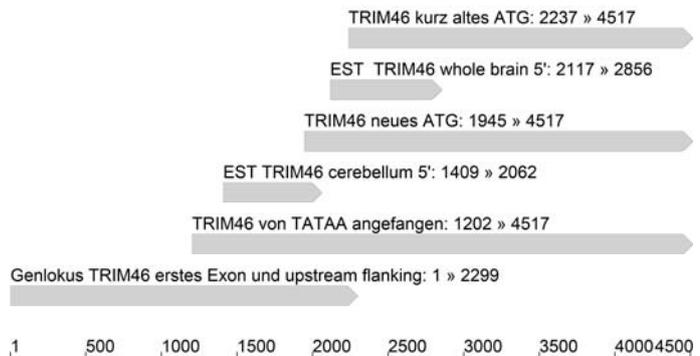
Hinsichtlich *TRIM46* konnten folgende Informationen aus der Maus-EST-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gewonnen werden:

1. Überprüfung des Experiments zur Bestimmung des 5'-Endes der mRNA von *TRIM46* (siehe Seite 58).

Die zusätzlichen 5'-Sequenzen sollten in ESTs der Datenbank zu finden sein. Tatsächlich wurden entsprechende ESTs gefunden:

BP428309 mRNA Fragment aus cerebellum E18-P56 Mus musculus
CA320885 mRNA Fragment aus whole brain embryo 13.5,14.5,16.5,17.5dpc

Ein **Contig-Assembly** für die gefundenen **ESTs zusammen mit** der mRNA-Sequenz für *TRIM46* (einmal mit altem ATG, neuem upstream gelegenen ATG und weiter upstream ab TATAA-Motiv) mit dem Programm *Vector NTI9* (Parameter: paarweises Alignment) ergab Überlappungen, die bestätigten, dass die mRNA tatsächlich nach *upstream* hin länger sein muss. Das Contig-Assembly wurde mit einigen Dutzend ESTs durchgeführt. Zur Übersicht wurden nur ein paar Repräsentative hier dargestellt. Ausschlaggebend sind die **gleichen Lese-Richtungen der Sequenzen**, da mRNA als Einzelstrang entweder *sense* oder *antisense* sein könnte und entsprechende ESTs mit umgekehrter Richtung in dem Bereich nicht vorkommen dürften bzw. dann zu einem anderen Gen gehören müssten. Außerdem sind **Überlappungen** ein sicherer Hinweis. Die ESTs überlappen hier zwar mit den für *TRIM46* angenommenen mRNA-Sequenzen, jedoch fand sich kein weiteres EST zur Überlappung der beiden dargestellten ESTs. Daher könnte das EST *TRIM46*-Cerebellum auch von einem anderen Gen stammen. Allerdings ist in diesem Bereich kein weiteres Gen *upstream* von *TRIM46* bekannt, außer einem, das aber in die andere Richtung abgelesen wird (*Keratinozyten assoziiertes Protein Krtcap2*, NM_025327, siehe auch **Abbildung 50**), so dass die korrekte Richtung der ESTs für *TRIM46* spricht.



2. Virtueller Northern für eine Übersicht über mögliche Expressionsorte von *TRIM46*.

Im Vergleich zu Punkt 1, wo es nur um die Überlappung der ESTs zur Vervollständigung der cDNA von *TRIM46* ging, sollen hier die ESTs nach ihrem Expressionsort in der NCBI-Datenbank sortiert werden, um einen Eindruck von den Organen und Geweben zu erhalten, in denen mRNA von *TRIM46* zu erwarten ist.

Maus-EST-Datenbank:

Gehirn: 9
Brustdrüse: 2
Lungentumor: 2
Hypophyse: 2
Rathke's Pouch: 2
Embryo E7.5: 2
Diencephalon: 1
Cerebellum: 1
Thymus: 1
Zellkultur B6-derived CD11 +ve dendritic cells: 1
Zellkultur NOD-derived CD11c +ve dendritic cells: 1
Bei den beiden Zelltypen handelt es sich um Leukozyten.



Abbildung 70: **Contig-Assembly der Maus-ESTs, welche mit der mRNA-Sequenz von *TRIM46* (cDNA12, roter Pfeil) gegen die NCBI-Datenbank (Maus-ESTs) *geblasted* wurden.** Es wurden diejenigen ESTs herausgefiltert, welche in dieselbe Richtung abgelesen wurden. Man kann sehen, wie die ESTs überlappen und zur Sequenz von *TRIM46* konvergieren. Vom ersten zum letzten EST ergibt sich eine gesamte Konsensus-Sequenz von 3,54 kbp, was mit dem realen Northern von 3,6 kbp gut übereinstimmt und noch etwas Spielraum auf Vervollständigung insbesondere am **5'-Ende (links)** lässt. Verwendete Software: *Vector NTI9*.

Human-EST-Datenbank:

Gehirn: 35
Amygdala: 4
Cerebellum: 3
Thalamus: 2
Lungenfibroblasten: 2
Hippocampus
Normale mesangiale Zellen (Niere)
Teratocarcinoma von NT2 neuronalen
Präkursor-Zellen nach Induktion durch
Retinsäure: 2

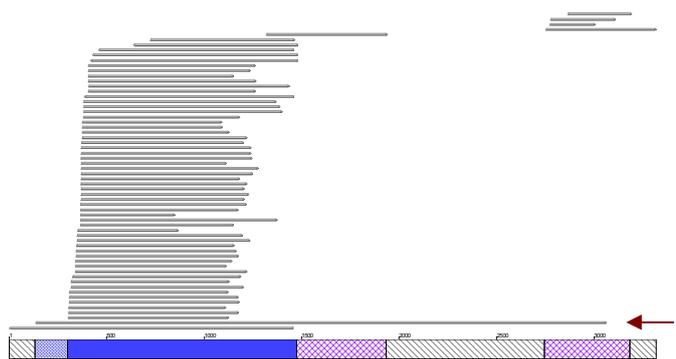


Abbildung 71: **Contig-Assembly der Human-ESTs analog wie oben.**

Abschätzung antigener Regionen des *TRIM46*-Proteins

Die Proteinsequenz des *TRIM46* wurde nach antigenen Regionen nach der Methode von Jameson-Wolf mit der Software *Lasergene-DNAsstar* abgesucht. Es wurde eine Protein-Region in DOM5 (siehe ab Seite 66) des *TRIM46*-Proteins ausgewählt, die nach *Blast* einzigartig im Proteom sein sollte, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die Firma Bioscience in Göttingen übernahm die Synthese des Polypeptids, deren Aufreinigung und anschließende Immunisierung in Kaninchen. Das Serum mit den polyklonalen Antikörpern wurde über eine Säule mit dem immobilisierten Antigenpeptid affinitätsaufgereinigt.

Synthetisierte Antigensequenz:
Cystein-IRHTEVSGQQAKEE

Das Cystein wurde zur Kopplung an das für die Immunisierung verwendete Trägerprotein (KLH, sonst auch BSA) eingefügt und war nicht Bestandteil der Antigensequenz

Die Wirksamkeit des Antikörpers wurde mittels Dot blot verifiziert. Dabei ergaben sich in Proteinextrakten aus Wildtyp-Embryonen deutliche Signale, in Extrakten von homozygoten *TRIM46*-KO hingegen keine oder nur schwache Signale je nach Konzentration. Für Immunfärbungen hatte sich eine Verdünnung von 1:20 für die affinitätsgereinigten Antikörper als praktikabel erwiesen. Wegen der geringen Verdünnung wurde das Material allerdings schnell aufgebraucht.

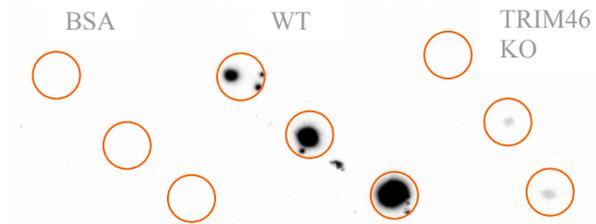


Abbildung 72: Dot blot von Proteinextrakten. Links BSA, Mitte Wildtyp-Embryo der Maus, rechts homozygoter *TRIM46*-KO. Der verwendete polyklonale Antikörper gegen *TRIM46* erwies sich als spezifisch, da kein Signal gegen BSA, kaum gegen das Proteingemisch aus dem *TRIM46*-KO-Embryo auftrat, jedoch ein starkes Signal im Wildtyp. Die Konzentration wurde so gewählt, dass im *TRIM46*-KO kein Signal mehr zu erkennen sein sollte, im Wildtyp hingegen noch ausreichend.

Zur Detektion wurde folgendes Material eingesetzt: Immobilon-P Transfer Membran, 20 x 20 cm (Cat.No. IPVH20200, Millipore), SuperSignal West Substrat Lösung (Cat.No. 34080, Pierce), Sekundärantikörper gegen Kaninchen mit Peroxidaseaktivität (Dianova).

Expression im *Whole-Mount*-Embryo auf Organebene

Vergleich von ISH, Immunfärbung und *lacZ*

Zur Analyse der Expression von *TRIM46* standen in dieser Arbeit 3 verschiedene Verfahren zur Verfügung: *lacZ*-Färbung gegen das im Knock-out eingefügte Reportergen β -Galactosidase, welches unter dem Promotor von *TRIM46* an dessen Stelle exprimiert würde und im homozygoten sowie heterozygoten KO, jedoch nicht Wildtyp nachweisbar wäre. In-situ-Hybridisierung gegen die mRNA von *TRIM46* im Wildtyp sowie heterozygotem KO. Immunfärbung gegen das *TRIM46*-Protein im Wildtyp sowie heterozygotem KO. Alle 3 Färbemethoden sollten zu konsistenten, d.h. Übereinstimmenden Ergebnissen führen. Somit stellte ein Vergleich der 3 Methoden auch eine weitere Kontrolle für den richtigen Knock-out dar, insbesondere ob keine die Expression kontrollierenden Sequenzen wie z.B. in Introns mit ausgeschaltet wurden, die zu Abweichungen führen könnten. Die Ergebnisse dieses Vergleiches sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

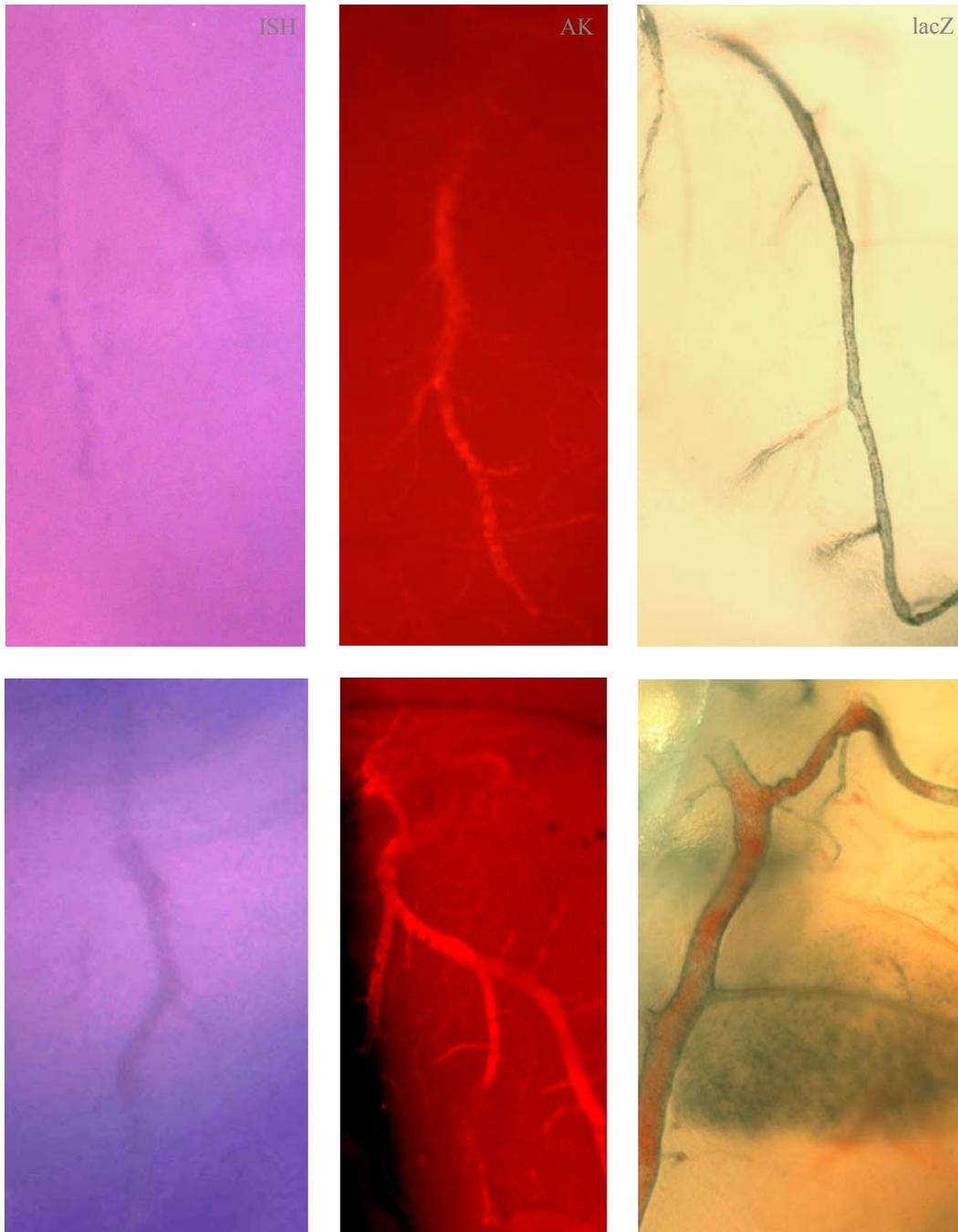


Abbildung 73: Die Abbildungen zeigen Blutgefäße an der Oberfläche eines präparierten Gehirnes aus Maus des Entwicklungsstadiums P1.

Expression von *TRIM46* im Wildtyp wurde mit in-situ-Sonde (links) und Antikörper angefärbt (Mitte) bzw. im homozygoten KO mit *lacZ*-Färbung (rechts). Die Färbung ist nicht durchgängig gleichmäßig entlang der Gefäße und auch nicht in allen Gefäßen, sondern scheint auf bestimmte Zelltypen beschränkt zu sein. Vergleich der *TRIM46*-Expression mit bekannten Markern für die verschiedenen Zelltypen in Blutgefäßen konnte darüber mehr Aufschluss geben (siehe Seite 119).

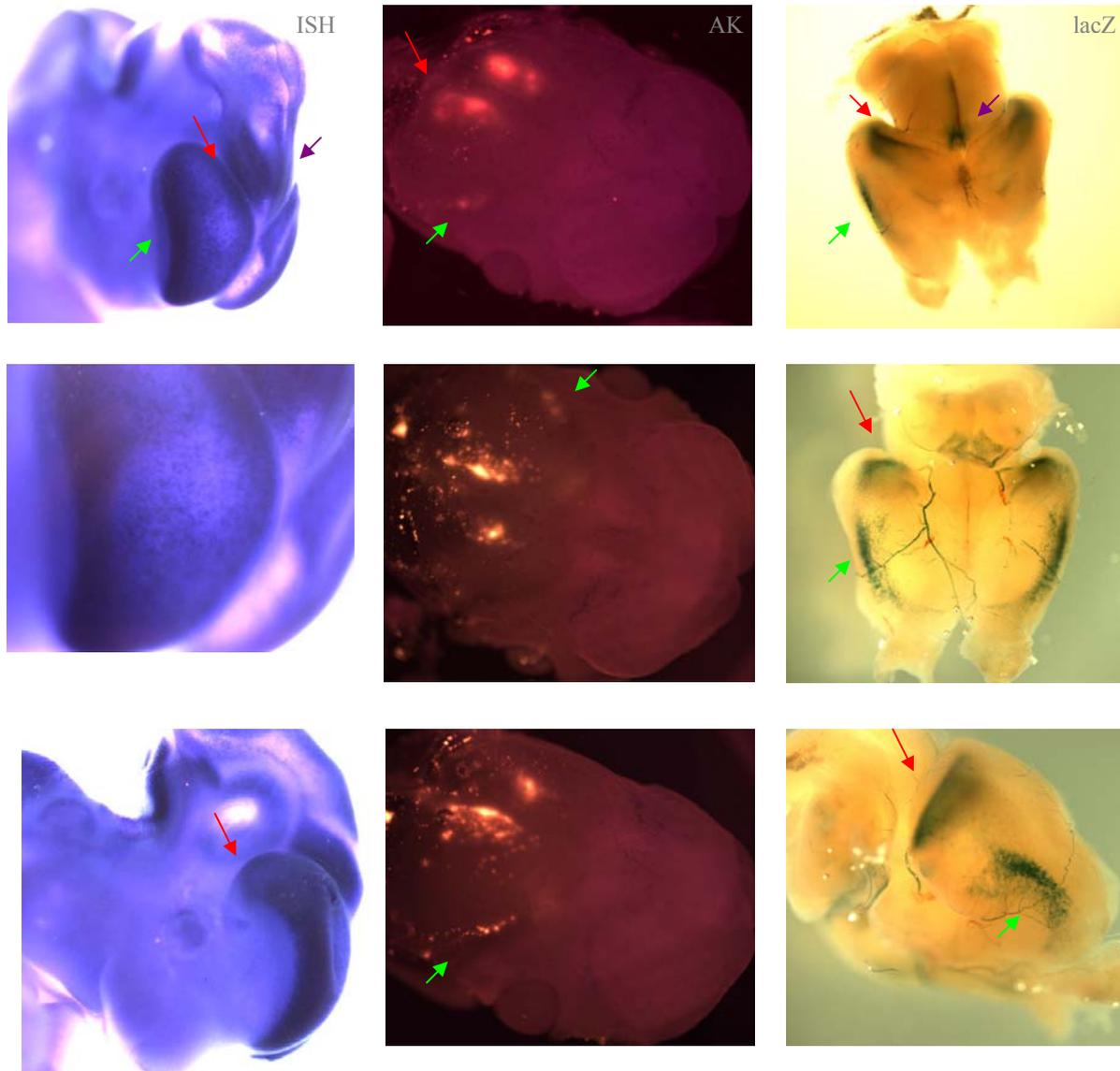


Abbildung 74: Die Abbildung zeigt in der linken Spalte in-situ-Hybridisierung an einem E13-Embryo, in der mittleren Spalte Immunfärbung an einem Mauskopf des Stadiums E16 und in der rechten Spalte *lacZ*-Färbung an einem isolierten Gehirn aus dem Stadium P1 jeweils für die Expression von *TRIM46*.

Es zeigt sich Konsistenz für die Expressionsanalyse bei den drei verschiedenen Methoden, jedoch auch Unterschiede, was die Deutlichkeit gegenüber der Hintergrundfärbung betrifft.

In allen drei Färbungen tritt eine *TRIM46*-Expression im Vorderhirn, vermutlich corticalen Arealen auf. Bei der Immunfärbung leuchten in der Fluoreszenz besonders Hirngebiete durch (vermutlich Hippocampus, siehe später mehr), die bei ISH und *lacZ*-Färbung verdeckt sind, so dass letztere nur die Aufsicht auf die äußere Oberfläche erlauben.

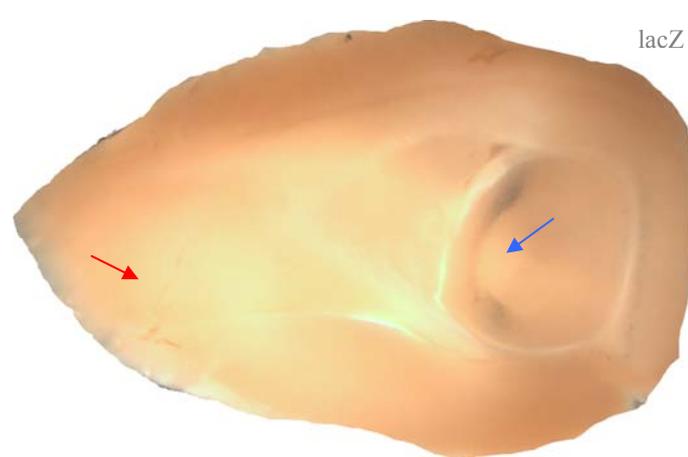
Die jeweils korrespondierenden Areale sind mit gleichfarbigen Pfeilen markiert. Der grüne Pfeil zeigt auf den **perirhinalen Cortex**, der rote auf die **Amygdala** und der violette auf die **Epiphyse** bzw. in dem früheren Stadium E13 das **Praetektum** und die **Roof Plate**. Unterschiedliche Ausdehnungen der Expressionsgebiete können durch den Vergleich von verschiedenen Entwicklungsstadien bedingt sein. Die verschiedenen Färbemethoden haben unterschiedliche Limitierungen und Optima bezüglich der Entwicklungsstadien aufgrund von Penetranz der Farbstoffe und anderer Faktoren. Hier geht es nur um die grundsätzliche qualitative Übereinstimmung der Expression.

Abbildung 75: In der rechten Abbildung ist zu erkennen, dass nicht alle Blutgefäße mit *lacZ*-Färbung blau wurden. Die ungefärbten sind normalerweise gar nicht zu erkennen, ausgenommen es befinden sich noch ausreichend rote Blutkörperchen in ihnen, die den Verlauf des Gefäßes nachzeichnen.

Der Übergang zwischen Arterien und Venen kann über zwei Wege erfolgen, ein dazwischen geschaltetes Kapillarbett oder eine Anastomose, eine Art Kurzschlussverbindung, deren Durchfluss reguliert werden kann, um Blutdruck und Gewebepfusion zu regulieren, so wie wahrscheinlich rechts zu sehen. Dabei wird später noch gezeigt werden, dass die *TRIM46*-Expression auf Arterien beschränkt ist.



Abbildung 76: Die Zahl der mit *lacZ* angefärbten Blutgefäße im Gehirn nimmt mit dem Alter ab. Bei einige Monate alten Tieren sind kaum noch welche zu sehen, siehe Abbildung rechts mit einem adulten Gehirn von homozygoter *Trim46*-KO-Maus. Keine Blutgefäße mehr angefärbt (nur solche mit roten Erythrozyten erkennbar, roter Pfeil), wobei die Färbung grundsätzlich funktioniert hat, wie an der angefärbten Hirnstruktur (Hippocampus, blauer Pfeil) zu sehen ist. Dies deutet auf eine selektive zeitlich begrenzte Expression von *TRIM46* während der Entwicklung hin. Offenbar wird das Gen für ausgewachsene Gefäße nicht mehr benötigt. Interessant wäre die Frage nach einer möglichen Induktion bei erneuter Angiogenese, etwa bei der Wundheilung oder dem Tumorwachstum.



Zusammenfassung des Vergleiches der drei Färbemethoden im *Whole Mount*:

Die drei unterschiedlichen Färbemethoden, Immunfärbungen gegen das *TRIM46*-Protein sowie in-situ Sonden im Wildtyp und *lacZ*-Färbungen im substituierten homozygoten KO zeigen im *whole-mount*-präparierten Gehirn eine Übereinstimmung der Expression in Blutgefäßen und im Gehirn. Die *lacZ*-Färbung macht weiterhin deutlich, dass nicht alle Gefäße gleichermaßen gefärbt werden und mit fortschreitendem Lebensalter der Tiere die Expression zurück geht und zumindest in den Blutgefäßen ganz verschwindet.

Die drei unterschiedlichen Färbemethoden zeigten Unterschiede in der Deutlichkeit der Färbungen, insbesondere hinsichtlich des Signal/Rauschverhältnisses, also der Intensität von Hintergrundfärbung. Als besonders deutlich zeichneten sich die *lacZ*-Färbungen aus, weswegen diesen im Weiteren der größte Darstellungsraum gewidmet wird.

Der Konsistenz wegen ist es aber positiv, dass die anderen beiden Methoden, in-situ-Hybridisierung und Immunfärbung, keine widersprüchlichen Resultate lieferten, da nur mit denen im Wildtyp gefärbt werden konnte, während *lacZ*-Färbung nur bei Vorliegen des im KO substituierten *lacZ*-Gens möglich ist, was bei homozygoten KOs und heterozygoten der Fall wäre.

Folgerichtig stimmt die Expression im Wildtyp mit der im KO überein, was nicht selbstverständlich sein müsste, wenn beispielsweise regulatorische Elemente, *Enhancer*, *Silencer*, etc. in Introns des Gens mit ausgeschaltet worden wären.

TRIM46 Expression im gesamten Embryo verschiedener Entwicklungsstadien

Wie zuvor gesehen, ist *TRIM46* nicht in allen Blutgefäßen exprimiert. Zur genauen Identifizierung der betroffenen Gefäßtypen, ob Arterien, Venen oder Kapillaren, muss die Anatomie des Gefäßsystems während der Embryonalentwicklung bestimmt werden. Siehe dazu das entsprechende Kapitel aus der Einleitung, Seite 21. Zudem zeigt sich Expression auch außerhalb von Blutgefäßen in anderen Endothelien.

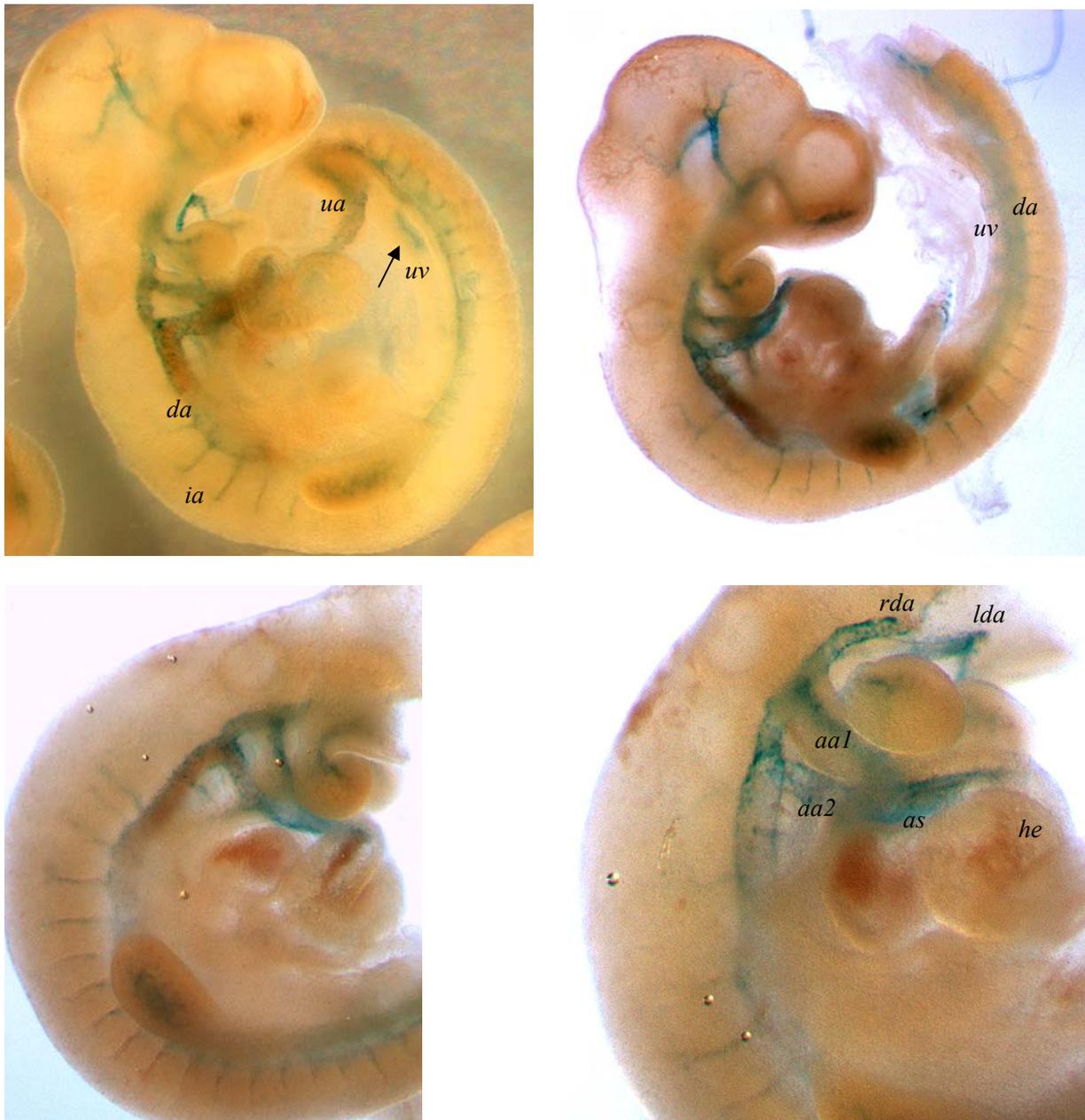


Abbildung 77: E9-Mausembryonen mit homozygotem *TRIM46*-Knock-Out durch *lacZ* angefärbt. Im Vergleich mit der Maus anatomie (Seite 7) erkennt man deutlich die **dorsale Aorta (da)** mit ihren **intersomitischen Arterien (ia)** und den Arch-Arterien (*aa*). Die weiter ventral liegende umbilicale Vene (*uv*) hingegen ist mit einer Ausnahme (Pfeil) nicht gefärbt im Gegensatz zur umbilicalen Arterie (*ua*), die aus der dorsalen Aorta hervorgeht. Man erkennt, wie die erste und zweite Arch-Arterie (*aa1*, *aa2*) mit der dorsalen Aorta kommunizieren sowie mit dem Aortic Sac (*as*), der in das Herz (*he*) mündet (siehe Abbildung 21). Rechte (*rda*) und linke dorsale Aorta (*lda*) sind nach Abtrennung des Kopfes zu erkennen. Im Bild links unten ist noch Blut im Herzen und der dorsalen Aorta zu sehen.

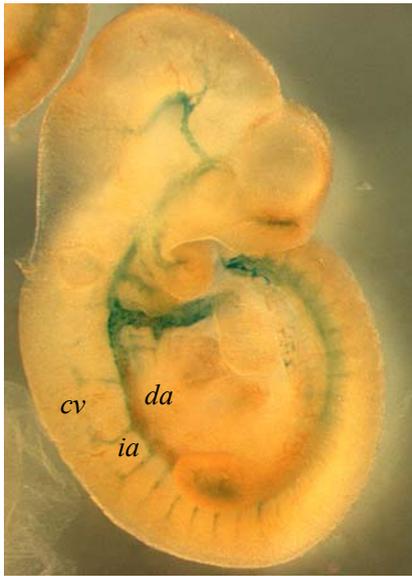


Abbildung 78: In diesem homozygoten *TRIM46*-KO Embryo des Stadiums **E9** kann man ansatzweise die cardinale Vene (*cv*) erkennen, die das Blut von den *lacZ*-gefärbten intersegmentischen Abzweigungen (*ia*) der dorsalen Aorta (*da*) wieder aufnimmt. Vergleiche dazu Abbildung 22.



Abbildung 79: Im Stadium **E10** sieht man feinere Aufästelungen der Arterien, insbesondere im Kopf. Hier wieder im homozygoten *TRIM46*-KO. Dazu sind weitere Somitensegmente gekommen. Deutlich ist der Unterschied von gefärbter umbilicaler Arterie (*ua*) und ungefärbter umbilicaler Vene (*uv*). Ausnahme bildet auch hier wie schon bei E9 ein kurzer blau gefärbter Abschnitt in der umbilicalen Vene. Auch im Kopf sind Venen zu erkennen, die noch Blut enthalten, sonst aber ungefärbt bleiben. Beim **Herzen** sind **noch keine Kranzarterien** zu erkennen, obschon erste ungefärbte Gefäße.

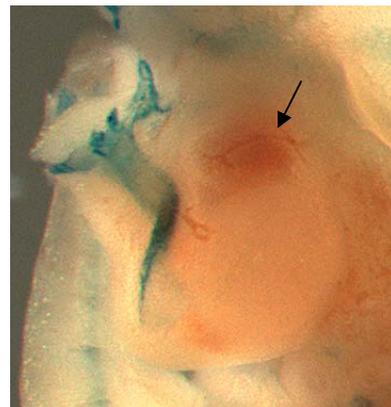
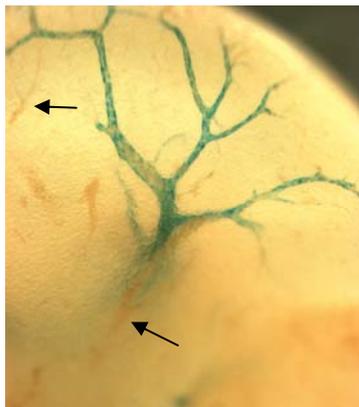




Abbildung 80: Bei diesen beiden **E10**-Embryonen mit homozygotem *TRIM46*-KO ist deutlich zu erkennen, wie nur die großen Gefäße gefärbt werden, jedoch **Kapillargebiete** (Pfeile) und daraus hervorgehende größere **Venen ungefärbt** bleiben. Erstmals tritt hier die cervicale Trunk-Arterie (*ct*) in Erscheinung (siehe Schema unten).

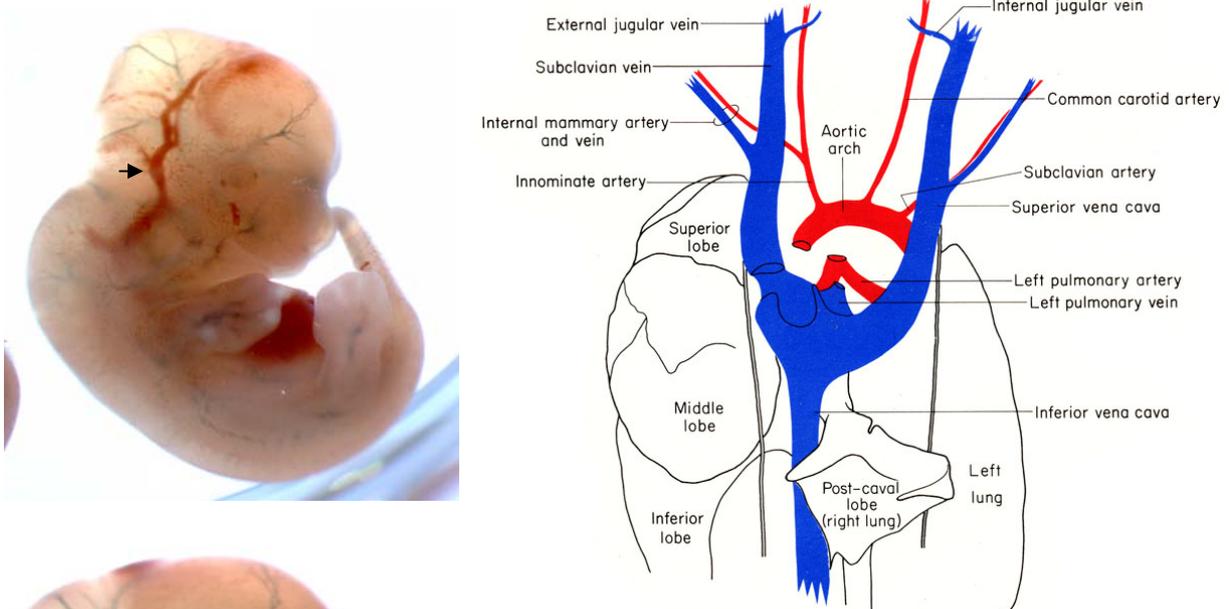


Abbildung 81: Im Stadium **E11** treten die **Kopfvnen** deutlicher hervor (dunkler Pfeil), sofern sich in Ihnen nach der Präparation noch Blut erhalten hat. Im Gegensatz zu den Arterien sind sie **nicht blau gefärbt** und scheinen demnach frei von *TRIM46*-Expression zu sein. Im Schema ist es umgekehrt dargestellt, die inner liegenden Carotis-Arterien sind dort rot und die weiter außen verlaufenden Kopfvnen blau gezeichnet. (Cook 1965). Auffällig ist eine Blaufärbung am Auge (heller Pfeil) mit zwei gegenüberliegenden Punkten.

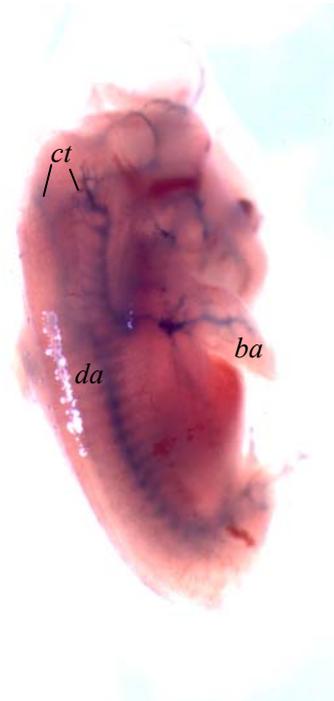


Abbildung 82: E12-Embryo homozygot für *TRIM46*. Die **rechte dorsale Aorta verschwindet** und die **linke wandert weiter nach innen**, um die Asymmetrie auszugleichen. Die cervicalen Trunk-Arterien (*ct*) sind paarig zu beiden Seiten des Embryos erkennbar. Hingegen nur noch eine dorsale Aorta (*da*), die sich in die Mitte unter die beiden cervicalen Trunk-Arterien positioniert. Die cervicale Trunk-Arterie geht zusammen mit der branchialen Arterie (*ba*) aus der subclavialen Arterie (*sa*) hervor, die über den Aortenbogen mit dem Herzen verbunden ist.

Die Anatomie im homozygoten *TRIM46*-KO zeigt sich bisher nicht auffällig gegenüber dem Wildtyp und der anatomischen Literatur. Mit zunehmendem Entwicklungsstadium verlieren die Embryonen an Durchsichtigkeit. Um die einzelnen Gefäße im Körperinneren identifizieren zu können, wurden die Embryonen im Folgenden seziiert. *TRIM46* offenbart sich weiterhin als Marker für das arterielle System, mit dem sich dessen Anatomie gut nachzeichnen lässt.

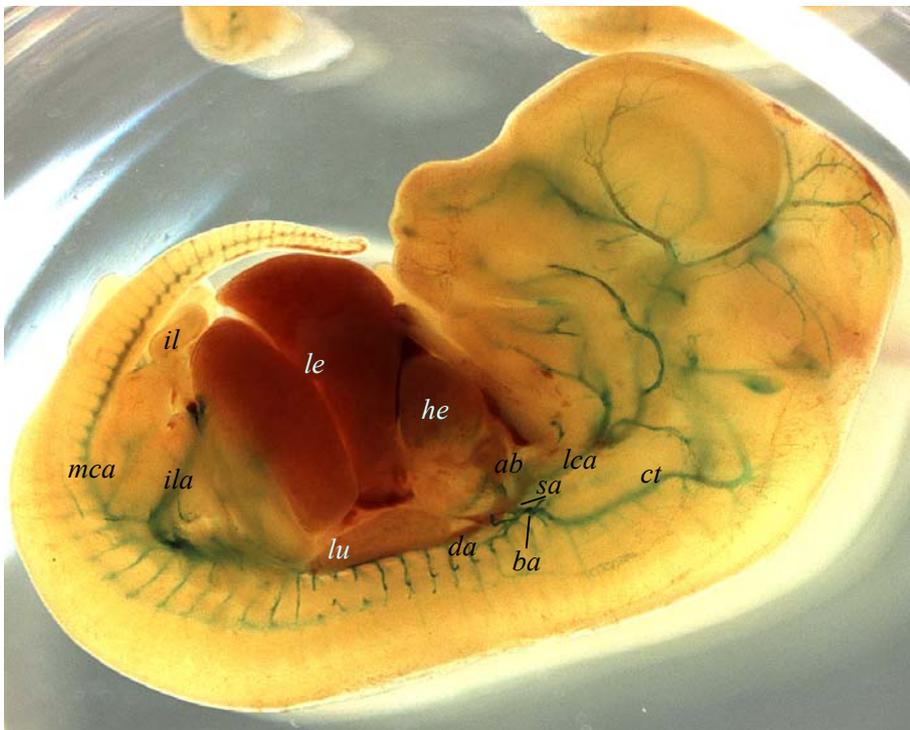


Abbildung 83: E13-Embryo, *TRIM46* homozygot, die **linke Körperseite zu ca. 1/4 abgetrennt**. Die dorsale Aorta (*da*) wandert immer weiter nach innen unter die Organsysteme. Oben geht sie im Aortenbogen (*ab*) in das Herz (*he*). Von dem Aortenbogen sind die Abzweigung der linken carotis Arterie (*lca*) und der subclavialen Arterie (*sa*) zu erkennen, von der die cervicale Trunk-Arterie (*ct*) und die branchiale Arterie (*ba*) abzweigen, wobei letztere abgetrennt ist wie auch der zugehörige linke Arm. Abdominal spaltet sich die Aorta auf in die mittige caudale Arterie (*mca*) und die paarigen iliac Arterien (*ila*), vormals vitteline Arterien (→ Abbildung 19). Leber, Lunge, Ileum:

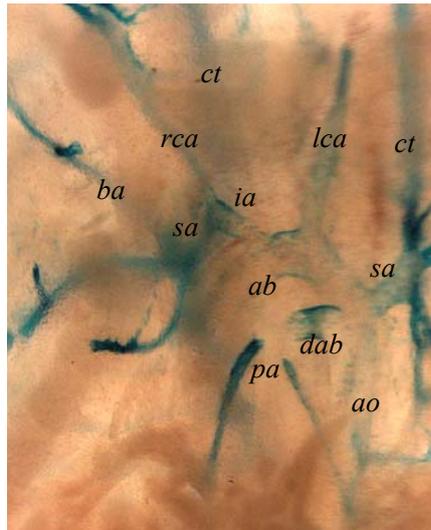
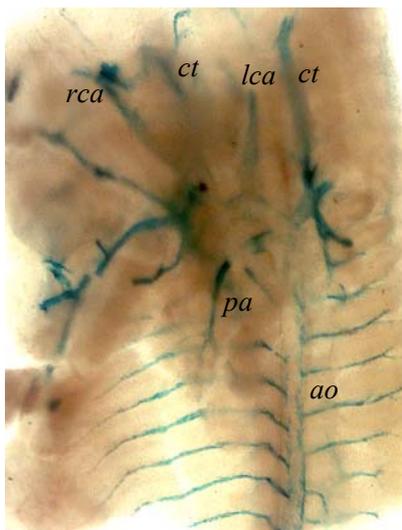
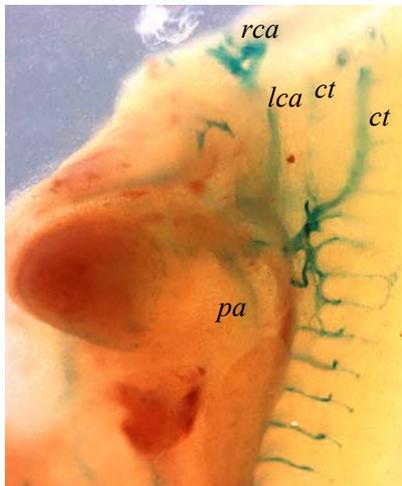
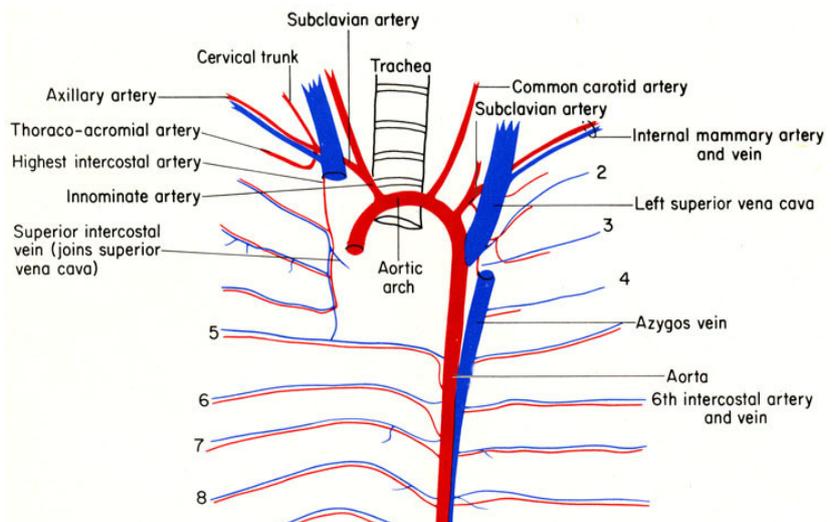
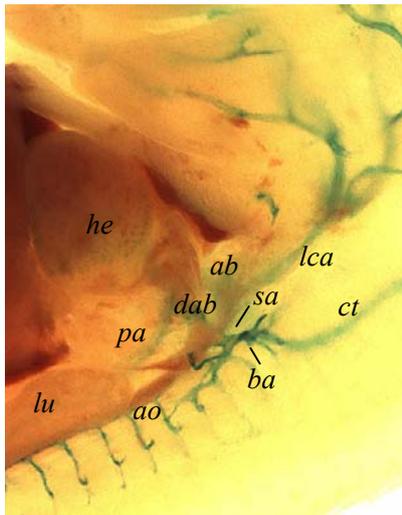


Abbildung 84: Der **Aortenbogen** hat sich im **TRIM46-KO** zum Stadium **E13** ordnungsgemäß ausgebildet, wie man durch Vergleich mit der anatomischen Literatur feststellen kann (→ Schema oben rechts (Cook 1965) und Abbildung 21, E). Die obere Bildsequenz vermittelt einen **räumlichen Eindruck durch Drehung der Perspektive** um das Herz im Vordergrund. In den beiden Bildern unten wurde das Herz entfernt, um den Aortenbogen unverdeckt sehen zu können. Von den beiden dorsalen Aorten ist nur noch die linke übrig geblieben. Die rechte

dorsale Aorta ist verschwunden. Die linke Aorta wandert zunehmend in die Mitte der Symmetrieachse, liegt im Stadium E13 aber noch deutlich zur linken Seite versetzt vor. Aorta (ao), Aortenbogen (ab), Herz (he), linke carotis Arterie (lca), rechte carotis Arterie (rca), subclaviale Arterie (sa), cervicale Trunk-Arterie (ct), branchiale Arterie (ba), pulmonale Arterien (pa), Lunge (lu), Ductus Arteriosus Botall (dab), innominale Arterie (ia).

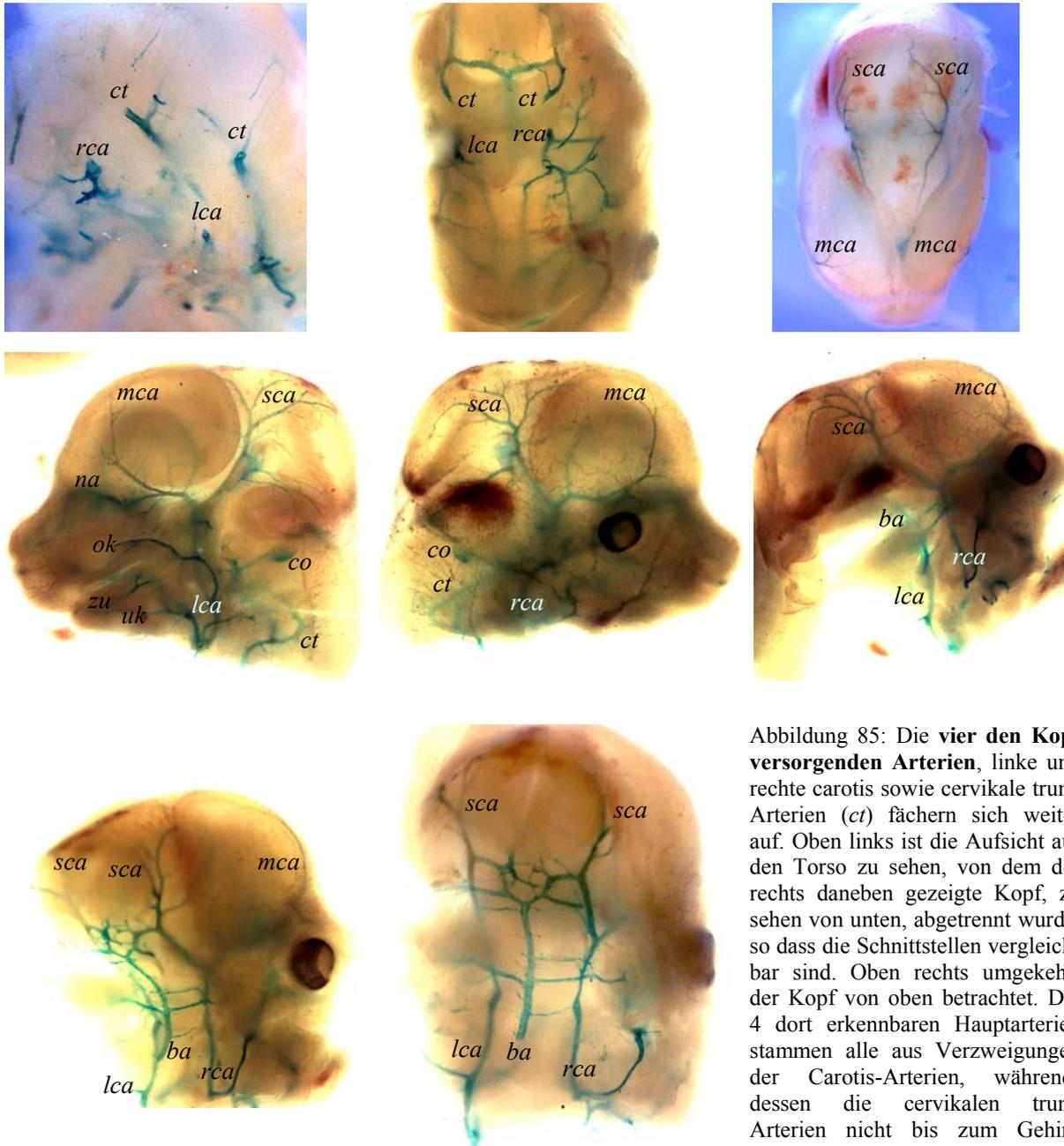


Abbildung 85: Die vier den Kopf versorgenden Arterien, linke und rechte carotis sowie cervikale trunk Arterien (ct) fächern sich weiter auf. Oben links ist die Aufsicht auf den Torso zu sehen, von dem der rechts daneben gezeigte Kopf, zu sehen von unten, abgetrennt wurde, so dass die Schnittstellen vergleichbar sind. Oben rechts umgekehrt der Kopf von oben betrachtet. Die 4 dort erkennbaren Hauptarterien stammen alle aus Verzweigungen der Carotis-Arterien, währenddessen die cervikalen trunk Arterien nicht bis zum Gehirn vordringen. Die carotis Arterien

versorgen mit ihren Verzweigungen neben dem Gehirn auch den ganzen vorderen Bereich des Kopfes, Unterkiefer (uk), Zunge (zu), Oberkiefer (ok), Auge, Nasenschleimhaut (na). Zur Versorgung des Gehirnes teilen sich auf jeder Seite die jeweilige carotis Arterie (lca, rca) in die mittlere cerebrale Arterie (mca) für das Vorderhirn mit dem Cortex sowie die superiore cerebellare Arterie (sca) für den hinteren Bereich mit dem Cerebellum auf. Diese beiden hinteren Arterienäste, die sich von beiden carotis Arterien ableiten, verschmelzen unter Cerebellum und Medulla zur unpaarigen basilaren Arterie (ba). Zur Sichtbarmachung wurde hier ein Teil des Hinterkopfes entfernt. Neben den Arterien findet sich TRIM46-Expression auch in der sich bildenden Cochlea (co) des Innenohres. Alle Bilder stammen von homozygoten TRIM46-KO des Stadiums E13.

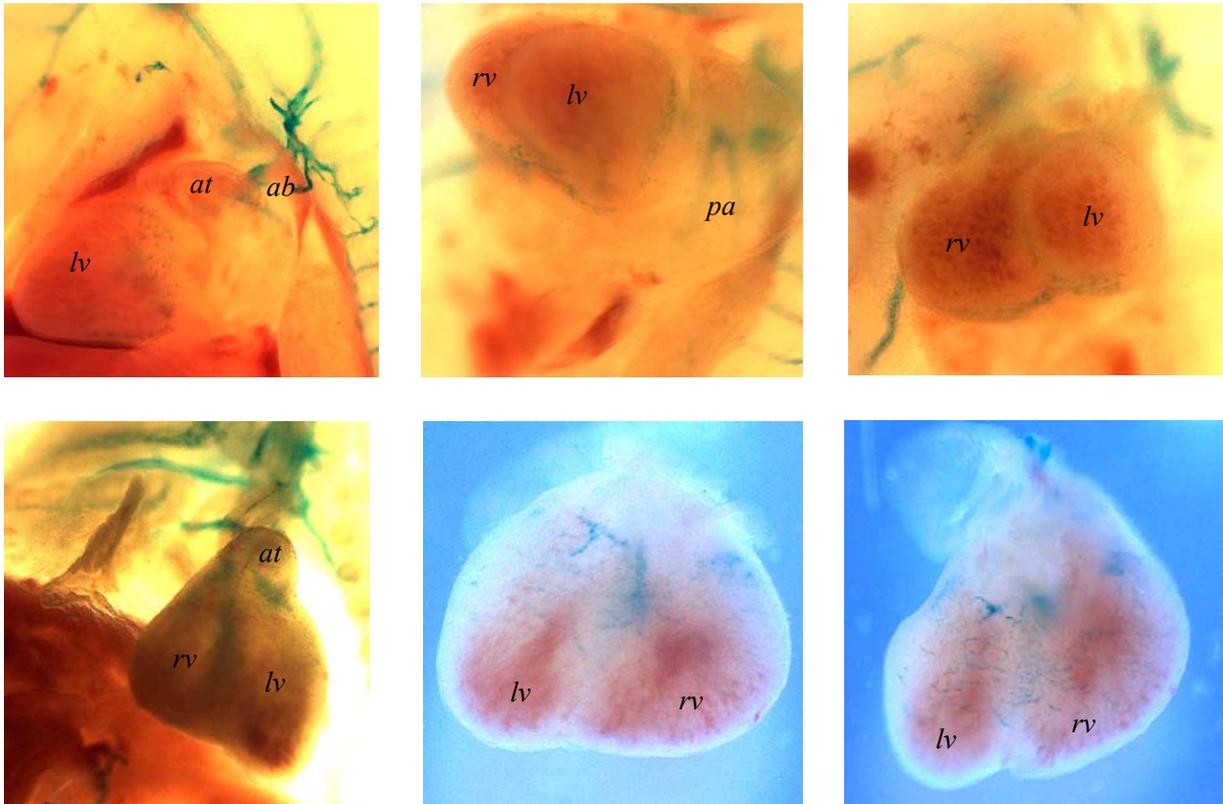


Abbildung 86: Im **Herzen** findet sich sowohl an der Oberfläche punktuell als auch durchscheinend aus dem Inneren eine *lacZ*-Färbung für *TRIM46* im homozygoten KO des Stadiums **E13**. Oben links ist das Herz von der Seite zu sehen, oben Mitte von seitlich unten, oben rechts von unten. Die blauen Punkte sind wie auf einem Band angeordnet, das die Ventrikel umfasst. Unten links dasselbe Herz von oben betrachtet. Hier scheinen insbesondere Strukturen aus dem Inneren durch. Zur Verdeutlichung wurde das Herz im Bild unten Mitte komplett entnommen und im starken Durchlicht von der Unterseite betrachtet. Ebenso unten rechts in einem anderen Fokus. Die blauen Punkte dürften **Vorläuferzellen zur Vasculogenese der Herzkranzarterien** sein. Siehe dazu Abbildung 89 und Diskussion sowie Einleitung. Hervorzuheben ist, dass PEO und Leber, von wo diese Vorläuferzellen stammen, nicht mit *lacZ* für *TRIM46* angefärbt werden. Rechter und linker Ventrikel (*rv*, *lv*), Atrium (*at*), pulmonale Arterien (*pa*), Aortenbogen (*ab*).

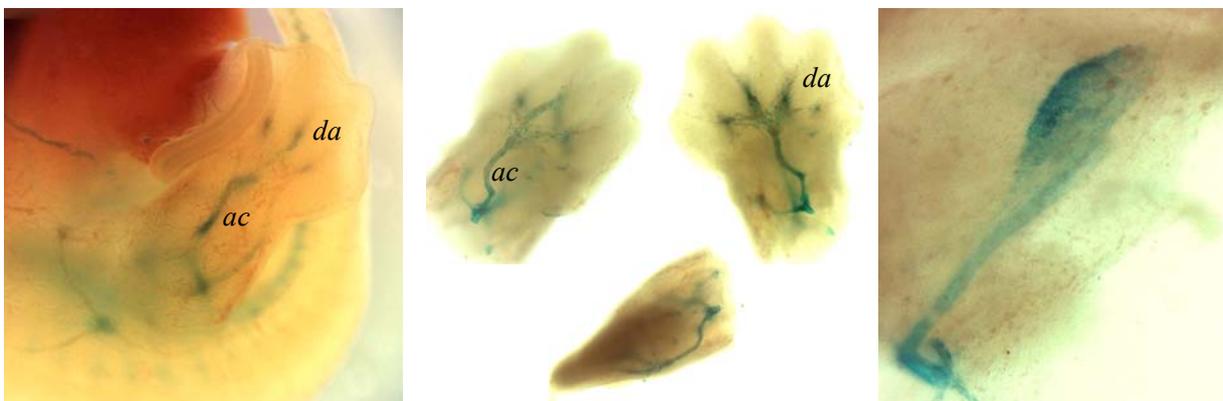


Abbildung 87: **Fuß** (links) und **Hand** (Mitte) eines **E13**-Mausembryos, homozygot für *TRIM46*-KO. In der Hand kann man den räumlichen Verlauf der Arterien gut erkennen. Im Bild rechts ist eine *lacZ*-Färbung in der sich entwickelnden **Cochlea** des Innenohres zu sehen. Arterie collateralis radialis (*ac*), dorsale metacarpal Arterien (*da*).

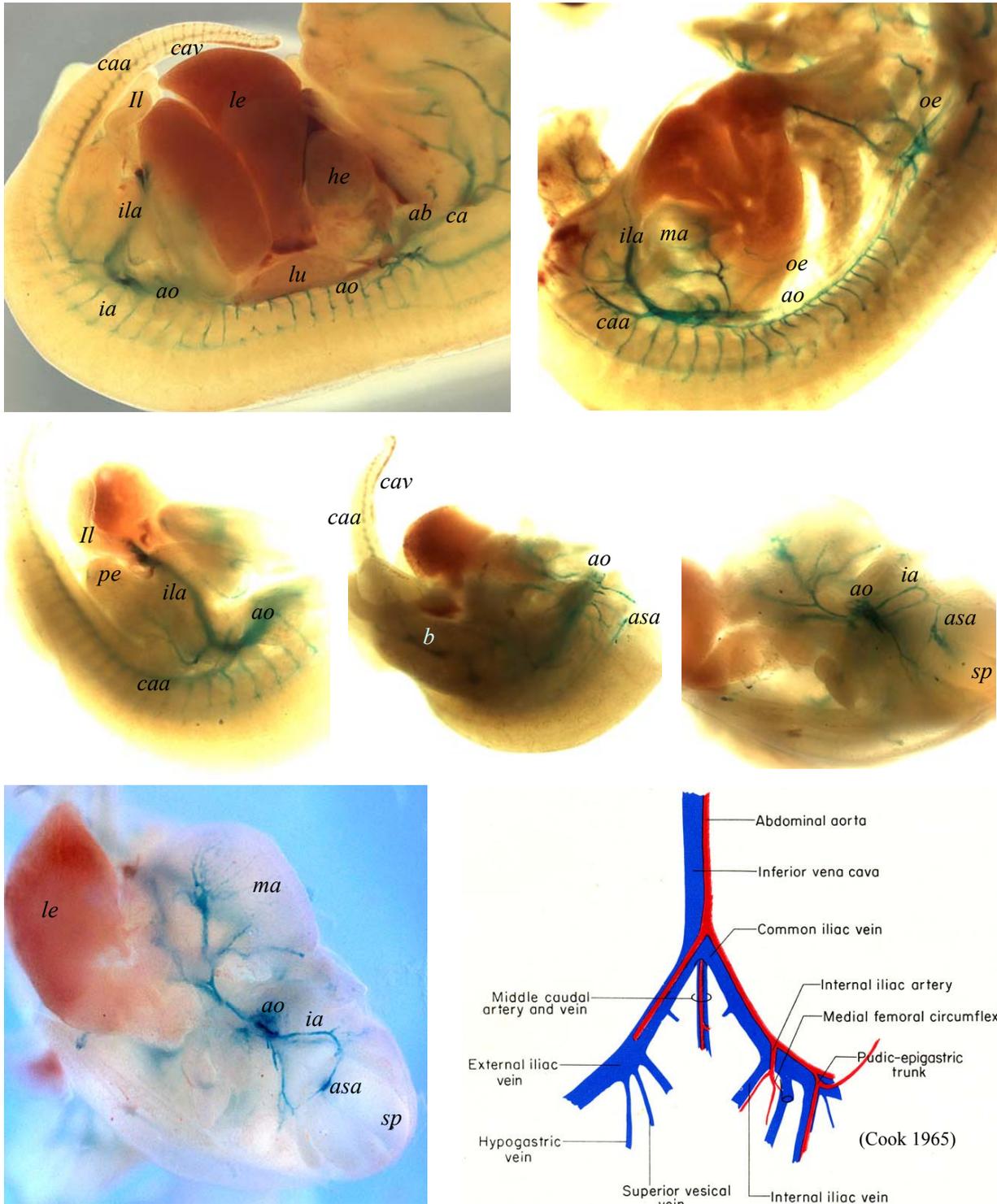


Abbildung 88: So wie sich die **Aorta** (*ao*) am Aortenbogen (*ab*) zum Kopf hin in 4 Arterien, darunter die beiden Carotisarterien (*ca*) mit der Gehirnversorgung, aufgefächert hat, so **spaltet** sie **sich auch im Abdomen in die mittlere caudale Arterie** (*caa*), die die Körperachse weiter entlang läuft und in den Schwanz mündet, **sowie die paarweisen iliac Arterien** (*ila*) **auf**. Von letzteren zweigen die arterielle Versorgung des Beines (*b*), des Darmes (*Il*) und weiterer innerer Organe (z.B. Testis, Blase) ab. Zudem münden die von der Aorta ausgehenden intersomitischen Arterien (*ia*) in der **anterioren spinalen Arterie** (*asa*), die die Wirbelsäule (*sp*) entlangläuft. Man kann im **Schwanz** erkennen, wie die **Blaufärbung beim Übergang in die mittlere caudale Vene** (*cav*) **verschwindet**. Notochord (*no*), Herz (*he*), Leber (*le*), Lunge (*lu*), Magen (*ma*), Oesophagus (*oe*), Penis (*pe*). E13-Embryo, homozygot für *TRIM46*-KO.

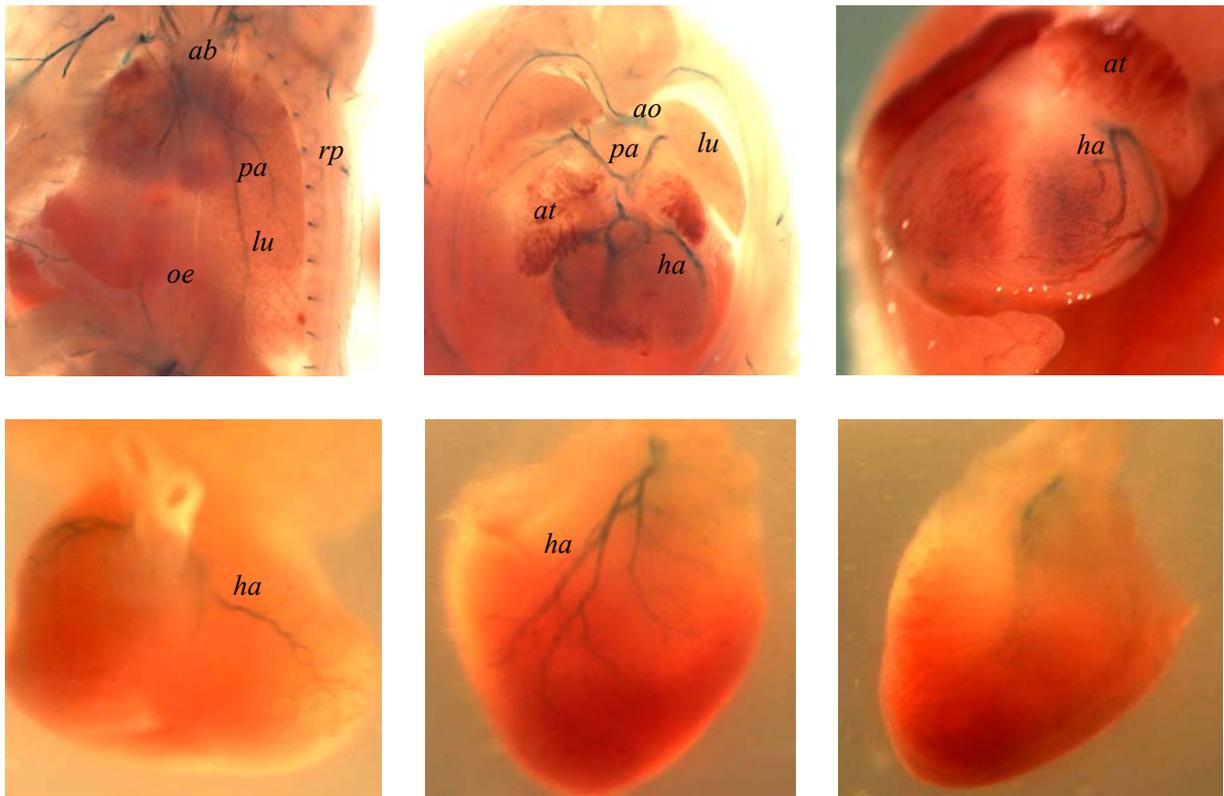


Abbildung 89: Zum Stadium **E14** haben sich die **Herzkranzarterien** (*ha*) deutlich ausgebildet im Vergleich zu E13 (siehe Abbildung 86). Die pulmonalen (*pa*) Arterien zeigen nun eine stärkere Verzweigung in der Lunge (*lu*). Im Inneren des Herzens zeigt sich keine weitere Färbung (Bild rechts unten mit halbiertem Herz). Das Bild oben links ist eine Ansicht von hinten, der Rücken wurde entfernt (und ist in Abbildung 91 zu sehen), daher macht der Aortenbogen (*ab*) hier eine Rechtsdrehung und der rechte Lungenflügel ist größer als der Linke wegen der Herzasymmetrie. Das mittlere Bild oben ist die Ansicht von vorne. Atrium (*at*), Rippen (*rp*), Oesophagus (*oe*), Aorta (*ao*).

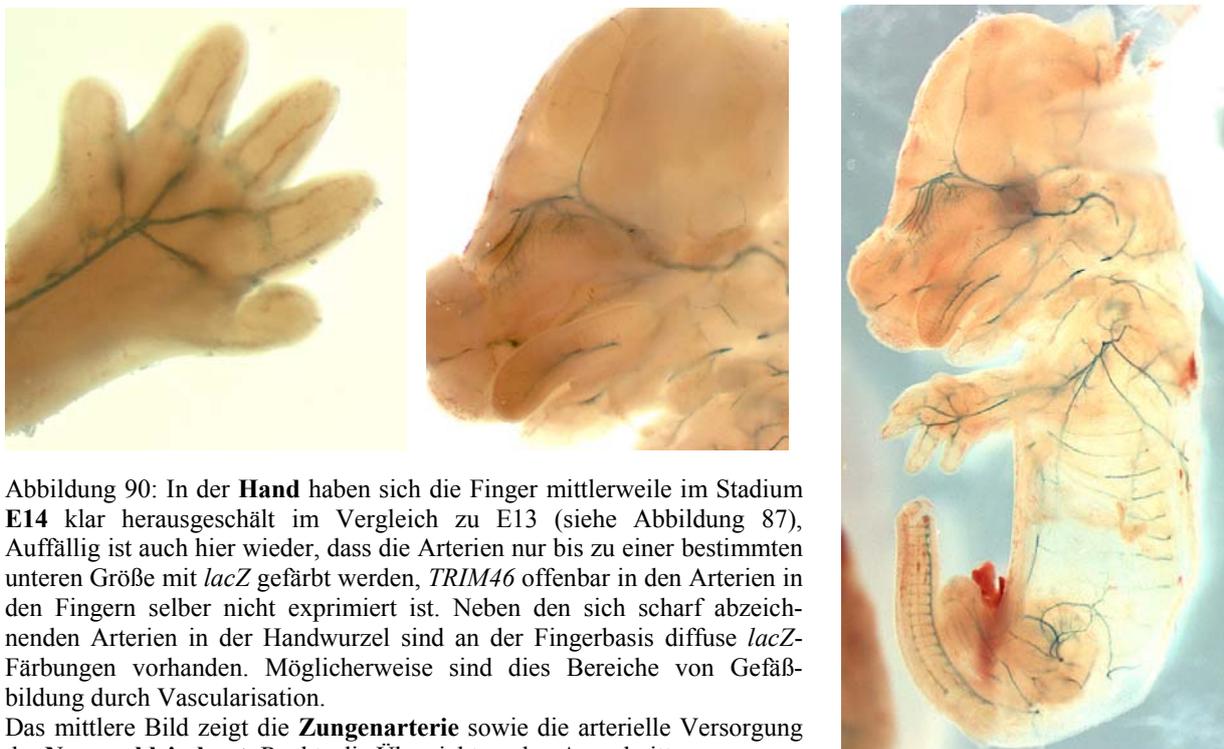


Abbildung 90: In der **Hand** haben sich die Finger mittlerweile im Stadium **E14** klar herausgeschält im Vergleich zu E13 (siehe Abbildung 87), Auffällig ist auch hier wieder, dass die Arterien nur bis zu einer bestimmten unteren Größe mit *lacZ* gefärbt werden, *TRIM46* offenbar in den Arterien in den Fingern selber nicht exprimiert ist. Neben den sich scharf abzeichnenden Arterien in der Handwurzel sind an der Fingerbasis diffuse *lacZ*-Färbungen vorhanden. Möglicherweise sind dies Bereiche von Gefäßbildung durch Vascularisation. Das mittlere Bild zeigt die **Zungenarterie** sowie die arterielle Versorgung der **Nasenschleimhaut**. Rechts die Übersicht zu den Ausschnitten.

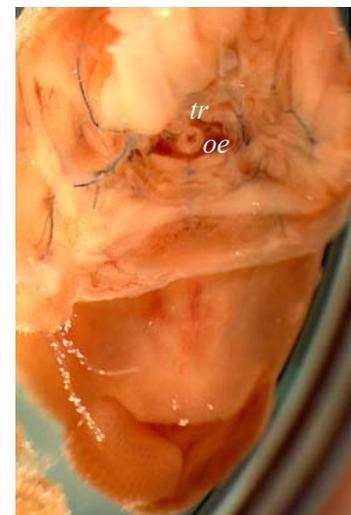
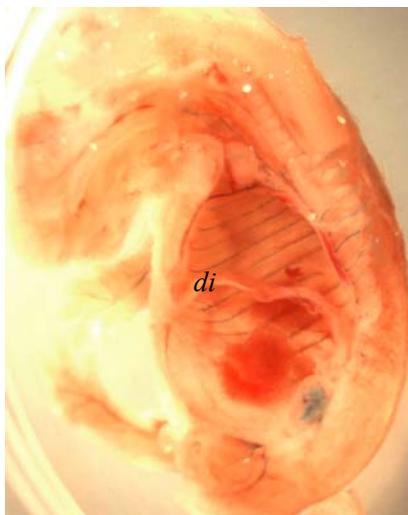
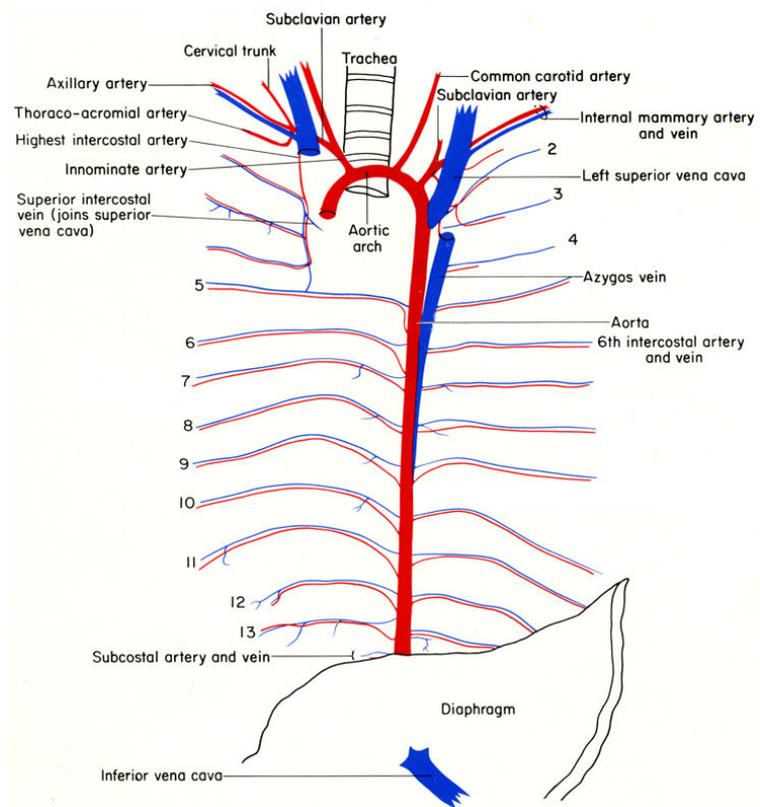
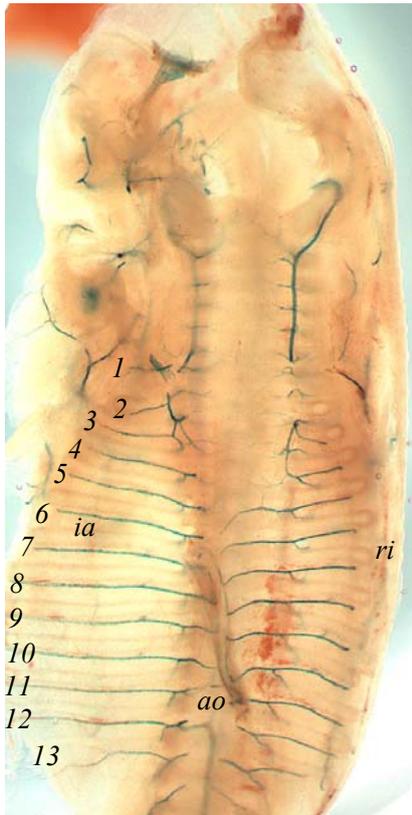


Abbildung 91: Diese Einblicke in einen seziierten **E14**-Embryo mit homozygotem KO für *TRIM46* zeigen in der *lacZ*-Färbung deutlich die von der Aorta abzweigenden **intercostalen Arterien (ia)**, die entlang den Rippen (*ri*) verlaufen. Die Venen (*ve*) sind in der Vergrößerung parallel zu den Arterien erkennbar, allerdings ohne Blaufärbung. Die Aorta (*ao*) hat sich inzwischen parallel zur Körperachse ausgerichtet, wohin sie von der linken Seite gewandert ist. Das **Diaphragma (di)**, auch Zwerchfell genannt, trennt den Brustraum vom Bauchraum. Die inneren Organe wie Herz, Lunge, Leber, Magen, Niere, etc. wurden hier zur Übersicht entfernt. Das Bild unten rechts zeigt eine Sicht von unten auf den abgetrennten Kopf. **Oesophagus (oe)** und die dahinter liegende **Trachea (tr)** sind im Querschnitt zu erkennen und **zeigen keine Blaufärbung**. Das Schema oben rechts stammt aus (Cook 1965).

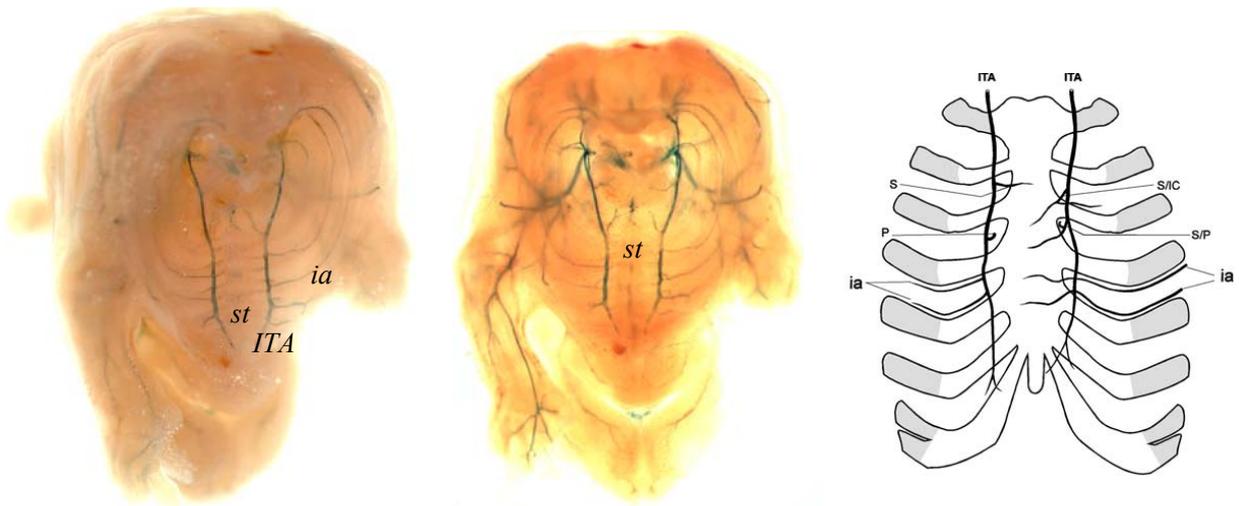
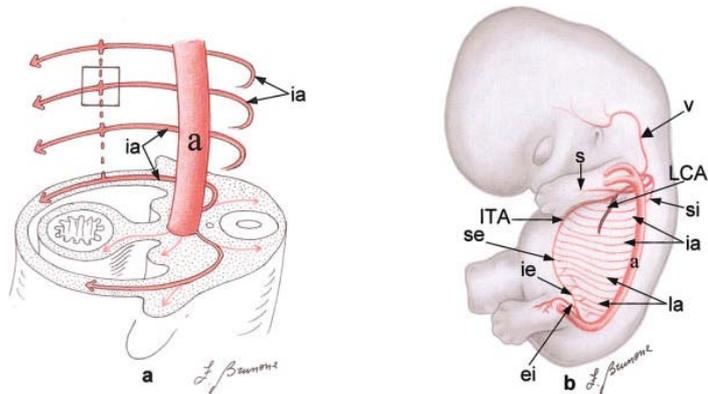


Abbildung 92: Die in Abbildung 91 angefarbten **intercostalen Arterien (ia)** entspringen der Aorta und folgen den Rippen, um in die paarweise angelegte **interne Thoraxarterie (ITA)** zu münden. Sie enden also weder in einem Kapillarbett noch per Anastomose in Venen. Die interne Thoraxarterie versorgt das **Sternum (st, Brustbein)** mit Blut. In dem homozygoten *TRIM46-KO* ist die interne Thoraxarterie ebenso mit *lacZ* angefarbt. Gezeigt ist ein cross durchtrennter **E14-Embryo** mit Blick von unten aus dem Brustkorb nach vorne oben auf die Rippen und Gefäße von innen. Neben den Arterien findet sich **im Sternum selber** eine punktuell **diffuse Blaufärbung**. Das Schema oben rechts stammt aus (M. Gupta 2002), die beiden Zeichnungen darunter aus (F. Barberini 2004).



Neben den Arterien findet sich **im Sternum selber** eine punktuell **diffuse Blaufärbung**. Das Schema oben rechts stammt aus (M. Gupta 2002), die beiden Zeichnungen darunter aus (F. Barberini 2004).

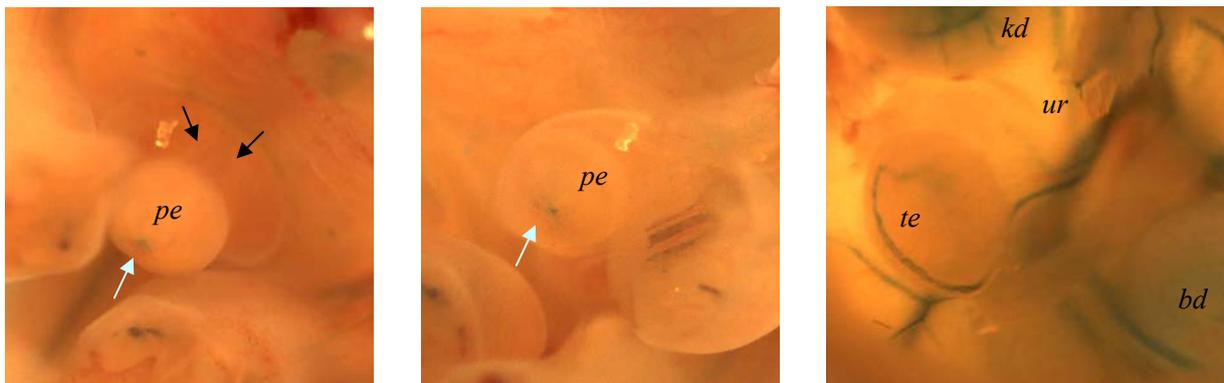


Abbildung 93: Im **Penis (pe, links und Mitte)** sowie **Hoden (te, rechts)** zeigt sich im **E14-Embryo** mit homozygotem *TRIM46-KO lacZ*-Färbung. Dabei ist im Penis der **Ausgang des Harnsamenleiters blau** zu erkennen (heller Pfeil). Die **Penisarterien** scheinen durch (dunkle Pfeile). Beim Hoden hingegen ist nur die Arterie mit beim genauen Hinsehen erkennbaren Blutspuren zu sehen, der **Samenleiter (Vas deferens) zeigt keine Färbung**. Die Anfärbung des Harnsamenleiters im Penis lässt sich also nicht durchgängig zum Hoden zurückverfolgen. Wohl aber sind der Harnleiter vom Penis zur Blase (*bl*) sowie die Urether (*ur*) von den beiden Nieren (*kd*) zur Blase blau angefarbt. Die Blaufärbung des Harnsamenleiters im Penis ist somit auf den Beitrag seitens des Harnleiters zurück zu führen.

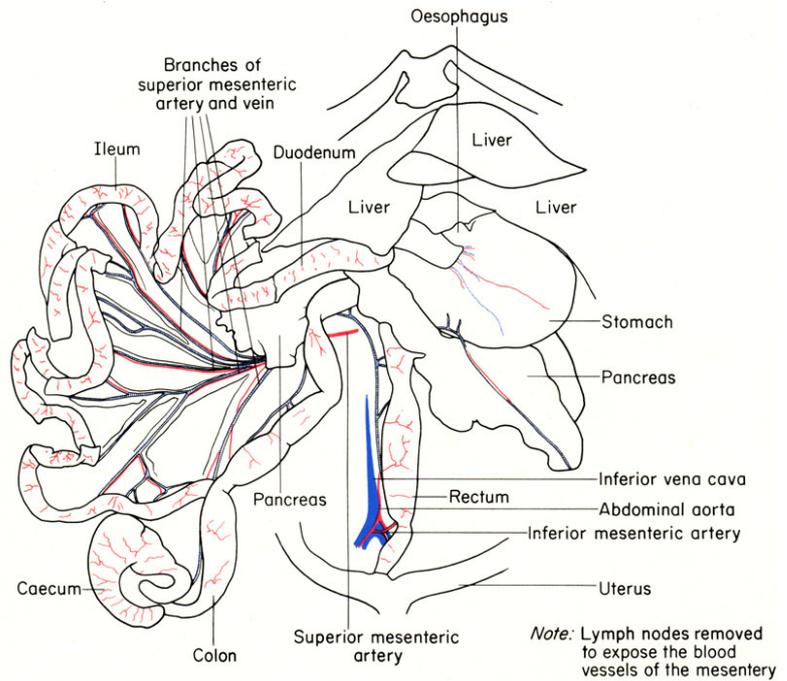
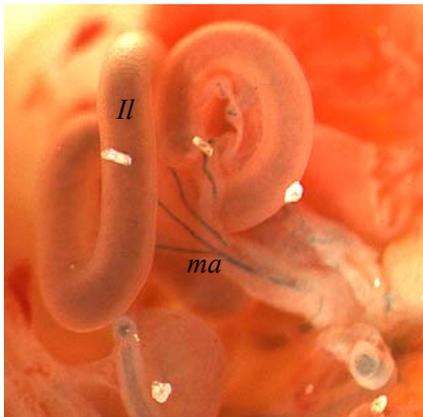


Abbildung 94: In diesem Embryo des Stadiums **E15** mit homozygotem *TRIM46*-KO sind die **mesenterischen Arterien** (*ma*), die den **Darm** (*II*) mit Blut versorgen, durch *lacZ* blau angefärbt. Zudem zeigt das **Endothel des Darmes** (*de*) selber eine Blaufärbung. Diese muss auf *TRIM46*-Expression zurückzuführen sein, da Bakterien, die ebenfalls β -Galactosidase exprimieren und im Darm heimisch sind, erst nach der Geburt dort hin gelangen können. Zudem würden sie im Querschnitt das Darmlumen und nicht das Epithel des Darmes selber färben lassen. Der Oesophagus zum Magen hin zeigte noch keine Blaufärbung seines Endothels (siehe Abbildung 91 und Abbildung 89). Diese tritt im Verdauungstrakt also erst ab dem Darm auf, das hauptsächlich Resorption der Nahrung betreibt. Man beachte noch die punktuelle Blaufärbung an der **Schwanzspitze** (*tt*) im Bild unten links. Das Schema oben rechts stammt aus (Cook 1965).

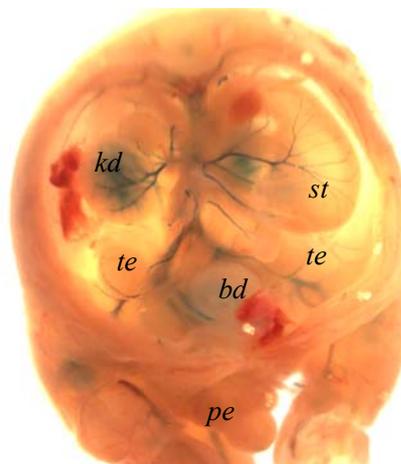


Abbildung 95: Das Bild links zeigt den isolierten Magen (*st*), in dessen Endothel keine *lacZ*-Färbung vorliegt. Wohl aber sind die ihn versorgenden Arterien angefärbt. Im Bild rechts ist der Magen in seiner natürlichen Lage in der Bauchhöhle zu sehen. Darm und Leber sind hier zur Übersicht entfernt. Niere (*kd*), Hoden (*te*), Blase (*bd*), Penis (*pe*). **E15**-Embryo mit homozygotem *TRIM46*-KO.

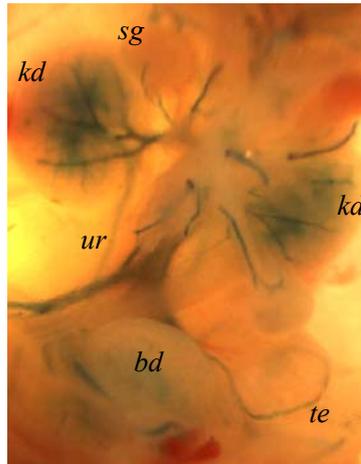
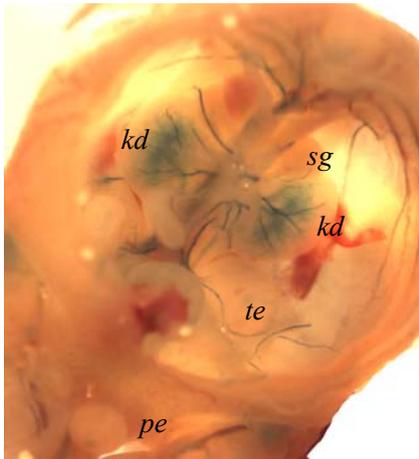
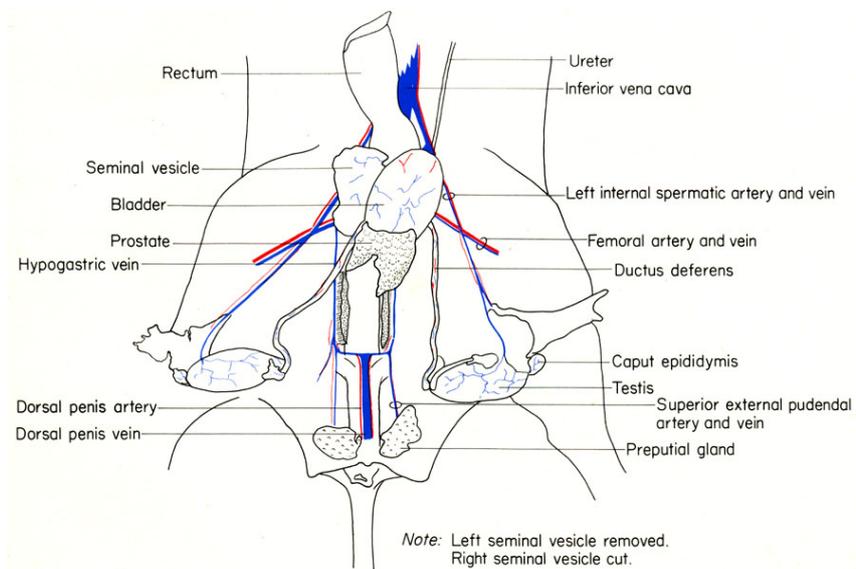
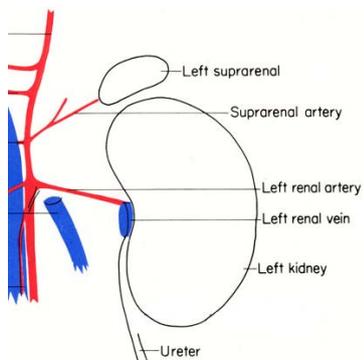
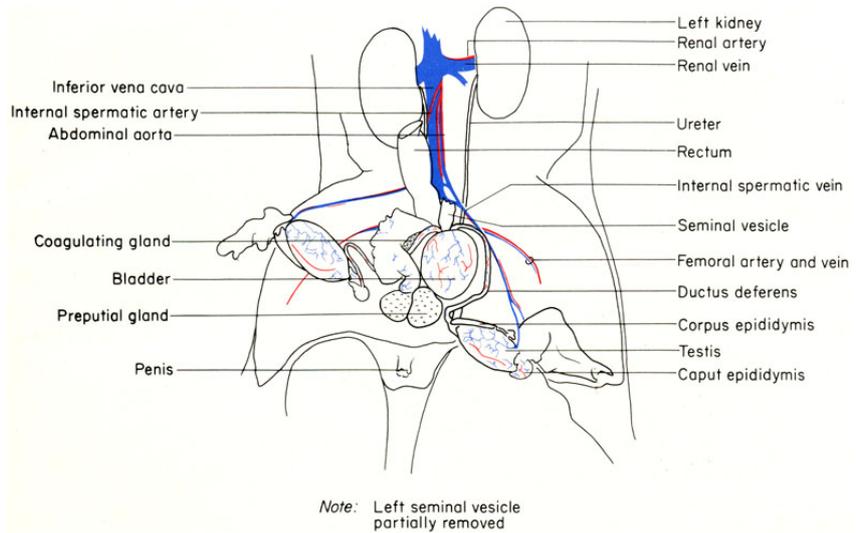


Abbildung 96: Die Abbildungen zeigen das Urogenitalsystem in unterschiedlichen Vergrößerungen in einem homozygoten *TRIM46-KO* des Stadiums **E15**. Magen und Darm wurden zur Übersicht entfernt. Die **Nierenarterien** sind deutlich zu erkennen. Neben ihren Aufzweigungen ist in den Nieren noch eine andere verzweigte und ebenfalls gefärbte Struktur zu erkennen, aus der der **Urether** (*ur*) hervorgeht. Im Gegensatz zu den Arterien ist dieser blasser gefärbt. Die Nebennierenrinde (*sg*) ist nicht gefärbt, nur eine Arterie dorthin. Aus dem Inneren der **Blase** (*bd*) schimmert in Fortsetzung des Urethers eine blasser Blaufärbung durch. Die Schemazeichnungen stammen aus (Cook 1965).



TRIM46 im Whole-Mount-Gehirn verschiedener Entwicklungsstadien

Wie in dem Abschnitt zuvor zu sehen, zeigt das eigentliche Gehirngewebe bis zum Stadium E13 keine *lacZ*-Färbung von homozygoten Mausembryonen mit *TRIM46*-KO, nur die Arterien des Kopfes und für die Hirnversorgung sind markiert. Dies ändert sich ab Stadium E14, wo allmählich erste *lacZ*-Färbungen an der Gehirnoberfläche und im seziierten Inneren auftreten. Die Expressionsintensität zeigt einen zeitlichen Verlauf von Zunahme in bestimmten Regionen mit anschließender Abnahme. Insbesondere die Blutgefäße zeigen in älteren Stadien keine *lacZ*-Färbungen mehr, wohingegen bestimmte Hirnstrukturen wie der Hippocampus *lacZ*-gefärbt bleiben und andere Bereiche zwar an Intensität verlieren, jedoch an Ausdehnung zunehmen.

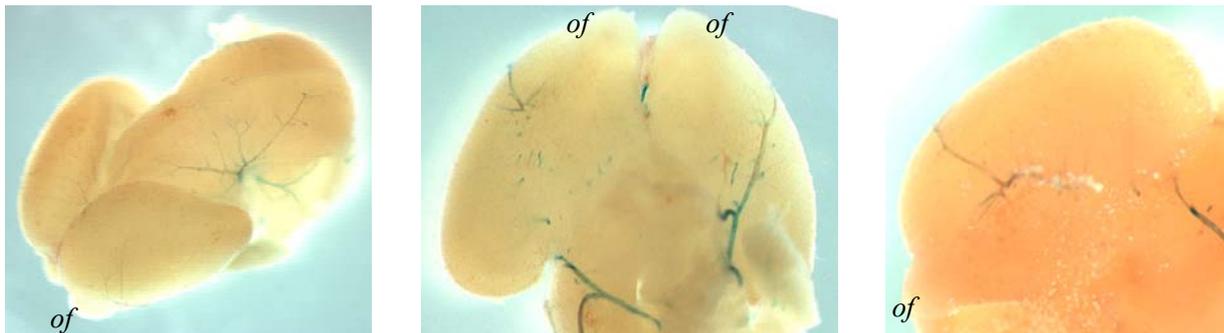


Abbildung 97: Bis zum Stadium **E13** zeigen die **Gehirne** homozygoter *TRIM46*-KO Embryonen **noch keine *lacZ*-Färbung**, sondern nur Blaufärbung der Hirnarterien. Ansichten jeweils von oben, unten und der Seite. Olfaktorischer Bulbus (*of*).

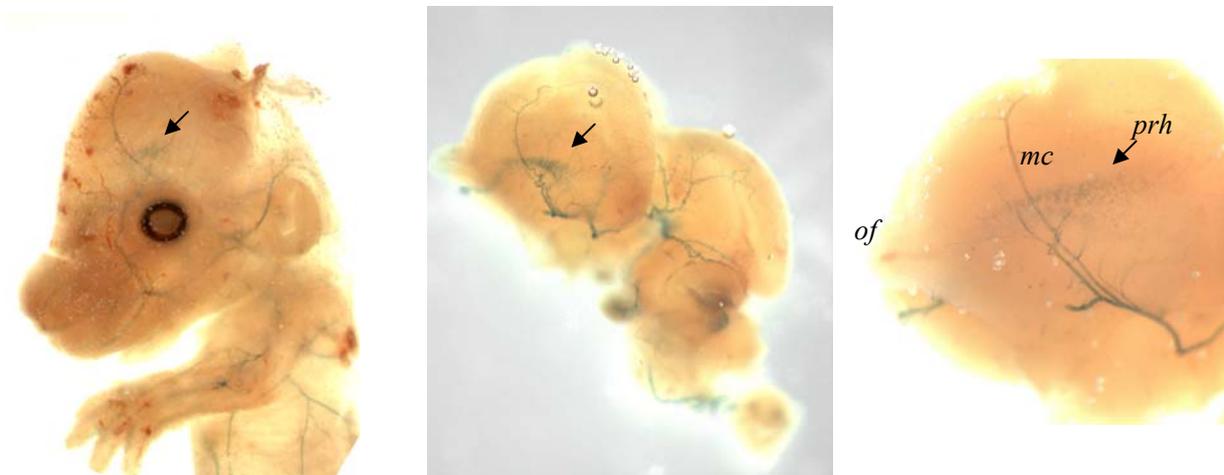


Abbildung 98: Ab Stadium **E14** zeichnet sich eine *lacZ*-Färbung auch in dem Gehirngewebe selber ab, zuerst von außen zu erkennen (Pfeil) ist der **perirhinale Cortex (*prh*) gefärbt**. Im linken Bild schimmert diese Färbung durch den Kopf eines Embryos durch, die anderen Bilder zeigen das entnommene Gehirn von der Seite in verschiedenen Vergrößerungen. Mittlere cerebrale Arterie (*mc*).

Abbildung 99: Im Stadium **E15** werden weitere Bereiche des Hirngewebes angefärbt. Deutliche Expression zeigt sich im **perirhinalen Cortex (prh)**, dem **Plexus Choroideus (PCh)** und der **Epi-physe** (Pfeil).

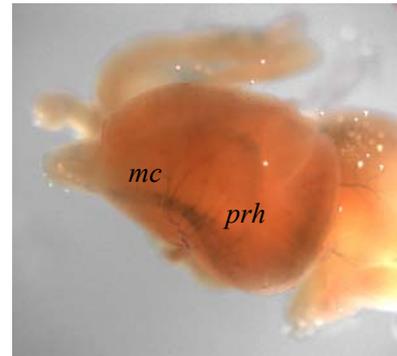
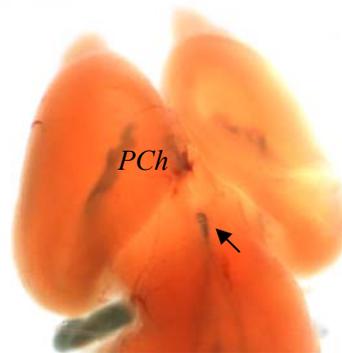


Abbildung 100: **Adulte Gehirne mit homozygotem TRIM46-KO vor der lacZ-Färbung** lassen die Blutgefäße deutlich erkennen. Dabei verlaufen die Arterien unterhalb bis seitlich des Gehirnes, wohingegen auf der Oberseite die Venen das Blut wieder aufnehmen. Neben den Gefäßen treten auf der Hirnoberfläche der Unterseite (oben) der Nervus olfactorius (*no*) sowie die beiden Nervi optici (*op*, einer bei Präparation abgetrennt) deutlich in weiß hervor, was im Embryo noch nicht so intensiv zu erkennen ist. Die Schemazeichnungen stammen aus (Cook 1965).

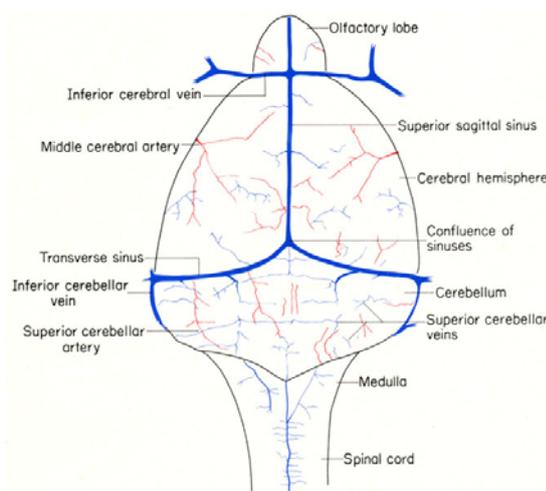
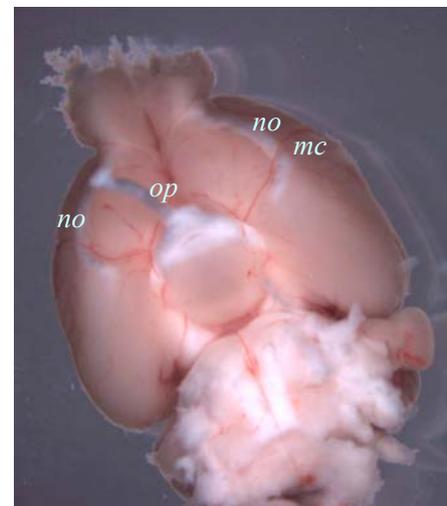
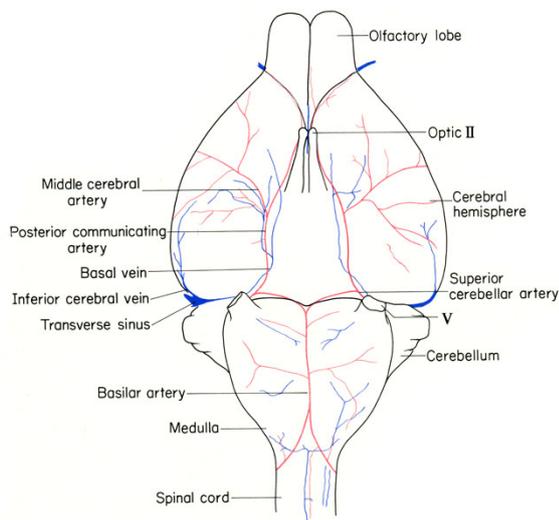


Abbildung 101:
Adultes Gehirn von *TRIM46*-KO vor (links) und nach der *lacZ*-Färbung. Die Blutgefäße zeigen keine Färbung mehr, der perirhinale Cortex schimmert noch in Blassblau durch die verdickten Hirnhäute.

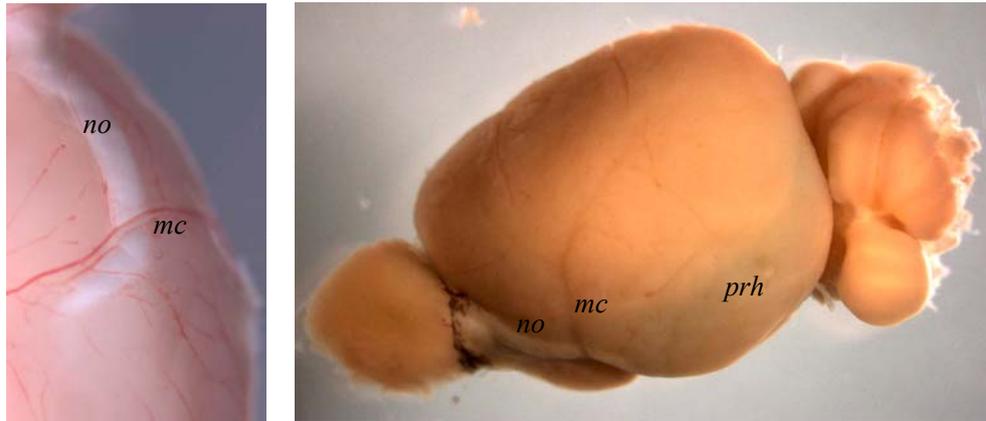
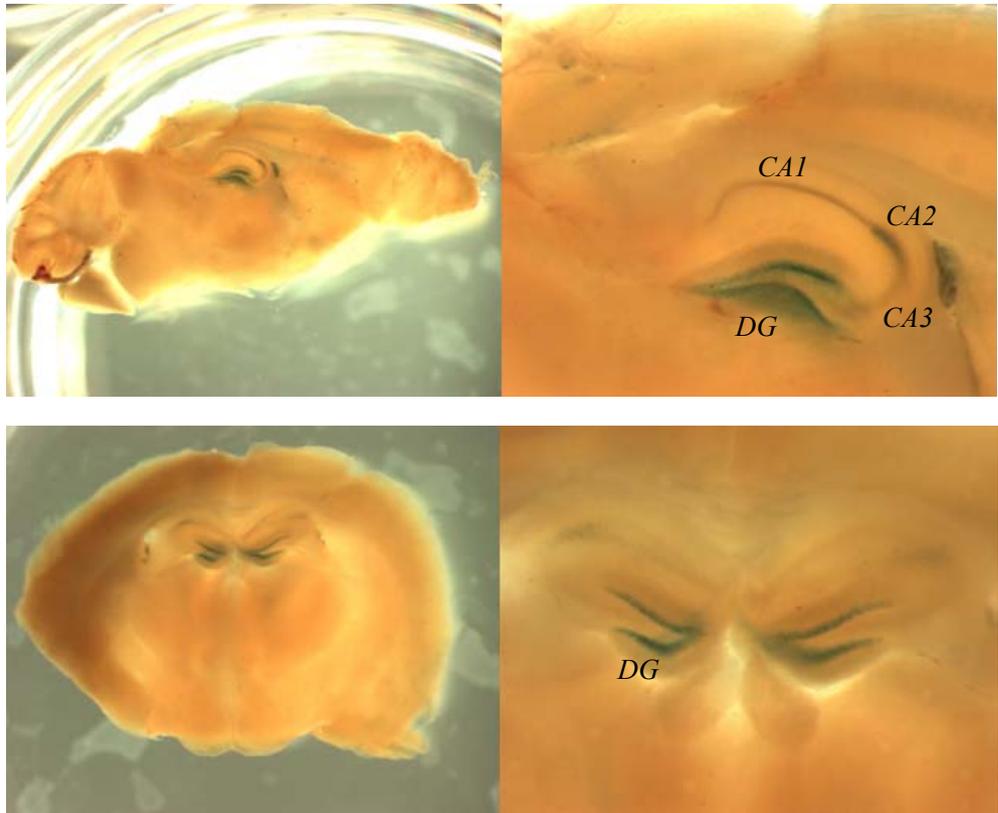


Abbildung 102:
Seziert man die adulten mit *lacZ* gegen *TRIM46*-KO gefärbten Gehirne, so zeigt sich Färbung nur im Hippocampus, dort im Dentate Gyrus (*DG*) und der Region *CA2*. Obere Reihe sagittal geschnitten, unten quer, rechts die jeweiligen Vergrößerungen.



Genaue Lokalisation der *TRIM46*-Expression im Gehirn mittels ISH und *lacZ*-Färbungen auf Schnitten

Histologische Schnitte von Maus-Gehirnen erlaubten eine detailliertere Kartierung der Expressionsgebiete mittels ISH in heterozygoten *TRIM46*-KO oder Wildtypen und *lacZ*-Färbungen in homozygoten *TRIM46*-KO. Zwischen Wildtypen und homozygoten *TRIM46*-KO konnten dabei keine Veränderungen in den Expressionsgebieten festgestellt werden. Zu der in den *Whole-Mounts* offensichtlich gewordenen Expression im Hippocampus konnten hier weitere Gebiete mit *TRIM46*-Expression festgestellt werden, da diese histologischen Färbungen empfindlicher sind. Hier sind insbesondere die Amygdala, Purkinje-Zellen im Cerebellum und die Schichten 5 und 6 im Cortex zu nennen. Daraus lassen sich Anhaltspunkte für weitere Analysen zu der Funktion von *TRIM46* gewinnen wie z.B. Verhaltenstests auf Motorkoordination (Cerebellum) oder bezüglich des Angstverhaltens (Amygdala) zusätzlich zu dem Augenmerk auf den Hippocampus (Lernen und Gedächtnis). Dazu mehr in der Diskussion.

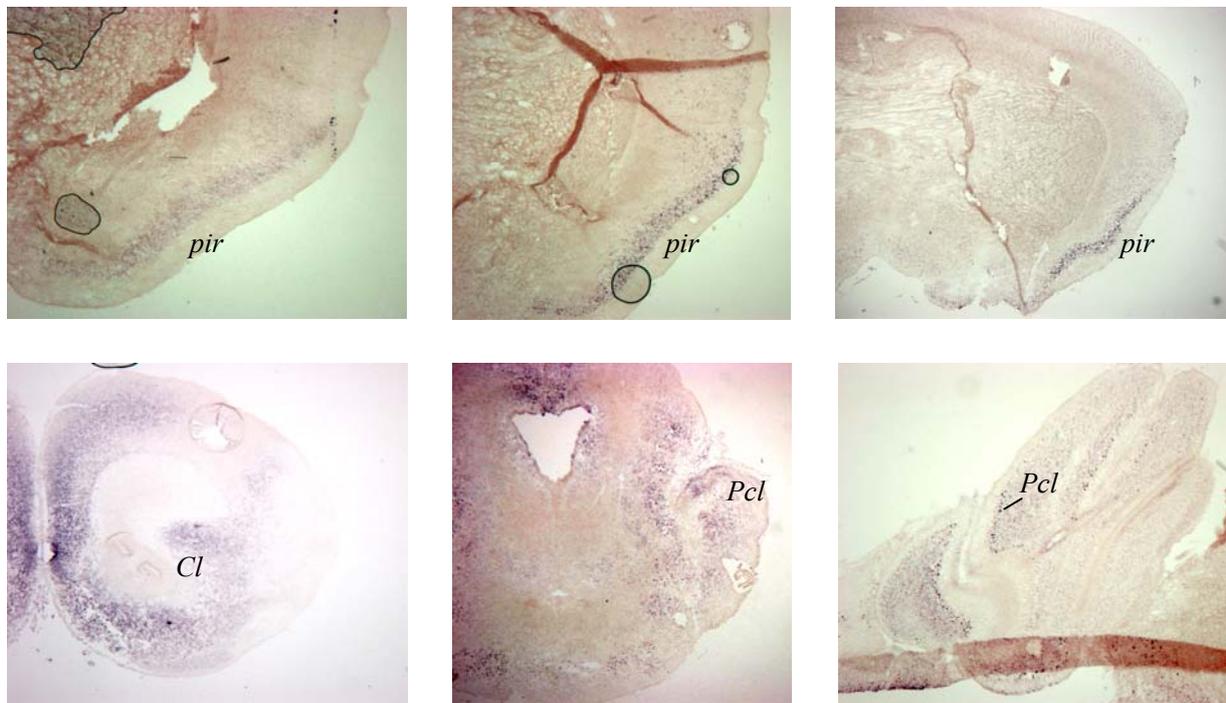
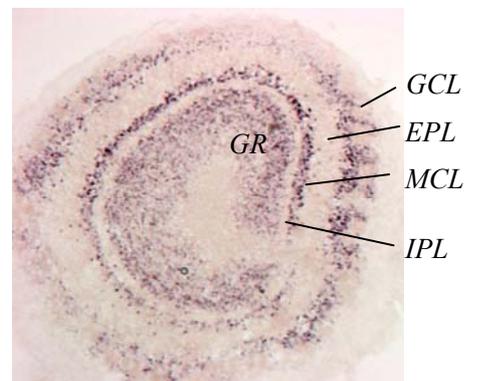


Abbildung 103: **In-situ-Hybridisierungen** von Wildtyp-Gehirnen des Stadiums **P8** mit einer komplementären RNA-Sonde gegen die *TRIM46*-mRNA. Deutliche Signale sind zu erkennen im **piriformen Cortex** (*pir*), **Clastrum** (*Cl*), **Purkinje-Zellschicht** (*Pcl*) im Cerebellum, **molekulare Schicht** (*ML*) im Cerebellum, **Zellschichten im olfaktorischen Bulbus** (*GCL* – glomerular cell layer, *EPL* – external plexiform layer, *MCL* – mitral cell layer, *IPL* – internal plexiform layer, *GR* – granular layer). Die Schnittebene ist in allen Fällen wieder coronal. Zum Vergleich mit den Negativ-Kontrollen der sense-Proben siehe Abbildung 128.



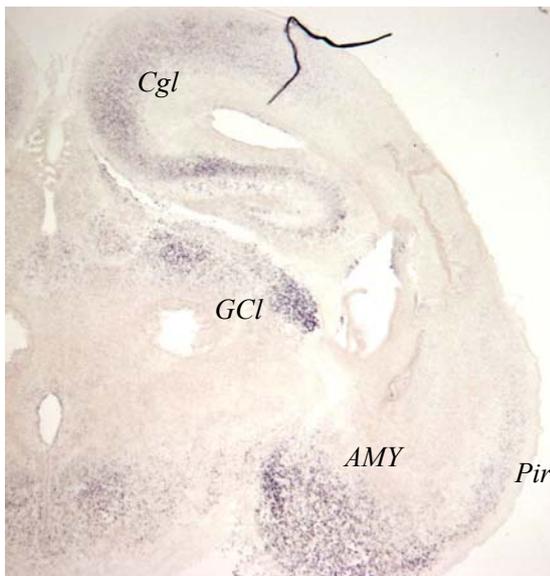
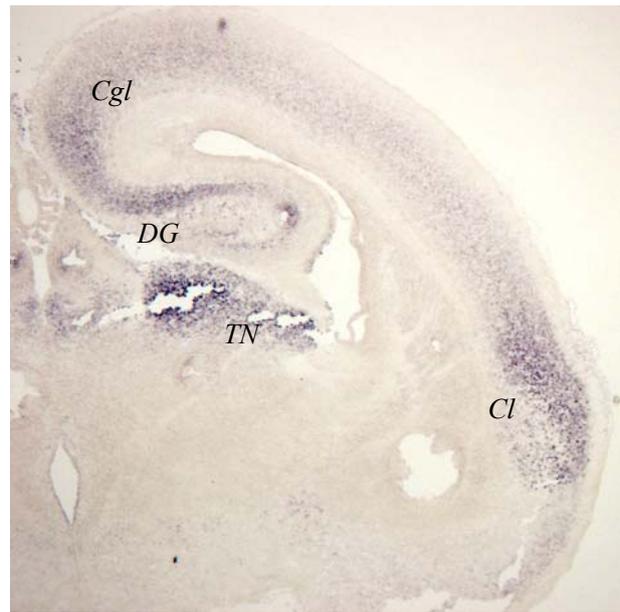
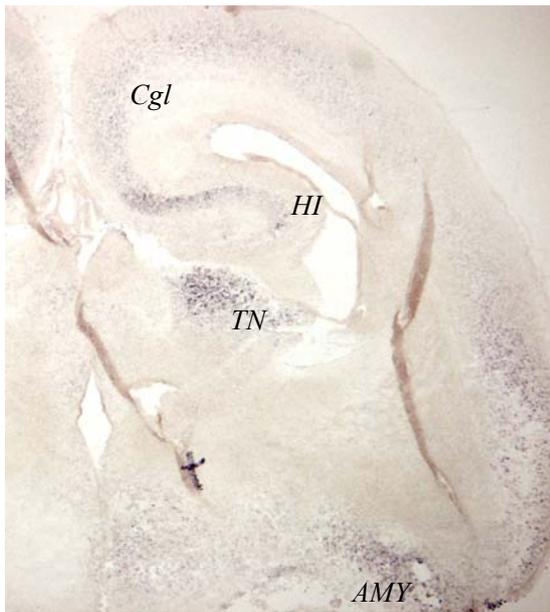
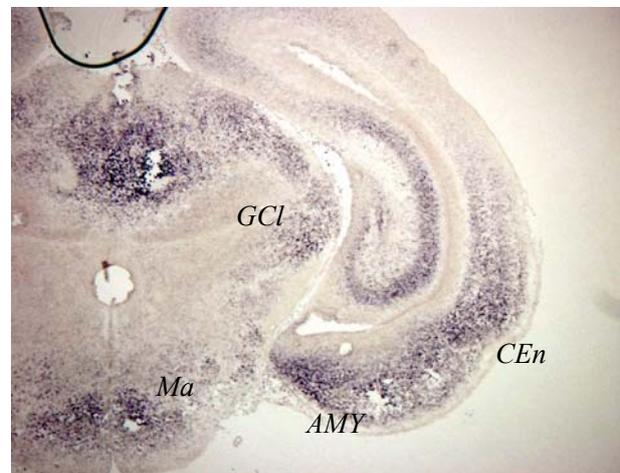


Abbildung 104: **In-situ-Hybridisierungen** von **Wildtyp-Gehirnen** des Stadiums **E18** mit einer komplementären RNA-Sonde gegen die **TRIM46**-mRNA. Die Schnittebene ist hier coronal (cross), die Bildreihe von vorne nach hinten. Deutliche Signale zeigen sich im **Hippocampus (HI)**, **Dentate Gyrus (DG)**, **Amygdala (AMY)**, **thalamischer Nucleus (TN, lateraler und ventraler Teil)**, **cingularer Cortex (Cgl)**, **entorhinaler Cortex (CEn)**, **piriformer olfaktorischer Cortex (CPf)**, **mammilarischer Nucleus (Ma)**, **dorsales und ventrales Corpus geniculatum laterale (GCl)**, **Clastrum (Cl)**.



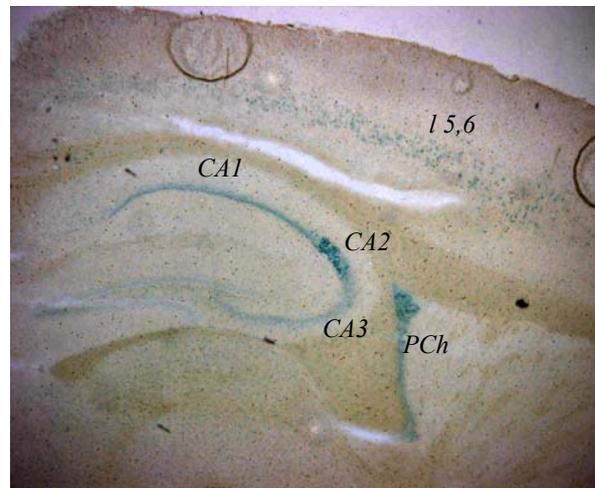
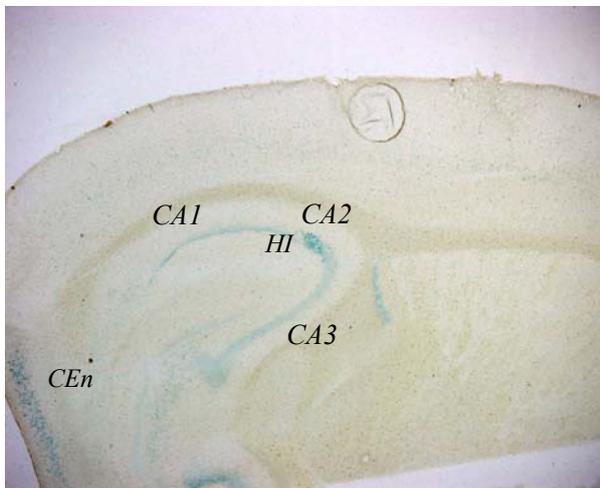
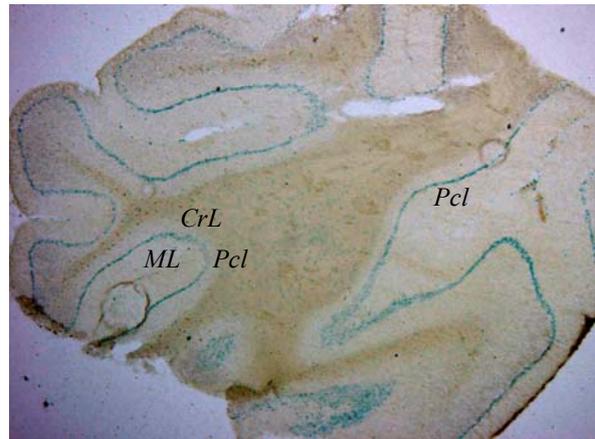
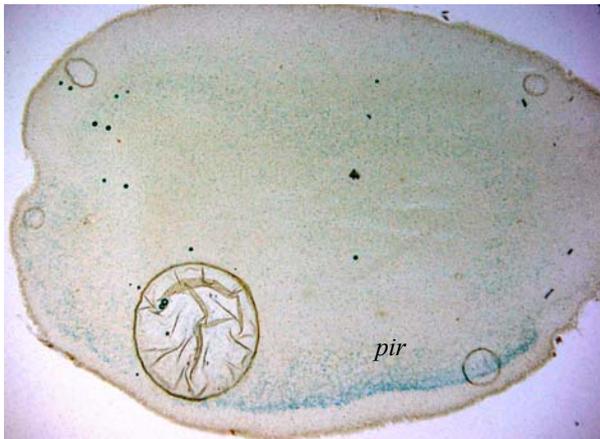
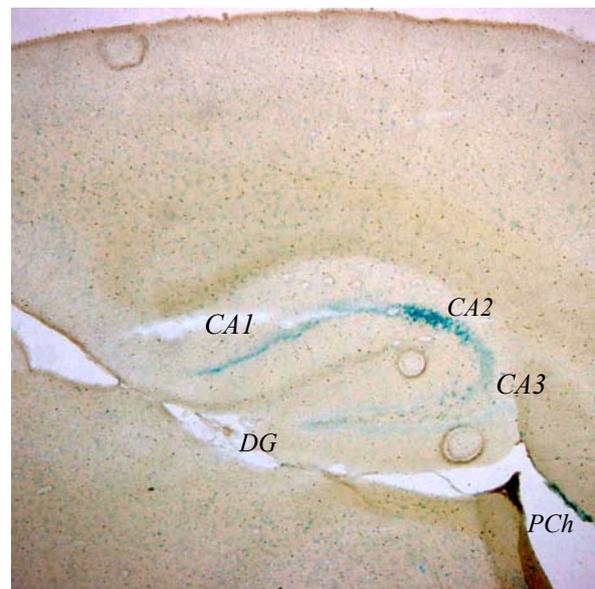


Abbildung 105: *lacZ*-Färbung an 30 µm dicken sagittalen Mikrotom-Schnitten eines **adulten Gehirnes** einer 2 Monate alten Maus. Mit **homozygotem TRIM46-KO**. Das Bild oben links zeigt Färbung im **piriformen Cortex (pir)**. Rechts daneben Färbung der **Purkinje-Zellschicht (Pcl) im Cerebellum**. Die drei unteren Bilder zeigen Expression von *TRIM46-KO* im **Hippocampus (HI)**, mit besonders starker Expression im Gebiet **CA2**, sowie in **Schichten des Cortex (l 5,6)**. Zusätzlich findet sich im ganzen Cortex punktuell verteilte Blaufärbung. Ferner sind noch angefärbt der **Plexus choroideus** des lateralen Ventrikels (*PCh*), der **entorhinale Cortex (CEn)** und der **Dentate Gyrus (DG)**. *ML*: Molecular Layer. *CrL*: Granular Layer.



Genaue Lokalisation der *TRIM46*-Expression im Embryo mittels *lacZ*-Färbungen auf Schnitten

Wie in dem Abschnitt zuvor am Gehirn gezeigt sollten histologische Färbungen an anderen Geweben ebenso feinere Details in der Expression von *TRIM46* offenbaren. Hinzu kamen Immunfärbungen und der Vergleich zur Expression bekannter Markerproteine. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Gewebe sind im Folgenden aufgeführt.

Arterien

Das *TRIM46*-Gen ist im Gefäßsystem exprimiert. Um die Lokalisation präziser einzukreisen, wurden Doppelfärbungen gegen Markergene für bestimmte Gefäßtypen wie Arterien, Venen und Lymphgefäße sowie für Zelltypen innerhalb dieser wie Endothelzellen oder Perizyten unternommen.

Einen ersten Eindruck konnte man von *lacZ*-Färbungen gegen die transgen im Genlocus von *TRIM46* exprimierte β -Galactosidase gewinnen. Durch morphologischen Vergleich konnte die Expression in Arterien statt in Venen festgestellt werden. Die Wände von Arterien sind viel dicker als die der Venen und zeigen im Querschnitt eine verzertere Form statt der eher rundlichen von Venen.

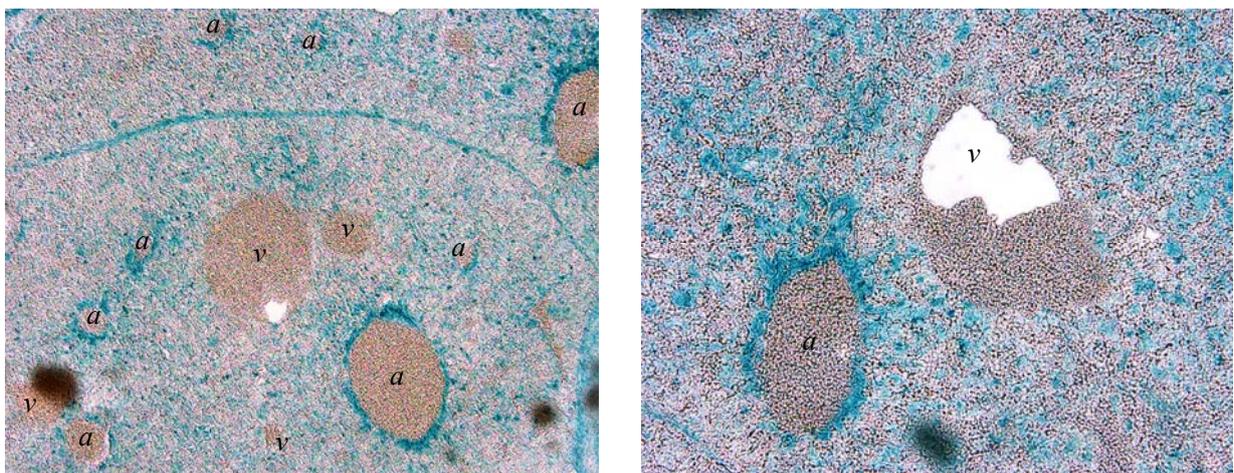


Abbildung 106: **Arterien (a) und Venen (v) in der Leber** im Querschnitt zeigen deutlichen Unterschied in der *lacZ*-Färbung gegen *TRIM46*-Knock-out in homozygoten E14-Mausembryonen. Die **Wände der Arterien** sind für *TRIM46*-Expression **positiv**, während das in den **Venen nicht** so ist. In den Gefäßen sind die roten Blutkörperchen noch gut erhalten.

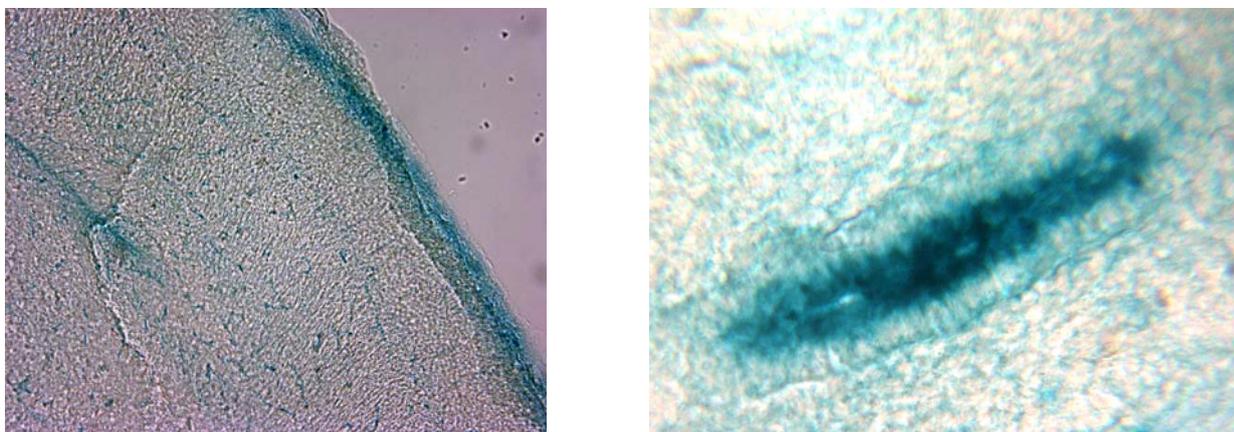


Abbildung 107: Diese *lacZ*-Färbungen zeigen auf der linken Seite in geringer Vergrößerung einen **Schnitt durch das Gehirn eines E14-Mausembryos mit vielen kleinen blau gefärbten Gefäßen**. Auf der rechten Seite ist ein einzelnes sagittal geschnittenes Gefäß stark vergrößert. Man erkennt die **Lokalisation der *TRIM46*-Expression im dem Gefäßlumen zugewandten Endothel**, nicht hingegen in der äußeren Wand. Die mehrschichtige Strukturierung deutet abermals auf eine Arterie statt einer Vene hin.

Der morphologisch begründete Eindruck der Expression in Arterien wird bestätigt durch Ko-Lokalisierung mit Markerproteinen für Arterien wie *VEGFR2*, einem Membranrezeptor für *VEGF* in Arterien, *Collagen IV*, welches in der dicken Basalmembran von Arterien vorkommt, und der komplementären Expression zu Markerproteinen für Venen wie *Neuropilin-2*.



Abbildung 108: Die *lacZ*-Färbung zeigt wieder *TRIM46*-Expression in Endothelzellen von Arterien und insbesondere Ko-Lokalisierung mit *VEGFR2*, das hier durch Antikörper einmal in Rot und einmal in Grün dargestellt wurde auf denselben Schnitten wie die *lacZ*-Färbung. *VEGFR2* ist ein Marker für Arterien und bestätigt somit die anatomische Interpretation der *TRIM46*-Expression in Endothelzellen von Arterien. Das Bildpaar links zeigt einen sagittalen Schnitt durch eine Arterie und das Bildpaar rechts einen Querschnitt. Die unterschiedlichen Farben für *VEGFR2* stammen von verschiedenen verwendeten Sekundärantikörpern. Im Querschnitt sieht man wieder deutlich die Schichtung der Arterienwand und die Lokalisation von *TRIM46* im Endothel.

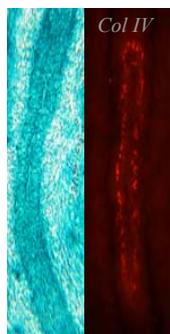


Abbildung 109: Die rote Immunfärbung gegen *Collagen IV* bestätigt weiter die Ko-Lokalisation von der *lacZ*-*TRIM46*-Expression in Arterien, mit allerdings einer anderen Charakteristik als *VEGFR2*. Dieser ist als Membranrezeptor überall auf der Zelloberfläche der Endothelzellen zu finden, wohingegen *Collagen IV* in der Basalmembran vorkommt, die die Zellen der Arterien umgrenzt. Entsprechend fällt die Färbung nicht mit der von *lacZ* für *TRIM46* zusammen, sondern umgrenzt diese.

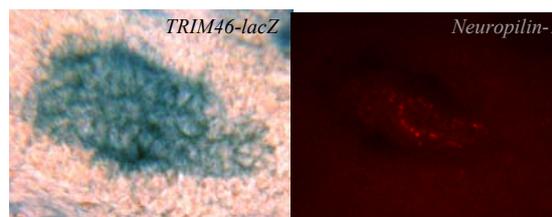


Abbildung 110: Die rote Immunfärbung gegen *Neuropilin-1* ist ein weiterer Marker für Arterien, der mit der *lacZ*-*TRIM46*-Expression zusammenfällt, allerdings nicht in der gleichen Intensität wie *VEGFR2*.

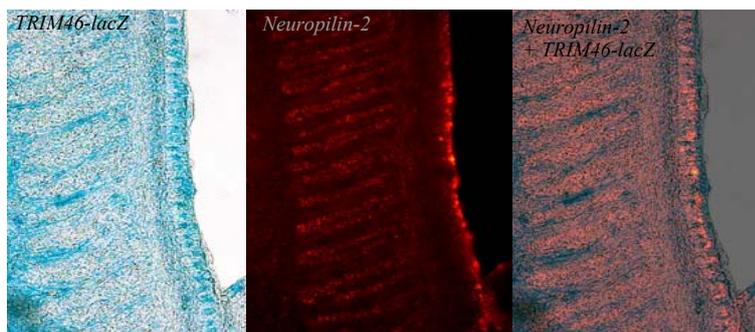


Abbildung 111: Immunfärbung gegen *Neuropilin-2* zeigt im Gegensatz zu den vorherigen Markern eine komplementäre Expression mit *TRIM46*, was konsistent ist, da *Neuropilin-2* ein Marker für Venen ist, der nicht in Arterien vorkommt. Das Bild rechts zeigt eine Überlagerung der beiden Bilder links, so dass die Nichtüberlappung von blauer und roter Färbung deutlicher wird.

Zur weiteren Spezifizierung innerhalb der Arterien wurde mit Antikörpern gegen *PECAM-1* gefärbt.

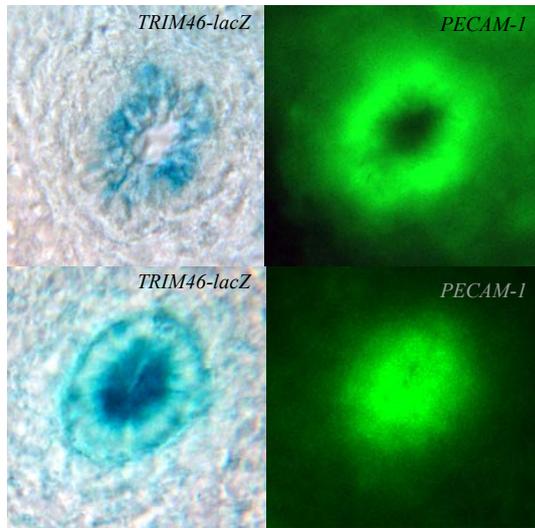
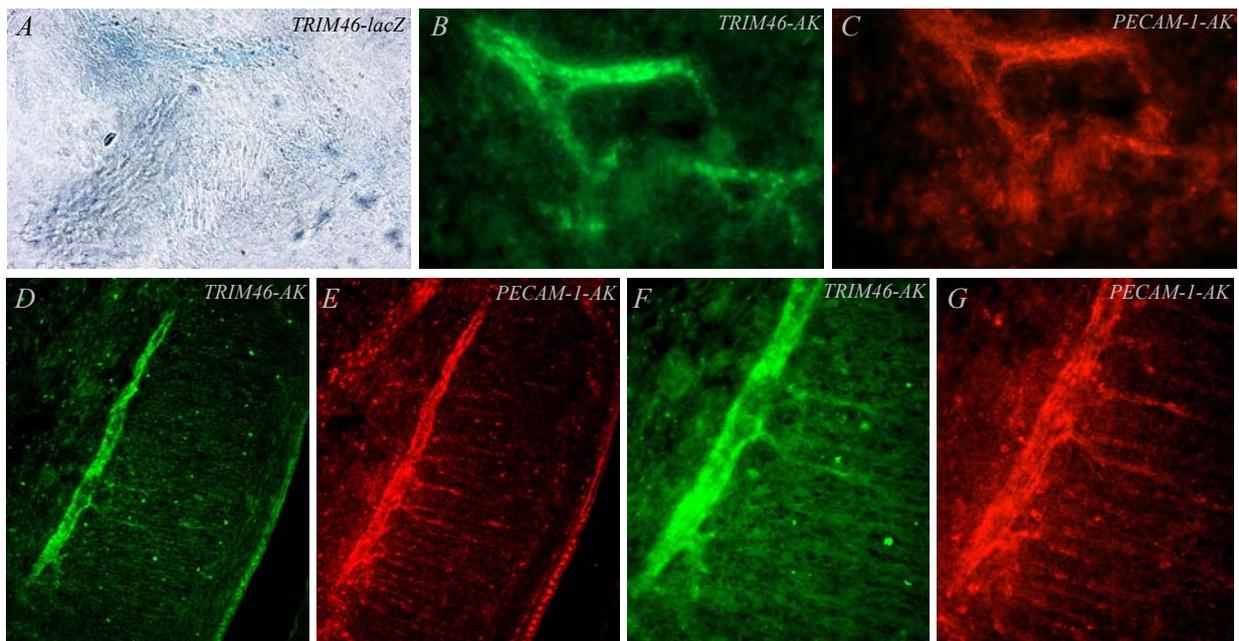


Abbildung 113: Links. Vergleich der blauen *lacZ*-Färbung für *TRIM46*-Expression mit der grünen Immunfärbung gegen *PECAM-1*, einem Marker für arterielle Endothelzellen. Man beachte die verschiedenen Größen der Lumina in den Querschnitten und wie sich die Färbungen jeweils entsprechen.

Abbildung 112: Unten. In **Rot** Immunfärbung gegen *PECAM-1*, einem **Marker für Endothelzellen** von Arterien, hier in geringerer Vergrößerung und im sagittalen Schnitt zur Übersicht (C, E, G). In **Grün** Immunfärbung gegen *TRIM46* (B, D, F) und oben links *lacZ*-Färbung im heterozygoten *TRIM46*-KO (A). *TRIM46* **ko-lokalisiert** also mit *PECAM-1* und ist somit in den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert. Entsprechende Färbungen gegen **Marker von Perizyten**, einem anderen Zelltyp von Arterien, wie *NG2* oder *PDGFR- β* , zeigten **keine gemeinsame Lokalisation**. Auf negative Ergebnisse wurde hier aus Platzgründen verzichtet.



Auf den folgenden Seiten dieses Kapitels sind die Ergebnisse der Immunfärbungen gegen Markerproteine und *lacZ*-Färbungen gegen *TRIM46* für andere Organe und Gewebe aufgeführt. Es zeigt sich eine weitere Spezifität für Endothelien etwa im Innenohr, dem Verdauungstrakt, den Nierentubuli und Bronchien in der Lunge. Auch dort zeigen sich wieder Ko-Lokalisationen mit den schon für Arterienendothel probierten Markerproteinen, aber auch mit weiteren. Diese allgemeinere Spezifität für Endothelien gibt Anlass zu der Frage nach gemeinsamen Eigenschaften dieser Endothelien und einer möglicherweise damit zusammenhängenden Funktion von *TRIM46* dort. Dazu mehr in der Diskussion.

Innenohr

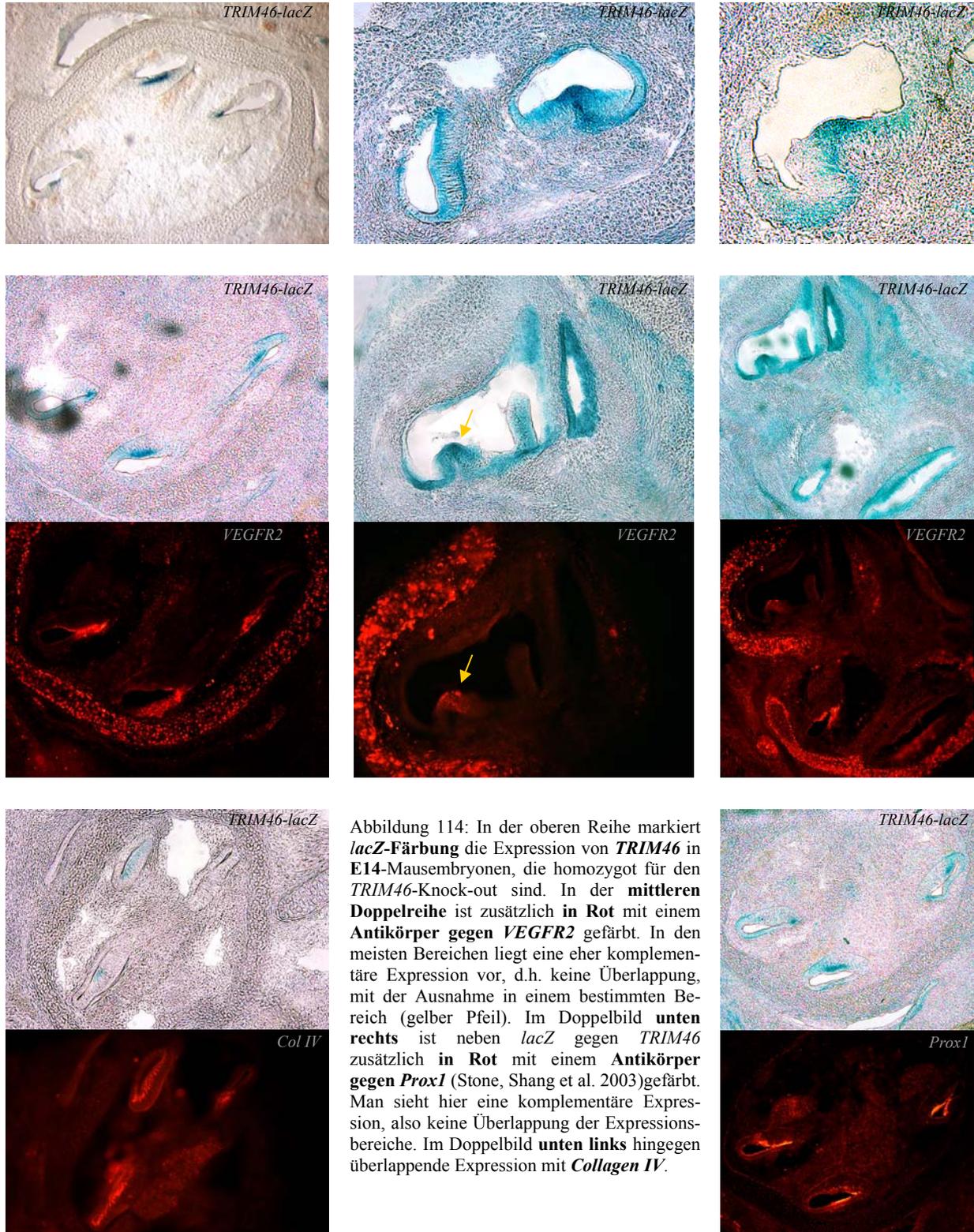


Abbildung 114: In der oberen Reihe markiert *lacZ*-Färbung die Expression von *TRIM46* in E14-Mausembryonen, die homozygot für den *TRIM46*-Knock-out sind. In der **mittleren Doppelreihe** ist zusätzlich **in Rot** mit einem Antikörper gegen *VEGFR2* gefärbt. In den meisten Bereichen liegt eine eher komplementäre Expression vor, d.h. keine Überlappung, mit der Ausnahme in einem bestimmten Bereich (gelber Pfeil). Im Doppelbild **unten rechts** ist neben *lacZ* gegen *TRIM46* zusätzlich **in Rot** mit einem Antikörper gegen *Prox1* (Stone, Shang et al. 2003) gefärbt. Man sieht hier eine komplementäre Expression, also keine Überlappung der Expressionsbereiche. Im Doppelbild **unten links** hingegen überlappende Expression mit *Collagen IV*.

Auge

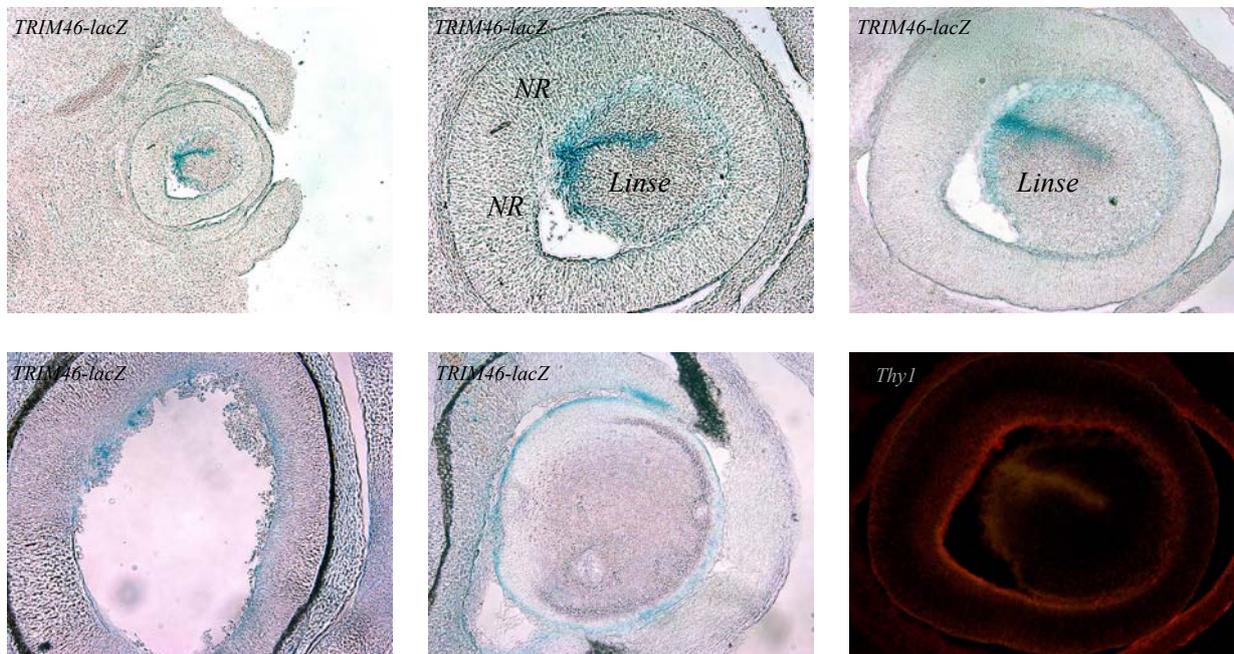


Abbildung 115: Expression von *TRIM46* im Auge von E14-Mausembryonen, sichtbar gemacht anhand *lacZ*-Färbung. Das Bild unten rechts ist eine Immunfärbung gegen das Markergen für retinale Ganglienzellen *Thy1*. Hiermit zeigt *TRIM46* eher keine Überlappung. NR: Neurale Retina.

Magen, Duodenum, Pankreas, Darm

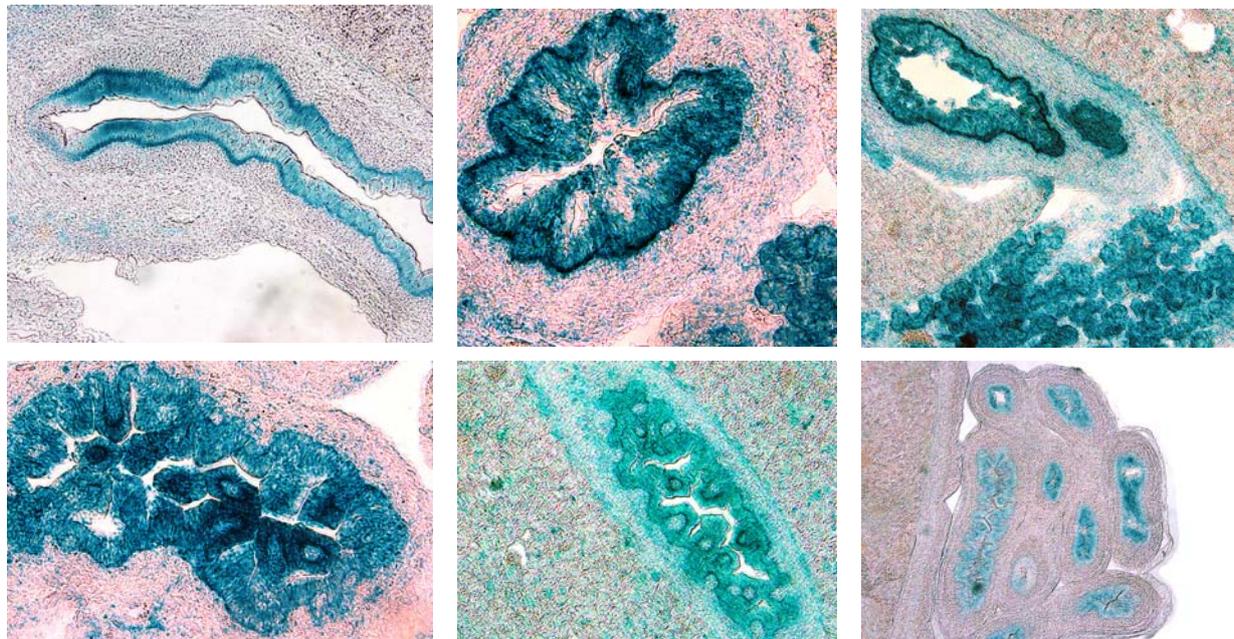


Abbildung 116: In der oberen Reihe sind von links nach rechts die **Magenschleimhaut**, das Endothel des **Duodenums** und im oberen Bild rechts noch mal Duodenum und darunter der **Pankreas** mit *lacZ* gefärbt im homozygoten *TRIM46*-KO. In der unteren Reihe ist die **Darmmucosa** mit den **Darmzotten** gefärbt. Links und Mitte im Längsschnitt, rechts einige Darmschlingen im Querschnitt. Im *Whole-Mount* war im Magen keine Färbung zu erkennen, möglicherweise wegen Diffusionsproblemen (siehe Abbildung 95).

Plexus choroideus

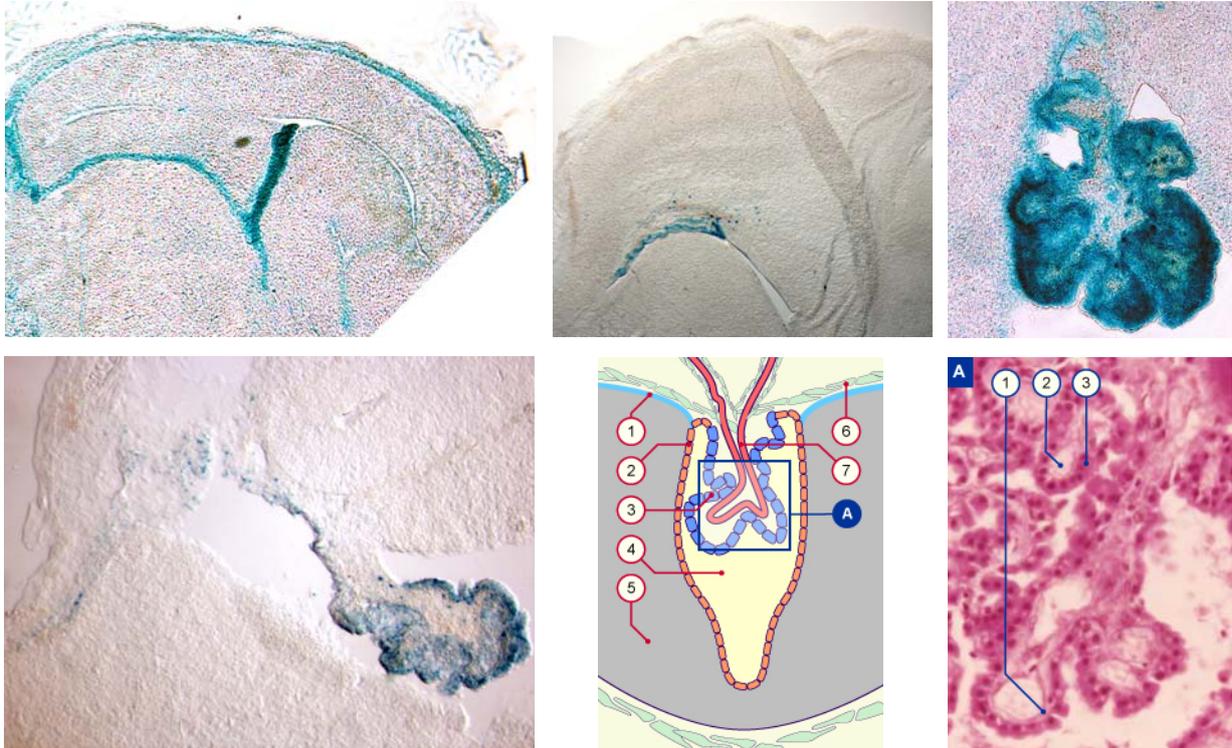


Abbildung 117: Der **Plexus choroideus** ist ein speziell geformtes, zottenreiches **arteriovenöses Gefäßkonvolut** in allen 4 Hirnventrikeln, das für die Produktion von Liquor verantwortlich ist. Die blaue *lacZ*-Färbung zeigt an, dass **TRIM46** im Plexus choroideus **exprimiert** ist und zwar insbesondere **in den Plexusepithelzellen**. Legende der linken Schemazeichnung: 1. Glia Grenzmembran, 2. Ependym, 3. **Plexusepithel**, 4. 3. Ventrikel, 5. Diencephalon, 6. Pia mater, 7. Kapillare. Legende des rechten Schemas: 1. Endothel, 2. Kapillarlumen, 3. Plexusepithel.

Neben der Produktion der cerebrospinalen Flüssigkeit **übernehmen die Plexusepithelzellen** mit ihren „Tight junctions“ die **Funktion der Blut-Hirn-Schranke** in den Ventrikeln, denn die darin verlaufenden Kapillaren haben ein gefenstertes Endothel. So bleibt der extrazelluläre Raum des Gehirns (Liquorraum) komplett vom übrigen Milieu des Blutes im Körper getrennt. Verantwortlich für diese Barriere im Gehirn selbst ist das nicht gefensterte Kapillarendothel der Kapillaren im Gehirn mit „Tight-junctions“, welches durch angrenzende Astrozytenfüßchen induziert und reguliert wird. Die äußeren Liquorräume ihrerseits sind durch das Neurothel (auch mit Tight junctions) der Arachnoidea vom subduralen Raum, welcher außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegt, abgedichtet.

Referenz der Schemabilder: Departement de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg, Pérolles, CH-1705 Fribourg, Suisse.

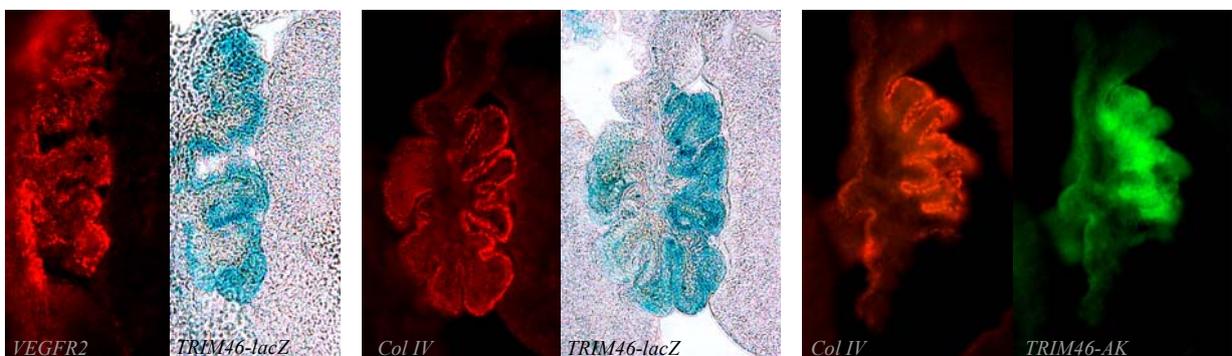


Abbildung 118: Verschiedene **Markergene zeigen Ko-Lokalisation mit TRIM46 in den Plexusepithelzellen**. Links jeweils in Rot Immunfärbungen gegen das Markergene, rechts **TRIM46-Expression mit lacZ** in Blau oder Antikörper in Grün angefärbt. Links außen **VEGFR2**, Mitte und rechts **Collagen IV**.

Niere

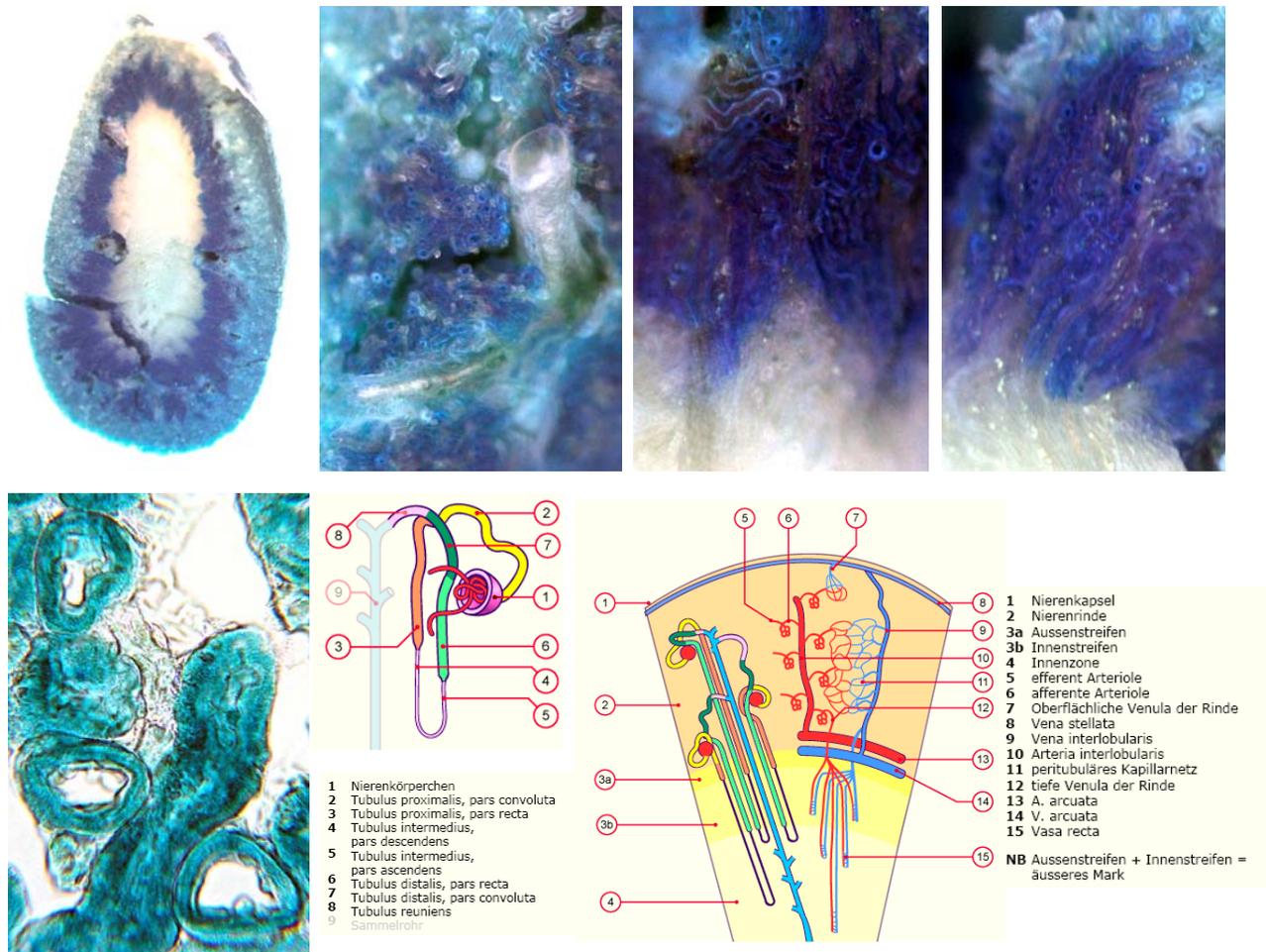


Abbildung 119: (A) Querschnitt einer Niere im Alter von 9 Monaten einer adulten Maus mit homozygotem *TRIM46*-Knock-out. Nach der *lacZ*-Färbung ist die *TRIM46*-Expression auf bestimmte Regionen und Strukturen der Niere beschränkt. So kommt sie nicht vor im Nierenmark, wo die Sammelrohre mit dem Harn darin verlaufen. Die Schemazeichnungen zeigen das Funktionsprinzip der Niere anhand seiner strukturellen Einheit, dem Nephron. Pro Niere gibt es 800.000 bis 1,5 Mio. Nephronen (Mensch), die aus einem vaskulären Teil und einem Nierenteil bestehen. Beide treten in der kugelförmigen Struktur des Glomerulus miteinander in Kontakt, wo das Blut in ein Kapillarnetz übergeht, durch dessen Endothel Wasser und verschiedene Substanzen (z.B. Harnstoff, Kreatinin) abfiltriert werden in die Tubuli. Das Filtrat durchläuft dann einen absteigenden und einen aufsteigenden Teil des Tubulus (Henlesche Schleife), in dem wertvolle Substanzen wie Elektrolyte und Glukose wieder zurückresorbiert werden. Das Nephron endet mit dem Übergang des Filtrates in das Sammelrohr, welches in das Mark in Richtung Urether zieht und selber nicht mehr Bestandteil der Nephronen ist.

Die **Blaufärbung** in der adulten Niere scheint in einem Teil der Nierentubuli lokalisiert zu sein, nicht jedoch in den Sammelrohren. Dies ergibt sich durch die Lokalisation in einem Streifen zwischen Rinde und Mark, wo aufsteigende und absteigende Tubuli verlaufen, während das Sammelrohr in das Mark verläuft und die Glomeruli selber in der Rinde liegen zusammen mit den proximalen Teilen der Tubuli, die schwächer blau gefärbt sind.

Referenz der Schemabilder: Departement de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg, Pérolles, CH-1705 Fribourg, Suisse.

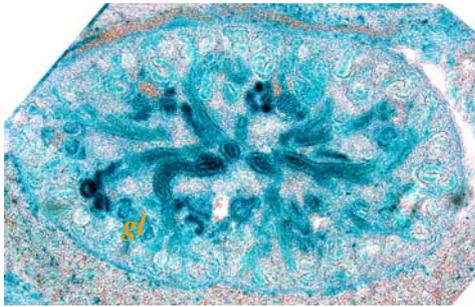


Abbildung 120: Querschnitt einer Niere des Stadiums E14. Hier sind Rinde- und Mark der Niere noch nicht derart ausgebildet und getrennt wie im Adulten und die Nephri noch nicht manifestiert. Besonders stark gefärbt treten die Nierenarterien hervor gefolgt von den sich bildenden Glomeruli (*gl*). In dem Bild kann man den Verlauf des Blutes gut verfolgen. Es strömt in das Organ zentral ein durch die Arteria renalis, die sich in 2 Äste teilt, die sich weiter aufspalten zum Rand hin, wo es in das Kapillarnetz der Glomeruli übergeht. Für die Anatomie der Niere gilt die Regel, dass keine Arterie in das Nierenmark eindringt und keine Vene daraus entspringt.

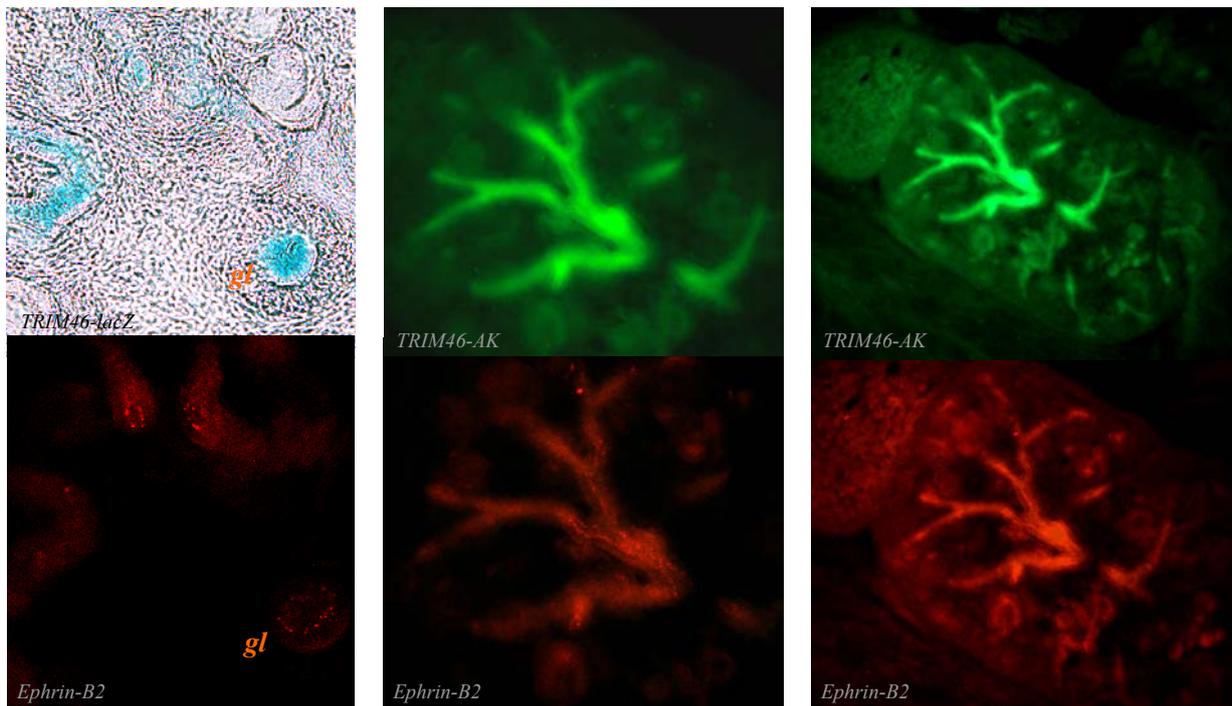


Abbildung 121: Immunfärbung gegen *Ephrin-B2* (rot) zeigt Ko-Lokalisation mit der *TRIM46*-Expression (grün Antikörper gegen *TRIM46*, blau *lacZ*) im arteriellen Gefäßsystem der Niere sowie sich bildenden Glomeruli (*gl*).

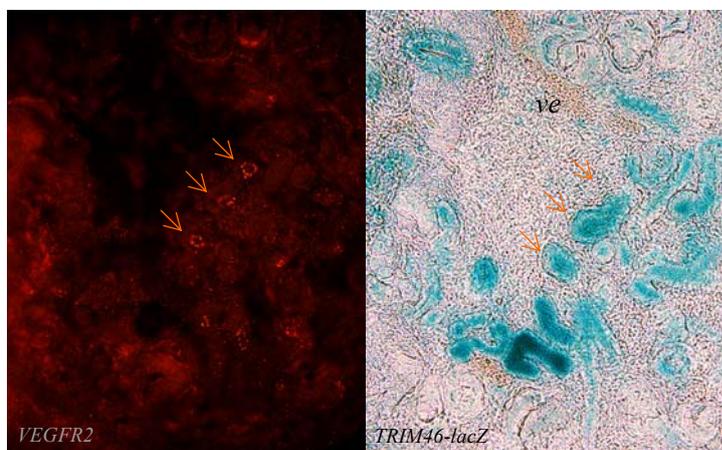


Abbildung 122: Immunfärbung gegen *VEGFR2* (rot) zeigt teilweise Ko-Lokalisation mit der *TRIM46*-Expression (*lacZ* blau) in den Arterien bzw. Arteriolen. Die Immunfärbung scheint nur an den Querschnittstellen der Gefäße deutlich sichtbar zu werden (Pfeile). *ve*: Vene mit Blut.

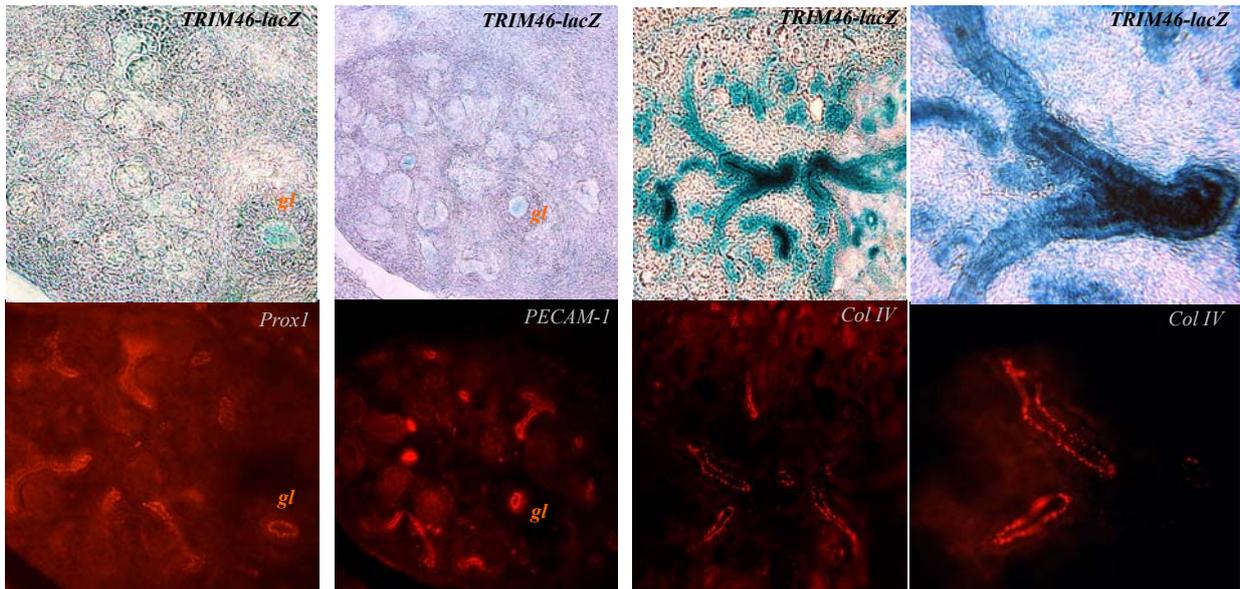


Abbildung 123: Vergleich von *lacZ* des *TRIM46*-KO mit verschiedenen Markerproteinen in der Immunfärbung in Rot. In der Niere liegt eine Ko-Lokalisation mit *Prox1* vor im Gegensatz zu dem Fall im Gefäßsystem allgemein. Die Expression ist in sich bildenden Glomeruli (*gl*) am stärksten. Allgemein ist *Prox1* kennzeichnend für sich bildende Nephronepithelzellen (Zinovieva, Duncan et al. 1996; Welham, Riley et al. 2005). Dort findet sich auch *PECAM-1* wieder. *Collagen IV* ist abermals ein Begleiter der *TRIM46*-Expression in den Nierenarterien.

Harnblase

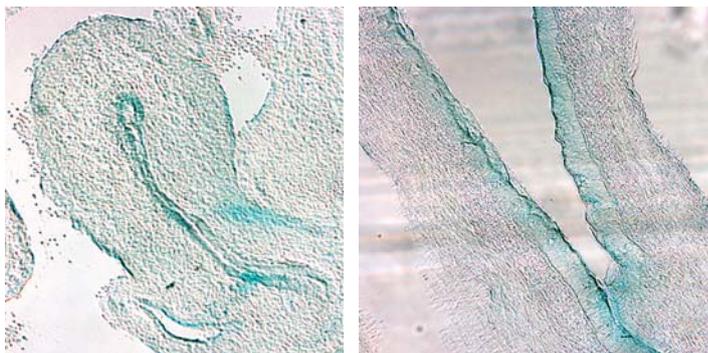


Abbildung 124: Das **Endothel der Harnblase** zeigt eine leichte *lacZ*-Blaufärbung für ***TRIM46*-Expression** im heterozygoten *TRIM46*-Knock-out. Das Epithel erscheint vergleichsweise dick, was daran liegt, dass es sich ausdehnt, wenn die Harnwege voll sind, und dann das Epithel dünner wird. Die Zellen werden platter.

Herz

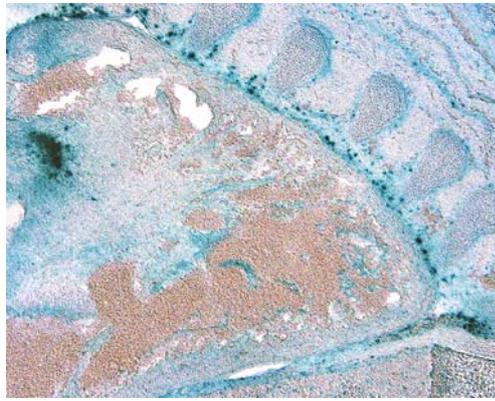
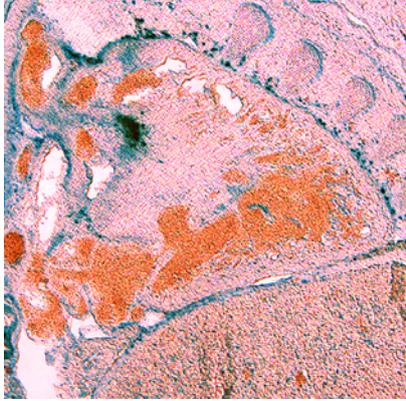


Abbildung 125: Im **Herzen** von Mausembryonen des Stadiums **E14** findet sich *lacZ*-Färbung insbesondere punktuell an der Oberfläche in den Bereichen, wo sich höchstwahrscheinlich die koronaren Arterien durch Vasculogenese formieren, was konsistent ist mit den Beobachtungen im *Whole-mount* (siehe Abbildung 89 und Abbildung 86).

Lunge

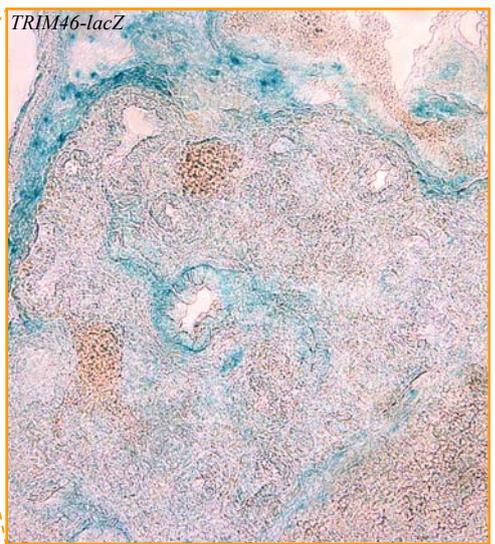
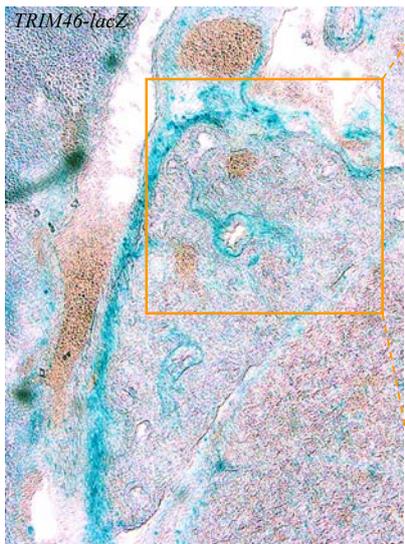


Abbildung 126: Hier ist *lacZ*-Färbung im *TRIM46*-KO der **Lunge** zum Stadium **E14** zu sehen. *TRIM46* ist im **Endothel der Bronchien** exprimiert.

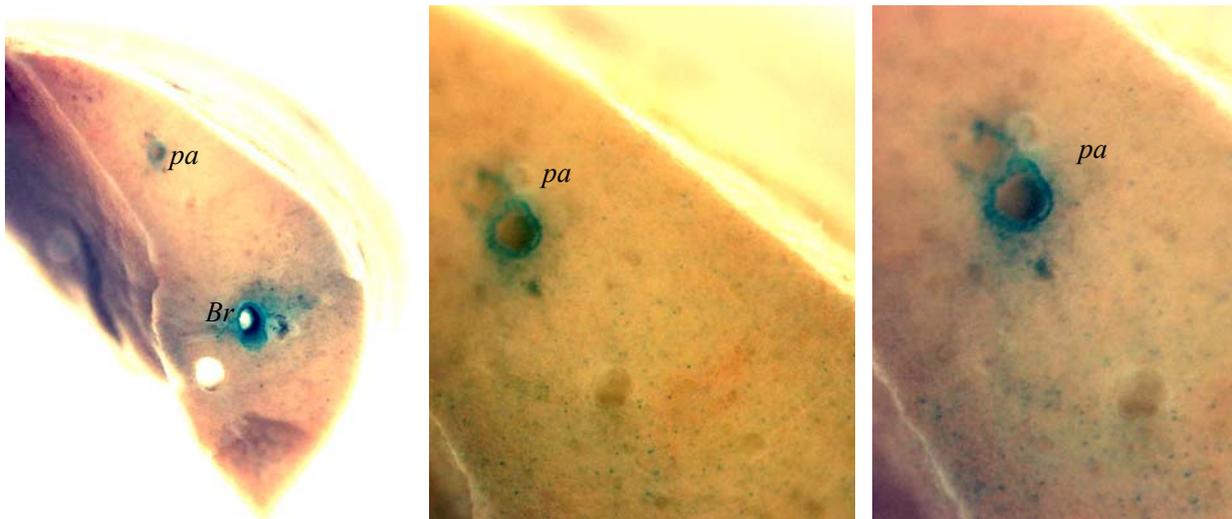
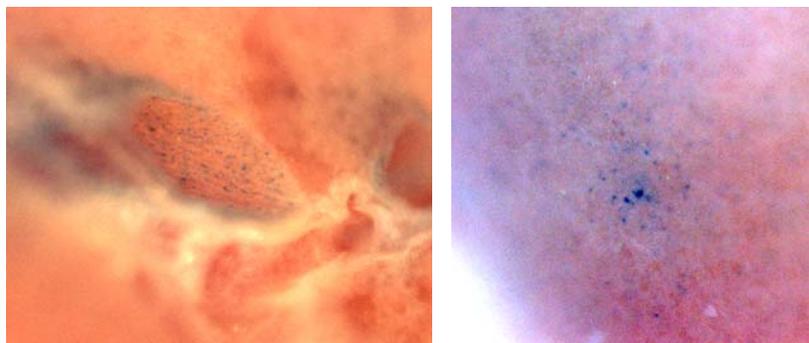


Abbildung 127: **lacZ-Färbung** in der **adulten Lunge** von 7 Monate alten Tieren. Das Endothel von **Bronchien (Br)** und pulmonalen Arterien (*pa*) ist gefärbt und es finden sich in der ganzen Lunge **verteilte blau punktierte Bereiche**, die Lungenbläschen sein können. Jedoch sind nicht alle gefärbt.



Negativkontrollen zu den Expressionsfärbungen

Die Negativkontrollen bestätigten die Spezifität der TRIM46-Expression und die angewandten Färbemethoden.

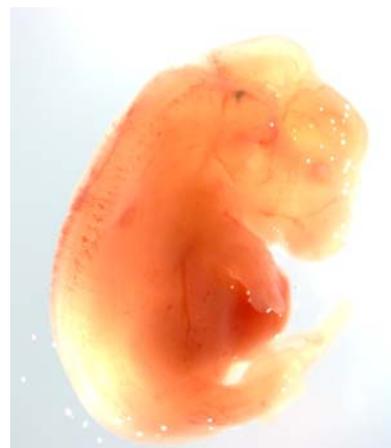
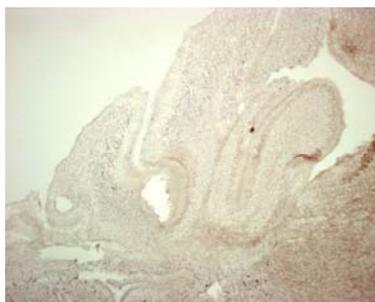
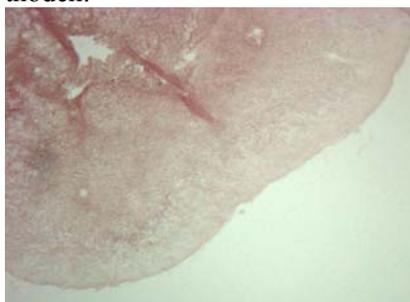


Abbildung 128: Ausgewählte **Negativ-Kontrollen von in-situ-Hybridisierungen mit der sense-Probe gegen TRIM46-mRNA**, die nicht komplementär ist und daher nicht binden sollte, was in allen Fällen deutlich zu sehen ist, so dass die Signale der antisense-Proben aus Abbildung 103 von Hybridisierungen herkommen müssen. Es handelt sich hierbei um Gehirnschnitte der gleichen Tiere und Präparate, die auch für die antisense-Proben verwendet wurden.

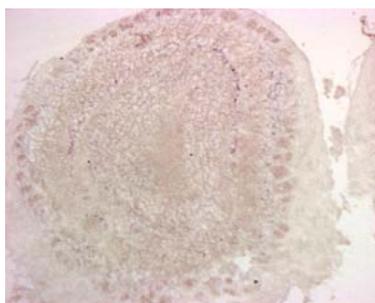


Abbildung 129: Negativkontrolle für die *lacZ*-Färbungen. Es zeigte sich keinerlei Blaufärbung in Wildtyp-Embryonen wie hier.

Phänotyp des Knock-outs im Vergleich zum Wildtyp

Die Mäuse mit dem *TRIM46*-KO waren auch im homozygoten Genotyp lebensfähig. Erst mit zunehmendem Alter von mehreren Monaten wurden Unterschiede zu den Wildtypen allmählich auffällig.

Veränderungen des Lungengewebes mit zunehmendem Alter

Einige äußerlich unauffällig erscheinende Mäuse des *TRIM46*-KO zeigten bei der Präparation Gewebsveränderungen in der Lunge, die entzündet bzw. blutig waren.

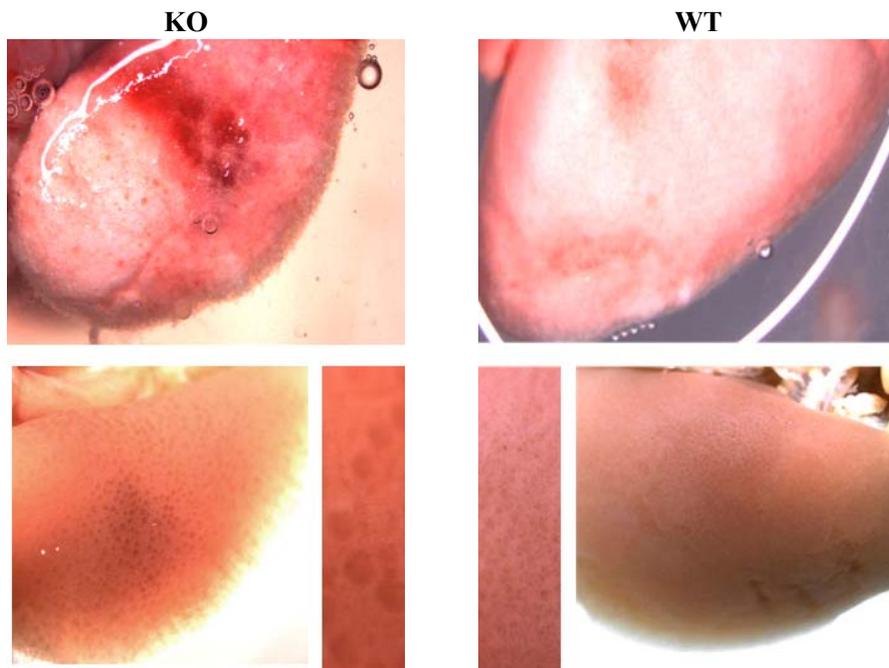


Abbildung 130: In 3 von 10 seziierten Mäusen mit Knock-out von *TRIM46* wurden entzündliche Veränderungen des Lungengewebes beobachtet, die bei entsprechenden Wildtypen nicht auftraten. Die Lungen zeigten nach der Sezierung Hämatome und Narben von früheren Blutungen, die eine Art Kraterlandschaft auf der Lunge bildeten, währenddessen die Lungenoberfläche im Wildtyp völlig glatt war und ohne Blutungen. Zudem traten diese Gewebsveränderungen erst bei älteren Tieren ab 7 bzw. 9 Monaten in Erscheinung.



Abbildung 131: Die kraterförmigen Narben zeigten teilweise eine *lacZ*-Blaufärbung für den *TRIM46*-KO. Die Intensität war nicht bei allen Narben gleich und es ist anzunehmen, dass dies von dem Alter der Narben abhing, wie lange die zugrunde liegende Blutung zurück lag.

***lacZ*-Färbung in Tumorgewebe von *TRIM46*-KO**

Weitere äußerlich unauffällig erscheinende Mäuse des *TRIM46*-KO, d.h. also andere als die zuvor mit den Lungenveränderungen beobachteten, zeigten bei der Präparation Tumoren zum Teil mit Metastasen.

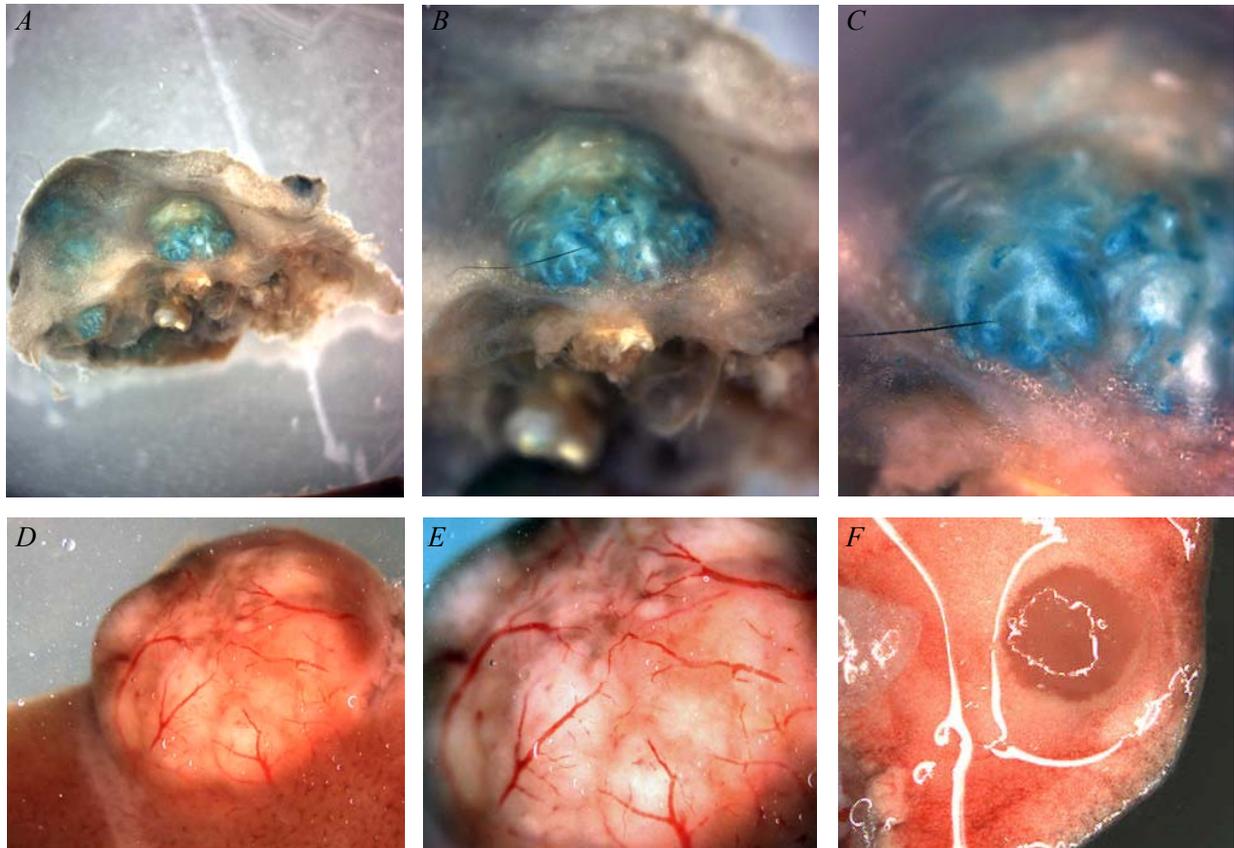


Abbildung 132: In 3 von 20 adulten Mäusen des *TRIM46*-KO wurden Tumore gefunden, keine in vergleichbaren Wildtypen. Die Mäuse waren dabei zwischen 9 und 12 Monaten alt. Der Tumor in der oberen Reihe (A-C) wurde nach Einsendung in ein pathologisches Labor als Trichoblastoma klassifiziert. Auffällig war die sehr starke *lacZ*-Blaufärbung gegen *TRIM46*-KO in Bereichen des Tumors, die wie abnormale Gefäße oder Gefäßwucherungen ausahen. Unten links (D-E) ist ein Lebertumor mit reichlichen Blutgefäßen zu sehen. Rechts unten (F) eine Wucherung in der Lunge.

Veränderungen des Urins

Die starke Expression von *TRIM46* in Nierentubuli (siehe Seite 125) gab Anlass zur Analyse der Zusammensetzung des Urins mittels Harnteststreifen (Combur⁵ Test[®] HC, Roche). Dabei zeigte 1 von 15 untersuchten Tieren mit *TRIM46*-KO eine deutliche Färbung in dem Testgebiet für Glukose im Urin (Testfeld links außen), während bei allen Wildtyptieren keine signifikante Veränderung stattfand. Normalerweise sollte Glukose wieder rückresorbiert werden und nicht im Harn vorkommen. Möglicherweise ist diese Rückresorption in dieser Maus mit *TRIM46*-KO gestört.



KO



WT

Melanocytenwucherung auf der Gehirnoberfläche

An den Gehirnen älterer (7 und 9 Monate) Tiere mit *TRIM46*-KO traten **Melanocytenwucherungen (Pfeil)** in der Nähe des olfaktorischen Bulbus besonders in Erscheinung. Diese treten generell vereinzelt bei Mäusen auf, wurden hier aber bei allen präparierten Mäusen (ca. 15) mit *TRIM46*-KO beobachtet, hingegen nicht in unseren Wildtypen. Auffällig war die räumliche Nähe dieser Strukturen zu Blutgefäßen, was den Verdacht zu einem Zusammenhang mit der Wirkung von *TRIM46* dort aufstellen könnte.

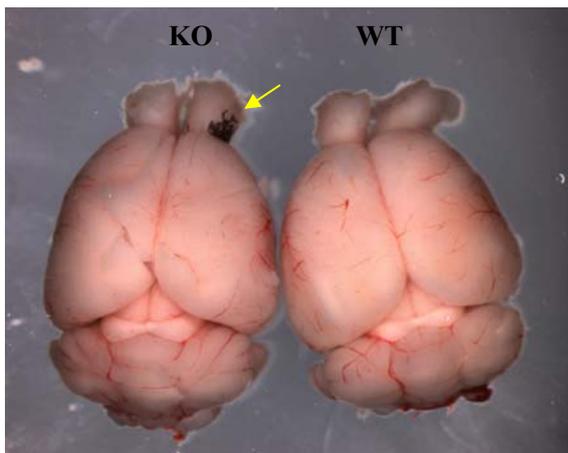


Abbildung 133: **Melanocytenwucherung** auf der Oberfläche von vornehmlich *TRIM46*-KO-Mäusen. Bild oben links zeigt Vergleich von *TRIM46*-KO zu gleichaltem Wildtyp-Gehirn. Der Pfeil markiert die Stelle der Wucherung. Darunter ist in einem sezierten Gehirn zu erkennen, dass die Wucherung nicht nur oberflächlich ist. Auf der rechten Seite sind Vergrößerungen zu sehen, die den räumlichen Zusammenhang der Wucherung mit Arterien zeigen.

Diskussion

Microarray-Analyse ermöglicht Identifizierung neuer Gene mit regionalisierter Expression im cerebralen Cortex der Maus zum Stadium E18,5

Unser Ansatz des Microarray-Screens diente vorrangig dem Ziel der qualitativen Gen-Entdeckung, weniger einer genauen Quantifizierung oder gar vollständigen Kartierung von Expressionsstärken, wozu mehrfache statistische Repetitionen / unabhängige Chip-Hybridisierungen nötig gewesen wären. Ziel war die Vorhersage möglicher neuer Gene mit lokalisierter Expression im Cortex, die dann mit unabhängigen Methoden wie ISH verifiziert und ausgearbeitet werden konnten, wodurch der Microarray-Screen maximale Informationen mit einer minimalen Anzahl an Chips und Kosten liefern konnte. Unter diesem Gesichtspunkt hatte der Screen damit seinen Zweck erfüllt, da neue Gene mit den gewünschten Kriterien gefunden und bestätigt wurden.

Auffällig bei Betrachtung der Anzahlen der für die 5 Cortexregionen vorhergesagten Gene, ist die Häufung im Hippocampus, der etwa 1,5 Mal so viele vorhergesagte Gene auf sich vereinte wie der Rest aller anderen Cortexregionen zusammen. Dies mag die bekannte funktionelle Besonderheit des Hippocampus im Cortex, so wie sie in der Einleitung beschrieben wurde, nun auch genetisch widerspiegeln. Der Hippocampus ist mit allen anderen Cortexregionen eingehend wie zurücklaufend verbunden und organisiert für diese bzw. in diesen assoziative Gedächtnisleistungen.

Wie in der Einleitung erwähnt, verlaufen rostral-caudal (anterior-posterior) und lateral-medial Morphogen-Gradienten, so dass ein Vergleich der Gene entlang dieser Achsen angebracht ist. Zu beachten ist allerdings, dass hier nur **ein** Zeitpunkt während der Entwicklung betrachtet wird, nämlich E18,5, und die Verhältnisse zu anderen Stadien unterschiedlich sein könnten. So wurde von dem anderen Team, das den Microarray-Screen zum Stadium E16 durchführte, eine besondere Expression von 58% aller Gene im frontalen motorischen Cortex gemessen, was übereinstimmt mit Beobachtungen anhand von ³H-Thymidin-Markierungen verschiedener Cortexschichten, die einen früheren Ursprungszeitpunkt anteriorer Zellen im Vergleich zu posterioren Bereichen feststellten (Bayer SA 1991). Dies würde somit auch eine erhöhte Genaktivität in der anterior gelegenen Anlage des motorischen Cortex bedeuten. Umgekehrt wäre zu schließen, dass sich diese Gen-Konzentration mit Fortschreiten der Entwicklung verschiebt zu den posterioren Bereichen. Ein solcher Erklärungsansatz könnte aber nicht ausreichend sein, da der Hippocampus zwar tatsächlich posterior zum frontalen Motorcortex liegt, allerdings auch medial versetzt, und stattdessen direkt auf der posterioren Achse der visuelle Cortex liegt, welcher in E18,5 keine herausragende Anhäufung von Genvorhersagen aufweist. Vielmehr halten sich die Genanzahlen des Stadiums E18,5 im frontalen Motorcortex (24 Gene) mit denen im posterioren visuellen Cortex (22 Gene) etwa die Waage, was aber zumindest die Verschiebung des Gradienten von frontal nach posterior mit zunehmender Entwicklung bestätigt, wenn auch der Effekt alleine nicht ausreicht, um die Sonderstellung des Hippocampus zu dem Zeitpunkt E18,5 zu erklären.

Bei der Annotierung der Gene (siehe ab Seite 32) stellten unter den bereits bekannten Genen die Transkriptionsfaktoren (19 Gene) die größte Einzelfraktion. Bei den unbekanntesten ESTs waren diese hingegen nur noch die drittgrößte Fraktion (17 Gene). Dies mag daran liegen, dass sich die bisherige Entwicklungsforschung im Gehirn auf vornehmlich Transkriptionsfaktoren konzentrierte und nach solchen gesucht hat.

Auffallend bei den ESTs war der hohe Anteil von Genen, die der Signaltransduktion annotierten (24 Gene) in Relation zu den bereits bekannten (7 Gene). Da die Hauptfunktion des Gehirnes und Cortex die Signalverarbeitung ist, wundert es nicht, dass diese Proteinklasse zahlreich vertreten ist. Es könnte sein, dass dieser auch während der Entwicklung eine größere Bedeutung als bisher angenommen im Vergleich mit Transkriptionsfaktoren beizumessen wäre. Andererseits könnte sich darin für das Stadium E18,5 auch eine bereits sich etablierende funktionelle Identität der Cortexregionen niederschlagen als Folge vorhergegangener Determinierungsschritte. Das Stadium E18,5 befindet sich schließlich am Ende der embryonalen Cortexentwicklung, so dass weniger initiiierende Gene als von Determinanten abgeleitete Gene (*downstream targets*) erwartet werden können, die corticale Identitäten nicht mehr wesentlich bestimmen, sondern bestehende weiter zu manifestieren helfen, folglich weniger neue Transkriptionsfaktoren als mehr Effektorproteine wie Signaltransduktoren.

Die hohe Anzahl an nicht annotierbaren Sequenzen unbekannter Funktion (26 Gene) bei den ESTs überrascht nicht und stellt für zukünftige Forschungen das größte Potential.

Verifizierung der Chip-Daten mittels ISH gibt eine erste Charakterisierung für neu gefundene Gene

Die Vorhersagen der Microarray-Experimente wurden durch in-situ-Hybridisierungen verifiziert und weiter spezifiziert. Insgesamt wurden für das Stadium E18,5 ca. 80 ISH gemacht, wobei sich eine Übereinstimmung mit den Chip-Daten zu 70% ergab. Nicht übereinstimmende Gene zeigten entweder gar kein Signal oder nur Hintergrund, d.h. die ISH-Sonde funktionierte nicht, oder ein widersprüchliches Ergebnis, d.h. Expression woanders im Körper nur nicht im Gehirn. Die Ursache hierfür ist einmal in der Konzeption der Microarray-Experimente zu sehen, die ohne statistische Repetitionen angelegt wurden, weil man stattdessen mit ISH im nächsten Schritt filterte. Des Weiteren müssen die für ISH ausgesuchten Sequenzen nicht immer identisch mit den Genabschnitten auf den Chips gewesen sein und z.B. Splicevarianten von Genen können dann gewebspezifisch unterschiedliche Expressionen zeigen. Oftmals funktionieren bestimmte Sonden auch nicht und man müsste diese optimieren und benachbarte Genabschnitte alternativ wählen. Solche Optimierungen waren aber für jedes einzelne Gen eines Screens zu aufwändig, so dass man sich ökonomisch zunächst auf die funktionierenden konzentrierte. Die Ergebnisse der ISH aller am Cortex-Projekt beteiligten Gruppen wurden in eine Datenbank eingetragen, die bald online zur Expressionskartierung im Cortex der Maus öffentlich zur Verfügung gestellt werden soll.

Ein besonderes Augenmerk galt den neu entdeckten ESTs oder bekannten Genen, die bisher noch nicht für das Gehirn und den Cortex charakterisiert worden waren. Mit Fortschreiten der Annotationsmöglichkeiten sank deren Zahl im Laufe der Zeit. In dieser Arbeit sind diejenigen neuen ESTs dargestellt, die für das Stadium E18,5 nach wie vor unbekannt sind und Gegenstand einer Veröffentlichung sein sollen.

Klon 137 – *Nse1*

Klon 137 zeigt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen ISH und den Microarray-Vorhersagen. Die Expression ist sehr spezifisch für das Gehirn und regionalisiert im Cortex. Im Körper ist hingegen keine oder kaum eine Expression messbar. Die Microarray-Sequenzen wie auch die ISH-Sonde annotieren zu dem Maus-Homolog des bereits in Mensch und Hefe bekannten Gens *Nse1*. Auch wenn dieses Gen schon seit einiger Zeit bekannt ist – der erste Eintrag in PubMed datiert auf Juni 2002 – und seit dem über 10

Publikationen sich damit beschäftigen, überrascht die Tatsache, dass keinerlei Expressionsdaten in Wirbeltieren bekannt sind. Das Gen ist vielmehr für Hefe charakterisiert (Morikawa H 2004), (Fujioka Y 2002). Möglicherweise ging man angesichts der Expression in einem Einzeller wie Hefe davon aus, dass das Gen eine fundamentale Funktion für eine Zelle bzw. für jede Zelle aufweisen sollte, so dass auch bei einem Vielzeller von einer ubiquitären Expression, die vielleicht lediglich zellzyklusreguliert sein dürfte, auszugehen wäre. Das könnte ein Grund dafür sein, dass bisher noch niemand die Motivation verspürt hat, für das Gen eine Expressionsanalyse in einem Wirbeltier durchzuführen.

Umso erstaunlicher ist nun das in unserem Cortex-Screen gefundene Resultat, dass dieses Gen überhaupt nicht ubiquitär vorkommt, sondern ausgezeichnet im Gehirn und Cortex exprimiert ist. Offenbar ist im Verlaufe der Evolution die grundsätzliche Zellfunktion redundant geworden und die Genfunktion konnte sich auf bestimmte Bereiche und Gewebe spezifizieren. Vergleicht man weiter mit den bisher bekannten Funktionsdaten des Proteins in Hefe, so ist allerdings eine Funktion in der Entwicklung sehr nahe liegend. Zu erwähnen wäre eine Publikation (Solmi, De Sanctis et al. 2004), die *Nse1* in humaner Colon-Mucosa, sowohl beim Gesunden als auch beim Krebs, festgestellt hat, was die Aussage der reinen Gehirnspezifität etwas einschränkt, allerdings von uns zum Stadium der ISH E14 diese Colon-Mucosa noch nicht nachweisbar war, so dass hier tatsächlich die Gehirnspezifität vorliegt.

Nse1 wurde mittels *Yeast-Two-Hybrid-Screen* als Interaktionspartner des *Spr18-Rad18 / Smc5-Smc6* – Genkomplexes gefunden (McDonald, Pavlova et al. 2003). Dieser hat in der Hefe eine essentielle Funktion in DNA-Reparatur-Vorgängen. *Smc* steht für „*structural maintenance of chromosomes*“ und umfasst eine Gruppe von 6 Proteinen, die zentrale Rollen für Chromosomen-Dynamik und –Organisation spielen sowie untereinander hochmolekulare Proteinkomplexe bilden können, an denen auch nicht-SMC-Proteine assoziiert sind. Als solche sind die *Nse*-Proteine benannt als *nicht-SMC-Elemente*. Bekannte SMC-Komplexe sind *Smc2-Smc4* und *Smc1-Smc3*, die auch als *Condensin* und *Cohesin* geläufig sind. In der Zellteilung hält *Cohesin* die Schwesterchromatiden zusammen und *Condensin* verdichtet die Chromatinstruktur durch ATP-abhängige Einfuhr positiver *Supercoils* in die DNA-Struktur. Disruption von *Condensin* führt zu schweren Defekten der Chromosomenkondensation und Segregation (Hirano and Mitchison 1994; Hirano, Kobayashi et al. 1997). Neben der Mitose spielen diese Prozesse eine Rolle bei der X-Inaktivierung und Dosiskompensation sowie dem *Gen-Silencing* durch Kompaktierung von Chromosomenabschnitten (Martinez-Balbas, Dey et al. 1995). Bei diesen Vorgängen kann es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA kommen, wie sie auch durch Strahlung induziert werden können. In beiden Fällen fungiert *Rad18* in seinem Proteinkomplex zur Rekombinations-Reparatur der DNA. Diese Genfunktion ist essentiell für die Zellproliferation und Gendefekte verhindern diese.

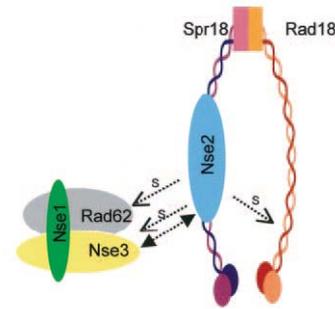


Abbildung 135: Protein-Interaktionspartner von *Nse1* (Sergeant, Taylor et al. 2005).

Bei diesen Vorgängen kann es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA kommen, wie sie auch durch Strahlung induziert werden können. In beiden Fällen fungiert *Rad18* in seinem Proteinkomplex zur Rekombinations-Reparatur der DNA. Diese Genfunktion ist essentiell für die Zellproliferation und Gendefekte verhindern diese. Einmal mehr zeigt sich hier eine ubiquitäre Funktion für Zellteilungen allgemein. Entsprechend wurde für *Rad18* auch eine ubiquitäre Expression in Säugetieren festgestellt mit einer besonders starken Expression im Hodengewebe (Masuyama, Tateishi et al. 2005). Während des Zellzyklus liegt das Maximum der Expression in der S-Phase, jedoch verbleibt eine Restkonzentration auch in anderen Phasen. Die meisten Veröffentlichungen über *Smc5-Smc6* beschäftigen sich mit deren Funktion für die DNA-Reparatur. Jedoch wurden kürzlich auch erste Hinweise für eine Funktion in der **Genregulation durch Chromatin-Silencing** gefunden (van der Laan, Uringa et al. 2004). In Testis wurde die Lokalisation von *Rad18* auf transkriptionell inaktivierten Regionen von X- und Y-Chromosomen beobachtet. Denkbar wäre

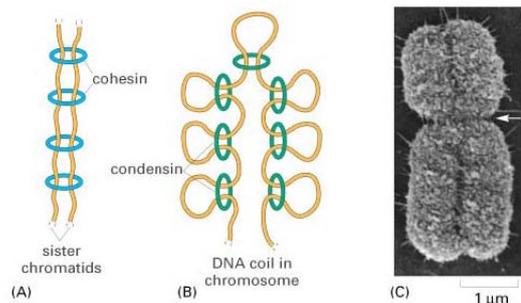


Abbildung 134: (© 2004 Garland Science).

Einmal mehr zeigt sich hier eine ubiquitäre Funktion für Zellteilungen allgemein. Entsprechend wurde für *Rad18* auch eine ubiquitäre Expression in Säugetieren festgestellt mit einer besonders starken Expression im Hodengewebe (Masuyama, Tateishi et al. 2005). Während des Zellzyklus liegt das Maximum der Expression in der S-Phase, jedoch verbleibt eine Restkonzentration auch in anderen Phasen.

Die meisten Veröffentlichungen über *Smc5-Smc6* beschäftigen sich mit deren Funktion für die DNA-Reparatur. Jedoch wurden kürzlich auch erste Hinweise für eine Funktion in der **Genregulation durch Chromatin-Silencing** gefunden (van der Laan, Uringa et al. 2004). In Testis wurde die Lokalisation von *Rad18* auf transkriptionell inaktivierten Regionen von X- und Y-Chromosomen beobachtet. Denkbar wäre

somit auch eine Funktion in der Genregulation auf diesen Chromosomen in der Gehirnentwicklung, insbesondere also X-Chromosominaktivierung und Dosis-Kompensation sowie insbesondere geschlechts-spezifischer Genregulation. Solche Funktionen könnten durch Zusatzfaktoren wie *Nse1* **moduliert** werden.

Doch auch eine Möglichkeit der **Genregulation durch** alternative Mechanismen wie Chromatin-*Silencing* unter Berücksichtigung der Eigenschaften von *Smc5-Smc6* bei der DNA-Reparatur wären denkbar, wobei man an **somatische Genkonversion** denken könnte, also Umbauprozesse auf der DNA selber bei der inaktive Gene aktiviert werden können oder umgekehrt, indem Bereiche auf der DNA entfernt werden oder neu rekombiniert, so dass Sequenzen unter andere Kontrollelemente geraten. Bekannt ist das beispielsweise beim Paarungstypwechsel in Hefe.

Auch **somatische Genamplifikationen** könnten so erzeugt werden. Über solche Prozesse ist zur Zeit allerdings mehr hinsichtlich pathologischer Entwicklungen wie in Tumoren bekannt nicht während der regulären Entwicklung (Kaminsky, Pependikyte et al. 2005; Knobbe, Trampe-Kieslich et al. 2005). In diesem Zusammenhang interessant ist das beschriebene verstärkte Auftreten von *Nse1* in solchen Tumoren (Beheshti, Braude et al. 2003; Weber, Imisch et al. 2004).

Defekte von *Nse1* in Hefe ergeben den gleichen Proliferationsstop wie Defekte an *Smc5-Smc6* selber. Dennoch ist in der Maus, wie in dieser Arbeit festgestellt, die Expression von *Nse1* nicht genauso ubiquitär wie die von *Smc5-Smc6*. Folglich muss es hier im Laufe der Evolution gegenüber Hefe zu einer Kompensation durch Redundanz gekommen sein oder andere Proteine oder *Smc5-Smc6* selber haben die ursprüngliche Funktion von *Nse1* übernommen, sofern wir die Funktion in Hefe als die ursprünglichere ansehen wollen.

Die Sequenzen von *Nse1* und *Nse2* weisen Motive von E3-Ubiquitin bzw. SUMO-Ligasen auf (Sergeant, Taylor et al. 2005), ***Nse1* mit seiner RING-Zink-Finger-Struktur**. Diese Motive sind bekannt für ihre **modulatorische Wirkung** auf andere Proteine.

Zusammenfassend handelt es sich bei *Nse1* um ein interessantes Gen, dessen hohe Spezifität im Gehirn und Cortex völlig unerwartet ist, weshalb es gerade spannend wäre, dessen Funktion dort weiter nachzugehen, insbesondere durch die Herstellung einer Knock-out-Maus, die von dem kompakten Genlokus her (4,2 kbp) praktikabel durchführbar wäre.

Klon 149 – unbekanntes Gen

Klon 149 ließ sich zu keinem bekannten Protein annotieren. Auch die Lokalisierung auf dem Genom war aufwändig und deutete auf ein neues Gen hin. Dieses zeigte in der ISH eine hervorragende Übereinstimmung mit den Chip-Vorhersagen mit hoher Regionalisierung im Hippocampus sowie der subventrikulären Zone und dem rostralen migratorischen Strom, also solchen Regionen, in denen auch im Adulten noch Neubildungen von Nervenzellen stattfinden. Es dürfte interessant sein, die Funktion dieses Gens in der Cortexentwicklung weiter zu verfolgen. Ein Knock-out dürfte sich jedoch als schwierig erweisen, da die genaue Gengröße bisher nicht abgeschätzt werden konnte und ein Northern-Blot eine Größe von mehr als 20 kbp aufzeigte, was auf einen sehr großen Genlokus hindeutet. Von daher wären nahe liegende Arbeiten zuerst die Vervollständigung der cDNA und Wiederholung der in dieser Arbeit vorgelegten Expressionsstudien mit anderen Sequenzbereichen als ISH-Sonde. Im nächsten Schritt könnte man schauen, ob das Genprodukt translatiert wird und DNA-, RNA-, Protein- oder sonst was bindende Eigenschaften besitzt, um es in einen funktionalen Kontext stellen zu können. Ohne Hinweise durch Annotationen zu schon bekannten Sequenzmotiven verlangt die weitere Erforschung dieses Gens viel Pionierarbeit.

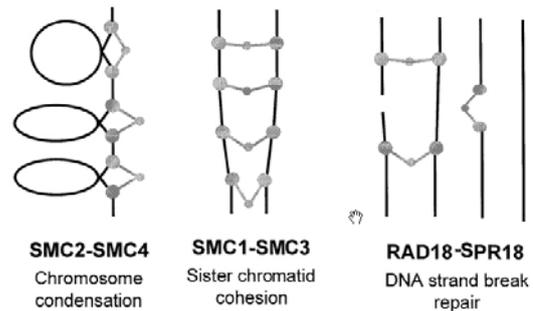
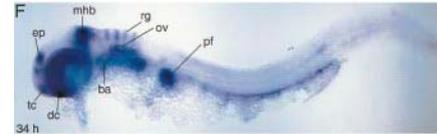


Abbildung 136: (Fousteri and Lehmann 2000).

Klon 103 – *Etv5*

Das Gen *Etv5*, welches auch unter dem Namen *ERM* bekannt ist, wurde bisher intensiv in der Lunge erforscht (Liu, Jiang et al. 2003), wo es in dieser Arbeit auch mittels ISH detektiert wurde. *ERM* ist verwandt mit *ER81* und *PEA3*, mit denen es die *PEA3*-Gruppe innerhalb der *Ets*-Familie von Transkriptionsfaktoren bildet.

Die Expression im Gehirn ist bisher beschrieben für frühe Entwicklungsstadien des Zebrafisch (Munchberg, Ober et al. 1999), wo es grob in Bereichen des Diencephalons (*dc*), Telencephalons (*tc*), der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (*mhb*) sowie der Epiphyse (*ep*) beschrieben wurde, wie im Bild zu sehen.



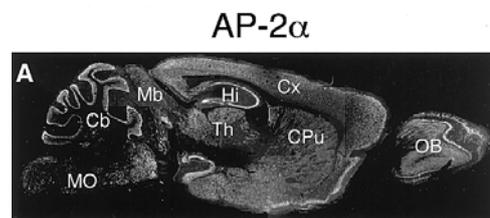
In der Maus gibt es Expressionsstudien mittels ISH vom Stadium E9,5 bis E15,5, wobei aber im Cortex noch keine Details zu erkennen sind (Anne Chotteau-Lelièvre 1997) und die Veröffentlichungen sich allgemein auf den Vergleich der drei Gene der *PEA3*-Gruppe und andere Organe konzentrieren, wie z.B. die Hypophyse. Zudem werden die drei Gene *ERM*, *ER81* und *PEA3* dargestellt mit einer hohen Homologie von 95% in der *Ets*-Domäne und 85% in der aminoterminalen Domäne, was die Frage nach Redundanz aufstellt und hierzu insbesondere für die Planung einer Knock-out-Maus die Expressionen der drei auf Überlappungen zu vergleichen wären.

Die in dieser Arbeit gemachten ISH geben im Vergleich zu den bisherigen Veröffentlichungen einen weitaus detaillierteren Einblick in die Expression während der Cortex-Entwicklung insbesondere dem Stadium E18,5 mit einer sowohl regionen- als auch schichtenspezifischen Expression. Hierbei ist insbesondere der Zusammenhang der Expression im Cortex zwischen den Stadien E14 und E18,5 hervorzuheben, da bereits in E14 eine Expression sichtbar ist in derselben Region wie sie später in E18,5 noch stärker manifestiert ist. **Dadurch ist das Gen *ERM* ein Vertreter derjenigen Gene, die für eine bereits intrinsische Spezifizierung des Cortex noch vor dem Erreichen der thalamo-corticalen Projektionen verantwortlich sind.**

Für weitere Untersuchungen wäre eine Knock-out-Maus interessant, jedoch sollten vorher die Überlappungsbereiche mit den beiden anderen verwandten Genen abgeklärt werden und aufgrund der Expression in anderen Organen sowie in Frühphasen des Embryos generell eine Strategie des konditionalen Knock-outs überlegt werden, sofern man sich gezielt auf die Funktion im Gehirn und Cortex konzentrieren möchte.

Klon 133 – Gen *Klf12* aka *AP-2rep*

AP-2rep ist ein Repressor des Transkriptionsfaktors *AP-2* und bindet hierzu an ein cis-Element in dem Promotor von *AP-2α* (Imhof, Schuierer et al. 1999). Bisher sind noch keine systematischen Expressionsstudien über *AP-2rep* veröffentlicht, lediglich in frühen Stadien von *Xenopus laevis* ohne Betrachtung des Gehirnes und Cortex (Gotoh, Izutsu et al. 2003). Demgegenüber sind die verschiedenen Subtypen von *AP-2* ausführlich untersucht. Von einem Repressor und seinem Zielprotein würde man vielleicht eine komplementäre Expression erwarten, da der Repressor die Transkription verhindern könnte. Im Vergleich der veröffentlichten Expressionsdaten von *AP-2α* (Shimada, Konishi et al. 1999) zu den in dieser Arbeit durchgeführten ISH von *AP-2rep* zeigt sich jedoch eher eine Überlappung (siehe Bild hier und auf Seite 47).



Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass in der Veröffentlichung von Shimada die ISH von adultem Mausgehirn gezeigt wurden, in dieser Arbeit aber die Expression während der Entwicklung zum Stadium E18,5 betrachtet wurde. Denkbar wäre aber auch, dass die Regulation im Überlappungsgebiet dynamisch aufgrund den Repressor aktivierenden Einflüssen erfolgt und nicht permanent stattfindet. In diese Richtung könnten auch die Befunde einer neueren Veröffentlichung bewertet werden, die eine Senkung der *AP-2α*-Konzentration nach 6 wöchiger Behandlung mit Lithiumchlorid (LiCl) beschreibt (Rao, Rapoport et al. 2005). Lithiumchlorid wird auch beim Menschen zur psychiatrischen Medikation

eingesetzt und wirkt stabilisierend auf die Stimmung, was insbesondere bei Depressionen vorteilhaft ist. Über den Mechanismus seiner Wirkung ist wenig bekannt und auch hier erschöpft sich die Feststellung der Konzentrationsabsenkung. Denkbar wäre, dass diese durch gesteigerte Aktivität seitens des Repressors *AP-2rep* zustande kommen könnte, so dass man auch dessen Konzentrationsverlauf während einer Behandlung mit LiCl verfolgen sollte bzw. darauf achten, auf welche anderen Arten (z.B. Phosphorylierung) dieser aktivierbar sein könnte. In einer weiteren Veröffentlichung (Coelho, Sims et al. 2005) wird auf geschlechtsspezifisch unterschiedliche Expression von *AP-2* hingewiesen, die insbesondere in solchen Hirnstrukturen vorkommt, die für soziale Verhaltensweisen und das Fortpflanzungsverhalten sowie mit der Verarbeitung von Stress und Aufmerksamkeit, also sehr dynamischen Prozessen, verbunden sind.

Die Herstellung einer Knock-out-Maus könnte interessant sein, um der Frage nach zu gehen, was eine Ausweitung der *AP-2*-Expression durch Ausschalten seiner regionalisierten Repression für Veränderungen während der Cortex-Entwicklung oder unter wechselnden Einflüssen und Verhaltensweisen bringt. Insbesondere könnte untersucht werden, wie der Zusammenhang mit der LiCl-Behandlung beeinflusst würde. Um sich hier auf die Wirkungen im Gehirn zu spezialisieren wäre ein konditionaler Knock-out nahe liegend. Zudem müsste die genaue Relation der Expression von *AP-2rep* und seinem Zielgen *AP-2 α* zu den gleichen Entwicklungsstadien geklärt werden, inwieweit Überlappung oder Ausschluss vorliegt. Hier ist nicht nur von einer räumlichen, sondern auch sehr zeitabhängigen Regulation während der Entwicklung auszugehen.

Auswahl des Gens *TRIM46* zur detaillierteren Analyse

Das Gen *TRIM46* wurde aus Klon 140 annotiert. Die *Fold Changes* von *TRIM46* deuteten zwar auf eine regionale Expression im cerebralen Cortex hin, jedoch war der Unterschied im Vergleich zu Vorhersagen für andere regionalisierte Gene eher durchschnittlich. So wurde nur ein Expressionsunterschied vom ganzen Gehirn zum Körper von dem Faktor 2 festgestellt. Tatsächlich ist das Gen sowohl im Gehirn wie im Körper exprimiert, dort allerdings jeweils in einer sehr lokalisierten Form, wie sich später herausstellte. Durch die Expression in Arterien, die den ganzen Körper durchziehen, wird die regionale Expression überlagert, so dass mit verschiedenen Versuchen der Eindruck von nur einer geringen Lokalisation erweckt wurde. Dieser Eindruck konnte erst durch die detaillierte Betrachtung unter dem Mikroskop mit ISH, Immun- und *lacZ*-Färbungen widerlegt werden, während Methoden wie Northern-Blot oder auch Microarray-Analyse ganze Organe gepoolt betrachten ohne die Möglichkeit einer Diskriminierung auf zellulärer Ebene.

Das Gen *TRIM46* ist also stärker regionalisiert exprimiert als es die Microarray-Analyse vorhersagte. Dabei lag die Chip-Vorhersage aber qualitativ richtig, wie sie das Expressionsmaximum im Hippocampus annahm, nur das Ausmaß wurde unterschätzt.

Das Gen *TRIM46* gehört zu einer großen Proteinfamilie, von der bereits viele Vertreter bekannt sind und für verschiedene Krankheiten beim Menschen verantwortlich zeichnen, wie in der Einleitung aufgeführt. Dies war auch zusammen mit den Expressionsdaten ein Grund für die Auswahl dieses Gens für eine detailliertere Analyse, da ein Phänotyp im Knock-out wahrscheinlich sein sollte in diesem Kontext. Mögliche Redundanzen wurden derart ausgeschlossen bzw. minimiert, indem die veröffentlichten Expressionsgebiete der nächsten Verwandten verglichen und als nicht oder wenig überlappend befunden wurden. Allerdings kann funktionelle Redundanz von anderen nicht sequenzhomologen Proteinen grundsätzlich nie ausgeschlossen werden.

Für den Knock-out wurde die Sequenz des Gens *β -Galactosidase* mit der von dem originalen *TRIM46* in dessen Genlokus ausgetauscht, so dass in den geborenen hetero- wie homozygoten Embryonen und adulten Tieren eine Färbung mittels *x-gal* den Expressionsbereich markierte. Somit konnten die

Expressionsdaten der ISH reproduziert und verbessert werden, wobei die *lacZ*-Färbung mit *x-gal* geringeren Hintergrund produzierte.

Während der Embryogenese fiel ab Stadium E9 zuerst die Expression in Blutgefäßen auf, wobei die großen Arterien, nicht jedoch Venen betroffen waren. Im weiteren Verlauf der Entwicklung kamen immer mehr sich neu bildende Arterien hinzu, so dass das Gen als spezifisch für wachsende Arterien angesehen werden kann. In ausgewachsenen adulten Arterien hingegen verblasste die Blaufärbung nach und nach, so dass eine Funktion während der Bildung angenommen werden sollte. Diese Annahme wird untermauert durch die Beobachtung eines Wiederauftretens von *TRIM46*-Expression bzw. *lacZ*-Färbung in neu wachsenden Arterien im Adulten, wie dies bei einem Tumor beobachtet wurde oder bei verletztem Gewebe in der Lunge.

Die Spezifität für Arterien wurde durch Ko-Lokalisation mit arterienspezifischen Markergenen wie *VEGFR2* und *Neuropilin-1* bestätigt, währenddessen Venen mit ihren Markergenen wie *Neuropilin-2* kein gemeinsames Vorkommen mit *TRIM46* bzw. *lacZ*-Färbung zeigten.

Innerhalb der Arterien konnte die Expression auf die innerste dem Lumen anliegende Zellschicht der Endothelzellen präzisiert werden, was einmal durch entsprechende hohe Vergrößerungen direkt sichtbar wurde und andererseits wieder durch Ko-Lokalisation mit endothelzellspezifischen Markerproteinen wie *PECAM-1* gezeigt werden konnte. Hingegen zeigten Markergene für andere Zelltypen in Arterien, insbesondere Perizyten (*NG2*, *PDGFR-β*) dieses nicht.

Die Spezifität für Endothelzellen blieb nicht auf Arterien beschränkt, sondern es zeigte sich *TRIM46*-Expression auch in anderen Endothelien, der Darmmucosa, der Harnblase, den Bronchien in der Lunge wie auch den Lungenbläschen, den Nierentubuli, dem Epithel des *Plexus choroideus*, der den *Liquor cerebrospinalis* produziert und dem Innenohr.

Es wäre eine nahe liegende Frage, ob *TRIM46* in allen diesen Endothelien eine bestimmte, endothelspezifische Funktion ausübt oder für eine bestimmte allgemeine Eigenschaft und Gemeinsamkeit von diesen Endothelien verantwortlich zeichnet. Dieser Frage wurde durch Vergleich der Morphologie der Endothelien unter dem Mikroskop zwischen homozygoten *TRIM46*-KO und heterozygoten sowie Wildtypen nachgegangen, wobei auch immer wieder die Expressionen verschiedener Markergene betrachtet wurden. Dabei zeigte sich keine auffällig erkennbare Veränderung in der Anatomie dieser Endothelien. Die Rolle von *TRIM46*, sofern sie nicht doch redundant sein sollte, dürfte folglich auf andere Funktionen oder Eigenschaften statt der offensichtlichen Morphologie bezogen sein.

Die Expression im Gehirngewebe, also jenseits der Gehirnarterien, tritt erst ab Stadium E13 und E14 in Erscheinung. Bezüglich des Cortex und seiner drei in unserem Cortex-Screen betrachteten Stadien ist ***TRIM46*** dann allerdings genauso wie Klon 103 ein **Vertreter für eine eher intrinsische Determination corticaler Identitäten**. Im Cortex selber ist seine Expression auf die Schichten 5 und 6 beschränkt, also nicht nur regionen-, sondern auch schichtenspezifisch. Die Hauptexpression liegt im *Hippocampus* und dort im *Gyrus dentatus* und der Region *CA2*, aber auch in den beiden anderen Regionen *CA1* und *CA3*. Zudem findet sich nennenswerte Expression in der *Amygdala* und dem *entorhinalen* und *piriformen Cortex*.

Hippocampus und Amygdala sind Bestandteile des Archicortex, einer evolutiv älteren Vorläuferstruktur, die mit dem Cortex aber in intensiver Verbindung steht und diesem hinsichtlich bestimmter Funktionen wie Gedächtnisausbildung sogar hierarchisch übergeordnet ist. Die Amygdala ist des Weiteren mit dem limbischen System verbunden und sorgt für emotionale Einfärbung von Erinnerungen bzw. emotionale Erinnerungen, wohingegen der Hippocampus die Eindrücke aus dem Cortex in Bezug auf deren räumlich-zeitlichen Zusammenhänge verarbeitet. So zeigen beispielsweise Taxifahrer in London, die den ganzen Stadtplan auswendig lernen müssen, um eine Lizenz zu erhalten, eine Vergrößerung des Hippocampusgewebes.

Der entorhinale Cortex stellt eine Übergangszone zwischen Archicortex und Neocortex dar. Der entorhinale Cortex besitzt reziproke Projektionen mit allen primären und sekundären Rindengebieten, die engsten Beziehungen bestehen jedoch mit dem Hippocampus. Zudem ist er Teil des limbischen Systems. Das System entorhinaler Cortex/Gyrus dentatus diente in vielen Experimenten als Modell zum Studium

der Langzeitpotenzierung (LTP). Der entorhinale Cortex spielt eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung. Er reagiert nach einem Gedächtnisbildungsreiz (z.B. einem einer Testperson auf einem Bildschirm gezeigten Wortes) schon nach 300 ms. Nur diejenigen Erregungen, die er an den Hippocampus weiterleitet, führen zur Speicherung des entsprechenden Reizes im Gedächtnis. **Nervenzelluntergang im entorhinalen Cortex findet sich schon zu einem frühen Zeitpunkt der Alzheimer-Krankheit und wird für die hierbei auftretenden Merkfähigkeitsstörungen verantwortlich gemacht.**

Die Expression von *TRIM46* bzw. die *lacZ*-Blaufärbung bleibt auch im adulten Gehirn erhalten, so dass hier von einer permanenten Funktion des Gens *TRIM46* auszugehen ist, die nicht nur auf die embryonale Entwicklung beschränkt ist. Daher wäre ein chronischer Phänotyp durch den *TRIM46*-KO hier am Ehesten zu erwarten. Allerdings konnte auch hier keine auffällige morphologische Veränderung im Vergleich von Wildtypen mit hetero- und homozygoten *TRIM46*-KO innerhalb der Messempfindlichkeiten beobachtet werden, wobei Tiere bis zu einem Alter von 9 Monaten betrachtet wurden. Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass solche Veränderungen in späterem Alter noch auftreten, so wäre es wahrscheinlicher, nach Veränderungen in anderen Bereichen zu suchen, als das wären Veränderungen physiologischer Parameter und insbesondere angesichts des Gehirnes und Cortex im Verhalten, wobei im Hippocampus das Augenmerk auf die Lernfähigkeit zu richten wäre. Dazu später mehr.

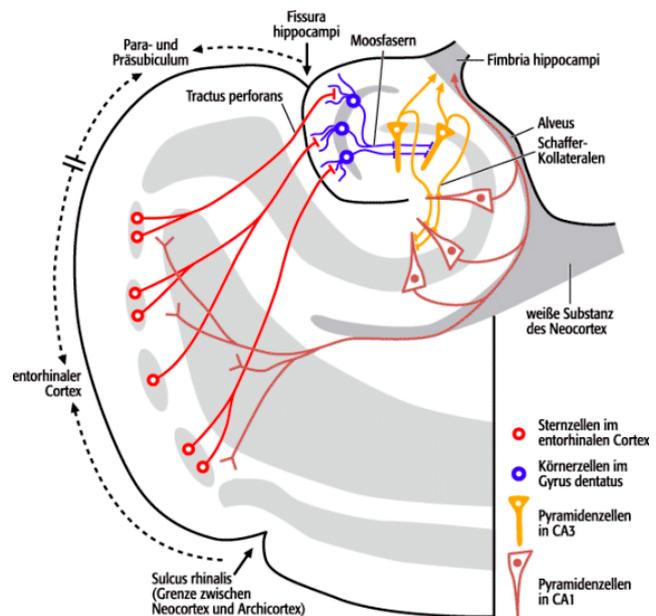


Abbildung 137: Nervenverknüpfungen zwischen entorhinalen Cortex und Hippocampus über Gyrus dentatus, CA1 und CA3 (Hanser 2001).

Protein-Interaktionspartner von TRIM46

Da die Auswertung der Expressionsmuster von *TRIM46* und der Vergleich dieser Gewebe zwischen KO und Wildtyp keinen offensichtlichen Phänotyp zeigte, bot es sich an, mit einer alternativen Strategie weitere Informationen über die mögliche Genfunktion zu erhalten. Da *TRIM46* ein Mitglied der TRIM-Proteinfamilie ist, die sich durch E3-Ubiquitinligase-Funktionalität kennzeichnet, war ein solcher Ansatz die Suche nach Protein-Interaktionspartnern mittels eines *Yeast-Two-Hybrid-Screens*. Für diesen Ansatz wurde die cDNA von *TRIM46* kloniert, wobei das Vorkommen von Splicevarianten und 2 verschiedene in Betracht kommende Protein-Isoformen festgestellt wurden. Diese waren nicht nur unterschiedlich lang, sondern zeigten in Zellkulturexperimenten eine abweichende subzelluläre Lokalisation, wobei die längere Variante sowohl im Zellkern als auch Cytoplasma, die kürzere nur im Cytoplasma vorkam. Beide Protein-Isoformen wurden für den *Yeast-Two-Hybrid-Screen* eingesetzt, wobei cDNA-Bibliotheken von Gehirn und Körper aus der Maus verwendet wurden. Hierbei wurden nur für die längere Variante Protein-Interaktionspartner gefunden.

Es wurde ein besonderes *Yeast-Two-Hybrid*-Verfahren der Firma *Mobitec* eingesetzt, das mit *GFP* als Reporter anstelle von β -*Galactosidase* arbeitet, wodurch das Verfahren sowohl schneller als auch sicherer gegenüber falsch positiven Resultaten sein sollte. Die Tatsache, dass für die kürzere Isoform von *TRIM46* nicht mal ein falsch positiver Klon gefunden wurde, obwohl beide Screens parallel und unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, deutet tatsächlich auf eine hohe Sicherheit demgegenüber hin. Umgekehrt wurden die für die längere Isoform gefundenen Klone dadurch umso wahrscheinlicher.

Bevor auf die gefundenen Interaktionspartner eingegangen wird, seien Schlussfolgerungen erwähnt, die für das Protein *TRIM46* selber gezogen werden können. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Isoformen geben wie in einem gezielten Deletions-Experiment Aufschluss über die an der Protein-Interaktion beteiligten Domänen des *TRIM46*. So besitzen beide Isoformen die TRIM-typischen Domänen RING-BBOX-BBC, in welchen auch die E3-Ubiquitinligase-Funktionalität von Vertretern der TRIM-Familie angesiedelt ist, jedoch fehlen der kürzeren Isoform die Domänen für *Fibronectin (FN3)* und *SPRY*. Die Protein-Interaktion muss also von diesen beiden Domänen, d.h. beiden zusammen oder einer von beiden, vermittelt werden. Denkbar wäre auch, dass beide mit jeweils unterschiedlichen Proteinen wechselwirken. Diese Frage könnte man nur mit einem gezielten Deletions-Experiment durchführen, wenn die Klärung dieser Frage von besonderem wissenschaftlichem Interesse wäre.

Insgesamt wurden 25 verschiedene Proteine als mögliche Interaktionspartner von *TRIM46* gefunden. Darunter befanden sich sowohl einige bekannte Proteine als auch viele bisher unveröffentlichte. Einige wurden mehrfach gefunden, was auf deren relative höhere Abundanz in den *gescreenten* cDNA-Bibliotheken schließen lässt, unter Umständen aber auch auf die Interaktionsstärke mit *TRIM46*, weil Klone mit starker Interaktion wahrscheinlicher die stringenten Selektionsbedingungen für die Hefe überleben. Auch die relative Leuchtintensität des *GFP*-Reporters kann in diese Richtung interpretiert werden. Als praktikabel erwies sich generell die Begutachtung unter einem Fluoreszenz-Binokular.

Mit 9 Klonen am häufigsten wurde ein bisher unveröffentlichtes Protein als Interaktionspartner für *TRIM46* gefunden, das für ein G-Protein-assoziiertes Protein annotiert (mCG140093, ***Gprasp2*** - *G protein-coupled receptor associated sorting protein 2*), die EST-Sequenzen der NCBI-Datenbank für Maus stammen bevorzugt aus Gehirn, insbesondere dem **visuellen Cortex** und Hypophyse sowie dem **Auge**. Über das Gen selber ist noch nichts publiziert, aber eine Annotation der Proteindomänen mit der ProDom-Datenbank ergab Homologie zu einer Interaktionsdomäne mit dem Protein *PER1*. Dieses ist zusammen mit *PER2* und *PER3* ein so genanntes Clock-Protein und Bestandteil des **circadianen Rhythmus**, der über das **Licht** des natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus synchronisiert wird, indem in der Zirbeldrüse (Epiphyse) *Melatonin* in wechselnder Konzentration ausgeschüttet wird (im Dunkeln mehr). Dieses steuert wiederum den Wach-Schlaf-Rhythmus und wirkt auf den Hippocampus, der für seine Leistungen zu Lernen und Gedächtnis den Schlaf braucht. Zudem erniedrigt hohe Melatoninkonzentration die Körpertemperatur und steuert bei bestimmten Tierarten den Winterschlaf (Oster, Maronde et al. 2002). Allgemein kann festgestellt werden, dass das Melatonin ein Hormon mit eher hemmendem Einfluss ist (beispielsweise hemmt es die Melaninsynthese). Über den genauen Mechanismus der Melatoninwirkung ist noch wenig bekannt. Alle bis jetzt bekannten Melatoninrezeptoren hemmen die cAMP-Bildung in der Zelle (Kokkola and Laitinen 1998). Bei der Ratte verändert Melatonin den Gefäßtonus über einen G-Protein vermittelten Mechanismus, der auch eine Rolle bei der Thermoregulation spielt. Auch vom Menschen ist bekannt, dass Melatonin eine blutdrucksenkende Wirkung hat. Die Hauptfundorte des Melatonin (Anreicherung an Rezeptoren) sind (Kokkola and Laitinen 1998): SCN (suprachiasmatisches Kerngebiet im vorderen Hypothalamus, pars tuberalis der Hypophyse, **Großhirnrinde**, Area postrema, präoptische Region, **Hippocampus**, **Kleinhirn**, **Plexus choroideus**, Thalamus, Commissura habenularum, **Niere**, Prostata, **Blutgefäße (Wand)**).

Unter der Hypothese, dass *Gprasp2* an den Signaltransduktionswegen für den circadianen Rhythmus beteiligt ist, so würde *TRIM46* dies über seine Interaktion auch sein und mittels seiner E3-Ubiquitinligase-Funktionalität die Proteinkonzentration von *Gprasp2* regulieren können, um auf das System der circadianen Rhythmik regulatorisch Einfluss zu nehmen. Die circadiane Rhythmik wäre ein Prototyp für eine Regulation auf Proteinebene, da es sich um eine relative kurzzeitige Regulation handelt, die zudem periodisch wiederkehrt. Entsprechend ist eine Regulation über das Ubiquitin-Proteasom-System für die *PER*-Proteine bekannt. Dies ist auch nahe liegend für andere Komponenten des Systems. Eine Microarray-Studie zu circadian regulierten Genen im SCN brachte bevorzugt Komponenten des Ras/MAKP-Pfades sowie des Ubiquitin/Proteasom-Systems hervor (Duffield, Best et al. 2002)

Zur weiteren Verfolgung dieser Hypothese stünden Verhaltensexperimente mit den *TRIM46*-KO-Mäusen hinsichtlich Veränderungen in der circadianen Rhythmik zur Debatte. Des Weiteren wären die Interaktionspartner von *Gprasp2* mit *Yeast-Two-Hybrid-Screen* aufzuklären, um dem ganzen Signalpfad nachzuspüren, analog auch die in dieser Arbeit gefundene Interaktion mit unabhängigen Methoden wie *GST-Pulldown* zu verifizieren.

Aber auch andere Funktionen von *Gprasp2* unabhängig von circadianer Regulation wären denkbar. Zwar ist zu *Gprasp2* noch nichts publiziert, aber zu dem verwandten *Gprasp1* gibt es erste Erkenntnisse. So soll die Funktion der G-Protein-Sortierung darin bestehen, G-Protein-Rezeptoren aus endozytotischen Vesikeln zum Abbau zu sortieren und somit deren Konzentration auf der Zellmembran zu kontrollieren, was die Empfindlichkeit gegenüber den Liganden steuert, was am Beispiel von Dopamin- und Opioidrezeptoren beschrieben wurde (Simonin, Karcher et al. 2004; Bartlett, Enquist et al. 2005). Aber auch in diesem Kontext deutet vieles auf Modulation von Verhaltensweisen der Tiere hin und weniger auf zu erwartende morphologische Veränderungen in einem *TRIM46*-Knock-out.

Der mit 5 Klonen zweithäufigste Klon aus dem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* war ***Ferritin Heavy Chain*** (mCG1931). Dieses zeigte auch im Hippocampus intensive Immunfärbung in denselben Gebieten der *TRIM46*-Expression (siehe Abbildung 63). Zudem konnte die Protein-Interaktion mit *GST-Pulldown* bereits verifiziert werden.

Ferritin ist ein Eisenbindeprotein und besteht aus 24 glykosylierten Domänen mit einer Gesamtmasse von 450 kDa. Es kann bis zu 5000 Eisen-Ionen speichern. Die 24 Untereinheiten bestehen aus einem variablen Verhältnis von *Ferritin Light* und *Ferritin Heavy Chain*.

Ferritin ist ein weit verbreitetes und gut untersuchtes Protein, das in vielen Zusammenhängen vorkommt. In Bezug zu *TRIM46* wären die bisherigen Erkenntnisse über *Ferritin Heavy Chain* im Gehirn und Hippocampus sowie im Blutgefäßsystem Anhaltspunkte.

Im Gehirn und Hippocampus konzentrieren sich die Arbeiten insbesondere auf eine neurodegenerative Wirkung von überexprimiertem *Ferritin* und die Koinzidenz von erhöhter *Ferritin*-Konzentration in **Alzheimer** und **Epilepsie**-Erkrankungen (Gorter, Mesquita et al. 2005; Quintana, Bellefqih et al. 2006) mit besonderem Fokus auf den **Hippocampus** und **entorhinalen Cortex**, wobei die *Ferritin*-Konzentration nicht nur als symptomatisch, sondern als ursächlich für bestimmte Epilepsie-Formen diskutiert wird, da sie vor den Anfällen ansteigt.

TRIM46 wirkt nun mutmaßlich negativ regulierend auf *Ferritin*, d.h. also senkt dessen Konzentration. Im KO sollte also mehr davon da sein, die Sensitivität für Epilepsie möglicherweise erhöht. *Ferritin* speichert Eisen, d.h. je mehr *Ferritin*, desto weniger Eisen ist frei, je weniger freies Eisen, desto größer also die Sensitivität für Epilepsie. Wenn die Tiere unter normalen Laborbedingungen aber genug Eisen mit der Nahrung bekommen, dann könnte das alles wieder kompensieren. Daher wäre es ein Ansatz für zukünftige Verhaltensexperimente, diese auch unter dem Aspekt einer Eisen-Mangel-Diät durchzuführen, um das Pathologische unter diesen Umständen leichter durchbrechen zu lassen.

Die am stärksten betroffenen Hirngebiete bei der Alzheimer-Erkrankung sind Hippocampus und entorhinaler Cortex, was wiederum gut mit *TRIM46* und auch *Ferritin* übereinstimmt (Lazarov, Peterson et al. 2006). Die erhöhte *Ferritin*-Konzentration geht nicht mit einer Veränderung der mRNA-Konzentration von *Ferritin* einher, so dass die Regulation auf Proteinebene erfolgen müsste. Sollte sich ein Phänotyp des *TRIM46*-KO in diese Richtung entwickeln, so ist mit diesem allerdings erst in hohem Alter der Tiere zu rechnen, wohingegen diese Arbeit hier auf die Analyse früher Entwicklungsvorgänge bis zu einem mittleren Alter adulter Tiere angelegt gewesen ist.

Ferritin steht in der derzeitigen Forschung noch in einem anderen pathogenen Zusammenhang, nämlich der Entwicklung bestimmter Krebstumoren, die insbesondere auf eine starke Neubildung von Blutgefäßen angewiesen sind. So zeigen viele **Tumore** erhöhte *Ferritin*-Konzentrationen (Higgy, Salicioni et al. 1997). *Antisense*-Oligonukleotide gegen *Ferritin* verhindern sogar Tumorwachstum und lassen solche schrumpfen (Yang, Jiang et al. 2002). Der Mechanismus für die tumorfördernde Wirkung von zu viel *Ferritin* (umgekehrt deren Tumorbehinderung bei wenig *Ferritin*) kann auf die Eisen-chelatierende Funktion des *Ferritin* zurückgeführt werden, mithin also auf eine Senkung der Eisen-Ionenkonzentration im Cytoplasma. In der Einleitung wurde im Zusammenhang mit der Bildung von Blutgefäßen der zentrale

regulatorische Pfad über das *HIF*-Protein besprochen (siehe Seite 20). Die Bildung von neuen Blutgefäßen ist essentiell für das Tumorwachstum. Für die Bildung von Blutgefäßen ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *HIF* notwendig, was über einen Sensormechanismus für die Sauerstoffkonzentration erfolgt. In diesem Sensormechanismus sind aber Eisen-Ionen Ko-Faktoren, so dass die *HIF*-Aktivierung nicht nur über O_2 , sondern auch über die im Cytoplasma freie Konzentration an Fe^{2+} getriggert werden kann (Demidenko, Rapisarda et al. 2005). Dessen freie Konzentration wird aber vom *Ferritin* reguliert. Je mehr *Ferritin* neu gebildet wird, desto mehr Fe^{2+} zieht es aus dem Cytoplasma ab, was den gleichen Effekt wie Sauerstoffmangel hat und zur *HIF*-Aktivierung führt, in Folge dessen zur besseren Versorgung eines Tumors mit Blutgefäßen.

Die tumorfördernde Wirkung von einer Überaktivierung des *HIF*-Pfades wurde bereits nachgewiesen für den Fall, dass das *VHL*-Protein durch Mutation oder KO defekt ist (Haase, Glickman et al. 2001). In der *HIF*-Kaskade erfüllt dies die gleiche Wirkung wie zu wenig O_2 oder Fe^{2+} , also zu viel *Ferritin*.

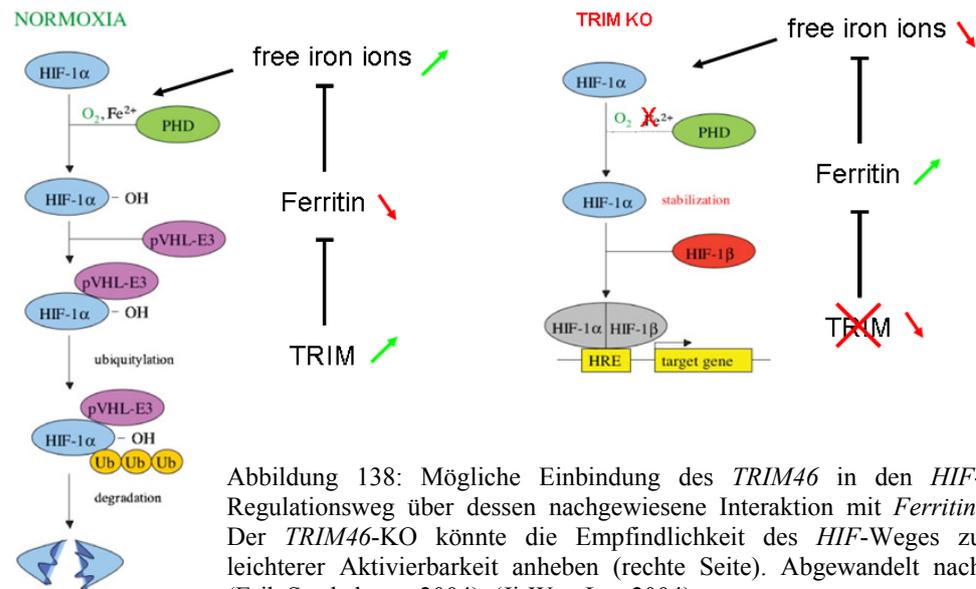


Abbildung 138: Mögliche Einbindung des *TRIM46* in den *HIF*-Regulationsweg über dessen nachgewiesene Interaktion mit *Ferritin*. Der *TRIM46*-KO könnte die Empfindlichkeit des *HIF*-Weges zu leichter Aktivierbarkeit anheben (rechte Seite). Abgewandelt nach (Erik Storkebaum 2004), (Ji-Won Lee 2004).

Mit seinem Einfluss auf *Ferritin*

könnte *TRIM46* eine tumorsuppressive Wirkung haben. Tatsächlich wurden in 3 von 20 Mäusen mit *TRIM46*-KO Tumore beobachtet, die sich mit einer hohen *lacZ*-Färbung für (im KO nicht mehr vorhandene) *TRIM46*-Expression kennzeichneten. *Ferritin* wurde zum damaligen Zeitpunkt noch nicht untersucht. Der Knock-out des *VHL*-Gens hingegen schien eine höhere Tumorzinzidenz zu bewirken (Haase, Glickman et al. 2001). Allerdings ist das *VHL*-Gen unmittelbar in dem *HIF*-Weg beteiligt, währenddessen *TRIM46* bestenfalls indirekt auf das *Ferritin* und dieses weiter über Fe^{2+} eingreifen kann. Hier können andere kompensatorische Mechanismen ausgleichen, da *Ferritin* nicht nur über seinen Proteinabbau, sondern auch über seine Transkription und auf mRNA-Ebene reguliert werden kann von anderen Faktoren.

Um eine mögliche, wenn auch indirekte, tumorsuppressive Wirkung überprüfen zu können, wären weitere Experimente zur gezielten Tumorinduktion notwendig, d.h. Screens mit cancerogenen Chemikalien oder Strahlung, die den Tieren zugeführt werden. Hierfür wäre die Tumorzinzidenz von *TRIM46*-KO-Mäusen zu Wildtypen statistisch zu vergleichen.

Der Knock-out des *VHL*-Gens zeigte neben Tumoren in der Leber auch hämorrhagische Läsionen. Solche konnten auch beim *TRIM46*-KO beobachtet werden, allerdings in der Lunge. Die Penetranz war mit 3 von 10 untersuchten Tieren höher als verglichen mit den 3 (anderen) von 20 Tieren mit Tumoren.

Das Gen *Fhl2* wurde als weiterer Interaktionspartner von *TRIM46* mit dem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* gefunden und durch *GST-Pulldown* verifiziert. Eine neue Veröffentlichung fand es herunterreguliert im entorhinalen Cortex bei Epilepsie-Patienten im Vergleich zu Gesunden (Jamali, Bartolomei et al. 2006).

Epilepsie befällt etwa 0,5% der Weltbevölkerung und hat eine starke genetische Komponente, die aber noch nicht aufgeklärt ist, da kein verlässlicher Biomarker existiert. Ursache ist eine elektrische Übererregbarkeit im ZNS.

So wie zuvor schon für das *Ferritin* beschrieben, gibt es auch für *Fhl2* in der Literatur Hinweise auf eine Verbindung zur Alzheimer-Krankheit. So wurde es mittels *Yeast-Two-Hybrid-Screen* als Interaktionspartner von *Presenilin-2* gefunden (Tanahashi and Tabira 2000). Dieses zeigt sich in vielen Alzheimer-Patienten mutiert, also nicht mehr funktional. Möglicherweise könnte der gleiche Effekt auch durch eine Hochregulation von *Fhl2* bedingt werden, wenn dadurch freies *Presenilin-2* genauso heraufreguliert werden würde, indem es an *Fhl2* gebunden wird. Die Hochregulation von *Fhl2* könnte dann auf den *TRIM46*-KO zurückgeführt werden, da *TRIM46* das *Fhl2* mutmaßlich negativ reguliert über seine E3-Funktionalität. Neben der überlappenden Expression im Gehirn ist *Fhl2* auch für sein Vorkommen in Arterien versus Venen beschrieben (Chu, Ruiz-Lozano et al. 2000).

Die *ATPase-Untereinheit VI* (mCG5800) wurde 4 Mal als Klon im *Yeast-Two-Hybrid-Screen* gefunden. Sie kommt in der Membran von endozytotischen Vesikeln vor (Myers and Forgac 1993; Liu, Feng et al. 1994) wodurch ein Zusammenhang mit *Gprasp2*, dem G-Protein Sortierungsprotein, bestehen könnte. Daneben wurde die *ATPase-Untereinheit VI* in starker Anreicherung in Alzheimer-Plaques gefunden, wie auch *Dynein Heavy Chain* (Liao, Cheng et al. 2004) und *Ferritin Heavy Chain* (Grundke-Iqbal, Fleming et al. 1990) als Interaktionspartner von *TRIM46*.

Über das *P116 RHO interagierende Protein* (hCT2257592) ist nichts weiter bekannt. Interessant sind die Fundorte seiner cDNA in der NCBI-EST-Datenbank. Dort werden die Harnblase (EST-Datenbankkennung: AK162530), das Innenohr (AK158296) und von aus Zellkultur NOD- sowie B6-abgeleiteten *CD11c +ve* dendritischen Zellen (AK154807 und AK155630) als Expressionsorte genannt, in denen auch *TRIM46* vorkommt (siehe virtueller Northern, Seite 94). Überlappende Expression wäre ein notwendiges, wenn auch nicht hinreichendes Kriterium für funktionale Interaktion mit *TRIM46*. Aus den Daten gehen leider keine Hinweise auf die Art dieser Funktion hervor.

Spectrin-β2 (mCG118463) überlappt in seiner Expression mit *TRIM46* im Innenohr sowie Purkinje-Zellen des Cerebellums, Hippocampus, Lunge und Niere. Es wurde als Bestandteil eines Multiprotein-Komplexes beschrieben, der an der Ausbildung einer bestimmten Form von Epilepsie beteiligt ist (Di Giaimo, Riccio et al. 2002). In derselben Veröffentlichung wird auch *RACK1* (Rezeptor für aktivierte Protein-Kinase C, mCG19409) diesem Proteinkomplex zugeordnet, das ebenfalls in dem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* für *TRIM46* gefunden wurde. *RACK1* überlappt mit *TRIM46* darüber hinaus im Hippocampus, Gyrus dentatus (Ashique, Kharazia et al. 2006) und ist hochreguliert in Angiogenese. *Spectrin-β2* ist als integraler Bestandteil von Alzheimer-Plaques beschrieben worden (Saitoh, Horsburgh et al. 1993; Sihag and Cataldo 1996).

Das endothelabgeleitete Gen *Eg1* (synonym *MED28*; *Mediator der RNA Polymerase II*, mCG21482) als Interaktionspartner von *TRIM46* aus dem *Yeast-Two-Hybrid-Screen* gilt als **Tumorangiogenese-Marker** (NCBI-Kennung: AF358829) und seine ESTs sind neben Tumoren auch in den *CD11c +ve* dendritischen Zellen beobachtet worden (AK154249), (Liu, Zhang et al. 2002; Zhang, Maul et al. 2004; Lu, Zhang et al. 2005). Funktionell steigert es die Tumorpherifation (Lu, Zhang et al. 2005) und ist in entsprechenden Tumoren hoch reguliert. Daneben kommt es allgemein in auch anderen Endothelien vor (Liu, Zhang et al. 2002). Im Endothel von Blutgefäßen kommt es sowohl in Arterien als auch Venen und Kapillaren vor. Auf molekularer Ebene fungiert *MED28/Eg1* als Transkriptionsaktivator (Sato, Tomomori-Sato et al. 2004).

Sollte *TRIM46* mit seiner E3-Funktionalität negativ regulierend auf *Eg1* einwirken können, so wäre das eine tumorsuppressive Wirkung. Darüber hinaus könnte es die Proliferation in Arterien anders regulieren als in Venen und Kapillaren, wo *TRIM46* nicht vorkommt.

Das Gen *Kif2a* (mCG9794) als mutmaßlicher Interaktionspartner von *TRIM46* ist wie dieses insbesondere im Hippocampus exprimiert (Homma, Takei et al. 2003). Es wirkt auf Mikrotubuli und beeinflusst darüber die Anzahl und Extension von dendritischen Nervenanswüchsen wie in einem Knock-out

nachgewiesen. Im Sinne der Interaktion mit *TRIM46* würde der *TRIM46*-KO allerdings den umgekehrten Effekt einer Anreicherung von *Kif2a* bewirken, worüber bisher nichts bekannt ist.

Das Gen *Usp33* (ubiquitinspezifische Protease, synonym *VDU1*, mCG21832) als mutmaßlicher Interaktionspartner von *TRIM46* wurde als Zielprotein von *pVHL*, dem Von-Hippel-Lindau-Protein aus dem *HIF*-Regulationsweg (siehe oben unter *Ferritin*) gefunden (Li, Na et al. 2002). Seine Funktion besteht in der Deubiquitinierung, also einem antagonistischen Prozess zu *pVHL*, welches ubiquitiniert. Als Zielprotein für die Deubiquitinierung ist jedoch *HIF-1α* ausgeschlossen (Li, Wang et al. 2005), wobei dieses aber von dem verwandten Protein *VDU2* deubiquitiniert wird.

Über *Usp33/VDU1* und dessen Interaktion mit *pVHL* wäre *TRIM46* mit einem weiteren Anknüpfungspunkt zusätzlich zu seiner Wechselwirkung mit *Ferritin* an den *HIF*-Regulationsweg angebunden. Die Richtung der Wirkung bleibt allerdings unklar, ob *Usp33* auch von *TRIM46* ubiquitiniert wird oder ob es selber deubiquitiniert und somit stabilisierend auf *TRIM46* wirkt.

In einem anderen Zusammenhang aktiviert *Usp33* die Synthese von *3,5,3'-Triiodothyronin (T3)*, das für die Gehirnentwicklung notwendig ist (Curcio-Morelli, Zavacki et al. 2003). Sollte *TRIM46* mit seiner E3-Funktionalität negativ auf *Usp33* einwirken, so würde dies im *TRIM46*-KO nicht so sein und *Usp33* sowie in Folge *T3* wäre erhöht. Interessant ist hierbei, dass eine erhöhte *T3*-Konzentration bei Alzheimer festgestellt wurde (Sampaolo, Campos-Barros et al. 2005). Zudem hat *T3* einen direkten Einfluss auf das alternative Splicen und die Proteinsekretion des β -Amyloid-Proteins (Latasa, Belandia et al. 1998), welches die Hauptkomponente der Alzheimer-Plaques darstellt und das zentrale Protein der Krankheit ist.

Ausblick – Richtung weiterer Forschung an *TRIM46*

Zusammenfassend geben die **Protein-Interaktionspartner von *TRIM46*** noch keine ausgiebige Erklärung für dessen mögliche Funktion, weil **viele davon selber noch unbekannte Proteine sind**. Bei denjenigen, über die bereits etwas veröffentlicht ist, fällt die **Tendenz** auf, dass sie **häufig im Zusammenhang mit** bestimmten Krankheiten wie **Alzheimer** und **Epilepsie** sowie **Tumoren** genannt werden.

Die Expressionsmuster und die wiederkehrenden Kontexte der mutmaßlichen Interaktionspartner sind konsistent, ja geradezu suggestiv, dass hier auch eine Funktion zu erwarten wäre. Tatsächlich wurden Tumore gehäuft im *TRIM46*-KO gefunden. Demgegenüber sind für die möglichen Funktionen von *TRIM46* im Gehirn mit den in dieser Arbeit angewandten wissenschaftlichen Methoden keine Hinweise gefunden worden. Hierfür wären weitere Versuche anderer Wissenschaftszweige wie insbesondere der Verhaltensforschung notwendig. Diesbezüglich wurden Kooperationen mit anderen Forschungsgruppen eingeleitet (JSW-Research, Graz, Österreich).

Da *TRIM46* wahrscheinlich mit seiner E3-Funktionalität die Konzentrationen seiner Zielproteine senkt, wäre es denkbar, dass weniger ein Knock-out als eher eine Überexpression von *TRIM46* zu einem stärker sichtbaren Phänotyp führen könnte. Denn in dem Knock-out sind die Zielproteine alle weiter vorhanden, würden mit der Zeit akkumulieren, was zu chronischen Störungen führen könnte, wohingegen eine Überexpression von *TRIM46* zu einer Senkung bis hin zu einem Wegfall der Zielproteine führte, was einen akuten Funktionsverlust und folglich drastischeren Phänotyp bedeutete.

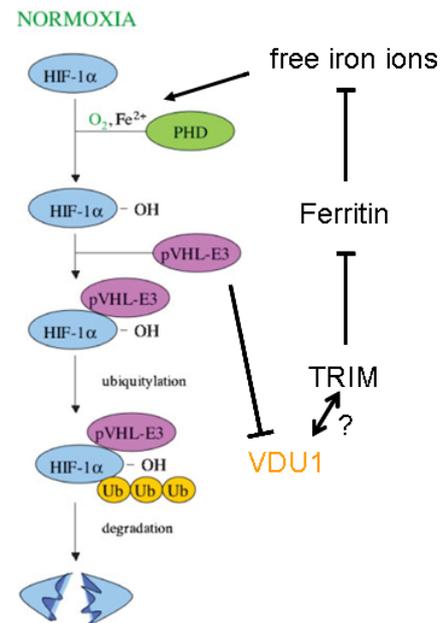


Abbildung 139: In dieser Arbeit konnte die Interaktion von *TRIM46* mit *VDU1* und *Ferritin* mittels *Yeast-Two-Hybrid-Screen* und im Falle des *Ferritins* auch mit *GST-Pulldown* gezeigt werden. Über beide Proteine ist eine Anbindung an den *HIF*-Regulationsweg möglich. Hierbei ist offen, wie die Wechselwirkung zwischen *TRIM46* und *VDU1* aussähe, ob aktivierend oder repressiv. Über *HIF* wird die Transkription von *VEGF* reguliert, das die Angiogenese anregt.

Andere Arbeitsgruppen haben zum Teil ähnliche Erfahrungen mit anderen vergleichbaren Genen gemacht. In der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Gruss wurde von einem anderen Doktoranden (Martin Ballastik) ein weiteres Protein der TRIM-Familie untersucht. Dieses zeigte seinen Phänotyp erst in 15 Monate alten Tieren, die aufgrund des Verlustes von Purkinje-Zellen im Cerebellum Motorkoordinationsstörungen entwickelten.

Eine andere Arbeitsgruppe aus den USA berichtet von einem Gen mit auch Zink-Ring-Finger-Struktur und Protein-Protein-Interaktionsfähigkeit sowie E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität zur Regulation von Zielproteinen (Ruan, Tecott et al. 2001), das zum Teil ähnliche Expression im Hippocampus und corticalen Bereichen der Riechwahrnehmung besitzt wie *TRIM46*. Dieses Gen zeigte im KO keinen auffälligen morphologischen Phänotyp, auch nicht in den betroffenen Hirnstrukturen, sondern nur im Verhalten, Defizite in der Riechwahrnehmung und Ethanol sensitivität. Möglicherweise wäre ein Doppel-KO durch Verpaarung der beiden Mauslinien ein Ansatz für einen synergistischen Phänotyp.

Da *TRIM46* im Hippocampus (insbesondere Gyrus dentatus, CA2) exprimiert ist sowie im entorhinalen Cortex, der Amygdala und im Innenohr, bieten sich insbesondere solche Verhaltensversuche an, bei denen Lernen und Gedächtnis, Angst, Riechwahrnehmung, Hören, sowie verknüpfendes Lernen/Konditionierung auf Riech-/Hörreize geprüft wird, ähnlich wie in dem gerade zitierten Artikel. Diese Versuche sind für die Kooperation mit der auf Verhaltensforschung spezialisierten Forschungsgruppe JSW-Research aus Graz in Österreich eingeleitet worden.

Die mit *Yeast-Two-Hybrid* gefundenen Proteine weisen ebenso weniger auf Funktionen in morphologischen Veränderung als auf dynamische temporär veränderliche Prozesse innerhalb unangetasteter zellulärer Morphologie hin, insbesondere die Mitglieder von Signaltransduktions-Kaskaden wie G-Protein-assoziierte Proteine, Rho-Proteine, die an Informationsverarbeitungs- und Verhaltensprozessen beteiligt sein könnten.

Die Funktion von TRIM-Proteinen ist mit ihrer E3-Ubiquitinligase, andere Proteine für den Abbau im Proteasom zu markieren, also Genregulation auf Proteomebene, neben siRNA/miRNA auf Transkriptomebene und den Transkriptionsfaktoren auf Genomebene. Sie fungieren somit als Schalter oder Begrenzer, als Schalter dann, wenn sich der zelluläre Zustand ändert und dafür eine Reihe Proteine schnell entsorgt werden müssen, die zu dem neuen Zustand nicht mehr passen. Transkriptionsfaktoren können zwar neue Gene anschalten und so den Zustand einer Zelle verändern, aber nicht gezielt die Proteinreste eines alten Zustandes beseitigen, was aber auch notwendig ist, damit die Zellen vollständig und in definierter Zeit den Zustand umschalten. Als Begrenzer fungieren sie, indem sie die Konzentration der Proteine, welche konstitutiv exprimiert werden, begrenzen. Somit sind viele TRIM-Gene auch Tumorsuppressoren (*TRIM46* vielleicht auch).

Die Funktion als Schalter auf Proteomebene und die Interaktion mit Proteinen der Signaltransduktion zusammen mit der Lokalisation im Gehirn und insbesondere im Hippocampus, dieser zentralen Struktur für Lernen und Gedächtnis, macht den Ausgang der Verhaltensexperimente erwartungsvoll und spannend.



Abbildung 140: Auswahl standardisierter Verhaltenstests für Mäuse. Links das *Rotarod* für Überprüfung der Motor-koordination. In der Mitte ein *8-Arm-Labyrinth* für Lernen und Gedächtnis. Rechts das *Wasser-Labyrinth* („*Water-Maze*“), bei dem die Tiere eine unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform erreichen müssen, um aus dem Wasser zu kommen. Dazu müssen sich die Tiere an Landmarken wie Tischen, Stühlen orientieren, um die Plattform so im Wiederholungsfalle schneller direkt erreichen zu können.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Microarray-Expressionsanalyse mit dem Ziel durchgeführt, neue Gene mit regionalisierter Expression im cerebralen Cortex der Maus zu finden. Die auf diese Weise gefundenen Gene wurden annotiert und mittels in-situ-Hybridisierung verifiziert. Neben bekannten Genen wurden 26 neue ESTs gefunden, von denen 5 in dieser Arbeit ausführlicher dargestellt wurden. Diese konnten als neue Markergene für die Cortexentwicklung identifiziert werden, die bisher noch gar nicht bzw. nicht für den Cortex veröffentlicht sind. Die Befunde sind zum Teil sehr überraschend gewesen und konnten bisherige Annahmen zu den Genen widerlegen. So zeigte das Gen *Nse1* eine fast ausschließliche Expression im Gehirn und dort im frontalen Cortex, obwohl es aufgrund seiner bekannten Funktion in der Hefe als ein ubiquitäres Gen postuliert wurde, was allerdings auch längere Zeit verhindert haben mag, dass die Expression dieses Gens bisher genauer untersucht wurde. Mit seiner möglichen Funktion in der Genregulation durch Beeinflussung des Chromatinzustandes ist eine wichtige Rolle in der Gehirnentwicklung anzunehmen, so dass diese Entdeckungen gute Grundlagen weiterer Forschung sein dürften, insbesondere da der frontale Cortex auch beim Menschen für dessen höhere kognitiven Leistungen sowie das soziale Verhalten eine besondere Rolle spielt.

In dem Wettstreit der beiden Theorien um die Cortexspezifizierung, dem Protocortex-Modell auf der einen Seite, welches die „Fernprogrammierung“ des Cortex durch einwachsende thalamische Afferenzen annimmt, und dem Protomap-Modell auf der anderen Seite, welches intrinsische Faktoren vorzieht, konnten in dieser Arbeit weitere 2 Gene gefunden werden, die bereits eine intrinsische Identifizierung zulassen. Die Gene *ERM (Etv5)* und *TRIM46* zeigten Expression in ihren speziellen corticalen Arealen bereits vor dem Eintreffen thalamo-corticaler Projektionen zum Stadium E14 und behielten diese bis zum Abschluss der embryonalen Cortexentwicklung bei bzw. weiteten diese darüber hinaus aus.

Das Gen *TRIM46* wurde für eine detailliertere Analyse ausgewählt, weil es einer bekannten Proteinfamilie angehört, von deren Vertretern viele an Krankheiten auch im Menschen beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Knock-out-Maus von *TRIM46* angefertigt und die Tiere vom embryonalen Stadium E9 an bis zu einem adulten Alter von 10 Monaten hinsichtlich eines Phänotyps untersucht. Hierbei konnte im Gehirn keine offensichtliche morphologische Veränderung festgestellt werden und auch bekannte Markergene blieben in ihrer Expression unverändert, wobei eine solche Markeranalyse allerdings keinen Anspruch auf Vollständigkeit haben kann, sondern nur eine bestimmte Anzahl aus rationalen Motiven ausgewählt wurde. Das Gen zeigte neben dem Gehirn aber auch Expression im Endothel von wachsenden Arterien und anderen Endothelien in der Lunge, der Niere, der Harnblase, dem Darm, dem Innenohr, dem Auge. Hier konnten Abnormitäten in den Tieren festgestellt werden, allerdings mit relativ geringen Penetranzen von einigen Prozent der Geborenen. Es zeigten sich Blutungen mit Entzündungen in der Lunge und in einem Einzelfall erhöhte Glukosespiegel im Urin. Auffälliger waren die Ausbildungen von Tumoren in mehreren der Tiere. Zur genaueren Charakterisierung dieser Vorfälle müssten Langzeitstudien mit einer größeren Tierzahl durchgeführt werden. Auch Versuche zur gezielten Tumorinduktion wären sinnvoll. Ferner besteht Berechtigung zu der Aussicht, dass mit weiter fortschreitendem Alter der Versuchstiere sich noch ein deutlicherer Phänotyp entwickeln kann bzw. die Penetranzen steigen, da – wie in der Diskussion besprochen – mehrere verwandte und Gene ähnlichen Typs erst chronisch über einen längeren Zeitraum zu einem Ausbruch der jeweiligen Defekte führen. Dies kann auf die Funktion dieser Proteine als E3-Ubiquitinligase begründet werden, die andere Proteine über den Abbau im Proteasom regulieren und bei Wegfall dieser Funktion zu einer Akkumulation dieser Zielproteine in den Zellen führen mögen, die irgendwann im Leben der Zellen bzw. Tiere an Toleranzgrenzen stößt. In diesem Zusammenhang wurde auch diskutiert, ob vielleicht eine Überexpression, also „Knock-in“ statt eines Knock-outs zu akuterer Effekten führen würde.

Die Microarray-Expressionsanalyse in dieser Arbeit hatte den Fokus auf das Entwicklungsstadium E18,5, zu dem allgemein die primäre Cortexentwicklung gerade abgeschlossen ist. Erwartungsgemäß dürften hier weniger solche Gene zu finden sein, bei deren Ausfall sich große morphologische Veränderungen, etwa Fehlen corticaler Strukturen, abzeichneten. Dies wäre eher für Gene zu erwarten, die aus einer Expressionsanalyse von früheren Stadien wie E16 und E14, die allerdings von anderen schon durchgeführt waren, hervorgingen, wo der Cortex in seiner Anfangsentwicklung ist. Die in der Expressionsanalyse zum Stadium E18,5 gefundenen Gene sollten eher eine Funktion in dem Feinbau oder der funktionalen Reifung des Cortex haben. Folglich könnte es sein, dass die Suche des Phänotyps im Gehirn für das Gen *TRIM46* nach Veränderungen der Morphologie sowie von Markergenen grundsätzlich an Grenzen stößt und man sich anderer Techniken und auch der Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftsgebieten bedienen sollte. Hierzu wurde eine Kooperation mit einer Arbeitsgruppe der Verhaltensforschung (JSW-Research, Graz, Österreich) eingeleitet.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein *Yeast-Two-Hybrid-Screen* durchgeführt, um Protein-Interaktionspartner für das Gen *TRIM46* zu finden, die weitere Hinweise auf dessen Funktion auf molekularer Ebene bringen sollten. Leider sind viele der dabei festgestellten Proteine genauso unbekannt wie das *TRIM46*, so dass sie zwar Hinweise auf neue Regulationssysteme in Zellen geben, jedoch keine weiteren Anhaltspunkte über deren Funktion. Es fanden sich aber auch einige bekannte Proteine als Partner wie das *Ferritin* oder *Fhl2*. In den Veröffentlichungen von vielen der Interaktionspartner tauchen Zusammenhänge mit Epilepsie, Alzheimer-Erkrankung und Tumoren gehäuft auf. In der Diskussion wurde eine Hypothese für die denkbare tumorsuppressive Wirkung von *TRIM46* durch seine Regulation von *Ferritin* im Zusammenhang des für die Angiogenese bedeutsamen *HIF*-Regulationsweges aufgestellt, die Gegenstand weiterer Überprüfung wäre. Neben dem *Ferritin* wurde auch *Egl* als Tumorangiogenese-Marker in der Literatur beschrieben und hier mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-Ansatz gefunden, ebenso der Faktor *Usp33/VDU1* als bekannter Interaktionspartner des *HIF*-Weges, wodurch sich die Hinweise verdichten.

Diskutierte Hypothesen über mögliche Auswirkungen eines *TRIM46*-KO gehen über mehrere Stufen und somit indirekte Wirkungen, was wiederum Raum für kompensatorische Mechanismen gibt. Auf der anderen Seite können solche indirekten und über mehrere Stufen und Partner vermittelten Fernwirkungen ein neuer Ansatz zur Erklärung von gerade komplizierten, chronischen oder nur mit geringer Penetranz auftretenden Phänotypen und Krankheiten sein, die die Wissenschaft heute eben wegen dieser Komplexität bisher nicht erklären bzw. auf ihre eigentlichen Ursachen zurückführen kann. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ansätze wären folglich für zukünftige Forschungen wertvoll in der Erwartung, sie in den Kontext weiterer Fortschritte auch auf anderen mit ihnen zusammenhängenden Gebieten stellen zu können und so schließlich den Gesamtzusammenhang nach und nach zu erarbeiten. Die hier dargestellte Arbeit wäre dann ein erster Schritt in eine solche Richtung.

Materialien und Methoden

Materialien

Chemikalien

Hersteller/Lieferant

Produktname (Bestellnummer/Charge, Molekulargewicht, Lagerungsbedingungen falls spezifiziert).

Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA 92039 USA

Bisbenzimidazole H 33258 Fluorochrome Trihydrochloride (382061/B16084, 533,9 g/mol, bei 4°C lagern).

CVH Chemie-Vertrieb Hannover GmbH & CO KG, Podbielskistr. 22, 30163 Hannover

Ethanol 99% vergällt (002E6E02_QS05/3).

O. Kindler GmbH & CO, Ziegelhofstraße 214, D-79110 Freiburg

Eukitt[®] Einschlussmittel für mikroskopische Technik (bei RT lagern).

Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberger Straße 17-19, D-69226 Nussloch

Tissue Freezing Medium[®], Einbettmedium für Gefrierschnitte (0201 06926/643293 2007 02).

Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, D-64293 Darmstadt

Aceton (K32892814/406, 58,08 g/mol, in Sicherheitsschrank mit Abzug lagern).

Eosin G Certistain[®] (45380/100g 616 K886235, 691,91 g/mol, bei 15-25°C lagern).

Essigsäure (Eisessig) 100% wasserfrei (K34243263/504, 60,05 g/mol, Sicherheitsschrank mit Abzug).

Kaliumchlorid KCl (K30323436/214, 74,55 g/mol).

Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (A324973/220, 136,09 g/mol).

Natriumchlorid NaCl (K34243404/504, 58,44 g/mol).

di-Natriumphosphat-Dihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (K32203480/335, 177,99 g/mol).

Natriumphosphat-Dihydrat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (K91641945/023, 156,01 g/mol).

Salzsäure rauchend 37% (K34071617/501, 1 l = 1,19 kg, in Sicherheitsschrank mit Abzug lagern).

Merck-Schuchardt, Eduard-Buchner-Str. 14-20, D-85662 Hohenbrunn

Tween[®] 20 (S37598/310, 1227,72 g/mol).

Sigma Chemical CO., P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA

DMSO Dimethylsulfoxid (D-8779/34H06231, 78,13 g/mol, bei RT lagern).

Gelatin Type A From Porcine Skin Bloom [9000-70-8] (G-1890/54H07245, bei RT lagern).

Hämatoxylinlösung Accustain[®] Harris (HHS16-500ML/064K4353, bei 18-26°C lagern).

Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 USA

Antigen Unmasking Solution (H-3300, Lagerung bei 4°C).

Vectashield H-1000 Mounting Medium For Fluorescence (H-1000/P1216, bei 4°C lagern).

Vectashield H-1300 Mounting Medium With Propidium Iodide (H-1300/P1001, bei 4°C lagern).

Vogel GmbH & CO. KG, Marburger Str. 81, 35396 Giessen

„HistoClear“ – Xylolersatz XEM-20 (ND-HS-2001).

Lösungen

FixA: 2,7 ml 37% Formaldehyd + 0,8 ml 25% Glutaraldehyd + 0,2 ml 10% NP-40 mit PBS auf 100 ml aufgefüllt.

FixB: 2,7 ml 37% Formaldehyd + 0,8 ml 25% Glutaraldehyd + 2 ml 10% NP-40 + 10 ml 1% DOC (Na-Desoxycholat) mit PBS auf 100 ml aufgefüllt.

Hoechst-Stain (2000x):
0,1 mg/ml Bisbenzimid H 33258 in Millipore H₂O aufgelöst.

PBS (20x): 160 g NaCl + 4 g KCl + 26,94 g Na₂HPO₄·2H₂O, 1,95 g + NaH₂PO₄·2H₂O + 4 g KH₂PO₄, aufgelöst in 1 l Millipore-H₂O.

PBT: 50 ml 20xPBS + 2 ml Tween[®] 20, verdünnt zu 1 l Millipore-H₂O.

x-Gal-Färbelösung: 2 ml MgCl₂ (100 mM) + 2,5 ml K₄Fe(CN)₆ (200 mM) + 2,5 ml K₃Fe(CN)₆ (200 mM) + 2,5 ml X-Gal (40 mg/ml in Dimethylformamid) mit PBS zu 100 ml.

GST-Resuspensionspuffer:
50 mM Tris pH 7,5 + 500 mM NaCl + 2 mM EDTA + Protease Inhibitor Cocktail (Roche).

GST-Waschpuffer: 50 mM Tris pH 7,5 + 1000 mM NaCl + 2 mM EDTA + Protease Inhibitor Cocktail (Roche).

GST-Bindepuffer: 20 mM Tris pH 7,5 + 100 mM NaCl + 1 mM EDTA + 0,1% NP-40 + 1 mM PMSF (frisch dazugegeben).

GST-Reinigungspuffer:
20 mM Tris pH 7,5 + 150 mM NaCl + 1 mM EDTA + 0,1% NP-40 + 1 mM PMSF (frisch dazugegeben).

SDS-2x-Ladepuffer:
6% β-Mercaptoethanol, 6% SDS, 0,6% Bromphenol-Blau, 20% Glycerol.

SDS-Laemmli-Puffer:
25 mM Tris-HCl pH 7,5 + 250 mM Glycin + 0,1 % SDS.

SDS-Trenngel (12%):
10 ml 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid (Bio-Rad) + 6,25 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 + 0,25 ml 10% SDS + 0,25 ml 10% Ammoniumsulfat + 25 µl TEMED + 8,5 ml dest. H₂O.

SDS-Sammelgel (4%):

1,3 ml 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid (Bio-Rad) + 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 + 0,1 ml 10% SDS + 0,1 ml 10% Ammoniumsulfat + 20 µl TEMED + 6 ml dest. H₂O.

10x TBE:

218 g Tris-Base + 110 g Borsäure + 9,3 g EDTA gelöst in 2 l dest. H₂O, pH 8.3.

TE-Puffer:

1 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 + 0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 in 100 ml dest. H₂O.

6x Ladepuffer für Agarosegele:

15% Ficoll 400 + 60 mM EDTA pH 8,0 + 0,01% Bromphenol-Blau + 0,03% Xylencyanol.

λ-Verdünnungspuffer: 0,1 M NaCl + 8 mM MgSO₄ + 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 + 0,01% Gelatine

Proteinase K-Lysepuffer:

100 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 5mM EDTA + 0,2% SDS + 200 mM NaCl + 1 mg/ml Proteinase K.

In-situ Hybridisierungsmix:

50% Formamid + 5x SSC + 1% Boehringer Block + 5 mM EDTA + 0,1% Tween 20 + 0,1 % CHAPS + 0,1 mg/ ml Heparin + 1 mg/ml tRNA.

In-Situ KTBT:

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 150 mM NaCl + 10 mM KCl + 1% Triton X-100.

In-Situ Blocklösung:

20% Schafserum in KTBT.

In-Situ NTMT:

100 mM Tris-HCl, pH 9,5 + 100 mM NaCl + 50 mM MgCl₂ + 0,05 % Tween 20.

In-Situ PBT:

PBS mit 0,1% Triton X-100 mit DEPC behandelt und autoklaviert.

Southern-Hybridisierungslösung:

6x SSC + 0,01 M EDTA + 5x Denhardt-Lösung + 0,5% SDS

RNA-Hybridisierungspuffer:

25 mM KPO₄ pH 7,4 + 5x SSC pH 7,5 + 50 µg/ µl Heringsspermium-DNA + 50% Formamid + (0,02% Ficoll + 0,02% Polyvinylpyrrolidon + 0,02 % BSA) + (alternativ zu den Sachen in Klammern 5x Denhardt-Lösung).

RNA-Ladepuffer:

1 mM EDTA + 0,25% Bromphenolblau + 0,25% Xylencyanol + 50% Glycerin

10x MOPS-Puffer:

0,2 M MOPS + 0,5 M Natriumacetat + 0,01 M EDTA

Kits

MoBiTec, Lotzestr. 22A, 37083 Göttingen

Grow'n'Glow GFP Two-Hybrid System "Complete Kit" (GNGK01, bei 4°C gelagert, Hefestämme bei -70°C).

Grow'n'Glow High Efficiency Yeast Transformation Kit (2200-1).

Grow'n'Glow Yeast-Plasmid Isolation Kit (2069-1).

Verschiedene Selektionsmedien für die Hefezellen (4001-1, 4001-2, 4025-1, 4026-1, 4025-2, 4026-2, 4510-3, 4511-2, 4520-3, 4520-4, 4520-5, 4530-8, 4540-0).

OriGene Technologies, Inc., AMS Biotechnologie GmbH, Henkellstr. 15, 65187 Wiesbaden

cDNA-Library mouse embryo 19 day, DupLEX-A (DLM-110) mit 1×10^7 verschiedenen Klonen und einer Größenverteilung der Fragmente von 0,2-2,5 kbp.

cDNA-Library mouse brain adult, DupLEX-A (DLM-100) mit $6,1 \times 10^6$ verschiedenen Klonen und einer Größenverteilung der Fragmente von 0,3-1,7 kbp.

Qbiogene, Waldhofer Str. 102, 69123 Heidelberg

ApopTag[®] Kit S7160 für Apoptose-Detektion

Sonderzubehör

12-Well-Plastikbehälter - Cellstar[®] 12 Well Suspension Culture sterile DNase and RNase free:
Greiner Bio-One, Krablerstr. 127, D-45326 Essen, Germany.

ImmEdge Pen – Fettstift für histochemische Färbungen: Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA 94010 USA, Cat. No. H-4000.

Verwendete Plasmide, Marker, PCR-Primer, Oligonukleotid-Sonden, Antikörper

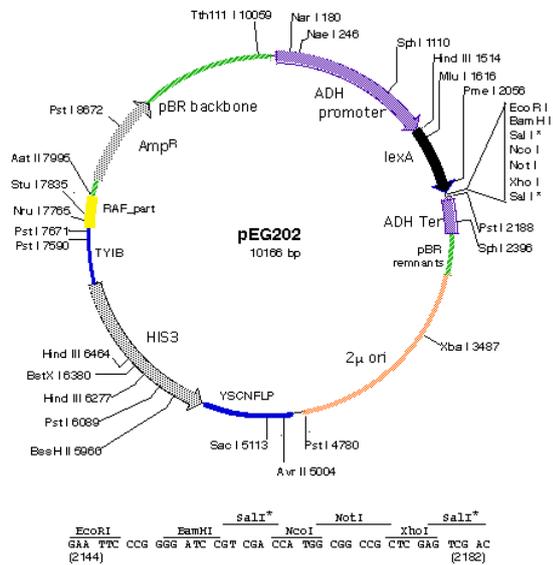


Abbildung 142: Plasmid-Karte von pEG202, dem Bait-Vektor für Yeast-Two-Hybrid-Screen. ACCESSION U89960, 10166 bp complete sequence, promoter 67-1511, lexA 1538-2227, ADH Ter 2209-2522, pBR remnants 2540-2889, 2m ori 2890-4785, YSCNFLP 4923-5729, HIS3 7190-5699, TYIB 7243-7707, RAF_part 7635-7976, pBR backbone 7995-10166, bla 8131-8988.

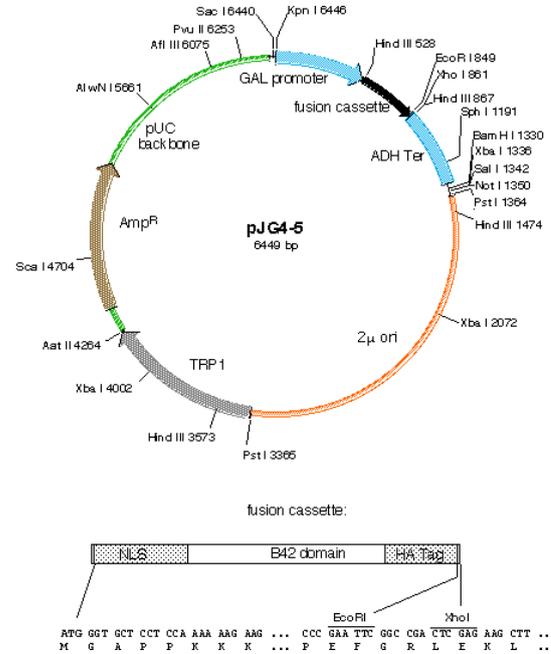


Abbildung 141: Plasmid-Karte von pJG4-5, dem Prey-Vektor für Yeast-Two-Hybrid-Screen. Der Vektor wurde zusammen mit den darin enthaltenen cDNAs der cDNA-Libraries von OriGene verwendet. 6449 bp complete sequence, GAL promoter 1-528, fusion cassette 528-849, ADH Ter 867-1315, 2m ori 1371-3365, TRP1 3365-4250, pUC backbone 4264-6422, Ap 4412-5274.

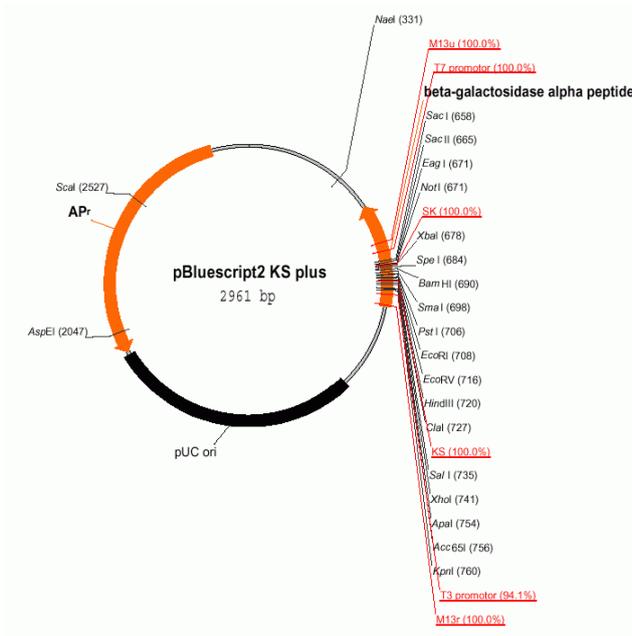


Abbildung 143: Der Vektor pBluescript II KS+ von Stratagene, der als Standard-Klonierungsvektor unter anderem auch für die Herstellung des Knock-out-Konstruktes verwendet wurde. Ampicillin Resistenz mit 50-200 µg/ml.

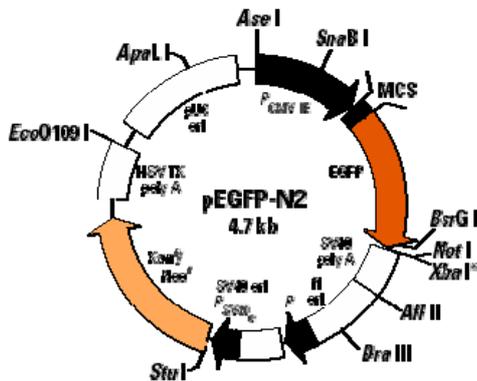


Abbildung 144: Vektor **pEGFP-N2** von Clontech mit Accession Number U57608 zur Anfertigung von **EGFP-Fusionsproteinen**, die in eukaryotischen Zellen exprimiert werden können. Die Fusion erfolgt N-terminal des **EGFPs**, so dass **das einzuklonierende Fusionsprotein das initiale ATG-Codon mitbringen muss**. Fusion an den N-Terminus von **EGFP** hat den Vorteil, dass später nur dann grüne Fluoreszenz eines intakten **EGFP** sichtbar wird, wenn die Klonierung ordnungsgemäß und im Leseraster erfolgt ist, somit als Kontrolle dient. Selektion in Bakterien über **Kanamycin** statt Ampicillin. SV40-Poly-A-Signal zur Bildung einer eukaryotischen mRNA. CMV-Promoter zur Proteinexpression in eukaryotischen Zellen. **EGFP** ist eine mutierte Version des **GFP** mit Excitationsmaximum bei 488 nm und Emissionsmaximum bei 507 nm.

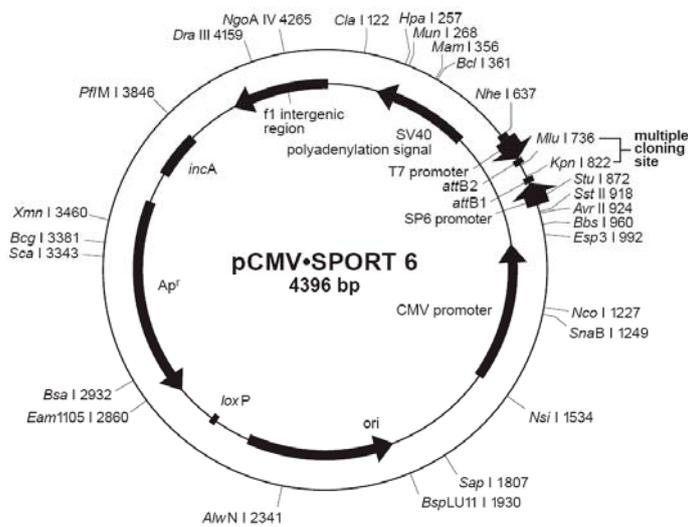
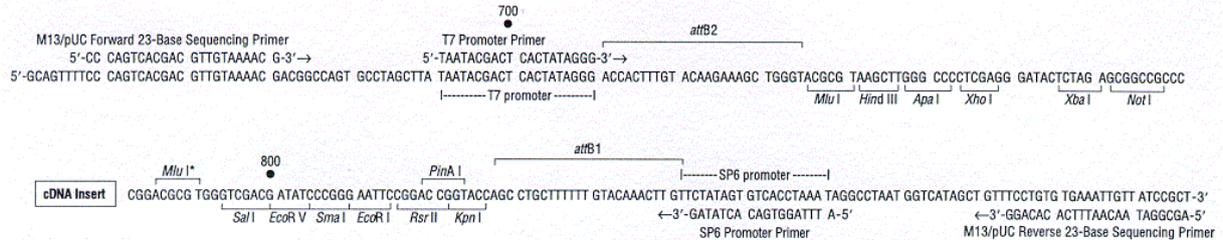


Abbildung 145: Expressionsvektor **pCMV-Sport6**, in dem viele der **IMAGE-Klone** geliefert wurden und der direkt für die Sonden-synthese in **in-situ-Hybridisierungen** über **T7-** oder **SP6-Promotoren** eingesetzt werden kann.

pCMV-Sport 6 multiple cloning site and primer binding regions: 641-917 (The sequence listed here is the (-) strand.)



* This **Mlu I** restriction site is contained within the **Sal I** adapter introduced into the vector upon ligation of the cDNA insert.

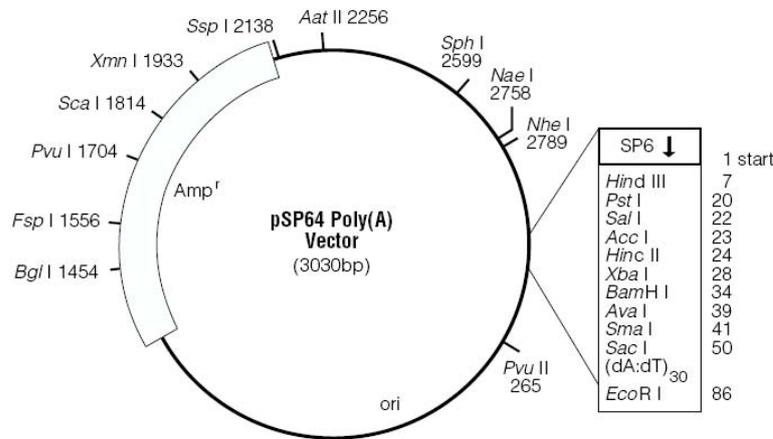


Abbildung 146: Expressionsvektor **pSP64-Poly(A)** für **in-vitro-Transkription und Translation** eines Inserts über SP6-Promoter und **Poly-A als Basensequenz** anstelle von Polyadenylierungssignal, was für die in-vitro-Transkription und Translation wichtig ist. Das Insert muss ATG- und Stop-Codons mitbringen. Accession Number X65328. Bezugsquelle von Promega.

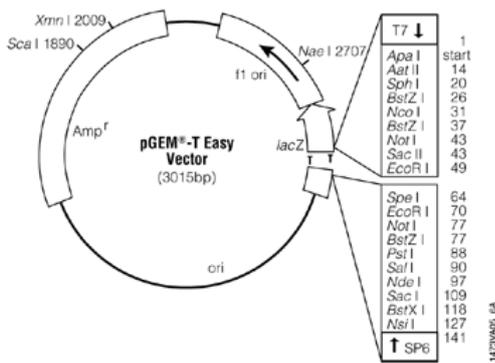
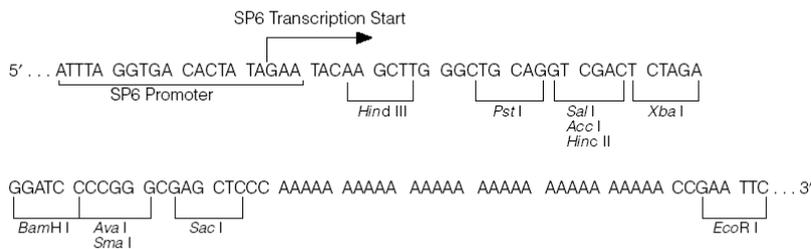
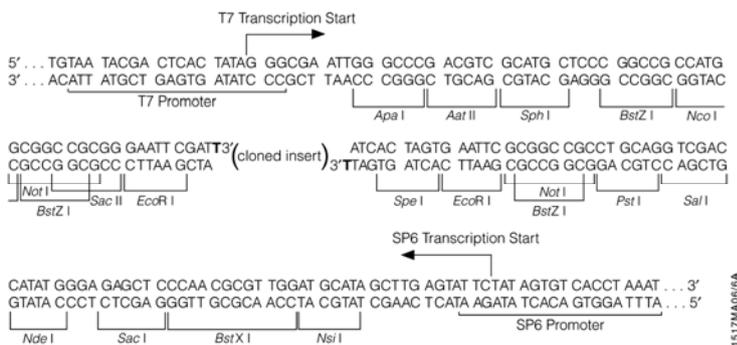


Abbildung 147: Klonierungsvektor für PCR-Fragmente, die nach Aufreinigung direkt unter Ligasezusatz in den linearen Vektor einkloniert werden können, indem 3'-überhängende T-Basen an den Enden komplementär mit 3'-überstehenden A-Basen von der durch Taq-Polymerase vermittelten PCR-Reaktion paaren können. Zu beachten ist, dass nicht alle thermostabilen PCR-Polymerasen einen solchen 3'-A-Überhang produzieren (beispielsweise Pfu-Polymerase nicht). Vermittels T7- oder SP6-Promoter können Inserts direkt für die Sondensynthese bei in-situ-Hybridisierung verwendet werden und stehen über die Schnittstellen in der MCS für weitere Klonierungen zur Verfügung. Bezugsquelle: Promega.



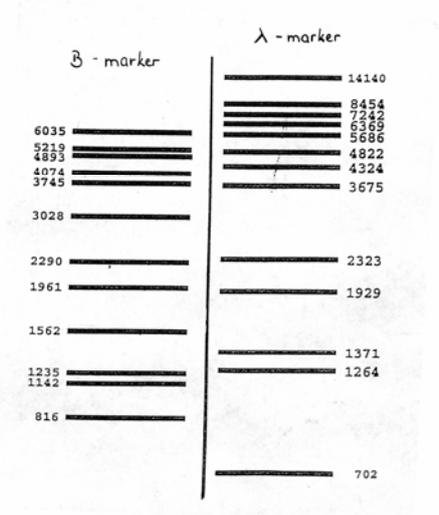
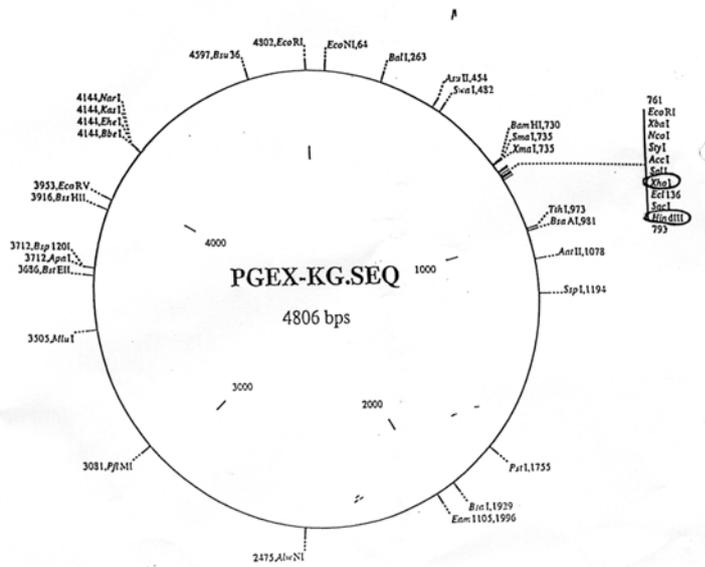


Abbildung 148: Verwendete Marker für Agarose-Gele mit verschiedenen DNA-Fragmentlängen.

Abbildung 149: Vektor pGEX-KG zur Herstellung von GST-Fusionskonstrukten, die in folgende MCS kloniert werden konnten (Leseraster zu GST sowie Xba I und Sal I Schnittstellen markiert):
 CTG . GTT . CCG . CGT . GGA . TCC . CCG . GGA . ATT . TCG . GTG . GT
 G . GTG . GTG . GGA . ATT . **CTA . GAC** . TCC . ATG . GGT . **CGA . CTC** .
 GAG . CTC . AAG . CTT . AAT . TCA

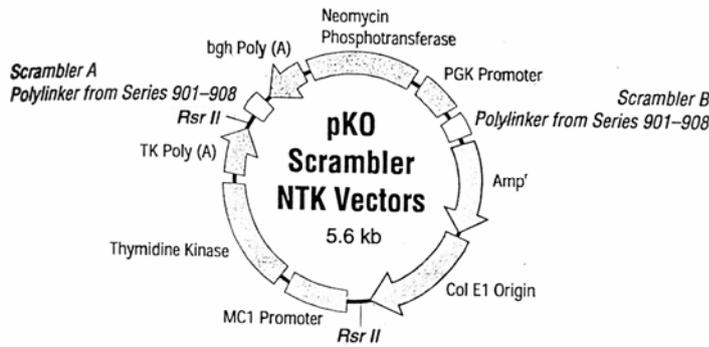


Abbildung 150: Der pKO Scrambler NTK Vektor von Stratagene (Katalog #745020-745027) lieferte für die Erstellung des Knock-out-Konstruktes wichtige Sequenzteile wie die Thymidin-Kinase, die aus ihm herauskloniert werden konnten.

>Primer revers für RT-Reaktion zur Klonierung der cDNA von *TRIM46* und Splicevarianten Tm 57°C
 ATATCCAGTGTCCAGGTGCC

>Primer vorwärts mit *Bam* HI zur Klonierung der cDNA von *TRIM46* und Splicevarianten Tm 57°C
 GGATCCATGGCTGAGGGTGAGGATATGC

>Primer revers mit *Not* I zur Klonierung der cDNA von *TRIM46* und Splicevarianten Tm 54°C
 GCGGCCGGTCAGAGACATGATGAGCCTGC

>Primer vorwärts zur Bestimmung der Sequenz upstream des ATG von *TRIM46* Tm 54°C
TAGACCGCCTTTGGAGAACC

>Primer revers zur Bestimmung der Sequenz upstream des ATG von *TRIM46* Tm 54°C
GCACACGTTGTGGGTACAAG

>Primer vorwärts zur Bestimmung der Sequenz zwischen TATAA und ATG von *TRIM46* Tm 56°C
TGGAGAAAGAGGGGAGCCAAAG

>Primer revers zur Bestimmung der Sequenz zwischen TATAA und ATG von *TRIM46* Tm 56°C
AGAAGCTTGCATCGATTCTGG

>Primer vorwärts für cDNA12 mit Restriktionsschnittstelle *Eco* RI für *Yeast-Two-Hybrid* Tm 55°C
GAATTCCATGGAGAAGGAAGGACTGCTGTGCC

>Primer revers für cDNA12 mit Restriktionsschnittstelle *Sal* I für *Yeast-Two-Hybrid* Tm 55°C
GTCGACCCAATGGTGACTTTCCTCTCAGG

>Primer vorwärts für cDNA12 mit Restriktionsschnittstelle *Eco* RI für *EGFP-Fusionskonstrukt* Tm 55°C
GAATTCCATGGAGAAGGAAGGACTGCTGTGCC

>Primer revers für cDNA12 mit Restriktionsschnittstelle *Apa* I für *EGFP-Fusionskonstrukt* Tm 55°C
GGGCCCAATGGTGACTTTCCTCTCAGG

>Primer vorwärts für Inserts von pJG4-5 Tm 52°C
AACGTCAAGGAGGAATTAAGC

>Primer revers für Inserts von pJG4-5 Tm 52°C
TGTCAACAACGTATCTACCAAC

>Primer vorwärts für λ -Phagen-PCR-Screen 5'-Flanke Tm 52°C
TATTTCCCACCCCTACCTC

>Primer revers für λ -Phagen-PCR-Screen 5'-Flanke Tm 51°C
CAAACGGGAGTCTCACCCT

>Primer vorwärts für λ -Phagen-PCR-Screen 3'-Flanke Tm 51°C
GATCTGTTGCCCTCTTCTGG

>Primer revers für λ -Phagen-PCR-Screen 3'-Flanke Tm 51°C
TCTTGGGATCACAGCATAAGAC

>Primer vorwärts für 5'-Sonde zur Verifizierung der KO-Integration Tm 52°C
TACGGATGAGAGGGTGAAG

>Primer revers für 5'-Sonde zur Verifizierung der KO-Integration Tm 52°C
AAAACAAAGTCGGCATCAGG

>Primer vorwärts für 3'-Sonde zur Verifizierung der KO-Integration Tm 54°C
ATTTTCGGAGGTGCAGGAACG

>Primer revers für 3'-Sonde zur Verifizierung der KO-Integration Tm 54°C
GAAAGACAACAGCACATTGCC

>Primer *lacZ* vorwärts für Genotypisierung transgener Mäuse Tm 65°C
CGTCACACTACGTCTGAACGTCCG

>Primer *lacZ* revers für Genotypisierung transgener Mäuse Tm 65°C
CAGACGATTCATTGGCACCATGC

>Primer *TRIM46*-Genlocus vorwärts für Genotypisierung transgener Mäuse Tm 56°C
GGTGGGGAACAAGCACCTTC

>Primer *TRIM46*-Genlocus revers für Genotypisierung transgener Mäuse Tm 56°C
GGGTCTCTGCAAAGGCAGT

>Sonde 5' zur Verifizierung der KO-Integration, als radioaktive Doppelstrang-DNA im Southern-Blot
TACGGATGAGAGGGTGGAAAGGGGCTAAGAGGTCCACTTGTCCAGCTGGAGCCAGAAAGGAAGGCAAAGAAGAGGATTTTTTCTTCT
CACTTCAAGACAGGTTCCACTGTGTAGCTCTGGCTGTCTGAAACTTGCTCTGTAGATCGCGCTAGCCCTGAACTCACAGAGACCTG
CCTCCCTCTGCCTCTAGTGCTAGGATTAAGAGCCTGTGCCATCACTGTCTGGCTGAAAGACAAGTTTTTGCCTTCCAACAATTTCT
TTCAGCATATAAGAAACACATGGGACAGAGTGGAAAGAGACAGAAGCTCTGGGCATTGCTGGGCGGAAGCTCTGGAAACCTCCAACAG
GGCCGTGAAGACAGCAACAATGGCGGGCTTCGGGGTTTCTGGGTGAGTCTTTCACGGGGCCACAACCTGCTTGTCTTTCCAGCATGT
GGCTTTCCAAGTGGCTCGGTCTGATGCCGACTTTGTTTT

>Sonde 3' zur Verifizierung der KO-Integration, als radioaktive Doppelstrang-DNA im Southern-Blot
ATTTTCGGAGGTGCAGGAACGGAGGCGTGGGTCCCACGCTCCCGCGTGTGTCCCGCTCTGAGAGGCTTTGTGAGGCTGCTCCGGG
CGGAGTGGAGCCGCCCTACGTCAGTTCGCCACAAGTATTTAGGTGGGCGGCACCAAACCCCAACTCCCAGGATTGCCAGGCAACAG
CCATTCAATTCGGTTGCTGGGACACCCGTCACCATGGCGATGGCTCTGCGCCTCTCAGTCTGAGTATTTAAAGAGCAAGCGCGCGCA
CTGCTTTAGCGTTGGAAAGTGGCCTTCGGGGCACCAGAGGCTCCCTCCTCTCCTCACCTTTCCCTTTCCGCCACCTTTCACTCTTC
GGGTGTTCAAGGCTCTGGCGCACCTTAAGGTGACCTATACTCCAGAGCACTCCAGTCCCTGGGTTCCAGCGGCCAGGTGGTTAG
GGAGCGGGATTCAGAGCCCCGGGTGGGCGGGAGGACGGGACGTGGTGCAGTGTGTTCTTTCCCTGCCAATATTGCACTCGTCC
CGGCCTCCGGCCCCCTCGGCCCCCCGGCGCCCCCTACCCAGAGTGGGGCAGCCCCGGCCACCGGGCTTTTCGATCTCTACCGAGCT
TAGACTGAAGTGTGCGCGTACCACGGTAAGTAAGCGGGCTGGAAGGACCTTAGCCACCTCCAACCTCATCCTTATTGGTCTT
TTCCACCCACACCTCAACTTAGTCTAACTTTCCCTAGCTCTTAACCTTGAACCTACCAGCCTTTCCCTCAGGTTCCCTTTCTGG
GCCGAAAAGGCCTAAAATAACAATTGCACTGACTTAGAAAATAACTGAACTTTATGGCAATGTGCTGTTGCTTTT

>Sonde *lacZ* zwischen *Eco* RV zur Verifizierung der KO-Integration, radioaktiv im Southern-Blot
ATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACCTTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGC
TACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTA
CCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCATGTAATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCTGGGGAATGAATCA
GGCCACGGCGCTAATCACGACGCGTGTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTTCCCGCCGGTGCAGTATGAAGCGGCGGAGCC
GACACCACGGCCACCGATATTATTGCCCAGTGTACGCGCGCTGGATGAAGACCAGCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATC

AAAAAATGGCTTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTTGCGAATACGCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTC
GCTAAATACTGGCAGGCGTTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAATAT
GATGAAAACGGCAACCCGTGGTTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTC
TTTGGCCAGCCGACGCCGATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAACCATC
GAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGC
GGTGAAGTGCTCTGGATGTGCTCCACAAGGTAACAGTTGATGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTC
TGGCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCCGATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCG
GAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCTCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGT
AATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTTACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACACTGCTGACGCCGCTGCCG
GATCAGTTTACCCGCTGCACCGCTGGATAACGACATTTGGCGTAAAGTGAAGCGACCCGATTGACCCTAACGCCTGGGTGCAACGCTGG
AAGGCGCGGGCCATTACAGGCCGAAAGCAGCGTTGTTGAGTGCACGGCAGATACACTTGTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCT
CACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTTACAGCCGGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTT
GATGTTGAAGTGGCGAGCGATAACCCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGG
CTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCCTTACTGCCGCTGTTTTGGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTAT
ACCCCGTACGCTTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCAATTTGAATTATGGCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTC
CAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTG
AATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGCAGACTCCTGGAGCCCCGTCAGTATCGCGGGAATTCAGCTGAGCGCCGGTCCG
TACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTTATCAGCCGAAAACCT
ACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATAACCCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGA
ACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCCTTACTGCCGCT
GTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTACGCTTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCG
AATTGAATTATGGCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGGA
TCCCGGAT

Liste der Antikörper:

Von Santa Cruz Biotechnology:

Presenilin-1, sc-1245.

Presenilin-2, sc-1456 .

Flk-1, sc-315-G.

Fhl-2, sc-23179.

Ferritin Heavy Chain, sc-14416.

Prefoldin 5, sc-19843.

Tom70, sc-26495.

Neuropilin, sc-7239.

Neuropilin-2, sc-7242.

VEGF, sc-507.

Caveolin-1, sc-894 TRITC.

PECAM-1, sc-1506.

Caveolin-3, sc-7665.

RACK1, sc-12517.

Spectrin II, sc-26913.

Ephrin-B2, sc-19227.

AQP5, sc-9890.

Cdc37, sc-6396.

Collagen IV, sc-9302.

Endoglin, sc-18893.

NG2, sc-30923.

PDGFR-Beta, sc-1627.

CD36, sc-5522.

Thy-1, sc-6071.

HA-Probe, sc-805.

Normal Donkey Serum, sc-2044.

Von Abcam:

Prox1, ab11941-100.

Beta Amyloid, ab14220-100.

Von Molecular Probes:

Alexa Fluor 488 donkey anti rabbit IgG, A21206.

Alexa Fluor 594 donkey anti goat IgG, A11058.

Alexa Fluor 594 donkey anti rabbit IgG, A21207.

Verwendete Zelllinien

Für die Zellkulturexperimente wurden Zelllinien des DSMZ, der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, verwendet.

NIH3T3: adhärenente Fibroblasten aus Maus-Embryo, Kulturmedium DMEM + 10% FCS.

HeLa: Zellen eines humanen Cervix-Carcinoms, Kulturmedium DMEM + 10% FCS.

Neuro2A: Zellen eines Neuroblastoms der Maus, Kulturmedium Eagle's MEM + nicht essentielle Aminosäuren + Earle's BSS + 10% FCS.

Methoden

Herstellung einer transgenen Maus

Präparation und mitotische Inaktivierung von Neomycin-resistenten Fibroblasten

Die späteren embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zur Aufnahme des Knock-out-Vektors benötigen zur Kultivierung so genannte Feeder-Zellen, was Fibroblastenzellen sind, die aus Mausembryonen präpariert werden. Zur Präparation Neomycin-resistenter Fibroblasten als Feeder für ES-Zellen werden Mäuse des Stammes CD-1.MTKneo2 (BRL, Basel) verwendet.

Eine trächtige Maus (Tag E13,5) wird getötet und die Embryonen werden entnommen. Diesen wird der Kopf abgetrennt sowie Herz und Leber entfernt. Der restliche Embryokörper wird zerschnitten und in PBS gespült. Das Embryogewebe wird in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit 25 ml 0,25%igem Trypsin und sterilen Glasperlen (\varnothing 4-5 mm) 15 min bei 37°C gerührt, die Trypsinisierung dann durch Zugabe von 25 ml DMEM gestoppt und der Ansatz durch ein Sieb in ein 50-ml-Plastikröhrchen filtriert. Nach Pelletierung (5 min, 1200 rpm) werden die Zellen in DMEM resuspendiert und auf 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät.

Konfluente Maus-Fibroblasten werden unmittelbar vor Benutzung als Feederzellen durch Behandlung mit Mitomycin-C mitotisch inaktiviert. Dazu wird dem Fibroblastenmedium Mitomycin-C zugesetzt (1:100 Verdünnung der Stammlösung von 2 mg auf 1,9 ml PBS und 0,1 ml DMSO) und für 2-3 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Anschließend werden die Zellen in einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro 10 cm Platte ausgesät. Nach Absetzen der Fibroblasten werden ES-Zellen auf dem Feederrasen ausgesät.

Kultivierung embryonaler Stammzellen

Medium zur Kultivierung embryonaler Stammzellen:

DMEM, hoher Glukosegehalt (4500 mg/ml, GibcoBRL) + 15% FKS (Boehringer) + 1x nicht-essentielle Aminosäuren (GibcoBRL, 100x), 1 mM Na-Pyruvat (100 mM, GibcoBRL) + 2 mM L-Glutamin (200 mM, GibcoBRL) + 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL) + 0,1 mM β -Mercaptoethanol + LIF (Leukemia Inhibitory Factor).

Die embryonalen Stammzellen werden auf Feeder-Rasen aus mitotisch inaktivierten Mausfibroblasten kultiviert. Das Medium (siehe oben) wird täglich gewechselt. LIF verhindert eine Differenzierung der ES-Zellen.

DNA-Transfer in embryonale Stammzellen durch Elektroporation

Elektroporationspuffer:

20 mM HEPES pH 7,0 + 137 mM NaCl + 5 mM KCl + 0,7 mM Na_2HPO_4 + 6 mM Glukose + 0,1 mM β -Mercaptoethanol, sterilfiltriert.

Embryonale Stammzellen einer 6 cm – Gewebekulturplatte werden nach Trypsinisieren in Elektroporationspuffer aufgenommen (1×10^7 Zellen/ml). 900 µl der Zellsuspension werden in eine Elektroporationsküvette (Bio-Rad, 4 mm Elektrodenabstand) gegeben.

20 µg linearisierte DNA (Rekombinationskonstrukt) werden in Elektroporationspuffer aufgenommen, der Zellsuspension zugesetzt und der Ansatz gemischt.

Eine Kapazität von 500 µF wird bei einer Spannung von 240 V über die Elektroporationsküvette durch die Zell/DNA-Suspension entladen. Hierdurch werden die Zellmembranen kurzfristig durchlässig, so dass die DNA eindringen kann. Die Zellen werden nach dem Strompuls 10 min lang nicht bewegt, anschließend in DMEM aufgenommen und auf einen Feeder-Zellrasen ausplattiert. Die Zellen eines Elektroporationsansatzes (9×10^6) werden auf zwei 10 cm Gewebekulturschalen verteilt.

Selektion von ES-Zellen zur Gewinnung von Einzelklonen

Geneticin[®] G418-Stammlösung: 5 g G418 in 200 ml DMEM lösen (25 mg/ml) und zweimal sterilfiltrieren.

Gancyclovir (Cymoven)-Stammlösung: Gancyclovir zu 5 mg / ml in PBS lösen und zu 1 ml Aliquots bei -20°C einfrieren. Auf 100 ml Medium kommen davon 10,5 µl.

Transfizierte ES-Zellen werden 48 h nach der Elektroporation auf G418-Resistenz selektiert. Dem ES-Zell-Medium wird 335 µg G418 / ml zugesetzt.

Die Gancyclovir-Selektion startet 24-48 h nach der G418-Selektion.

Etwa am 10. Tag nach Beginn der Selektionen werden überlebende Einzelklone gepickt.

Für diese werden Gewebekulturplatten vorbereitet:

In 6-Loch-Gewebekulturplatten wird 2 ml ES-Zellmedium (10% FKS) vorgelegt.

In 24-Loch-Gewebekulturplatten werden $1,5 \times 10^5$ mitotisch inaktivierte Mausfibroblasten pro Loch ausgesät und für 3 h inkubiert.

Das Medium der Selektionsschalen wird abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 10 ml 1x PBS bedeckt. Unter dem Mikroskop werden die Klone mit einer kurzen Pasteur-Pipette (steril) durch leichtes Umkratzen gelöst und aufgesaugt. Die Zellen eines ES-Zellklons werden in 50 µl PBS in ein Loch einer Mikrotiterplatte überführt, mit 2 Tropfen Trypsin/EDTA 5 min bei 37°C inkubiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette vereinzelt. Ein Drittel der Zellsuspension wird in ein Loch einer 25-Loch-Gewebekulturplatte, der Rest in ein Loch einer 6-Loch-Platte gegeben.

Die ES-Zellen in den 6-Loch-Platten werden bis zur Konfluenz kultiviert, durch Trypsinisieren getrennt und pelletiert. Aus dem Pellet wird genomische DNA gewonnen zur Analyse mittels Southern-Blot oder PCR auf korrekte homologe Rekombinationsereignisse.

Die ES-Zellen in den 24-Loch-Gewebekulturplatten werden in DMSO-haltigem Medium eingefroren (siehe unten).

Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

Das Einfriermedium entspricht bei Fibroblasten dem jeweiligen Kulturmedium zuzüglich 10% DMSO, bei ES-Zellen 60% DMEM, 20% FKS, 20% DMSO. Die Zellen werden trypsinisiert, pelletiert und in kaltem Einfriermedium resuspendiert, alsdann in vorgekühlte (0°C) Cryoröhrchen überführt und langsam auf -70°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen erfolgt durch rasche Entnahme aus dem Stickstoff. Das Röhrchen wird 1 min bei RT gehalten, dann in einem 37°C-Bad unter Schwenken aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern übrig ist. Die Zellsuspension wird in 5 ml Medium überführt und pelletiert (5 min, 1500 rpm). Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in Medium aufgenommen und ausplattiert.

Gewinnung von Morulae für die Morula-Aggregation

CD-1-Spenderweibchen wurden hormonell behandelt, indem am ersten Tag von dem Hormon Folligon (PMS, Intervet 1000 I.U., Science Park, Milton Road Cambridge) intraperitoneal 5 I.U. (*international unit*) injiziert werden. Zwei Tage später folgt Injektion von 5 I.U. hCG (Chorionic Gonadotropin, Sigma, 10000 I.U.). 2,5 Tage nach Verpaarung mit männlichen CD1-Mäusen werden die Ovidukte sowie proximalen Uteri entnommen und mit M2-Medium und einer Einmalnadel von 0,3 mm gespült. Die Embryonen/Morulae werden in einer Mikrotropfenkultur in einem Tropfen M16-Medium bei 5% CO₂ im 37°C Inkubator gelagert.

M2-Medium: 3 ml 10x Hank's Puffer + 141 µl 7,5% NaHCO₃ + 630 µl 1 M HEPES-Puffer + 99 µl 100 mM Na-Pyruvat + 300 µl 10000 U/ml Penicillin/Streptomycin + 30 µl 1 M NaOH + 120 mg BSA + 78 mg Na-Lactat, alles aufgefüllt auf 30 ml mit destilliertem H₂O.

M16-Medium: 1 ml 10x Earle's-Puffer + 270 µl 7,5% NaHCO₃ + 33 µl 100 mM Na-Pyruvat + 100 µl 10000 U/ml Penicillin/Streptomycin + 40 mg BSA + 26 mg Na-Lactat, alles aufgefüllt auf 10 ml mit destilliertem H₂O.

Vorbereitung von ES-Zellen für die Morula-Aggregation

ES-Zellen werden mindestens 2 Tage vor dem Aggregationsexperiment auf Falcon Zellkulturschalen ohne embryonale Fibroblasten kultiviert. Die ES-Zellen sollen in Klumpen von etwa 15 Zellen mit den Morulae zusammengebracht werden.

Aggregation der Morulae mit ES-Zellen

Zur Aggregation mit ES-Zellen muss die Zona Pellucida um die Morulae entfernt werden. Dies geschieht durch Pipettierung der Morulae durch eine Reihe von Tropfen, die aus je 2 Tropfen M2-Medium sowie 3 Tropfen saurer Tyrode-Lösung und wieder 2 Tropfen M2-Medium bestehen. In jedem Tropfen sollen die Morulae 15 Sekunden verbleiben. Anschließend werden die Morulae auf Tropfen mit M16-Medium verteilt und dort mit je 15 ES-Zellen zusammengebracht für die Morulae-Aggregation. Die Aggregation wird über Nacht in einem Zellkulturinkubator bei 37°C und mit 5% CO₂ durchgeführt.

Saure Tyrode-Lösung: 8 mg/ml NaCl + 0,2 mg/ml KCl + 0,2 mg/ml CaCl₂ + 0,1 mg/ml MgCl₂x6H₂O + 0,05 mg/ml NaH₂PO₄xH₂O + 1 mg/ml NaHCO₃ + 1 mg/ml Glukose, pH 2,5.

Uterustransfer der Blastocysten in pseudoschwangere Empfängerinnen

Jeweils 10 der aus den Morulae hervorgehenden Blastocysten werden in einen Maus-Uterus transferiert. Dazu wird das Muttertier mit einer 2,5%igen Avertin-Lösung (19 µl pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal gespritzt) anästhesiert. Bei diesen Mäusen handelt es sich um pseudoschwangere Foster-Mäuse, die 2,5 Tage nach Kopulation zwar Schwangerschaftshormone produzieren, aber selber keine fertilen Eizellen produzieren, jedoch die transferierten Blastozysten aufnehmen und versorgen können. Die Blastozysten werden mit einer Kanüle in M16-Medium in den Uterus injiziert.

Chimären und Keimbahntransfer

Etwa 17 Tage nach dem Uterus-Transfer sollten die Empfängerweibchen werfen. Wurden die ES-Zelllinie und die Blastozysten von Mausstämmen mit unterschiedlicher Fellfarbe gewählt (wie üblich), so erhält man als Nachkommen Chimären mit geflecktem und gestreiftem Fell. Kreuzt man chimäre männliche Tiere mit Wildtypweibchen des Genotyps der Blastozyste, so erhält man in der nächsten Generation entweder Tiere, die die Fellfarbe der Mutter tragen (keine Transmission des ES-Genotyps), oder Tiere, die die Fellfarbe des Mausstammes der ES-Zellen tragen (sofern diese Fellfarben-Allele dominant vererbt werden). In letzterem Fall ist die Keimbahntransmission geglückt. Die Verwendung männlicher Chimären hat den Vorteil, innerhalb kurzer Zeit viele Nachkommen erzeugen zu können. Hat man diejenigen Tiere identifiziert (Schwanzbiopsie, Genotypisierung), die die gewünschte Mutation tragen, so werden diese Heterozygoten gemeinsam (Bruder x Schwester) verpaart zur Erzeugung homozygoter Mutanten.

Zellkultur-Techniken

Splitten von Zellen durch Trypsinisieren

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 ml Trypsin versetzt, darin für 5 min bei 37°C inkubiert. Es folgte Zusatz von 7,5 ml Medium und Überführung der Zellsuspension in 50 ml Falcon Röhrchen. Dann Zentrifugation für 5 min bei 1000 Umdrehungen. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und je 2,5 ml auf 10 cm Platten mit Zugabe von 7,5 ml weiterem Medium ausplattiert, dabei die Zellen durch Schwenken möglichst gleichmäßig verteilt.

Transfektion mit Lipofektamin2000

Es wurde nach den Herstellerangaben für Lipofectamine™ 2000 von Invitrogen verfahren.

Affymetrix-Microarray-Screen

Zur Expressionsanalyse wurde die GeneChip-Technologie der Firma Affymetrix eingesetzt. Es wurden die Microarrays Test3 Array, MGU74Av2, MGU74Bv2 und MGU74Cv2 verwendet, die ca. 36.000 Gene bzw. EST-Sequenzen des Mausgenoms abdeckten.

Gewebe-Präparation und RNA-Isolation

Tris-freie Lösungen wurden mit DEPC (0,1%; Sigma) bei 37°C über Nacht behandelt und autoklaviert. Tris enthaltende Puffer wurden autoklaviert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter RNase-freien Bedingungen. Gewebe aus fünf Regionen des cerebralen Cortex 18,5 Tage alter Embryonen wurde isoliert (Hippocampus, Motorcortex, visueller Cortex, somatosensorischer Cortex, cingularer Cortex). Als zusätzliche Probe wurde der Körper nach Entfernung von Rückenmark und Genitalanlage verwendet. Die Präparation erfolgte in eiskaltem PBS-DEPC. Isoliertes Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung in RNAlater (Ambion) bei 4°C aufbewahrt. Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Homogenisators (Polytron PT1200, Kinematica) homogenisiert und die Gesamt-RNA mit Hilfe des "RNeasy Mini Kit" (Qiagen) isoliert. Die Integrität der RNA wurde im nativen Agarosegel (1%) überprüft, deren Konzentration in einem Spektrophotometer bestimmt.

cDNA-Synthese

Zur Synthese von doppelsträngiger cDNA aus Gesamt-RNA wurde das "**SuperScript Choice System**" der Firma Invitrogen Life Technologies verwendet. Dabei wurden 9 µg Gesamt-RNA pro Gewebeprobe eingesetzt. Das Protokoll begann mit der Primerhybridisierung (10 min, 70°C), es folgten Temperatureinstellung (2 min, 42°C), Synthese der einzelsträngigen cDNA (1 h, 42°C), Synthese der doppelsträngigen cDNA (2 h, 16°C) und "*blunt*"-machen der cDNA-Enden (5 min, 16°C). Alle Teilschritte erfolgten in einem Reaktionsansatz unter sukzessiver Zugabe der Komponenten:

Ansatz zur Primerhybridisierung (12 µl):

2 µl T7-(dT)24-Primer (50 µM, Affymetrix).
9 µl RNA (1 µg/µl).
1 µl RNasin (40 Units/µl, Promega).

Ansatz zur Temperatureinstellung (19 µl):

Zugabe von:
4 µl Erststrang-cDNA-Puffer (fünffach).
2 µl DTT (0,1 M).
1 µl dNTP-Mix (10 mM).

Ansatz zur Synthese der einzelsträngigen cDNA (20 µl):

Zugabe von:
1 µl SuperScript II reverse Transkriptase (200 Units/ µl).

Ansatz zur Synthese der doppelsträngigen cDNA (150 µl):

Zugabe von:
90 µl DEPC-Wasser.

30 µl Zweitstrang-cDNA-Puffer (fünffach).
3 µl dNTP-Mix (10 mM).
1 µl DNA-Ligase aus E. coli (10 Units/ µl).
4 µl DNA-Polymerase I aus E. coli (10 Units/ µl).
2 µl RNase H aus E. coli (2 Units/ µl).

Ansatz zum "Blunt"-machen der cDNA (152 µl):

Zugabe von:

2 µl T4-DNA-Polymerase (5 Units/ µl).

Die Reaktion wurde unter Zugabe von 10 µl EDTA (0,5 M) abgestoppt und die doppelsträngige cDNA mit Hilfe von "Phase Lock Gels" (Eppendorf) über Phe/Chl-Extraktion aufgereinigt und schließlich mit Ethanol präzipitiert. Nach zweimaligem Waschen mit 80%-igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 12 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Synthese biotinylierter RNA und Ausbeuteberechnung

Die in-vitro-Transkription der cDNA zur Herstellung biotinylierter RNA-Sonden wurde für 5 h bei 37°C durchgeführt. Dazu wurde das "RNA Transcript Labeling Kit" der Firma Enzo verwendet.

Ansatz zur in-vitro-Transkription (40 µl):

12 µl cDNA (ca. 100 ng/ µl).

10 µl DEPC-Wasser.

4 µl HY-Reaktionspuffer (zehnfach).

4 µl Biotin-markierte Ribonukleotide (zehnfach).

4 µl DTT (100 mM).

4 µl RNase-Inhibitor (20 Units/ µl).

2µl T7-RNA-Polymerase (50 Units/ µl).

Zur Extraktion der RNA aus dem Reaktionsansatz wurde die Option "RNA Clean-up" des "RNeasy Mini Kit" (Qiagen) genutzt. Die Elution erfolgte mit 30 µl DEPC-Wasser. Die Konzentration der erhaltenen RNA (c_0) wurde im Spektrophotometer bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration an biotinylierter RNA (c_1) wurde von einem vollständigen Übertrag der ursprünglich eingesetzten Gesamt-RNA (9 µg) ausgegangen und eine entsprechende Korrektur vorgenommen ($c_1 = c_0 - 9 \mu\text{g} / 30 \mu\text{l}$, $c_1 = c_0 - 0,3 \mu\text{g} / \mu\text{l}$). Es wurde also zur Berechnung der tatsächlichen cRNA-Ausbeute die eingesetzte Menge totaler RNA von der Menge cRNA nach in-vitro-Transkription abgezogen.

Fragmentierung der biotinylierten RNA

Die Fragmentierung der biotinylierten RNA wurde für 35 min bei 94°C durchgeführt, danach bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert. Die Qualität fragmentierter RNA wurde mit 1 µl RNA in einem nativen Agarosegel (1%) überprüft. Es sollten RNA-Fragmente von 35 bis 200 Basen vorliegen.

Ansatz zur Fragmentierung biotinylierter RNA (40 µl):

0,625 µg/µl Biotinylierte RNA in Fragmentierungspuffer mit 40 mM Tris-Acetat, pH 8,1 + 100 mM Kaliumacetat + 30 mM Magnesiumacetat.

Herstellung der Hybridisierungskontrollen

Auf den Microarrays vom Typ MGU74v2 sind Proben der prokaryotischen Gene *bioB*, *bioC*, *bioD* und *Cre* repräsentiert. Entsprechende *antisense*-RNAs wurden als Hybridisierungskontrollen dem Hybridisierungscocktail zugefügt. Plasmide mit den cDNAs *bioB*, *bioC*, *bioD* und *Cre* wurden von American Type Culture Collection bezogen. Plasmid-DNA wurde mit dem "QIAfilter Plasmid Maxi Kit" (Qiagen) präpariert, mit *Xho* I linearisiert und Phe/Chl-extrahiert. Die in vitro-Transkription wurde mit 0,75 µg Plasmid-DNA durchgeführt (RNA Transcript Labeling Kit, Enzo). Es wurde T7-RNA-Polymerase verwendet.

Hybridisierung der Microarrays

Zur Prähybridisierung wurde der Microarray 10 min bei 45 °C mit MES-Puffer (74 mM [Na⁺], 100 mM MES) inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Rotation (60 U/ min) im Hybridisierungssofen (Affymetrix). Zur Hybridisierung wurden 300 µl Hybridisierungscocktail mit 15 µg fragmentierter RNA vorbereitet, 5 min bei 99 °C denaturiert und auf 45 °C temperiert. Die Hybridisierung erfolgte über 16 h bei 45°C und 60 U/min im Hybridisierungssofen.

Hybridisierungscocktail (300 µl):

0,05 µg/µl Fragmentierte, biotinylierte RNA.
50 pM Kontroll-Oligonukleotide B2 (Affymetrix).
1,5 pM Hybridisierungskontrolle *bioB*.
5 pM Hybridisierungskontrolle *bioC*.
25 pM Hybridisierungskontrolle *bioD*.
100 pM Hybridisierungskontrolle *cre*.
0,1 mg/ml Heringsspermien-DNA (Promega).
0,5 mg/ml acetyliertes BSA (Gibco).
100 mM MES.
1 M [Na⁺].
20 mM EDTA.
0,01% Tween-20.

Waschen und Färben der Microchips

Die Posthybridisierung der Microarrays wurde in der "GeneChip Fluidics Station 400" (Affymetrix) durchgeführt und durch die Software "Microarray suite 4.0" (Affymetrix) gesteuert. Dazu wurde zunächst der Hybridisierungscocktail entfernt und durch Puffer A ersetzt. Anschließend wurde zehnmal mit Puffer A bei 25°C und viermal mit Puffer B bei 50°C gewaschen. Es folgten Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (10 min, 25°C), zehnmal Waschen mit Puffer A bei 25°C, Inkubation mit Biotin-anti-Streptavidin-Antikörper (10 min, 25°C), Inkubation mit Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (10 min, 25°C) und 15 Waschschrte mit Puffer A bei 30°C.

Puffer A: 0,9 M NaH₂PO₄ + 60 mM NaCl + 6 mM EDTA + 0,01% Tween-20 + 0,005% Antifoam 0-30 (Sigma).

Puffer B: 100 mM MES + 0,1 M [Na⁺] + 0,01% Tween-20.

Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung: 100 mM MES + 1 M [Na⁺] + 0,05% Tween-20 + 0,005% Antifoam 0-30 + 2 mg/ml acetyliertes BSA + 10 µg/ml Streptavidin-Phycoerythrin (Molecular Probes).

Lösung mit Biotin-anti-Streptavidin-Antikörper: 100 mM MES + 1 M [Na⁺] + 0,05% Tween-20 + 0,005% Antifoam 0-30 + 0,1 mg/ml IgG der Ziege (Sigma) + 3 µg/ml Biotin-anti-Streptavidin-Antikörper aus der Ziege (Vector Laboratories).

Scannen der Microarrays und Auswertung der Daten

Die Microarrays wurden mit dem "Agilent GeneArray Scanner" (Affymetrix) mit einer Laserwellenlänge von 570 nm gescannt. Die Datenanalyse wurde mit der Software "MicroArray Suite 4" (Affymetrix) vorgenommen. Die Qualität jeder RNA-Probe wurde zunächst mit einem Testchip (Test3 Array, Affymetrix) beurteilt. Der Testchip enthält Sets von Proben für murine Haushaltsgene, wie β -Aktin und GAPDH. Für gute Hybridisierungsproben sollte das Verhältnis der Hybridisierungssignale von Probensets aus dem 5'- und 3'-Ende der Gene β -Aktin und GAPDH den Wert 3 nicht überschreiten. Anderenfalls müsste von einer Degradierung der RNA im Hybridisierungscocktail ausgegangen werden. Für gut befundene Hybridisierungscocktails wurden zur Hybridisierung der Microarrays vom Typ MGU74v2 weiter verwendet. Um die Vergleichbarkeit zweier Microarrays zu gewährleisten, wurde der Algorithmus "Scaling" (Skalierung) ausgeführt. Die gewählte Targetintensität betrug 500. Computerdateien vom Typ ".chp" wurden erstellt und paarweise miteinander verglichen. Mit Hilfe der erhaltenen Daten für "Fold Change" (Expressionsverhältnis) und "Difference Call" (Prädikat des Expressionsunterschiedes) wurden Listen von Genen erstellt, deren Expression in einem der fünf Cortexgebiete erhöht war. Zusätzlich wurden weitere Prioritätslisten erstellt für Gene, die in mehreren Cortexregionen insbesondere in Form eines Gradienten exprimiert waren. Die hierfür ausgewählten Gene mussten einen "Difference Call" von "marginal increased" (geringfügig erhöht) oder "increased" (erhöht) vorweisen. Hinzu kam ein Schwellenwert für den "Fold Change" von mindestens 2 in der betrachteten Hirnregion in Bezug zu den anderen Regionen bzw. bei Gradienten von den betrachteten Hirnregionen zu den anderen Regionen.

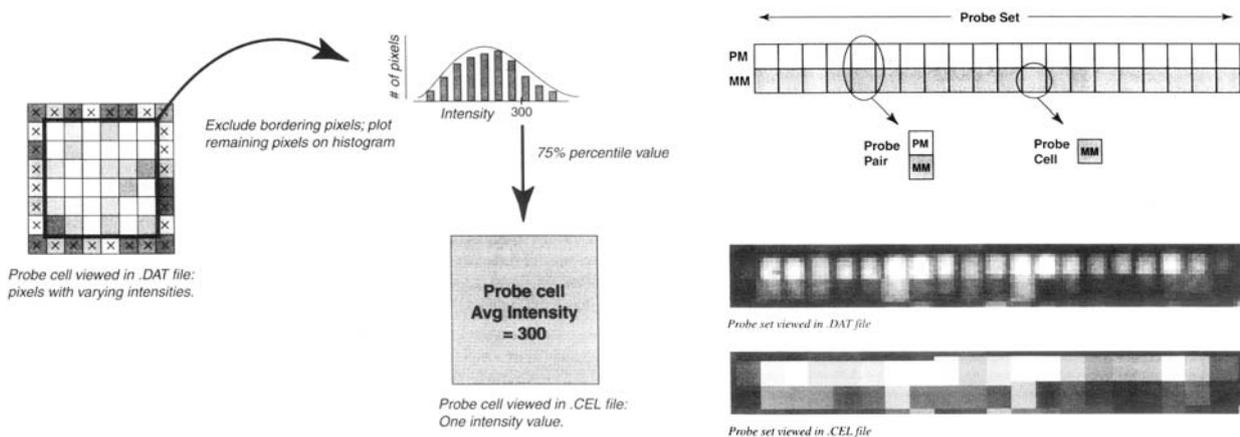


Abbildung 151: Aus dem Scannen der Microarrays wurden Rohdaten in „.dat“-Dateien gewonnen, aus denen auf statistisch festgelegte Weise Ausreißer eliminiert und Mittelwerte für die „Probe Cells“ gebildet wurden, die in „.cel“-Dateien abgelegt wurden. Diese wurden weiter verarbeitet zu den „.chp“-Dateien, die die eigentliche Grundlage für die Auswertung bildeten und jedem Gen nur noch einen Wert für die Signalstärke zuwiesen, so dass zwischen verschiedenen Chips nach Normierung auf den Hintergrund und auf die mithybridisierten Kontrollgene verglichen werden konnte.

DNA-Techniken

Herstellung elektrokompeter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompeter Bakterien wurde eine Einzelkolonie des Bakterienstammes *E. coli DH5 α* in 50 ml STI-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 2,5 ml dieser Starterkultur wurden in 250 ml STI-Medium überimpft und weiter kultiviert bis die Kultur bei 600 nm eine optischen Dichte von 0,5-0,6 aufwies. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt (15 min) und die Bakterien pelletiert. Nacheinander wurden die Bakterien durch Resuspension und Zentrifugation dreimal in sterilem Wasser und dreimal in 10% Glycerol gewaschen. Alle Waschschrirte erfolgten bei 4 °C. Schließlich wurden die Bakterien in einem dem Volumen des Pellets äquivalenten Volumen 10% Glycerol resuspendiert, aliquotiert und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

DNA-Präparation

Die Plasmid enthaltenden Bakterien wurden auf STI-Bakterienagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Vorkultur wurden Einzelkolonien in 5 ml STI-Medium inokuliert und 6-8 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Es folgten das Animpfen von 100 ml STI-Medium mit 1 ml Vorkultur und Inkubation unter Schütteln über Nacht bei 37°C. Zur Präparation von Plasmid-DNA kam das "QIAfilter Plasmid Maxi Kit" (Qiagen) zur Verwendung. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Gewonnene Plasmid-DNA wurde in 200 μ l TE-Puffer (pH 7,5) gelöst. Zur analytischen DNA-Präparation wurde das "QIAfilter Plasmid Mini Kit" (Qiagen) verwendet.

Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

40 μ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in eine vorgekühlte 0,1 cm Elektroporations-Küvette (Gene Pulser von Bio-Rad) überführt. 1 bis 3 μ l DNA-Lösung (1 bis 10 ng/ μ l) wurde zu den kompetenten Zellen gegeben und gemischt. Die Elektroden der Küvetten wurden sorgfältig abgetrocknet und die Elektroporation durchgeführt mittels eines Gene Pulser Gerätes von Bio-Rad unter den Einstellungen mit einer Spannung von 1,8 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 μ F. Nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 960 μ l vorgewärmten LB-Medium gemischt, in Eppendorf-Gefäße überführt und bei 37°C unter Rotation für 1 h inkubiert, anschließend in Chargen zu 10, 50 und 400 μ l auf den Plasmiden entsprechenden selektiven Agar-Platten ausplattiert.

Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

50 – 100 μ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in ein Falcon 2059 Polypropylen-Röhrchen (BD Falcon) überführt. 10 ng DNA bzw. 10 μ l DNA-Lösung wurden mit den kompetenten Zellen vermischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte Hitzeschock bei 42°C für 45 s mit folgender Inkubation auf Eis für 2 min. Die Zellen wurden mit 960 μ l vorgewärmten LB-Medium gemischt, in Eppendorf-Gefäße überführt und bei 37°C unter Rotation für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden in einer Tischzentrifuge bei 3000 rpm und 2 min abzentrifugiert und in 200 μ l LB-Medium aufgenommen und ausplattiert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde in einem Spektrophotometer (Bio Photometer von Eppendorf, UV-Küvetten von Brand) bestimmt. Dazu wurde die DNA/RNA-Lösung 1:100 in Wasser verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm (OD260) ermittelt. Eine OD260 von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg RNA pro ml Lösung. Geringe DNA-Konzentrationen wurden im Agarosegel durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der unbekanntenen mit einer bekannten DNA-Probe abgeschätzt.

Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion

Extraktionen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (TE-gesättigt, pH 7,5 von Roth) und Chloroform/Isoamylalkohol wurden zur Entfernung von Proteinrückständen aus DNA-haltigen Lösungen durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit einem äquivalenten Volumen des Phe/Chl/Isoam.-Gemisches (vol:vol:vol=24:24:1) bzw. der Chl/Isoam.-Mischung (vol:vol=24:1) versetzt, 30 s kräftig geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation (5 min Maximum) getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA durch Ethanol-fällung gewonnen.

Ethanol-fällung

Ein Volumenanteil DNA-haltiger Lösung wurde mit 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumazetat und 2,5 Volumenanteilen absolutem Ethanol versetzt und mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Das DNA-Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei höchster Umdrehungszahl abgeschieden und in 75% Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des DNA-Pellets wurde es in einem geeigneten Volumen Wasser oder TE-Puffer gelöst.

λ-Phagen-PCR-Screen

Vorbehandlung der Wirtsbakterien

Von dem Bakterienstamm *XLI-Blue MRA* wurde mit einer Einzelkolonie eine 50 ml STI + 1% Maltose-Kultur angeimpft. Am nächsten Tag wurden die Bakterien pelletiert (3000 rpm, 10 min, 4°C) und anschließend in 25 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die Bakterien wurden bei 4°C gelagert und blieben etwa 1 Woche für die Infektion mit λ-Phagen kompetent.

Durchführung des λ-Phagen-PCR-Screens

Es wurde die Lambda[®] Fix II Library der Firma Stratagene verwendet. Die $6,9 \times 10^7$ Klone waren auf 5 Röhrchen zu je 1 ml aliquotiert. Aus jedem dieser Röhrchen wurde je 1 µl für PCR entnommen. Die PCR wurde mit den Primern für die 5'- bzw. 3'-Flanke des Genlocus für den Maus-Knock-out durchgeführt (siehe ab Seite 153) unter Standard-PCR-Bedingungen (30 s bei 94°C Denaturierung, 30 s Anlagerung

gemäß den Primern, siehe dort, 1 min Elongation bei 72°C, 30 Zyklen). Eine positive Bande in der Agarose-Gelelektrophorese spezifizierte das Ausgangsröhrchen für den weiteren λ -Phagen-PCR-Screen. Die PCR wurde mit einer Verdünnungsreihe aus dem positiven Röhrchen der Library wiederholt, so lange, bis keine Bande mehr sichtbar wurde. Von der letzten Verdünnung mit eindeutig positiver Bande wurde die dreifache Menge in 1 ml λ -Verdünnungspuffer eingesetzt, diesem 1 ml einer ÜN-Kultur des Bakterienstammes *XLI Blue MRA* zugegeben. Der Bakterienstamm hatte dabei eine OD₆₀₀ von 2,0 und war in STI-Medium + 0,2% Maltose gewachsen. Das Gemisch aus Phagen, λ -Verdünnungspuffer und Bakteriensuspension wurde für 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 18 ml STI + 0,2% Maltose + 10 mM MgSO₄ weiter verdünnt und gemischt. Hiervon wurden je 100 μ l in das Well einer 8x8 Mikrotiter-Platte überführt, insgesamt also 6,4 ml auf 64 Wells. Die Mikrotiter-Platte wurde mit Klebefolie versiegelt und bei 37°C für 5-6 h oder ÜN unter Schütteln inkubiert. Danach wurden je 20 μ l von den Wells einer Spalte sowie entsprechend von denen eine Zeile gepoolt, gemischt und davon mit je 1 μ l eine PCR durchgeführt. Von den positiven Proben wurde noch mal eine PCR von dem vermuteten einzelnen Well durchgeführt. Von dem eindeutig identifizierten individuellen positiven Well wurde eine Verdünnungsreihe wie zuvor durchgeführt und die kleinste Verdünnung mit noch positivem Resultat bestimmt, davon wieder die 3 fache Menge für die nächste Runde des PCR-Screens eingesetzt. Insgesamt wurde diese Prozedur etwa 3 bis 5 Mal wiederholt. Am Ende sollten die λ -Phagen mit dem durch PCR bestimmten gewünschten Insert gegenüber unspezifischen Phagen soweit angereichert worden sein, dass sie im weiteren isoliert und für die Klonierung eines Knock-out-Konstruktes eingesetzt werden konnten.

Ausplattieren der Phagenbibliothek

Die Phagen wurden auf 90 mm Platten (STI mit 1,5% Bactoagar) gegebenenfalls in mehreren Verdünnungen ausplattiert. Dazu wurden die Phagen mit der berechneten Verdünnung für 15 min bei 37°C mit je 200 μ l Bakterien inkubiert, mit Topagarose gemischt und auf die vorgewärmten Agarplatten plattiert. Nach Erstarren der Topagarose wurden die Platten umgekehrt für ca. 10-12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 4°C gelagert.

Topagarose: STI mit 0,7% Agarose.

Aufreinigen positiver Phagen und Anlegen eines Phagenstocks

Positive Phagen-Plaques wurden mit einer Pasteur-Pipette gepickt und in 1 ml λ -Verdünnungspuffer sowie einem Tropfen Chloroform für mehrere Stunden bei RT unter Schütteln zur Elution der Phagen inkubiert. Zur Vereinzelung der Phagen wurde erneut in verschiedenen Verdünnungen auf kleine Platten ausplattiert und gepickt. Auf diese Weise entstand eine hochkonzentrierte Lösung („*high titer stock*“) der isolierten Phagen. Die Phagenüberstände wurden bei 4°C gelagert und waren durch das Chloroform konserviert.

DNA-Isolierung aus λ -Phagen

Der entsprechende Phagenklon wurde auf einer 14 cm Petrischale (STI mit 1,5% Agarose) ausplattiert. Anschließend wurden die Phagen mit 10 ml λ -Verdünnungspuffer und einigen Tropfen Chloroform für 1-2 h bei 37°C von der Platte gewaschen. Nach Transfer dieses Lysats in 50 ml Röhrchen und Zentrifugation (10 min, 7000 rpm, 4°C) wurde der Überstand für 30 min bei 37°C mit RNase A und DNase (Endkonzentrationen jeweils 1 μ g/ ml) unter Schütteln inkubiert, um die bakteriellen Nukleinsäuren zu entfernen. Danach wurde der Überstand mit einem Volumen 20% Polyethylenglycol-6000 + 2 M NaCl für 1 h auf Eis präzipitiert. Die Phagen wurden pelletiert (20 min, 7000 rpm, 4°C) in 0,5 ml λ -Verdünnungspuffer gelöst und einmal nachgewaschen. Nach 15 minütiger Inkubation bei 68°C in 10% SDS und 0,5 M EDTA folgte eine Phe-Extraktion, eine Phe/Chl-Extraktion und eine Chl-Extraktion. Die Phagen-DNA wurde gefällt, gewaschen und schließlich für eine Stunde bei 60°C in 0,1xTE gelöst.

Aufbereitung der KO-Konstrukt-DNA für ES-Zell-Elektroporation.

Das aus den λ -Phagen klonierte Knock-out-Konstrukt musste für die Elektroporation in ES-Zellen linearisiert werden, da es im zyklischen Zustand nicht ordnungsgemäß homolog rekombinieren könnte.

Für den Restriktionsverdau wurden angesetzt: 100 μ g Plasmid-DNA + 10 μ l 10x Enzympuffer + 1 μ l BSA (abhängig vom Enzym) + 5 μ l Enzym (hier *Not I*, 10000 U/ml) + H₂O auf 100 μ l Gesamtvolumen.

Die Reaktion erfolgte ÜN bei 37°C (enzymabhängig). Dann wurde der Verdau durch Zusatz von 2 μ l 0,5 M EDTA gestoppt. Zur Entfernung des Enzyms erfolgte Phe/Chl-Extraktion, Chl/Isoamylalkohol-Extraktion, Zusatz von 2 μ l 5 M NaCl und Fällung mit dem 2,5fachen Volumen absoluten Ethanol oder dem 0,7fachen Volumen Isopropanols. Die Fällung erfolgte sogleich nach dem Mischen durch Zentrifugation bei RT und unter maximaler Drehzahl einer Tischzentrifuge für 5 min. Es wurde mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet vorsichtig getrocknet, wobei die Gefäße mit Folie abgedeckt wurden. Insgesamt sollte möglichst steril gearbeitet werden, damit bei der Elektroporation in ES-Zellkultur keine Kontamination eingeschleppt werden konnte, da die Kultivierung ohne Antibiotika erfolgte. Das getrocknete Pellet wurde in 100 μ l sterilem TE gelöst und zu 30 μ l für die Elektroporation aliquotiert. Unter einem Agarosegel erfolgte Kontrolle von 1 μ l auf vollständigen Verdau.

RT-PCR

Es wurde im Wesentlichen das der *Reverse Transkriptase Superscript II* von Gibco BRL (200 U/ μ l) beiliegende Protokoll verwendet.

1. **DNase-Verdau:** Bis 5 μ g RNA in 45 μ l DEPC-H₂O aufgenommen. Mastermix für n Proben: 49,4 μ l DEPC-H₂O, 3,3 μ l 3 M NaAc pH 5,5, 0,5 μ l 1 M MgCl₂, 1,8 μ l DNase I (RNase frei, Boehringer Mannheim Cat. No. 776785, 10 units/ μ l). Σ 55 μ l. Zugabe der 45 μ l RNA-Lösung (Σ 100 μ l). Inkubation 15-20 min bei RT. Zugabe von 10 μ l 3 M NaAc und 250 μ l Ethanol, gemischt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und an Luft getrocknet.
2. **cDNA-Synthese:** Die RNA wurde in 11 μ l DEPC-H₂O gelöst. Zusatz von 1 μ l oligo(dT₃₀) (500 μ g/ml), alternativ 50-250 ng *random primer*. Erhitzt bei 70°C für 10 min, danach auf Eis gekühlt. Zugabe von 4 μ l 5x First Strand Puffer, 2 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l 10 mM dNTP-Mix. Gemischt und 2 min bei 42°C inkubiert. Zusatz von 1 μ l *Superscript II* (200 U/ μ l). Inkubation für 50 min bei 42°C, dann für 15 min bei 70°C und abkühlen gelassen.
3. **RNase H-Verdau:** Zusatz von 0,5 μ l RNase H (1 U/ μ l). Inkubation für 30 min bei 37°C. Wenn mehr als 2 μ g RNA anfänglich eingesetzt wurden, mit DEPC-H₂O aufgefüllt auf 30 μ l (bei 3 μ g RNA), bzw. 40 μ g (bei 4 μ g) oder 50 μ l (bei 5 μ g).
4. **PCR:** Man sollte eine Kontrolle ohne Template mitlaufen lassen. Mastermix je Ansatz: 2,5 μ l Primer 1 (10 pmol/ μ l), 2,5 μ l Primer 2 (10 pmol/ μ l), 5,0 μ l 10x PCR-Puffer (enthält MgCl₂), 1,0 μ l 10 mM dNTP-Mix, 0,25 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l), 38 μ l H₂O. Je PCR-Tube 49 μ l des Master-Mix + 1 μ l der cDNA. PCR: 94°C 5 min, 35 Zyklen zu 45 s 94°C, 45 s *Annealing*-Temperatur (primerspezifisch), 1 min 72°C. Endelongation 5 min bei 72°C. Analyse auf Agarosegel (5 μ l Auftrag).

PCR

Alle PCR-Reaktionen folgten einem allgemeinen Reaktionsschema, die Annealing-Temperatur (T_m) wurde je nach Primer variiert. Die Schmelztemperatur betrug standardmäßig 94°C . War genomische DNA das Ausgangsmaterial, dann 95°C und es wurden 50-100 ng genomische DNA als Template eingesetzt. PCR-Reaktionen wurden auf dem PCR-Gerät "TRIO-Thermoblock" von Biometra durchgeführt.

PCR-Reaktionsschema:	95°C	2 min	}	25-30 Zyklen
	T_m	30 s		
	72°C	60 s	}	
	95°C	30 s	}	
	72°C	5 min	}	

PCR-Reaktionsansatz (25 μl): Genomische DNA 2-4 ng/ μl + Vorwärts-Primer 10 μM + Rückwärts-Primer 10 μM + PCR-Puffer (GeneCraft) einfach konzentriert + dNTP-Mix (GeneCraft) 0,2 mM + DNA-Polymerase (BioTherm, GeneCraft) 1 Unit/Ansatz.

Isolation genomischer DNA

Gewebe aus Schwanzspitzen von Mäusen wurde über Nacht bei 56°C in 500 μl Proteinase K-Lysepuffer verdaut. Gewebereste wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die genomische DNA wurde mit 400 μl Isopropanol gefällt, einmal in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und 1 h bei 60°C in 1 ml TE-Puffer gelöst.

Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das enzymatische Schneiden von DNA wurde nach den Angaben des Enzymherstellers durchgeführt. DNA (je nach Anwendung 0,2-25 μg) in 0,1xTE mit Restriktionsendonuklease-Puffer (verdünnt aus 10x) gelöst in einem Volumen von 10-100 μl . Es erfolgte Zusatz von Restriktionsendonuklease (1-2 Units) und Inkubation ÜN oder mindestens 3 h bei 37°C oder je nach Enzymbedingungen, entsprechend auch Zusatz von BSA je nach Anforderung.

Klonierung von DNA-Fragmenten

Die zu klonierende DNA wurde aus folgenden verschiedenen Quellen gewonnen:

Vektorpräparation

Vektor-DNA wurde für 3 h mit einem Überschuss des entsprechenden Restriktionsenzym (3-5 Units/ μg Plasmid-DNA) bei 37°C in geeignetem Puffer inkubiert. Das linearisierte Plasmid wurde durch Gel-Elektrophorese und Elution aus dem Gel aufgereinigt. Erfolgte der Restriktionsverdau mit nur einem Enzym, so musste die mögliche Rückligation unterbunden werden, was durch Inkubation für 30 min bei 37°C in CIP-Puffer mit der Behandlung durch alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP) geschah

(Dazu wurde die DNA in 8 μ l TE gelöst und mit je 1 μ l der Phosphatase und des 10x *CIP*-Puffers versetzt und für 15 min reagieren gelassen). Die DNA wurde Phe/Chl-extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 10 μ l TE resuspendiert. Vektoren, die mit zwei verschiedenen Restriktions-Enzymen geschnitten wurden, brauchten nicht mit *CIP* behandelt zu werden.

Präparation von Restriktionsfragmenten

Zu klonierende DNA-Fragmente (Inserts) wurden durch Restriktionsverdau aus bereits vorhandenen Plasmiden ausgeschnitten. Das DNA-Fragment wurde durch Gel-Elektrophorese und Elution aus dem Gel ("QIAquick Gel Extraction Kit", Qiagen) aufgereinigt. Es folgten Fällung mit Ethanol und Resuspension in 10 μ l TE.

Präparation von PCR-Fragmenten

Einige klonierte Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion aus genomischer DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt ("QIAquick PCR Purification Kit", Qiagen), mit Ethanol gefällt und in geeignetem Volumen TE aufgenommen. Um in den Vektor "pGEM-Teasy" (Promega) zu klonieren, konnte aufgrund des A-Überhangs der PCR-Produkte direkt zur Ligation übergegangen werden. Sollten PCR-Produkte als Restriktionsfragmente kloniert werden, so wurden in der PCR Primer verwendet, welche Überhänge mit entsprechenden Restriktions-Schnittstellen enthielten.

Die präparierten DNA-Fragmente wurden für die Klonierung weiter behandelt:

Blunt end-Klonierung

Zur Klonierung in "*blunt end*"-Vektoren wurden 5'-Überhänge von Restriktionsfragmenten mittels Klenow-Fragment aufgefüllt (15 min bei RT, 50 μ M dNTP + 10 mM $MgCl_2$ + 5 Units/ μ l Klenow). 3'-Überhänge wurden durch T4-DNA-Polymerase entfernt (15 min bei RT, 100 μ M dNTP + T4-DNA-Polymerase-Puffer). Beide Reaktionen wurden für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert, das Enzym durch Phe/Chl-Extraktion abgetrennt.

Ligation

Die Konzentrationen von Insert und Vektor wurden im Agarosegel abgeschätzt. Zur Ligation wurde angestrebt, Insert und Vektor im Stoffmengenverhältnis von 3 : 1 einzusetzen. Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

Ligationsansatz (10 μ l): Insert 3 Stoffmengenanteile + Vektor (>50 ng) 1 Stoffmengenanteile + Ligationspuffer (GeneCraft) einfach konzentriert + T4-DNA-Ligase (GeneCraft) 10 Units/Ansatz (1 μ l).

Agarose-Gelelektrophorese

Der aufzutrennenden Fragmentgröße entsprechend (siehe Tabelle) wurde Agarose in 0,5x TBE unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und danach mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE benutzt. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit Ladebuffer (siehe 150) versetzt.

Anteil der Agarose im Gel (% [w/v])	Erwarteter Trennbereich der Fragmente (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Nach der Elektrophorese wurden die Gele bei kurzzeitigem UV-Licht (285 nm) fotografiert. Präparative Gele wurden zur Vermeidung von Strangbrüchen nur energieärmerem, langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgesetzt.

Isolation von DNA aus dem Agarosegel

DNA-Fragmente wurden im präparativen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt, die gewünschte DNA-Bande unter langwelligem UV-Licht lokalisiert und das Gelstück ausgeschnitten. Mit Hilfe der Option Gelextraktion des "QIAquick Kit" (Qiagen) wurde die DNA aus dem Gelstück isoliert und in 30 µl TE-Puffer eluiert.

Alternativ wurden Dialyseschläuche verwendet, in denen die DNA elektrophoretisch aus der Agarose gelöst wurde. Hierzu wurden ca. 700 µl Puffer zusammen mit dem ausgeschnittenen Agarosestück in den Schlauch gebracht, welcher mit Klemmen an beiden Enden abgedichtet wurde. Je nach Fragmentgröße wurde dann für 30-60 min eine Spannung von 80-120 V angelegt, die Trennung unter langwelligem UV-Licht kontrolliert. Zum Schluss wurde für 30 s umgepolt, um die DNA von den Schlauchwänden zu lösen und die Lösung abpipettiert, alsdann Phe/Chl extrahiert und die DNA gefällt. Hiermit ließen sich insbesondere größere DNA-Fragmente, z.B. für die Klonierung des Knock-out-Konstruktes, deutlich effektiver, also mit höheren Ausbeuten, extrahieren als mit oben beschriebenem Kit, das für kleinere DNA-Fragmente wie PCR-Produkte und dicke Banden allerdings ausreichte und schneller durchzuarbeiten war.

Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde das Verfahren der kontrollierten Unterbrechung der DNA-Synthese (Sanger, Nicklen et al. 1977) eingesetzt. Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wurde auf einem ABI PRISM-377 DNA-Sequencer durchgeführt. Im Reaktionsansatz wurden 300-400 ng DNA, 10 pmol Primer und 4,5 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-Lösung zugegeben. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 11,5-13,5 µl statt. Das Cycle-Sequencing-Programm (30 s / 95°C, 10 s / 50°C, 4 min / 60°C, 25 Zyklen) wurde in einem Biometra Trio-Thermoblock durchgeführt. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt und in *Big Dye*-Auftragspuffer gelöst. Die Analyse erfolgte auf dem Sequenziergel und wurde mit der Computersoftware "Sequencher" ausgewertet.

Als Sequenzierprimer wurden verwendet:

lacZ-spezifischer Primer: AGCGGCTGATGTTGAACTG
T3: AATTAACCCTCACTAAAGG

T7: CTAATACGACTCACTATAGGGC
Sp6: ATTTAGGTGACACTATAG

Southern-Blot

Die mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA wurde im Agarosegel aufgetrennt, wobei die Gelkonzentration den zu bestimmenden Fragmentgrößen angepasst wurde. Nach Ethidiumbromidfärbung wurde mit einem Lineal fotografiert. Das Gel wurde dann für 15 min in 0,25 M HCl gewaschen, kurz mit Millipore-Wasser gespült und anschließend für 40 min in 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH denaturiert. Nach kurzem Spülen folgte die Neutralisierung für 40 min in 1 M Tris-HCl / 1,5 M NaCl. Zum Blotten wurde der Aufbau nach Southern verwendet. Als Transferpuffer diente 20x SSC, transferiert wurde für zwei Tage. Anschließend wurde die DNA durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (312 nm bei 0,3 J/ cm²) und zweistündigem Backen bei 80°C auf der Membran ("Qiabrane", Qiagen) kovalent fixiert.

Bezüglich der radioaktiven Markierung siehe unter „Radioaktives Labeln von Hybridisierungssonden“ (Seite 176).

Die wie oben beschrieben präparierte Membran wurde mit der radioaktiven Sonde in Hybridisierungsflaschen unter kontinuierlichem Drehen bei 65°C inkubiert. Zunächst wurden die Membranen für 1 h in 2x SSC / 0,5% SDS, dann für 1-2 h in Hybridisierungslösung prähybridisiert (siehe Seite 150). Die markierte Sonde und 100 µg/ml Heringsspermium-DNA wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, 5 min auf Eis inkubiert und mit der Hybridisierungslösung auf die Membran gegeben. Es wurde ÜN hybridisiert. Am nächsten Tag wurde zweimal für 30 min mit 2x SSC / 0,5% SDS und einmal 30 min mit 0,2x SSC / 0,5% SDS gewaschen. Die Exposition der abgetrockneten Membran erfolgte für ein bis drei Tage, unter Umständen auch länger, mit einem Biomax-Film (Kodak) bei -70°C.

Radioaktives *Labeln* von Hybridisierungssonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (gereinigte PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente) erfolgte nach dem "RediPrime II - random prime labelling system" (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben. Dazu wurden 50 - 100 ng DNA in 45 µl TE-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert, auf 4°C abgekühlt und unter Zuhilfenahme des Kits "RediPrime II" (Amersham) mit 50 µCi ³²P-dCTP (Amersham) 15 min bei 37°C radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde mit 5 µl EDTA (0,2 M) beendet, nichtinkorporierte Nukleotide durch Gelfiltration an G-50-Mikrosäulen (Sephadex G-50 Probe Quant, Pharmacia) nach Herstelleranleitung entfernt. Zur Überprüfung der Qualität der radioaktiven Markierung wurde die spezifische Aktivität der Sonde im Szintillationszähler (Beckmann) gemessen. Die DNA-Sonde sollte eine spezifische Aktivität von mindestens 5×10⁸ Zerfällen/min/µg aufweisen. Dazu wurde 1 µl vom Säulendurchfluss für die Szintillationszählung eingesetzt. 1 µl sollte ein Signal von 400000-700000 cpm („counts per minute“) liefern.

RNA-Techniken

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden Handschuhe getragen, das Wasser für alle Lösungen wurde mit 0,1% DEPC versetzt und alle Lösungen wurden zusätzlich autoklaviert. Die Arbeitsfläche sowie Pipetten wurden mit Ethanol und RNAZap gereinigt, Elektrophoresezubehör wurde in 0,5% SDS eingeweicht und anschließend mit DEPC-Wasser gespült. Frisch präpariertes Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Isolierung von Gesamt-RNA mit TRIzol

Das Gewebe wurde in TRIzol (Life Technologies) mit Hilfe eines Homogenisators (Polytron PT1200, Kinematica) homogenisiert, wobei für 50-100 mg Gewebe 1 ml TRIzol eingesetzt wurde. Das Homogenat wurde zentrifugiert (10 min, 12000 rpm, 4°C), der Überstand abgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro ml TRIzol wurde das Röhrchen kurz geschüttelt, 2-3 min bei RT inkubiert und zur Phasentrennung zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die RNA mit Isopropanol gefällt. Die RNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend das Pellet an der Luft getrocknet und in DEPC-Wasser für 10 min bei 60°C gelöst.

Isolierung von Gesamt-RNA mit RNeasy Total RNA Isolation Kit

Hierfür wurde das Protokoll für Tiergewebe nach den Angaben des Herstellers Qiagen durchgeführt.

Aufreinigung von poly-A⁺ RNA aus Gesamt-RNA

Hierfür wurde das Protokoll für das Oligotex-Kit des Herstellers Qiagen durchgeführt.

Northern-Blot-Analyse

Die Integrität der zuvor präparierten RNA wurde anhand der Banden ribosomaler RNA im nativen Agarosegel (1 %) überprüft. Die Konzentration der RNA-Proben wurde im Spektrophotometer bestimmt. Die RNA (etwa 5 µg poly A⁺ oder 10 µg total RNA / Geltasche) wurde in einem 1,2%igen denaturierenden Agarose-Formaldehydgel (1,2% Agarose, 37% Formaldehyd, 1x MOPS-Puffer) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS-Puffer verwendet. Für die Probendenaturierung wurden pro Probe 5 µl 10x MOPS-Puffer, 8,75 µl 37% Formaldehyd, 25 µl Formamid und 11,25 µl RNA (+ evtl. DEPC-Wasser) gemischt und für 5 min bei 60°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Ladepuffer wurde das Gel beladen und mit 75 V für 3-4 h laufen gelassen bis die Bromphenolblau-Bande 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Danach wurde der Bereich des Gels, der den Längenstandard enthielt, abgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Lineal fotografiert.

Der Aufbau des Northern Blots entsprach dem des Southern Blots. Die RNA wurde ebenfalls über zwei Tage auf eine Membran transferiert. Zunächst wurde das RNA-Gel 40 min in zehnfach konzentriertem SSC (pH 7,5) äquilibriert. Zum Blotten wurde der Aufbau nach (F. Sambrook 1989) verwendet. Das Blotten erfolgte für 48 h mit zehnfach konzentriertem SSC. Es wurden Nitrozellulosemembranen von Qiagen verwendet.

Es folgte der Blotabbau, das Markieren der Geltaschen auf der Membran und zweistündiges Backen bei 80°C, um die RNA auf der Membran kovalent zu fixieren.

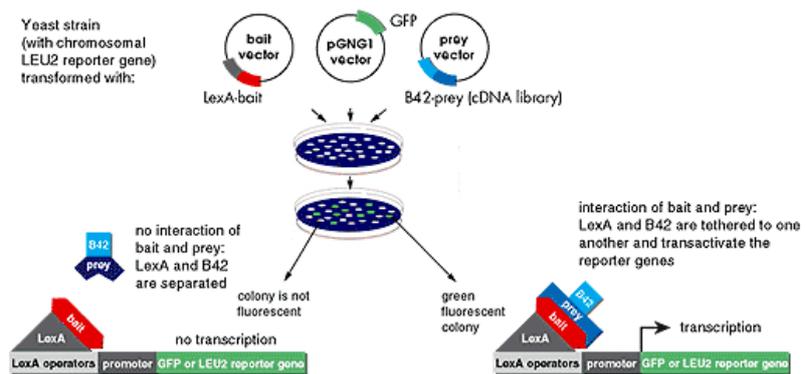
Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschrte wurden in rotierenden Hybridisierungsflaschen in Wärmeschranken entsprechend der Hybridisierung von Southern-Blots durchgeföhrt. Dazu wurde die geblottete Nitrozellulosemembran 60 min bei 60°C in zweifach SSC / 0,5 % SDS gewaschen. Anschließend wurde 2 h bei 42 °C mit Hybridisierungspuffer (siehe Seite 151) vorhybridisiert, die Hybridisierungslösung erneuert und radioaktiv markierte, denaturierte DNA-Sonde zugegeben. Bezüglich der radioaktiven Markierung siehe unter „Radioaktives *Labeln* von Hybridisierungssonden“ (Seite 176). Die Hybridisierung erfolgte unter Rotation in Glasflaschen, über Nacht bei 42 °C. Es wurden > 50 ng radioaktiv markierte Sonde in 6 ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Zur Entfernung ungebundener Sonde wurden folgende Waschschrte durchgeföhrt: Zweimal 30 min bei 60°C mit zweifach SSC / 0,5 % SDS und zweimal 30 min bei 60 °C mit 0,1fach SSC / 0,5 % SDS. Die hybridisierten Nitrozellulosemembranen wurden in Folie gepackt und in Kassetten mit Röntgenfilmen (Biomax, Kodak) exponiert (3-6 d bei -70 °C). Die Entwicklung der Filme erfolgte in einem Entwicklerautomaten (Curix 60, Agfa).

Protein-Techniken

Yeast-Two-Hybrid-Screen

Es wurde das *Grow'n'Glow GFP Two-Hybrid System* der Firma *Mobitec* (siehe Materialien) zusammen mit cDNA-Bibliotheken (Gehirn und kompletter Embryo) der Firma *OriGene* verwendet und den Angaben in den Kit-Anleitungen gefolgt.

Dieses System verwendet *GFP* als Reporter anstelle β -*Galactosidase*, so dass die zeitaufwändigeren β -*Gal-Assays* wegfallen, zudem man sich eine bessere Empfindlichkeit und Resistenz gegen Falschpositive verspricht. Tatsächlich konnten wir in zwei durchgeföhrt Screens mit unterschiedlichen Splice-Varianten des *TRIM46*-Gens (cDNA4, cDNA12) eine sehr hohe Spezifität feststellen, so dass überhaupt bei nur einer der beiden Varianten (cDNA12) Signale gefunden wurden. Unter der Annahme, dass die andere Variante nicht an andere Proteine bindet und keine Falschpositiven angezeigt wurden, wäre die Spezifität im Fall der anderen Splice-Variante, die an Proteine zu binden scheint, tatsächlich maximal.



Zur Durchföhrt wurde die kodierende Region des *TRIM46*-Gens (cDNA4 und cDNA12 jeweils) in die Multiple-Klonierungsstelle (*MCS*) des *Bait*-Vektors pEG202 kloniert, so dass sie ins Leseraster mit dem *LexA*-Fusionsprotein kommt. Das *LexA*-Protein vermittelt die DNA-Bindung an den *LexA*-Operator im Hefegenom sowie auf dem *GFP*-Reporter-Plasmid pGNG1. Im Genom des verwendeten Hefestammes *EGY48* befindet sich das Gen *Leu2* unter der Kontrolle des *LexA*-Operators. Mit Hilfe des *Leu2*-Gens vermögen diese Hefezellen die essentielle Aminosäure Leucin selber zu synthetisieren, so dass sie in

einem entsprechenden Mangelmedium überleben können, allerdings nur, wenn das *Leu2*-Gen aktiviert wird, was nur dann geschieht, wenn das Fusionskonstrukt des *Bait*-Vektors an den Operator bindet und des Weiteren durch überbrückende Protein-Protein-Interaktion die vom *Prey*-Vektor gelieferte RNA-Polymerase-Transkriptionsaktivierungs-Domäne B42 bindet. Hierzu wurden *cDNA-Libraries* in dem Vektor pJG4-5 eingesetzt, bei dem die einzelnen cDNAs im Leseraster mit der B42-Domäne fusioniert transkribiert und translatiert werden. Bindet eines dieser *Prey*-Proteine von einer der cDNAs aus der *Library* an das *Bait*-Protein (*TRIM46*-Isoform), so kann durch diese Überbrückung das *Leu2*-Gen transkribiert und die Resistenz gegenüber *Leu*-Mangelmedium von den Zellen ausgelebt werden.

Zusätzlich zum Mangel an Leucin werden die Zellen nach Transformation mit den Vektoren pEG202, pJG4-5 und pGNG1 auf Histidin-, Tryptophan- und Uracil-Mangelmedium gehalten, da auf diesen Vektoren entsprechende Gene zur Kompensation vorliegen und somit auf erfolgreiche Transformation selektiert werden kann, damit sichergestellt ist, dass die Zellen alle diese Vektoren enthalten.

Die Transformationen erfolgten unter Verwendung des *Grow'N'Glow High Efficiency Yeast Transformation Kit* von *Mobitec* in zwei Schritten, wobei die Vektoren pEG202 mit dem *Bait* und pGNG1 in einem Schritt als *small scale* Ansatz transformiert wurden, dieses auf entsprechendem Mangelmedium getestet wurde und diese Zellen anschließend für *large scale* Ansätze mit der DNA der *Prey-Library* im Vektor pJG4-5 eingesetzt wurden. Dabei wurden für einen vollständigen *Library-Screen* 100 µg DNA eingesetzt, um möglichst mehr als 10⁶ unabhängige Klone zu erhalten. Hierzu wurde die Transformations-effizienz durch Ausplattieren auf Mangelmedium DOBA (glu) –His –Ura –TRP, das also lediglich auf Vorhandensein aller drei Plasmide selektiert, bestimmt.

Abweichend von dem Transformationsprotokoll aus dem Kit wurden die Ansätze in 2 ml Eppendorf-Cups pipettiert und 3 µg statt 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, so dass mit 34 Ansätzen die 100 µg abgedeckt werden konnten. Die Plasmidmenge darf nicht zu groß werden, um zu verhindern, dass mehr als ein Plasmid der *Library* in eine Zelle kommt, wodurch der spätere Screen nicht mehr eindeutig wäre und die spätere Identifizierung der Klone erschwert würde.

Zur Selektion wurden 3 der 2 ml Ansätze der transformierten Hefezellen auf 12 großen 15 cm Platten mit dem Selektionsmedium DOBA (gal/raf) –His –Leu –Ura –TRP ausplattiert. Innerhalb einer Woche wurden die Kolonien sichtbar, die aufgrund der zahlreichen Selektionskriterien langsam wuchsen.

Zur Reduzierung Falschpositiver wurden die auf Agarplatten mit Mangelmedium DOBA (gal/raf) –His –Leu –Ura –TRP überlebenden Kolonien mit UV-Licht für *GFP* (395 nm, am besten unter Binokular mit *GFP*-Fluoreszenzfilter) bestrahlt, um diejenigen sichtbar zu machen, die zusätzlich den *GFP*-Reporter aktivieren. Diese Kolonien wurden zur weiteren Kontrolle auf das gleiche Mangelmedium mit Glucose anstelle von Galactose (glu statt gal/raf) als Energie- und C-Quelle ausplattiert, wo sie nicht wachsen können sollten, da das *Prey*-Protein auf dem Vektor pJG4-5 nur durch Induktion mittels Galactose transkribiert werden können sollte. Kolonien, die auf diesem Medium mit Glu trotzdem wachsen, wären Falschpositive.

Positive Hefe-Klone wurden mit dem *Grow'N'Glow Yeast Plasmid Isolation Kit* der Firma *Mobitec* isoliert und die DNA weiter in *E. coli* Bakterienzellen des Stammes *DH5α* elektroporiert. Dieser Schritt diente zur Trennung der Plasmide, da bei der Elektroporation zumeist nur ein einziges Plasmid in die Bakterien gelangt, so dass die verschiedenen Plasmide aus den Hefezellen in den Bakterien vereinzelt werden konnten. Nach Ausplattieren der Bakterien waren zwischen 6 bis 12 vereinzelt Bakterienkolonien zu picken und für Mini-Prep. zu kultivieren, um in einer davon das gewünschte Plasmid mit dem isolierten *Prey*-Vektor zu erhalten. Dieser konnte dann mit den für ihn spezifischen Primern sequenziert werden, um die cDNA-Sequenz zu identifizieren und für weitere Annotationen zu verwenden.

Praktisch gelang diese Sequenzierung bereits vor der Separierung der Plasmide, da auch in einem Plasmidgemisch die Primer für den *Prey*-Vektor spezifisch blieben und die andere Plasmid-DNA nicht störte, was die Sequenzierung von mehr als 50 Hefe-Klonen nach dem Screen beschleunigte.

GST-Pulldown-Essay

1. 50 µl Glutathion Sepharose 4B *Beads* (Amersham) wurden mit 500 µl *GST*-Bindepuffer (siehe Seite 150) gewaschen, bei 4.000 rpm in einer Tischzentrifuge kurz herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen.
2. Die vorgewaschenen *Beads* wurden mit 50 µg rekombinantem *GST*-Fusionsprotein bzw. reinem *GST* als Kontrolle in 500 µl *GST*-Bindepuffer bei 4°C unter Rotation ÜN inkubiert.
3. Die *Beads* wurden kurz herunterzentrifugiert und mit 500 µl *GST*-Bindepuffer bei 4°C unter Rotation für 3 min gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen.
4. Die *Beads* wurden herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen.
5. 45 µl des in-vitro-Transkriptions- und Translations-Produktes wurden zu den mit *GST*-Fusionsprotein bzw. nur mit *GST* gekoppelten *Beads* gegeben und in 500 µl *GST*-Bindepuffer bei 4°C unter Rotation für 1 - 2 h inkubiert. 5 µl des in-vitro-Transkriptions- und Translations-Produktes wurden als Kontrolle mit 2x SDS Ladepuffer (siehe *SDS-PAGE*) bei 95°C für 5 min erhitzt.
6. Die *Beads* wurden herunterzentrifugiert, der Überstand verworfen und die *Beads* 2 Mal mit *GST*-Bindepuffer bei 4°C unter Rotation für jeweils 3 – 5 min gewaschen.
7. Die *Beads* wurden herunterzentrifugiert, der Überstand verworfen und die *Beads* 2 Mal mit *GST*-Reinigungspuffer (siehe Seite 150) bei 4°C unter Rotation für jeweils 3 – 5 min gewaschen.
8. Die *Beads* wurden herunterzentrifugiert und der Überstand verworfen.
9. Das Protein wurde von den *Beads* eluiert mit 40 µl 2x SDS Ladepuffer (siehe *SDS-PAGE*) unter Erhitzung auf 95°C für 5 min.
10. Die *Beads* wurden abzentrifugiert und der Überstand mit dem Eluat entnommen, davon 20 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen zusammen mit den zuvor entnommenen Kontrollen.
11. Das Gel wurde auf ein Whatman-Papier gelegt und mit einem Vakuumgeltrockner von Biometra bei 60°C für 3 h getrocknet.
12. Das trockene Gel wurde in einer lichtdichten Kassette auf einem Whatman-Papier fixiert und damit Röntgenfilm (BioMax, Kodak) bei -70°C ÜN oder mehrere Tage belichtet.
13. Der Autoradiographie-Film wurde mit einer Curix 60 Entwicklermaschine der Firma Agfa entwickelt.

Affinitätsaufreinigung eines rekombinant exprimierten *GST*-Fusionsproteins

1. Die cDNA mit der zu exprimierenden Sequenz wurde in pGEX-KG-Vektor so inkloniert, dass sie im fortlaufenden Leseraster mit *GST* stand.
2. Das pGEX-KG-cDNA-Konstrukt wurde per Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien des Stammes *BL21 DE3 C41* gebracht und zur Selektion ausplattiert (Ampicillin). Eine einzelne Kolonie wurde in 100 ml LB-Medium zu 50 µg/ml Ampicillin bei 37°C ÜN geschüttelt.
3. Das Gefäß wurde mit vorgewärmtem LB-Medium zu 50 µg/ml Ampicillin auf 1 l Volumen aufgefüllt. Inkubation erfolgte so lange weiter, bis die OD₆₀₀ bei 37°C unter Schütteln einen Wert von 0,7 bis 0,8 erreichte (ca. 1 h).
4. Die Proteinexpression auf dem pGEX-KG-Vektor wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Inkubation wurde jetzt bei 25°C unter Schütteln fortgesetzt für ca. 6 h (alternativ bei 37°C für 2 h).
5. Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 25 min zur Ernte der Zellen.
6. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert, alsdann in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.
7. Die Falcon-Röhrchen wurden bei 4000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren zur späteren Weiterarbeit.

8. Das Pellet wurde in 40 ml *GST-Resuspensionspuffer* (siehe Seite 150) gelöst und das Gefäß dabei auf Eis gekühlt.
9. Die Bakterienzellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen (Branson Sonifier Disruptor B15, Einstellung Output 7 und 50% Arbeitszyklus), dabei in ihrem Gefäß zur Kühlung auf Eis gehalten. Die Prozedur wurde 5 Mal für jeweils 1 Minute durchgeführt.
10. Ultrazentrifugation der Suspension bei 25000 rpm und 4°C für 25 min in einer Beckmann L7 Ultrazentrifuge.
11. Der Überstand wurde zu 500 µl vorgewaschenen (siehe Kapitel *GST-Pulldown-Essay*) Glutathion-Sepharose *Beads* 4B (Amersham) gegeben und unter Rotation bei 4°C für 1 h inkubiert.
12. Die Suspension wurde bei 800 rpm und 4°C für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.
13. Das Pellet wurde 2 Mal mit 15 ml vorgekühltem *GST-Waschpuffer* (siehe Seite 150) gewaschen und dazu jeweils bei 800 rpm und 4°C für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen.
14. Die *Beads* wurden in 5 ml *GST-Wasch-Puffer* resuspendiert und in eine 5 ml Säule (Pierce) überführt, deren Fritte die *Beads* einfach bei den folgenden Waschungen zurückhalten sollte. In der Säule wurden die *Beads* mit weiteren 4 ml *GST-Wasch-Puffer* gewaschen.
15. Das *GST*-Fusionsprotein wurde von den *Beads* eluiert durch Zugabe von 1,2 ml 20 mM Glutathion (Sigma) und Inkubation bei 4°C unter Rotation für 1 h. Das Eluat wurde aufgefangen.
16. Nochmalige Elution mit 2 ml 20 mM Glutathion und Inkubation bei 4°C unter Rotation für 1 h.
17. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay bestimmt und Aliquots des gereinigten Proteins in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Bradford-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels des Bradford-Assays der Firma Bio-Rad bestimmt. Hierzu wurden 1 µl Proteinlösung mit 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach Inkubation von 10 min wurde die OD₅₉₅ bestimmt und die Konzentration anhand einer Eichkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen (abgewogene oder abpipettierte Mengen von BSA-Protein) bestimmt.

In-vitro-Transkription und Translation

Es wurde nach den Angaben des Herstellers Promega in seinem „TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System“ verfahren.

SDS-PAGE

Es wurde eine *Mini-Protean II* Gelapparatur der Firma Bio-Rad verwendet und den beiliegenden Instruktionen gefolgt. Die Proben wurden in einem denaturierenden Proteingel nach Laemmli aufgetrennt (Laemmli 1970). Dazu wurde in der BIORAD-Gießapparatur ein 12,5%-iges Trenngel gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde das Wasser abgegossen und ein 5%iges Sammelgel zusammen mit einem Kamm zum Formen der Taschen überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in die Gelkammer gesetzt. Als Laufpuffer wurde Laemmli-Puffer (siehe Seite 150) verwendet. Die Proben wurden mit 2x Ladepuffer (siehe Seite 150) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden die Proben und ein Proteinmarker (Precision Plus Protein Standard von BIORAD) geladen und für 3-4 h bei 60 V aufgetrennt bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Puffer und Gelzusammensetzungen siehe ab Seite 150).

Histologie

Anfertigung von Cryo-Schnitten

Für Cryo-Schnitte wurden embryonale Gehirne, ganze Embryonen oder einzelne Organe adulter Tiere 2 h oder ÜN in kaltem PFA (4 % in PBS) fixiert, zweimal 30 min in kaltem PBS gewaschen und ÜN bei 4 °C in 25 % Sucrose in PBS so lange inkubiert, bis die Proben in der Sucrose-Lösung auf den Boden absanken, was zum Schutz gegen Gefrierartefakte diente. Das Einfrieren erfolgte in Einbettmedium (Leica Instruments) auf Trockeneis in entsprechenden Plastik-Passformen. Gefrierschnitte wurden am Cryostaten (S3000, Leica Instruments) angefertigt und auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser) aufgeschmolzen. Je nach Gewebe wurden Schnittdicken von 12-35 µm angefertigt.

Anfertigung von Paraffinschnitten

Embryonale oder adulte Gehirne, ganze Embryonen oder einzelne Organe adulter Tiere wurden isoliert, ÜN in kaltem PFA (4 % in PBS) fixiert und jeweils 3 h bei 4 °C in PBS und 0,86 % NaCl gewaschen, wobei die Lösungen jeweils 3 Mal gewechselt wurden. Das Gewebe wurde in aufsteigender Ethanol- und Lösungsmittel-Reihe entwässert, dreimal über Nacht mit flüssigem Paraffin (Tycon health care) infiltriert und in Paraffin mit entsprechenden Förmchen eingebettet. Paraffinschnitte wurden am Mikrotom (Leica Instruments) angefertigt und auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser) aufgenommen. Je nach Gewebe wurden Schnittdicken von 10-20 µm angefertigt.

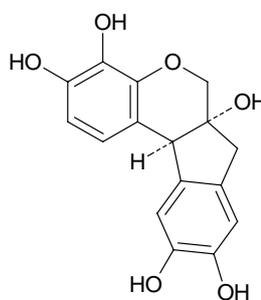
Aufsteigende Ethanol- und Lösungsmittel-Reihe zur Gewebeeentwässerung:

Ethanol 50% 2 x 15 min, Ethanol 70%, 2 x 15 min, Ethanol 80% 3 x 20 min, Ethanol 90% 3 x 30 min, Ethanol 96% 4 x 30 min, Ethanol 100% 5 x 20 min, Isopropanol ÜN bei 4 °C, Toluol : Isopropanol (25% : 75%) 30 min, Toluol : Isopropanol (50 % : 50 %) 30 min, Toluol : Isopropanol (75 % : 25 %) 30 min, Toluol 3 x 60 min, 3 x ÜN in flüssigem Paraffin (Paraplast).

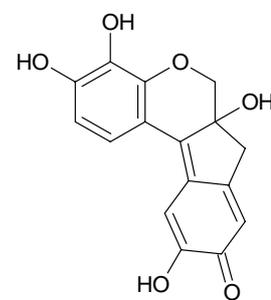
Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die H.E. - Färbung ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung, die Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile darstellt. Dabei werden Zellkerne blau und das Zytoplasma rot angefärbt, je nach Gewebetyp in unterschiedlicher Intensität.

Hämatoxylin ist ein farbloser Pflanzenfarbstoff, welcher durch Alkohol-extraktion aus Blauholz gewonnen wird. Durch Oxidation (Dehydrierung) an Raumluft wird Hämatoxylin in den Farbstoff Hämatein überführt. Über Zugabe von Alaunen ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$, Hämatoxylinlösung nach Harris) entstehen bei $pH < 3$ positiv geladene Komplexverbindungen, die sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, z.B. die DNA des Kernchromatins und der Mitochondrien, die RNA des rauen endoplasmatischen



Hämatoxylin [(+)-Form]



Hämatein

Abbildung 152: **Hämatoxylin links und der oxidierte Farbstoff Hämatein.**

tischen Retikulum, aber auch die sauren Glykosaminoglykane des hyalinen Knorpels anlagern. Die eigentliche tiefblaue Färbung der Kerne wird durch Einstellen des pH>3 mittels Leitungswasser erreicht, was zu einem Indikatorumschlag führt.

Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient. Er färbt alle übrigen Strukturen in verschiedenen Rot-Tönen, indem es sich an die positiven Gruppen von z.B. Eiweißen mittels elektrostatischer Adsorption bindet.

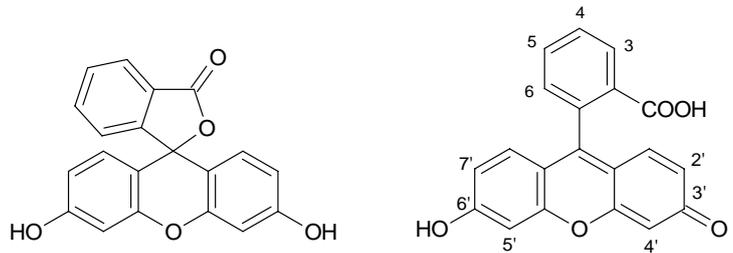


Abbildung 153: **Fluorescein in seiner Lacton-Form (links) bzw. offenen Form (rechts). Eosin ist das Natriumsalz des 2',4',5',7'-Tetrabromfluoresceins.**

Protokoll für Paraffinschnitte

Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden aus Lagerung bei RT genommen.

Entparaffinierung: 3 x 5 min in Histoclear.

Rehydrierung: Absteigende Ethanolreihe von je 4 min 100%, 90%, 70%, 50% Ethanol, 100% Millipore-H₂O.

Färbung: 8 – 15 min filtrierter Hämatoxylinlösung nach Harris.

Waschen: 3 x 3 min mit Millipore-H₂O.

Entfärbung: 15 s in HCl-Alkohol-Lösung (500 ml 70% Ethanol + 5 ml konzentrierte HCl (37%)).

Neutralisierung: 1 min mit Millipore-H₂O, dann 7 min Millipore-H₂O.

Gegenfärbung: 2 – 5 min in 0,1% Eosin-Lösung (0,1 g Eosin + 500 ml Millipore-H₂O + 150 µl Eisessig).

Entfärbung und

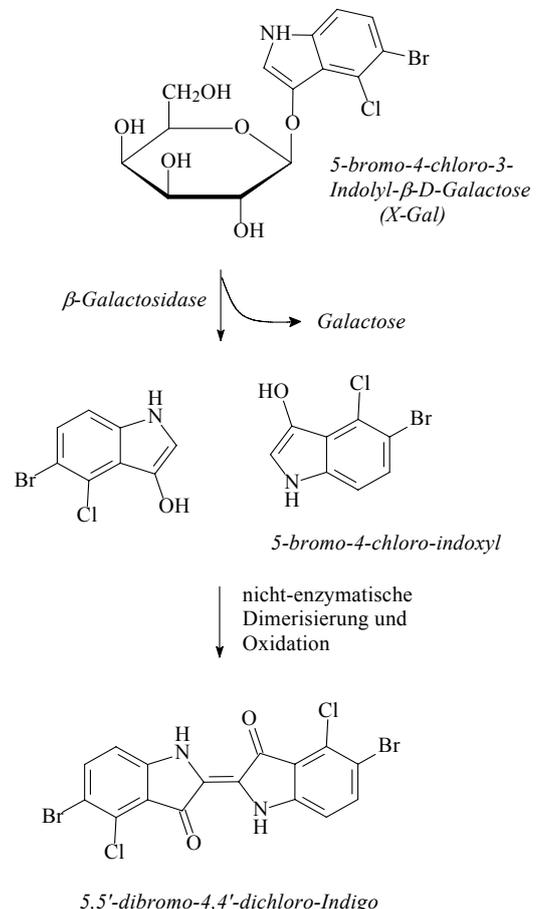
Dehydrierung: Aufsteigende Ethanolreihe von je 2 min 50%, 70%, 90%, 100%, 100% Ethanol. Anschließend 3 x 3 min in Histoclear.

Die Objektträger wurden abgetrocknet, mit einigen Tropfen *Eukitt* versehen und mit Deckgläschen bedeckt. Das Eindeckungsmedium sollte nicht wasserlöslich sein, um Ausfärbungen des Eosins zu vermeiden.

β-Galactosidase-Enzymhistochemie (lacZ-Färbung)

Die Färbung diente zum Nachweis der Enzymaktivität von β-Galactosidase (*lacZ*) aus *E. coli*, die in Geweben von Säugetieren nicht vorkommt, aber als Reporter-Transgen für einen Maus-Knock-out eingesetzt werden kann. Die physiologische Funktion des Enzyms ist die hydrolytische Spaltung von Lactose in Galactose und Glucose.

Statt Lactose wird zur Färbung 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid (*X-Gal*) eingesetzt. Durch die Hydrolyse wird das zunächst farblose Indoxylmonomer freigesetzt, das sich zu einem Dimer zusammenlagert, welches schließlich nicht-enzymatisch zu einem blauen



Farbstoff oxidiert werden kann, einem halogenierten Indigo-Derivat, das unlöslich ist und präzipitiert. Dimerisierung und Oxidation erfordern den Transfer eines Elektrons durch einen Elektronenakzeptor mit passendem Redoxpotential. Die der Färbelösung zugesetzten Kationen Fe^{3+} (Eisen(III)/„Ferri“) und Fe^{2+} (Eisen(II)/„Ferro“) erfüllen diese Funktion.

Die Fixierdauer sollte nicht übertrieben werden, da Überfixierung die Enzymaktivität vermindert.

Zur Vermeidung von Hintergrundfärbung durch endogene β -Galactosidase-Aktivität aus Lysosomen der Säugerzellen sollte der pH bei 7,2 (PBS) und die Reaktionstemperatur von 30°C eingehalten werden, da das lysosomale Enzym nur bei geringem pH aktiv ist.

Protokoll für Cryo-Schnitte

Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden aus -70°C Lagerung genommen und 20 min bei 37°C trocknen gelassen. Es wurde wie im *Protokoll für Whole-Mounts* beschrieben verfahren, jedoch ohne die dortige Fixierungsprozedur. Es genügte die zur *Präparation von Cryo-Schnitten* übliche Fixierung in 4% PFA ÜN mit anschließender Behandlung in 25% Sucrose bis zum Absinken vor dem Einbetten in *Tissue Freezing Medium*[®]. Die aufgetauten Cryo-Schnitte wurden nicht nachfixiert, optional wäre eine Fixierung von 5-15 min in Fix A oder Fix B. Die weiteren Schritte waren analog zum *Protokoll für Whole-Mounts*, allerdings ohne abschließenden Aufklärungsschritt in Glycerol. Die Objektträger wurden stattdessen getrocknet, mit einigen Tropfen Vectashield H-1300 versehen und mit Deckgläschen bedeckt.

Protokoll für Doppelfärbung lacZ + Immunhistochemie

Zuerst erfolgte die lacZ-Färbung nach dem *Protokoll für Cryo-Schnitte* – von entweder heterozygotem oder homozygotem lacZ-transgenem Gewebematerial – für 1 bis 3 Tage bei 30°C. (Optional wurde die lacZ-Färbelösung aus der Küvette gegossen bis nur noch ca. 1/5 der ursprünglichen Menge als Rest übrig blieb, und die teilweise jetzt an der Luft freiliegenden Cryo-Schnitte wurden für 1 Tag bei 30°C weiter inkubiert.) Anschließend Immunfärbung nach dem dortigen *Protokoll für Cryo-Schnitte*, Beginn mit Waschen in PBS. Die Objektträger wurden getrocknet, mit einigen Tropfen Vectashield H-1000 versehen und mit Deckgläschen bedeckt.

Protokoll für Whole-Mount-Embryonen oder Gehirne

Embryonen oder Gehirne wurden unmittelbar nach der Präparation aus den lebenden Tieren verwendet.

Fixierung: Fixierdauer und Fixativ je nach Alter.

Gewebe	Alter	Fixierdauer [min]	Fixativ
Embryo	E9,5	30	Fix A
Embryo	E10,5	30	Fix A
Embryo	E11,5	50	Fix A
Embryo	E12,5	50	Fix A
Embryo	E13,5	30, Embryo halbieren, 30	Fix A, Fix A
Embryo	E15,5	30, Embryo halbieren, 30	Fix A, Fix B
Gehirn	P0-7	30, zu 100 µm schneiden, 30	Fix B
Gehirn	P7-10	30, zu 100 µm schneiden, 60	Fix B
Gehirn	P10+	45, zu 100 µm schneiden, 60	Fix B

Fixierung erfolgte auf Eis oder 4°C unter Schwenken.

Schneiden mittels Rasierklinge unter Arretierung der Gewebe in einer Schale.

Waschen: 2 x 20 min PBS bei RT.

Färben: In *x-Gal*-Färbelösung unter Lichtausschluss bei 30°C ÜN oder mehrere Tage bis Färbung sichtbar wurde.

Waschen: 2 x 15 min PBS.

Aufklären: Aufsteigende Glycerolreihe, alle 6 bis 24 h pro Schritt (20%, 40%, 60%, 80% Glycerol in PBS).

Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen dienen dem Nachweis von Protein-Expression in Gewebeschnitten. Primäre Antikörper des Typs IgG aus einer bestimmten Tierart sollten spezifisch an ihr Epitop, einer Teilsequenz des Zielproteins, binden. Ein sekundärer Antikörper wurde gegen die invarianten Domänen (*Heavy-Chain*) der IgG-Antikörper aus der Spezies des primären Antikörpers gerichtet. Der sekundäre Antikörper war mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Wurden primäre Antikörper aus unterschiedlichen Spezies eingesetzt, so konnten mit spezies-spezifischen sekundären Antikörpern, die mit verschiedenen Fluorochromen gekoppelt waren, Mehrfachfärbungen durchgeführt werden, beispielsweise um die Co-Lokalisation bestimmter Proteine zu bestimmen.

Die unten dargestellten Protokolle konnten anhand der jeweiligen Antikörperverdünnungen variiert werden. Auch die Veränderung der Blocking-Bedingungen hatte Einfluss auf das Ergebnis. Neben der dargestellten allgemeinen Blocking-Lösung empfiehlt es sich, Blutserum aus der Spezies des Sekundär-Antikörpers einzusetzen (ca. 1-5%), um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Verwendung von Cryo- oder Paraffinschnitten erfolgte je nach Anforderungen für den Antikörper, da manche nur auf bestimmten Gewebepreparationen funktionieren.

Protokoll für Cryo-Schnitte

Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden aus -70°C Lagerung genommen und 20 min bei 37°C trocknen gelassen.

Umrandung mittels Fettstift (ImmEdge Pen), um die Lösungen später auf dem Objektträger zu halten oder um verschiedene Inkubationsbereiche mit Antikörperlösungen voneinander abzutrennen.

In Küvetten eingesetzt folgte Inkubation:

Waschen: 3 x 5 min in PBT.

Blocking: 1 h in Blockinglösung (0,2% Gelatine in PBT).

Primär AK: Verdünnung des primären AKs je nach Typ zwischen 1:50-1:500 in Blocking-Lösung. Inkubation ÜN bei 4°C, nicht in Küvetten, sondern horizontal in feuchten Kammern, um die Menge an AK-Lösungen zu minimieren (ca. 150-300 µl je nach Zahl der Gewebeschnitte pro Objektträger, die durch den Fettstift auf dem Objektträger gehalten wurden).

Waschen: 3 x 5 min in PBT.

Sekundär AK: Verdünnung des sekundären AKs je nach Typ bei 1:200 in Blockinglösung für 1 h bei RT, ebenfalls wieder in feuchten Kammern statt Küvetten.

Waschen: 2 x 5 min PBT.

Gegenfärbung: Optional konnten die Zellkerne mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst (verdünnt zu 1 x in PBS) für 5 min eingefärbt werden.

Waschen: 1 x 5 min PBS.

Die Objektträger wurden getrocknet, mit einigen Tropfen Vectashield H-1000 versehen und mit Deckgläschen bedeckt.

Protokoll für Paraffinschnitte ohne Antigen-Unmasking

Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden aus Lagerung bei RT genommen. Die Prozedur war identisch mit der für Cryo-Schnitte bis auf folgende alternative Schritte zum Waschen und Rehydrieren vor dem Blocking:

2 x 5 min in HistoClear.

Absteigende Ethanolreihe je 2 min in 100%, 96%, 90%, 70% Ethanol in Millipore-H₂O.

5 min in Millipore-H₂O.

Weiter im Protokoll für Cryo-Schnitte mit Waschschritten in PBT vor Blocking.

Protokoll für Paraffinschnitte mit Antigen-Unmasking

Antigen-Unmasking sollte die Zugänglichkeit von Antikörpern zu ihren Epitopen verbessern, indem es PFA fixierte Proteine teilweise wieder aus ihrer Fixierung befreit, d.h. *Crosslinks* aufbricht. In das vorherige Protokoll für Paraffinschnitte ohne Antigen-Unmasking wurden vor dem Blocking 3 Antigen-Unmasking-Inkubationen eingefügt. Während einer Antigen-Unmasking-Inkubation wurden die Objektträger für 4 min in der Mikrowelle in der Antigen-Unmasking-Lösung gekocht und zwar auf der kleinsten Intensitätsstufe, bei der noch ein Kochen zu beobachten war, danach 20 min abkühlen gelassen bei RT. Es folgten 3 x 5 min in PBS zum Waschen und weiter im vorherigen Protokoll beim Blocking.

Protokoll für Whole-Mount-Immunfärbungen

Die Färbungen erfolgten hier nicht auf Schnitten, sondern möglichst intakt belassenen Embryonen. Limitierender Faktor dieser Methode ist die Penetrierbarkeit der Antikörper in das Gewebe, was bei Schnitten von wenigen µm Dicke nicht so problematisch ist. Je früher die verwendeten Embryonalstadien waren, desto besser das Ergebnis. Embryonen ab Stadium E12 wurden mit einer Rasierklinge in kleinere Teile zerlegt.

Waschen: Embryonen, welche zuvor ÜN in 4% PFA fixiert worden waren, wurden in 12 Well-Plastikbehältern für 5 min mit PBT inkubiert, anschließend 5 min in Millipore-H₂O.

Permeabilisierung:

Inkubation in vorgekühltem Aceton bei -20°C.

Waschen: 5 min in Millipore-H₂O, anschließend 5 min in PBT.

Blocking: Inkubation für mindestens 1,5 h in Immunoblock-Lösung (5% Serum der Spezies des sekundären AKs + 1% BSA + 1% DMSO in PBT).

Primär AK: Inkubation des primären AKs mit geeigneter Verdünnung (1:50-1:500) in Immunoblock-Lösung bei 4°C ÜN.

Waschen: 7 x 15 min in Immunowasch-Lösung (1% BSA + 1% DMSO in PBT), anschließend 1 x 2 h in Immunowasch-Lösung.

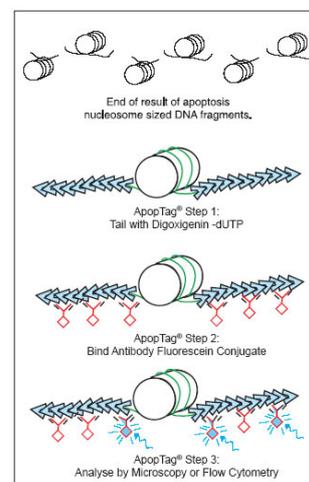
Sekundär AK: Inkubation des sekundären AKs mit geeigneter Verdünnung (1:200) in Immunoblock-Lösung bei 4°C ÜN.

Waschen: 8 x 15 min in Immunowasch-Lösung, anschließend 2 x 5 min in PBT.

Die Embryonen konnten in PBT bei 4°C längere Zeit gelagert und zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

Tunnel Staining gegen Apoptose

Tunnel Staining ist eine Nachweismethode für apoptotische Zellen, d.h. Zellen, die einen programmierten Zelltod durchlaufen. Eine Nachweismethode für das Labor ist das *Tunnel Staining*. Hier wird davon Gebrauch gemacht, dass bei der Apoptose das Genom der Zellen in kleine Fragmente von der Größe von Nucleosomen zerkleinert wird. Viele kleine DNA-Fragmente bedeuten doppelt so viele Enden mit freien 3'OH-Gruppen. An diese können mit Hilfe des Enzyms *Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT)* freie Nucleotid-Triphosphate, die oft mit Digoxigenin markiert sind, angehängt werden unter Abspaltung des Pyrophosphatrestes. Dies geht sowohl an doppelsträngiger wie einzelsträngiger DNA und unabhängig von einem *Template*. Gegen das Digoxigenin kann dann zur Sichtbarmachung mit einem fluoreschromen Antikörper gefärbt werden. Alternativ können die Nucleotid-Triphosphate bereits mit einem Fluorochrom gekoppelt sein.



Protokoll für Cryo-Schnitte

Es wurde das ApopTag[®] Kit S7160 der Firma Qbiogene verwendet.

Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden aus -70°C Lagerung genommen und 20 min bei 37°C trocknen gelassen.

Nachfixierung: 1% PFA in PBS für 10 min bei RT.

Waschen: 2 x 5 min PBS.

Permeabilisierung: Ethanol + Eisessig (2:1) für 5 min bei -20°C (vorgekühlt).

Waschen: 2 x 5 min PBS.

Pufferäquilibration: Die Objektträger wurden horizontal in einer feuchten Kammer ausgelegt und Äquilibrationspuffer aus dem Kit aufgetropft und für 10-15 s inkubiert.

Enzymreaktion: Entfernung des Äquilibrationspuffers und Auftropfen der TdT-Enzymlösung (700 µl Reaktionspuffer aus dem Kit + 300 µl TdT-Enzym auch daraus) für 1 h bei 37°C.

Stopp der Reaktion: Die Objektträger wurden in Küvetten mit Stop/Wash-Buffer aus dem Kit inkubiert für 10 min bei RT und anfänglichem leichtem Schütteln (15 s).

Waschen: 2 x 2 min PBS, eventuell Hoechst-Stain (1:1000) und nochmals 2 x 2 min PBS.

Die Objektträger wurden getrocknet, mit einigen Tropfen Vectashield H-1000 versehen und mit Deckgläschen bedeckt.

In-situ-Hybridisierung von RNA-Sonden

Die verwendeten Tris-freien Lösungen wurden mit DEPC behandelt und anschließend autoklaviert, Tris enthaltende Puffer nur autoklaviert. Es wurden RNase-freie Bedingungen eingehalten, d.h. Küvetten im Ofen gebacken und Pipetten mit RNAzap (Ambion) gereinigt, ebenso der Arbeitsbereich. Die Sonden wurden in Plasmidvektoren verwendet, die über T7-, SP6- oder T3-Promotoren verfügten, so dass mit den entsprechenden Polymerasen cRNA synthetisiert werden konnte. Hierzu wurden die Fragmente mittels PCR oder Restriktionsverdau gewonnen und in solche Vektoren wie z.B. *pGEM-Teasy* kloniert. Alternativ konnten bestellte Plasmide mit cDNA-Inserts von RZPD direkt verwendet werden.

Herstellung von Digoxigenin markierten RNA-Sonden

Die Plasmid-DNA musste mittels Restriktionsverdau einseitig linearisiert werden, um ein definiertes Ende der cRNA-Synthese festzulegen und damit nicht zu viel Vektorsequenz in der zu synthetisierenden Sondensequenz eingebaut wurde. Hierzu musste die Orientierung des Inserts in den Plasmiden mittels Sequenzierung oder Restriktionsverdau bestimmt werden, so dass man die geeignete Polymerase für „sense“ und „antisense“ auswählen konnte.

Ausgangsmenge für den Restriktionsverdau waren mindestens 10 µg DNA. Beispiel eines Restriktionsansatzes: Gesamtvolumen 100 µl, 25-30 µg DNA, 20 U Restriktionsenzym, 10 µl Restriktionspuffer.

Nach 3-6 h Inkubation bei 37°C (je nach Enzym) wurde der Verdau im Gel auf Vollständigkeit mit unverdauter DNA als Kontrolle kontrolliert. Bei unvollständiger Linearisierung wurden erneut 10 U Enzym zugefügt. Nach vollständiger Linearisierung des Plasmids wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt und mit TE auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Es erfolgte eine Phe/Chl-Extraktion durch Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform, welches gemischt und bei 13000 Umdrehungen pro Minute in einer Tischzentrifuge 5 min lang getrennt wurde. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und wieder für 5 min und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues Gefäß überführt und zur Präzipitation mit 1/25 seines Volumens an 7,5 M NH₄Acetat (Endkonzentration 0,3 M) sowie dem 2,5

fachen seines Volumens an vorgekühltem 100% Ethanol versetzt. Nach mindestens 30 min Inkubation bei -70°C erfolgte Zentrifugation für 15 min unter maximaler Drehzahl. Der Überstand wurde verworfen und das sichtbare Pellet mit 70% Ethanol 2 Mal gewaschen sowie nach kurzer Trocknung mit 10-20 µl TE bei 37°C gelöst.

Mit Hilfe der linearisierten Sonden-DNA wurde folgende Synthesereaktion angesetzt:

Gesamtvolumen 20 µl, bestehend aus 1 µg DNA-Matrize + 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche) + 2 µl 10x DIG RNA Markierungsmix (Roche) + 0,5 µl RNasin (40 U/ µl, Promega) + 1 µl T3, T7 oder Sp6 RNA Polymerase (Roche, 20 U/ µl) je nach Plasmid + x µl Wasser zur Kompensation des Gesamtvolumens.

Der 10x Transkriptionspuffer hatte die Zusammensetzung: 0,4 M Tris-HCl, pH 8,0 + 60 mM MgCl₂ + 100 mM DTT + 20 mM Spermidin.

Der Transkriptionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Es folgte ein 15 minütiger DNase-Verdau bei 37°C durch Zusatz von 2 U RQ1-DNase (20 U/µl, DNase war RNase frei, von Promega). Danach wurde die RNA durch Zugabe von 100 µl TE (pH 8) + 10 µl 4 M LiCl und 300 µl absolutem Ethanol für 2 h bei -70°C gefällt. Die RNA wurde in 100 µl TE gelöst und im Agarosegel auf ihre Integrität hin überprüft.

Protokoll für ISH auf Cryo-Schnitten

Die Cryo-Schnitte wurden von Ihren Lagerbedingungen bei -70°C für ca. 20 min auf RT gebracht bis die Kondensfeuchtigkeit verschwunden war. Nach der Umrandung mit einem hitzebeständigen Stift (*ImmEdge Pen*, Vector) wurden sie in gebackene Küvetten überführt und durchliefen die folgenden Schritte:

1. Tag: 15 min Fixierung in 4% PFA in PBS.
2x 5 min in PBS.
4-5 min Proteinase K (20 µg/ml) in 50 mM Tris-HCl, pH8 und 5 mM EDTA bei 37°C.
5 min 0,2% Glycin in PBS.
2x 5 min in PBS.
20 min Postfixierung in 4% PFA / PBS und 0,2% Glutaraldehyd.
2x 5 min in PBS.
2 h Prähybridisierung in Hybridisierungsmix bei 70°C.
3 min Denaturierung der RNA-Sonde bei 80°C, Zugabe zum Hybridisierungsmix.
Hybridisierung ÜN bei 70°C in einer feuchten Kammer mit Formamid/SSC/Wasser.
2. Tag: 5 min 2x SSC, pH 4,5.
3x 30 min 2x SSC/50% Formamid bei 65°C.
2x 10 min KTBT.
2 h Blocken in Blocklösung.
Inkubation ÜN mit anti-DIG-alkalischer Phosphatase, Fab-Fragmenten (Roche, 1:2000) in Blocklösung, 4°C.
3. Tag: 3x 5 min KTBT.
3x 30 min KTBT.
3x 5 min NTMT.
Färben mit NBT/BCIP (1:50, Roche) in NTMT bei RT für mehrere Stunden, evtl. ÜN.
3x 5 min PBT.
Eindeckeln mit Mowiol 4-88 (Kuraray Specialities Europe).

Vor dem Eindeckeln wurden die Färbestärke und das Verhältnis des Signals zum Hintergrund verglichen und eventuell mit frischer Färbelösung weiter inkubiert bis es ausreichte.

Anhang

Literaturverzeichnis

- Accili, D., C. S. Fishburn, et al. (1996). "A targeted mutation of the D3 dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 1945-9.
- Aernout Luttun, P. C. (2003). "De novo vasculogenesis in the heart." Cardiovascular Research(58): 378-389.
- Ali Z. Chaudhry, G. E. L., and Richard M. Gronostajski (1997). "Expression Patterns of the Four Nuclear Factor I Genes During Mouse Embryogenesis Indicate a Potential Role in Development." Developmental Dynamics **208**: 313–325.
- Anne Chotteau-Lelièvre, X. D., Hélène Pelczar, Pierre-Antoine Defossez and Yvan de Launoit (1997). "Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development." Oncogene **15**(8): 937-952.
- Ashburner, M., C. A. Ball, et al. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nat Genet **25**(1): 25-9.
- Ashique, A. M., V. Kharazia, et al. (2006). "Localization of the scaffolding protein RACK1 in the developing and adult mouse brain." Brain Res **1069**(1): 31-8.
- Bartlett, S. E., J. Enquist, et al. (2005). "Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11521-6.
- Bayer SA, A. J. (1991). Neocortical Development, Raven Press.
- Beer, H. D., C. Munding, et al. (2002). "The estrogen-responsive B box protein: a novel regulator of keratinocyte differentiation." J Biol Chem **277**(23): 20740-9.
- Beheshti, B., I. Braude, et al. (2003). "Chromosomal localization of DNA amplifications in neuroblastoma tumors using cDNA microarray comparative genomic hybridization." Neoplasia **5**(1): 53-62.
- Bishop, K. M., J. L. Rubenstein, et al. (2002). "Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex." J Neurosci **22**(17): 7627-38.
- Bouwmeester, T., S. Kim, et al. (1996). "Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer." Nature **382**(6592): 595-601.
- Braitenberg, S. (1998). Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity, Springer.
- Burwell, R. D., M. P. Witter, et al. (1995). "Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain." Hippocampus **5**(5): 390-408.
- Cajal, R. y. (2000). Texture of the Nervous System of Man and the Vertebrates. Vienna.
- Cao, T., K. L. Borden, et al. (1997). "Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution." J Cell Sci **110 (Pt 14)**: 1563-71.
- Carmeliet, P. (2003). "Blood Vessels and Nerves: Common Signals, Pathways and Diseases." Nature Review Genetics **4**: 710-720.
- Chiang, C., Y. Litingtung, et al. (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function." Nature **383**(6599): 407-13.
- Chu, P. H., P. Ruiz-Lozano, et al. (2000). "Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system." Mech Dev **95**(1-2): 259-65.
- Coelho, D. J., D. J. Sims, et al. (2005). "Cell type-specific and sexually dimorphic expression of transcription factor AP-2 in the adult mouse brain." Neuroscience **134**(3): 907-19.
- Cook, M. J. (1965). The Anatomy of the Laboratory Mouse, M.R.C. Laboratory Animals Centre Carshalton, Surrey, England Academic Press.

- Curcio-Morelli, C., A. M. Zavacki, et al. (2003). "Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation." *J Clin Invest* **112**(2): 189-96.
- Demidenko, Z. N., A. Rapisarda, et al. (2005). "Accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is limited by transcription-dependent depletion." *Oncogene* **24**(30): 4829-38.
- Di Giaimo, R., M. Riccio, et al. (2002). "New insights into the molecular basis of progressive myoclonus epilepsy: a multiprotein complex with cystatin B." *Hum Mol Genet* **11**(23): 2941-50.
- Diatchenko, L., Y. F. Lau, et al. (1996). "Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 6025-30.
- Doetschman, T. C., H. Eistetter, et al. (1985). "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." *J Embryol Exp Morphol* **87**: 27-45.
- Duffield, G. E., J. D. Best, et al. (2002). "Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells." *Curr Biol* **12**(7): 551-7.
- El-Husseini, A. E. and S. R. Vincent (1999). "Cloning and characterization of a novel RING finger protein that interacts with class V myosins." *J Biol Chem* **274**(28): 19771-7.
- Englund C, F. A., Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF (2005). "Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex." *Journal of Neuroscience* **25**: 247-51.
- Erik Storkebaum, D. L., and Peter Carmeliet (2004). "VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection." *BioEssays* **26**: 943-954.
- F. Barberini, A. C., I G. Carpino, I S. Correr, I and F. Brunone, 2 (2004). "Lateral Costal Artery: Accessory Thoracic Vessel of Clinical Interest." *Clinical Anatomy*(17): 218-226.
- F. Sambrook, E. F. F. u. T. M. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.
- Fairall, L., J. W. Schwabe, et al. (1993). "The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition." *Nature* **366**(6454): 483-7.
- Fousteri, M. I. and A. R. Lehmann (2000). "A novel SMC protein complex in *Schizosaccharomyces pombe* contains the Rad18 DNA repair protein." *Embo J* **19**(7): 1691-702.
- Fujioka Y, K. Y., Nomaguchi K, Watanabe K, Kohno K. (2002). "Identification of a novel non-structural maintenance of chromosomes (SMC) component of the SMC5-SMC6 complex involved in DNA repair." *J Biol Chem*. **277**(24): 21585-91.
- Fukuchi-Shimogori, T. and E. A. Grove (2001). "Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8." *Science* **294**(5544): 1071-4.
- Fukuchi-Shimogori, T. and E. A. Grove (2003). "Emx2 patterns the neocortex by regulating FGF positional signaling." *Nat Neurosci* **6**(8): 825-31.
- Galceran, J., E. M. Miyashita-Lin, et al. (2000). "Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1." *Development* **127**(3): 469-82.
- Gorter, J. A., A. R. Mesquita, et al. (2005). "Increased expression of ferritin, an iron-storage protein, in specific regions of the parahippocampal cortex of epileptic rats." *Epilepsia* **46**(9): 1371-9.
- Gotoh, M., Y. Izutsu, et al. (2003). "Complementary expression of AP-2 and AP-2rep in ectodermal derivatives of *Xenopus* embryos." *Dev Genes Evol* **213**(7): 363-7.
- Gotz M, S. A., Gruss P. (1998). "Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex." *Neuron* **21**: 1031-44.
- Grove, E. A. and T. Fukuchi-Shimogori (2003). "Generating the cerebral cortical area map." *Annu Rev Neurosci* **26**: 355-80.
- Grove, E. A., S. Tole, et al. (1998). "The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in *Gli3*-deficient mice." *Development* **125**(12): 2315-25.
- Grundke-Iqbal, I., J. Fleming, et al. (1990). "Ferritin is a component of the neuritic (senile) plaque in Alzheimer dementia." *Acta Neuropathol (Berl)* **81**(2): 105-10.

- Haase, V. H., J. N. Glickman, et al. (2001). "Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1583-8.
- Hanser (2001). Lexikon der Neurowissenschaft. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Harbers, M., T. Nomura, et al. (2001). "Intracellular localization of the Ret finger protein depends on a functional nuclear export signal and protein kinase C activation." J Biol Chem **276**(51): 48596-607.
- Heather B. Wood, G. M., Lyn Healy, Tariq Enver, and Gillian M. Morriss-Kay (1997). "CD34 Expression Patterns During Early Mouse Development Are Related to Modes of Blood Vessel Formation and Reveal Additional Sites of Hematopoiesis." Blood **90**(6): 2300-2311.
- Higgy, N. A., A. M. Salicioni, et al. (1997). "Differential expression of human ferritin H chain gene in immortal human breast epithelial MCF-10F cells." Mol Carcinog **20**(4): 332-9.
- Hirano, T., R. Kobayashi, et al. (1997). "Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein." Cell **89**(4): 511-21.
- Hirano, T. and T. J. Mitchison (1994). "A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro." Cell **79**(3): 449-58.
- Homma, N., Y. Takei, et al. (2003). "Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension." Cell **114**(2): 229-39.
- Hubel, D. H., T. N. Wiesel, et al. (1977). "Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **278**(961): 377-409.
- Imhof, A., M. Schuierer, et al. (1999). "Transcriptional regulation of the AP-2alpha promoter by BTEB-1 and AP-2rep, a novel wt-1/egr-related zinc finger repressor." Mol Cell Biol **19**(1): 194-204.
- Jamali, S., F. Bartolomei, et al. (2006). "Large-scale expression study of human mesial temporal lobe epilepsy: evidence for dysregulation of the neurotransmission and complement systems in the entorhinal cortex." Brain.
- Ji-Won Lee, S.-H. B., Joo-Won Jeong, Se-Hee Kim and Kyu-Won Kim (2004). "Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions." EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE **36**(1): 1-12.
- Kaminsky, Z. A., V. Popenkikyte, et al. (2005). "Search for somatic DNA variation in the brain: investigation of the serotonin 2A receptor gene." Mamm Genome **16**(8): 587-93.
- Kawakami, A., T. Kitsukawa, et al. (1996). "Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system." J Neurobiol **29**(1): 1-17.
- Keynes, R. and R. Krumlauf (1994). "Hox genes and regionalization of the nervous system." Annu Rev Neurosci **17**: 109-32.
- Kiyoshi Iida, H. K., Hideaki Kakinuma, Naoko Kato, Yoko Mizutani-Koseki, Hideyo Ohuchi, S. N. Hidefumi Yoshioka, Koichi Kawamura, Yuki Kataoka, Fukuko Ueno, Masaru Taniguchi, et al. (1997). "Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis." Development **124**: 4627-4638.
- Knobbe, C. B., A. Trampe-Kieslich, et al. (2005). "Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(5): 486-90.
- Kokkola, T. and J. T. Laitinen (1998). "Melatonin receptor genes." Ann Med **30**(1): 88-94.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Latasa, M. J., B. Belandia, et al. (1998). "Thyroid hormones regulate beta-amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells." Endocrinology **139**(6): 2692-8.
- Lazarov, O., L. D. Peterson, et al. (2006). "Expression of a familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 variant enhances perforant pathway lesion-induced neuronal loss in the entorhinal cortex." J Neurosci **26**(2): 429-34.
- Leon Jonker, H. M. A. (2002). "Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis." Mechanisms of Development **110**: 193-196.

- Levitt, P., M. F. Barbe, et al. (1997). "Patterning and specification of the cerebral cortex." Annu Rev Neurosci **20**: 1-24.
- Li, Z., X. Na, et al. (2002). "Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." J Biol Chem **277**(7): 4656-62.
- Li, Z., D. Wang, et al. (2005). "VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 α ." EMBO Rep **6**(4): 373-8.
- Liang, P. and A. B. Pardee (1992). "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction." Science **257**(5072): 967-71.
- Liao, L., D. Cheng, et al. (2004). "Proteomic characterization of postmortem amyloid plaques isolated by laser capture microdissection." J Biol Chem **279**(35): 37061-8.
- Liour SS, K. S., Dinkins MB, Su CY, Yanagisawa M, Yu RK (2006). "Further characterization of embryonic stem cell-derived radial glial cells." Glia **53**: 43-56.
- Liu, C., L. Zhang, et al. (2002). "Identification of a novel endothelial-derived gene EG-1." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 602-12.
- Liu, Q., Y. Feng, et al. (1994). "Activity and in vitro reassembly of the coated vesicle (H⁺)-ATPase requires the 50-kDa subunit of the clathrin assembly complex AP-2." J Biol Chem **269**(50): 31592-7.
- Liu Y, J. H., Crawford HC, Hogan BL (2003). "Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development." Dev Biol. **261**(1): 10-24.
- Liu, Y., H. Jiang, et al. (2003). "Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development." Dev Biol **261**(1): 10-24.
- Lu, M., L. Zhang, et al. (2005). "The novel gene EG-1 stimulates cellular proliferation." Cancer Res **65**(14): 6159-66.
- M. Gupta, L. S., D. Sahni (2002). "Variations in collateral contributions to the blood supply to the sternum." Surg Radiol Anat(24): 265-270.
- M.H. Kaufman, J. B. L. B. (1999). The Anatomical Basis of Mouse Development. San Diego.
- Maéno, M. G. Y. I. M. (2003). "Complementary expression of AP-2 and AP-2rep in ectodermal derivatives of *Xenopus* embryos." Dev Genes Evol **213**: 363-367.
- Mallamaci, A., R. Iannone, et al. (1998). "EMX2 protein in the developing mouse brain and olfactory area." Mech Dev **77**(2): 165-72.
- Mansouri, A. (2001). "Determination of gene function by homologous recombination using embryonic stem cells and knockout mice." Methods Mol Biol **175**: 397-413.
- Martinez-Balbas, M. A., A. Dey, et al. (1995). "Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin." Cell **83**(1): 29-38.
- Masuyama, S., S. Tateishi, et al. (2005). "Regulated expression and dynamic changes in subnuclear localization of mammalian Rad18 under normal and genotoxic conditions." Genes Cells **10**(8): 753-62.
- Matzner, Y., S. Abedat, et al. (2000). "Expression of the familial Mediterranean fever gene and activity of the C5a inhibitor in human primary fibroblast cultures." Blood **96**(2): 727-31.
- McDonald, W. H., Y. Pavlova, et al. (2003). "Novel essential DNA repair proteins Nse1 and Nse2 are subunits of the fission yeast Smc5-Smc6 complex." J Biol Chem **278**(46): 45460-7.
- McDonald WH, P. Y., Yates JR 3rd, Boddy MN (2003). "Novel essential DNA repair proteins Nse1 and Nse2 are subunits of the fission yeast Smc5-Smc6 complex." J Biol Chem. **278**(46): 45460-7.
- Miyashita-Lin, E. M., R. Hevner, et al. (1999). "Early neocortical regionalization in the absence of thalamic innervation." Science **285**(5429): 906-9.
- Morikawa H, M. T., Kawane S, Iwasaki H, Carr AM, Shinagawa H. (2004). "Rad62 protein functionally and physically associates with the smc5/smc6 protein complex and is required for chromosome integrity and recombination repair in fission yeast." Mol Cell Biol. **24**(21): 9401-13.
- Munchberg, S. R., E. A. Ober, et al. (1999). "Expression of the Ets transcription factors erm and pea3 in early zebrafish development." Mech Dev **88**(2): 233-6.
- Muzio, L., B. DiBenedetto, et al. (2002). "Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in Emx2(-/-) Pax6(Sey/Sey) double-mutant mice." Nat Neurosci **5**(8): 737-45.

- Myers, M. and M. Forgac (1993). "Assembly of the peripheral domain of the bovine vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase." J Cell Physiol **156**(1): 35-42.
- Nakagawa, Y., J. E. Johnson, et al. (1999). "Graded and areal expression patterns of regulatory genes and cadherins in embryonic neocortex independent of thalamocortical input." J Neurosci **19**(24): 10877-85.
- O'Leary, D. D. (1989). "Do cortical areas emerge from a protocortex?" Trends Neurosci **12**(10): 400-6.
- O'Leary, D. D., B. L. Schlaggar, et al. (1992). "The specification of sensory cortex: lessons from cortical transplantation." Exp Neurol **115**(1): 121-6.
- Oster, H., E. Maronde, et al. (2002). "The circadian clock as a molecular calendar." Chronobiol Int **19**(3): 507-16.
- Panchision, D. M., J. M. Pickel, et al. (2001). "Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate." Genes Dev **15**(16): 2094-110.
- Quintana, C., S. Bellefquih, et al. (2006). "Study of the localization of iron, ferritin, and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level." J Struct Biol **153**(1): 42-54.
- Rakic, P. (1988). "Specification of cerebral cortical areas." Science **241**(4862): 170-6.
- Rao, J. S., S. I. Rapoport, et al. (2005). "Decrease in the AP-2 DNA-binding activity and in the protein expression of AP-2 alpha and AP-2 beta in frontal cortex of rats treated with lithium for 6 weeks." Neuropsychopharmacology **30**(11): 2006-13.
- Ravasi, T., T. Huber, et al. (2003). "Systematic characterization of the zinc-finger-containing proteins in the mouse transcriptome." Genome Res **13**(6B): 1430-42.
- Reese DE, M. T., Bader DM (2002). "Development of the coronary vessel system." Circ Res(91): 761-768.
- Reymond A, M. G., Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelle D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." EMBO Journal **20**(9): 2140-2151.
- Robert E. Poelmann, P. H. L.-V., PhD Adriana C. Gittenbergerde Groot, PhD (2002). "The Role of the Epicardium and Neural Crest as Extracardiac Contributors to Coronary Vascular Development." Texas Heart Institute Journal(29): 255-261.
- Ruan, Y., L. Tecott, et al. (2001). "Ethanol hypersensitivity and olfactory discrimination defect in mice lacking a homolog of Drosophila neuralized." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9907-12.
- Saitoh, T., K. Horsburgh, et al. (1993). "Hyperactivation of signal transduction systems in Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **695**: 34-41.
- Sampaolo, S., A. Campos-Barros, et al. (2005). "Increased cerebrospinal fluid levels of 3,3',5'-triiodothyronine in patients with Alzheimer's disease." J Clin Endocrinol Metab **90**(1): 198-202.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sato, S., C. Tomomori-Sato, et al. (2004). "A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology." Mol Cell **14**(5): 685-91.
- Scannell, J. W., C. Blakemore, et al. (1995). "Analysis of connectivity in the cat cerebral cortex." J Neurosci **15**(2): 1463-83.
- Sergeant, J., E. Taylor, et al. (2005). "Composition and architecture of the Schizosaccharomyces pombe Rad18 (Smc5-6) complex." Mol Cell Biol **25**(1): 172-84.
- Shimada, M., Y. Konishi, et al. (1999). "Distribution of AP-2 subtypes in the adult mouse brain." Neurosci Res **33**(4): 275-80.
- Sihag, R. K. and A. M. Cataldo (1996). "Brain beta-spectrin is a component of senile plaques in Alzheimer's disease." Brain Res **743**(1-2): 249-57.
- Simonin, F., P. Karcher, et al. (2004). "Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins." J Neurochem **89**(3): 766-75.
- Solmi, R., P. De Sanctis, et al. (2004). "Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR." Int J Oncol **25**(4): 1049-56.

- Stone, J. S., J. L. Shang, et al. (2003). "Expression of Prox1 defines regions of the avian otocyst that give rise to sensory or neural cells." J Comp Neurol **460**(4): 487-502.
- Stoykova, A. and P. Gruss (1994). "Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns." J Neurosci **14**(3 Pt 2): 1395-412.
- Streit, A., A. J. Berliner, et al. (2000). "Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation." Nature **406**(6791): 74-8.
- Tanahashi, H. and T. Tabira (2000). "Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein." Hum Mol Genet **9**(15): 2281-9.
- Theil, T., S. Aydin, et al. (2002). "Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon." Development **129**(13): 3045-54.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell **51**(3): 503-12.
- Tole, S., G. Goudreau, et al. (2000). "Emx2 is required for growth of the hippocampus but not for hippocampal field specification." J Neurosci **20**(7): 2618-25.
- Tso, J. Y., D. J. Van Den Berg, et al. (1986). "Structure of the gene for Xenopus transcription factor TFIIIA." Nucleic Acids Res **14**(5): 2187-200.
- van der Laan, R., E. J. Uringa, et al. (2004). "Ubiquitin ligase Rad18Sc localizes to the XY body and to other chromosomal regions that are unpaired and transcriptionally silenced during male meiotic prophase." J Cell Sci **117**(Pt 21): 5023-33.
- Velculescu, V. E., L. Zhang, et al. (1995). "Serial analysis of gene expression." Science **270**(5235): 484-7.
- Von Ohlen, T. and J. E. Hooper (1997). "Hedgehog signaling regulates transcription through Gli/Ci binding sites in the wingless enhancer." Mech Dev **68**(1-2): 149-56.
- Walsh, E. S. M. a. C. A. (2001). "Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans." Nature Neuroscience **4**: 1199-1206.
- Weber, A., P. Imisch, et al. (2004). "Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma." J Clin Oncol **22**(13): 2681-90.
- Welham, S. J., P. R. Riley, et al. (2005). "Maternal diet programs embryonic kidney gene expression." Physiol Genomics **22**(1): 48-56.
- Wilson, K. (1999). The MIT Encyclopedia of The Cognitive Sciences. Cambridge, Massachusetts.
- Witter, M. P., G. W. Van Hoesen, et al. (1989). "Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey." J Neurosci **9**(1): 216-28.
- Yang, D. C., X. Jiang, et al. (2002). "Antisense ferritin oligonucleotides inhibit growth and induce apoptosis in human breast carcinoma cells." Anticancer Res **22**(3): 1513-24.
- Zhang, L., R. S. Maul, et al. (2004). "Expression pattern of the novel gene EG-1 in cancer." Clin Cancer Res **10**(10): 3504-8.
- Zinovieva, R. D., M. K. Duncan, et al. (1996). "Structure and chromosomal localization of the human homeobox gene Prox 1." Genomics **35**(3): 517-22.

Publikationen:

- Yuh-Shin Chang*, Kamal Chowdhury*, Joachim Glaubitz*, Friederike Kirsch*, Victoria Moreno*, Sven Mühlfriedel*, Kay Nieselt-Struwe*, Anastassia Stoykova*, Ahmet Ucar and Peter Gruss (*gleichberechtigte Beiträge, Liste in alphabetischer Reihenfolge): “Large microarray screen for genes with regionalized expression in the developing mouse cerebral cortex”, MPINews, April 2002.
- Joachim Glaubitz: “Common pathways in development of vascular and central nervous system: role of a new TRIM gene.”, MPINews, October 2005.
- Joachim Glaubitz : “Freier Wille”, Spektrum der Wissenschaft, August 2005, S.7.
- Joachim Glaubitz, Kamal Chowdhury, Anastassia Stoykova, Peter Gruss: “Identification of new marker genes for cerebral cortex development by DNA microarray screening and verification with in-situ-hybridizations”, in Vorbereitung zur Veröffentlichung im Journal Mechanisms of Development.
- Joachim Glaubitz, Kamal Chowdhury, Anastassia Stoykova, Peter Gruss: “TRIM46 is specifically expressed in the embryonic and adult central nervous system, the endothel of developing arteries, and several other endothelia”, in Vorbereitung zur Veröffentlichung.
- Joachim Glaubitz, Gunnar Dietz, Monika Labes, Nicolaj Kloecker, Regina Ort-Winkelbauer, Mathias Baehr: „Upregulation of Rat Six1 Gene After Optic Nerve Axotomy to Resemble Regeneration Programms of Primitive Organisms”, in Vorbereitung zur Veröffentlichung im Journal Molecular Brain Research.

Akademische Lehrer

Akademische Lehrer an der Universität Tübingen und (*) während eines einjährigen Aufenthaltes am Max-Planck-Institut für Biochemie in München-Martinsried sowie (**) während meiner Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen und der Universität Göttingen waren (in alphabetischer Reihenfolge):

Dr. L. Bachmann (Evolutionsgenetik), Prof. Dr. med. Mathias Bähr (Neurologie), Prof. Bisswanger (Enzymkinetik), Prof. Bohley (Biochemie), Dr. Kamal Chowdhury** (Molekularbiologie), Dr. Torsten Crass** (Bioinformatik), Prof. Eisele (Biochemie), Prof. Dr. Kai-Uwe Fröhlich (Biochemie), Prof. Gauglitz (Physikalische Chemie), Prof. Dr. Gebhard (Biochemie), Prof. Gönnerwein (Physik), Prof. Dr. Peter Gruss** (Entwicklungsbiologie), PD Dr. Günzl (Zoologie), Prof. Hagenmaier (Organische Chemie), Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt* (Virologie), Prof. Hamprecht (Biochemie), Prof. Hanack (Organische Chemie), Prof. Dr. Robert Huber* (Röntgenstrukturanalyse), Prof. G. Jung (Organische Chemie), Dr. Titus Kaletta* (Entwicklungsbiologie), Prof. Dr. med. Kaiser (Humanphysiologie), PD Dr. Kapurniotu (Naturstoffchemie), Prof. Lindner (Anorganische Chemie), Prof. Mecke (Biochemie), Dr. J. Meier (Botanik), Dr. Peter Meinicke** (Bioinformatik), Prof. Dr. Morgenstern** (Bioinformatik), Prof. Dr. Ulrich Nagel (Anorganische Chemie), PD Dr. W. Neubert (Virologie), Prof. Dr. Dr. Walter Neupert* (Physiologische Chemie), Prof. Dr. H. Ninnemann (Biochemie der Pflanzen), Prof. Oberhammer (Physikalische Chemie), Dr. Marina Parry* (Proteinstrukturanalyse), Prof. Pfeiffer (Zoologie), PD Dr. Pommer (Mathematik), Prof. Dr. Hansgeorg Probst (Biochemie), Prof. Dr. Rammensee (Immunologie), Dr. Reinecke (Isotopenchemie), Prof. Reutter (Anatomie), Prof. Dr. Ralf Schnabel* (Entwicklungsbiologie), Prof. Dr. H.-U. Schnitzler (Tierphysiologie), Prof. Friedrich Schöffl (Genetik), Prof. Dr. M. Schwarz (Toxikologie), Dr. H. Schwarz (Elektronenmikroskopie), Prof. Seelig (Theoretische Chemie), Prof. Sperlich (Evolutionbiologie), Prof. Dr. Stefan Stamm* (Alternatives Spleißen), PD Dr. Stoeva (Proteinchemie), Dr. Anastassia Stoykova** (Neuroentwicklungsbiologie), Prof. Strähle (Anorganische Chemie), Prof. Voelter (Naturstoffchemie), Prof. Wegmann (Botanik), Prof. Weser (Anorganische Biochemie), Prof. Dr. Wingender** (Bioinformatik), PD Dr. Wiesmüller (Immunologie), Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben (Mikrobiologie)

Lebenslauf

- Name: Joachim Glaubitz
Geburtsdatum: 05.06.1972
Geburtsort: Gelsenkirchen, Deutschland
- Juni 1992 Abitur (Schnitt 1,0). Gustav-Heinemann-Schule. Essen.
Abiturfächer: Mathematik (LK1), Physik (LK2), Englisch, Philosophie.
- November 1992 TMS, Test für medizinische Studiengänge mit Testwert 130 (99,9%).
- 1992-1993 Leitung von Übungsseminaren und Erstellung von Aufgaben für den
TMS bei Reinhardt Goertz-Team, Köln (heute: www.eignungstest.ch)
und GCA-GmbH Witten-Herdecke.
- Januar 1994 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
- 1993-1999 Studium der Biochemie an der Universität Tübingen.
- 1997-1998 Forschungsjahr am Max-Planck-Institut für Biochemie
in München-Martinsried. Mitarbeit an aktuellen Forschungsprojekten in 6
verschiedenen Arbeitsgruppen, darunter die AG Strukturforschung des
Nobelpreisträgers Robert Huber.
- Juni 1999 Abschluss der Biochemie-Diplomprüfung (Notenschnitt 1)
- Juli 1999 Praktische Diplomarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Rammensee
bis Januar 2000 im Interfakultären Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen,
SFB 430, AG Bähr.
Thema: Identifizierung von Genen zur Regeneration von Neuronen nach
Axotomie. Fernziel ist eine Gentherapie zur Regeneration neuronaler
Läsionen wie sie beispielsweise bei Querschnittslähmung auftreten.
- Juni 2000 Promotion am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in
bis April 2006 Göttingen, Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie des Max-Planck-
Präsidenten Prof. Dr. Peter Gruss unter der Fernbetreuung von Prof. Dr.
Rammensee, Tübingen.
Thema: Identifizierung und Charakterisierung von neuen Genen für die
Entwicklung des cerebralen Cortex
- 2003 Heirat mit Xiaolu Li, Magistra iuris
- 2004 Vergabe eines Stipendiums der Klaus-Tschira-Stiftung (Mitbegründer und
Aufsichtsratsmitglied der SAP-AG, Europas größter Softwarefirma) für die
Fortbildung in Bioinformatik in Höhe von 4500 Euro.
- 2004-2006 Aufbaustudium in Bioinformatik an der Georg-August-Universität
Göttingen (Notenschnitt der besuchten Kurse 1,4).