

# Untersuchungen zur Struktur und Expression des *SCAPININ/Scapinin*-Gens bei Mensch und Maus

D i s s e r t a t i o n



zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl.-Biol. Sebastian Worch  
geb. am 24.03.1976 in Aschersleben

Gutachter

1. Prof. Gunter Reuter
2. Prof. Ingo Hansmann
3. Prof. Bernhard Weber

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.03.2008

Halle (Saale), im September 2007

**urn:nbn:de:gbv:3-000013244**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013244>]

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
Abkürzungen	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Identifizierung und erste Charakterisierung von <i>SCAPININ</i>	1
1.2. Alternatives Spleißen und Phänotypen aufgrund von Störungen dieses Prozesses	3
1.3. Genomisches Imprinting	5
1.4. Ziele der Arbeit	8
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1. Material	10
2.1.1. Chemikalien	10
2.1.2. Biochemikalien	11
2.1.3. Humane RNAs	12
2.1.4. Vorgefertigte Systeme	12
2.1.5. Längenstandards	13
2.1.6. Geräte	13
2.1.7. Oligonukleotide	14
2.1.8. Beschreibung der verwendeten Mausstämme	16
2.2. Methoden	17
2.2.1. Kultur und Stammhaltung von Bakterien	17
2.2.2. Präparation von Plasmid-DNA	18
2.2.3. Aufarbeitung von Gewebeproben der Maus	18
2.2.3.1. Entnahme von Geweben aus Mäusen	18
2.2.3.2. Präparation von genomischer DNA aus Geweben	19
2.2.3.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Geweben	19
2.2.3.4. Isolierung von polyadenylierter RNA (poly(A) <sup>+</sup> -RNA) aus Gesamt-RNA	19
2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
2.2.5. Northern Blotting	21
2.2.5.1. Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese	21
2.2.5.2. Transfer der RNA mittels Kapillarblot	22

2.2.5.3.	Hybridisierung der Northern-Blots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	22
2.2.6.	Reverse Transkription (RT)	23
2.2.7.	PCR	23
2.2.7.1.	Standard-PCR	24
2.2.7.2.	Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	25
2.2.8.	Restriktion	27
2.2.9.	Elektrophorese	27
2.2.10.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.2.11.	Klonierung von PCR-Produkten	28
2.2.12.	Sequenzierung	29
2.2.13.	Analyse der elternspezifischen Expression	29
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1.	Analyse des <i>SCAPININ</i> -Locus des Menschen	31
3.1.1.	Genomische Struktur des <i>SCAPININ</i> -Locus	31
3.1.1.1.	Ergebnisse der RACE-PCR-Experimente	31
3.1.1.2.	Analyse des 5'-Bereichs des <i>SCAPININ</i> -Gens	32
3.1.1.3.	Untersuchungen zum alternativen Spleißen von Exon 5	34
3.1.2.	Gewebespezifische Expression von <i>SCAPININ</i>	35
3.2.	Analyse des <i>Scapinin</i> -Locus der Maus	37
3.2.1.	Genomische Struktur des <i>Scapinin</i> -Locus	37
3.2.1.1.	Ergebnisse der RACE-Analysen	38
3.2.1.2.	Weiterführende Analyse der Startexons	41
3.2.1.3.	Untersuchungen zum alternativen Spleißen von Exon fünf	42
3.2.1.4.	Untersuchungen zur alternativen Polyadenylierung	43
3.2.2.	Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von <i>Scapinin</i>	45
3.2.2.1.	Gewebespezifische Expression	45
3.2.2.2.	Entwicklungsspezifische Expression	47
3.3.	Analyse der elternspezifischen Expression des <i>Scapinin</i> -Gens in der Maus	51
3.3.1.	Analyse des SNP rs27649398 in Exon 11	51
3.3.2.	Analyse des SNP rs27685005 in Exon 1D	54
3.3.3.	Analyse des SNP rs27685047 in Exon 1C	57

3.4.	<i>In silico</i> -Analysen des <i>SCAPININ/Scapinin</i> -Locus bei Mensch und Maus	65
3.4.1.	Promotoranalyse	65
3.4.2.	Identifizierung von CpG-Inseln im 5'-Bereich des <i>SCAPININ/Scapinin</i> -Locus	66
3.4.3.	Weitere <i>in silico</i> -Analysen	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	69
4.1.	Regulationsmöglichkeiten am <i>SCAPININ/Scapinin</i> -Locus	69
4.1.1.	Möglichkeiten zur Regulation der Transkription sowie zur Kontrolle der Lokalisation	69
4.1.2.	Möglichkeiten zur Regulation der Translation	71
4.2.	Analyse der Expression von <i>Scapinin</i> während der Entwicklung der Maus	74
4.2.1.	Hirnentwicklung	74
4.2.2.	Gonadenentwicklung	77
4.3.	Entstehung von Genfamilien und vergleichende Analyse der <i>Phactr</i> -Familie	77
4.4.	Analyse der allelspezifischen <i>Scapinin</i> -Expression in der Maus	83
4.5.	Ausblick	89
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	91
	Literaturverzeichnis	93
	Anhang	A

**Abkürzungen**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
BAC	<i>bacterial arteficial chromosome</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tools</i>
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>copy (complementary) DNA</i>
dATP	Desoxyadenosin-5`-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5`-Triphosphat
dNTP	2`-Desoxynukleosid-5`-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5`-Triphosphat
DMR	<i>differential methylation region</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpc	<i>day(s) post coitum</i> (Tag(e) nach der Befruchtung)
dTTP	Desoxythymidin-5`-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
F1	erste Filialgeneration
g	Gramm
G	Guanin
GDP	Guanosin-5`-Diphosphat
GTP	Guanosin-5`-Triphosphat
h	Stunde
HSA	<i>Homo sapiens</i>
HSA20	<i>Homo sapiens</i> Chromosom 20
i.d.R.	in der Regel
IMAGE	<i>integrated molecular analysis of genomes and their expression</i>
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
IR	Imprintingregion

---

kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria broth
M	Mol (molar)
m	Milli-
Mb	Megabase(n)
min	Minute
MMU	<i>Mus musculus</i>
MMU2	<i>Mus musculus</i> Chromosom 2
MOPS	3(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
μ	Mikro-
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
P	Parentalgeneration
p	Pico-
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
RZPD	Ressourcenzentrum/Primärdatenbank
s	Sekunde

---

SB	Super broth
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SSC	<i>sodium salt citrate</i> (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer)
STS	<i>sequence tagged site</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris- EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>unit</i> (Maß für Enzymaktivität)
UPD	uniparentale Disomie
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

**Abbildungsverzeichnis**

	Seite	
Abb.1:	Syntenie in IR1 zwischen MMU2 und HSA20q13.	6
Abb.2:	Der geprägte <i>Gnas</i> -Locus der Maus.	7
Abb.3:	Darstellung der verwendeten DNA-Molekulargewichtsstandards.	13
Abb.4:	Lokalisation der verwendeten Primer.	16
Abb.5:	Ablaufdiagramm zur Analyse der allelspezifischen Expression von <i>Scapinin</i> bei der Maus.	30
Abb.6:	Ergebnis der 5'-RACE-PCR für das humane <i>SCAPININ</i> -Gen.	32
Abb.7:	RT-PCR-Analyse des 5'-Bereiches von <i>SCAPININ</i> und Verifizierung von Exon 1B2 im Hirn.	33
Abb.8:	Analyse des alternativen Spleißens von Exon 5 beim humanen <i>SCAPININ</i> -Gen.	35
Abb.9:	Genomische Struktur des humanen <i>SCAPININ</i> -Locus.	35
Abb.10:	Gewebespezifische Northern Blot-Analyse des humanen <i>SCAPININ</i> -Gens.	36
Abb.11:	Gewebespezifische RT-PCR-Analyse der einzelnen Startexons von <i>SCAPININ</i> .	37
Abb.12:	Ergebnis der 3'-RACE-PCR in <i>GeneFinder cDNA-Pools</i> für das <i>Scapinin</i> -Gen der Maus.	38
Abb.13:	Ergebnis der RACE in der <i>Marathon-Ready™ cDNA-library</i> .	39
Abb.14:	Darstellung eines Ergebnisses der 5'-RACE-PCR mit selbst generiertem Template.	40
Abb.15:	RT-PCR-Analyse des 5'-Bereiches von <i>Scapinin</i> .	42
Abb.16:	Analyse des alternativen Spleißens von Exon 5 beim <i>Scapinin</i> -Gen der Maus.	43
Abb.17:	Analyse des 3'-Bereiches des <i>Scapinin</i> -Gens der Maus.	44
Abb.18:	Genomische Struktur des <i>Scapinin</i> -Locus der Maus.	45
Abb.19:	Gewebespezifische Northern Blot-Analyse des <i>Scapinin</i> -Gens.	46
Abb.20:	Expression von <i>Scapinin</i> in 8 verschiedenen Regionen des Hirns der Maus.	47
Abb.21:	Entwicklungsspezifische Northern Blot-Analyse.	48
Abb.22:	Entwicklungsspezifische RT-PCR-Analyse des <i>Scapinin</i> -Gens der Maus.	49

Abb.23:	Genomische Analyse des SNP rs27649398 in Exon 11.	52
Abb.24:	Analyse der allelspezifischen Expression des SNP rs27649398 in Exon 11.	53
Abb.25:	Genomische Analyse des SNP rs27685005 in Exon 1D.	55
Abb.26:	Analyse der allelspezifischen Expression des SNP rs27685005 in Exon 1D.	56
Abb.27:	Genomische Analyse des SNP rs27685047 in Exon 1C.	58
Abb.28:	Schematische Darstellung der allelspezifischen Expressionsanalyse des SNP rs27685047 in Exon 1C.	59
Abb.29:	Analyse der allelspezifischen Expression des SNP rs27685047 in Exon 1C.	60
Abb.30:	Sequenzanalyse der Elterntiere für den SNP rs27685047 in Exon 1C.	61
Abb.31:	Genomische Analyse des EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C.	62
Abb.32:	Schematische Darstellung der allelspezifischen Expressionsanalyse des EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C.	63
Abb.33:	Sequenzanalyse der Elterntiere für den EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C.	63
Abb.34:	Analyse der allelspezifischen Expression des EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C.	64
Abb.35:	Identifizierung eines Initiatorelementes im 5'-Bereich von Exon 1D des <i>Scapinin</i> -Gens der Maus.	65
Abb.36:	Schematische Darstellung der CpG-Inseln im 5'-Bereich der <i>SCAPININ/Scapinin</i> -Gene von Mensch und Maus.	66
Abb.37:	Ausgewählte mRNA-Sekundärstrukturen der Startexons 1A und 1D.	73
Abb.38:	Schematische Darstellung der Entwicklung des Säugetiergehirns.	75
Abb.39:	Chromosomale Lokalisation der <i>PHACTR/Phactr</i> -Gene im Humangenom und Mausgenom.	79
Abb.40:	Paramutation bei Mais und Maus.	87

**Tabellenverzeichnis**

Tab.1:	Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer.	14
Tab.2:	Zusätze zur selektiven Anzucht von Bakterien.	17
Tab.3:	Benötigte Mengen an Oligo(dT) Cellulose zur Isolierung von polyA <sup>+</sup> -RNA aus Gesamt-RNA.	20
Tab.4:	Übersicht über die wesentlichen Parameter der verwendeten PCR-Programme.	24
Tab.5:	Übersicht über die Größe der Startexons des <i>SCAPININ</i> -Gens des Menschen und die in ihnen enthaltenen ATGs.	34
Tab.6:	Tabellarische Zusammenfassung der gewebespezifischen RT-PCR-Analyse der einzelnen Startexons von <i>SCAPININ</i> .	37
Tab.7:	Übersicht über die Größe der Startexons des <i>Scapinin</i> -Gens der Maus und die in ihnen enthaltenen ATGs.	41
Tab.8:	Berechnung möglicher Sekundärstrukturen der Startexons von <i>SCAPININ/Scapinin</i> .	73
Tab.9:	<i>In silico</i> -Untersuchungen zu möglichen Phosphorylierungsstellen im <i>SCAPININ/Scapinin</i> -Protein.	82
Tab.10:	Übersicht über einige epigenetische Phänomene, die mit Veränderungen der allelischen Expression einhergehen können.	85

## 1. Einleitung

Noch im Jahr 1999 wurde die Zahl der menschlichen Gene auf über 140 000 geschätzt (DICKSON 1999), so dass die Erkenntnis des Humangenomprojektes, diese Zahl auf 20 000 bis 25 000 Protein kodierende Gene zu reduzieren (Lander *et al.* 2001, Venter *et al.* 2001), als durchaus unerwartet anzusehen war. Das humane Genom enthält somit ungefähr so viele Gene wie das der Maus (WATERSTON *et al.* 2002) und nur wenige mehr als das von *C. elegans* (ca.19000) (CONSORTIUM, T. C. E. S. 1998) oder von *Drosophila* (ca.13600) (ADAMS *et al.* 2000). Diese Erkenntnis lenkte das Interesse auf das Transkriptom bzw. Proteom, um die unterschiedliche Komplexität der verschiedenen Organismen trotz ähnlicher Anzahl von Genen zu erklären. Alternatives Spleißen und variable Transkriptionsinitiation und -termination sowie RNA-editing erhöhen die Diversität des Proteoms und somit rückte die Aufklärung der Struktur der einzelnen Gene in den Mittelpunkt. Durch alternatives Spleißen können von einem Genlocus verschiedene Transkripte generiert werden, die sich in ihrer Wirkung leicht unterscheiden oder sogar entgegengesetzte Funktionen haben. Die Anzahl der Transkripte eines Gens kann damit die Anzahl der Gene in einem Genom übersteigen (GRAVELEY 2001). Während die Vorhersage von Genen in einem bestimmten Chromosomenabschnitt mittels Computer unter Verwendung verschiedenster Algorithmen während des Humangenomprojektes immer weiter verbessert wurde und schließlich eine relativ hohe Erfolgsrate aufwies, können auch bis heute die exakten Genstrukturen nur schwer vorhergesagt werden (BRENT und GUIGO 2004). Da viele alternativ gespleißte Transkripte sehr selten sind und oft nur in wenigen Geweben zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen gebildet werden, sind sie auch in EST (*expressed sequence tag*)-Datenbanken, die zur Strukturvorhersage herangezogen werden, unterrepräsentiert (GRAVELEY 2001). Unter diesen Umständen bleiben experimentelle Ansätze zur Aufklärung von Struktur und Expression eines Gens bis auf weiteres unablässig.

### 1.1. Identifizierung und erste Charakterisierung von *SCAPININ*

Im Rahmen des Deutschen Humangenomprojektes (DHGP) wurden in einem Projekt zur physikalischen und transkriptionellen Kartierung des humanen Chromosomenabschnittes 20q13 (HSA20q13) (KUBMANN *et al.* 1998) am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie eine Reihe von Genen aus diesem Bereich identifiziert und charakterisiert (GROB 2000, GROB *et al.* 2000, WORCH 2000). Ausgehend von zwei in dieser chromosomalen Region lokalisierten ESTs, A005Z17 und H17739, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (WORCH

2000) eine korrespondierende cDNA von 2,4 kb Länge isoliert, die sich in 13 Exons aufteilen ließ (AJ311122). Darüber hinaus konnten zu diesem Zeitpunkt durch Northern Blot Experimente mit verschiedenen humanen Geweben zwei Transkripte nachgewiesen werden, was als Hinweis auf alternatives Spleißen bewertet wurde.

Im Jahr 2003 veröffentlichten SAGARA *et al.* (2003) eine Arbeit über Veränderungen der Zellkernmatrix während der Differenzierung von HL-60-Zellen, einer humanen promyelotischen Leukämie-Zelllinie. Sie entwickelten monoklonale Antikörper gegen diverse Matrixproteine aus HL-60-Zellen, und einer dieser Antikörper erkannte zwei Polypeptide von 60 kDa bzw. 75 kDa. Durch immunoscreenen einer HL-60-spezifischen  $\lambda$ gt11-cDNA-Bibliothek isolierten sie das entsprechende Gen, bestehend aus 13 Exons und einem alternativ gespleißten Exon 5 als Ursache für die zwei Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts. Weitere Experimente zeigten, dass beide Proteine mit Elementen des Cytoskeletts assoziiert sind und dass diese Verbindung teilweise über RNAs bzw. Ribonukleoproteine vermittelt wird, obwohl beide kein bekanntes RNA-Bindemotiv enthalten. Mit Hilfe des *yeast two-hybrid* Systems wurden Interaktionspartner gesucht und die  $\alpha$ -katalytische Untereinheit von Proteinphosphatase-1 (PP1), einer eukaryotischen Serin/Threonin-Phosphatase, als bindendes Protein identifiziert. Durch diese Interaktion wird die Aktivität von PP1 inhibiert, weshalb es SCAPININ (*scaffold-associated PP1 inhibiting protein*) genannt wurde. SAGARA *et al.* (2003) führten Deletionsexperimente durch und zeigten, dass ca. 70 Aminosäuren am C-Terminus von SCAPININ essentiell für eine effektive Bindung und Inhibierung von PP1 sind, obwohl sich dort kein RVXF-Motiv befindet, das in vielen PP1 bindenden Proteinen vorhanden ist (COHEN 2002). Weit über 50 regulatorische Untereinheiten von PP1 sind bekannt, die in der Mehrzahl der Fälle über dieses RVXF-Sequenzmotiv an die katalytische Untereinheit PP1c binden und somit die subzelluläre Lokalisation und die Funktion von PP1 beeinflussen. Diese Regulation erfolgt als Antwort auf extra- oder intrazelluläre Signale und geht meist einher mit Änderungen der Konformation oder des Phosphorylierungsstatus der regulatorischen Untereinheiten (COHEN 2002). PP1 wird ubiquitär exprimiert und ist in eine Vielzahl von physiologischen Prozessen involviert. Das Enzym beeinflusst z.B. Muskelkontraktion, Glykogenstoffwechsel und Zellzyklus und spielt eine wichtige Rolle im Nervensystem, z.B. bei der Regulation der synaptischen Plastizität über die Kontrolle verschiedener Ionenkanäle und Signaltransduktionsenzyme (COHEN 2002, STRACK *et al.* 1999). Die Rolle von PP1 bei der Modulation der synaptischen Funktion und der Einfluss PP1-bindender Proteine darauf wurde von ALLEN *et al.* (2004) untersucht. Durch Interaktionsklonierung identifizierten sie ein Protein, das an PP1 und an cytoplasmatisches Aktin bindet und nannten es PHACTR

(*phosphatase and actin regulator*). Sie fanden Homologien zu drei anderen humanen Proteinen und fassten diese zur PHACTR-Familie zusammen, wobei PHACTR-3 dem von SAGARA *et al.* (2003) beschriebenen SCAPININ entspricht. STELZL *et al.* (2005) fanden einen dritten möglichen Interaktionspartner für SCAPININ-Proteine. In einer *high-throughput yeast-two-hybrid* Studie identifizierten sie über 3000 Kandidaten für humane Protein-Interaktionen. Da solche umfassenden experimentellen Ansätze anfällig für falsch negative wie falsch positive Ergebnisse sind (VON MERING *et al.* 2002), führten sie für zufällig ausgewählte Proteinpaare zusätzliche *pull-down*- und Coimmunopräzipitationsexperimente durch, bei denen 66% bzw. 62% der Interaktionen verifiziert wurden. Die erhaltenen Daten wurden bioinformatisch ausgewertet und die Wahrscheinlichkeit für eine identifizierte Proteininteraktion mit hoch, mittel oder gering bewertet. Nach den Ergebnissen der *yeast-two-hybrid* Studie bindet SCAPININ mit mittlerer Wahrscheinlichkeit an den eukaryotischen Translationselongationsfaktor 1 Gamma (EF-1 $\gamma$ ), was allerdings nicht durch weitere Versuche verifiziert wurde. Dimere von EF-1 $\gamma$  bilden zusammen mit je einer  $\beta$ - und einer  $\delta$ -Untereinheit von EF-1 einen Komplex, der GDP für GTP austauscht und somit die EF-1 $\alpha$  vermittelte Bindung einer Aminoacyl-tRNA ans Ribosom und eine weitere Elongationsrunde ermöglicht (SHEU und TRAUGH 1999).

Bezüglich der veröffentlichten Sequenzinformationen zu *SCAPININ/Scapinin* fiel auf, dass sich sowohl die von SAGARA *et al.* (2003) (AB098521 & AB098522) als auch die von ALLEN *et al.* (2004) (AY500157) ermittelten cDNA Sequenzen von der zuerst beschriebenen Sequenz AJ311122 in ihrer 5'-UTR unterschieden, genauer gesagt in ihrem Exon 1. Alternatives Spleißen fand also nicht nur innerhalb des Transkriptes sondern auch im 5'-Bereich statt.

## 1.2. Alternatives Spleißen und Phänotypen aufgrund von Störungen dieses Prozesses

Die Identifizierung verschiedener *SCAPININ*-Transkripte steht im Einklang mit der Entdeckung von immer mehr alternativ gespleißten Transkripten bei Mensch und Maus. Nach derzeitigen Erkenntnissen scheinen bis zu 90% der humanen Gene dieser Regulation zu unterliegen (BOUE *et al.* 2003), so dass die Anzahl der Transkripte beim Mensch als auch bei der Maus wenigstens zehnmal so hoch ist wie die Anzahl ihrer Gene (CARNINCI *et al.* 2005). Aus diesem Grund können Störungen des normalen Spleißvorganges Krankheitsverläufe beeinflussen oder sogar auslösen (FAUSTINO und COOPER 2003). Verschiedene Mutationen des Spleißens, die sowohl in *cis* als auch in *trans* wirken, wurden bereits beschrieben.

Die Mutation einer klassischen Spleißstelle führt zu einer veränderten mRNA, die entweder abgebaut oder in ein verändertes Protein translatiert wird, was meist dem Funktionsverlust des betroffenen Alleles entspricht.

Eine zweite in *cis* wirkende Mutation kann eine alternative Spleißstelle betreffen, was zum Verlust von Proteinisoformen führt und Auslöser für Krankheiten wie *Familial isolated growth hormone deficiency type II (IGHD II)* (MOSELEY *et al.* 2002), *Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to Chromosome 17 (FTDP-17)* (D'SOUZA *et al.* 1999, HONG *et al.* 1998, HUTTON *et al.* 1998, SPILLANTINI *et al.* 1998), *Atypical Cystic Fibrosis* (DELANEY *et al.* 1993, STRONG *et al.* 1993) und *Frasier Syndrome* (ARMSTRONG *et al.* 1993) ist. Bei letzterem beispielsweise ist das Wilms Tumor-Suppressorgen (WT1) betroffen, was zu Veränderungen des Urogenitaltraktes führt. Es enthält zwei alternative Spleißstellen für Exon 9, die 9 Nukleotide voneinander entfernt liegen, welche die Aminosäuren Lysin-Threonin-Serin (KTS) kodieren. Normalerweise wird in allen Geweben etwas mehr der 9 Nukleotide längeren +KTS-Isoform gegenüber der kürzeren -KTS-Isoform gebildet (HABER *et al.* 1991). Bei der Mehrheit der Patienten mit Frasier-Syndrom ist die weiter 5'-wärts gelegene Spleißstelle mutiert, so dass nur noch die -KTS-Isoform gebildet wird (BARBAUX *et al.* 1997, KOHSAKA *et al.* 1999, MELO *et al.* 2002).

In *trans* wirkende Mutationen können mit Veränderungen der Spleißmaschinerie selbst einhergehen, wie etwa bei der Ausprägung der *Retinitis pigmentosa* (RP) (Franceschetti 1953) durch Veränderungen des Spleißfaktors *PRPF31*. Für dieses Gen wurden verschiedene Mutationen gefunden, die alle die Funktion des Genproduktes beeinträchtigen, wodurch das Überführen des Prä-Spleißosoms in einen aktiven Komplex verhindert wird (MAKAROVA *et al.* 2002).

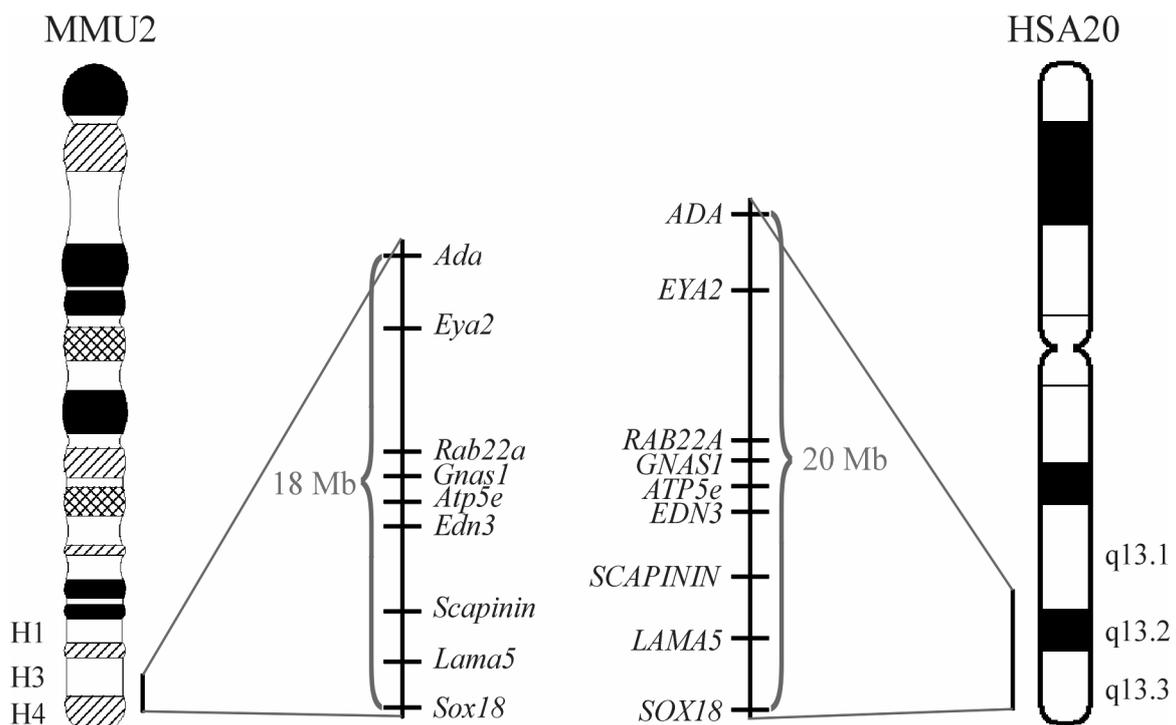
Darüber hinaus wurden bei verschiedenen Tumoren in *trans* wirkende Mutationen gefunden, welche die Regulation des Spleißvorganges selbst stören können. Beispielsweise führt in malignen Glioblastomen eine erhöhte Expression des Spleißregulators PTB zu verstärktem Herausspleißen des  $\alpha$ -Exons vom Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 1 (*FGFR1*) (JIN *et al.* 2000).

Auch nicht kodierende RNAs mit einer regulatorischen Wirkung können in alternativen Transkriptformen auftreten. So existieren beispielsweise für das *Ube3a* Gen, welches im Hirn nur vom maternalen Allel exprimiert wird und bei Verlust oder Inaktivierung zum Angelman-Syndrom führt, mehrere alternativ gespleißte Antisense-Transkripte, die die hirsnspezifische Inaktivierung des paternalen Allels kontrollieren (LANDERS *et al.* 2004).

### 1.3. Genomisches Imprinting

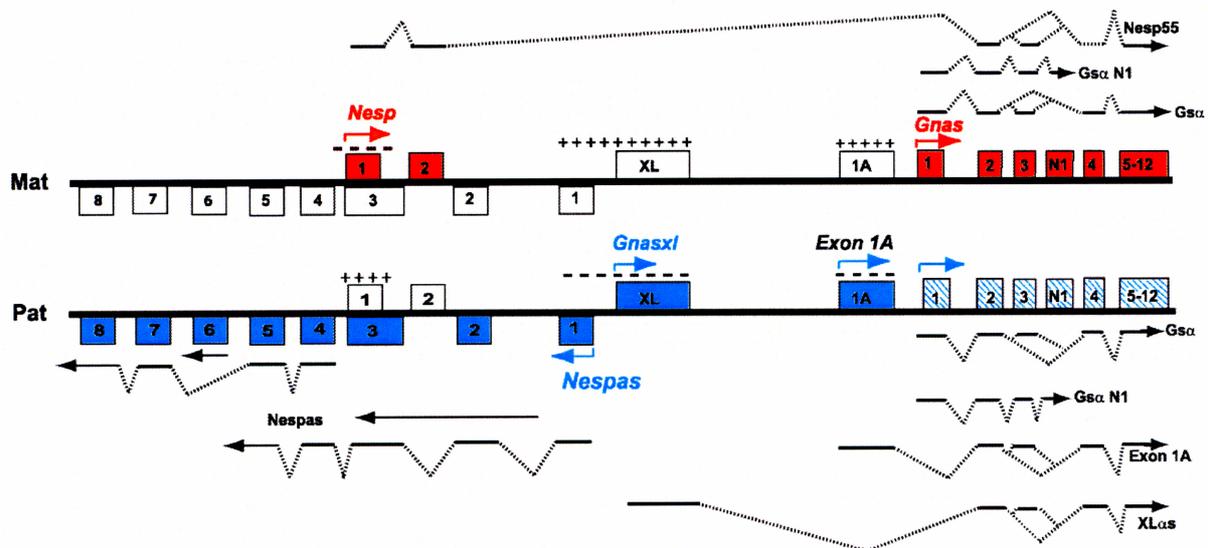
Bei der genomischen Prägung bzw. dem Imprinting handelt es sich um eine Form der epigenetischen Regulation, bei der die Nachkommen zwar mit beiden elterlichen Allelen ausgestattet werden, diese werden aber hinsichtlich ihres Ursprungs markiert und differentiell exprimiert (CONSTANCIA *et al.* 1998). Gene, die einem Imprinting unterliegen, sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie Embryogenese, Wachstum und Verhalten beteiligt, so dass eine Störung des Imprintings zu Missbildungen und Krebs führen kann (SASAKI und ISHINO 2006). Über den Ursprung des genomischen Imprintings gibt es verschiedene Theorien, von denen keine alle Eigenschaften von geprägten Genen erklären kann (DAY und BONDURIANSKY 2004, IWASA 1998, IWASA und POMIANKOWSKI 1999, VARMUZA und MANN 1994). So versucht laut der so genannten Konflikthypothese (MOORE und HAIG 1991) das paternale Genom dem Embryo möglichst viele Ressourcen auf Kosten der Mutter zugänglich zu machen. Das maternale Genom hingegen versucht, dem entgegen zu wirken, um später weitere Nachkommen, auch von anderen Vätern, bekommen zu können. Als Konsequenz dieser Hypothese würden Gene, die das embryonale Wachstum fördern, wie z. Bsp. der *Insulin-like growth factor II (Igf2)*, paternal exprimiert werden. Gene hingegen, die dem entgegenwirken, wie z. Bsp. der *Igf2*-Rezeptor (*Igf2r*), würden paternal reprimiert. Allerdings lässt sich diese Theorie nicht auf alle an der fetalen Entwicklung beteiligten Gene anwenden und erklärt auch nicht die Unterschiede im Imprintingstatus orthologer Gene unter den Säugetieren (MORISON *et al.* 2005). Momentan sind über 80 Gene bei Mensch und Maus bekannt, die einem Imprinting unterliegen (MORISON *et al.* 2005). Sie neigen dazu in Clustern aufzutreten, die häufig unter der Kontrolle von so genannten Imprintingcentern (IC) stehen (LEWIS und REIK 2006). ICs sind DNA-Abschnitte, welche die Genexpression auf einem Allel z. Bsp. als Chromatin-Insulator beeinflussen. Dies kann durch Rekrutierung bestimmter Proteine geschehen, welche den Kontakt eines Enhancers mit einem Promotor verhindern. Das *Igf2/H19* IC beispielsweise enthält einen Insulator mit Bindestellen für das CCCTC-Bindeprotein (CTCF), das am unmethylierten, maternalen Allel binden kann und somit den Zugang von Enhancern zum *Igf2* Promoter unterbindet. Am methylierten, paternalen Allel kann CTCF nicht binden und der Enhancer interagiert mit dem Promotor des Gens in normaler Weise (BELL und FELSENFELD 2000, HARK *et al.* 2000, KANDURI *et al.* 2000, SZABO *et al.* 2000). Desweiteren kontrollieren ICs allelspezifisch die Methylierung der DNA sowie die Modifizierung der Histone in einem bestimmten Chromosomenabschnitt und sie können Promotoren für nicht-kodierende RNAs enthalten (LEWIS und REIK 2006).

Erste Hinweise auf das Vorhandensein von geprägten Genen im distalen Bereich von Chromosom 2 der Maus (MMU2), der syntän zu HSA20q13 ist, ergaben Untersuchungen an Mäusen mit maternaler bzw. paternaler Disomie für diesen Bereich, welche entgegengesetzt anormale Phänotypen aufweisen (CATTANACH und KIRK 1985). Dieser als Imprintingregion 1 (IR1) bezeichnete Chromosomenabschnitt wird proximal begrenzt durch den Translokationsbruchpunkt T(2;8)2Wa in Bande H3 und distal durch T(2;16)28H in Bande H4 (CATTANACH *et al.* 1992). Die Ausdehnung dieser Region wurde seinerzeit mit ca. 7 Mb angegeben (PETERS *et al.* 2006). Im Bereich dieser Bruchpunkte wurden die Gene *Ada* (T2Wa) und *ragged* alias *Sox18* (T28H) kartiert (PETERS *et al.* 1994). Allerdings liegen laut aktuellem Datenbankeintrag ([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)) diese beiden Gene bei der Maus 18 Mb und beim Menschen sogar 20 Mb voneinander entfernt. In Abbildung 1 sind die Lokalisation von IR1 bei Mensch und Maus sowie die Syntenie der beiden Regionen durch ausgewählte Gene dargestellt.



**Abb.1:** Syntenie in IR1 zwischen MMU2 und HSA20q13. Abgebildet ist die Lokalisation der Imprintingregion 1 (IR1) im distalen Bereich von Maus-Chromosom 2 (MMU2) und der syntänische Abschnitt des humanen Chromosoms 20q13 (HSA20q13). Die IR1, mit den sie begrenzenden Genen, ist vergrößert und die Lage ausgewählter Loci ist schematisch dargestellt. Die Größenangaben beziehen sich auf Werte aus öffentlichen Datenbanken ([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov), [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)).

Innerhalb der IR1 liegt der *GNAS/Gnas*-Locus, welcher sowohl bei der Maus als auch beim Menschen einem Imprinting unterliegt und sich in seiner genomischen Organisation sehr komplex darstellt (PETERS *et al.* 2006). In Abbildung 2 sind die unterschiedlichen Transkripte des *Gnas*-Locus der Maus als Folge der Verwendung verschiedener Promotoren und des alternativen Spleißens von vier Startexons an die Exons 2-13 dargestellt. Die Transkription vom unmethylierten *Gnas* Promoter erfolgt in den meisten untersuchten Geweben von beiden parentalen Allelen, allerdings fanden YU *et al.* (1998) in einigen Geweben der Nierenrinde sowie in weißem und braunem Fettgewebe rein maternale Expression. Die Promotoren für *Gnas1A* und *Gnasxl* sind maternal methyliert und werden ausschließlich paternal exprimiert (LIU *et al.* 2000b), beim *Nesp* Gen verhält es sich umgekehrt, der Promoter ist paternal methyliert und wird maternal exprimiert (PETERS *et al.* 1999).



**Abb.2:** Der geprägte *Gnas*-Locus der Maus. Gezeigt sind die verschiedenen Spleißvarianten, die vom maternalen (Mat) bzw. paternalen (Pat) Allel in teilweise entgegengesetzten Orientierungen (Pfeile) transkribiert werden. Maternal exprimierte Exons sind rot, paternal exprimierte blau und das paternale *Gnas* blau schraffiert dargestellt, um zu zeigen, dass letzteres in einigen Geweben inaktiv ist. Die differenziell methylierten Regionen (DMRs) sind mit einem „+“ versehen, wenn sie methyliert und mit einem „-“ wenn sie unmethyliert sind (aus PETERS 2006).

Diese Transkripte des *Gnas*-Locus kodieren für verschiedene Proteine. *Gsa* ist das Gen für die  $\alpha$ -Untereinheit eines stimulierenden heterotrimeren Guanidin Nukleotid-Bindeproteins (G-Proteins), welches extrazelluläre Signale, die von Transmembranrezeptoren aufgenommen wurden, durch die Aktivierung einer Adenylatcyclase an Effektorproteine im Zellinneren weiterleitet (SPIEGEL *et al.* 1992). Das *XLas* Protein, welches von der *Gnasxl*-mRNAs translatiert wird, ist eine Variante von *Gsa* mit einer anderen N-terminalen Domäne.

Desweiteren existiert in neuralen Geweben ein verkürztes Protein Gs $\alpha$ N1, das zwischen den Exons 3 und 4 abbricht (WEINSTEIN *et al.* 2001). Das *Nesp*-Gen wiederum kodiert für das neuroendokrine sekretorische Protein-55 (Nesp55), einem Chromogranin-ähnlichen Protein (ISCHIA *et al.* 1997). Darüber hinaus gibt es ein nicht-proteinkodierendes Antisensetranskript zu *Nesp*, *Nespas*, das ausschließlich paternal exprimiert wird und den kodierenden Bereich von *Nesp* überlappt (LI *et al.* 2000, WILLIAMSON *et al.* 2002, WROE *et al.* 2000).

Durch Deletionsexperimente des Bereiches um Exon1A von *Gnas* wurde gezeigt, dass diese Region essentiell für die gewebespezifische Abschaltung des paternalen *Gnas*-Allels ist (LIU *et al.* 2005, WILLIAMSON *et al.* 2004). Diese in *cis* wirkende Sequenz gehört zu den so genannten *imprinting control regions* (ICR), die bei der Regulation der uniparentalen Expression von geprägten Genen eine wichtige Rolle spielen. Die Expression der anderen Transkripte des *Gnas*-Locus (*Gnasxl*, *Nesp*, *Nespas*) war durch diese Deletion nicht verändert, was für eine zweite Kontrollregion spricht, die im Bereich der maternal methylierten Promotoren von *Nespas* und *Gnasxl* vermutet wird (COOMBES *et al.* 2003, LIU *et al.* 2000a). Ob sich weitere geprägte Gene in der IR1 befinden ist unklar. BEECHEY und PETERS (1994) untersuchten Dosiseffekte in IR1 und zeigten bei Mäusen mit partiellen Trisomien für den distalen Bereich von MMU2 (distMMU2), dass eine paternale Duplikation durch ein zusätzliches maternales distMMU2-Fragment gerettet werden kann und umgekehrt, woraufhin sie mindestens ein weiteres geprägtes Gen in diesem Chromosomenabschnitt vermuteten. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt der komplexe Aufbau des *Gnas*-Locus mit entgegengesetzt geprägten Transkripten noch nicht bekannt. Darüber hinaus wurden im Verlaufe der Genomprojekte weitere Gene im Bereich von IR1 entdeckt, von denen eine Vielzahl auf uniparentale Expression getestet wurde (PETERS *et al.* 2006, WILLIAMSON *et al.* 1995). Bis heute gibt es keinen Hinweis auf weitere geprägte Gene in IR1 (PETERS *et al.* 2006). *Scapinin* liegt innerhalb der IR1 ca. 4 Mb distal von *Gnas* und wurde bisher nicht auf elternspezifische Expression hin untersucht.

#### 1.4. Ziele der Arbeit

Ausgehend von den Ergebnissen der an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie angefertigten Diplomarbeit mit dem Titel „Isolierung und Untersuchungen zur Struktur und Expression zweier Gene aus dem Bereich des humanen Chromosoms 20q13“ (WORCH 2000) sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Aspekte untersucht werden: Eine weitestgehende Aufklärung der genomischen sowie der cDNA-Struktur des *SCAPININ/Scapinin*-Gens bei der Maus und beim Menschen.

Daran anschließen sollte sich eine umfangreiche Expressionsanalyse bei der Maus, mit dem Ziel, sowohl die gewebe- als auch die entwicklungspezifische Genexpression zu analysieren. Soweit möglich, sollten die erhaltenen Daten der Maus auf den Menschen übertragen und an humanem Material untersucht werden. Abschließend sollte ein Mausmodell etabliert werden, mit dessen Hilfe eine mögliche epigenetische Regulation am *Scapinin*-Locus untersucht werden konnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	MP Biochemicals
2-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Betain	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	GE Healthcare, Freiburg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleotide	Roche Diagnostics, Mannheim
Dextranblau	Roth, Karlsruhe
Dimethyldicarbonat	Bayer, Leverkusen
Dimethylformamid	Sigma, Deisenhofen
EDTA $\times$ Na <sub>2</sub> $\times$ 2H <sub>2</sub> O	GE Healthcare, Freiburg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Fluka Biochemica, Ulm
Gel loading dye blue	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Gel loading dye orange G	Sigma, Deisenhofen
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Gibco BRL, Eggenstein
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
Guanidinthiocyanat	Fluka Biochemica, Ulm
Halothan	Hoechst, Frankfurt am Main
Hexaminkobaltchlorid	Sigma, Deisenhofen
IPTG	AppliChem, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt

Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarcosinat-Natriumsalz	Fluka Biochemica, Ulm
Nylonmembranen	GE Healthcare, Freiburg
Parafin	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol	Serva, Heidelberg
Rapid-Hyb-Puffer	GE Healthcare, Freiburg
SDS	GE Healthcare, Freiburg
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Whatman-Papier	Whatman International Ltd., Maidstone/UK
X-Gal	AppliChem, Darmstadt

### 2.1.2. Biochemikalien

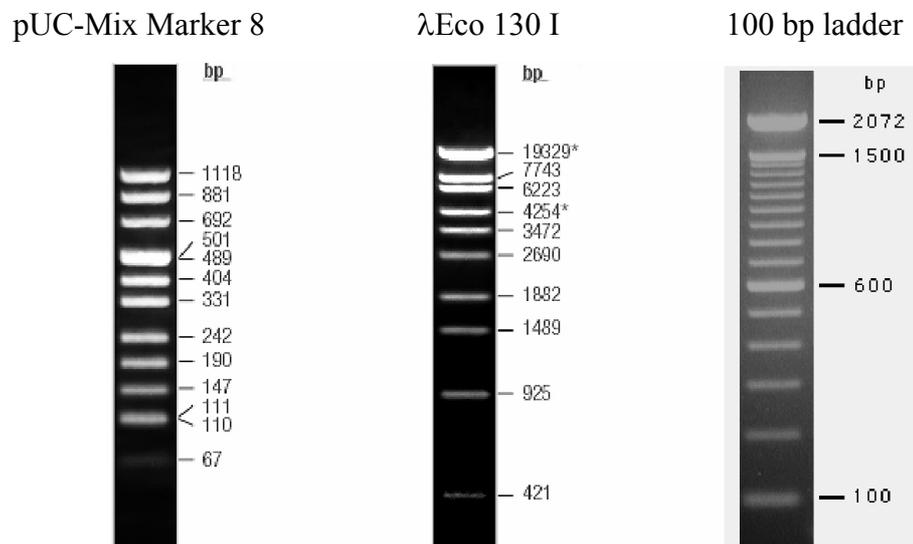
Agar	Fluka Biochemica, Ulm
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Antibiotika: Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloramphenicol	Fluka Biochemica, Ulm
Kanamycin	Roche Diagnostics, Ulm
Bakterienstamm DH5 $\alpha$	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
GeneFinder cDNA Pools	RZPD, MPI Mol. Genetik, Berlin
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
IMAGE-Klone	RZPD, MPI Mol. Genetik, Berlin
Oligo(dT)-Cellulose	GE Healthcare, Freiburg
Pepton	Gibco BRL, Eggenstein
Proteinase K	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Restriktionsenzyme mit Puffer	Gibco BRL, Eggenstein New England Biolabs, Schwalbach MBI Fermentas, St. Leon-Roth CHIMERx, Madison, WI, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase mit Puffer	Promega, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon-Roth Boehringer, Mannheim
T4-RNA-Ligase mit Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
TAE/TBE-Puffer	Roth, Karlsruhe
Trypton	Gibco BRL, Eggenstein
2.1.3. Humane RNAs	
<i>Human Fetal Brain poly(A)<sup>+</sup>-RNA</i> aus normalen, ganzen Hirnen von 10 männlichen und weiblichen kaukasischen Feten zwischen der 21. und 30. Woche	Clontech, Heidelberg
<i>Human Brain Total RNA</i> aus normalen, ganzen Hirnen von 2 männlichen Kaukasiern zwischen 47 und 55 Jahren	Clontech, Heidelberg
<i>Human Testis Total RNA</i> normale Testis von 39 Kaukasiern zwischen 14 und 64 Jahren	Clontech, Heidelberg
<i>Human Ovary Total RNA</i> 1 Donor, 59 Jahre alt	BioChain, Hayward/USA
2.1.4. Vorgefertigte Systeme	
Advantage <sup>®</sup> cDNA PCR-Kit	Clontech, Heidelberg
eLONGase <sup>™</sup> -Mix	Gibco BRL, Eggenstein
Expand Reverse Transcriptase	Roche Diagnostics, Mannheim
Human Multiple Tissue Northern Blot	Clontech, Heidelberg Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, UK
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
Marathon-Ready <sup>™</sup> -cDNA	Clontech, Heidelberg

Megaprime™ DNA Labeling System	GE Healthcare, Freiburg
pGEM-T/pGEM-Teasy vector system	Promega, Mannheim
QIAprep® Spin Miniprep Kit 250	Qiagen, Hilden
SuperScript™II RNase H <sup>-</sup>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SuperScript™III RNase H <sup>-</sup>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Thermosequenase™ II dye terminator cycle sequencing kit	GE Healthcare, Freiburg
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	GE Healthcare, Freiburg
TOPO TA Cloning®-Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.5. Längenstandards

pUC-Mix Marker 8	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
λEco 130 I	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
100 bp ladder	Gibco BRL, Eggenstein



**Abb.3:** Darstellung der verwendeten DNA-Molekulargewichtsstandards. Quellen: [www.mbi-fermantas.com](http://www.mbi-fermantas.com), [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).

### 2.1.6. Geräte

Autoklav „Sanoclav“	Schütt, Göttingen
Proportionalzähler, LB 122 β-γ-Detector	Berthold, Bundoora, Australien

Elektrophoresekammern	Peqlab, Erlangen
Heizblock	Roth, Karlsruhe
Hybridisierungsöfen	Hereaus, Osterode
Mikroliterpipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Netzgeräte für Elektrophorese	Heinemann, Göttingen
pH-Meter, Typ CG 810	Schott, Hofheim
Phosphorimager, STORM 860	Molecular Dynamics, Krefeld
Photometer UltrospecIII	GE Healthcare, Freiburg
Schüttler Innova 4000 & 4300	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Sterilbox	Zapf-Instrumente, Sarstedt
Thermocycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Herolab, Wiesloch
Videoprinter, E.A.S.Y. Image Plus	Herolab, Wiesloch
Waagen	Schütt, Göttingen
Zentrifugen	Heraeus, Osterode

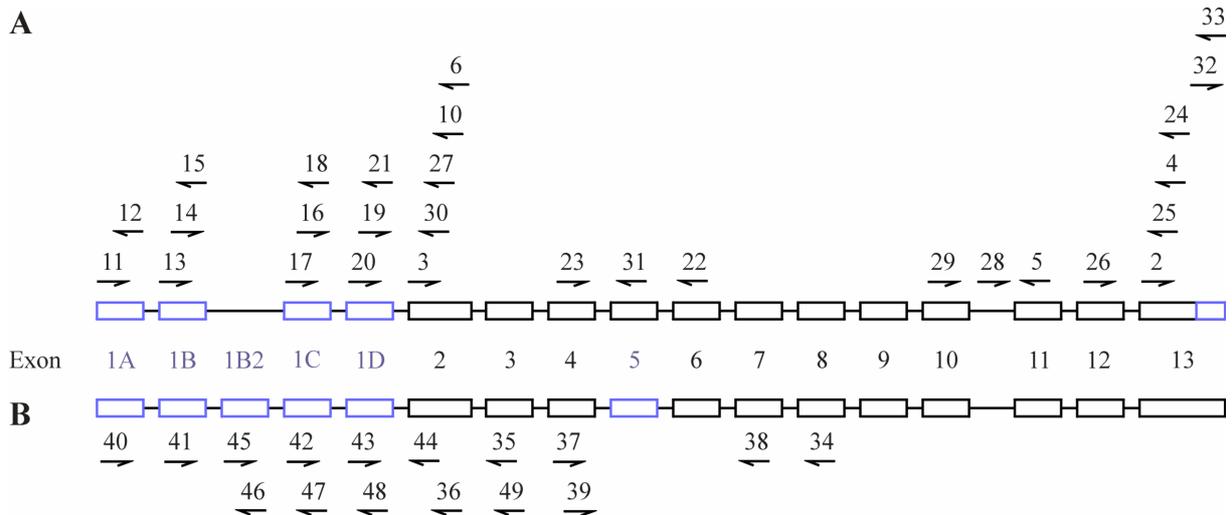
### 2.1.7. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Computerprogrammes GENERUNNER (Version 3.0; Hastings Software) berechnet und von den Firmen Biosource (Nivelles, Belgien), Metabion (Martinsried), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA ) und Qiagen (Hilden) bezogen. Die nachstehende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bei PCR- und Sequenzierungsreaktionen verwendeten Primer mit den dazugehörigen Sequenzen und in Abbildung 4 sind die spezifischen Bindestellen dieser Primer am *Scapinin*-Locus der Maus (Abbildung 4A) bzw. des Menschen (Abbildung 4B) schematisch dargestellt.

**Tab.1:** Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer. Links ist die Primernummer angegeben, die im fortlaufenden Text verwendet wird und die den entsprechenden Primer in Abbildung 4 bezeichnet.

Primer-Nr.	Primernamen	Primersequenz 5'-3'
P1	pZero-R2	TGTGCTGCAAGGCGATTAAG
P2	mD17M1	TGACCACTGACTACAAGAGGAGC
P3	mAU066M1	AGCACGCTCAGAGCCTCTGG

P4	mD17M2	ACAAAATACTGAATGACACTGGG
P5	mA005marat1	GTCTGCCCTCCTGTCCATAGTCC
P6	H17739mR	TCCAAGTTTTGAAGATCCTG
P7	Anchor3	PHOSPHAT-CTAGGAATTCCATCGATGGTTACCT-AMIN
P8	Anchor3Prim1	AGGTAACCATCGATGGAATTC
P9	Anchor3Prim2	ACCATCGATGGAATTCCTAG
P10	H17739marat5	TTGAAGATCCTGCCAGGGTG
P11	AK039213F	CCTTCAGGGAGATGCGTGG
P12	AK039213R	TCCGGTGGTGGTGTCTTGG
P13	AK032242F	TTGTCTCCCCACCCTGAAGC
P14	AK032242start	ATGGCCGCATCCGAGGAC
P15	AK032242R	AAGCTGGGGTCACTCTGCG
P16	altex1-F	ACACTCAATGCAAACAGCC
P17	altex1-F2	CTTAAAGTCAGAAGCCATGC
P18	altex1-R2	CACAGCGGCTGGGCCAC
P19	AK098449F	GAGGAGCTGCAGGGAAG
P20	AK098449F2	CAGTCTCTGCCTCCCAGG
P21	AK098449R	CTCATGGCCAAGGTCAAG
P22	mA005marat-K1-fw3	GAAACTGTCCTGACGGTG
P23	mA005marat-K1-rw2	AGCTTCTGTCCTCCGATG
P24	mA005-27Arw	ATCAAAATGTTGGAGCTG
P25	A005Z17mR	GTTACTCTGGGCCTAAAGTG
P26	A005Z17mF2	GGTACACGCATCCAGCAAGC
P27	mA005marat3	CCAGCTTGCTGTTCCCTCCTCAC
P28	Int10-F	AGGATTATTTGATGCATTCTG
P29	R44seq10	AAAGGAATGATCAGACAGAG
P30	mo-ex2-R2	GGCTCTGAGCGTGCTGGG
P31	mA005marat-K1-fw4	AGTCAGACCCAGCTAAGG
P32	m3UTR-F	TAAACACAAGAAAGGAAATGC
P33	m3UTR-R	TTTGTCAGCTCATTCTTCC
P34	O0821seq	AGCTTCATCTCGATCTGC
P35	H17739marat8	CGGCCATCTTCTTCTCCAGC
P36	H17739marat6	GTGGCCAGTTTGCTGTTCCCTC
P37	H17739marat4	TGGAGGACCCCGATCTGTACAG
P38	H17739F	CAGATTCCTTAGCGGCAG
P39	orfH17-4F	AACCACCCACTCCCAAGTCG
P40	AK098788-F	ATGCGTGGCCGTGGCGGG
P41	hum-ex1-F	ATGGCCGCGTCGGAGGAC
P42	hum1C-F	ACCTTTCAGGGAGATTTGAG
P43	hum1D-F	CTGTGTAGGATGCATCTGCG
P44	H17739F3	AGACCAGATATTCAGGACGC
P45	1B2-F	GTGTCTCACTCTGTGCCCC
P46	1B2-R	CTGTAGTCCCAGCCACTCG
P47	hum1C-R	TTATGGTCACAGAGGGATCC
P48	hum1D-R	TGGTTTCATCAGTTTCTTGC
P49	H17739marat7	AGCAGCCCCTTCTTGATGAGC
P50	pZero-F	CCAGGCTTTACACTTTATGCTTC



**Abb.4:** Lokalisation der verwendeten Primer. Schematische Darstellung des *SCAPININ/Scapinin*-Locus der Maus (**A**) und des Menschen (**B**). Die Primer sind mit Nummern versehen, die im fortlaufenden Text verwendet werden und deren Sequenz in Tabelle 1 angegeben ist. Die Pfeile unterhalb der Nummern zeigen die Orientierung der Primer an. Die alternativ gespleißten *SCAPININ/Scapinin*-Exons sowie der alternativ polyadenylierte 3'-Bereich bei der Maus sind blau dargestellt.

#### 2.1.8. Beschreibung der verwendeten Mausstämme

Beim NMRI-Stamm handelt es sich um ein Albino-Mausmodell, das spontan verschiedene Tumore sowie Nierenerkrankungen entwickelt. Er wurde in den 1930er Jahren als Auszuchtstamm entwickelt und ab 1937 am *National Institute of Health* als NIH/P1 Linie in Inzucht gehalten. Im Gegensatz zur Auszucht wird eine Mauslinie als Inzuchtstamm bezeichnet, wenn die Mäuse seit mindestens zwanzig Generationen ausschließlich in Geschwisterverpaarungen gehalten worden sind. Außer dem Geschlechtsunterschied sind Mäuse eines Inzuchtstammes genetisch identisch, sie sind für praktisch alle genetischen Loci homozygot (BECK *et al.* 2000). Später wurde die NIH/P1 Linie am *Naval Medical Research Institute*, USA (NMRI), unter der heute gültigen Bezeichnung, wieder willkürlich verpaart und gelangte schließlich zum Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover) und zur *Danish mouse breeding company* M&B A/S (heute Taconic) ([www.Informatics.jax.org](http://www.Informatics.jax.org), [www.taconic.com](http://www.taconic.com), BECK *et al.* 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten NMRI wurden am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, ebenfalls in Auszucht, gehalten.

Die *Mus musculus castaneus* wurden von Frau Dr. Bettina Harr, Abteilung für Evolutionsgenetik des Institutes für Genetik der Universität Köln, zur Verfügung gestellt. Diese Linie stammt ursprünglich aus dem *Laboratoire Génome Populations Interactions Adaptation* aus Montpellier, das die in Indien gefangenen Mäuse etwa in der 18. Generation

in zufälliger Kreuzung, also nicht in Inzucht, hielt (Auskunft von Professor Francois Bonhomme, Montpellier).

## 2.2. Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden die hier aufgeführten Methoden aus SAMBROOK und RUSSEL (2001) entnommen und gegebenenfalls modifiziert.

### 2.2.1. Kultur und Stammhaltung von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in flüssigen oder auf festen Medien. Nach dem Autoklavieren der Nährmedien und Abkühlen auf ca. 55°C wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Zusatzstoffe beigemischt, um selektive Wachstumsbedingungen zu schaffen. Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C und 190 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden dann bei 4000 rpm 30 min abzentrifugiert und die DNA sofort präpariert (vgl. 2.2.2.) oder das Zellpellet bei -20°C tiefgefroren. Nährböden wurden ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten können dann ca. 1 Monat bei 4°C gelagert werden. Für die längerfristige Aufbewahrung der Klone empfiehlt sich das Anlegen von Stammhaltungen. Dazu werden 800 µl einer über Nacht.-Kultur mit 200 µl 87%igem, autoklaviertem Glycerol gemischt und zügig bei -80°C eingefroren.

**Tab.2:** Zusätze zur selektiven Anzucht von Bakterien.

Zusatz	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	dH <sub>2</sub> O	50 mg/ml	50 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol, absolut	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	dH <sub>2</sub> O	30 mg/ml	30 µg/ml
IPTG	dH <sub>2</sub> O	1 M	0,5 mM
X-Gal	Dimethylformamid	40 mg/ml	40 µg/ml

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton  
5 g Bacto-Hefeextrakt  
5 g NaCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
autoklavieren

SB-Medium: 20 g Bacto-Trypton  
10 g Bacto-Hefeextrakt  
20 g NaCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
autoklavieren

Um einen festen Nährboden zu erhalten, wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 20 g Agar zugegeben.

### 2.2.2. Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde der „QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (250)“ und die darin enthaltenen Pufferlösungen verwendet.

- 5 ml LB-Medium + Antibiotikum mit Einzelkolonie animpfen und über Nacht bei 190 rpm und 37°C schütteln
- Kulturlösung 30 min bei 4000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendieren und in 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- 250 µl Puffer P2 zugeben und vorsichtig mischen (nicht vortexen)
- 350 µl Puffer N3 zugeben und vorsichtig mischen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand auf QIAprep-Säule geben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 500 µl Puffer PB auf Säule geben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 750 µl Puffer PE auf Säule geben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- nochmals 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Säule in neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen, 30 µl H<sub>2</sub>O auf Säule geben und 1 min stehen lassen
- 1 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- DNA-Konzentration im Durchfluss photometrisch bestimmen (vgl. 2.2.4.)

### 2.2.3. Aufarbeitung von Gewebeproben der Maus

#### 2.2.3.1. Entnahme von Geweben aus Mäusen

Für die Gewebeentnahme vorgesehene Mäuse wurden zunächst mit Halothan betäubt und anschließend ihre Halswirbelsäule durchtrennt. Die Präparation der Organe und Gewebe erfolgte unter Anleitung und entsprechend der Literatur (RUGH 1990). Proben für die RNA-Isolation wurden in Denaturierungslösung homogenisiert und entweder direkt die RNA präpariert (vgl. 2.2.3.3.) oder in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren und bei -80°C gelagert. Gewebe für die Präparation von DNA wurden direkt in entsprechendem Puffer aufgenommen und weiterverarbeitet (vgl. 2.2.3.2.) oder ohne Puffer schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Denaturierungslösung: 4 M Guanidinthiocyanat  
25 mM Natriumcitrat pH 7,0  
0,5% (w/v) N-Lauroylsarcosinat-Natriumsalz  
0.1 M 2-Mercaptoethanol (erst vor Gebrauch zusetzen)

### 2.2.3.2. Präparation von genomischer DNA aus Geweben

- Gewebe in 1×SSC, 0,5% SDS aufnehmen (ca. 100mg Gewebe/ml Puffer) und pro ml Puffer 30 µl Proteinase K (20mg/ml) zugeben
- bei 55°C inkubieren bis die Gewebestruktur vollständig gelöst ist (ca. 2 h)
- mit 1 Vol Phenol/Chloroform versetzen, gut mischen und 3 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und gegebenenfalls nochmals mit 1 Vol Phenol/Chloroform versetzen, gut mischen und 3 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und mit 0,7 Vol Isopropanol die DNA ausfällen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol waschen und erneut abzentrifugieren
- Überstand abnehmen und Pellet trocknen
- Pellet in angemessener Menge TE oder Wasser lösen und Konzentration bestimmen (vgl. 2.2.4.)

20× SSC:     3M    Natriumchlorid  
              0,3M  Natriumcitrat

1× TE:       10 mM Tris-HCl  
              1 mM  EDTA

### 2.2.3.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Geweben

(nach CHOMCZYNSKI und SACCHI 1987)

- Gewebe in 1 ml Denaturierungslösung pro 100 mg Gewebe aufnehmen und homogenisieren
- 0,1 Vol 2 M Natriumacetat pH 4,0 zugeben und gut durchmischen
- 1 Vol Phenol und 0,2 Vol Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 zugeben und gut durchmischen
- 15 min auf Eis inkubieren und 20 min bei 10000 g und 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen, mit 1 Vol Isopropanol versetzen und 30 min bei -20°C inkubieren
- RNA-Pellet in 0,5 ml Denaturierungslösung aufnehmen und nochmals mit 1 Vol Isopropanol 30 min bei -20°C fällen
- 20 min bei 10000 g und 4°C zentrifugieren
- Pellet mit 1 ml 75% Ethanol waschen und 20 min bei 10000 g und 4°C zentrifugieren
- Pellet lufttrocknen lassen und in nukleasefreiem Wasser lösen
- Konzentration bestimmen (vgl. 2.2.4.) und in Aliquots bei -80°C lagern

### 2.2.3.4. Isolierung von polyadenylierter RNA (poly(A)<sup>+</sup>-RNA) aus Gesamt-RNA

(nach AVIV und LEDER 1972)

- zwei 2ml Reaktionsgefäße mit entsprechenden Mengen Oligo(dT) Cellulose füllen (vgl. Tabelle 3), 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand abnehmen
- in Wasser gelöste Gesamt-RNA 5 min bei 65°C denaturieren, Lithiumchlorid zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugeben und mit der Oligo(dT) Cellulose 3 min bei RT vorsichtig schütteln

- 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren, Überstand auf das zweite Oligo(dT) Cellulose Aliquot geben und 3 min bei RT vorsichtig schütteln
- 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- beide Oligo(dT) Cellulose Aliquots jeweils mit 1 Ausgangsvolumen high-salt Puffer waschen, 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- beide Oligo(dT) Cellulose Aliquots jeweils mit 1 Ausgangsvolumen low-salt Puffer waschen, 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- beide Oligo(dT) Cellulose Aliquots je 2× mit 150µl Elutionspuffer (auf 65°C vorgewärmt) spülen, 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren und Überstand sammeln
- Eluat gegebenenfalls nochmals 2 min bei 13000 rpm zentrifugieren um mitgeschleppte Oligo(dT) Cellulose abzutrennen
- poly(A)<sup>+</sup>-RNA mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 Vol Isopropanol und 1µl Glykogen (10mg/ml) über Nacht bei -20°C fällen
- 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet mit 500µl 75% Ethanol waschen und 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet lufttrocknen und in 1× TE pH 7,8 lösen
- Konzentration bestimmen (vgl. 2.2.4.) und in Aliquots bei -70°C lagern

Oligo(dT) Cellulose: 25mg/ml

high-salt Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
0,5 M NaCl

low-salt Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
0,1 M NaCl

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
1 mM EDTA

**Tab.3:** Benötigte Mengen an Oligo(dT) Cellulose zur Isolierung von polyA<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA.

Ausgangsmenge an Gesamt-RNA	Menge an Oligo(dT) Cellulose für 1. Isolierung	Menge an Oligo(dT) Cellulose für 2. Isolierung
100 - 300µg	100µl	100µl
<1mg	200µl	100µl
<3mg	300µl	100µl
>3mg	500µl	300µl

#### 2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Anhand der Extinktion wurde die Konzentration der isolierten Nukleinsäuren mit einem Spektralphotometer bestimmt. Es wurde eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke verwendet. Nach Abgleich des Photometers wurden die Nukleinsäurelösungen bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm 50 µg/ml

doppelsträngiger DNA oder 37 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen bei 260 und 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) gibt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren an und sollte bei DNA-Lösungen 1,8-1,95 und bei RNA 1,9-2 betragen.

## 2.2.5. Northern Blotting

### 2.2.5.1. Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese

#### Vorbereitung eines 1%igen Gels

- 1g Agarose in 85 ml nukleasefreiem Wasser und 10ml 10× MOPS unter kochen lösen
- auf 60°C abkühlen, unter einem Abzug 5 ml 12,3M Formaldehyd zugeben und in vorbereitete Gelkammer mit Kamm gießen
- nach Erkalten Kamm ziehen und 1× MOPS als Laufpuffer zugeben, sodass das Gel vollständig bedeckt ist

10× MOPS: 0,4M MOPS pH 7,0  
0,1M Natriumacetat  
0,01M EDTA

#### Vorbereitung der RNA-Proben

- RNA-Proben (und gegebenenfalls Marker) mit nukleasefreiem Wasser auf gleiche Volumina einstellen (Größe der Geltaschen berücksichtigen)
- entsprechendes Volumen 5× Ladepuffer zugeben und gut mischen
- 5 min bei 95°C denaturieren, sofort auf Eis
- Gel laden und mit 5V/cm laufen lassen bis Ladepuffer ca.  $\frac{2}{3}$  des Gels passiert hat

5× Ladepuffer: 16 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung (in Wasser)  
80 µl 500 mM EDTA pH 8,0  
720 µl 12,3 M Formaldehyd  
2 ml 100% Glycerol  
3,084 ml Formamid  
4 ml 10× MOPS  
ad 10 ml nukleasefreies Wasser

#### Gel färben und dokumentieren

- Gel aus der Kammer nehmen, mit nukleasefreiem Wasser bedecken und Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugeben
- 30 min schütteln
- Färbelösung abgießen und Gel zum Entfärben mit nukleasefreiem Wasser bedecken
- 15 min schütteln, Wasser abgießen und Gel erneut mit nukleasefreiem Wasser bedecken
- 15 min schütteln, Wasser abgießen und RNA mit UV-Licht sichtbar machen
- Lineal ans Gel anlegen und fotografieren, um später Hybridisierungssignale mit dem Marker vergleichen zu können

### 2.2.5.2. Transfer der RNA mittels Kapillarblot

- Photoschale zu  $\frac{3}{4}$  mit  $20\times$  SSC als Transferlösung füllen, eine Kunststoffplatte darüber legen, auf der sich ein Filterpapier befindet, das auf beiden Seiten in die  $20\times$  SSC-Lösung eintaucht
- Filterpapier mit  $20\times$  SSC anfeuchten und mit einem Glasstab luftblasenfrei andrücken
- nacheinander 3 Schichten feuchtes Whatman Papier luftblasenfrei auflegen
- Gel auflegen und Gelränder so mit Folie abdichten, dass die Transferlösung nur durch das Gel hindurch gesaugt werden kann
- auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran mit  $2\times$  SSC anfeuchten und luftblasenfrei auf das Gel auflegen
- luftblasenfrei mit einer Schicht Whatman Papier bedecken
- mehrere Schichten saugfähiges Papier auflegen und mit einem Gewicht beschweren (ca. 500g)
- nach 24-48h Saugpapier und oberste Schicht Whatman entfernen
- auf der Membranrückseite mit Bleistift die Geltaschen markieren und gegebenenfalls eine Identifikationsnummer aufbringen
- Membran vom Gel abziehen und kurz in  $2\times$  SSC spülen
- Membran soweit lufttrocknen lassen, dass keine stehende Flüssigkeit mehr vorhanden ist
- RNA mittels eines UV-Stratalinkers 1800 kovalent an die Nylonmembran binden
- Gel unter UV-Licht auf Rest-RNA und somit Blot-Effizienz hin überprüfen

### 2.2.5.3. Hybridisierung der Northern-Blots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Markierung der Sonden mit „Megaprime™ DNA labelling systems“-Kit

20-50 ng DNA  
5  $\mu$ l random Primer  
ad 33  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

5 min bei 95°C inkubieren  
sofort auf Eis

10  $\mu$ l labelling Puffer  
5  $\mu$ l  $\alpha^{32}$ P-dCTP  
2  $\mu$ l Klenow-Fragment (1 U/ $\mu$ l)  
 $\Sigma$  50  $\mu$ l

Markierung der Sonden mit „ready-to-go™ Labelling beads“

20-50 ng DNA in 45  $\mu$ l TE  
lösen

5 min bei 95°C inkubieren  
sofort auf Eis

Labelling-bead und  
5  $\mu$ l  $\alpha^{32}$ P-dCTP zugeben  
 $\Sigma$  50  $\mu$ l

- Ansatz 30min bei 37°C inkubieren
- nicht eingebaute dNTPs und random Primer über MicroSpin™G50-Säule abtrennen

#### Vorhybridisierung

- Membran mit  $2\times$ SSC/0,05% SDS anfeuchten und in Hybridisierungsröhren geben
- 5-10 ml „Rapid-Hyb“-Puffer in Hybridisierungsröhren geben
- 1 h bei 63°C prähybridisieren

### Hybridisierung

- Sonde 5 min bei 95°C denaturieren und sofort zum Vorhybridisierungsansatz geben
- 2-16h bei 63°C hybridisieren

### Waschen

- Membran 2× 5min in 2×SSC/0,1% SDS bei RT waschen und Aktivität messen (Aktivität sollte 10-15× Hintergrund betragen)
- Membran gegebenenfalls in 0,2×SSC/0,1% SDS bei 63°C waschen und regelmäßig Aktivität messen

### Detektion

- in Folie eingeschlagene Membranen für mindestens 2 h auf Phosphorimager-Screen exponieren
- Detektion der Signale mit Phosphorimager und Auswertung mit ImageQuant<sup>®</sup>-Software
- Zuordnung der Signale zu Molekulargewichten der detektierten Transkripte mittels Herolab Software und unter Bezugnahme zu den bei der Gelelektrophorese mitgeführten Standards

### 2.2.6. Reverse Transkription (RT)

Für die Reverse Transkription kamen verschiedene Produkte zum Einsatz, die entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurden. Für einen 20 µl Ansatz wurden 50-200 ng poly(A)<sup>+</sup>-RNA bzw. 0,5-10 µg Gesamt-RNA mit 10 pmol Primer, 10 nmol von jedem dNTP und einer entsprechenden Menge nukleasefreiem Wasser für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend für mind. 5 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden, je nach verwendetem Produkt, Reaktionspuffer, Enzym und gegebenenfalls weitere Zusätze hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion abgestoppt, indem sie für 10 min auf 65°C erhitzt wurde. Für eine anschließende PCR wurde  $\frac{1}{100}$  bis  $\frac{1}{10}$  der RT-Reaktion eingesetzt.

### 2.2.7. PCR (nach Saiki *et al.* 1988)

Die für die verschiedenen Anwendungen konzipierten PCR-Reaktionsansätze werden im Folgenden ausführlich dargestellt und die dafür verwendeten Reaktionsbedingungen (PCR-Programme für den „Eppendorf Mastercycler Gradient“) sind in der folgenden Tabelle 4 aufgeführt.

**Tab.4:** Übersicht über die wesentlichen Parameter der verwendeten PCR-Programme.

	Programm 1	Programm 2	Programm 3	Programm 4	Programm 5
		Zugabe von Mix A			Zugabe von Mix A
einmalige Denaturierung	95°C/120 s	95°C/120 s	94°C/120 s	95°C/120 s	95°C/120 s
		Zugabe von Mix B			Zugabe von Mix B
Denaturierung	95°C/40 s	95°C/40 s	92°C/30 s	95°C/40 s	95°C/40 s
Annealing	50-70°C/40 s	50-70°C/40 s	50-60°C/30 s	72°C/40 s, -1°C/Zyklus	72°C/40 s, -1°C/Zyklus
Elongation	72°C/60 s	72°C/60 s	60°C/2 min	68-72°C/240 s	68-72°C/240 s
einmalige Elongation	72°C/180 s	72°C/180 s			
Zyklenzahl	30	30	25	22	22
Denaturierung				95°C/40 s	95°C/40 s
Annealing				50-60°C/40 s	50-60°C/40 s
Elongation				72°C/240 s	72°C/240 s
Zyklenzahl				25	25

### 2.2.7.1. Standard-PCR

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

20-100 ng	Template
1,5 µl	10×PCR-Puffer
3,3 mM	MgCl <sub>2</sub>
5 nmol	je dNTP
5 pmol	Primer forward
5 pmol	Primer reverse
0,5 U	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 15 µl	H <sub>2</sub> O

PCR-Programm 1 (vgl. Tabelle 4)

Gegebenenfalls enthielt der PCR-Ansatz 1,6 M Betain, da es die Denaturierungstemperatur der DNA herabsetzt und somit die Amplifikation von GC-reichen Regionen erleichtert (HENKE *et al.* 1997, REES *et al.* 1993). Um für Primerkombinationen die optimale Annealingtemperatur zu finden, wurde ein Programm mit Temperaturgradient (50°C -70°C ) durchgeführt. War dies nicht möglich, so wurde ein *touch down*-Programm verwendet. Dabei wird die anfängliche Annealingtemperatur von 72°C um 1°C pro Zyklus verringert bis zu einer Temperatur von 50°C, um sich so von oben an die optimalen Bedingungen anzunähern und unspezifische Amplifikation möglichst auszuschließen. Daran schlossen sich nochmals 25 Zyklen mit einer mittleren Annealingtemperatur (50°C-60°C) an (PCR-Programm 4, vgl.

Tabelle 4). Eine weitere Möglichkeit, um unspezifische Produkte zu vermeiden, ist die *hot start*-PCR. Hierbei kommen Template, Primer und Polymerase erst bei hoher Temperatur zusammen. Dazu wurde der PCR-Ansatz wie folgt aufgeteilt:

Mix A	Mix B	
x $\mu$ l	---	Template
1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l	5×Reaktionspuffer
0,5 $\mu$ l	---	dNTPs (10 mM)
0,5 $\mu$ l	---	Primer forward (10pmol/ $\mu$ l)
0,5 $\mu$ l	---	Primer reverse (10pmol/ $\mu$ l)
---	0,1 $\mu$ l	<i>Taq</i> -Polymerase
x $\mu$ l	x $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
$\Sigma$ 7,5 $\mu$ l	$\Sigma$ 7,5 $\mu$ l	

PCR-Programm 2 (vgl. Tabelle 4)

Mix A wurde zunächst für 5 min bei 95°C inkubiert und erst dann wurde Mix B zugegeben. Anschließend wurde eines der oben genannten Programme durchgeführt. Bei allen PCR-Ansätzen wurde eine Negativkontrolle (ohne Template) und, wenn möglich, auch eine Positivkontrolle (genomische DNA, Plasmid-DNA) mitgeführt. Die Reaktionen wurden anschließend durch Gelelektrophorese ausgewertet (vgl. 2.2.9.)

#### 2.2.7.2. Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Die RACE-PCR ist eine Methode, um fehlende 5'- bzw. 3'-Enden von cDNAs zu amplifizieren. Voraussetzung ist eine effiziente Reverse Transkription, insbesondere im 5'-Bereich von Genen, die einen hohen GC-Gehalt haben und daher zur Bildung von Sekundärstrukturen neigen. Des Weiteren wird eine bekannte Sequenz benötigt, z. Bsp. in Form eines Adaptors, die an das 5'-Ende der erhaltenen Einzelstrang-cDNA ligiert wird, um eine Amplifikation zu ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Templates für die RACE-PCR eingesetzt.

Zunächst wurde versucht, aus gewebespezifischen Pools einer vorhandenen cDNA-Bank (*GeneFinder-cDNA-Pools*, RZPD, Berlin), die positiv für *Scapinin* waren, gezielt die 5'-Enden der enthaltenen cDNA-Klone zu amplifizieren. Hierfür wurden die vektorspezifischen Primer pZERO-F bzw. pZERO-R2 (Primer P50 und P1 in Tabelle 1) in Kombination mit einem genspezifischen Primer in einer Standard-PCR-Reaktion eingesetzt.

Als weiteres Ausgangsmaterial diente die *Marathon-Ready™ cDNA-library*, die Einzelstrang-cDNAs enthält, an deren Enden Adaptoren ligiert wurden, für die geschachtelte Primer zur Verfügung stehen. Somit konnten zwei PCR-Runden durchgeführt werden, wodurch die Spezifität der Amplifikation erhöht wurde. Da die Länge der Produkte nicht bekannt war, wurden Enzym-Kombinationen verwendet, die auch die Amplifikation größerer Fragmente gewährleisten. Zudem wurde für beide PCRs ein *hot start-touch down*-Programm gewählt (PCR-Programm 5, vgl. Tabelle 4). Erst nach der zweiten Runde erfolgte eine Auftrennung der Produkte mittels Agarosegelelektrophorese. Folgender Ansatz wurde für die erste Amplifikationsrunde verwendet:

Mix A	Mix B	
0,7 µl	---	Marathon-Ready™ cDNA (0,1 ng/µl)
---	0,1 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	0,8 µl	10× Advantage® cDNA PCR-Reaktionspuffer
0,1 µl	---	Adaptorprimer 1 (10 µM)
0,1 µl	---	genspezifischer Primer (10 µM)
---	0,2 µl	50× Advantage® cDNA Polymerase Mix
3,9 µl	3,9 µl	H <sub>2</sub> O
Σ 5 µl	Σ 5 µl	

Folgender Ansatz wurde für die zweite Amplifikationsrunde verwendet:

Mix A	Mix B	
1,0 µl	---	DNA (1:50 verdünntes Produkt der 1. Runde)
0,5 µl	---	dNTPs (10 mM)
1,0 µl	3,0 µl	ELONGASE™-Puffer B
---	1,1 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
0,2 µl	---	Adaptorprimer 2 (10 µM)
0,2 µl	---	genspezifischer Primer (10 µM)
---	0,4 µl	ELONGASE™-Mix
7,1 µl	5,5 µl	H <sub>2</sub> O
Σ 10 µl	Σ 10 µl	

Darüber hinaus wurde ein eigenes RACE-Template generiert, indem poly(A)<sup>+</sup>-RNA zunächst in einer Reverse Transkriptions-Reaktion in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben wurde (vgl. 2.2.6.). Anschließend wurde ein so genannter Anker-Oligo mit Hilfe einer RNA-Ligase an das 5'-Ende der generierten cDNA ligiert. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen, wurden

Polyethylenglykol und Hexaminkobaltchlorid zugegeben. Ein möglicher RNase-Verdau vor der Ligation wurde nicht durchgeführt:

2,5 µl RT-Reaktion  
1 µl anchor3 (10 pmol/µl)  
10 µl PEG 6000  
2 µl Hexaminkobaltchlorid  
2 µl 10×RNA-Ligase-Puffer  
2 µl ATP-Lösung (10 mM)  
0,5 µl RNA-Ligase (10 U/µl)

Der Ligationsansatz wurde für mind. 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend wie die *Marathon-Ready™ cDNA-library* für die RACE-PCR eingesetzt.

#### 2.2.8. Restriktion

Restriktions(endo)nukleasen sind Enzyme, die DNA sequenzspezifisch schneiden. Sie haben unterschiedliche Erkennungssequenzen, die palindromisch angeordnet sind. Die Spaltung von DNA mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen erfolgte in den vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffern bei den angegebenen Reaktionsbedingungen. In der Regel wurden pro µg DNA 10 Units des jeweiligen Enzyms eingesetzt, die Spaltung erfolgte für 2-5 h bei entsprechender Temperatur. Die Nomenklatur erfolgte entsprechend Roberts *et al.* (2003)

#### 2.2.9. Elektrophorese

Durch eine Elektrophorese in Agarosegelen können DNA-Moleküle in einem Größenbereich von 0,1 - 30 kb aufgetrennt werden. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,5 - 3%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die jeweils benötigte Agarosemenge wurde in 0,5×TBE- bzw. 1×TAE-Puffer gegeben, durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf etwa 50°C in einen Gelträger gegossen und Kämme eingehängt, so dass Taschen entstehen, in die die DNA eingebracht werden kann. Für einige Anwendungen wurde die Agarose mit Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) bis zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml versetzt. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard diente eine DNA mit bekannten Fragmentgrößen. Als Laufpuffer wurde 0,5×TBE- bzw. 1×TAE verwendet. Die Elektrophoresen wurden in der Regel bei 6 V/cm Gellänge durchgeführt. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele in Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) angefärbt, wenn kein Ethidiumbromid zur Agarose

zugegeben worden war. Die Gele wurden mit Hilfe eines Videoprinter-Systems dokumentiert.

10×TAE:	0,4 M Tris pH 8,0	10×TBE	1 M Tris pH 8,0
	0,2 M Eisessig		1 M Borsäure
	10 mM EDTA		20 mM EDTA

#### 2.2.10. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Agaroseblöckchen, welche die gewünschten DNA-Banden enthielten, wurden unter UV-Licht (305 nm) mit einem sterilen Skalpell aus den präparativen Gelen ausgeschnitten und in ein Filterpapier überführt, welches sich in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit perforiertem Boden befand. Dieses Reaktionsgefäß wurde in ein weiteres 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt, so dass es nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 45 sec bei 12000 rpm möglich war, die im Puffer gelöste DNA frei von Agarose im unteren Gefäß aufzufangen. Die so isolierte DNA wurde mit 1 Vol Isopropanol gefällt, abzentrifugiert, mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNA in Wasser oder TE gelöst und für Klonierungen, Sequenzierungen oder Hybridisierungen eingesetzt.

#### 2.2.11. Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurden entweder der TOPO TA Cloning® Kit oder das pGEM-T bzw pGEM-Teasy vector system verwendet. Bei diesen Systemen wird ausgenutzt, dass die *Taq*-DNA-Polymerase unabhängig vom Template an das 3'-Ende der PCR-Produkte ein zusätzliches Adenin anhängt. Die in den Kits enthaltenen Vektoren besitzen Thymin-Überhänge was die Integration der PCR-Produkte erleichtert. Die Ligationsansätze wurden entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und inkubiert. Die anschließende Transformation erfolgte durch Hitzeschock (HANAHAN 1983) in chemisch kompetente DH5α-Zellen. Dazu wurde ein 100 µl Aliquot der Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und der Ligationsansatz hinzugefügt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 1 min bei 42°C „geschockt“. Unmittelbar danach wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben, der Ansatz 30 min bei 190 rpm und 37°C geschüttelt und schließlich auf selektivem LB-Agar-Medium ausplattiert.

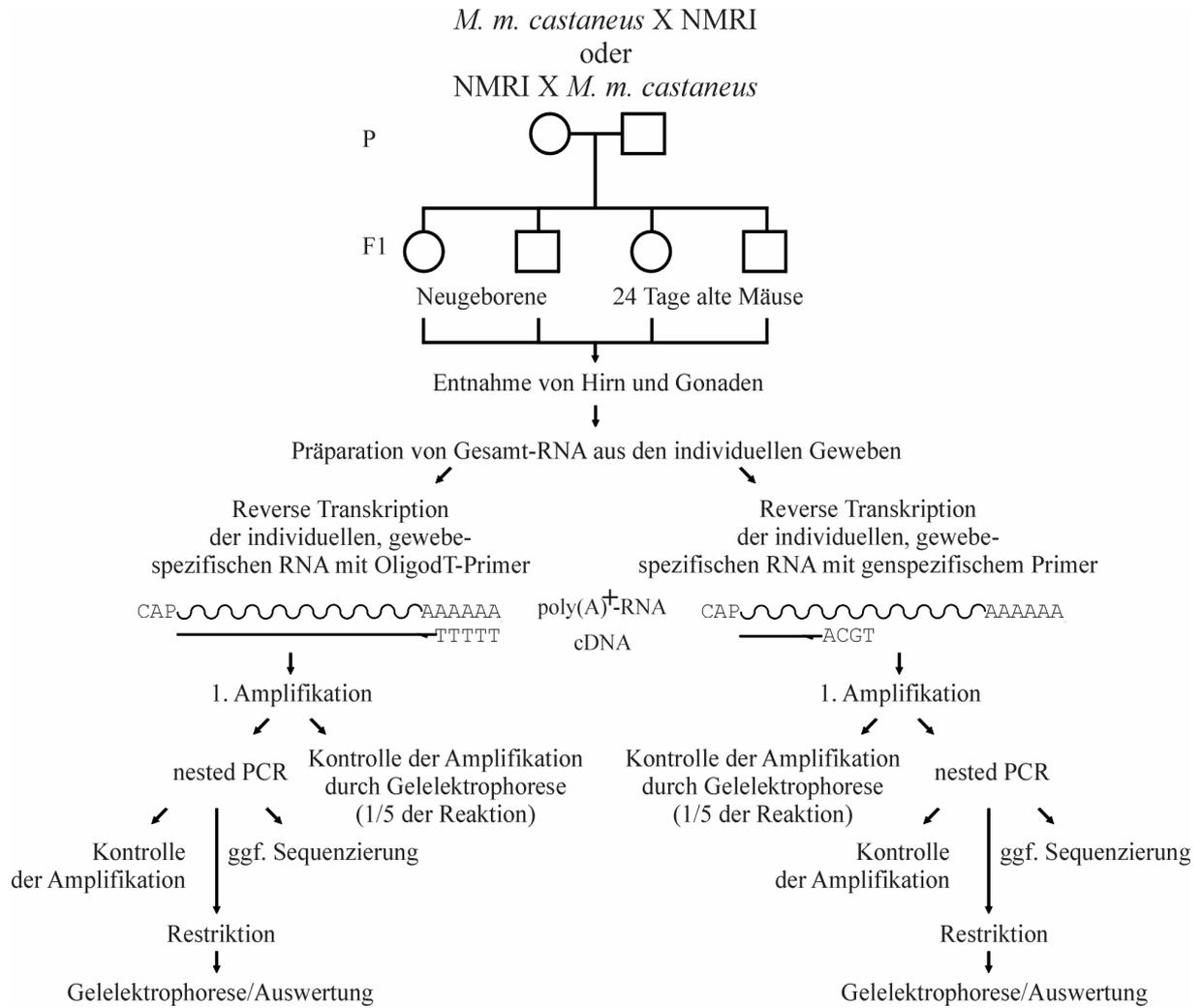
SOC-Medium:	2% Trypton	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,5% Hefeextrakt	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	10 mM NaCl	20 mM Glukose
	2,5 mM KCl	

### 2.2.12. Sequenzierung (nach SANGER *et al.* 1977)

Für Sequenzierungen wurde entweder der „Thermo Sequenase™ II dye terminator cycle sequencing premix kit“ oder der „BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Es wurden ca. 100 ng Template und 3 pmol Primer in Verbindung mit den entsprechenden Komponenten der Sequenzierungskits in 20 µl-Ansätzen eingesetzt (PCR-Programm 3, vgl. Tabelle 4). Nach erfolgter Reaktion wurden die Produkte durch Zugabe von 0,5 µl Glykogen (10 µg/µl),  $\frac{1}{10}$  Vol 1,5 M NaAcetat/250 mM EDTA und 4 Vol Ethanol (absolut) ausgefällt und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 150 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet. Die Auswertung der Sequenzierungsreaktionen erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät in Halle unter Leitung von Herrn Dr. Georg Kaltenborn bzw. Frau Dr. Dorothea Darmer.

### 2.2.13. Analyse der allelspezifischen Expression

Für die Analyse der allelspezifischen Expression wurde wie im Ablaufdiagramm dargestellt (Abbildung 5) vorgegangen. Adulte Mäuse des NMRI-Stammes und *Mus musculus castaneus* wurden reziprok gekreuzt und aus den Würfen beider Kreuzungen wurden jeweils ein männliches und ein weibliches Tier der F1-Generation innerhalb eines Tages nach ihrer Geburt (Neugeborene) bzw. 24 Tage danach für die Gewinnung von Geweben entnommen und individuell weiter aufgearbeitet. Die so erhaltenen Gesamt-RNAs, die jeweils ein Gewebe eines Tieres repräsentierten, wurden für zwei unabhängige Reverse Transkriptionen, einmal mit einem Oligo(dT)-Primer und einmal mit einem genspezifischen Primer (P6, P10 oder P31) eingesetzt. Eine Ausnahme bildeten hier Ovarien und Testis von Neugeborenen, die aufgrund der geringen RNA-Ausbeute lediglich mit dem Oligo(dT)-Primer revers transkribiert wurden. Mit den so generierten zwei Erststrang-cDNA-Pools pro Gewebe wurde eine erste PCR durchgeführt und ein Teil jeder Reaktion zur Kontrolle auf mögliche cDNA-Kontaminationen im Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurden die Produkte der ersten PCR i.d.R. mit geschachtelten Primern reamplifiziert und ein Teil (ca.  $\frac{1}{4}$ ) dieser Amplifikationen wiederum mittels Gelelektrophorese überprüft. Der Rest wurde mit dem jeweiligen Restriktionsenzym für mindestens zwei Stunden inkubiert und nach anschließender Auftrennung im Agarosegel analysiert. Gegebenenfalls wurden die Produkte der zweiten PCR auch isoliert und direkt sequenziert.



**Abb.5:** Ablaufdiagramm zur Analyse der allelspezifischen Expression von *Scapinin* bei der Maus. Erläuterungen im Text unter 2.2.13. P: Parentalgeneration, F1: erste Filialgeneration.

### 3. Ergebnisse

Die hier vorliegende Arbeit basiert auf Daten einer am Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie im Rahmen des Humangenomprojektes angefertigten Diplomarbeit (WORCH 2000), bei der ausgehend von *expressed sequence tags* (ESTs) das inzwischen als *SCAPININ* bzw. *PHACTR3* bezeichnete Gen erstmals kloniert und näher charakterisiert wurde. Durch die Analyse von cDNA-Klonen aus verschiedenen Ressourcen sowie RACE-PCR Experimente konnte ein ca. 2,4 kb großes humanes Transkript beschrieben werden. Dieses teilte sich in 13 Exons auf und wurde durch weitere Untersuchungen im distalen Bereich des humanen Chromosoms 20 lokalisiert sowie seine Expression im Hirn nachgewiesen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der weiterführenden Analysen beschrieben, die sowohl beim Menschen aber hauptsächlich bei der Maus Erkenntnisse zur Struktur und zur Expression des *SCAPININ/Scapinin*-Gens erbrachten. Die für die verschiedenen Experimente verwendeten Primer wurden im fortlaufenden Text mit einem in Klammern stehenden „P“ mit folgender Nummer versehen. Die exakte Bezeichnung und Sequenz sowie die Lage der Primer am *SCAPININ/Scapinin*-Locus sind in der Tabelle 1 sowie in Abbildung 4 dargestellt.

#### 3.1. Analyse des *SCAPININ*-Locus des Menschen

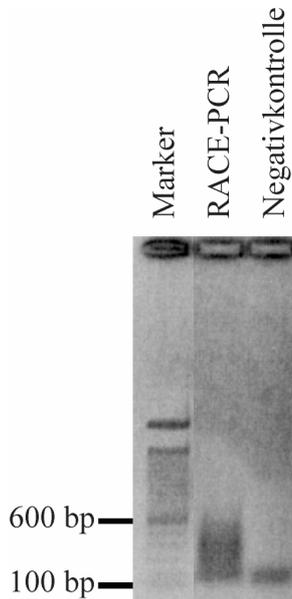
##### 3.1.1. Genomische Struktur des *SCAPININ*-Locus

Für das humane *SCAPININ*-Gen war zu Beginn dieser Arbeit nur das eine im cDNA Klon IMAGp998J09283 enthaltene Startexon bekannt (WORCH 2000), das sich im weiteren Verlauf der Arbeiten als Exon 1B herausstellte (AJ311122). Durch regelmäßige Recherche in den aktualisierten Sequenzdatenbanken konnte eine cDNA mit einem weiteren Startexon identifiziert werden, welches Exon 1A darstellt (AK098788). Darüber hinaus veröffentlichten SAGARA *et al.* (2003) ihre Ergebnisse zum *SCAPININ*-Gen mit der dazugehörigen cDNA Sequenz, welche Exon 1D enthielt (AB098522). Eigene RACE-Analysen lieferten schließlich ein viertes, bis dahin unbekanntes Startexon (AJ617581).

##### 3.1.1.1. Ergebnisse der RACE-PCR-Experimente

Für die RACE-Experimente wurde, wie unter 2.2.7.2. beschrieben, humane polyA<sup>+</sup>-RNA aus fetalem Hirn genspezifisch revers transkribiert (P34) und ein Anker-Oligo (P7) an diese Erststrang-cDNA ligiert. Anschließend folgten zwei PCRs mit geschachtelten Primern, die spezifisch für den Anker (P8 & P9) bzw. für Exon 2 des humanen *SCAPININ*-Gens waren

(P35 & P36). Auf diese Weise wurden, wie in Abbildung 6 gezeigt, Fragmente zwischen 100 bp und 600 bp erhalten, die anschließend subkloniert wurden. Nach der Sequenzierung ausgewählter Klone wurde eine neue 104 bp lange Sequenz erhalten, die Exon 1C darstellt (AJ617581).



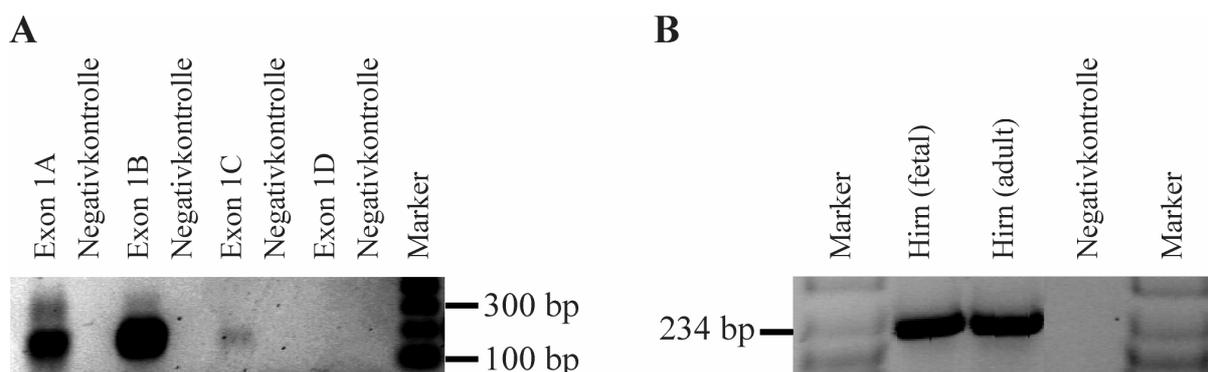
**Abb.6:** Ergebnis der 5'-RACE-PCR für das humane *SCAPININ*-Gen. Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template. Das Signal in der Negativkontrolle ist aufgrund seines Molekulargewichtes vermutlich auf Primer-Dimere zurückzuführen. Marker: 100 bp ladder.

Die RACE-PCR-Analysen des 3'-Bereiches (WORCH 2000) erbrachten ein einzelnes Fragment, das der aus den verschiedenen cDNA-Klonen bekannten 3'-UTR entsprach und lieferten daher keine Hinweise auf etwaige strukturelle oder regulatorische Besonderheiten wie z. Bsp. eine alternative Polyadenylierungsstelle. Auch in den Sequenzdatenbanken finden sich bis zum jetzigen Zeitpunkt weder eine cDNA noch ein EST, die auf ein solches Phänomen hinweisen.

#### 3.1.1.2. Analyse des 5'-Bereiches des *SCAPININ*-Gens

Neben der Möglichkeit, in einer Vielzahl verschiedener cDNA-Bibliotheken mittels PCR bzw. Hybridisierungen nach Klonen zu suchen, können beim RZPD (Berlin) auch durch eine BLAST-Suche teilsequenzierte Klone als positiv für ein bestimmtes Gen identifiziert werden. Auf diese Weise wurde der cDNA-Klon IMAGp998A099490 erhalten, der ebenfalls ein *SCAPININ*-Transkript mit Startexon 1B enthält. Nach dessen Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit, konnte die bekannte Sequenz im 5'-Bereich um weitere 332 bp verlängert werden. Um im Folgenden zu untersuchen, ob sich die vier Startexons gegenseitig ausschließen, oder ob es Spleißvarianten gibt, in denen sie in Kombination auftreten, wurden RT-PCR Analysen mit RNA aus fetalem Hirn durchgeführt. Dabei kamen Primer zum Einsatz, die jeweils spezifisch für eines der Startexons (P40, P41, P42 & P43) und für Exon 2

(P36) waren. Wie in Abbildung 7A gezeigt, konnte kein Exon 1D-spezifisches Produkt generiert werden und nur ein schwaches Produkt für Exon 1C, das aber der erwarteten Größe von 195 bp entspricht. Für die Exons 1A und 1B zeigten sich neben den erwarteten Produkten von 200 bp bzw. 209 bp zusätzliche, größere Fragmente, von denen das größere 1A-Produkt von etwa 250 bp Größe bisher nicht abschließend analysiert werden konnte. Nach Subklonierung und Sequenzierung des zusätzlichen 1B-PCR-Fragments stellte sich heraus, dass es sich dabei um ein weiteres, neues 147 bp großes Exon handelt, das sich genomisch zwischen den Exons 1B und 1C, ca. 8 kb stromaufwärts von Exon 1B, befindet (vgl. Abbildung 9). Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden mehrere hirnspezifische RT-PCR-Ansätze mit Primern, die spezifisch für dieses neue Exon 1B2 waren (P45 & P46), in Kombination mit anderen Startexon-spezifischen Primern (P40, P41, P47 & P48) bzw. Primern für die Exons 2 (P36) und 3 (P49) durchgeführt und die erhaltenen Produkte sequenziert. Dabei wurden nur Exon 1B2-Produkte gefunden, die an Exon 1B und Exon 2 gespleißt wurden, andere Spleißvarianten von Exon 1B2, das kein Startexon zu sein scheint, konnten nicht identifiziert werden. Im Anhang (Anlage 3) ist die Sequenz dieses neuen Exons 1B2 hinterlegt, und exemplarisch ist in Abbildung 7B das Ergebnis einer RT-PCR mit Exon1B2- und Exon 2-spezifischen Primern (P45 & P36) dargestellt. Das erhaltene Fragment hat eine Größe von 234 bp und enthält keine Sequenz der Startexons C oder D, die auf genomischer Ebene zwischen 1B2 und Exon 2 lokalisiert sind.



**Abb.7:** RT-PCR-Analyse des 5'-Bereiches von *SCAPININ* und Verifizierung von Exon 1B2 im Hirn. Abbildung (A) zeigt das Ergebnis der RT-PCR mit Startexonspezifischen Primern. Die deutlichen Fragmente für 1A und 1B sowie das Produkt für 1C entsprechen Amplifikaten, die keinen Hinweis auf Kombinationen der Startexons untereinander geben. Für 1A und 1B wurden zusätzliche, größere Fragmente erhalten, von denen bisher nur das zusätzliche 1B-Produkt analysiert werden konnte und sich als weiteres, alternativ gespleißtes Exon herausstellte. In Abbildung (B) ist die Verifizierung dieses neuen Exons mittels RT-PCR exemplarisch für eine der verwendeten Primerkombinationen dargestellt, die ein Produkt von 234 bp lieferte, das nur Sequenzen von 1B2 und Exon 2 enthielt. Negativkontrollen: PCR-Ansatz ohne Template. Marker in (A): 100 bp *ladder*. Marker in (B): pUC-Mix Marker 8.

Bei der Analyse des 5'-Bereiches des humanen *SCAPININ*-Gens fiel darüber hinaus auf, dass die Transkripte im Bereich ihrer jeweiligen Startexons ATG-Codons (bzw. AUG in der mRNA) enthalten, die teilweise *in frame* mit dem putativen Translationsstart in Exon 2 liegen. Ob von diesen *upstream* AUGs (uAUGs), neben den von SAGARA *et al.* (2003) beschriebenen, weitere Genprodukte gebildet werden oder ob sie eine andere Funktion haben, wurde bisher nicht untersucht. Die bei der Analyse des 5'-Bereichs des humanen *SCAPININ*-Gens erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Größe der Startexons und den enthaltenen AUGs sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Im Anhang sind die Sequenzinformationen zum *SCAPININ*-Gen (Anlagen 1 bis 7) sowie eine Grafik zur Lokalisation der uAUGs in den Startexons (Anlage 17) abgebildet.

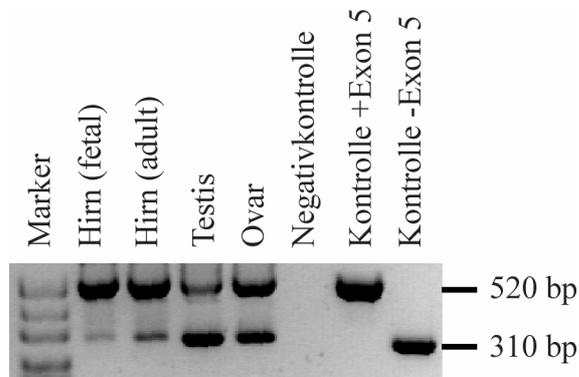
**Tab.5:** Übersicht über die Größe der Startexons des *SCAPININ*-Gens des Menschen und die in ihnen enthaltenen ATGs. Die Sequenzen sind in öffentlichen Datenbanken unter den aufgeführten *accession*-Nummern (Acc.-Nr.) abgelegt. Die Position der ATGs ist bezogen auf den Translationsstart in Exon 2 angegeben, mit dem sie *in frame* sind, wenn sie mit einem \* markiert sind.

Exon	Acc.-Nr.	Größe (bp)	ATGs
1A	AK098788	109	-114* -5
1B	AJ311122	585	-397 -349 -176 -123* -5
1C	AJ617581	104	-5
1D	AB098521 AB098522	229	-208 -167 -31 -5

### 3.1.1.3. Untersuchungen zum alternativen Spleißen von Exon 5

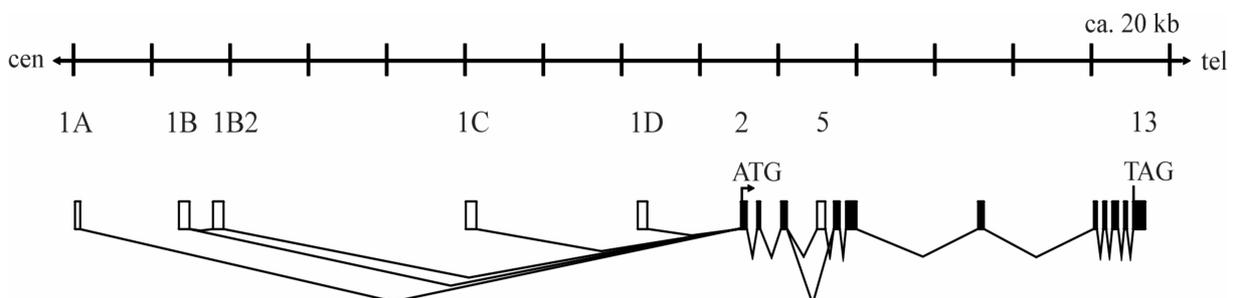
Eine weitere strukturelle Besonderheit des humanen *SCAPININ*-Genes wurde von SAGARA *et al.* (2003) erstmals beschrieben. Sie fanden Transkripte in humanen Krebszelllinien, bei denen Exon 5 herausgespleißt wurde. Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen auch in normalem Gewebe auftritt, wurden RT-PCR Experimente mit RNA aus fetalem und adultem Hirn sowie Testis und Ovar durchgeführt. Nach einer ersten PCR mit Primern aus den Exons vier (P37) und sieben (P38) wurde mit geschachtelten, ebenfalls Exon 5 überspannenden Primern (P39 & P22) in allen untersuchten Geweben ein 520 bp großes Produkt amplifiziert, das Exon 5 enthält. Zusätzlich wurde in allen Ansätzen ein 310 bp Fragment erhalten, das

Transkripte mit herausgespleißtem Exon 5 anzeigt. In Abbildung 8 sind die beiden Fragmente in den erwarteten Größen dargestellt, die das alternative Spleißen von Exon 5 in den analysierten humanen Geweben bestätigen.



**Abb.8:** Analyse des alternativen Spleißens von Exon 5 beim humanen *SCAPININ*-Gen. Die RT-PCR mit Exon 5 überspannenden Primern lieferte zwei Produkte, die das alternative Spleißen von Exon 5 in den untersuchten Geweben anzeigen. Neben einer Negativkontrolle (ohne Template) wurden als Positivkontrollen cDNA-Klone mitgeführt, die *SCAPININ*-PCR-Produkte mit (+) und ohne (-) Exon 5 enthielten. Marker: pUC-Mix Marker 8.

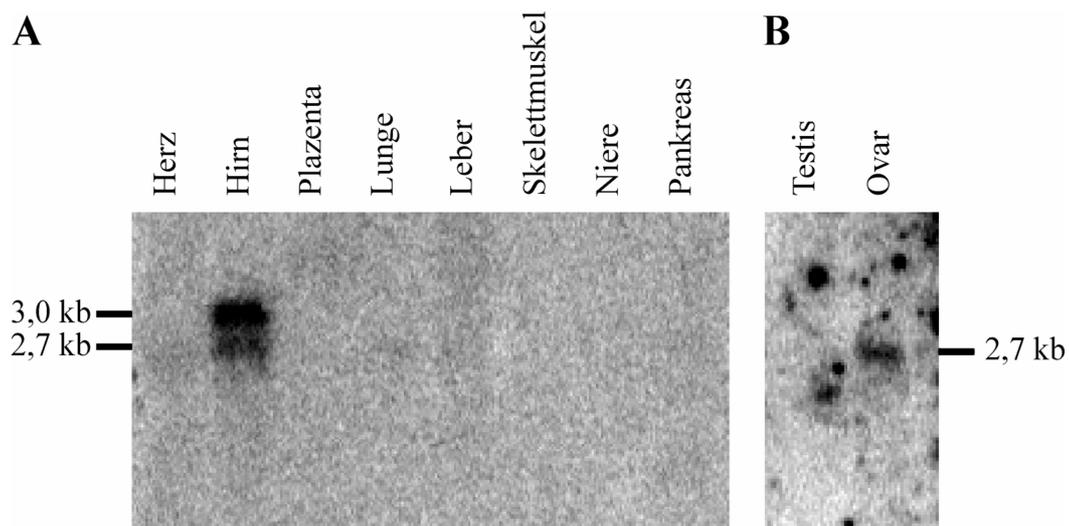
In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der RACE sowie der weiteren Analysen zur Organisation des humanen *SCAPININ*-Gens in Form einer genomischen Struktur grafisch zusammengefasst. Das Gen erstreckt sich über ca. 280 kb und besteht aus insgesamt mindestens 17 Exons, von denen sechs alternativ gespleißt werden können (weiße Boxen). Daher variiert auch die Größe der möglichen Transkripte, von denen das längste bisher darstellbare 2726 bp umfasst. Der offene Leserahmen beginnt in Exon 2 (ATG) und endet in Exon 13 (TAG). Er hat eine Länge von 1557 bp mit bzw. 1347 bp ohne Exon 5 und kodiert somit für Proteine von 518 bzw. 448 Aminosäuren.



**Abb.9:** Genomische Struktur des humanen *SCAPININ*-Locus. Alternativ gespleißte Exons sind als weiße Boxen dargestellt und der ORF ist durch ein Start- bzw. Stop-Codon angezeigt. Die nicht maßstabsgetreu dargestellten Exons sind teilweise nummeriert.

### 3.1.2. Gewebespezifische Expression von *SCAPININ*

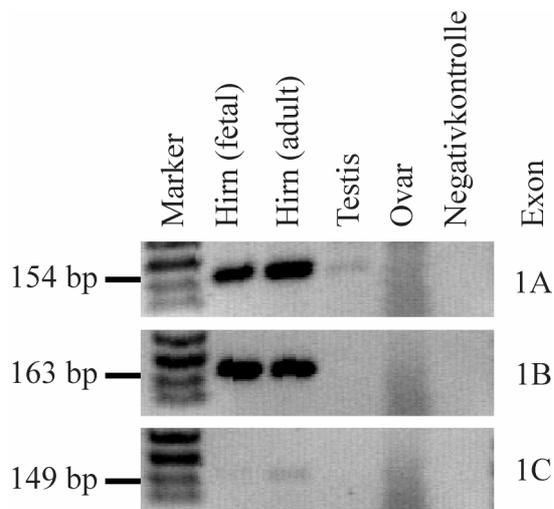
Die bereits vorliegenden Ergebnisse zur Expression des humanen *SCAPININ*-Gens zeigten zwei spezifische Signale von 3,0 kb und 2,7 kb im Hirn (WORCH 2000) (Abbildung 10A). In der hier vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung einer DNA-Sonde, die spezifisch für den 3'-Bereich des Gens war und mit Hilfe eines weiteren Northern Blots auch in Ovar ein 2,7 kb großes Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 10B).



**Abb.10:** Gewebespezifische Northern Blot-Analyse des humanen *SCAPININ*-Gens. Abbildung (A) zeigt das bereits bekannte, hirnspezifische Expressionsmuster nach der Hybridisierung eines Filters mit acht verschiedenen humanen Geweben. In Abbildung (B) ist ein spezifisches Signal von 2,7 kb in Ovar dargestellt.

Da mittels Northern Blot in Testis keine *SCAPININ*-Transkripte nachgewiesen werden konnten, sollten diese Ergebnisse durch RT-PCR Analysen mit RNA aus fetalem und adultem Hirn sowie Testis und Ovar verifiziert werden. Dabei kamen Primer zum Einsatz, die jeweils spezifisch für eines der Startexons (P40, P41, P42 & P43) und für Exon 2 (P44) waren. Wie Abbildung 11 zeigt, wurde unter den gegebenen Versuchsbedingungen, die keinen quantitativen Ansatz darstellten, die Expression der Exons 1A, 1B und 1C in beiden Entwicklungsstadien des Hirns mit spezifischen Produkten von 154 bp, 163 bp bzw. 149 bp belegt. Für Testis konnte eine Expression von 1A-spezifischen Transkripten gezeigt werden, wohingegen in Ovar keine Expression der *SCAPININ*-Startexons nachgewiesen werden konnte. Dabei muss aber in Betracht gezogen werden, dass die verwendete Ovar-RNA nur von einer einzelnen Person stammt und die Genexpression in Abhängigkeit von Alter oder Physiologie schwanken kann. Wie bereits bei der Analyse möglicher Spleißvarianten des

5'-Bereiches (vgl. 3.1.1.2.) konnten auch bei den hier untersuchten Geweben keine Exon 1D-spezifischen Produkte amplifiziert werden (Abbildung nicht gezeigt).



**Abb.11:** Gewebespezifische RT-PCR-Analyse der einzelnen Startexons von *SCAPININ*. Für Exon 1A wurden Produkte in beiden Entwicklungsstadien des Hirns sowie in Testis amplifiziert, wohingegen das Exon 1B-spezifische Amplifikat nur in den Hirnproben nachweisbar war. Exon 1C war ebenfalls nur im Hirn detektierbar und für Exon 1D konnte keine Expression nachgewiesen werden. Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template. Marker: pUC-Mix Marker 8.

Gewebe Exon	fet. Hirn	ad. Hirn	Testis	Ovar
1A	×	×	×	o
1B	×	×	o	o
1C	×	×	o	o
1D	o	o	o	o

**Tab.6:** Tabellarische Zusammenfassung der gewebespezifischen RT-PCR-Analyse der einzelnen Startexons von *SCAPININ*. ×: Expression nachgewiesen, o: keine Expression nachweisbar.

### 3.2. Analyse des *Scapinin*-Locus der Maus

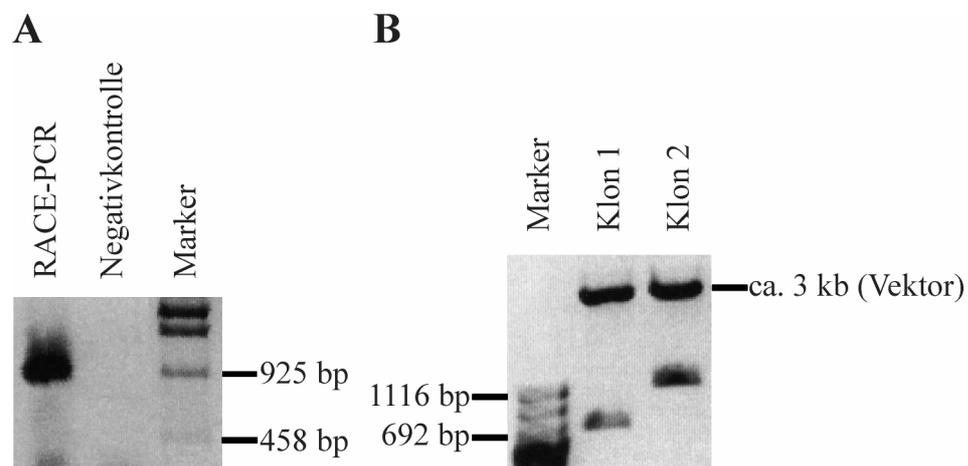
#### 3.2.1. Genomische Struktur des *Scapinin*-Locus

Ausgehend von den Sequenzdaten der in vorangegangenen Untersuchungen (WORCH 2000) isolierten Maus-cDNA-Klone IMAGp998D171141 und IMAGp998M174100 und unter Verwendung der in EST-Datenbanken abgelegten Sequenzabschnitte sollte die Sequenz des *Scapinin*-Gens der Maus vervollständigt werden. Da die beiden cDNA-Klone nur etwa 0,5 kb Sequenzinformation des 3'-Bereiches enthielten, wurden RACE-PCR Experimente durchgeführt, für die verschiedene Quellen zur Verfügung standen.

### 3.2.1.1. Ergebnisse der RACE-Analysen

#### RACE in *GeneFinder*-cDNA-Pools

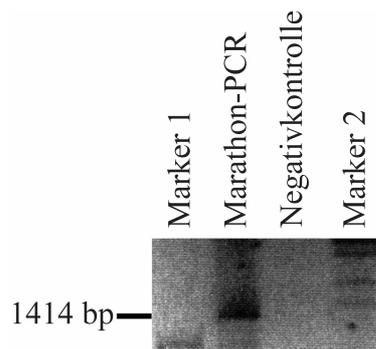
Die *GeneFinder*-cDNA Bank des RZPD setzt sich aus insgesamt ca. 1,25 Mio Klonen zusammen, die auf 280 gewebe- und entwicklungsspezifische Pools verteilt sind. Mit Hilfe von vektorspezifischen Primern, in Kombination mit spezifischen Primern für das entsprechende Zielgen, lassen sich die 5'- bzw. 3'-Enden der in der cDNA-Bank enthaltenen Klone amplifizieren. Für die ersten RACE-Experimente wurde die *GeneFinder*-cDNA Bank zunächst auf das Vorhandensein von *Scapinin*-spezifischen Klonen getestet und als positiv identifizierte *Pools* anschließend als Template für die eigentliche RACE-PCR eingesetzt. Mit Hilfe eines vektorspezifischen (P1) und eines genspezifischen Primers (P2) konnten auf diese Weise zwei 3'-spezifische Fragmente von ca. 900 bp und 400 bp Länge amplifiziert werden (Abbildung 12A). Nachdem sie subkloniert und sequenziert waren, stellte sich das kleinere Fragment als Teilsequenz des ca. 900 bp großen PCR-Produktes heraus, welches 419 bp länger ist. Auch eine zusätzliche Restriktionsanalyse der erhaltenen Subklone zeigt diesen Größenunterschied der Inserts (Abbildung 12B). Da beide Fragmente ein Polyadenylierungssignal enthalten (Anlage 18) war dies ein erster Hinweis auf mögliche Varianten der 3'-UTR des *Scapinin*-Gens der Maus.



**Abb.12:** Ergebnis der 3'-RACE-PCR in *GeneFinder* cDNA-Pools für das *Scapinin*-Gen der Maus. Abbildung (A) zeigt das Ergebnis der 3'-RACE-PCR, die zwei Fragmente lieferte, welche subkloniert wurden. In (B) ist die Restriktionsanalyse zweier dieser Subklone dargestellt, deren Insertgrößen um 419 bp variieren, da der 3'-Bereich des *Scapinin*-Gens der Maus aufgrund einer alternativen Polyadenylierungsstelle zwei unterschiedliche Größen aufweisen kann. Das höhere Molekulargewicht der Restriktionsfragmente im Vergleich zu den subklonierten PCR-Produkten ist auf verbliebene Vektor-DNA zurückzuführen. Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template. Marker in (A):  $\lambda$ Eco 130 I. Marker in (B): pUC-Mix Marker 8.

### RACE in der *Marathon-Ready*<sup>TM</sup> cDNA-library

Da unter Verwendung der *GeneFinder*-cDNA-Pools bis zu diesem Zeitpunkt keine weiteren Sequenzinformationen aus dem 5'-Bereich des *Scapinin*-Gens vorlagen, wurde wie unter 2.2.7.2. beschrieben die *Marathon-Ready*<sup>TM</sup> cDNA-library analysiert. Dieses RACE-Template basiert auf mit einem Oligo(dT)-Primer unter optimierten Bedingungen revers transkribierter RNA aus 11 Tage alten Mausembryonen. Anschließend wurde sowohl an das 5'- als auch an das 3'-Ende der Einzelstrang-cDNA ein Adapter ligiert, für den ein geschachteltes Primerpaar zur Verfügung steht, das in Verbindung mit genspezifischen Primern die Amplifikation der cDNA-Enden ermöglicht. Nach zwei PCRs mit den Primern P3 & P4 bzw. P3 & P5 konnte das in Abbildung 13 gezeigte Produkt isoliert und sequenziert werden. Dieses Fragment hatte eine Länge von 1414 bp, so dass die Gesamtlänge der cDNA zu diesem Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des variablen 3'-Bereiches 2091 bp bzw. 2510 bp betrug.

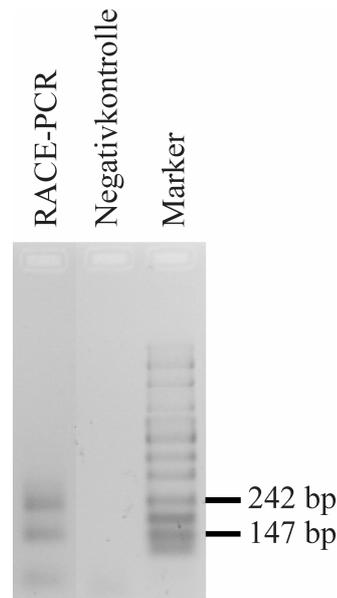


**Abb.13:** Ergebnis der RACE in der *Marathon-Ready*<sup>TM</sup> cDNA-library. Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template. Marker 1: pUC-Mix Marker 8. Marker 2:  $\lambda$ Eco 130 I.

### RACE mit selbst generiertem Template

In einem folgenden Ansatz wurden weitere 5'-RACE-Analysen mit einem selbst generierten Template durchgeführt, was u. a. die Möglichkeit eröffnet, die RACE-Experimente bereits durch Verwendung eines genspezifischen Primers bei der Reversen Transkription auf ein spezielles Zielgen abzustimmen. Um ganz spezifisch 5'-Enden des Maus-*Scapinin*-Gens darzustellen, wurde ausgehend von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Hirn zunächst in einer RT-Reaktion mit einem in Exon 2 gelegenen Primer (P6) eine Einzelstrang cDNA generiert, an deren 5'-Ende anschließend, wie unter 2.2.7.2. beschrieben, ein Anker-Oligonukleotid (*Anchor*, P7) ligiert wurde. In zwei aufeinander folgenden PCRs mit geschachtelten Primern spezifisch für den *Anchor* (P8 & P9) bzw. Exon 2 (P6 & P10), konnten mehrere spezifische Fragmente

amplifiziert und anschließend sequenziert werden. In Abbildung 14 ist exemplarisch das Ergebnis einer solchen RACE-PCR mit den Primern P9 und P10 dargestellt. Bei einem Abgleich der so erhaltenen Sequenzen mit verschiedenen Datenbanken zeigte sich, dass von den vier bereits bekannten Startexons die Exons 1A, 1C und 1D durch die neu generierten Sequenzinformationen um 8 bp, 31 bp bzw. 32 bp in 5'-Richtung verlängert werden konnten.



**Abb.14:** Darstellung eines Ergebnisses der 5'-RACE-PCR mit selbst generiertem Template. Nach zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen mit geschachtelten Primern wurden zwei distinkte Fragmente von ca. 150 bp und ca. 250 bp erhalten, die anschließend subkloniert und sequenziert wurden. Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template. Marker: pUC-Mix Marker 8.

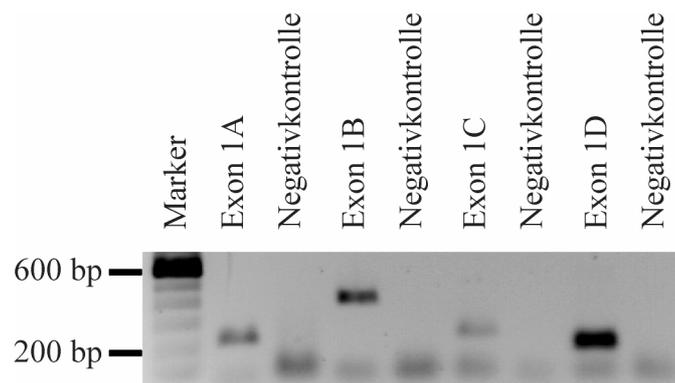
Die zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Daten zu den insgesamt vier Startexons sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Aufgeführt ist neben der jeweiligen Länge die Lage der in Ihnen enthaltenen *upstream* AUGs, von denen einige, wie beim Menschen, im gleichen Leserahmen liegen wie der putative Translationsstart in Exon 2. Die Sequenzen zum *Scapinin*-Gen der Maus sind im Anhang (Anlagen 10 bis 15) ebenso abgebildet wie eine Grafik mit der Lage der uAUGs in den Startexons (Anlage 18).

**Tab.6:** Übersicht über die Größe der Startexons des *Scapinin*-Gens der Maus und die in ihnen enthaltenen ATGs. Die Sequenzen sind in öffentlichen Datenbanken unter den aufgeführten *accession*-Nummern (Acc.-Nr.) abgelegt. Die Position der ATGs ist bezogen auf den Translationsstart in Exon 2 angegeben, mit dem sie *in frame* sind, wenn sie mit einem \* markiert sind.

Exon	Acc.-Nr.	Größe (bp)	ATGs
1A	AJ632220	125	-108* -5
1B	XM_130742	599	-592 -373 -325 -170 -120* -5
1C	AJ632221	163	-148 -123* -105* -81* -5
1D	AJ632222	110	-49 -10 -5

### 3.2.1.2. Weiterführende Analyse der Startexons

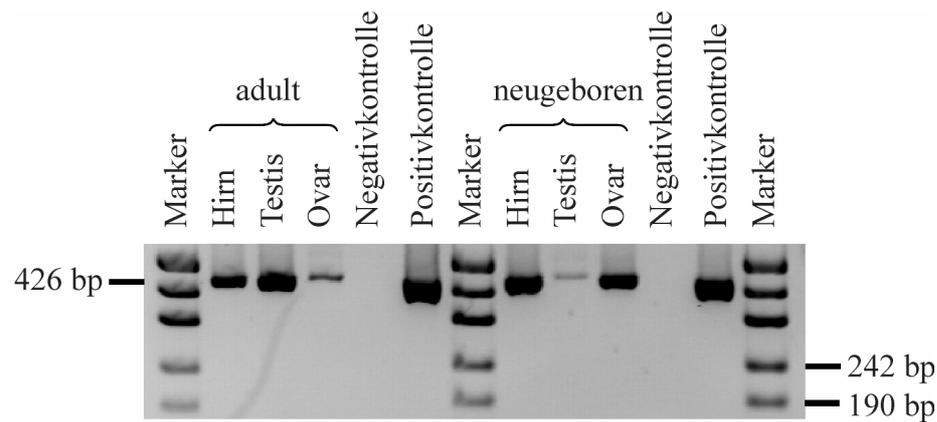
Analog zur Vorgehensweise beim Menschen (vgl. 3.1.1.2.) sollte geklärt werden, ob es sich tatsächlich um vier verschiedene Startexons handelt oder ob es Transkripte gibt, die Kombinationen von zwei oder mehr dieser Exons aufweisen. Dazu wurden RT-PCR Experimente mit RNA aus Hirn durchgeführt, wobei ein Exon 2 spezifischer Primer (P10) in verschiedenen Reaktionen jeweils mit startexonspezifischen Primern eingesetzt (P11, P13, P16 & P19) wurde. Abbildung 15 zeigt die erhaltenen Fragmente, von denen keines mehr als ein Startexon enthielt, was durch Sequenzierung dieser Produkte verifiziert werden konnte. Somit handelt es sich bei diesen Startexons, entsprechend der Ergebnisse beim Menschen, um vier verschiedene Transkriptionsstartpunkte, die sich gegenseitig ausschließen.



**Abb.15:** RT-PCR-Analyse des 5'-Bereiches von *Scapinin*. Die RT-PCR mit startexonspezifischen Primern und einem Primer in Exon 2 lieferte jeweils die erwarteten Produkte für sich gegenseitig ausschließende Startexons. Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template. Die Signale in den Negativkontrollen sind aufgrund ihrer Molekulargewichte vermutlich auf Primer-Dimere zurückzuführen. Marker: 100 bp *ladder*.

### 3.2.1.3. Untersuchungen zum alternativen Spleißen von Exon 5

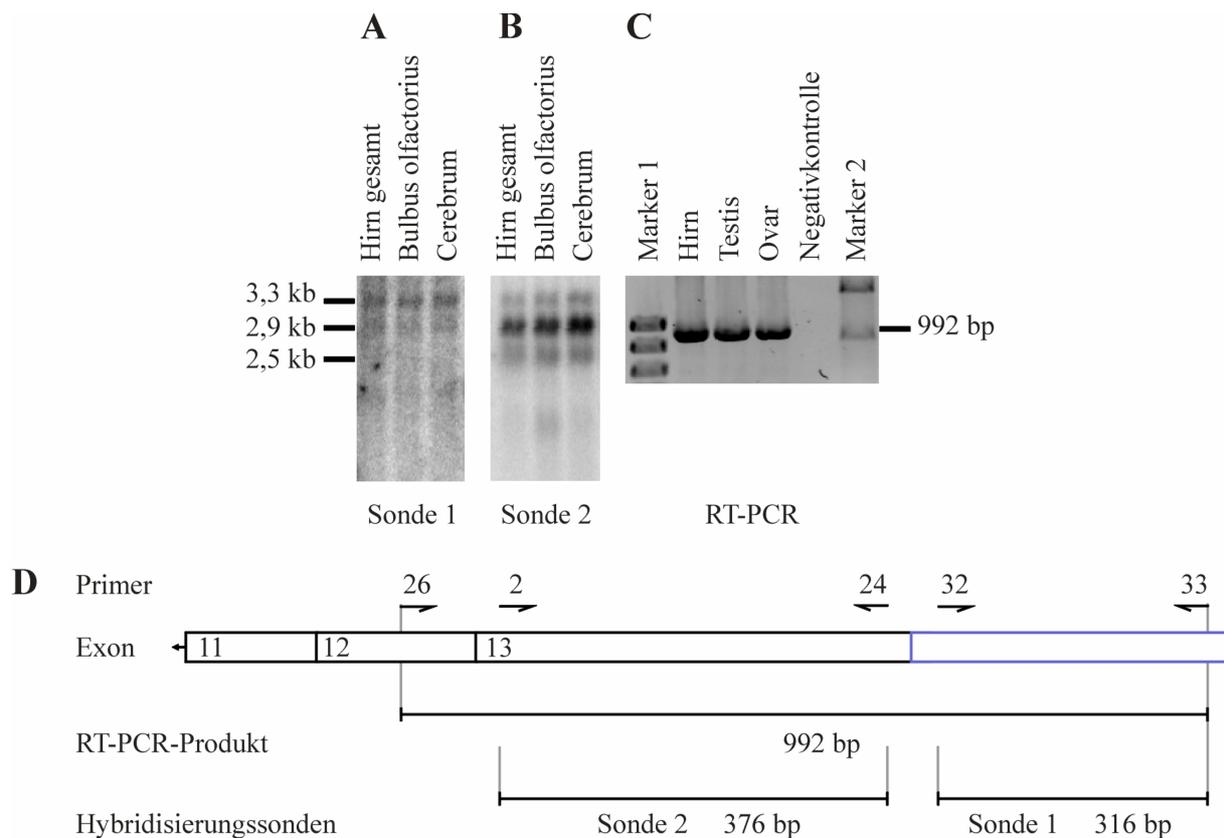
Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen von SAGARA *et al.* (2003) konnte ein alternatives Spleißen von Exon 5 beim Menschen, wie unter 3.1.1.3. beschrieben, verifiziert werden. Zur Überprüfung eines alternativen Spleißens von Exon 5 bei der Maus wurden nun mehrere RT-PCR-Experimente mit Exon 5 flankierenden Primern (P22 & P23) durchgeführt. Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde bei diesen Analysen in drei verschiedenen Geweben (Hirn, Testis und Ovar) zu zwei unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (neugeboren und adult) nur ein einzelnes Produkt von 426 bp erhalten, was der erwarteten Größe eines Exon 5 enthaltenden Amplifikates entspricht. Da kein zweites, kleineres Produkt von 216 bp generiert wurde, kann das alternative Spleißen von Exon 5 im Maus-*Scapinin*-Gen in diesen Geweben ausgeschlossen werden.



**Abb.16:** Analyse des alternativen Spleißens von Exon 5 beim *Scapinin*-Gen der Maus. Die RT-PCR mit Exon 5 überspannenden Primern wurde bei zwei unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Maus, adult (links) und neugeboren (rechts), durchgeführt. Die Analyse lieferte nur ein Produkt von 426 bp, das Exon 5 enthielt. Neben einer Negativkontrolle (ohne Template) wurde als Positivkontrolle ein cDNA-Klon mitgeführt, der ein *Scapinin*-PCR-Produkt mit Exon 5 enthielt. Marker: pUC-Mix Marker 8.

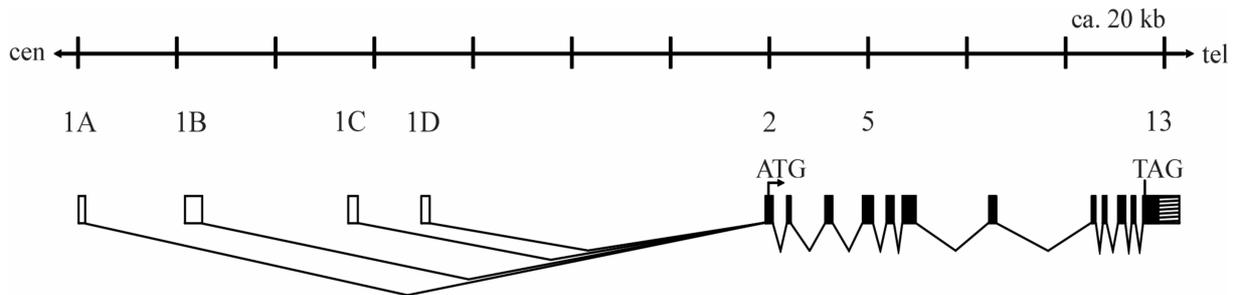
#### 3.2.1.4. Untersuchungen zur alternativen Polyadenylierung

Um die in den RACE-PCR-Experimenten erhaltenen Ergebnisse bezüglich einer alternativen Polyadenylierung (siehe 3.2.1.1.) zu verifizieren und detaillierter zu untersuchen, wurden weitere Analysen durchgeführt. Zunächst wurden hirnspezifische Northern Blots, die im weiteren Verlauf noch ausführlicher besprochen werden, mit einem PCR-Fragment hybridisiert, das spezifisch für den längeren 3'-Bereich des *Scapinin*-Gens der Maus war („Sonde 1“, generiert mit den Primern P32 & P33 in Abbildung 17D). Die so erhaltenen Ergebnisse wurden mit Hybridisierungen verglichen, für die eine „Sonde 2“ aus der 3'-UTR verwendet wurde, die alle *Scapinin*-Transkripte detektiert (Primer P2 & P24). Wie in Abbildung 17A an hirnspezifischen Geweben dargestellt, ist der längere 3'-Bereich nur in den 3,3 kb und 2,9 kb Transkripten vorhanden. Das 2,5 kb Fragment kann mit dieser „Sonde 1“, im Gegensatz zu Abbildung 17B („Sonde 2“), nicht nachgewiesen werden. Durch eine weiterführende RT-PCR-Analyse wurde die Transkription des längeren 3'-Bereiches bestätigt. Mit den Exon überspannenden Primern P26 & P33 (Abbildung 17D) wurde in drei adulten Geweben (Hirn, Testis und Ovar) das in Abbildung 17C gezeigte 992 bp Produkt amplifiziert.



**Abb.17:** Analyse des 3'-Bereiches des *Scapinin*-Gens der Maus. In Abbildung (A) sind als Ergebnis der Hybridisierung mit „Sonde 1“ nur zwei Transkripte von 3,3 kb und 2,9 kb zu sehen. Die Hybridisierung mit „Sonde 2“ erbrachte zusätzlich zu diesen beiden Fragmenten eine weitere 2,5 kb große Bande (B), woraus sich eine alternative Polyadenylierung ableiten lässt. Das in (C) abgebildete RT-PCR-Produkt zeigt in Hirn, Testis und Ovar die Expression des längeren 3'-Bereiches. Die Grafik (D) gibt einen Überblick über die Lokalisation der Primer sowie die verwendeten Sonden. Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Template. Marker 1: pUC-Mix Marker 8. Marker 2:  $\lambda$ Eco 130 I.

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Daten ergibt sich die in Abbildung 18 dargestellte genomische Struktur für das *Scapinin*-Gen der Maus. Es erstreckt sich über ca. 220 kb und besitzt mit 16 Exons eines weniger als der Mensch, was auf das Fehlen von Exon 1B2 zurückzuführen ist. Keines der durchgeführten RT-PCR-Experimente erbrachte Hinweise auf ein vergleichbares Exon bei der Maus und auch eine BLAST-Suche mit der Sequenz des humanen Exons 1B2 im Mausgenom erbrachte keinerlei Homologien, so dass es sich um ein nicht konserviertes Exon zu handeln scheint. Weitere Unterschiede in der Struktur des *Scapinin*-Locus der Maus zum Menschen sind zum einen das Fehlen eines alternativ gespleißten Exons 5 und ausschließlich bei der Maus zu findende, alternativ polyadenylierte Transkripte (schraffierter Bereich in Exon 13). Die Größe des offenen Leserahmens hingegen ist mit 1557 bp konserviert und das längste darstellbare *Scapinin*-Transkript besteht aus 3131 bp.



**Abb.18:** Genomische Struktur des *Scapinin*-Locus der Maus. Alternativ gespleißte Exons sind als weiße Boxen dargestellt und der alternativ polyadenylierte 3'-Bereich ist schraffiert. Der ORF ist durch ein Start- bzw. Stop-Codon angezeigt, die einzelnen Exons sind teilweise nummeriert.

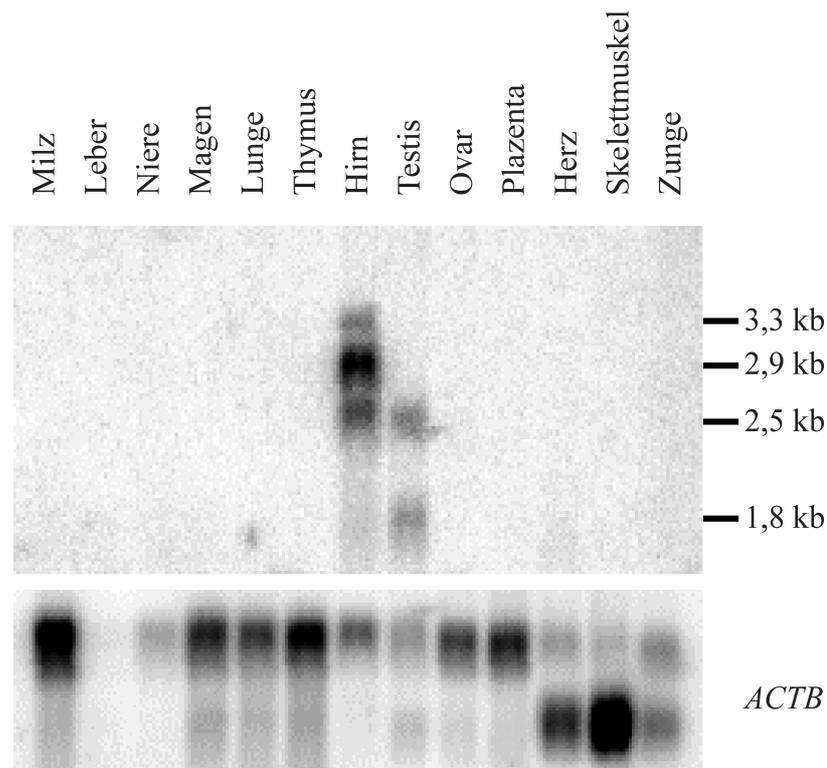
### 3.2.2. Gewebe- und entwicklungsspezifische Expression von *Scapinin*

Analog zur Analyse des Expressionsmusters des humanen *SCAPININ*-Gens sollten auch bei der Maus mittels Northern Blot Hybridisierungen die Transkriptgrößen bestimmt und deren gewebespezifische Verteilung untersucht werden. Darüber hinaus bot die Verfügbarkeit von verschiedenen Entwicklungsstufen der Maus für die RNA-Präparation die Möglichkeit, die Genexpression von der frühen Embryonalentwicklung bis zum adulten Stadium zu dokumentieren. Durch RT-PCR Experimente sollten die erhaltenen Ergebnisse verifiziert und wenn möglich spezifische Daten für die verschiedenen Transkriptvarianten generiert werden. Die für diese Analysen benötigten RNAs wurden aus gepoolten Geweben von NMRI-Mäusen isoliert.

#### 3.2.2.1. Gewebespezifische Expression

Im Rahmen der Expressionsanalyse des *Scapinin*-Gens der Maus wurden zunächst Northern Blot Hybridisierungen durchgeführt, um die Größe der einzelnen Transkripte sowie deren gewebespezifische Verteilung zu untersuchen. Hierfür wurden Filter angefertigt, die RNA aus 13 adulten Geweben repräsentierten. Für die Hybridisierung wurde eine *Scapinin*-spezifische Sonde mittels PCR und Primern aus der 3'-UTR generiert (P2 & P24, Abbildung 17D), um möglichst alle Transkripte detektieren zu können. Wie in Abbildung 19 gezeigt, sind nur in zwei der 13 Gewebe (Hirn und Testis) Transkripte nachweisbar. Insgesamt konnten mit der hier verwendeten Sonde drei Transkripte von 3,3 kb, 2,9 kb und 2,5 kb im Hirn nachgewiesen werden. Des Weiteren ist das 2,5 kb Fragment auch schwach in Testis zu detektieren und es existiert in beiden Geweben ein schwaches Signal von ca. 1,8 kb Größe. Allerdings gibt es bisher keinen Datenbankeintrag in Form einer cDNA oder eines EST, der einen Hinweis auf die Struktur eines solchen Transkriptes gibt. Auch eigene Versuche, dieses Transkript mittels RT-PCR unter Verwendung verschiedenster Primerkombinationen darzustellen, führten zu

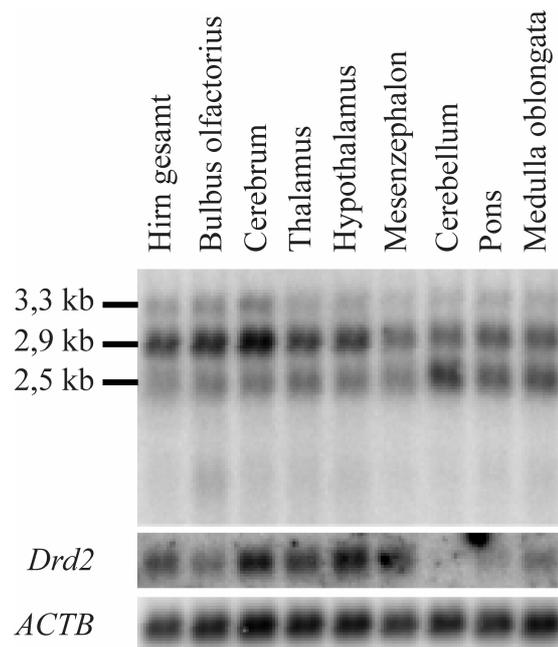
keinem Ergebnis. Bis auf Weiteres wird daher von einer unspezifischen Kreuzhybridisierung ausgegangen. In weiterführenden Untersuchungen mit Hilfe der RT-PCR wurden sowohl die Ergebnisse der Northern Blot-Hybridisierungen überprüft, als auch ein möglicherweise gewebespezifisches Spleißen von Exon 5 analysiert. Wie bereits in Abbildung 16 dargestellt, konnte die Expression in Hirn und Testis bestätigt und darüber hinaus auch im Ovar detektiert werden. Somit wird das *Scapinin*-Gen der Maus, ebenso wie das des Menschen, hauptsächlich im Hirn exprimiert, es können aber auch Transkripte in den Gonaden nachgewiesen werden.



**Abb.19:** Gewebespezifische Northern Blot-Analyse des *Scapinin*-Gens. Die Hybridisierung des Filters, der 13 adulte Gewebe der Maus repräsentiert, erbrachte spezifische Signale von 3,3 kb, 2,9 kb und 2,5 kb in Hirn sowie von 2,5 kb in Testis. Dem Signal bei 1,8 kb konnte bisher keine Struktur zugeordnet werden. Im unteren Bereich ist das Ergebnis einer Kontrollhybridisierung mit  $\beta$ -Actin dargestellt, das zeigt, dass die Leber-RNA allem Anschein nach nicht intakt war.

Um die Verteilung der Maus-*Scapinin*-Transkripte in spezifischen Regionen des Hirns zu untersuchen, wurden Northern Blots mit RNA aus acht verschiedenen adulten Hirnregionen angefertigt und mit der 3'-UTR spezifischen „Sonde 2“ hybridisiert. Dieser Versuch wurde insgesamt dreimal mit verschiedenen Filtern durchgeführt, jedes Mal zeigte sich die in Abbildung 20 dargestellte typische Verteilung der verschiedenen *Scapinin*-Transkripte bezogen auf die einzelnen Gewebe. Das 2,9 kb Transkript ist die am stärksten exprimierte Form in Bulbus olfactorius, Cerebrum, Thalamus, Hypothalamus and Mesenzephalon. In

Cerebellum, Pons and Medulla ergibt das 2,5 kb Produkt das stärkste Signal, wohingegen die 3,3 kb mRNA in allen Hirnregionen am schwächsten transkribiert wird. Neben einer Kontrollhybridisierung mit  $\beta$ -Actin (*ACTB*) zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde eine zweite Kontrollhybridisierung mit einer für den *Dopamin Rezeptor D2* (*Drd 2*) der Maus spezifischen Sonde durchgeführt. Dieses ebenfalls regionenspezifisch im Hirn exprimierte Gen zeigt in Abbildung 20 sehr deutlich eine distinkte Verteilung der Transkripte und kann somit die erfolgreiche Anreicherung der verschiedenen Hirngewebe bestätigen.

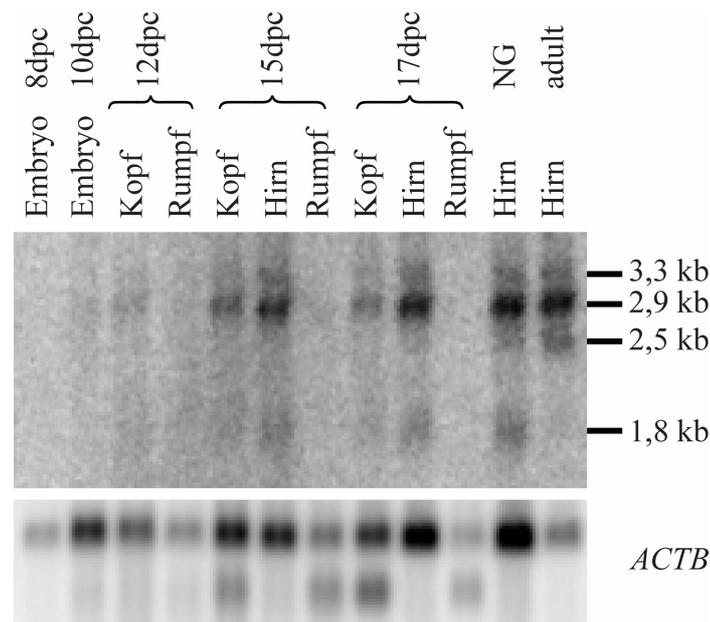


**Abb.20:** Expression von *Scapinin* in 8 verschiedenen Regionen des Hirns der Maus. Die Hybridisierung dieses Filters, der polyA<sup>+</sup>-RNA aus acht verschiedenen Hirnregionen und Gesamthirn enthielt, erbrachte eine distinkte Verteilung der *Scapinin*-Transkripte, bezogen auf das untersuchte Gewebe. Im unteren Bereich sind die Kontrollhybridisierungen mit *Drd2*- und  $\beta$ -Actin-Sonden abgebildet.

### 3.2.2.2. Entwicklungsspezifische Expression

Im Anschluss an die Analyse der gewebespezifischen Verteilung der *Scapinin*-Transkripte sollte eine möglicherweise zeitliche Kontrolle der *Scapinin*-Expression während der Entwicklung der Maus untersucht werden. Für diese Experimente wurden poly(A)<sup>+</sup>-RNAs aus sieben verschiedenen Entwicklungsstufen der Maus isoliert und ein Northern Blot angefertigt. Die Embryonen im Alter von 8 und 10 Tagen post coitum (pc) wurden komplett zur RNA Isolierung eingesetzt. Vom 12. Tag pc an wurden bei der Präparation Kopf und Rumpf voneinander getrennt. Ab Tag 15 pc wurde bei einigen Tieren zusätzlich Hirn-RNA isoliert, bei Neugeborenen (NG, max. 24 h alt) sowie adulten Tieren wurde hingegen ausschließlich

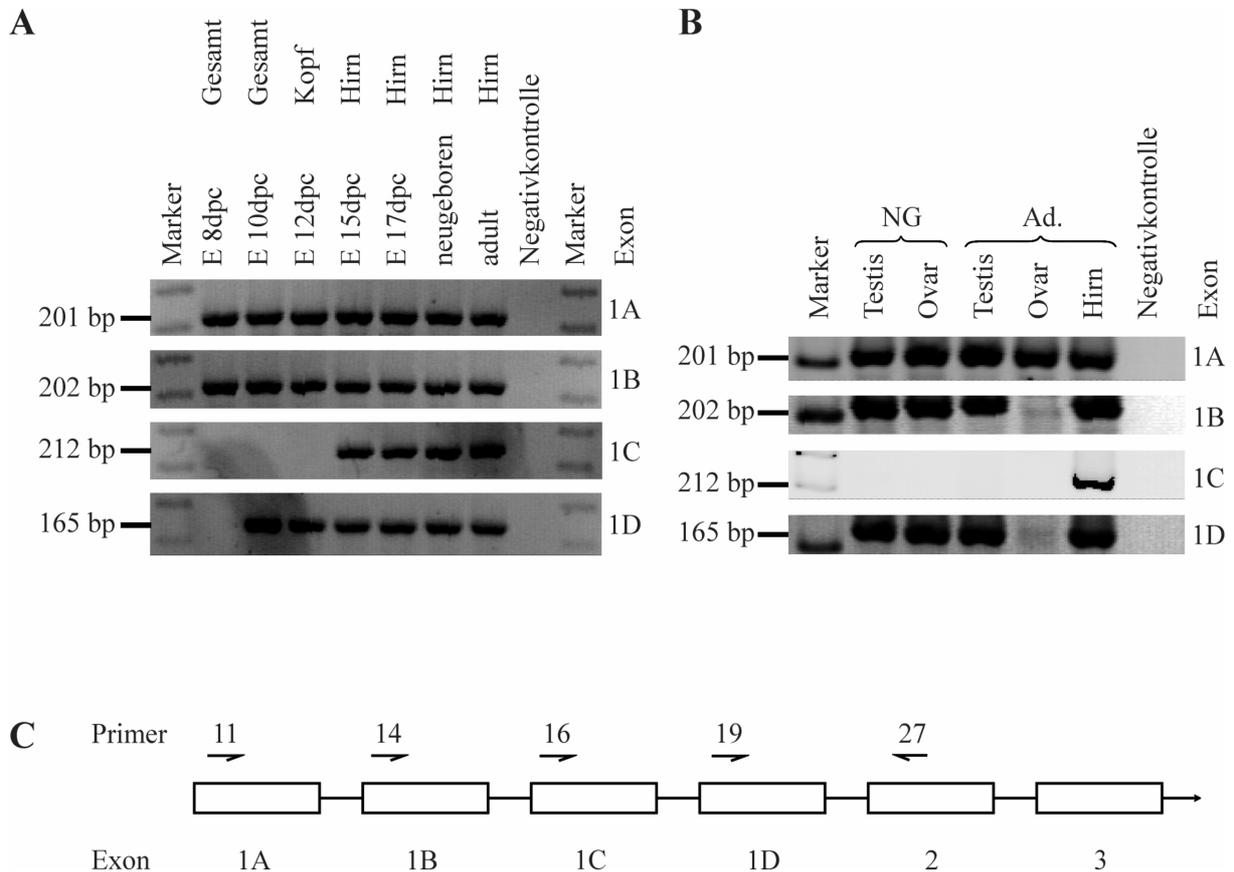
Hirn-RNA untersucht. Dieser Northern Blot wurde ebenfalls mit „Sonde 2“ aus der gemeinsamen 3'-UTR hybridisiert (vgl. 3.2.1.4.). In Abbildung 21 ist gezeigt, dass die Expression des 2,9 kb Transkriptes von *Scapinin* bei der Maus ab dem 10. Tag pc schwach und ab dem 15. Tag pc deutlich nachweisbar war. Ab Tag 15 pc konnte zusätzlich das 3,3 kb Signal detektiert werden. Die Transkription des 2,5 kb Produktes hingegen ist in keinem der Embryonalstadien nachweisbar und wird erst perinatal detektierbar. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde auch dieser Blot mit einer  $\beta$ -Actin Sonde hybridisiert.



**Abb.21:** Entwicklungsspezifische Northern Blot-Analyse. Ab Tag 10 pc kann schwach die Expression des 2,9 kb und ab Tag 15 pc des 3,3 kb Transkriptes nachgewiesen werden, wogegen das 2,5 kb Produkt erst perinatal detektierbar wird. Die Kontrollhybridisierung mit  $\beta$ -Actin ist darunter abgebildet.

Diese Ergebnisse zur entwicklungsspezifischen Expression des Maus *Scapinin*-Gens wurden analog zur gewebespezifischen Expression mittels RT-PCR analysiert und überprüft. Durch RT-PCR-Experimente mit den Exon überspannenden Primern P11, P14, P16 & P19 für die Startexons sowie P27 für Exon 2 (Abbildung 22C) wurde für jedes der Startexons der Zeitpunkt der hirsnspezifischen Expression untersucht (Abbildung 22A). Da für die frühen Embryonalphasen keine hirsnspezifische RNA zur Verfügung stand wurde RNA aus gesamten Embryonen (8 dpc & 10 dpc) bzw. aus dem Kopf (12 dpc) verwendet. Für die Exons 1A und 1B konnte auf diese Weise eine mit Tag 8 pc bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung der Maus einsetzende Expression durchgehend bis zum adulten Stadium nachgewiesen werden. Exon 1C-Transkripte hingegen treten erst ab dem 15. Tag pc auf und Exon 1D

spezifische RT-PCR-Fragmente wurden ab Tag 10 pc erhalten. Somit könnten sie mit den im Northern Blot ebenfalls erst relativ spät in der Entwicklung detektierbaren Transkripten von 2,5 kb bzw. 3,3 kb korrelieren (Abbildung 21). Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Startexons zu bestimmten Transkriptgrößen ist anhand dieser Daten allerdings nicht möglich.



**Abb.22:** Entwicklungsspezifische RT-PCR-Analyse des *Scapinin*-Gens der Maus. In Abbildung (A) ist das Ergebnis der hirnspezifischen Expressionsanalyse gezeigt. Die Expression der unterschiedlichen, Startexon-spezifischen Transkripte beginnt zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten und bleibt bis zum adulten Stadium nachweisbar. Bei der Analyse der Gonaden (B) zeigte sich, dass 1A-spezifische Transkripte in allen, 1C-spezifische in keinem Entwicklungsstadium amplifiziert werden konnten. Darüber hinaus nimmt die Expression von 1B und 1D im Ovar zum adulten Stadium hin ab, während sie für Testis gleich bleibt. In Abbildung (C) ist die Lokalisation der für diese Untersuchungen verwendeten Primer dargestellt.

Die Analyse der entwicklungspezifischen Genexpression des *Scapinin*-Gens der Maus wurde anschließend dahin gehend erweitert, dass die Gonaden von neugeborenen bzw. adulten Mäusen mittels RT-PCR untersucht wurden. Wie in Abbildung 22B dargestellt, sind Exon 1A enthaltende Transkripte in beiden Entwicklungsstufen von Testis und Ovar nachweisbar. Während das Exon 1B in den Gonaden von Neugeborenen ebenfalls gut darstellbar ist, wurde unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei adulten Tieren für Ovar, im Gegensatz zu

Testis, nur ein schwaches Signal erhalten. Die Transkription von Exon 1C hingegen ist in beiden Entwicklungsstadien der Gonaden nicht detektierbar. Möglicherweise sind fehlende 1C-Transkripte der Testes also für das unterschiedliche Signalmuster zwischen Hirn und Testes im Northern Blot verantwortlich (vgl. Abbildung 19). Die Ergebnisse der Analyse für Exon 1D sind ähnlich denen für 1B, es ist in den Gonaden von Neugeborenen und in Testis von Adulten deutlich nachweisbar, allerdings ist das Signal in adultem Ovar sehr schwach.

### 3.3. Analyse der allelspezifischen Expression des *Scapinin*-Gens in der Maus

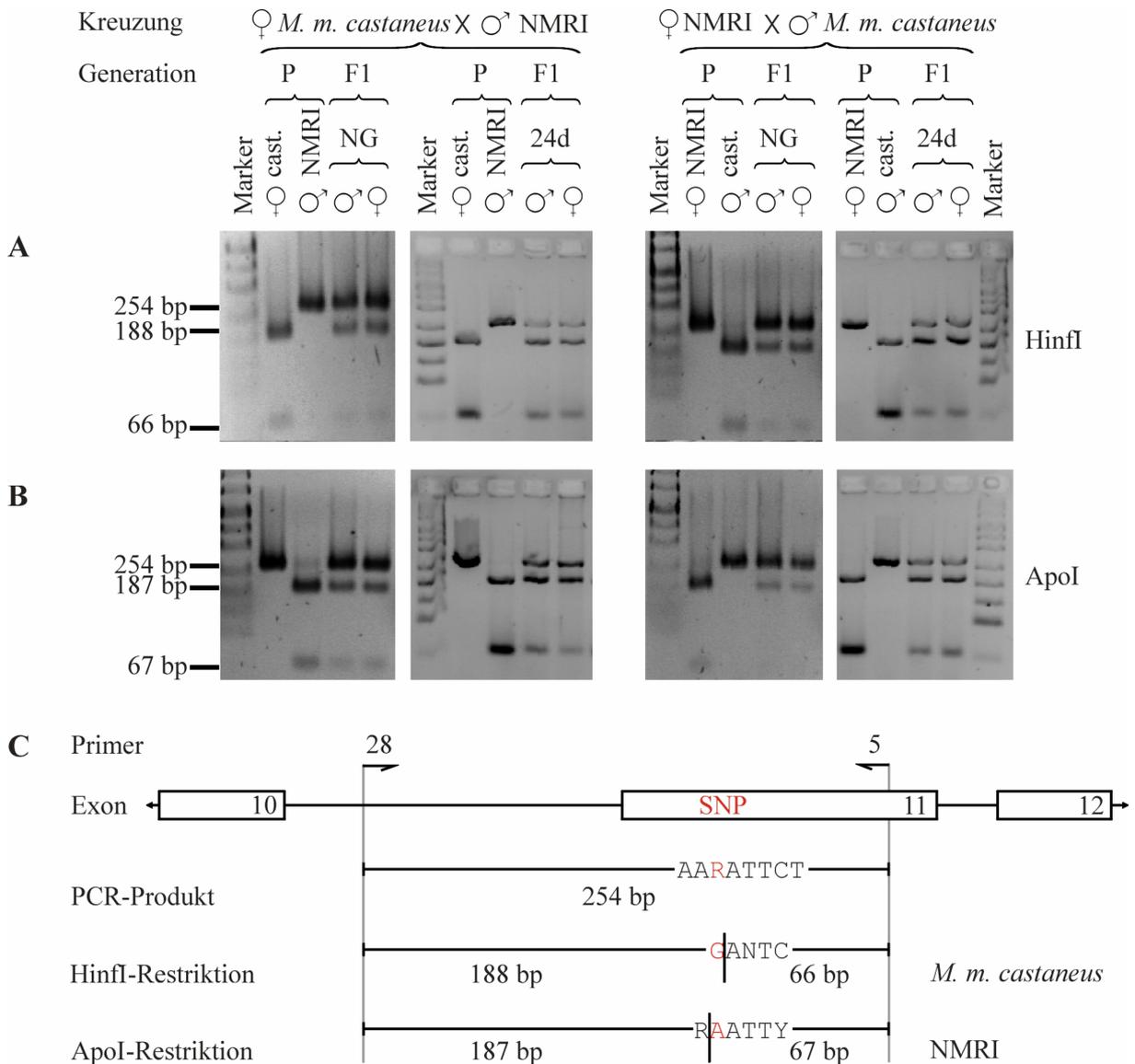
Grundvoraussetzung für die Analyse der allelspezifischen Expression ist die Unterscheidbarkeit der parental Allele. Dies gelingt am einfachsten, wenn im Bereich der reifen mRNA singuläre Nukleotidpolymorphismen (SNPs) lokalisiert sind. Durch die Kreuzung zweier Mauslinien, die für jeweils eine Variante des Polymorphismus homozygot sind, entstehen in der ersten Filialgeneration (F1) Heterozygote, deren Allele eindeutig den Eltern (P) zugeordnet werden können. Für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden Mäuse des NMRI-Stammes und *Mus musculus castaneus* reziprok gekreuzt und die F1 auf die Expression von polymorphen Loci, die aus der SNP-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)) ausgewählt wurden, untersucht. Diese SNPs befanden sich in den Startexons 1C und 1D sowie in Exon 11. Für die Exons 1A und 1B waren keine SNPs bekannt.

#### 3.3.1. Analyse des SNP rs27649398 in Exon 11

##### Analyse des Genotyps

Der innerhalb des ORFs liegende, synonyme SNP rs27649398 betrifft das 42. Nukleotid des Exons 11 und sollte somit nach bisherigem Kenntnisstand in allen *Scapinin*-Transkripten enthalten sein. Da sich die vier Startexons gegenseitig ausschließen und unter Berücksichtigung der alternativen Polyadenylierungsstelle ergibt sich eine maximale Anzahl von acht Transkripten. Für diesen SNP sind in der Datenbank zwei Zustandsformen beschrieben, und zwar entweder Adenin (NMRI) oder Guanin (*M. m. castaneus*). In beiden Fällen ist er durch ein Restriktionsenzym darstellbar. Handelt es sich um ein Guanin so spaltet HinfI, bei einem Adenin spaltet ApoI (Abbildung 23C). Sowohl die Elterntiere als auch die Nachkommen (n=8) wurden zunächst auf genomischer Ebene auf das Vorhandensein des Polymorphismus hin untersucht. Hierfür wurde mit Hilfe der in Abbildung 23C gezeigten Primer in Intron 10 (P28) und in Exon 11 (P5) ein 254 bp Produkt amplifiziert und mit jeweils einem der Restriktionsenzyme analysiert. Abbildung 23A zeigt die Ergebnisse der Restriktionsanalyse mit HinfI für die Kreuzung ♀ *M. m. castaneus* × ♂ NMRI (links) bzw. die reziproke Kreuzung (rechts). Die *M. m. castaneus*-Mäuse der Parentalgeneration (P) sind homozygot für ein Guanin an der polymorphen Stelle, da das 254 bp PCR-Produkt vollständig in ein 188 bp und ein 66 bp Fragment gespalten wurde. Die NMRI-Eltern sind ebenfalls homozygot, allerdings für Adenin, da das Amplifikat ungespalten bleibt und alle F1-Tiere, sowohl die Neugeborenen (NG) als auch die 24 Tage alten (24d), zeigen ein heterozygotes Restriktionsmuster mit drei Fragmenten. Analog dazu ist in Abbildung 23B das die erste

Analyse mit *HinfI* bestätigende Ergebnis der Restriktion mit *ApoI* gezeigt, bei der ein 187 bp und ein 67 bp Fragment entstehen.



**Abb.23:** Genomische Analyse des SNP rs27649398 in Exon 11. In **(A)** ist die *HinfI*-Restriktionsanalyse eines 254 bp-Amplifikates von genomischer DNA für die Kreuzung ♀ *M. m. castaneus* × ♂ NMRI (links) und die reziproke Kreuzung ♀ NMRI × ♂ *M. m. castaneus* (rechts) dargestellt. Die *M. m. castaneus*-Fragmente wurden vollständig in 188 bp und 66 bp Produkte gespalten, während die NMRI-Amplifikate ungespalten blieben. Die Nachkommen (F1), sowohl Neugeborene (NG) als auch 24 Tage alte (24d), zeigten ein heterozygoten RFLP-Muster. In **(B)** ist die analoge Analyse mit *ApoI* dargestellt. Marker: pUC-Mix Marker 8. Abbildung **(C)** zeigt die Lage des SNP am *Scapinin*-Locus und die Lokalisation der zur Amplifikation verwendeten Primer. Des Weiteren ist schematisch das analysierte PCR-Produkt mit einem Teil der Sequenz am rot hervorgehobenen polymorphen Nukleotid (R=A oder G) dargestellt. Darunter sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sowie die entstehenden Spaltungsprodukte abgebildet.

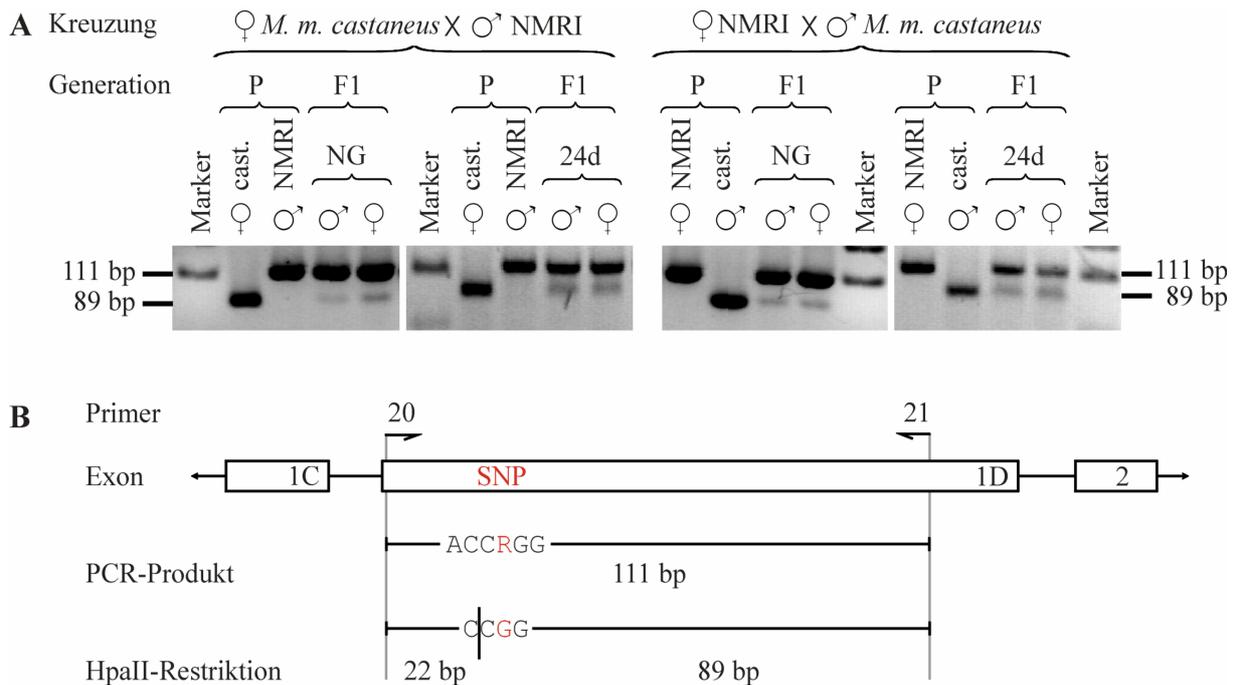


Das zu analysierende PCR-Produkt ist 170 bp lang und wurde ebenfalls mit *HinfI* und *ApoI* gespalten. Als Positivkontrollen wurden die RT-PCR-Produkte der Elterntiere mitgeführt. In Abbildung 24A ist die Analyse mit *HinfI* für die Kreuzung ♀ *M. m. castaneus* × ♂ NMRI (links) bzw. die reziproke Kreuzung (rechts) gezeigt. Aus ihr geht hervor, dass die Elterntiere entsprechend ihrem Genotyp homozygot sind und dass die Analyse der F1-Nachkommen (n=8) ein heterozygoten Restriktionsmuster ergibt, somit also beide parentalen Allele exprimiert werden. Da diese Ergebnisse durch die Restriktionsanalyse mit *ApoI* bestätigt wurden (Abbildung 24B), kann ausgeschlossen werden, dass der gesamte *Scapinin*-Locus einer Regulation unterliegt, die zu einer uniparentalen Genexpression führt.

### 3.3.2. Analyse des SNP rs27685005 in Exon 1D

#### Analyse des Genotyps

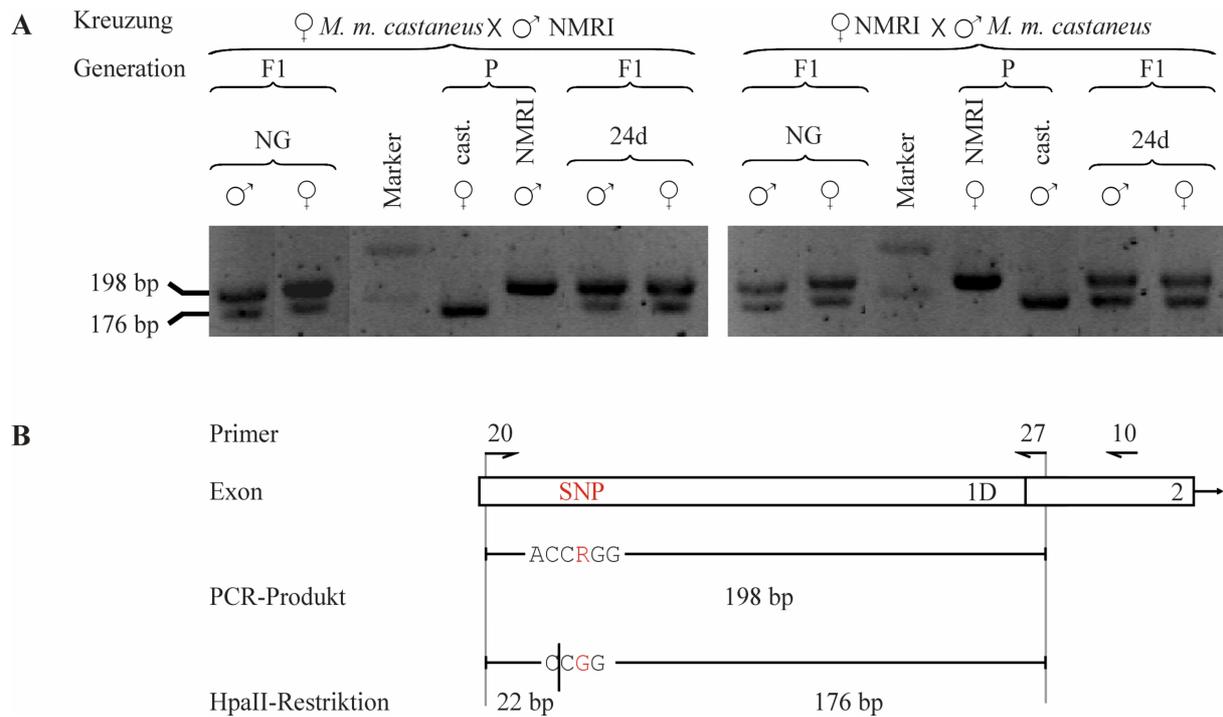
Als zweiter polymorpher Marker diente der SNP rs27685005 an Position 23 in Exon 1D, welcher entweder ein Adenin (NMRI) oder ein Guanin (*M. m. castaneus*) aufweist und somit für eine *HpaII*-Schnittstelle polymorph ist. Dieser RFLP wurde von genomischer DNA mit den in Abbildung 25B schematisch dargestellten, Exon 1D-spezifischen Primern (P20 & P21) als 111 bp Fragment amplifiziert. Die Auswertung der Restriktion mit *HpaII* ergab, dass die Elterntiere jeweils homozygot für den SNP waren. Bei beiden Kreuzungen besaßen sowohl die Neugeborenen (Abbildung 25A links) als auch die 24 Tage alten Nachkommen (n=8) der F1-Generation (Abbildung 25A rechts) einen heterozygoten Genotyp, da sie neben dem 111 bp Fragment auch die Spaltungsprodukte von 89 bp und 22 bp aufwiesen. Das 22 bp Fragment war im Agarosegel nur schlecht zu sehen, so dass dieser Bereich in den Abbildungen 25 und 26 nicht gezeigt wird.



**Abb.25:** Genomische Analyse des SNP rs27685005 in Exon 1D. In **(A)** ist die HpaII-Restriktionsanalyse eines 111 bp-Amplifikates von genomischer DNA für die Kreuzung  $\text{♀ } M. m. castaneus \times \text{♂ NMRI}$  (links) und die reziproke Kreuzung  $\text{♀ NMRI} \times \text{♂ } M. m. castaneus$  (rechts) dargestellt. Die gespaltenen PCR-Produkte bei *M. m. castaneus* sowie die nicht gespaltenen Fragmente bei NMRI zeigen einen jeweils homozygoten Genotyp. Alle Nachkommen (F1) zeigen ein heterozygotes RFLP-Muster. Marker: pUC-Mix Marker 8. Abbildung **(B)** zeigt die Lage des rot hervorgehobenen SNP am *Scapinin*-Locus und die Lokalisation der zur Amplifikation verwendeten Primer. Des Weiteren ist schematisch das analysierte PCR-Produkt mit einem Teil der Sequenz am rot hervorgehobenen polymorphen Nukleotid (R=A oder G) dargestellt. Darunter sind die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym sowie die entstehenden Spaltungsprodukte abgebildet.

### Analyse der Expression

Die Analyse der allelspezifischen Expression im Hirn erfolgte über die Restriktion eines 198 bp PCR-Produktes, welches entsprechend 2.2.13. mit den Primern P20 und P10 amplifiziert und anschließend mit P20 und P27 reamplifiziert wurde (Abbildung 26B). Als Positivkontrollen wurden die Gewebe der Elterntiere (P) mitgeführt. Der Locus wurde von cDNA amplifiziert und die erhaltenen PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym HpaII gespalten. Wie in Abbildung 26A dargestellt wurde bei diesem Ansatz sowohl für die Kreuzung  $\text{♀ } M. m. castaneus \times \text{♂ NMRI}$  (links) als auch für die reziproke Kreuzung  $\text{♀ NMRI} \times \text{♂ } M. m. castaneus$  (rechts) eine biparentale Expression in allen Proben der Nachkommen (F1, n=8) detektiert, da neben der 198 bp Bande auch immer Spaltungsprodukte von 176 bp und 22 bp erhalten wurden.



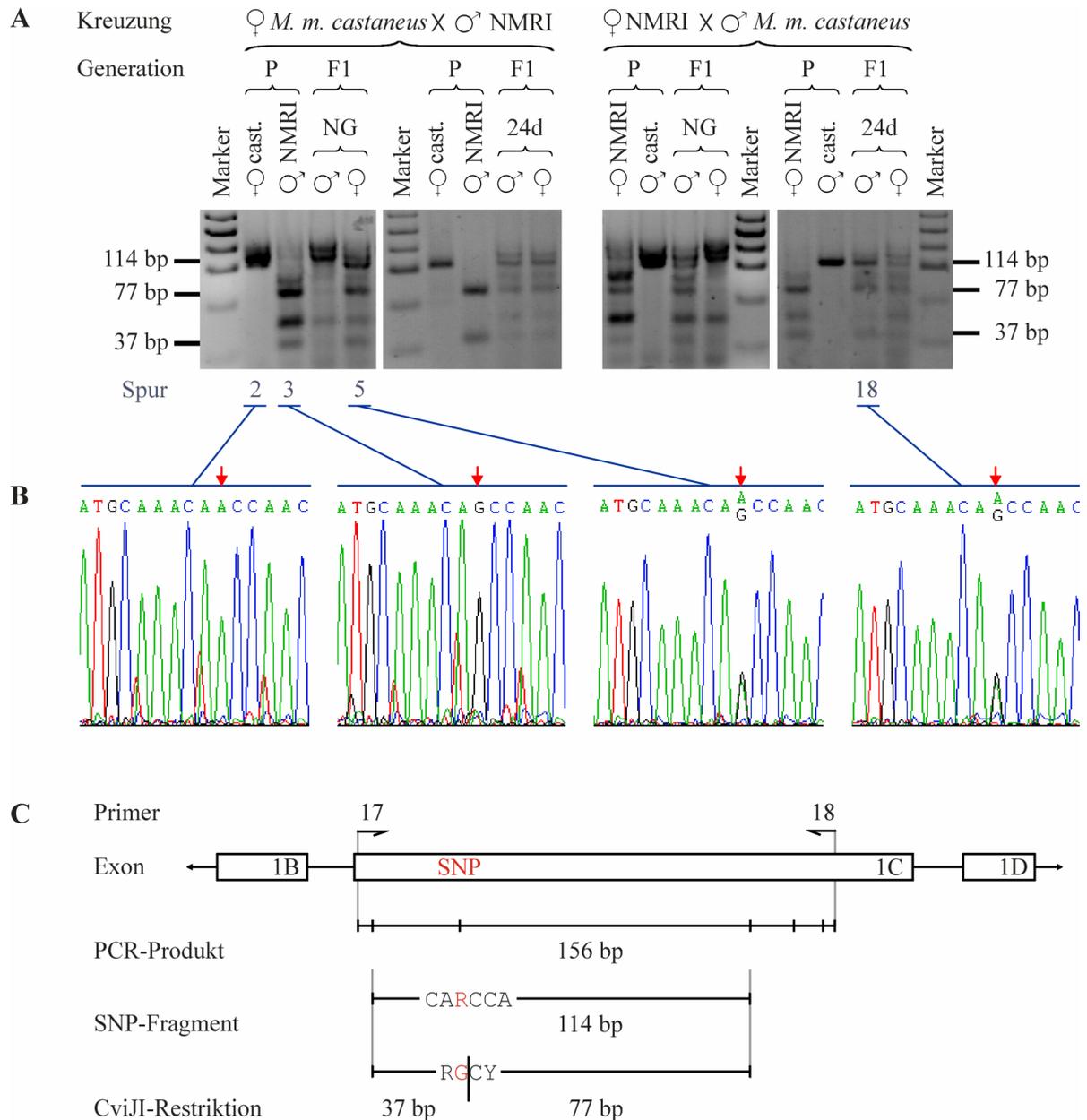
**Abb.26:** Analyse der allelspezifischen Expression des SNP rs27685005 in Exon 1D. Die Abbildung (A) zeigt das Ergebnis der Restriktionsanalyse mit HpaII für ein 198 bp langes PCR-Fragment für die Kreuzungen ♀ *M. m. castaneus* × ♂ NMRI (links) und ♀ NMRI × ♂ *M. m. castaneus* (rechts). Die zur Kontrolle mitgeführten Fragmente der Eltern (P) zeigen ein homozygotes und die der neugeborenen (NG) und 24 Tage alten (24d) Nachkommen (F1) ein heterozygotes RFLP-Muster. Marker: pUC-Mix Marker 8. Abbildung (B) zeigt die Lage des SNP am *Scapinin*-Locus und die Lokalisation der zur Amplifikation verwendeten Primer. Des Weiteren ist schematisch das analysierte PCR-Produkt mit einem Teil der Sequenz am rot hervorgehobenen polymorphen Nukleotid (R=A oder G) dargestellt. Darunter sind die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym sowie die entstehenden Spaltungsprodukte abgebildet.

Für die Analyse der gonadenspezifischen 1D-Transkripte stand nur sehr wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung, so dass eine eindeutige Reproduktion der Ergebnisse nicht gelang. Somit können zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussagen über den Expressionsstatus dieser Transkripte getroffen werden.

### 3.3.3. Analyse des SNP rs27685047 in Exon 1C

#### Analyse des Genotyps

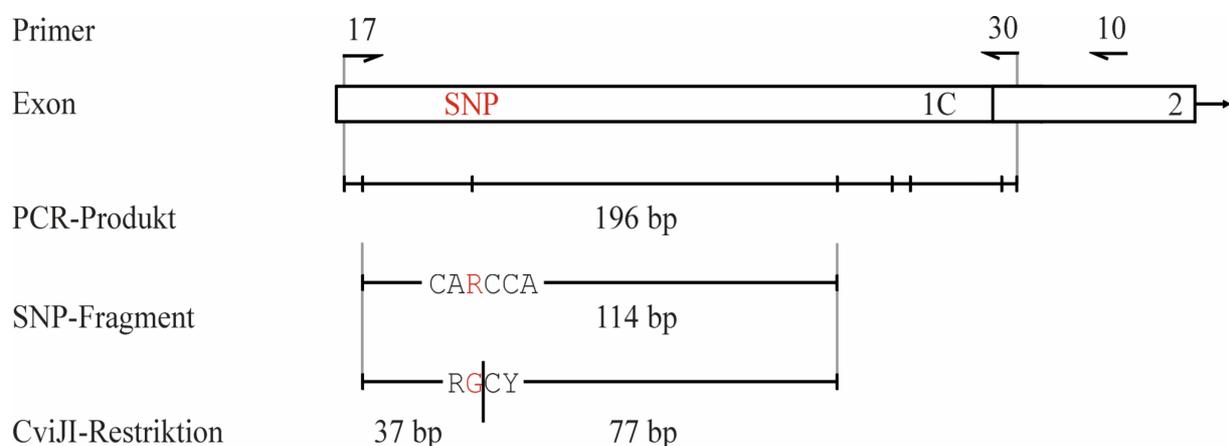
Der dritte analysierte SNP (rs27685047) befindet sich an Position 54 der bisher bekannten Sequenz von Startexon 1C und kann ebenfalls ein Adenin (*M. m. castaneus*) oder ein Guanin (NMRI) sein. Für die Amplifikation des 156 bp langen, den RFLP tragenden Fragmentes von genomischer DNA, wurden die in Abbildung 27C gezeigten Exon 1C-spezifischen Primer verwendet. Der RFLP ist ausschließlich mit Hilfe des Restriktionsenzymes CviJI darstellbar, dessen Erkennungssequenz RGCY ist (Abbildung 27C), so dass dieses Amplifikat fünf Schnittstellen enthält und es daher zu mehreren Spaltungsprodukten kommt, die sich im Gel teilweise überlagern (Abbildung 27A). Diese Tatsache erschwert eine eindeutige Auswertung des RFLP, auch wenn man sich auf ein 114 bp Fragment beschränkt, welches den SNP trägt und somit in ein 77 bp und ein 37 bp Produkt gespalten wird, wenn es sich um ein Guanin handelt. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Auswertung des RFLP mittels Restriktionsspaltung und anschließender Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte zusätzlich sequenziert. Auf der Ebene der genomischen DNA wurden jeweils eine *Mus musculus castaneus* und eine NMRI-Maus (Spur 2 bzw. 3 in Abbildung 27A) sowie eine F1-Maus aus jeder Kreuzung (Spur 5 bzw. 18) untersucht. Für das polymorphe Nukleotid waren NMRI und *M. m. castaneus* jeweils homozygot und die Nachkommen (n=8) waren heterozygot (Abbildung 27B).



**Abb.27:** Genomische Analyse des SNP rs27685047 in Exon 1C. In **(A)** ist die CviJI-Restriktionsanalyse eines 156 bp-Amplifikates von genomischer DNA für die Kreuzung  $\text{♀ } M. m. castaneus \times \text{♂ NMRI}$  (links) und die reziproke Kreuzung  $\text{♀ NMRI} \times \text{♂ } M. m. castaneus$  (rechts) dargestellt. Da dieses Fragment fünf Schnittstellen des Restriktionsenzymes enthält, ist für die Analyse ein entstehendes 114 bp Produkt entscheidend, das den SNP trägt und bei den *M. m. castaneus*-Eltern (P) ungespalten bleibt, bei NMRI-Mäusen aber vollständig in 77 bp und 37 bp Fragmente gespalten wurde. Die Nachkommen (F1), sowohl Neugeborene (NG) als auch 24 Tage alte (24d), zeigten ein heterozygoten RFLP-Muster. Marker: pUC-Mix Marker 8. In **(B)** ist die Sequenzanalyse einer *M. m. castaneus* (Spur 2) und einer NMRI-Maus (Spur 3) der Parentalgeneration (P) sowie zweier Nachkommen (F1) dargestellt (Spuren 5 & 18), die bestätigt, dass die Eltern homozygot und die F1-Tiere heterozygot für die polymorphe Stelle (markiert durch rote Pfeile) in der genomischen DNA sind. Abbildung **(C)** zeigt die Lage des SNP am *Scapinin*-Locus und die Lokalisation der zur Amplifikation verwendeten Primer. Des Weiteren ist schematisch das analysierte PCR-Produkt mit den 5 CviJI-Schnittstellen gezeigt. Darunter ist das 114 bp lange Fragment gezeigt, das das rot hervorgehobene polymorphe Nukleotid (R=A oder G) trägt. Ganz unten sind die Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes sowie die entstehenden Spaltungsprodukte abgebildet.

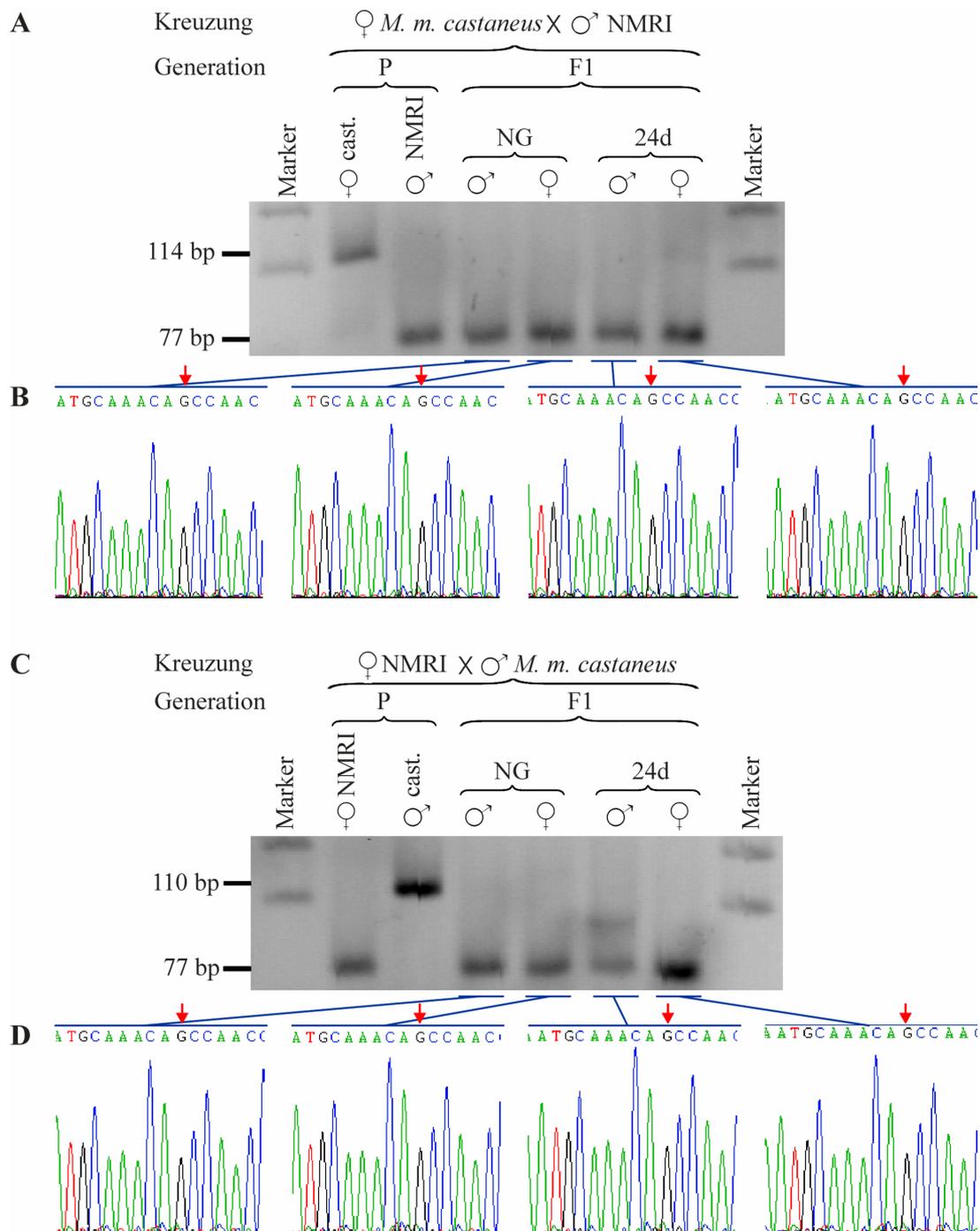
## Analyse der Expression

In die Analyse der Genexpression wurden nur hirnspezifische Transkripte einbezogen, da Exon 1C in den Gonaden nicht nachweisbar war (vgl. Abbildung 22B). Für die Amplifikation des zu untersuchenden Fragments wurden, wie unter 2.2.13. beschrieben, zunächst Primer in Exon 1C (P17) und in Exon 2 (P10) eingesetzt, deren Produkt anschließend mit den Primern P17 und P30 reamplifiziert wurde (Abbildung 28). Somit wurde ein 196 bp Produkt erhalten, das sieben CviJI-Schnittstellen enthielt. Auch bei diesen Analysen ist das 114 bp Fragment entscheidend, das in 77 bp und 37 bp Produkte gespalten wird, wenn sich an der polymorphen Stelle ein Guanin befindet.

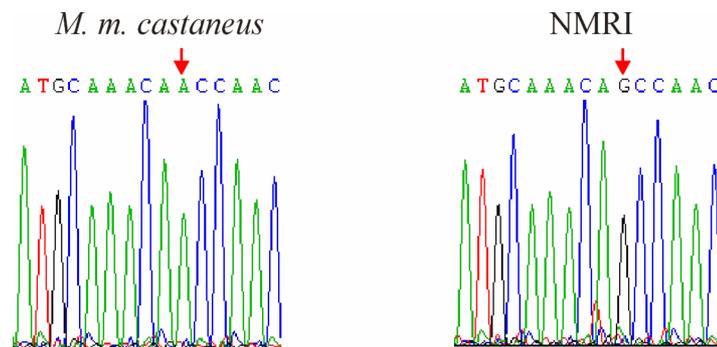


**Abb.28:** Schematische Darstellung der allelspezifischen Expressionsanalyse des SNP rs27685047 in Exon 1C. Die Abbildung zeigt die Lage des SNP am *Scapinin*-Locus und die Lokalisation der zur Amplifikation verwendeten Primer. Des Weiteren ist schematisch das analysierte PCR-Produkt mit den 6 CviJI-Schnittstellen gezeigt. Darunter ist das 114 bp lange Fragment gezeigt, das das rot hervorgehobene polymorphe Nukleotid (R=A oder G) trägt. Ganz unten sind die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym sowie die entstehenden Spaltungsprodukte abgebildet.

Die Auswertung der Restriktionsanalyse für die Kreuzung ♀ *M. m. castaneus* × ♂ NMRI (Abbildung 29A) bzw. die reziproke Kreuzung (Abbildung 29C) erbrachte, dass die Elterntiere, wie erwartet, homozygot waren, die Nachkommen (n=8) aber kein heterozygotes Restriktionsmuster aufwiesen, sondern nur ein parentales Allel exprimierten. Bei allen Nachkommen beider Kreuzungen wurde das RFLP-Fragment vollständig gespalten, wodurch die exklusive Expression des NMRI-Allels in der F1-Generation dieser reziproken Kreuzungen nachgewiesen wurde. Um die Ergebnisse der RFLP-Analyse zu verifizieren, wurde das PCR-Produkt von *M. m. castaneus* und NMRI (Abbildung 30 auf Seite 61), sowie allen F1-Tieren (Abbildungen 29B und 29D) sequenziert. Hierbei bestätigte sich, dass alle 8 Nachkommen an der polymorphen Stelle ein Guanin, also das NMRI-Allel, exprimieren.



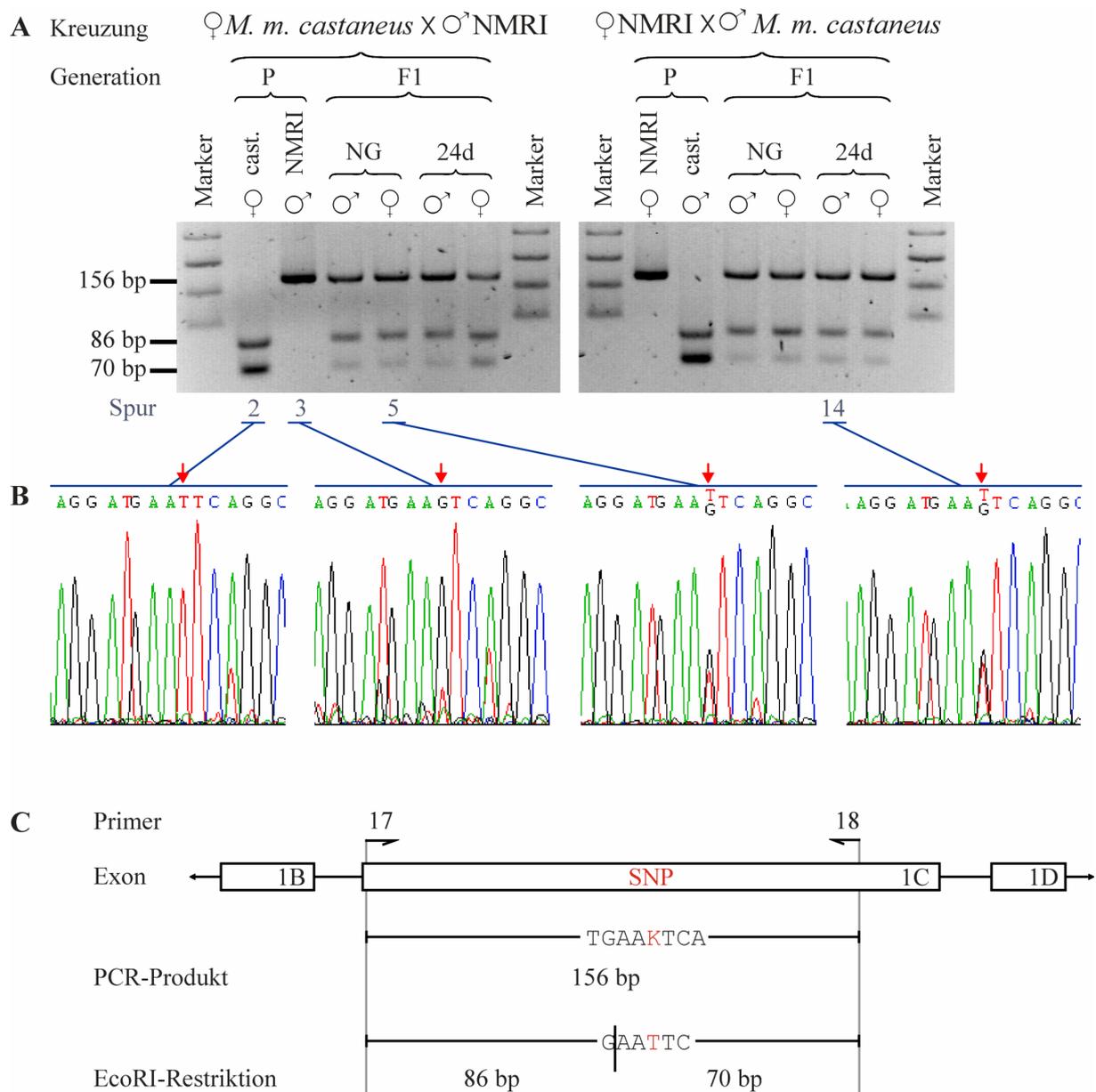
**Abb.29:** Analyse der allelspezifischen Expression des SNP rs27685047 in Exon 1C. Die Restriktionsanalyse eines 196 bp langen RT-PCR-Fragmentes mit CviJI zeigt, dass die Eltern (P) homozygot sind und auch die neugeborenen (NG) und 24 Tage alten (24d) Nachkommen (F1) nur eines der beiden parental Allele exprimieren, da das den SNP tragende 114 bp Fragment sowohl bei der Kreuzung  $\text{♀ } M. m. castaneus \times \text{♂ NMRI}$  (A) als auch bei der reziproken Kreuzung  $\text{♀ NMRI} \times \text{♂ } M. m. castaneus$  (C) vollständig gespalten wurde. Die aberrante Bande beim 24 Tage alten F1-Männchen in Abbildung (C) entspricht keinem der spezifischen Signale von 114 bp oder 77 bp. Sie ist daher wohl auf eine unvollständige Spaltung einer der anderen vier CviJI-Schnittstellen zurückzuführen. Marker: pUC-Mix Marker 8. Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass alle Nachkommen am SNP ein Guanin tragen, also bei beiden Kreuzungen das NMRI-Allel exprimiert wird (B & D). Die polymorphe Stelle ist in den dargestellten Chromatogrammen mit einem roten Pfeil markiert.



**Abb.30:** Sequenzanalyse der Elterntiere für den SNP rs27685047 in Exon 1C. Durch die Sequenzierung wurde bestätigt, dass *M. m. castaneus*-Mäuse an der polymorphen Stelle ausschließlich ein Adenin und NMRI ein Guanin exprimieren.

#### Identifizierung und Genotypisierung eines EcoRI-Polymorphismus in Startexon 1C

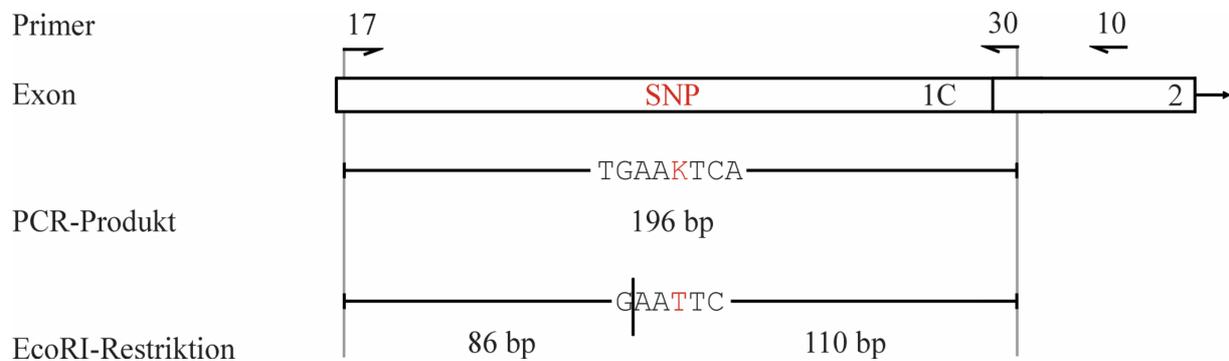
Im Zuge der durchgeführten Sequenzanalysen wurde ein zweiter, bis dahin noch nicht beschriebener SNP an Position 93 in Exon 1C identifiziert. An dieser Stelle befindet sich entweder ein Thymin (*M. m. castaneus*) oder ein Guanin (NMRI) und sie ist damit polymorph für das Restriktionsenzym EcoRI (Abbildung 31C). Dieser Polymorphismus stellte somit eine Möglichkeit dar, die für den SNP rs27685047 erhaltenen Daten zu reproduzieren und zu verifizieren. Für die Amplifikation des EcoRI-RFLP wurden sowohl auf genomischer als auch auf cDNA Ebene die gleichen Primer verwendet wie für den CviJI-Polymorphismus (Abbildung 31C). Die Analyse des Genotyps erbrachte auch hier, dass die Elterntiere homozygot und die Nachkommen (n=8) mit beiden parental Allelen ausgestattet waren. Aus Abbildung 31A geht hervor, dass das 156 bp PCR-Produkt von *M. m. castaneus* vollständig in ein 86 bp und ein 70 bp Fragment gespalten wurde, wogegen das NMRI-Produkt ungespalten bleibt und bei den F1-Nachkommen alle drei Fragmente erhalten wurden. Auch hier wurde der Genotyp bei zwei Elterntieren (Spuren 2 & 3 in Abbildung 31A) sowie zwei Nachkommen (Spuren 5 & 14) durch Sequenzierung überprüft (Abbildung 31B) und das Ergebnis der Restriktionsanalyse bestätigt.



**Abb.31:** Genomische Analyse des EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C. In **(A)** ist die EcoRI-Restriktionsanalyse eines 156 bp-Amplifikates von genomischer DNA für die Kreuzung ♀ *M. m. castaneus* × ♂ NMRI (links) und die reziproke Kreuzung ♀ NMRI × ♂ *M. m. castaneus* (rechts) dargestellt. Die *M. m. castaneus*-Fragmente wurden vollständig in 86 bp und 70 bp Produkte gespalten, während die NMRI-Amplifikate ungespalten blieben, was zeigt, dass die Parentalgeneration (P) homozygot für jeweils eine Variante des Polymorphismus war. Die Nachkommen (F1), sowohl Neugeborene (NG) als auch 24 Tage alte (24d), zeigten ein heterozygotes RFLP-Muster. Marker: pUC-Mix Marker 8. In **(B)** ist die Sequenzanalyse einer *M. m. castaneus* (Spur 2) und einer NMRI-Maus (Spur 3) der Parentalgeneration (P) sowie zweier Nachkommen (F1) dargestellt (Spuren 5 & 14), die bestätigt, dass die Eltern homozygot und die F1-Tiere heterozygot für die polymorphe Stelle (markiert durch rote Pfeile) in der genomischen DNA sind. Abbildung **(C)** zeigt die Lage des rot hervorgehobenen SNP am *Scapinin*-Locus und die Lokalisation der zur Amplifikation verwendeten Primer. Des Weiteren ist schematisch das analysierte PCR-Produkt mit einem Teil der Sequenz am rot hervorgehobenen polymorphen Nukleotid (K=G oder T) dargestellt. Darunter sind die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym sowie die entstehenden Spaltungsprodukte abgebildet.

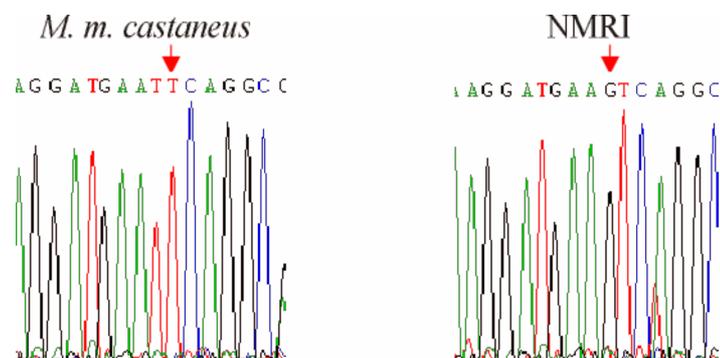
## Analyse der Expression

Analog zur Analyse des CviJI-Polymorphismus wurde ein 196 bp PCR-Produkt amplifiziert und durch Restriktion mit EcoRI charakterisiert (Abbildung 32).

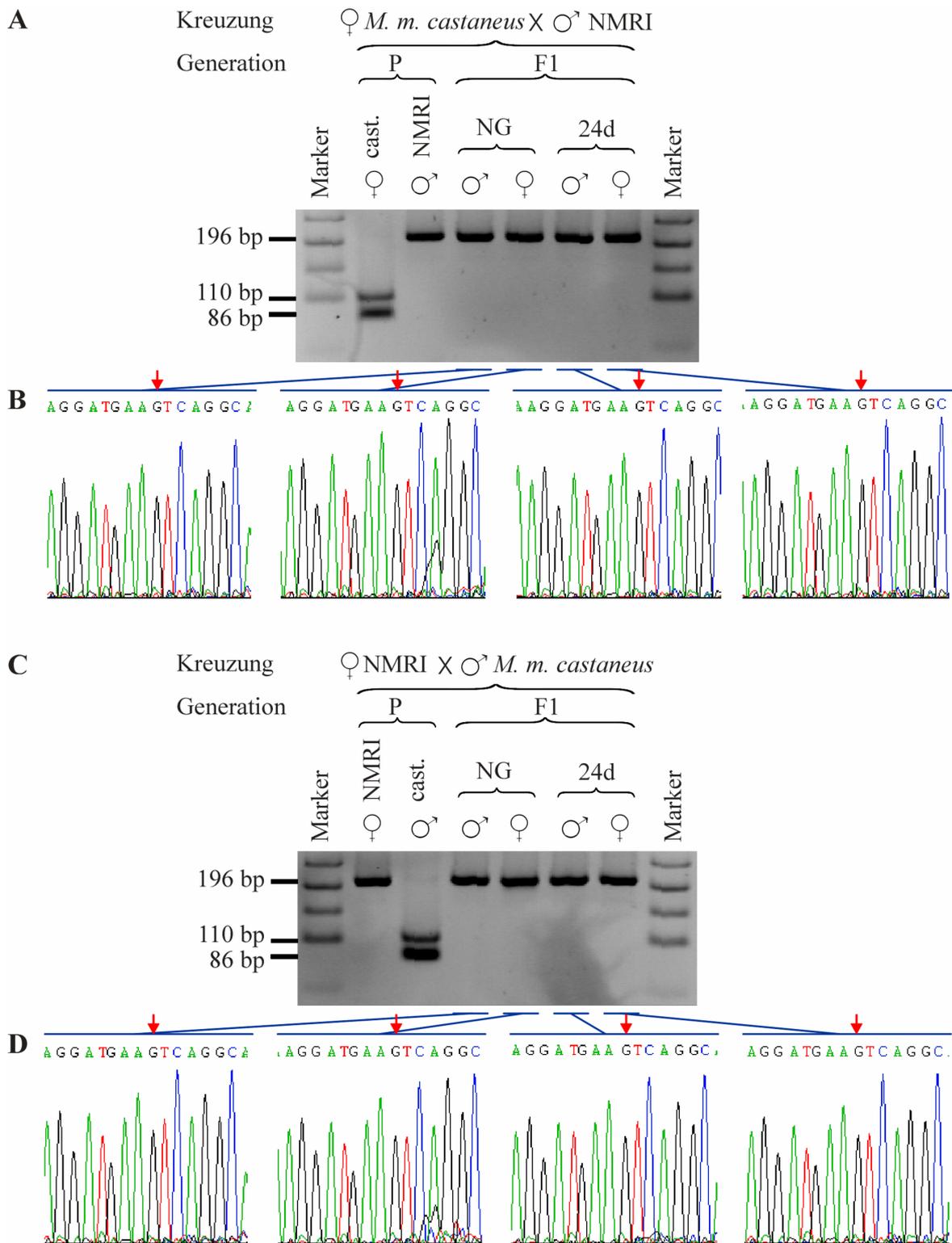


**Abb.32:** Schematische Darstellung der allelspezifischen Expressionsanalyse des EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C. Die Abbildung zeigt die Lage des SNP am *Scapinin*-Locus und die Lokalisation der zur Amplifikation verwendeten Primer. Des Weiteren ist schematisch das analysierte PCR-Produkt mit einem Teil der Sequenz am rot hervorgehobenen polymorphen Nukleotid (K=G oder T) dargestellt. Darunter sind die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym sowie die entstehenden Spaltungsprodukte abgebildet.

Die analog zum CviJI-Polymorphismus durchgeführte Analyse der Genexpression bestätigte die vorangegangenen Untersuchungen. Wie in Abbildung 34A und 34C zu sehen ist, wird durch das Restriktionsenzym EcoRI ausschließlich das 196 bp PCR-Produkt von *M. m. castaneus* in ein 110 bp und ein 86 bp Fragment gespalten. Die NMRI-Amplifikate bleiben, wie die aller Nachkommen (n=8), ungespalten. Die Sequenzanalyse zweier Elterntiere (Abbildung 33) sowie der Nachkommen beider Kreuzungen (Abbildungen 34B und 34D) zeigen eindeutig, dass die F1 ausschließlich das NMRI-Allel exprimiert.



**Abb.33:** Sequenzanalyse der Elterntiere für den EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C. Durch die Sequenzierung wurde bestätigt, dass *M. m. castaneus*-Mäuse an der polymorphen Stelle ausschließlich ein Adenin und NMRI ein Guanin exprimieren.



**Abb.34:** Analyse der allelspezifischen Expression des EcoRI-Polymorphismus in Exon 1C. Die Restriktionsanalyse eines 196 bp RT-PCR-Fragmentes mit EcoRI zeigt, dass die Eltern (P) homozygot sind und auch die neugeborenen (NG) und 24 Tage alten (24d) Nachkommen (F1) nur eines der beiden parental Allele exprimieren, da das PCR-Produkt sowohl bei der Kreuzung ♀ *M. m. castaneus* × ♂ NMRI (**A**) als auch bei der reziproken Kreuzung ♀ NMRI × ♂ *M. m. castaneus* (**C**) ungespalten blieb. Marker: pUC-Mix Marker 8. Durch Sequenzierung wurde bestätigt, dass alle Nachkommen am SNP ein Guanin tragen, also bei beiden Kreuzungen das NMRI-Allel exprimiert wird (**B & D**). Die polymorphe Stelle ist in den dargestellten Chromatogrammen mit einem roten Pfeil markiert.

### 3.4. *In silico*-Analysen des *SCAPININ/Scapinin*-Locus bei Mensch und Maus

Ausgehend von den nun bekannten genomischen und cDNA-Sequenzen sollten durch *in silico*-Analysen weitere Informationen über die Struktur sowie mögliche regulatorische Bereiche am *SCAPININ/Scapinin*-Locus identifiziert werden.

#### 3.4.1. Promotoranalyse

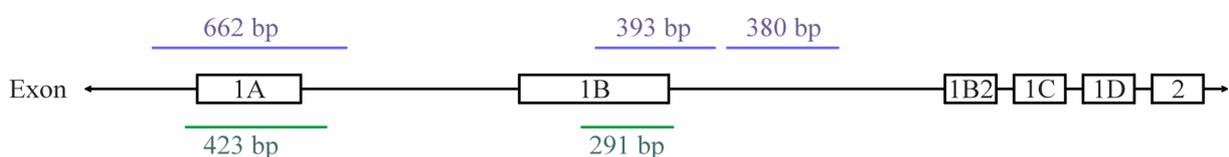
Die Vorhersage von RNA-PolymeraseII-Promotoren in einer bestimmten Sequenz ist bis heute problematisch (ZHANG 2003) und erreicht bei einem der am häufigsten genutzten Programme, Promoter2.0 (KNUDSEN 1999), nur eine durchschnittliche Trefferquote von 80% ([www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/performance.php](http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/performance.php)). Daher wurde neben Promoter2.0 mit PROSCAN (PRESTRIDGE 1995) eine zweite Software eingesetzt, um in den Sequenzen der genomischen Klone A1121908 (Mensch) und A1731783 (Maus) nach möglichen Promotoren zu suchen. Als Kernpromotor wird dabei laut Literatur ein Bereich von -40 bp bis +40 bp um den Transkriptionsstart angesehen (ZHANG 2003). Beide verwendeten Programme konnten weder beim Menschen noch bei der Maus im 5'-Bereich der Startexons von *SCAPININ/Scapinin* mögliche Promotorelemente wie TATA-, CCAAT- oder GC-Box identifizieren. Aus diesem Grund wurde zusätzlich nach einem Initiatorelement gesucht, das vor allem bei Promotoren ohne TATA-Box den Transkriptionsstart anzeigt und eine Konsensussequenz von Py Py A<sub>+1</sub> N<sup>T</sup>/<sub>A</sub> Py Py aufweist (JAVAHERY *et al.* 1994). Ein solches Initiatorelement wurde im Bereich des Exons 1D der Maus identifiziert und überlappt, wie in Abbildung 35 dargestellt, exakt mit der durch RACE-PCR erhaltenen Sequenz.

Sequenz Startexon 1D		AGTCTCTGCC →
Genomische Sequenz	←	GCTCCTTGCCAGTCTCTGCC →
Konsensussequenz Initiatorelement		YYANWYY

**Abb.35:** Identifizierung eines Initiatorelementes im 5'-Bereich von Exon 1D des *Scapinin*-Gens der Maus. In der Mitte ist die Sequenz des Mausgenoms in diesem Bereich abgebildet, darüber der Anfang der durch RACE-Analysen erhaltenen Sequenz von Startexon 1D und darunter die Konsensussequenz eines Initiatorelementes, die den putativen Transkriptionsstart anzeigt.

### 3.4.2. Identifizierung von CpG-Inseln im 5'-Bereich des *SCAPININ/Scapinin*-Locus

Da zumindest einige *Scapinin*-Transkripte der Maus, wie für Exon 1C beschrieben, nicht von beiden Allelen exprimiert werden, könnten sie einer Regulation unterliegen, die möglicherweise mit der Methylierung einzelner DNA-Abschnitte einhergeht. Daher wurde im 5'-Bereich der *SCAPININ/Scapinin* Gene von Mensch und Maus mit Hilfe der CpGPlot/CpGReport-Software ([www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/index.html](http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/index.html)) nach so genannten CpG-Inseln gesucht. Mit den Standardeinstellungen, mindestens 200 bp Länge und >50% GC-Gehalt, wurden beim Menschen drei und bei der Maus zwei solcher CpG-Inseln identifiziert, die jeweils im Bereich der Exons 1A und 1B liegen (Abbildung 36 sowie Anlagen 19 & 20). Die erste CpG-Insel des Menschen, mit einer Ausdehnung von 662 bp, beginnt 380 bp vor der bisher bekannten Sequenz von Exon 1A, überspannt es vollständig und endet 174 bp hinter Exon 1A im Intron. Die zweite, mit 393 bp Länge, beginnt in Exon 1B, mit dem es 210 bp überlappt und endet 182 bp dahinter. Nur 87 bp weiter beginnt die dritte CpG-Insel von 380 bp Länge. Die Lage der CpG-Inseln am *Scapinin*-Locus der Maus ist sehr ähnlich. Der erste, 423 bp große GC-reiche Abschnitt beginnt 160 bp vor Exon 1A, überspannt es und endet 146 bp dahinter. Der zweite Bereich beginnt ebenfalls in Exon 1B, überlappt 258 bp und erstreckt sich bis 33 bp ins Intron 1B. Unter wesentlich stringenteren Suchbedingungen (mindestens 200 bp Länge und >80% GC-Gehalt) wurden beim Menschen immer noch zwei der drei GC-reichen Regionen um die Startexons 1A und 1B gefunden, bei der Maus aber keine mehr. Für die Exons 1C und 1D, die im Verlaufe dieser Arbeit bezüglich einer allelspezifischen Genexpression bei der Maus untersucht wurden, konnte auch mit relativ unstringenten Suchparametern keine nennenswerte Häufung von CpG-Dinukleotiden detektiert werden. Die Sequenzbereiche der CpG-Inseln sind im Anhang (Anlagen 18 & 19) detailliert dargestellt.



**Abb.36:** Schematische Darstellung der CpG-Inseln im 5'-Bereich der *SCAPININ/Scapinin*-Gene von Mensch und Maus. Die im Bereich der Exons 1A und 1B identifizierten CpG-Inseln sind für den Menschen in blau und für die Maus in grün dargestellt.

### 3.4.3. Weitere *in silico*-Analysen

Durch weitere *in silico*-Analysen sollten mögliche Sekundärstrukturen im 5'-Bereich der *SCAPININ/Scapinin* mRNAs sowie putative Phosphorylierungsstellen in den *SCAPININ/Scapinin*-Proteinen untersucht werden. Die Aussagen dieser ergänzenden Untersuchungen werden unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Modelle im folgenden Diskussionsteil besprochen.

#### Analyse möglicher mRNA-Sekundärstrukturen im 5'-Bereich

Die Sekundärstruktur einer transkribierten (pre)mRNA ist entscheidend für zahlreiche zelluläre Abläufe, u. a. das Spleißen (BURATTI und BARALLE 2004, KLAFF *et al.* 1996). Das Programm *mfold* ([www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold](http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold), ZUKER 1989) berechnet die freie Energie, die benötigt oder freigesetzt wird, um bestimmte Konfigurationen einzunehmen. Je kleiner der Wert der freien Energie desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass sich diese Sekundärstruktur spontan ausbildet. Da die natürliche Bildung einer Struktur aber auch von unberechenbaren Faktoren, wie der Beteiligung von Chaperonen abhängt, errechnet *mfold* für jede Sequenz eine gewisse Anzahl suboptimaler Faltungen als Kandidaten für die natürliche Struktur. Auf diese Weise wurden für die *SCAPININ/Scapinin*-Startexons die in Tabelle 8, Abbildung 37 sowie im Anhang (Anlagen 21 & 22) dargestellten putativen stabilen Sekundärstrukturen vorhergesagt.

#### Untersuchungen zu möglichen Phosphorylierungsstellen in *SCAPININ/Scapinin*-Proteinen

Bereits ALLEN *et al.* (2004) hatten für das Phactr-1 Protein berichtet, dass es acht mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A (PKA) und sieben für Proteinkinase C (PKC) enthält. Sie fanden, dass sich diese Stellen im Bereich der RPEL-repeats am N- bzw. C-Terminus häuften und vermuteten einen Einfluss auf die Phactr-1-Interaktion mit Aktin und PP1. Für die Analyse des *SCAPININ/Scapinin*-Proteins wurden die cDNA-Sequenzen von Mensch und Maus zunächst in die putative Aminosäureabfolge des jeweiligen Genproduktes (Aminosäuresequenzen im Anhang, Anlagen 8, 9 & 16) übersetzt und mit Hilfe von NetPhosK (BLOM *et al.* 2004) auf mögliche Phosphorylierungsstellen hin untersucht. Ausgehend von der Umgebung einer phosphorylierbaren Aminosäure wird ein *Score*-Wert berechnet, der angibt, wie wahrscheinlich eine Phosphorylierung an dieser Stelle ist. Dieser *Score* geht bis maximal 1.0 und wird bereits ab 0.5 angegeben. Geringe *Score*-Werte

beinhalten aber ein höheres Risiko für falsch positive Ergebnisse, so dass für SCAPININ/Scapinin erst *Score*-Werte ab 0.7 in die Analyse aufgenommen wurden. Dabei wurden, wie in Tabelle 9 zusammengefasst, mehrere putative Phosphorylierungsstellen identifiziert.

## 4. Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen eine komplexe genomische Organisation des *SCAPININ/Scapinin*-Locus, die sich auch im gewebe- und entwicklungsspezifischen Expressionsmuster wieder findet. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings weder dem *Scapinin*-Gen eine exakte Funktion zugewiesen worden, noch konnte der Vielzahl der auftretenden Transkriptvarianten eine biologische oder biochemische Bedeutung zugeordnet werden. Aus diesem Grund soll im Folgenden im Vergleich mit Genen ähnlicher Struktur oder Komplexität gezeigt werden, welche Möglichkeiten eine komplexe genomische Organisation als Grundlage für Diversität und Flexibilität bei der Regulation eines Gens bietet, und zwar hinsichtlich der Lokalisation sowie der Kontrolle von Transkription und Translation.

### 4.1. Regulationsmöglichkeiten am *SCAPININ/Scapinin*-Locus

#### 4.1.1. Möglichkeiten zur Regulation der Transkription sowie zur Kontrolle der Lokalisation

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten variablen Startexons des *SCAPININ/Scapinin*-Gens sowie das zusätzliche Exon 1B2 beim Menschen und der alternativ polyadenylierte 3'-Bereich bei der Maus bilden den Ausgangspunkt für eine hohe Diversität an möglichen Transkripten. Wie die bei Northern Blot- und RT-PCR-Analysen erhaltenen Ergebnisse zeigen (vgl. Abbildungen 10 & 19 bis 22), unterliegen diese Transkripte sowohl einer gewebe- als auch einer entwicklungsspezifischen Kontrolle. Inwieweit der komplexe Aufbau des Genlocus dem zugrunde liegen könnte, zeigt ein Vergleich mit dem *Otx2*-Gen, welches ebenfalls alternativ gespleißte, nicht kodierende Startexons (Exons A-C) besitzt, die von drei verschiedenen Promotoren aus transkribiert werden. Das *Otx2*-Gen der Maus, das ortholog zum *otd*-Gen von *Drosophila* und Bestandteil einer Genfamilie zusammen mit *Otx1* und den *crx*-Genen ist, spielt eine essentielle Rolle bei der Hirnentwicklung von einem sehr frühen Zeitpunkt bis nach der Geburt. Bereits in der Gastrula ist es an der Ausbildung der anterior-posterior-Achse beteiligt und spielt später eine wichtige Rolle bei der Entwicklung sensorischer Organe, speziell des Auges und der Retina (COURTOIS *et al.* 2003). Voraussetzung für die Erfüllung dieser vielfältigen Aufgaben ist eine fein regulierte zeitliche und räumliche Genexpression, deren Grundlage die bereits erwähnten drei Spleißvarianten mit den nicht kodierenden Startexons A-C sind. Dabei ist die C-Form das Haupttranskript in frühen embryonalen Stammzellen (ES), wogegen die A- und B-Formen in der adulten Retina gefunden werden. Während der Differenzierung der ES ändert sich das Expressionsmuster

weg von der C- hin zur A-Form (COURTOIS *et al.* 2003). Die Organisation des *Otx2*-Genes bietet also die Möglichkeit, die Genexpression an verschiedene biologische Funktionen anzupassen.

Im Gegensatz zum *Otx2*-Gen verfügt die *Argininosuccinat-Synthase* (AS) über nur einen Promotor, von dem dennoch verschiedene gewebespezifische Transkripte exprimiert werden. Die AS ist u. a. am Harnstoffzyklus beteiligt und bildet drei verschiedene Transkripte, die sich in der Größe der 5'-UTR unterscheiden, aber alle vom gleichen Promotor aus exprimiert werden. Während das kürzeste Transkript sowohl in Endothel- als auch in Leberzellen von Rindern nachgewiesen wurde, fanden PENDLETON *et al.* (2002) die längeren Formen ausschließlich im Endothel. Diese Art der räumlichen Verteilung verschiedener Transkriptvarianten ist beim *Scapinin*-Gen insbesondere innerhalb verschiedener Hirnareale detektierbar. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse von acht verschiedenen adulten Hirnregionen mittels Northern Blot (vgl. Abbildung 18) zeigt deutlich, dass die Lokalisation der verschiedenen *Scapinin*-Transkripte innerhalb des Maushirns variiert. Dies stimmt insoweit mit den Befunden von ALLEN *et al.* (2004) überein, dass anhand von *in situ*-Hybridisierungen ein spezifisches Verteilungsmuster von *Scapinin*-Transkripten im Hirn der Ratte dargelegt werden konnte. Durch die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse können diese Befunde allerdings erstmalig mit dem Auftreten verschiedener Transkripte korreliert werden (vgl. 3.2.1.4.).

Möglicherweise sind für diese Lokalisation der Transkripte Sequenzelemente in den 5'-UTRs der verschiedenen Startexons verantwortlich, wie beispielsweise für die räumliche Kontrolle des *gurken* (*grk*)-Transkripts von *Drosophila*. *Gurken* kodiert für ein TGF $\alpha$ -ähnliches Protein, das in der Keimbahn als Ligand für *torpedo* agiert, den *Drosophila* EGF-Rezeptor, und ist somit mit verantwortlich für die Ausbildung sowohl der anterior-posterior- als auch der dorso-ventral-Achse im Ei und im Embryo. Deletionsexperimente zeigten, dass Sequenzabschnitte im 5'-Bereich der mRNA verantwortlich dafür sind, dass die *gurken* mRNA während der frühen Entwicklungsphasen aus den so genannten *nurse*-Zellen in den posterioren Bereich der Oocyte transportiert wird. Diese Signale haben jedoch keinen Einfluss auf die Akkumulation der *grk*-mRNA im dorsal-anterioren Bereich zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt. Hierfür sind Signale im 3'-Bereich der *grk*-mRNA notwendig, welche allein wiederum nicht den Transport aus den *nurse*-Zellen in die Oocyte bewirken können (THIO *et al.* 2000).

Des Weiteren können auch variable 3'-Bereiche, wie es hier für das *Scapinin*-Gen der Maus beschrieben wurde (vgl. Abbildungen 12 & 17), an der Regulation einer gewebespezifischen Genexpression beteiligt sein. So wurde für das an der Hämatopoese beteiligte Kernprotein

*Hemogen (HEMGN)* die Expression zunächst nur in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen. Doch YANG *et al.* (2003) fanden eine Isoform, die ausschließlich in runden Spermatozyten der Testis exprimiert wird. Diese Isoform verwendet einen eigenen Promotor und eine alternative Polyadenylierungsstelle, besitzt aber den gleichen ORF wie die hämatopoetische Form. Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass das Expressionsmuster des humanen *SCAPININ*-Gens, das SAGARA *et al.* (2003) bei ihren Analysen von Krebszelllinien fanden, von dem in normalem Gewebe deutlich abwich. Sie detektierten bei ihren Northern Blot-Hybridisierungen nur ein einzelnes Transkript. Der Verlust von alternativen Transkripten, und das zeigen diese Blots an, kann zur Tumorbildung beitragen (NISSIM-RAFANIA und KEREM 2002, PHILIPS und COOPER 2000). Inwieweit dieses veränderte Expressionsmuster ein sekundärer Effekt durch genomweite Änderungen der Genexpression in den untersuchten Zelllinien war oder ob *SCAPININ* selbst an der Onkogenese, zumindest einiger Tumore, beteiligt ist, müssen zukünftige Untersuchungen in dieser Richtung zeigen. Auch dass die Genexpression in Zelllinien nicht immer der im zugrunde liegenden Tumor entsprechen muss, sollte berücksichtigt werden (HODGSON *et al.* 2003). Trotzdem fällt auf, dass SAGARA *et al.* (2003) bei ihren Untersuchungen *SCAPININ*-cDNAs aus diesen Zelllinien isolierten, die Startexon 1D enthielten. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, die Expression dieses Exons in normalem humanem Gewebe nachzuweisen.

#### 4.1.2. Möglichkeiten zur Regulation der Translation

Wie in den Tabellen 5 & 6 sowie im Anhang (Anlagen 16 & 17) gezeigt, enthalten die vier Startexons von *SCAPININ/Scapinin* ATG-Codons, die teilweise *in frame* mit dem von SAGARA *et al.* (2003) beschriebenen Translationsstart in Exon zwei sind. Solche *upstream open reading frames* (uORFs) können durchaus einen regulatorischen Einfluss auf die Translation ausüben, wie beispielsweise beim bereits erwähnten *Argininosuccinat-Synthase* (AS)-Gen. Die beiden längeren Transkriptformen enthalten ein Startcodon, welches in der Zelle dafür sorgt, dass die Translationseffizienz auf einem relativ niedrigen Niveau gehalten wird. Durch die Entfernung dieses uORFs im Rahmen von Mutationsanalysen ließ sich die Translationsrate signifikant steigern (PENDLETON *et al.* 2002). Darüber hinaus kann eine solche Kontrolle der Translation auch entscheidend für die physiologische Wirkung eines Genproduktes sein. Das mdm2-Protein kontrolliert p53 und andere Proteine, die beim Zellwachstum eine Rolle spielen (DAUJAT *et al.* 2001, MICHAEL und OREN 2002, MOMAND *et al.* 2000). Das Transkript enthält zwei uORFs, die die Translation reprimieren. Fehlen diese uORFs im Transkript, führt das zur Deregulation der Translation und es kann sogar zur

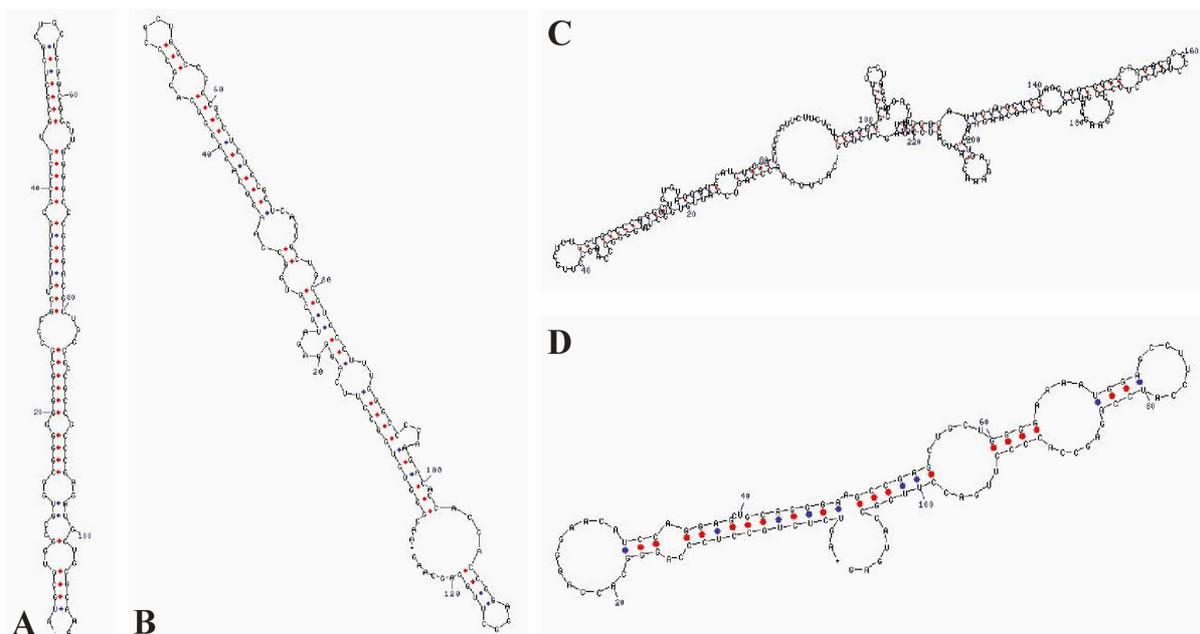
Ausbildung von Tumoren kommen (BROWN *et al.* 1999). Im Falle von *mdm2* ist die Repression der Translation auf die Sequenz der uORF-kodierten Proteine zurückzuführen, die direkt mit der Translationsmaschinerie interagieren und so eine Blockade für weitere Ribosomen darstellen (JIN *et al.* 2003). Ein weiteres Beispiel hierfür ist *Atf4/ATF4* (*Activating Transcription Factor 4*), welches bei der Maus zwei und beim Menschen drei uORFs in der 5'-leader Sequenz besitzt, von denen die jeweils am weitesten 3'-wärts gelegenen mit dem *Atf4/ATF4*-kodierenden ORF überlappen. Das Gen wird ubiquitär exprimiert, aber das Genprodukt ist nur in geringen Mengen in den Zellen nachweisbar (VALLEJO *et al.* 1993). Bei Stress, wie z.B. Hypoxie, nimmt der Gehalt an ATF4-Protein in den Zellen zu, ohne dass die Menge an mRNA ansteigt (YUKAWA *et al.* 1999). Es konnte auch gezeigt werden, dass die mRNA mit niedermolekularen Polyribosomen und Monoribosomen assoziiert ist, was eine effiziente Translation verhindert. Nach Stresseinwirkung wurden höhermolekulare Ribosomen nachgewiesen, was die Aufhebung der Repression der Translation anzeigt. Im *Reporter Gene Assay* mit der 5'-UTR von *ATF4* fanden HARDING *et al.* (2000), dass die uORFs für die Repression essentiell sind. Die bisher charakterisierten Proteine, die von solchen uORFs kodiert werden, haben keine gemeinsame Konsensussequenz und greifen auf unterschiedlichen Wegen in die Translation ein (MORRIS und GEBALLE 2000).

Neben den uORFs können auch Sekundärstrukturen der mRNA die Initiation der Translation in höheren Eukaryoten beeinflussen (KOZAK 1991). Diese, insbesondere bei hohem GC-Gehalt vorhandenen Sekundärstrukturen können dabei sowohl 5'- als auch 3'-wärts vom Translationsinitiationscodon AUG liegen. Während die 5'-wärts gelegenen meist einen negativen Einfluss haben, etwa in dem sie die Ribosomenbindung verhindern, haben 3'-wärts gelegene eher positiven Einfluss. Durch die Verlangsamung des Ribosoms in diesem Bereich wird das Startcodon besser erkannt, besonders wenn es sich in einem schwachen Sequenzkontext befindet (KOZAK 1991). KOZAK (1989) beschrieb, dass bereits eine Struktur mit einer freien Energie von -30 kcal/mol die Initiation der Translation inhibieren kann, wenn sie sich im 5'-Bereich innerhalb von 12 Nukleotiden nach der CAP befindet, da sie die Bindung der 40S-Ribosomenuntereinheit verhindert. Sekundärstrukturen, die weiter von der CAP entfernt, aber immer noch vor dem AUG liegen, benötigen etwa -50 kcal/mol, um das Vorankommen der Ribosomen zu unterbinden (KOZAK 1986). Im Rahmen einer *in silico*-Analyse mit Hilfe des Programms *mfold* ([www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold](http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold), ZUKER 1989) wurden daher auch die Startexons der *SCAPININ/Scapinin*-Gene auf die Ausbildung möglicher stabiler Sekundärstrukturen auf RNA-Ebene hin untersucht. In Tabelle 8 sind die Anzahl der möglichen Faltungen und die errechneten freien Energien zusammengefasst und

im Anhang (Anlagen 21 & 22) ist für jedes Startexon die energetisch günstigste Struktur abgebildet. Die Ergebnisse dieser *in silico*-Analyse zeigen, dass auch am *SCAPININ/Scapinin*-Locus mit hoher Wahrscheinlichkeit stabile Sekundärstrukturen gebildet werden. Natürlich ist die Komplexität der erhaltenen Strukturen sowie deren freie Energie abhängig von der Länge der analysierten Sequenz, dennoch bilden beispielsweise die Startexons 1A und 1D der Maus und des Menschen laut dieser Befunde die in Abbildung 37 gezeigten Haarnadelstrukturen mit einer freien Energie von bis zu -78,4 kcal/mol. Sie könnten also durchaus eine regulatorische Wirkung auf die Translation haben, wie es beispielsweise für das Gen *p27<sup>Kip1</sup>* beschrieben wurde (GOPFERT *et al.* 2003).

**Tab.8:** Berechnung möglicher Sekundärstrukturen der Startexons von *SCAPININ/Scapinin*. Die Anzahl und die freie Energie (dG) der mittels *mfold* berechneten möglichen Faltungen jedes Startexons sind für den Menschen (links) und für die Maus (rechts) zusammengefasst.

Exon	Mensch		Maus	
	Anzahl	dG (kcal/mol)	Anzahl	dG (kcal/mol)
1A	4	-62,6 bis -61,7	8	-50,1 bis -48
1B	23	-226 bis -214,8	21	-203,9 bis -194,1
1C	1	-38,1	17	-50,2 bis -47,8
1D	11	-78,4 bis -74,9	6	-38,3 bis -36,5



**Abb.37:** Ausgewählte mRNA-Sekundärstrukturen der Startexons 1A und 1D. Abgebildet sind die mit dem Programm *mfold* berechneten Haarnadelstrukturen mit möglicherweise regulatorischer Wirkung von Exon 1A des Menschen (A) und der Maus (B) sowie von Exon 1D des Menschen (C) und der Maus (D).

Das Gen *p27<sup>Kip1</sup>* ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt, indem es an cyclinabhängige Kinasen bindet und deren Aktivität beeinflusst. Daher wird auch die Translation von *p27* zellzyklusmäßig reguliert und ist am stärksten in der G1-Phase. Dies geschieht über Strukturen in der 5'-UTR der mRNA, die einen uORF und eine GC-reiche Region enthält, die laut dem RNA-Struktur-Vorhersageprogramm *mfold* stabile Haarnadelstrukturen bilden kann. Deletionsexperimente zeigten, dass bei diesem Gen nicht die Länge des uORFs oder das von ihm kodierte Protein regulativ wirkt. Entscheidend ist die Sequenz um das uAUG herum in Verbindung mit GC-reichen Haarnadelstrukturen, um eine effiziente Translation zum richtigen Zeitpunkt zu gewährleisten (GOPFERT *et al.* 2003). Die Funktion der GC-reichen Sequenz liegt möglicherweise in ihrer Fähigkeit, verschiedene stabile Sekundärstrukturen zu bilden und somit verschiedene Proteine zu rekrutieren oder ribosomale Faktoren zu beeinflussen. Dass Proteine an Sekundärstrukturen von mRNAs binden, zeigt das Beispiel des *trans-activation response element* (TAR) im 5'-Bereich des HI-Virus Typ 1. TAR bildet eine stabile Haarnadelstruktur, die die Translation inhibiert und an die virale und zelluläre Proteine binden. Das viruseigene Tat-Protein aktiviert die virale Genexpression, während das zelluläre La-Autoantigen die translationsinhibierende Wirkung der Haarnadelstruktur abschwächt (SVITKIN *et al.* 1994). Beim *bovine viral diarrhoea virus* ist die Bildung eines *stem-loops* im 5'-Bereich sogar essentiell für eine effiziente Translation (YU *et al.* 2000).

Die hier angeführten Beispiele zeigen, dass die Struktur des *SCAPININ/Scapinin*-Locus eine Vielzahl an Möglichkeiten zur gewebe- und entwicklungspezifischen Regulation bietet, besonders vor dem Hintergrund, dass einige, aber eben nicht alle, *Scapinin*-Transkripte bereits sehr früh während der Entwicklung des Maushirns nachweisbar sind und bis ins adulte Stadium aktiv bleiben (vgl. Abbildung 22).

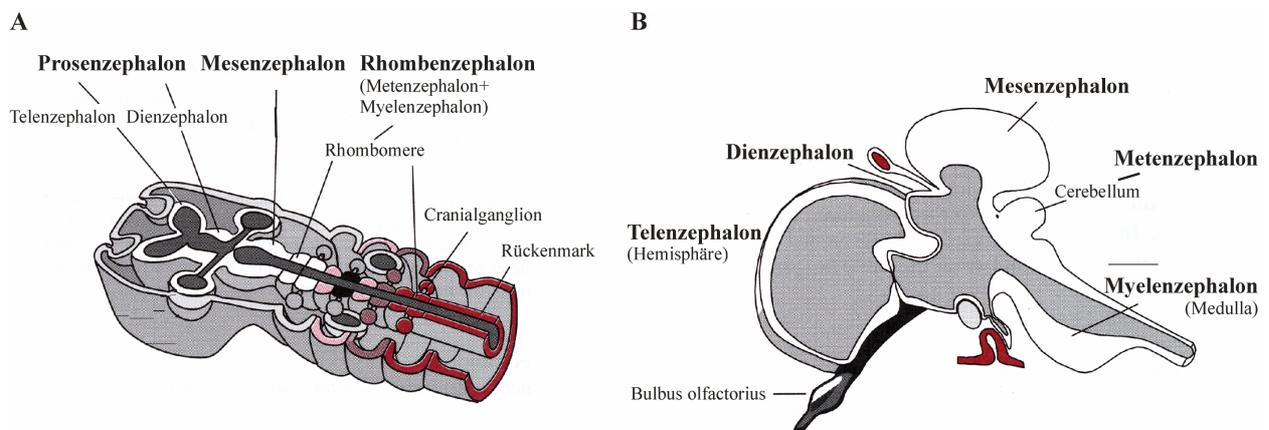
## 4.2. Analyse der Expression von *Scapinin* während der Entwicklung der Maus

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass das *SCAPININ/Scapinin*-Gen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus hauptsächlich im Hirn transkribiert wird. Zwar wurde es auch in den Gonaden detektiert, doch konnte in Northern Blot- und RT-PCR-Analysen weder in Testis noch in Ovar eine ähnliche Vielzahl an Transkripten wie im Hirn nachgewiesen werden (vgl. Abbildungen 8, 10 & 11 für Mensch sowie 19 & 22 für Maus).

### 4.2.1. Hirnentwicklung

Die genaue biologische Funktion der verschiedenen *Scapinin*-Transkripte ist bisher nicht bekannt. Die distinkten Veränderungen im Expressionsmuster könnten aber sowohl auf eine

Beteiligung des *Scapinin*-Gens an der Hirnentwicklung der Maus hindeuten, als auch eine Rolle bei der Erhaltung von Strukturen oder eines physiologischen Zustandes anzeigen. Im Gegensatz zur sehr gut untersuchten und beschriebenen anatomischen Entwicklung des Maushirns (RUGH 1990), ist das für die korrekte Ausbildung einer neuronalen Diversität mitverantwortliche Genexpressionsmuster bis heute erst in Ansätzen verstanden. Kaskaden von Transkriptionsfaktoren in so genannten Signalzentren sind an der frühen Musterbildung im zentralen Nervensystem beteiligt. Zahlreiche solcher Signalzentren finden sich an verschiedenen Stellen im sich entwickelnden Hirn und kontrollieren das Schicksal der angrenzenden Strukturen (KIECKER und LUMSDEN 2005). Signalzentren werden von bestimmten Zellen gebildet und sezernieren lösliche Proteine, welche durch Induktion oder Repression einzelner Signalwege die Entwicklung der umgebenden Zellen beeinflussen. Bereits während der Gastrulation sendet das dorsale Mesoderm Signale in Form von Noggin- und Chordin-Proteinen an das darüber liegende Ektoderm, die dessen Entwicklung zum neuralen Gewebe festlegen (MÜLLER 1997). Unter anderem durch Interaktionen der *Sonic hedgehog* und BMP (*bone morphogenetic protein*) Signalwege wird die dorso-ventral-Achse angelegt (BRISCOE und ERICSON 2001). Auch die anterior-posterior-Achse wird, neben anderen Genen, durch die Expression von *Otx2* (anterior) und *Gbx2* (posterior) in gegenüberliegenden Domänen festgelegt (CHAMBERS und MASON 2006). Am sechsten Tag nach der Befruchtung (dpc) ist die Nidation des Embryos abgeschlossen und bereits kurz danach entstehen Kopffalte und Neuralplatte bzw. Neuralrinne (RUGH 1990). Abbildung 38 zeigt nachfolgende Entwicklungsstufen des Säugerhirns und dient der Veranschaulichung der im Ergebnisteil untersuchten Hirnareale (vgl. 3.2.2.1.)



**Abb.38:** Schematische Darstellung der Entwicklung des Säugerhirns. Abbildung (A) zeigt eine frühe Entwicklungsstufe mit den drei primären Hirnvesikeln Pros-, Mes- und Rhombenzephalon. In (B) ist das Hirn etwas später, mit seinen fünf Hauptbestandteilen Tel-, Di-, Mes-, Met- und Myelenzephalon, dargestellt (nach MÜLLER 1997).

Am achten Tag ist das Neuralrohr schon teilweise geschlossen und die drei primären Hirnvesikel, Prosenzephalon, Mesenzephalon und Rhombenzephalon bilden sich. Das Prosenzephalon geht aus der *Otx2*-Domäne hervor, das Rhombenzephalon entsteht im Bereich der *Gbx2*-Expression. Dazwischen befindet sich ein Signalzentrum, der *midbrain-hindbrain-organizer* (MHB) (RAIBLE und BRAND 2004, WURST und BALLY-CUIF 2001), auch Isthmus genannt, der die weitere Entwicklung dieser Region kontrolliert. Durch nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren wie *Pax2*, *Pax5*, *Pax8*, *En1* und *En2* wird die Entwicklung des Mesenzephalons, durch *Hox*-Gene die Entwicklung des Rhombenzephalons gesteuert (CHAMBERS und MASON 2006, LUMSDEN 2004, PRAKASH und WURST 2004). Andere Transkriptionsfaktoren wie *Dlx*, *Emx*, *Fox* und *Six* regulieren die weitere Entwicklung des Prosenzephalons (KIECKER und LUMSDEN 2005). Das Prosenzephalon unterteilt sich weiter in Telenzephalon und Dienzephalon, aus dem Rhombenzephalon gehen Metenzephalon und Myelenzephalon hervor. Zu diesem Zeitpunkt (8 dpc) können mittels RT-PCR bereits *Scapinin*-Transkripte mit den Startexons 1A und 1B nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 22). Am neunten Tag bilden die Neuralleisten unabhängige Einheiten, aus denen die Spinalganglien und weite Teile des vegetativen Nervensystems entstehen (MÜLLER 1997). Nach 10 Tagen ist das Hirn in seine fünf Hauptstrukturen einteilbar, die Verbindung mit den ersten Hirnnerven aufnehmen. Zu diesem Zeitpunkt wird die Expression des 2,9 kb-Transkriptes im Northern Blot detektierbar (vgl. Abbildung 21) und die RT-PCR zeigt erstmals *Scapinin*-Transkripte mit Exon 1D (vgl. Abbildung 22). Bis zum 15. Tag nimmt das Hirn an Größe zu, weitere Nervenverbindungen werden etabliert und weitere Strukturen werden sichtbar. Aus dem Telenzephalon entstehen u. a. Bulbus olfactorius, die Großhirnhemisphären und der Neocortex, aus dem Dienzephalon Thalamus und Hypothalamus. Aus dem Metenzephalon werden Cerebellum und Pons, das Myelenzephalon bildet die Medulla oblongata. Im Northern Blot kann vom 15. Tag pc an zusätzlich das 3,3 kb-Transkript detektiert werden (vgl. Abbildung 21) und mittels RT-PCR sind jetzt alle vier Startexons nachweisbar (vgl. Abbildung 22). Am 17. Tag treten der olfaktorische und der optische Nerv aus dem Telenzephalon bzw. dem Dienzephalon hervor und an Tag 18 beginnt das Cerebellum seine charakteristischen Querfaltungen, die erst einige Zeit nach der Geburt abgeschlossen werden. Möglicherweise korreliert die Expression des 2,5 kb Transkriptes von *Scapinin* mit der Entwicklung des Cerebellums, da es im Northern Blot erst perinatal detektierbar ist (vgl. Abbildung 21) und im adulten Hirn am stärksten im Cerebellum exprimiert wird (vgl. Abbildung 20).

#### 4.2.2. Gonadenentwicklung

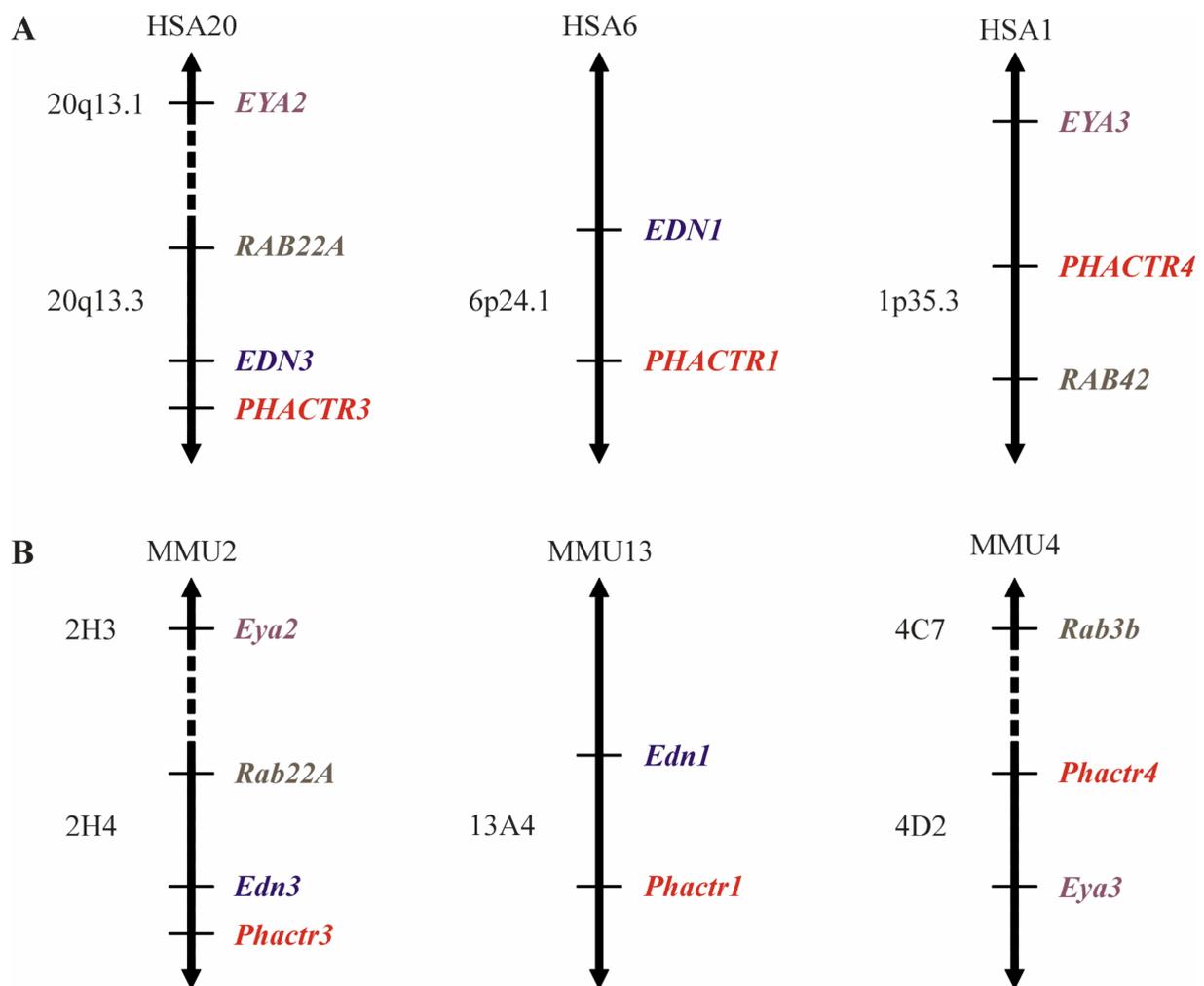
Die Entwicklung der Gonaden verläuft bis zum 13. Tag pc bei beiden Geschlechtern zum größten Teil gleich, erst danach werden die Unterschiede deutlich sichtbar (RUGH 1990). Für die entwicklungspezifische Analyse der *Scapinin*-Expression in den Gonaden der Maus standen allerdings nur zwei postnatale Stadien, neugeboren und adult, zur Verfügung (vgl. Abbildung 22). Wie bereits erwähnt, ist die nachweisbare gonadenspezifische Expression von *Scapinin* bei der Maus bei Weitem nicht so variabel wie im Hirn, dennoch konnte auch während der postnatalen Gonadenentwicklung ein distinktes Muster der verschiedenen Startexon-spezifischen Transkripte dargestellt werden. Auffällig ist zum einen die Tatsache, dass Spleißvarianten mit Exon 1C weder bei neugeborenen noch adulten Tieren nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus gibt es auch einen Unterschied bezüglich der nachweisbaren Spleißvarianten zwischen den untersuchten Stadien der Gonaden. Während bei neugeborenen Mäusen sowohl in Testis als auch in Ovar noch insgesamt drei verschiedene Transkriptvarianten mit den Startexons 1A, 1B und 1D detektiert werden konnten, scheint es während der Entwicklung zum adulten Tier zu Umstellungen der *Scapinin*-Expression im Ovar zu kommen. Im Zuge dieser Veränderungen gehen die 1B- und 1D-Transkripte verloren, so dass hier nur noch eine Spleißvariante mit Exon 1A nachgewiesen wurde.

Für die anderen Mitglieder der von ALLEN *et al.* (2004) postulierten *Phactr*-Familie sind entwicklungspezifische Daten bisher nicht bekannt, so dass ein Vergleich mit *Scapinin* (*Phactr-3*) hier nicht möglich ist. Das gewebespezifische Expressionsmuster, zumindest von *Phactr-1* und *Phactr-2*, ist allerdings nicht so spezifisch wie das von *Scapinin*, sondern diese beiden Gene werden ubiquitär exprimiert (ALLEN *et al.* 2004, ISHIKAWA *et al.* 1998, NAGASE *et al.* 2000).

#### 4.3. Entstehung von Genfamilien und vergleichende Analyse der *Phactr*-Familie

Neben dem gewebespezifischen Expressionsmuster scheint auch die Struktur des *SCAPININ/Scapinin*-Gens (*phactr-3*) einen Unterschied zu den anderen *PHACTR/Phactr*-Genen darzustellen, da für diese bisher kein so komplexer Aufbau beschrieben wurde wie hier für *SCAPININ/Scapinin*. Aufgrund der Tatsache, dass alle vier *PHACTR/Phactr*-Proteine mit Aktin und PP1 interagieren können, wurden sie zur Genfamilie der *phosphatase and actin regulators* (*Phactr*) zusammengefasst (ALLEN *et al.* 2004). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind fast 8000 humane Gene über 1300 Genfamilien zugeordnet, die sich in sechs funktionale Klassen einteilen lassen (SHARMA *et al.* 2005). Genfamilien entstanden in der Evolution überwiegend durch Duplikation von Chromosomenabschnitten, einzelnen Chromosomen und

ganzer Genome (Polyploidisierung) (VANDEPOELE *et al.* 2004). Außer für *PHACTR-2* gibt es auch bei der chromosomalen Lokalisation der einzelnen *PHACTR*-Gene Hinweise auf solche Ereignisse. Wie in Abbildung 39A dargestellt, liegt *SCAPININ*, also *PHACTR-3* auf Chromosom 20q13 unmittelbar distal vom *ENDOTHELIN 3*-Gen (*EDN3*). Diese Anordnung stimmt augenscheinlich mit der Lokalisierung von *ENDOTHELIN 1* (*EDN1*) proximal zu *PHACTR-1* auf HSA6p24 überein. In der gleichen chromosomalen Region wie *SCAPININ* befinden sich darüber hinaus weitere, zu bestimmten Genfamilien gehörende Gene, was auf Duplikationsereignisse schließen lässt. So liegt auf HSA20q13 ebenfalls proximal von *SCAPININ* das Gen *RAB22A* und ein anderes Mitglied der *RAB*-Familie, *RAB42* kartiert auf Chromosom 1p35 distal vom *SCAPININ*-ähnlichen *PHACTR-4*. Auch die beiden Gene *EYA2* und *EYA3* liegen jeweils proximal von *SCAPININ* auf HSA20q13 bzw. auf HSA1p35, proximal von *PHACTR-4*. Bei der Lokalisation der orthologen Gene im Mausgenom verhält es sich ganz ähnlich (Abbildung 39B). Lediglich die Lage der Gene *Eya3* und *Rab3b* zu *Phactr4* ist invertiert, was auf chromosomale Rearrangements nach der Trennung von Mensch und Maus hindeutet. Geht man von einem gemeinsamen Ursprung der einzelnen Mitglieder der *PHACTR/Phactr*-Familie aus, so sind die offensichtlichen Gemeinsamkeiten, insbesondere in der Struktur der jeweils kodierten Proteine nicht verwunderlich. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus gibt es zwei Abschnitte mit hohen Homologien (ALLEN *et al.* 2004, SAGARA *et al.* 2003). Im Bereich des N- sowie des C-Terminus befinden sich so genannte RPEL-repeats, bezeichnet nach den Aminosäuren Arginin, Prolin, Glutaminsäure und Leucin. Beim *myocardin-related SRF coactivator* (MAL), der zwei RPEL-repeats am N-Terminus trägt, sind sie für die Bindung an Aktin essentiell. Die Mutation dieser Bindestellen verhindert die Interaktion und somit den Transport von MAL in den Zellkern, so dass er als Co-Aktivator des Transkriptionsfaktors SRF fehlt (MIRALLES *et al.* 2003). Die Tatsache, dass *SCAPININ* zumindest in HL-60 Zellen hauptsächlich im Zellkern gefunden wurde (SAGARA *et al.* 2003) und dass es ebenfalls mit Aktin interagieren kann, lässt vermuten, dass dieser Lokalisation ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegen könnte. Desweiteren befindet sich im Bereich von Exon 5 des *SCAPININ/Scapinin*-Gens, das beim Menschen alternativ herausgespleißt wird, eine Prolin-reiche Region. Bei der Ena/vasodilator-stimulierten Phosphoprotein (VASP)-Proteinfamilie, die ebenfalls an Aktin binden kann und so zahlreiche Aktin-basierte zelluläre Prozesse reguliert (LOUREIRO *et al.* 2002), dient eine Prolin-reiche Region als Bindestelle für verschiedene Proteine. Dazu gehören z. Bsp. die Profiline, kleine Proteine, die Komplexe mit Aktin-Monomeren bilden können (REINHARD *et al.* 1995), sowie Proteine mit WW- und SH3-Domänen (ERMEKOVA *et al.* 1997, GERTLER *et al.* 1996).



**Abb.39:** Chromosomale Lokalisation der *PHACTR/Phactr*-Gene im Humangenom (A) und Mausgenom (B). In rot dargestellt sind die Gene *PHACTR-3* (*SCAPININ*) auf HSA20q13 bzw. MMU2H4, *PHACTR-1* auf 6p24 bzw. MMU13A4 und *PHACTR-4* auf 1p35 bzw. MMU4D2. Die Mitglieder anderer Genfamilien, die Hinweise darauf geben, dass Duplikationen im Genom zur Entstehung der *PHACTR*-Familie führten, sind blau (*EDN*), braun (*RAB*) und violett (*EYA*) hervorgehoben (nach [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)).

Die Entwicklung und Bedeutung von Genfamilien wie sie die Gruppe der *PHACTR/Phactr*-Gene darstellt, lässt sich sehr gut am Beispiel des *Hox*-Genclusters darlegen (PRINCE 2002). Die *Hox*-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die eine hoch konservierte, 60 Aminosäuren umfassende DNA-bindende Domäne, die Homeodomäne, besitzen. Diese Transkriptionsfaktoren sind entscheidend an der Ausbildung der primären Körperachse des Embryos und dessen Segmentierung beteiligt. Alle mehrzelligen Organismen, bis auf einige Schwämme, scheinen solche *Hox*-Gene zu enthalten. Invertebraten besitzen nur ein einzelnes *Hox*-cluster welches z.B. bei *Drosophila* aus acht Genen besteht und beim Lanzettfischchen (*Amphioxus*) aus 14. Vergleichende Analysen dieser beiden Cluster zeigten, dass beide auf

einen gemeinsamen Vorläufer mit sieben Genen zurückgehen (DE ROSA *et al.* 1999), welcher wiederum durch Duplikationen eines Urgens entstanden ist. Durch Duplikationen des gesamten Clusters bzw. ganzer Chromosomen besitzen Wirbeltiere mehrere *Hox*-Cluster. Tetrapoden besitzen vier Cluster, Fische bis zu sieben.

Nach der Verdopplung eines Urgens ist aber weiterhin nur eine Kopie nötig, um die ursprüngliche Funktion aufrecht zu erhalten. Es gibt zwei Modelle, die versuchen zu erklären, wie beide Kopien erhalten bleiben konnten und es somit überhaupt erst zur Bildung von Genfamilien kommen konnte. Das klassische Modell besagt, dass eine Kopie des Urgens dazu neigt, Mutationen zu akkumulieren, die häufig mit der Degeneration dieses Gens einhergehen. Es können auch beide erhalten bleiben, die dann redundante Funktionen haben und zusätzlich neue Funktionen erlangen (PRINCE und PICKETT 2002). Das zweite Modell, das Duplikation-Degeneration-Komplementation-Modell (FORCE *et al.* 1999) postuliert, dass degenerative Mutationen in unterschiedlichen regulatorischen Bereichen oder funktionalen Subdomänen beider Kopien eines duplizierten Gens dazu führen, dass sich die ursprüngliche Funktion auf die beiden Kopien aufteilt, sie sich also gegenseitig komplementieren. Ein Beispiel hierfür sind die Gene *Hoxa3* und *Hoxd3* der Maus, deren jeweilige Nullmutanten unterschiedliche Phänotypen ausbilden. Fehlen *Hoxa3* Transkripte sind aus der Neuralrinne hervorgegangene Strukturen wie Thymus und Thyroidea betroffen (CHISAKA und CAPECCHI 1991, MANLEY und CAPECCHI 1995), während bei *Hoxd3*-Mutanten die ersten Halswirbel verändert sind (CONDIE und CAPECCHI 1993). Doppelmутanten fehlen die Wirbel ganz (CONDIE und CAPECCHI 1994), was auf eine Redundanz in der Funktion dieser Gene hindeutet. Da die *Hoxa3*- und *Hoxd3*-Proteine funktionell austauschbar sind (GREER *et al.* 2000), gehen die nicht-redundanten Funktionen eher auf Unterschiede in der *cis*-Regulation dieser Gene zurück als auf Änderungen ihrer kodierenden Sequenz. Diese Unterschiede in der Genexpression haben entscheidenden Einfluss auf ihre Funktion und sind ein gutes Beispiel für die funktionelle Komplementation duplizierter Gene. Wie bereits besprochen, hebt sich *Scapinin* mit seinem hirn- und gonadenspezifischen Expressionsmuster von den anderen *PHACTR/Phactr*-Genen deutlich ab und bietet aufgrund seiner genomischen Organisation auch zahlreiche Möglichkeiten zur Regulation in *cis*. Betrachtet man die Verteilung der verschiedenen *Phactr*-Transkripte im Hirn der Ratte (ALLEN *et al.* 2004), so unterscheiden sich die einzelnen Expressionsmuster deutlich. Ähnlich verhält es sich bei den Genen *hoxb1a* und *hoxb1b* des Zebrafischs. Es handelt sich bei ihnen um Duplikationen des Maus-Gens *Hoxb1*, die durch degenerative Mutationen in *cis*-regulativen Bereichen unterschiedliche Expressionsmuster ausbildeten und sich zu dem ursprünglichen *Hoxb1*-Muster

komplementieren. Das Zebrafischgen *hoxb1b* gleicht der frühen Expression von Maus *Hoxb1* im Rautenhirn, wogegen die Expression von *hoxb1a* der späten Expression von *Hoxb1* in einem einzelnen Segment des Rautenhirns während der Neurulation entspricht (PRINCE und PICKETT 2002). *Hoxb1*-Nullmutanten der Maus zeigen Veränderungen der neuronalen Identität, denn von Rhombomer-4 abstammende faziale Neuronen unterliegen nicht ihrer typischen posterioren Migration. Knockdown-Experimente beim Zebrafisch zeigten, dass *hoxb1a* ebenfalls für die Migration dieser Neuronen verantwortlich ist, *hoxb1b* an diesem Prozess aber nicht beteiligt ist, sondern stattdessen für die korrekte Segmentierung des Rautenhirns benötigt wird (MCCLINTOCK *et al.* 2001, MCCLINTOCK *et al.* 2002, STUDER *et al.* 1996). Diese Funktion wird in der Maus vom *Hoxa1* Gen übernommen. Dieses *function shuffling* ist vermutlich auf die große Redundanz der Gene der Paraloggruppe 1 zurückzuführen, wird aber auch bei anderen Zebrafisch-Genen beobachtet (PRINCE 2002). MCCLINTOCK *et al.* (2002) vermuteten, dass dieses *function shuffling* auf einen Abschnitt in der Genomevolution der Vertebraten zurückgeht, in dem es partielle funktionale Redundanz zwischen nicht-orthologen Genen gab.

Die Wechselwirkung von Scapinin mit EF-1 $\gamma$  (STELZL *et al.* 2005), die für die anderen Phactr-Proteine bisher nicht beschrieben wurde, deutet an, dass es unter ihnen auch nicht-redundante Funktionen geben könnte. Auch die für SCAPININ nachgewiesene direkte Interaktion mit Komponenten der Zellkernmatrix (SAGARA *et al.* 2003) kann zumindest für Phactr-1 ausgeschlossen werden, da ALLEN *et al.* (2004) dieses Protein nur im Cytoplasma, aber nicht im Zellkern von N2a Zellen, einer Neuroblastom-Zelllinie der Maus, nachweisen konnten. Dennoch zeigten ALLEN *et al.* (2004) für das Phactr-1 Protein, dass es acht putative Phosphorylierungsstellen enthält, die möglicherweise die Interaktion mit Aktin und PP1 regulieren. Für die SCAPININ/Scapinin-Proteine wurden durch eine *in silico*-Analyse ebenfalls mehrere putative Phosphorylierungsstellen identifiziert, die über die Interaktionen mit Aktin, PP1 und EF-1 $\gamma$  hinaus einen Einfluss auf dessen Bindung an Komponenten der Zellkernmatrix haben könnten. Mit Hilfe des Programmes NetPhosK (BLOM *et al.* 2004) sowie der auf den vorhandenen cDNA-Sequenzen basierenden Aminosäureabfolge der jeweiligen Genprodukte (Aminosäuresequenzen im Anhang, Anlagen 8, 9 & 16) wurden die in Tabelle 9 dargestellten möglichen Phosphorylierungsstellen im humanen sowie im murinen Protein identifiziert.

**Tab.9:** *In silico*-Untersuchungen zu möglichen Phosphorylierungsstellen im SCAPININ/Scapinin-Protein. Angegeben ist die Position der phosphorylierbaren Aminosäure, die Kinase (Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), Cyclin abhängige Kinase 5 (cdk5)) und der von NetPhosK ermittelte *Score*-Wert für das humane Protein (links) und das der Maus (rechts).

Mensch			Maus		
Aminosäure	Kinase	Score-Wert	Aminosäure	Kinase	Score-Wert
T-18	cdk5	0.71	T-18	cdk5	0.70
S-25	PKA	0.87	S-25	PKA	0.87
T-29	PKC	0.82	T-29	PKC	0.82
T-204	PKC	0.79	S-201	PKC	0.83
T-205	PKC	0.81	T-205	PKC	0.84
S-219	PKC	0.78			
T-242	PKC	0.71			
T-262	PKC	0.86	T-262	PKC	0.86
S-274	PKC	0.76			
T-352	PKC	0.87	T-352	PKC	0.87
S-401	PKC	0.79	S-401	PKC	0.79
S-405	PKC	0.73	S-405	PKC	0.73
T-439	PKC	0.90	T-439	PKC	0.90

Ein Beispiel für die über Phosphorylierungen kontrollierte Interaktion mit der Kernmatrix ist die RNA-Polymerase II, ein Multimer aus verschiedenen Untereinheiten, das die proteinkodierenden Gene in Eukaryoten transkribiert. Ihre größte Untereinheit kann unphosphoryliert oder hyperphosphoryliert sein, wobei die hyperphosphorylierte Form mit bestimmten Regionen der Kernmatrix interagieren kann und somit ein mögliches Bindeglied zwischen Transkriptions- und Spleißfaktoren darstellt (MORTILLARO *et al.* 1996, NIKOLOV und BURLEY 1997, VINCENT *et al.* 1996). Die Kernmatrix selbst ist nicht nur ein dreidimensionales Netzwerk aus Proteinen und RNAs im Inneren des Zellkerns, das die Form des Nukleus aufrecht erhält (BARBORO *et al.* 2002, MIKA und ROST 2005), sondern unterteilt zusätzlich den Kern in Subkompartimente mit unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten (HOZAK *et al.* 1994, MATERA 1999). Neben der regulatorischen Wirkung von Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen auf die Interaktion mit PP1, Aktin oder EF-1 $\gamma$  könnte daher auch die Bindung von SCAPININ an die Kernmatrix auf diese Weise reguliert werden, oder SCAPININ fungiert sogar als Vermittler zwischen Komponenten der Matrix und seinen anderen Interaktionspartnern.

#### 4.4. Analyse der allelspezifischen *Scapinin*-Expression in der Maus

Ausgehend von der Lokalisation des *Scapinin*-Gens innerhalb der Imprinting Region 1 auf Mauschromosom 2, stellte es einen Kandidaten dar, um es auf mögliche elternspezifische Expression hin zu untersuchen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen umfassten 3 verschiedene Loci innerhalb des Gens bei 2 unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Maus. Bei einer ersten Analyse eines Polymorphismus in Exon 11, der vermutlich in allen Transkripten vorhanden ist, zeigte sich, dass am *Scapinin*-Locus beide parentalen Allele, also sowohl von NMRI als auch von *Mus musculus castaneus*, exprimiert werden. Für diese Untersuchungen wurden zwei verschiedene Enzyme verwendet, die jeweils die entgegengesetzte Form der polymorphen Stelle darstellen können und sich damit die vorliegenden Ergebnisse gegenseitig verifizieren lassen.

Wie das im Abschnitt 1.3. bereits beschriebene *Gnas*-Gen zeigt, können einzelne, alternativ gespleißte Transkripte eines Gens in ihrem parentalen Expressionsstatus vom gesamten Locus abweichen. Daher wurden im Folgenden weitere polymorphe Stellen im *Scapinin*-Gen analysiert, mit deren Hilfe einzelne Spleißvarianten charakterisiert werden konnten. Dabei zeigte die Analyse eines Markers in Startexon 1D für hirnspezifische Transkripte bei neugeborenen und 24 Tage alten Mäusen ebenfalls eine Expression von beiden parentalen Allelen. Bei den Untersuchungen von Startexon 1C-enthaltenden Transkripten wurden zwei unterschiedliche Marker verwendet, die übereinstimmende Resultate lieferten. Sie zeigten, dass die F1-Nachkommen beider reziproker Kreuzungen von NMRI und *Mus musculus castaneus* ausschließlich das NMRI-Allel exprimieren.

Um als mögliche Fehlerquelle etwaige Kontaminationen auszuschließen, wurden wie bereits unter 2.2.13. dargelegt, bei allen PCR-Reaktionen Negativkontrollen mitgeführt. Sollte hingegen bereits ein PCR-Produkt die RNA- oder cDNA Pools kontaminieren und würde somit ebenfalls amplifiziert, wäre dies anhand aberranter Banden bei der RFLP-Analyse identifizierbar. Die Verfälschung der Ergebnisse durch kontaminierende genomische DNA kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da die für Expressionsanalyse verwendeten Primer in unterschiedlichen Exons liegen und somit durch das dazwischen liegende Intron kein Produkt bilden können. Da es auch keinerlei Hinweise auf ein intronloses Pseudogen von *Scapinin* gibt, ist davon auszugehen, dass bei der Kreuzung von NMRI mit *Mus musculus castaneus* die F1-Generation ausschließlich das NMRI-Allel von Exon 1C von *Scapinin* exprimiert.

Es ist bekannt, dass bei der Maus die Ausprägung eines Phänotyps durchaus abhängig von den verwendeten Mausstämmen ist. Beim Modell für die Alzheimer-Krankheit beispielsweise wird das *Alzheimer amyloid precursor protein* überexprimiert, woraufhin Tiere aus

Inzuchtstämmen (FVB/N oder C57BL/6J) frühzeitig sterben, ohne den Alzheimer-typischen Phänotyp zu entwickeln. Auszuchtmäuse hingegen überleben und bilden mit ca. 1 Jahr die typischen Plaques im Hirn aus (CARLSON *et al.* 1997).

Auch andere Phänotypen, wie z. Bsp. die uniparentale Expression eines Transgens, sind bei verschiedenen Mauslinien unterschiedlich stark ausgeprägt (CHAILLET 1994, REIK *et al.* 1990, SURANI *et al.* 1988). Als erstes internes Gen, das einem stammspezifischen Imprinting unterliegt, wurde *Kv1qt1* gefunden. JIANG *et al.* (1998) kreuzten weibliche 129/SvEv Mäuse mit männlichen *Mus musculus castaneus* und fanden in mehreren Entwicklungsstadien der F1-Generation vom frühen Embryo bis zum adulten Tier maternale Expression in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme von Hirn, wo eine biparentale Expression nachgewiesen wurde. Bei der reziproken Kreuzung ist in den postnatalen Stadien eine gleich starke Expression beider parentalen Allele vorhanden (JIANG *et al.* 1998).

Für das *Atp10c*-Gen der Maus berichteten KASHIWAGI *et al.* (2003) von maternaler Expression im Bulbus olfactorius und im Hippocampus von F1-Mäusen der reziproken Kreuzungen von C57BL/6J und JF1. Bei Kreuzungen der Stämme PWK (*Mus musculus*) und C57BL/6J wurde aber keine uniparentale Expression von *Atp10c* in diesen Geweben gefunden (KAYASHIMA *et al.* 2003).

Dass die Expression der parentalen Allele eines Gens variiert und nicht immer im 50:50 Verhältnis steht, ist nichts Ungewöhnliches, sondern scheint die genetische Basis der Individualität zu sein (JOHNSON und PORTER 2000, LEVINE 2002, LO *et al.* 2003). Gründe dafür sind möglicherweise langsame, reversible stochastische Fluktuationen der Genexpression, epigenetische Faktoren oder Polymorphismen in regulatorischen Sequenzen (RASER und O'SHEA 2005). YAN *et al.* (2002) untersuchten die allelische Genexpression bei verschiedenen Genen des Menschen und fanden, dass Unterschiede im Transkriptionslevel der parentalen Allele einer Person nichts Ungewöhnliches bei normalen Individuen sind. In ihrer Studie entdeckten sie Abweichungen von bis zu 30%. Eine solche allelische Variation oder Imbalance scheint im vorliegenden Fall der *Scapinin-1C*-Transkripte nicht vorzuliegen, da überhaupt nur ein Allel nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich auch nicht um ein klassisches Imprintingphänomen, da die Vererbung weder maternal noch paternal gerichtet verläuft, sondern es wurde eine dominierende Expression bezogen auf einen Mäusestamm gefunden. Einige, im weitesten Sinne, epigenetische Phänomene, die als Modellvorstellungen für den *Scapinin-1C*-Expressionsstatus herangezogen werden können, sind in Tabelle 10 kurz beschrieben.

**Tab.10:** Übersicht über einige epigenetische Phänomene, die mit Veränderungen der allelischen Expression einhergehen können.

### **Genomisches Imprinting**

Geprägte Gene sind hinsichtlich ihres elterlichen Ursprungs markiert und werden nur von einem der beiden homologen parentalen Allele exprimiert. Diese elternspezifische Genregulation wird durch epigenetische Regulationen der DNA und des Chromatins kontrolliert (ALLEMAN und DOCTOR 2000, FERGUSON-SMITH *et al.* 2003).

### **Paramutation**

Paramutation wurde zuerst bei Mais beobachtet (BRINK 1956) und bezeichnet die mitotisch und meiotisch vererbare Veränderung eines Allels durch sein homologes in *trans*. Dieser Vorgang beinhaltet Veränderungen der Chromatinstruktur und der DNA-Methylierung (CHANDLER und STAM 2004).

### **Transvection**

Transvection ist ein nicht vererbbarer Einfluß eines Genlocus auf die Expression des homologen Allels, oft durch die Aktivität von Enhancern in *trans* (DUNCAN 2002).

### **X-Inaktivierung**

Dosiskompensation durch Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen von weiblichen Säugetieren durch Heterochromatinisierung (CHOW und BROWN 2003).

### **Allelic Exclusion**

Ein Prozess, bei dem nur ein Allel einer leichten bzw. schweren Immunglobulinkette innerhalb einer Zelle transkribiert wird (ALT *et al.* 1980, PERNIS *et al.* 1965).

### **Positionseffekt**

Wenn durch chromosomale Veränderungen euchromatische Gene in die Nähe von Heterochromatin verlagert werden, so kann sich dieses ausbreiten und zur transkriptionellen Inaktivierung dieser Gene führen (REUTER und SPIERER 1992).

### **RNA Interferenz**

RNA-Interferenz ist ein Mechanismus, bei dem doppelsträngige RNA den Abbau homologer RNA induziert, aber auch an der Methylierung von DNA, Bildung von Heterochromatin und der Repression der Translation beteiligt sein kann (CERUTTI 2003).

### **RNA abhängige DNA-Methylierung**

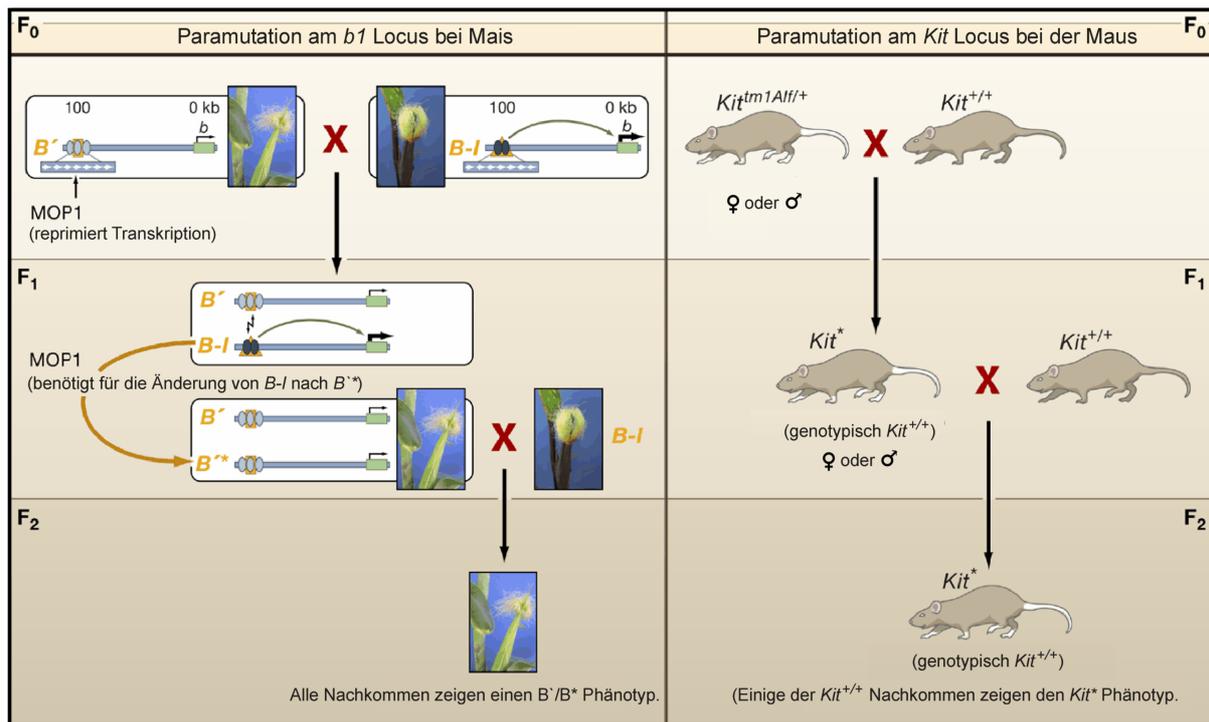
Ein in Pflanzen beobachtetes Phänomen, bei dem eine transkribierte RNA als Signal für die Methylierung der komplementären DNA-Sequenz dient (MELQUIST und BENDER 2003, METTE *et al.* 2000, WASSENEGGER *et al.* 1994).

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression von *Scapinin-1C*-Transkripten sowohl bei NMRI als auch bei *Mus musculus castaneus* in der Parentalgeneration nachgewiesen wurde und die Transkription der *M. m. castaneus*-Allele erst in der F1-Generation reprimiert wird, könnte das NMRI-Allel einen Einfluss auf den Expressionsstatus seines Homologen haben. Somit könnte es sich im vorliegenden Fall um eine Paramutation oder eine Transvection handeln. Beide Phänomene werden bei der Maus in der aktuellen Literatur als Paramutations-ähnlicher Effekt zusammengefasst und unterscheiden sich dadurch, dass die Transvection im Unterschied zur Paramutation nur mitotisch, nicht aber meiotisch stabil sein soll (ASHE und WHITELAW 2007). Die Ausprägung der Paramutation beruht auf der Wirkung eines paramutagen wirkenden Allels, das die Expression seines homologen, paramutierbaren Allels

beeinflusst (CHANDLER und STAM 2004). Diesem Modell entsprechend würde das *Scapinin-1C*-Allel von NMRI-Mäusen als paramutagen und das von *M. m. castaneus* als paramutierbar eingestuft werden können.

Die Paramutation wurde vornehmlich in Mais untersucht (BRINK 1956) und ein klassisches Beispiel ist das in Abbildung 40 links dargestellte *booster*-Gen (*b1*). Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für die Bildung von violetten Anthocyanpigmenten verantwortlich ist. Pflanzen, die homozygot für das *B-I*-Allel sind, zeigen eine starke *b1*-Expression und sind daher violett. Wenn das *B'*-Allel homozygot vorliegt, wird *b1* schwach exprimiert und die Pflanzen sind nur leicht pigmentiert. Treffen beide Allele aufeinander, so wird die Expression des paramutierbaren *B-I*-Allels auf das Niveau von *B'* herunterreguliert. Dieses veränderte *B''*-Allel verhält sich in der nächsten Generation wie das paramutagene *B'*-Allel (COE 1966). Entscheidend für die Regulation dieses Effektes sind Tandemwiederholungen, die 100 kb stromaufwärts vom *b1*-Locus lokalisiert sind. Die Sequenz dieser Wiederholungen ist beim *B-I*- und beim *B'*-Allel identisch, die DNA ist aber unterschiedlich methyliert und das Chromatin am *B-I*-Allel ist offener (STAM *et al.* 2002a). Des Weiteren wird eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, der so genannte *mediator of paramutation* (*mop1*), benötigt, um *small interfering RNAs* (siRNAs) aus dem Bereich der Tandemwiederholungen zu bilden (ALLEMAN *et al.* 2006). Diese siRNAs vermitteln zwischen den *B-I*- und *B'*-Allelen, um einen distinkten Chromatinstatus zu etablieren (CHANDLER 2007).

Bei der Maus wurden bis heute vier Loci beschrieben, die einem Paramutations-ähnlichem Effekt unterliegen (HATADA *et al.* 1997, RASSOULZADEGAN *et al.* 2002, HERMAN *et al.* 2003, RASSOULZADEGAN *et al.* 2006). Für das *Kit*-Gen, einen Tyrosin Kinase Rezeptor, ist der Effekt in Abbildung 40 rechts dargestellt. Mäuse, die heterozygot für einen *Kit-Knock out* sind (*Kit<sup>tm1Alf/+</sup>*) exprimieren weniger *Kit*-mRNA als der Wildtyp und haben weiße Schwanzspitzen und weiße Füße. Kreuzt man diese Tiere untereinander oder mit Wildtyp-Mäusen, so zeigen einige der Nachkommen (*Kit\**) die genotypisch homozygot Wildtyp sind den Phänotyp der heterozygoten *Knock out* Tiere mit reduziertem mRNA Level, weißen Schwanzspitzen und weißen Füßen (RASSOULZADEGAN *et al.* 2006). Dabei war es egal, ob die Mutter oder der Vater heterozygot für den *Knock out* war. Darüber hinaus fanden die Autoren, dass der Phänotyp mit dem Abbau von *Kit*-mRNA und der Anhäufung von nicht-polyadenylierten RNAs unnormaler Größe einherging. Die Injektion von Gesamt-RNA von *Kit<sup>tm1Alf/+</sup>*-Mäusen sowie *Kit*-spezifischen miRNAs in befruchtete Eizellen induzierte den beobachteten Phänotyp. Somit scheint die epigenetische Vererbung des Phänotyps auf einem zygotischen Transfer von RNA Molekülen zu beruhen (RASSOULZADEGAN *et al.* 2006).



**Abb.40:** Paramutation bei Mais und Maus. Auf der linken Seite ist der Mechanismus der Paramutation für das *booster*-Gen (*b1*) bei Mais, mit starker Expression am *B-I*-Locus in violetten Pflanzen und schwacher Expression am *B'*-Locus in grünen Pflanzen, dargestellt. Das orangefarbene Dreieck bzw. Viereck symbolisieren den unterschiedlichen Methylierungsstatus der sieben Tandemwiederholungen (blauer Balken mit weißen Pfeilen), die sich ca. 100 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstart befinden. Die sich daraus ergebende potentiell unterschiedliche Assoziation mit verschiedenen Proteinen ist durch hell- und dunkelblaue Ellipsen gekennzeichnet. Innerhalb der Wiederholungen soll sich ein Enhancer befinden, der die Expression des *b1*-Gens induziert (grüner Pfeil), wenn sich das Chromatin im *B-I*-Status befindet. Vermutlich sind RNAs für die Veränderung des *B-I*-Allels zum *B\**-Allel verantwortlich, da sowohl *mop1* als auch die transkribierten Tandemwiederholungen benötigt werden. *Mop1* ist darüber hinaus essentiell für die Reprimierung der Transkription am *B'*-Locus.

Im rechten Teil der Abbildung ist die Paramutation am *Kit*-Locus der Maus dargestellt. Mäuse, die heterozygot für einen *Knock out* des *Kit*-Gens sind, haben weiße Schwanzspitzen und weiße Füße. Kreuzt man diese mit Wildtyp-Mäusen, so zeigen viele Nachkommen, obwohl sie genotypisch Wildtyp sind, ebenfalls den beschriebenen Phänotyp (*Kit\**). Dies wurde mit einer geringen Frequenz auch in der F<sub>2</sub>-Generation beobachtet. (verändert nach Chandler 07)

Sowohl der Paramutations-ähnliche Phänotyp am *Kit*-Locus (RASSOULZADEGAN *et al.* 2006), als auch die drei anderen Gene der Maus, die einem solchen Effekt unterliegen (HATADA *et al.* 1997, RASSOULZADEGAN *et al.* 2002, HERMAN *et al.* 2003) beruhen ausschließlich auf transgenen Mäusen bzw. deren Nachkommen. Das bedeutet, dass die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse für *Scapinin* 1C-Transkripte den ersten Paramutations-ähnlichen Effekt für ein internes Mausgen darstellen.

Obwohl die Mechanismen, die für die Gene *booster* (PATTERSON *et al.* 1993, STAM *et al.* 2002a, STAM *et al.* 2002b) und *red* (KERMICLE *et al.* 1995, ALLEMAN und DOCTOR 2000, WALKER und PANAVALAS 2001) in Mais beschrieben wurden und letztendlich zum Phänotyp der Paramutation führen, sehr unterschiedlich sein können, sind immer Veränderungen der Chromatinstruktur und der DNA-Methylierung nachweisbar. Für letzteres könnten die in Abbildung 32 und in den Anlagen 18 & 19 dargestellten CpG-Inseln im 5'-Bereich des *Scapinin*-Gens in Frage kommen. Sollten sie differentiell methyliert sein und als Kontrollregion wirken, hätten sie möglicherweise Einfluss auf die Expression des weiter 3'-wärts gelegenen Exons 1C. Beim *Gnas*-Gen befindet sich, wie in Abbildung 2 bereits gezeigt, im Bereich des Exons 1A eine solche differentiell methylierte Kontrollregion, welche die maternale Expression des weiter 3'-wärts lokalisierten *Gnas* in bestimmten Geweben reguliert (WILLIAMSON *et al.* 2004). Der zu dieser Kontrollregion orthologe Locus des Menschen *GNAS*-Exon A/B wiederum scheint selbst unter der Kontrolle eines 220 kb proximal gelegenen Bereichs zu stehen. Bei Patienten mit Pseudohypoparathyreoidismus Typ Ib (PHP-Ib), die eine 3 kb-Mikrodeletion im nicht geprägten *Syntaxin-16* (*STX16*)-Gen tragen, wurde der Verlust der Methylierung von Exon A/B festgestellt (BASTEPE *et al.* 2003). Der Mechanismus dieser Regulation ist ungeklärt, beinhaltet aber vermutlich Veränderungen in übergeordneten Chromatinstrukturen (LEWIS und REIK 2006). Aber auch in *cis* wirkende Polymorphismen können die Ausprägung eines epigenetischen Effekts beeinflussen. So fanden Xu *et al.* (1993) für den humanen *Insulin-like growth factor II receptor* (*IGF2R*) sowohl biparentale als auch monoallelische Expression und die Bildung rein maternaler Transkripte scheint von der Vererbung eines bestimmten Polymorphismus abhängig zu sein (Xu *et al.* 1997).

Da *Scapinin* möglicherweise das erste interne Mausgen darstellt, das einem Paramutations-ähnlichem Effekt unterliegt, sollte der Status des orthologen *SCAPININ* beim Menschen ebenfalls in dieser Hinsicht untersucht werden. So ist in der Literatur ein Paramutations-ähnliches *trans*-Allel-Phänomen beschrieben, welches die Ausprägung von Typ-1-Diabetes beim Menschen beeinflussen kann. Ausgehend von einem *variable number of tandem repeats* (VNTR) Polymorphismus im Bereich des Insulin-Gens (*INS*) scheinen Klasse-1-Allele mit 26 bis 63 Wiederholungen rezessiv prädisponierend zu wirken. Demgegenüber sind Klasse-3-Allele (über 140 Wiederholungen) eher dominant protektiv (BENNETT und TODD 1996). Ein bestimmter Klasse-1-Polymorphismus, Allel 814 mit 42 Wiederholungen, kann allerdings ebenfalls protektiv wirken, aber ausschließlich, wenn er von einem 814/Klasse-3 Vater vererbt wurde (BENNETT *et al.* 1997). Das Klasse-3-Allel des Vaters hat also einen

vererbaren Einfluss auf das 814-Allel, so dass hier ein epigenetischer, elternspezifischer Effekt vorliegt, bei dem das nicht vererbte Allel das Verhalten des vererbten Allels bestimmt. Allerdings ist die direkte Übertragung eines epigenetischen Status von der Maus auf den Menschen und umgekehrt nicht immer möglich, da es einen nicht unerheblichen Unterschied im Imprintingstatus zwischen Mensch und Maus gibt. Von 83 Transkriptionseinheiten bei Mensch und Maus, die nach heutigem Wissen einem Imprinting unterliegen, zeigen nur 29 in beiden Spezies uniparentale Expression (MORISON *et al.* 2005). Das humane *L3MBTL*-Gen beispielsweise, das für ein Protein der Polycomb-Gruppe kodiert, wird in hämatopoetischen Geweben ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert und enthält zwei CpG-Inseln, die auf dem maternalen Allel methyliert sind (LI *et al.* 2004). Diese CpG-Inseln sind am orthologen Genlocus auf Chromosom 2 der Maus nicht vorhanden und die Analyse der elternspezifischen Expression in zahlreichen Geweben und zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten erbrachte ausschließlich biparentale Expression (LI *et al.* 2005). Genau anders herum verhält es sich bei *Impact*, dem ersten, auf Chromosom 18 der Maus lokalisierten geprägten Gen (OAKEY *et al.* 1995). Im ersten Intron befindet sich eine CpG-Insel, die charakteristische Tandem-Wiederholungen enthält und die auf dem reprimierten maternalen Allel hypermethyliert und auf dem transkriptionell aktiven paternalen Allel hypomethyliert ist. Beim Menschen fehlt diese intronische CpG-Insel und die *IMPACT*-Expression erfolgt von beiden parentalen Allelen (OKAMURA und ITO 2006).

Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigen eindeutig einen Paramutations-ähnlichen Effekt am *Scapinin-1C*-Locus. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels verschiedener Experimente reproduziert und verifiziert und stützen somit die am Anfang dieses Abschnittes geäußerte Vermutung, dass die komplexe Struktur des *Scapinin*-Gens einer fein justierbaren gewebe- und entwicklungspezifischen Expression der einzelnen Spleißvarianten dient.

#### 4.5. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, insbesondere die zur elternspezifischen Expression des *Scapinin*-Gens der Maus, bilden die Grundlage für eine Reihe von weiterführenden Untersuchungen. Zunächst sollte versucht werden, polymorphe Marker in den Startexons 1A und 1B zu identifizieren, um auch diese Transkripte nach dem in dieser Arbeit dargestellten Prinzip analysieren zu können. In Erweiterung der hier durchgeführten Versuche könnten weitere Mausstämme mit entsprechenden SNPs in die Analyse mit einbezogen werden, um den Paramutations-ähnlichen Effekt näher zu charakterisieren. Inwieweit dieser Effekt auch meiotisch stabil ist, könnte für die *Scapinin 1C*-Transkripte

durch Rückkreuzungen der F1-Nachkommen verifiziert werden. In diesem Zusammenhang ist auch von Interesse, ob bereits bei den Elterntieren eine allelische Imbalance festzustellen ist. Dies könnte möglicherweise mittels quantitativer RT-PCR für alle zur Verfügung stehenden Transkriptvarianten durchgeführt werden. Auch die CpG-Inseln, die im Bereich der Startexons 1A und 1B identifiziert wurden, sollten auf ihren Methylierungsstatus und damit ihren regulatorischen Einfluss auf die Expression des *Scapinin*-Gens untersucht werden. Neben weiteren elternspezifischen Expressionsanalysen bleiben auch noch Fragen zu den gewebespezifischen Transkripten zu klären. Zunächst sollte ermittelt werden, welche der aufgrund der Genstruktur theoretisch möglichen Transkripte tatsächlich in welchem Gewebe und zu welchem Entwicklungszeitpunkt gebildet werden. Anschließend können spezifisch für diese Transkripte *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt werden, um zu untersuchen, in welchen Geweben bzw. Zellen des Hirns und der Gonaden sie lokalisiert sind. Auch eine Zuordnung der erhaltenen Northern Blot-Signale zu einzelnen Transkripten wäre dann möglich.

Um auch das Genprodukt näher charakterisieren zu können, sollte ein Antikörper gegen die SCAPININ/Scapinin-Proteine entwickelt werden. Dies bietet die Möglichkeit, ihre zelluläre und gewebespezifische Lokalisation zu untersuchen und die Bindung an die beschriebenen Interaktionspartner zu verifizieren und möglicherweise neue zu identifizieren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für Untersuchungen zur biologischen und/oder biochemischen Funktion der SCAPININ/Scapinin-Proteine.

## 5. Zusammenfassung

Für das humane *SCAPININ*-Gen konnten im Verlauf dieser Arbeit vier Exons erstmals beschrieben oder näher charakterisiert werden, so dass sich die Gesamtzahl der bekannten Exons von anfangs 13 auf nun 17 erweitern ließ. Diese Exons erstrecken sich über ca. 280 kb auf Chromosom 20q13 und sechs von ihnen können alternativ gespleißt werden. Es wurden vier verschiedene Startexons (1A bis 1D) nachgewiesen, die an Exon zwei gespleißt werden und zusätzlich das Exon 1B2 identifiziert, das alternativ zwischen Startexon 1B und Exon zwei gespleißt werden kann. Darüber hinaus konnte durch RT-PCR-Analysen das alternative Spleißen von Exon fünf in fetalem und adultem Hirn sowie Testis und Ovar nachgewiesen werden. Somit ergeben sich bis zu 2726 bp lange Transkripte, die, abhängig von Exon fünf, einen offenen Leserahmen von 1557 bp bzw. 1347 bp besitzen, der für Proteine von 518 bzw. 448 Aminosäuren kodiert. Die Analyse der gewebespezifischen Expression mittels Northern Blot und RT-PCR ergab eine Expression sowohl in Hirn als auch in Testis und Ovar.

Für das orthologe Gen der Maus konnten durch RT-PCR- und RACE-Analysen insgesamt 16 Exons identifiziert werden, die sich über ca. 220 kb in Bande H4 von Chromosom zwei erstrecken und von denen ebenfalls vier als alternative Transkriptionsstartpunkte dienen können. Die bis zu 3131 bp langen Transkripte enthalten, wie beim Menschen, einen 1557 bp ORF, es gibt aber auch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Loci. So konnte für das Mausgen nachgewiesen werden, dass Exon fünf keinem alternativen Spleißen unterliegt und auch für ein mit Exon 1B2 des Menschen vergleichbares Exon gibt es keine Hinweise. Darüber hinaus konnte für das *Scapinin*-Gen der Maus gezeigt werden, dass es über eine alternative Polyadenylierungsstelle verfügt. Die Expression konnte mittels RT-PCR in Hirn, Testis und Ovar nachgewiesen werden, wobei Northern Blot-Untersuchungen zeigten, dass die größte Anzahl verschiedener Transkripte im Hirn gebildet wird. Hier wurden spezifische Signale von 3,3 kb, 2,9 kb und 2,5 kb erhalten, wogegen in Testis nur das kleinste dieser Transkripte detektiert wurde. Weitere Northern Blot-Analysen zeigten, dass die drei nachweisbaren Transkripte in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlich stark exprimiert werden und dass sie während der Embryonalentwicklung der Maus zu verschiedenen Zeitpunkten gebildet werden. Eine weiterführende RT-PCR-Analyse zeigte, dass bereits ab Tag 8 pc *Scapinin*-Transkripte mit den Startexons 1A und 1B im Hirn nachweisbar sind. Die Exons 1C und 1D sind erst ab dem 15. bzw. 10. Tag pc detektierbar. Auf diese Weise wurde auch für die Gonaden ein entwicklungsspezifisches Expressionsmuster nachgewiesen.

Aufgrund seiner Lokalisation in einem als Imprintingregion 1 bezeichneten Chromosomenabschnitt, 4 Mb distal vom geprägten *Gnas*-Gen, stellte das *Scapinin*-Gen einen

Kandidaten dar, der auf allelspezifische Expression untersucht wurde. Hierfür wurden Mäuse des NMRI-Stammes und *Mus musculus castaneus* reziprok gekreuzt und die Nachkommen auf die Expression verschiedener SNPs untersucht. Für einen Marker in Exon 11 wurde nachgewiesen, dass er in Hirn und Gonaden von beiden parentalen Allelen exprimiert wird, also der gesamte Locus keinesfalls einer Regulation unterliegt, die zu uniparentalen Transkripten führt. Bei einem zweiten analysierten SNP, der in Startexon 1D lokalisiert war, wurde für hirnspezifische Transkripte ebenfalls biparentale Expression festgestellt. Schließlich wurden noch zwei polymorphe Marker für das ausschließlich im Hirn exprimierte Exon 1C untersucht und für beide Marker bei den Nachkommen beider Kreuzungen eine ausschließlich vom NMRI-Allel erfolgende Expression festgestellt. Es handelt sich dabei um kein klassisches Imprinting, sondern vermutlich um einen Paramutations-ähnlichen Effekt, der bisher noch für kein internes Mausgen beschrieben wurde. Somit stellt das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Mausmodell eine Möglichkeit dar, *trans*-Allel Phänomene näher zu untersuchen und somit auch weitere Erkenntnisse über den Einfluss epigenetischer Regulation der Genexpression auf die Ausprägung verschiedener humaner Krankheiten zu gewinnen.

## Literaturverzeichnis

- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P. G., SCHERER, S. E., LI, P. W., HOSKINS, R. A., GALLE, R. F., GEORGE, R. A., LEWIS, S. E., RICHARDS, S., ASHBURNER, M., HENDERSON, S. N., SUTTON, G. G., WORTMAN, J. R., YANDELL, M. D., ZHANG, Q., CHEN, L. X., BRANDON, R. C., ROGERS, Y. H., BLAZEJ, R. G., CHAMPE, M., PFEIFFER, B. D., WAN, K. H., DOYLE, C., BAXTER, E. G., HELT, G., NELSON, C. R., GABOR, G. L., ABRIL, J. F., AGBAYANI, A., AN, H. J., ANDREWS-PFANNKOCHE, C., BALDWIN, D., BALLEW, R. M., BASU, A., BAXENDALE, J., BAYRAKTAROGU, L., BEASLEY, E. M., BEESON, K. Y., BENOS, P. V., BERMAN, B. P., BHANDARI, D., BOLSHAKOV, S., BORKOVA, D., BOTCHAN, M. R., BOUCK, J., BROKSTEIN, P., BROTTIER, P., BURTIS, K. C., BUSAM, D. A., BUTLER, H., CADIEU, E., CENTER, A., CHANDRA, I., CHERRY, J. M., CAWLEY, S., DAHLKE, C., DAVENPORT, L. B., DAVIES, P., DE PABLOS, B., DELCHER, A., DENG, Z., MAYS, A. D., DEW, I., DIETZ, S. M., DODSON, K., DOUP, L. E., DOWNES, M., DUGAN-ROCHA, S., DUNKOV, B. C., DUNN, P., DURBIN, K. J., EVANGELISTA, C. C., FERRAZ, C., FERRIERA, S., FLEISCHMANN, W., FOSLER, C., GABRIELIAN, A. E., GARG, N. S., GELBART, W. M., GLASSER, K., GLODEK, A., GONG, F., GORRELL, J. H., GU, Z., GUAN, P., HARRIS, M., HARRIS, N. L., HARVEY, D., HEIMAN, T. J., HERNANDEZ, J. R., HOUCK, J., HOSTIN, D., HOUSTON, K. A., HOWLAND, T. J., WEI, M. H., IBEGWAM, C., JALALI, M., KALUSH, F., KARPEN, G. H., KE, Z., KENNISON, J. A., KETCHUM, K. A., KIMMEL, B. E., KODIRA, C. D., KRAFT, C., KRAVITZ, S., KULP, D., LAI, Z., LASKO, P., LEI, Y., LEVITSKY, A. A., LI, J., LI, Z., LIANG, Y., LIN, X., LIU, X., MATTEI, B., MCINTOSH, T. C., MCLEOD, M. P., MCPHERSON, D., MERKULOV, G., MILSHINA, N. V., MOBARRY, C., MORRIS, J., MOSHREFI, A., MOUNT, S. M., MOY, M., MURPHY, B., MURPHY, L., MUZNY, D. M., NELSON, D. L., NELSON, D. R., NELSON, K. A., NIXON, K., NUSSKERN, D. R., PACLEB, J. M., PALAZZOLO, M., PITTMAN, G. S., PAN, S., POLLARD, J., PURI, V., REESE, M. G., REINERT, K., REMINGTON, K., SAUNDERS, R. D., SCHEELER, F., SHEN, H., SHUE, B. C., SIDEN-KIAMOS, I., SIMPSON, M., SKUPSKI, M. P., SMITH, T., SPIER, E., SPRADLING, A. C., STAPLETON, M., STRONG, R., SUN, E., SVIRSKAS, R., TECTOR, C., TURNER, R., VENTER, E., WANG, A. H., WANG, X., WANG, Z. Y., WASSARMAN, D. A., WEINSTOCK, G. M., WEISSENBACH, J., WILLIAMS, S. M., WOODAGET, WORLEY, K. C., WU, D., YANG, S., YAO, Q. A., YE, J., YEH, R. F., ZAVERI, J. S., ZHAN, M., ZHANG, G., ZHAO, Q., ZHENG, L., ZHENG, X. H., ZHONG, F. N., ZHONG, W., ZHOU, X., ZHU, S., ZHU, X., SMITH, H. O., GIBBS, R. A., MYERS, E. W., RUBIN, G. M. und VENTER, J. C. (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **5461**, 2185-95.
- ALLEMAN, M. und DOCTOR, J. (2000): Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Mol Biol* **2-3**, 147-61.
- ALLEMAN, M., SIDORENKO, L., MCGINNIS, K., SESHADRI, V., DORWEILER, J. E., WHITE, J., SIKKINK, K. und CHANDLER, V. L. (2006): An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature* **7100**, 295-8.
- ALLEN, P. B., GREENFIELD, A. T., SVENNINGSSON, P., HASPELAGH, D. C. und GREENGARD, P. (2004): Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **18**, 7187-92.
- ALT, F. W., ENEA, V., BOTHWELL, A. L. und BALTIMORE, D. (1980): Activity of multiple light chain genes in murine myeloma cells producing a single, functional light chain. *Cell* **1**, 1-12.
- ARMSTRONG, J. F., PRITCHARD-JONES, K., BICKMORE, W. A., HASTIE, N. D. und BARD, J. B. (1993): The expression of the Wilms' tumour gene, *WT1*, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* **1-2**, 85-97.
- ASHE, A. und WHITELAW, E. (2007): Another role for RNA: a messenger across generations. *Trends Genet* **1**, 8-10.
- AVIV, H. und LEDER, P. (1972): Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **6**, 1408-12.
- BARBAUX, S., NIAUDET, P., GUBLER, M. C., GRUNFELD, J. P., JAUBERT, F., KUTTENN, F., FEKETE, C. N., SOULEYREAU-THERVILLE, N., THIBAUD, E., FELLOUS, M. und MCELREAVEY, K. (1997): Donor splice-site mutations in *WT1* are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* **4**, 467-70.
- BARBORO, P., D'ARRIGO, C., DIASPRO, A., MORMINO, M., ALBERTI, I., PARODI, S., PATRONE, E. und BALBI, C. (2002): Unraveling the organization of the internal nuclear matrix: RNA-dependent anchoring of NuMA to a lamin scaffold. *Exp Cell Res* **2**, 202-18.

- BASTEPE, M., FROHLICH, L. F., HENDY, G. N., INDRIDASON, O. S., JOSSE, R. G., KOSHIYAMA, H., KORKKO, J., NAKAMOTO, J. M., ROSENBLUM, A. L., SLYPER, A. H., SUGIMOTO, T., TSATSOULIS, A., CRAWFORD, J. D. und JUPPNER, H. (2003): Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J Clin Invest* **8**, 1255-63.
- BECK, J. A., LLOYD, S., HAFEZPARAST, M., LENNON-PIERCE, M., EPPIG, J. T., FESTING, M. F. und FISHER, E. M. (2000): Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* **1**, 23-5.
- BEECHEY, C. V. und PETERS, J. (1994): Dosage Effects of the distal chromosome 2 imprinting region. *Mouse Genome* **92**, 353-354.
- BELL, A. C. und FELSENFELD, G. (2000): Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **6785**, 482-5.
- BENNETT, S. T. und TODD, J. A. (1996): Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 343-70.
- BENNETT, S. T., WILSON, A. J., ESPOSITO, L., BOUZEKRI, N., UNDLIEN, D. E., CUCCA, F., NISTICO, L., BUZZETTI, R., BOSI, E., POCIOT, F., NERUP, J., CAMBON-THOMSEN, A., PUGLIESE, A., SHIELD, J. P., MCKINNEY, P. A., BAIN, S. C., POLYCHRONAKOS, C. und TODD, J. A. (1997): Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. The IMDIAB Group. *Nat Genet* **3**, 350-2.
- BLOM, N., SICHERITZ-PONTEN, T., GUPTA, R., GAMMELTOFT, S. und BRUNAK, S. (2004): Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **6**, 1633-49.
- BOUE, S., LETUNIC, I. und BORK, P. (2003): Alternative splicing and evolution. *Bioessays* **11**, 1031-4.
- BRENT, M. R. und GUIGO, R. (2004): Recent advances in gene structure prediction. *Curr Opin Struct Biol* **3**, 264-72.
- BRINK, R. A. (1956): A genetic change associated with the *R* locus in maize which is directed and potentially reversible. *Genetics* **41**, 872-89.
- BRISCOE, J. und ERICSON, J. (2001): Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol* **1**, 43-9.
- BROWN, C. Y., MIZE, G. J., PINEDA, M., GEORGE, D. L. und MORRIS, D. R. (1999): Role of two upstream open reading frames in the translational control of oncogene *mdm2*. *Oncogene* **41**, 5631-7.
- BURATTI, E. und BARALLE, F. E. (2004): Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process. *Mol Cell Biol* **24**, 10505-14.
- CARLSON, G. A., BORCHELT, D. R., DAKE, A., TURNER, S., DANIELSON, V., COFFIN, J. D., ECKMAN, C., MEINERS, J., NILSEN, S. P., YOUNKIN, S. G. und HSIAO, K. K. (1997): Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein overexpression in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **11**, 1951-9.
- CARNINCI, P., KASUKAWA, T., KATAYAMA, S., GOUGH, J., FRITH, M. C., MAEDA, N., OYAMA, R., RAVASI, T., LENHARD, B., WELLS, C., KODZIUS, R., SHIMOKAWA, K., BAJIC, V. B., BRENNER, S. E., BATALOV, S., FORREST, A. R., ZAVOLAN, M., DAVIS, M. J., WILMING, L. G., AIDINIS, V., ALLEN, J. E., AMBESI-IMPIOMBATO, A., APWEILER, R., ATURALIYA, R. N., BAILEY, T. L., BANSAL, M., BAXTER, L., BEISEL, K. W., BERSANO, T., BONO, H., CHALK, A. M., CHIU, K. P., CHOUDHARY, V., CHRISTOFFELS, A., CLUTTERBUCK, D. R., CROWE, M. L., DALLA, E., DALRYMPLE, B. P., DE BONO, B., DELLA GATTA, G., DI BERNARDO, D., DOWN, T., ENGSTROM, P., FAGIOLINI, M., FAULKNER, G., FLETCHER, C. F., FUKUSHIMA, T., FURUNO, M., FUTAKI, S., GARIBOLDI, M., GEORGII-HEMMING, P., GINGERAS, T. R., GOJOBORI, T., GREEN, R. E., GUSTINCICH, S., HARBERS, M., HAYASHI, Y., HENSCH, T. K., HIROKAWA, N., HILL, D., HUMINIECKI, L., IACONO, M., IKEO, K., IWAMA, A., ISHIKAWA, T., JAKT, M., KANAPIN, A., KATOH, M., KAWASAWA, Y., KELSO, J., KITAMURA, H., KITANO, H., KOLLIAS, G., KRISHNAN, S. P., KRUGER, A., KUMMERFELD, S. K., KUROCHKIN, I. V., LAREAU, L. F., LAZAREVIC, D., LIPOVICH, L., LIU, J., LIUNI, S., MCWILLIAM, S., MADAN BABU, M., MADERA, M., MARCHIONNI, L., MATSUDA, H., MATSUZAWA, S., MIKI, H., MIGNONE, F., MIYAKE, S., MORRIS, K., MOTTAGUI-TABAR, S., MULDER, N., NAKANO, N., NAKAUCHI, H., NG, P., NILSSON, R., NISHIGUCHI, S., NISHIKAWA, S., NORI, F., OHARA, O., OKAZAKI, Y., ORLANDO, V., PANG, K. C., PAVAN, W. J., PAVESI, G., PESOLE, G., PETROVSKY, N., PIAZZA, S.,

- REED, J., REID, J. F., RING, B. Z., RINGWALD, M., ROST, B., RUAN, Y., SALZBERG, S. L., SANDELIN, A., SCHNEIDER, C., SCHONBACH, C., SEKIGUCHI, K., SEMPLE, C. A., SENO, S., SESSA, L., SHENG, Y., SHIBATA, Y., SHIMADA, H., SHIMADA, K., SILVA, D., SINCLAIR, B., SPERLING, S., STUPKA, E., SUGIURA, K., SULTANA, R., TAKENAKA, Y., TAKI, K., TAMMOJA, K., TAN, S. L., TANG, S., TAYLOR, M. S., TEGNER, J., TEICHMANN, S. A., UEDA, H. R., VAN NIMWEGEN, E., VERARDO, R., WEI, C. L., YAGI, K., YAMANISHI, H., ZABAROVSKY, E., ZHU, S., ZIMMER, A., HIDE, W., BULT, C., GRIMMOND, S. M., TEASDALE, R. D., LIU, E. T., BRUSIC, V., QUACKENBUSH, J., WAHLESTEDT, C., MATTICK, J. S., HUME, D. A., KAI, C., SASAKI, D., TOMARU, Y., FUKUDA, S., KANAMORI-KATAYAMA, M., SUZUKI, M., AOKI, J., ARAKAWA, T., IIDA, J., IMAMURA, K., ITOH, M., KATO, T., KAWAJI, H., KAWAGASHIRA, N., KAWASHIMA, T., KOJIMA, M., KONDO, S., KONNO, H., NAKANO, K., NINOMIYA, N., NISHIO, T., OKADA, M., PLESSY, C., SHIBATA, K., SHIRAKI, T., SUZUKI, S., TAGAMI, M., WAKI, K., WATAHIKI, A., OKAMURA-OHO, Y., SUZUKI, H., KAWAI, J. und HAYASHIZAKI, Y. (2005): The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **5740**, 1559-63.
- CATTANACH, B. M., EVANS, E. P., BURTENSHAW, M. und BEECHEY, C. V. (1992): Further delimitation of the distal chromosome 2 imprinting region. *Mouse Genome* **90**, 82.
- CATTANACH, B. M. und KIRK, M. (1985): Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **6019**, 496-8.
- CERUTTI, H. (2003): RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* **1**, 39-46.
- CHAILLET, J. R. (1994): Genomic imprinting: lessons from mouse transgenes. *Mutat Res* **2**, 441-9.
- CHAMBERS, D. und MASON, I. (2006): A high throughput messenger RNA differential display screen identifies discrete domains of gene expression and novel patterning processes along the developing neural tube. *BMC Dev Biol* **9**.
- CHANDLER, V. L. (2007): Paramutation: from maize to mice. *Cell* **4**, 641-5.
- CHANDLER, V. L. und STAM, M. (2004): Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat Rev Genet* **7**, 532-44.
- CHISAKA, O. und CAPECCHI, M. R. (1991): Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* **6318**, 473-9.
- CHOMCZYNSKI, P. und SACCHI, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **1**, 156-9.
- CHOW, J. C. und BROWN, C. J. (2003): Forming facultative heterochromatin: silencing of an X chromosome in mammalian females. *Cell Mol Life Sci* **12**, 2586-603.
- COE, E. H. (1966): The Properties, Origin, and Mechanism of Conversion-Type Inheritance at the B Locus in Maize. *Genetics* **6**, 1035-1063.
- COHEN, P. T. (2002): Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci Pt* **2**, 241-56.
- CONDIE, B. G. und CAPECCHI, M. R. (1993): Mice homozygous for a targeted disruption of *Hoxd-3* (*Hox-4.1*) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the atlas and the axis. *Development* **3**, 579-95.
- CONDIE, B. G. und CAPECCHI, M. R. (1994): Mice with targeted disruptions in the paralogous genes *hoxa-3* and *hoxd-3* reveal synergistic interactions. *Nature* **6487**, 304-7.
- CONSORTIUM, T. C. E. S. (1998): Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **5396**, 2012-8.
- CONSTANCIA, M., PICKARD, B., KELSEY, G. und REIK, W. (1998): Imprinting mechanisms. *Genome Res* **9**, 881-900.
- COOMBES, C., ARNAUD, P., GORDON, E., DEAN, W., COAR, E. A., WILLIAMSON, C. M., FEIL, R., PETERS, J. und KELSEY, G. (2003): Epigenetic properties and identification of an imprint mark in the *Nesp-Gnasxl* domain of the mouse *Gnas* imprinted locus. *Mol Cell Biol* **16**, 5475-88.

- COURTOIS, V., CHATELAIN, G., HAN, Z. Y., LE NOVERE, N., BRUN, G. und LAMONERIE, T. (2003): New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J Neurochem* **4**, 840-53.
- DAUJAT, S., NEEL, H. und PIETTE, J. (2001): MDM2: life without p53. *Trends Genet* **8**, 459-64.
- DAY, T. und BONDURIANSKY, R. (2004): Intralocus sexual conflict can drive the evolution of genomic imprinting. *Genetics* **4**, 1537-46.
- DE ROSA, R., GRENIER, J. K., ANDREEVA, T., COOK, C. E., ADOUTTE, A., AKAM, M., CARROLL, S. B. und BALAVOINE, G. (1999): Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* **6738**, 772-6.
- DELANEY, S. J., RICH, D. P., THOMSON, S. A., HARGRAVE, M. R., LOVELOCK, P. K., WELSH, M. J. und WAINWRIGHT, B. J. (1993): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nat Genet* **4**, 426-31.
- DICKSON, D. (1999): Gene estimate rises as US and UK discuss freedom of access. *Nature* **6751**, 311.
- D'SOUZA, I., POORKAJ, P., HONG, M., NOCHLIN, D., LEE, V. M., BIRD, T. D. und SCHELLENBERG, G. D. (1999): Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **10**, 5598-603.
- DUNCAN, I. W. (2002): Transvection effects in Drosophila. *Annu Rev Genet* 521-56.
- ERMEKOVA, K. S., ZAMBRANO, N., LINN, H., MINOPOLI, G., GERTLER, F., RUSSO, T. und SUDOL, M. (1997): The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila Enabled. *J Biol Chem* **52**, 32869-77.
- FAUSTINO, N. A. und COOPER, T. A. (2003): Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* **4**, 419-37.
- FERGUSON-SMITH, A., LIN, S. P., TSAI, C. E., YOUNGSON, N. und TEVENDALE, M. (2003): Genomic imprinting--insights from studies in mice. *Semin Cell Dev Biol* **1**, 43-9.
- FORCE, A., LYNCH, M., PICKETT, F. B., AMORES, A., YAN, Y. L. und POSTLETHWAIT, J. (1999): Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **4**, 1531-45.
- FRANCESCHETTI, A. (1953): [Case study: recessive retinitis pigmentosa in two consecutive generations (pseudodominance)]. *J Genet Hum* **2**, 145-6.
- GERTLER, F. B., NIEBUHR, K., REINHARD, M., WEHLAND, J. und SORIANO, P. (1996): Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* **2**, 227-39.
- GOPFERT, U., KULLMANN, M. und HENGST, L. (2003): Cell cycle-dependent translation of p27 involves a responsive element in its 5'-UTR that overlaps with a uORF. *Hum Mol Genet* **14**, 1767-79.
- GRAVELEY, B. R. (2001): Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* **2**, 100-7.
- GREER, J. M., PUETZ, J., THOMAS, K. R. und CAPECCHI, M. R. (2000): Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature* **6770**, 661-5.
- GROß, C. (2000): Isolierung und Charakterisierung der Gene für die ATP-Synthase-e-Untereinheit *ATP5E* und das b-Tubulin *Hb1* aus dem Chromosomenabschnitt 20q13 des Menschen. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- GROß, C., KUSSMANN, S., HEHR, A., HANSMANN, I. und SCHLOTE, D. (2000): Epsilon subunit gene of F(1)F(0)-ATP synthase (*ATP5E*) on human chromosome 20q13.2-->q13.3 localizes between D20S171 and GNAS1. *Cytogenet Cell Genet* **1-4**, 105-6.
- HABER, D. A., SOHN, R. L., BUCKLER, A. J., PELLETIER, J., CALL, K. M. und HOUSMAN, D. E. (1991): Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **21**, 9618-22.
- HANAHAN, D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **4**, 557-80.

- HARDING, H. P., NOVOA, I., ZHANG, Y., ZENG, H., WEK, R., SCHAPIRA, M. und RON, D. (2000): Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **5**, 1099-108.
- HARK, A. T., SCHOENHERR, C. J., KATZ, D. J., INGRAM, R. S., LEVORSE, J. M. und TILGHMAN, S. M. (2000): CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **6785**, 486-9.
- HATADA, I., NABETANI, A., ARAI, Y., OHISHI, S., SUZUKI, M., MIYABARA, S., NISHIMUNE, Y. und MUKAI, T. (1997): Aberrant methylation of an imprinted gene U2af1-rs1(SP2) caused by its own transgene. *J Biol Chem* **14**, 9120-2.
- HENKE, W., HERDEL, K., JUNG, K., SCHNORR, D. und LOENING, S. A. (1997): Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **19**, 3957-8.
- HERMAN, H., LU, M., ANGGRAINI, M., SIKORA, A., CHANG, Y., YOON, B. J. und SOLOWAY, P. D. (2003): Trans allele methylation and paramutation-like effects in mice. *Nat Genet* **2**, 199-202.
- HODGSON, J. G., CHIN, K., COLLINS, C. und GRAY, J. W. (2003): Genome amplification of chromosome 20 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **3**, 337-45.
- HONG, M., ZHUKAREVA, V., VOGELSBERG-RAGAGLIA, V., WSZOLEK, Z., REED, L., MILLER, B. I., GESCHWIND, D. H., BIRD, T. D., MCKEEL, D., GOATE, A., MORRIS, J. C., WILHELMSSEN, K. C., SCHELLENBERG, G. D., TROJANOWSKI, J. Q. und LEE, V. M. (1998): Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* **5395**, 1914-7.
- HOZAK, P., JACKSON, D. A. und COOK, P. R. (1994): Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J Cell Sci* 2191-202.
- HUTTON, M., LENDON, C. L., RIZZU, P., BAKER, M., FROELICH, S., HOULDEN, H., PICKERING-BROWN, S., CHAKRAVERTY, S., ISAACS, A., GROVER, A., HACKETT, J., ADAMSON, J., LINCOLN, S., DICKSON, D., DAVIES, P., PETERSEN, R. C., STEVENS, M., DE GRAAFF, E., WAUTERS, E., VAN BAREN, J., HILLEBRAND, M., JOOSSE, M., KWON, J. M., NOWOTNY, P., CHE, L. K., NORTON, J., MORRIS, J. C., REED, L. A., TROJANOWSKI, J., BASUN, H., LANNFELT, L., NEYSTAT, M., FAHN, S., DARK, F., TANNENBERG, T., DODD, P. R., HAYWARD, N., KWOK, J. B., SCHOFIELD, P. R., ANDREADIS, A., SNOWDEN, J., CRAUFURD, D., NEARY, D., OWEN, F., OOSTRA, B. A., HARDY, J., GOATE, A., VAN SWIETEN, J., MANN, D., LYNCH, T. und HEUTINK, P. (1998): Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **6686**, 702-5.
- ISCHIA, R., LOVISETTI-SCAMIORN, P., HOGUE-ANGELETTI, R., WOLKERSDORFER, M., WINKLER, H. und FISCHER-COLBRIE, R. (1997): Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5-HT1B receptor antagonist activity. *J Biol Chem* **17**, 11657-62.
- ISHIKAWA, K., NAGASE, T., SUYAMA, M., MIYAJIMA, N., TANAKA, A., KOTANI, H., NOMURA, N. und OHARA, O. (1998): Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res* **3**, 169-76.
- IWASA, Y. (1998): The conflict theory of genomic imprinting: how much can be explained? *Curr Top Dev Biol* 255-93.
- IWASA, Y. und POMIANKOWSKI, A. (1999): Sex specific X chromosome expression caused by genomic imprinting. *J Theor Biol* **4**, 487-95.
- JAVAHERY, R., KHACHI, A., LO, K., ZENZIE-GREGORY, B. und SMALE, S. T. (1994): DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **1**, 116-27.
- JIANG, S., HEMANN, M. A., LEE, M. P. und FEINBERG, A. P. (1998): Strain-dependent developmental relaxation of imprinting of an endogenous mouse gene, Kvlqt1. *Genomics* **3**, 395-9.
- JIN, W., MCCUTCHEON, I. E., FULLER, G. N., HUANG, E. S. und COTE, G. J. (2000): Fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon exclusion and polypyrimidine tract-binding protein in glioblastoma multiforme tumors. *Cancer Res* **5**, 1221-4.
- JIN, X., TURCOTT, E., ENGLEHARDT, S., MIZE, G. J. und MORRIS, D. R. (2003): The two upstream open reading frames of oncogene mdm2 have different translational regulatory properties. *J Biol Chem* **28**, 25716-21.

- JOHNSON, N. A. und PORTER, A. H. (2000): Rapid speciation via parallel, directional selection on regulatory genetic pathways. *J Theor Biol* **4**, 527-42.
- KANDURI, C., PANT, V., LOUKINOV, D., PUGACHEVA, E., QI, C. F., WOLFFE, A., OHLSSON, R. und LOBANENKOV, V. V. (2000): Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol* **14**, 853-6.
- KASHIWAGI, A., MEGURO, M., HOSHIYA, H., HARUTA, M., ISHINO, F., SHIBAHARA, T. und OSHIMURA, M. (2003): Predominant maternal expression of the mouse *Atp10c* in hippocampus and olfactory bulb. *J Hum Genet* **4**, 194-8.
- KAYASHIMA, T., OHTA, T., NIKAWA, N. und KISHINO, T. (2003): On the conflicting reports of imprinting status of mouse *ATP10a* in the adult brain: strain-background-dependent imprinting? *J Hum Genet* **9**, 492-3; author reply 494.
- KERMICLE, J. L., EGGLESTON, W. B. und ALLEMAN, M. (1995): Organization of paramutagenicity in R-stippled maize. *Genetics* **1**, 361-72.
- KIECKER, C. und LUMSDEN, A. (2005): Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* **7**, 553-64.
- KLAFF, P., RIESNER, D. und STEGER, G. (1996): RNA structure and the regulation of gene expression. *Plant Mol Biol* **1-2**, 89-106.
- KNUDSEN, S. (1999): Promoter2.0: for the recognition of PolII promoter sequences. *Bioinformatics* **5**, 356-61.
- KOHSAKA, T., TAGAWA, M., TAKEKOSHI, Y., YANAGISAWA, H., TADOKORO, K. und YAMADA, M. (1999): Exon 9 mutations in the *WT1* gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Hum Mutat* **6**, 466-70.
- KOZAK, M. (1986): Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9**, 2850-4.
- KOZAK, M. (1989): Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* **11**, 5134-42.
- KOZAK, M. (1991): An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol* **4**, 887-903.
- KUBMANN, S., MURPHY, D., KÖRBER, K., SCHLOTE, D., MILLER, H. J., PETERS, J. und HANSMANN, I. (1998): Comparative Physical and Transcriptional Mapping of Human Chromosome 20q13 Segment as Candidate for Imprinting. *German Human Genome Project Progress Report 1996-1998*, 61-62.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., McMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., GIBBS, R. A., MUZNY, D. M., SCHERER, S. E., BOUCK, J. B., SODERGREN, E. J., WORLEY, K. C., RIVES, C. M., GORRELL, J. H., METZKER, M. L., NAYLOR, S. L., KUCHERLAPATI, R. S., NELSON, D. L., WEINSTOCK, G. M., SAKAKI, Y., FUJIYAMA, A., HATTORI, M., YADA, T., TOYODA, A., ITOH, T., KAWAGOE, C., WATANABE, H., TOTOKI, Y., TAYLOR, T., WEISSENBACH, J., HEILIG, R., SAURIN, W., ARTIGUENAVE, F., BROTTIER, P., BRULS, T., PELLETIER, E., ROBERT, C., WINCKER, P., SMITH, D. R., DOUCETTE-STAMM, L., RUBENFIELD, M., WEINSTOCK, K., LEE, H. M., DUBOIS, J., ROSENTHAL, A., PLATZER, M., NYAKATURA, G.,

- TAUDIEN, S., RUMP, A., YANG, H., YU, J., WANG, J., HUANG, G., GU, J., HOOD, L., ROWEN, L., MADAN, A., QIN, S., DAVIS, R. W., FEDERSPIEL, N. A., ABOLA, A. P., PROCTOR, M. J., MYERS, R. M., SCHMUTZ, J., DICKSON, M., GRIMWOOD, J., COX, D. R., OLSON, M. V., KAUL, R., SHIMIZU, N., KAWASAKI, K., MINOSHIMA, S., EVANS, G. A., ATHANASIOU, M., SCHULTZ, R., ROE, B. A., CHEN, F., PAN, H., RAMSER, J., LEHRACH, H., REINHARDT, R., MCCOMBIE, W. R., DE LA BASTIDE, M., DEDHIA, N., BLOCKER, H., HORNISCHER, K., NORDSIEK, G., AGARWALA, R., ARAVIND, L., BAILEY, J. A., BATEMAN, A., BATZOGLOU, S., BIRNEY, E., BORK, P., BROWN, D. G., BURGE, C. B., CERUTTI, L., CHEN, H. C., CHURCH, D., CLAMP, M., COPLEY, R. R., DOERKS, T., EDDY, S. R., EICHLER, E. E., FUREY, T. S., GALAGAN, J., GILBERT, J. G., HARMON, C., HAYASHIZAKI, Y., HAUSSLER, D., HERMJAKOB, H., HOKAMP, K., JANG, W., JOHNSON, L. S., JONES, T. A., KASIF, S., KASPRYZK, A., KENNEDY, S., KENT, W. J., KITTS, P., KOONIN, E. V., KORF, I., KULP, D., LANCET, D., LOWE, T. M., MCLYSAGHT, A., MIKKELSEN, T., MORAN, J. V., MULDER, N., POLLARA, V. J., PONTING, C. P., SCHULER, G., SCHULTZ, J., SLATER, G., SMIT, A. F., STUPKA, E., SZUSTAKOWSKI, J., THIERRY-MIEG, D., THIERRY-MIEG, J., WAGNER, L., WALLIS, J., WHEELER, R., WILLIAMS, A., WOLF, Y. I., WOLFE, K. H., YANG, S. P., YEH, R. F., COLLINS, F., GUYER, M. S., PETERSON, J., FELSENFELD, A., WETTERSTRAND, K. A., PATRINOS, A., MORGAN, M. J., DE JONG, P., CATANESE, J. J., OSEOGAWA, K., SHIZUYA, H., CHOI, S. und CHEN, Y. J. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **6822**, 860-921.
- LANDERS, M., BANCESCU, D. L., LE MEUR, E., ROUGEULLE, C., GLATT-DEELEY, H., BRANNAN, C., MUSCATELLI, F. und LALANDE, M. (2004): Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* **11**, 3480-92.
- LEVINE, M. (2002): How insects lose their limbs. *Nature* **6874**, 848-9.
- LEWIS, A. und REIK, W. (2006): How imprinting centres work. *Cytogenet Genome Res* **1-4**, 81-9.
- LI, J., BENCH, A. J., PILTZ, S., VASSILIOU, G., BAXTER, E. J., FERGUSON-SMITH, A. C. und GREEN, A. R. (2005): L3mbtl, the mouse orthologue of the imprinted L3MBTL, displays a complex pattern of alternative splicing and escapes genomic imprinting. *Genomics* **4**, 489-94.
- LI, J., BENCH, A. J., VASSILIOU, G. S., FOUROUCLAS, N., FERGUSON-SMITH, A. C. und GREEN, A. R. (2004): Imprinting of the human L3MBTL gene, a polycomb family member located in a region of chromosome 20 deleted in human myeloid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **19**, 7341-6.
- LI, T., VU, T. H., ZENG, Z. L., NGUYEN, B. T., HAYWARD, B. E., BONTHRON, D. T., HU, J. F. und HOFFMAN, A. R. (2000): Tissue-specific expression of antisense and sense transcripts at the imprinted Gnas locus. *Genomics* **3**, 295-304.
- LIU, J., CHEN, M., DENG, C., BOURC'HIS, D., NEALON, J. G., ERLICHMAN, B., BESTOR, T. H. und WEINSTEIN, L. S. (2005): Identification of the control region for tissue-specific imprinting of the stimulatory G protein alpha-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **15**, 5513-8.
- LIU, J., LITMAN, D., ROSENBERG, M. J., YU, S., BIESECKER, L. G. und WEINSTEIN, L. S. (2000a): A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type IB. *J Clin Invest* **9**, 1167-74.
- LIU, J., YU, S., LITMAN, D., CHEN, W. und WEINSTEIN, L. S. (2000b): Identification of a methylation imprint mark within the mouse Gnas locus. *Mol Cell Biol* **16**, 5808-17.
- LO, H. S., WANG, Z., HU, Y., YANG, H. H., GERE, S., BUETOW, K. H. und LEE, M. P. (2003): Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res* **8**, 1855-62.
- LOUREIRO, J. J., RUBINSON, D. A., BEAR, J. E., BALTUS, G. A., KWIATKOWSKI, A. V. und GERTLER, F. B. (2002): Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration. *Mol Biol Cell* **7**, 2533-46.
- LUMSDEN, A. (2004): Segmentation and compartmentation in the early avian hindbrain. *Mech Dev* **9**, 1081-8.
- MAKAROVA, O. V., MAKAROV, E. M., LIU, S., VORNLOCHER, H. P. und LUHRMANN, R. (2002): Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6\*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *Embo J* **5**, 1148-57.
- MANLEY, N. R. und CAPECCHI, M. R. (1995): The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* **7**, 1989-2003.

- MATERA, A. G. (1999): Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* **8**, 302-9.
- MCCLINTOCK, J. M., CARLSON, R., MANN, D. M. und PRINCE, V. E. (2001): Consequences of Hox gene duplication in the vertebrates: an investigation of the zebrafish Hox paralogue group 1 genes. *Development* **13**, 2471-84.
- MCCLINTOCK, J. M., KHEIRBEK, M. A. und PRINCE, V. E. (2002): Knockdown of duplicated zebrafish hoxb1 genes reveals distinct roles in hindbrain patterning and a novel mechanism of duplicate gene retention. *Development* **10**, 2339-54.
- MELO, K. F., MARTIN, R. M., COSTA, E. M., CARVALHO, F. M., JORGE, A. A., ARNHOLD, I. J. und MENDONÇA, B. B. (2002): An unusual phenotype of Frasier syndrome due to IVS9 +4C>T mutation in the WT1 gene: predominantly male ambiguous genitalia and absence of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **6**, 2500-5.
- MELQUIST, S. und BENDER, J. (2003): Transcription from an upstream promoter controls methylation signaling from an inverted repeat of endogenous genes in Arabidopsis. *Genes Dev* **16**, 2036-47.
- METTE, M. F., AUFSATZ, W., VAN DER WINDEN, J., MATZKE, M. A. und MATZKE, A. J. (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* **19**, 5194-201.
- MICHAEL, D. und OREN, M. (2002): The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 53-9.
- MIKA, S. und ROST, B. (2005): NMPdb: Database of Nuclear Matrix Proteins. *Nucleic Acids Res Database issue*, D160-3.
- MIRALLES, F., POSERN, G., ZAROMYTIDOU, A. I. und TREISMAN, R. (2003): Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **3**, 329-42.
- MOMAND, J., WU, H. H. und DASGUPTA, G. (2000): MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **1-2**, 15-29.
- MOORE, T. und HAIG, D. (1991): Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* **2**, 45-9.
- MORISON, I. M., RAMSAY, J. P. und SPENCER, H. G. (2005): A census of mammalian imprinting. *Trends Genet* **8**, 457-65.
- MORRIS, D. R. und GEBALLE, A. P. (2000): Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* **23**, 8635-42.
- MORTILLARO, M. J., BLENCOWE, B. J., WEI, X., NAKAYASU, H., DU, L., WARREN, S. L., SHARP, P. A. und BEREZNEY, R. (1996): A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **16**, 8253-7.
- MOSELEY, C. T., MULLIS, P. E., PRINCE, M. A. und PHILLIPS, J. A., 3RD (2002): An exon splice enhancer mutation causes autosomal dominant GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **2**, 847-52.
- MÜLLER, W. A. (1997): *Developmental Biology*. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg
- NAGASE, T., KIKUNO, R., HATTORI, A., KONDO, Y., OKUMURA, K. und OHARA, O. (2000): Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* **6**, 347-55.
- NIKOLOV, D. B. und BURLEY, S. K. (1997): RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1**, 15-22.
- NISSIM-RAFANIA, M. und KEREM, B. (2002): Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* **3**, 123-7.

- OAKEY, R. J., MATTESON, P. G., LITWIN, S., TILGHMAN, S. M. und NUSSBAUM, R. L. (1995): Nondisjunction rates and abnormal embryonic development in a mouse cross between heterozygotes carrying a (7, 18) robertsonian translocation chromosome. *Genetics* **2**, 667-74.
- OKAMURA, K. und ITO, T. (2006): Lessons from comparative analysis of species-specific imprinted genes. *Cytogenet Genome Res* **1-4**, 159-64.
- PATTERSON, G. I., THORPE, C. J. und CHANDLER, V. L. (1993): Paramutation, an allelic interaction, is associated with a stable and heritable reduction of transcription of the maize b regulatory gene. *Genetics* **3**, 881-94.
- PENDLETON, L. C., GOODWIN, B. L., FLAM, B. R., SOLOMONSON, L. P. und EICHLER, D. C. (2002): Endothelial argininosuccinate synthase mRNA 5'-untranslated region diversity. Infrastructure for tissue-specific expression. *J Biol Chem* **28**, 25363-9.
- PERNIS, B., CHIAPPINO, G., KELUS, A. S. und GELL, P. G. (1965): Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues. *J Exp Med* **5**, 853-76.
- PETERS, J., BEECHEY, C. V., BALL, S. T. und EVANS, E. P. (1994): Mapping studies of the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Genet Res* **3**, 169-74.
- PETERS, J., HOLMES, R., MONK, D., BEECHEY, C. V., MOORE, G. E. und WILLIAMSON, C. M. (2006): Imprinting control within the compact Gnas locus. *Cytogenet Genome Res* **1-4**, 194-201.
- PETERS, J., WROE, S. F., WELLS, C. A., MILLER, H. J., BODLE, D., BEECHEY, C. V., WILLIAMSON, C. M. und KELSEY, G. (1999): A cluster of oppositely imprinted transcripts at the Gnas locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **7**, 3830-5.
- PHILIPS, A. V. und COOPER, T. A. (2000): RNA processing and human disease. *Cell Mol Life Sci* **2**, 235-49.
- PRAKASH, N. und WURST, W. (2004): Specification of midbrain territory. *Cell Tissue Res* **1**, 5-14.
- PRESTRIDGE, D. S. (1995): Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J Mol Biol* **5**, 923-32.
- PRINCE, V. (2002): The Hox Paradox: More complex(es) than imagined. *Dev Biol* **1**, 1-15.
- PRINCE, V. E. und PICKETT, F. B. (2002): Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat Rev Genet* **11**, 827-37.
- RAIBLE, F. und BRAND, M. (2004): Divide et Impera--the midbrain-hindbrain boundary and its organizer. *Trends Neurosci* **12**, 727-34.
- RASER, J. M. und O'SHEA, E. K. (2005): Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* **5743**, 2010-3.
- RASSOULZADEGAN, M., MAGLIANO, M. und CUZIN, F. (2002): Transvection effects involving DNA methylation during meiosis in the mouse. *Embo J* **3**, 440-50.
- RASSOULZADEGAN, M., GRANDJEAN, V., GOUNON, P., VINCENT, S., GILLOT, I. und CUZIN, F. (2006): RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* **7092**, 469-74.
- REES, W. A., YAGER, T. D., KORTE, J. und VON HIPPEL, P. H. (1993): Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry* **1**, 137-44.
- REIK, W., HOWLETT, S. K. und SURANI, M. A. (1990): Imprinting by DNA methylation: from transgenes to endogenous gene sequences. *Dev Suppl* 99-106.
- REINHARD, M., GIEHL, K., ABEL, K., HAFFNER, C., JARCHAU, T., HOPPE, V., JOCKUSCH, B. M. und WALTER, U. (1995): The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J* **8**, 1583-9.
- REUTER, G. und SPIERER, P. (1992): Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays* **9**, 605-12.

- ROBERTS, R. J., BELFORT, M., BESTOR, T., BHAGWAT, A. S., BICKLE, T. A., BITINAITE, J., BLUMENTHAL, R. M., DEGTYAREV, S., DRYDEN, D. T., DYBVIK, K., FIRMAN, K., GROMOVA, E. S., GUMPORT, R. I., HALFORD, S. E., HATTMAN, S., HEITMAN, J., HORNBY, D. P., JANULAITIS, A., JELTSCH, A., JOSEPHSEN, J., KISS, A., KLAENHAMMER, T. R., KOBAYASHI, I., KONG, H., KRUGER, D. H., LACKS, S., MARINUS, M. G., MIYAHARA, M., MORGAN, R. D., MURRAY, N. E., NAGARAJA, V., PIEKAROWICZ, A., PINGOUD, A., RALEIGH, E., RAO, D. N., REICH, N., REPIN, V. E., SELKER, E. U., SHAW, P. C., STEIN, D. C., STODDARD, B. L., SZYBALSKI, W., TRAUTNER, T. A., VAN ETEN, J. L., VITOR, J. M., WILSON, G. G. und XU, S. Y. (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* **7**, 1805-12.
- RUGH, R. (1990): *The Mouse Its Reproduction and Development*. Oxford University Press, Oxford
- SAGARA, J., HIGUCHI, T., HATTORI, Y., MORIYA, M., SARVOTHAM, H., SHIMA, H., SHIRATO, H., KIKUCHI, K. und TANIGUCHI, S. (2003): Scapinin, a putative protein phosphatase-1 regulatory subunit associated with the nuclear nonchromatin structure. *J Biol Chem* **46**, 45611-9.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. und ERLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **4839**, 487-91.
- SAMBROOK, J. und RUSSEL, D. W. (2001): *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **12**, 5463-7. SASAKI, H. und ISHINO, F. (2006): Preface. *Cytogenet Genome Res* **1-4**, 5.
- SASAKI, H. und ISHINO, F. (2006): Preface. *Cytogenet Genome Res* **1-4**, 5.
- SHARMA, V. K., BRAHMACHARI, S. K. und RAMACHANDRAN, S. (2005): (TG/CA)<sub>n</sub> repeats in human gene families: abundance and selective patterns of distribution according to function and gene length. *BMC Genomics* **1**, 83.
- SHEU, G. T. und TRAUUGH, J. A. (1999): A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII. *Mol Cell Biochem* **1-2**, 181-6.
- SPIEGEL, A. M., SHENKER, A. und WEINSTEIN, L. S. (1992): Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocr Rev* **3**, 536-65.
- SPILLANTINI, M. G., MURRELL, J. R., GOEDERT, M., FARLOW, M. R., KLUG, A. und GHETTI, B. (1998): Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **13**, 7737-41.
- STAM, M., BELELE, C., DORWEILER, J. E. und CHANDLER, V. L. (2002a): Differential chromatin structure within a tandem array 100 kb upstream of the maize b1 locus is associated with paramutation. *Genes Dev* **15**, 1906-18.
- STAM, M., BELELE, C., RAMAKRISHNA, W., DORWEILER, J. E., BENNETZEN, J. L. und CHANDLER, V. L. (2002b): The regulatory regions required for B' paramutation and expression are located far upstream of the maize b1 transcribed sequences. *Genetics* **2**, 917-30.
- STELZL, U., WORM, U., LALOWSKI, M., HAENIG, C., BREMBECK, F. H., GOEHLER, H., STROEDICKE, M., ZENKNER, M., SCHOENHERR, A., KOEPPEN, S., TIMM, J., MINTZLAFF, S., ABRAHAM, C., BOCK, N., KIETZMANN, S., GOEDDE, A., TOKSOZ, E., DROEGE, A., KROBITSCH, S., KORN, B., BIRCHMEIER, W., LEHRACH, H. und WANKER, E. E. (2005): A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **6**, 957-68.
- STRACK, S., KINI, S., EBNER, F. F., WADZINSKI, B. E. und COLBRAN, R. J. (1999): Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *J Comp Neurol* **3**, 373-84.
- STRONG, T. V., WILKINSON, D. J., MANSOURA, M. K., DEVOR, D. C., HENZE, K., YANG, Y., WILSON, J. M., COHN, J. A., DAWSON, D. C., FRIZZELL, R. A. und ET AL. (1993): Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. *Hum Mol Genet* **3**, 225-30.

- STUDER, M., LUMSDEN, A., ARIZA-MCNAUGHTON, L., BRADLEY, A. und KRUMLAUF, R. (1996): Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* **6610**, 630-4.
- SURANI, M. A., REIK, W. und ALLEN, N. D. (1988): Transgenes as molecular probes for genomic imprinting. *Trends Genet* **3**, 59-62.
- SVITKIN, Y. V., PAUSE, A. und SONENBERG, N. (1994): La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol* **11**, 7001-7.
- SZABO, P., TANG, S. H., RENTSENDORJ, A., PFEIFER, G. P. und MANN, J. R. (2000): Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* **10**, 607-10.
- THIO, G. L., RAY, R. P., BARCELO, G. und SCHUPBACH, T. (2000): Localization of gurken RNA in Drosophila oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript. *Dev Biol* **2**, 435-46.
- VALLEJO, M., RON, D., MILLER, C. P. und HABENER, J. F. (1993): C/ATF, a member of the activating transcription factor family of DNA-binding proteins, dimerizes with CAAT/enhancer-binding proteins and directs their binding to cAMP response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **10**, 4679-83.
- VANDEPOELE, K., DE VOS, W., TAYLOR, J. S., MEYER, A. und VAN DE PEER, Y. (2004): Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **6**, 1638-43.
- VARMUZA, S. und MANN, M. (1994): Genomic imprinting--defusing the ovarian time bomb. *Trends Genet* **4**, 118-23.
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., SMITH, H. O., YANDELL, M., EVANS, C. A., HOLT, R. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P., BALLEW, R. M., HUSON, D. H., WORTMAN, J. R., ZHANG, Q., KODIRA, C. D., ZHENG, X. H., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P. D., ZHANG, J., GABOR MIKLOS, G. L., NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A. G., NADEAU, J., MCKUSICK, V. A., ZINDER, N., LEVINE, A. J., ROBERTS, R. J., SIMON, M., SLAYMAN, C., HUNKAPILLER, M., BOLANOS, R., DELCHER, A., DEW, I., FASULO, D., FLANIGAN, M., FLOREA, L., HALPERN, A., HANNENHALLI, S., KRAVITZ, S., LEVY, S., MOBARRY, C., REINERT, K., REMINGTON, K., ABU-THREIDEH, J., BEASLEY, E., BIDDICK, K., BONAZZI, V., BRANDON, R., CARGILL, M., CHANDRAMOULISWARAN, I., CHARLAB, R., CHATURVEDI, K., DENG, Z., DI FRANCESCO, V., DUNN, P., EILBECK, K., EVANGELISTA, C., GABRIELIAN, A. E., GAN, W., GE, W., GONG, F., GU, Z., GUAN, P., HEIMAN, T. J., HIGGINS, M. E., JI, R. R., KE, Z., KETCHUM, K. A., LAI, Z., LEI, Y., LI, Z., LI, J., LIANG, Y., LIN, X., LU, F., MERKULOV, G. V., MILSHINA, N., MOORE, H. M., NAIK, A. K., NARAYAN, V. A., NEELAM, B., NUSSKERN, D., RUSCH, D. B., SALZBERG, S., SHAO, W., SHUE, B., SUN, J., WANG, Z., WANG, A., WANG, X., WANG, J., WEI, M., WIDES, R., XIAO, C., YAN, C., YAO, A., YE, J., ZHAN, M., ZHANG, W., ZHANG, H., ZHAO, Q., ZHENG, L., ZHONG, F., ZHONG, W., ZHU, S., ZHAO, S., GILBERT, D., BAUMHUETER, S., SPIER, G., CARTER, C., CRAVCHIK, A., WOODAGE, T., ALI, F., AN, H., AWE, A., BALDWIN, D., BADEN, H., BARNSTEAD, M., BARROW, I., BEESON, K., BUSAM, D., CARVER, A., CENTER, A., CHENG, M. L., CURRY, L., DANAHER, S., DAVENPORT, L., DESILETS, R., DIETZ, S., DODSON, K., DOUP, L., FERRIERA, S., GARG, N., GLUECKSMANN, A., HART, B., HAYNES, J., HAYNES, C., HEINER, C., HLADUN, S., HOSTIN, D., HOUCK, J., HOWLAND, T., IBEGWAM, C., JOHNSON, J., KALUSH, F., KLINE, L., KODURU, S., LOVE, A., MANN, F., MAY, D., MCCAWLEY, S., MCINTOSH, T., MCMULLEN, I., MOY, M., MOY, L., MURPHY, B., NELSON, K., PFANNKOCH, C., PRATTS, E., PURI, V., QURESHI, H., REARDON, M., RODRIGUEZ, R., ROGERS, Y. H., ROMBLAD, D., RUHFEL, B., SCOTT, R., SITTER, C., SMALLWOOD, M., STEWART, E., STRONG, R., SUH, E., THOMAS, R., TINT, N. N., TSE, S., VECH, C., WANG, G., WETTER, J., WILLIAMS, S., WILLIAMS, M., WINDSOR, S., WINN-DEEN, E., WOLFE, K., ZAVERI, J., ZAVERI, K., ABRIL, J. F., GUIGO, R., CAMPBELL, M. J., SJOLANDER, K. V., KARLAK, B., KEJARIWAL, A., MI, H., LAZAREVA, B., HATTON, T., NARECHANIA, A., DIEMER, K., MURUGANUJAN, A., GUO, N., SATO, S., BAFNA, V., ISTRAIL, S., LIPPERT, R., SCHWARTZ, R., WALENZ, B., YOUSEPH, S., ALLEN, D., BASU, A., BAXENDALE, J., BLICK, L., CAMINHA, M., CARNES-STINE, J., CAULK, P., CHIANG, Y. H., COYNE, M., DAHLKE, C., MAYS, A., DOMBROSKI, M., DONNELLY, M., ELY, D., ESPARHAM, S., FOSLER, C., GIRE, H., GLANOWSKI, S., GLASSER, K., GLODEK, A., GOROKHOV, M., GRAHAM, K., GROPMAN, B., HARRIS, M., HEIL, J., HENDERSON, S., HOOVER, J., JENNINGS, D., JORDAN, C., JORDAN, J., KASHA, J., KAGAN, L., KRAFT, C., LEVITSKY, A., LEWIS, M., LIU, X., LOPEZ, J., MA, D., MAJOROS, W., MCDANIEL, J., MURPHY, S., NEWMAN, M., NGUYEN, T., NGUYEN, N., NODELL, M., PAN, S., PECK, J., PETERSON, M., ROWE, W., SANDERS, R., SCOTT, J., SIMPSON, M., SMITH, T., SPRAGUE, A., STOCKWELL, T., TURNER, R., VENTER, E., WANG, M., WEN, M., WU, D., WU, M., XIA, A., ZANDIEH, A. und ZHU, X. (2001): The sequence of the human genome. *Science* **5507**, 1304-51.

- VINCENT, M., LAURIAULT, P., DUBOIS, M. F., LAVOIE, S., BENSUADE, O. und CHABOT, B. (1996): The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes. *Nucleic Acids Res* **23**, 4649-52.
- VON MERING, C., KRAUSE, R., SNEL, B., CORNELL, M., OLIVER, S. G., FIELDS, S. und BORK, P. (2002): Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* **6887**, 399-403.
- WALKER, E. L. und PANAVALAS, T. (2001): Structural features and methylation patterns associated with paramutation at the r1 locus of *Zea mays*. *Genetics* **3**, 1201-15.
- WASSENEGGER, M., HEIMES, S., RIEDEL, L. und SANGER, H. L. (1994): RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **3**, 567-76.
- WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J. F., AGARWAL, P., AGARWALA, R., AINSCOUGH, R., ALEXANDERSSON, M., AN, P., ANTONARAKIS, S. E., ATTWOOD, J., BAERTSCH, R., BAILEY, J., BARLOW, K., BECK, S., BERRY, E., BIRREN, B., BLOOM, T., BORK, P., BOTCHERBY, M., BRAY, N., BRENT, M. R., BROWN, D. G., BROWN, S. D., BULT, C., BURTON, J., BUTLER, J., CAMPBELL, R. D., CARNINCI, P., CAWLEY, S., CHIAROMONTE, F., CHINWALLA, A. T., CHURCH, D. M., CLAMP, M., CLEE, C., COLLINS, F. S., COOK, L. L., COPLEY, R. R., COULSON, A., COURONNE, O., CUFF, J., CURWEN, V., CUTTS, T., DALY, M., DAVID, R., DAVIES, J., DELEHAUNTY, K. D., DERI, J., DERMITZAKIS, E. T., DEWEY, C., DICKENS, N. J., DIEKHANS, M., DODGE, S., DUBCHAK, I., DUNN, D. M., EDDY, S. R., ELNITSKI, L., EMES, R. D., ESWARA, P., EYRAS, E., FELSENFELD, A., FEWELL, G. A., FLICEK, P., FOLEY, K., FRANKEL, W. N., FULTON, L. A., FULTON, R. S., FUREY, T. S., GAGE, D., GIBBS, R. A., GLUSMAN, G., GNERRE, S., GOLDMAN, N., GOODSTADT, L., GRAFHAM, D., GRAVES, T. A., GREEN, E. D., GREGORY, S., GUIGO, R., GUYER, M., HARDISON, R. C., HAUSSLER, D., HAYASHIZAKI, Y., HILLIER, L. W., HINRICHS, A., HLAVINA, W., HOLZER, T., HSU, F., HUA, A., HUBBARD, T., HUNT, A., JACKSON, I., JAFFE, D. B., JOHNSON, L. S., JONES, M., JONES, T. A., JOY, A., KAMAL, M., KARLSSON, E. K., KAROLCHIK, D., KASPRZYK, A., KAWAI, J., KEIBLER, E., KELLS, C., KENT, W. J., KIRBY, A., KOLBE, D. L., KORF, I., KUCHERLAPATI, R. S., KULBOKAS, E. J., KULP, D., LANDERS, T., LEGER, J. P., LEONARD, S., LETUNIC, I., LEVINE, R., LI, J., LI, M., LLOYD, C., LUCAS, S., MA, B., MAGLOTT, D. R., MARDIS, E. R., MATTHEWS, L., MAUCELI, E., MAYER, J. H., MCCARTHY, M., MCCOMBIE, W. R., MCLAREN, S., MCLAY, K., MCPHERSON, J. D., MELDRIM, J., MEREDITH, B., MESIROV, J. P., MILLER, W., MINER, T. L., MONGIN, E., MONTGOMERY, K. T., MORGAN, M., MOTT, R., MULLIKIN, J. C., MUZYNY, D. M., NASH, W. E., NELSON, J. O., NHAN, M. N., NICOL, R., NING, Z., NUSBAUM, C., O'CONNOR, M. J., OKAZAKI, Y., OLIVER, K., OVERTON-LARTY, E., PACHTER, L., PARRA, G., PEPIN, K. H., PETERSON, J., PEVZNER, P., PLUMB, R., POHL, C. S., POLIAKOV, A., PONCE, T. C., PONTING, C. P., POTTER, S., QUAIL, M., REYMOND, A., ROE, B. A., ROSKIN, K. M., RUBIN, E. M., RUST, A. G., SANTOS, R., SAPOJNIKOV, V., SCHULTZ, B., SCHULTZ, J., SCHWARTZ, M. S., SCHWARTZ, S., SCOTT, C., SEAMAN, S., SEARLE, S., SHARPE, T., SHERIDAN, A., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., SINGER, J. B., SLATER, G., SMIT, A., SMITH, D. R., SPENCER, B., STABENAU, A., STANGE-THOMANN, N., SUGNET, C., SUYAMA, M., TESLER, G., THOMPSON, J., TORRENTS, D., TREVASKIS, E., TROMP, J., UCLA, C., URETA-VIDAL, A., VINSON, J. P., VON NIEDERHAUSERN, A. C., WADE, C. M., WALL, M., WEBER, R. J., WEISS, R. B., WENDL, M. C., WEST, A. P., WETTERSTRAND, K., WHEELER, R., WHELAN, S., WIERZBOWSKI, J., WILLEY, D., WILLIAMS, S., WILSON, R. K., WINTER, E., WORLEY, K. C., WYMAN, D., YANG, S., YANG, S. P., ZDOBNOV, E. M., ZODY, M. C. und LANDER, E. S. (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **6915**, 520-62.
- WEINSTEIN, L. S., YU, S., WARNER, D. R. und LIU, J. (2001): Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocr Rev* **5**, 675-705.
- WILLIAMSON, C. M., BALL, S. T., NOTTINGHAM, W. T., SKINNER, J. A., PLAGGE, A., TURNER, M. D., POWLES, N., HOUGH, T., PAPWORTH, D., FRASER, W. D., MACONOCHE, M. und PETERS, J. (2004): A cis-acting control region is required exclusively for the tissue-specific imprinting of *Gnas*. *Nat Genet* **8**, 894-9.
- WILLIAMSON, C. M., DUTTON, E. R., ABBOTT, C. M., BEECHEY, C. V., BALL, S. T. und PETERS, J. (1995): Thirteen genes (*Cebpb*, *E2f1*, *Tcf4*, *Cyp24*, *Pck1*, *Acra4*, *Edn3*, *Kcnb1*, *Mc3r*, *Ntsr*, *Cd40*, *Plcg1* and *Rcad*) that probably lie in the distal imprinting region of mouse chromosome 2 are not monoallelically expressed. *Genet Res* **2**, 83-93.
- WILLIAMSON, C. M., SKINNER, J. A., KELSEY, G. und PETERS, J. (2002): Alternative non-coding splice variants of *Nespa3*, an imprinted gene antisense to *Nesp* in the *Gnas* imprinting cluster. *Mamm Genome* **2**, 74-9.
- WORCH, S. (2000): Isolierung und Untersuchungen zur Struktur und Expression zweier Gene aus dem Bereich des humanen Chromosoms 20q13. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- WROE, S. F., KELSEY, G., SKINNER, J. A., BODLE, D., BALL, S. T., BEECHEY, C. V., PETERS, J. und WILLIAMSON, C. M. (2000): An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **7**, 3342-6.
- WURST, W. und BALLY-CUIF, L. (2001): Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nat Rev Neurosci* **2**, 99-108.
- XU, Y., GOODYER, C. G., DEAL, C. und POLYCHRONAKOS, C. (1993): Functional polymorphism in the parental imprinting of the human IGF2R gene. *Biochem Biophys Res Commun* **2**, 747-54.
- XU, Y. Q., GRUNDY, P. und POLYCHRONAKOS, C. (1997): Aberrant imprinting of the insulin-like growth factor II receptor gene in Wilms' tumor. *Oncogene* **9**, 1041-6.
- YAN, H., YUAN, W., VELCULESCU, V. E., VOGELSTEIN, B. und KINZLER, K. W. (2002): Allelic variation in human gene expression. *Science* **5584**, 1143.
- YANG, L. V., HENG, H. H., WAN, J., SOUTHWOOD, C. M., GOW, A. und LI, L. (2003): Alternative promoters and polyadenylation regulate tissue-specific expression of Hemogen isoforms during hematopoiesis and spermatogenesis. *Dev Dyn* **4**, 606-16.
- YU, H., ISKEN, O., GRASSMANN, C. W. und BEHRENS, S. E. (2000): A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. *J Virol* **13**, 5825-35.
- YU, S., YU, D., LEE, E., ECKHAUS, M., LEE, R., CORRIA, Z., ACCILI, D., WESTPHAL, H. und WEINSTEIN, L. S. (1998): Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (Gsalph) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the gsalph gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **15**, 8715-20.
- YUKAWA, K., TANAKA, T., TSUJI, S. und AKIRA, S. (1999): Regulation of transcription factor C/ATF by the cAMP signal activation in hippocampal neurons, and molecular interaction of C/ATF with signal integrator CBP/p300. *Brain Res Mol Brain Res* **1**, 124-34.
- ZHANG, M. Q. (2003): Prediction, annotation, and analysis of human promoters. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 217-25.
- ZUKER, M. (1989): On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **4900**, 48-52.

**Anhang**

Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich auf das *SCAPININ/Scapinin*-Gen des Menschen bzw. der Maus oder deren Genprodukte.

**Anlage 1:** Sequenz des Startexons 1A des Menschen.

```
ATGCGTGGCCGTGGCGGGGGCGCGCCCGCTGTCCTGCGCCCTGCGCTCGCTGCTGGGC      60
GCCTTCGGGGCCCAGGACGCTGCCGCCCGCCCGAGATCCTGCGCAAG                    109
```

**Anlage 2:** Sequenz des Startexons 1B des Menschen.

```
GCAATTGCAAGAGCAAAGATTCTTCCTTTTCCCTTTTTTCTGGGGGGGTGGGGGGTGGG      60
GTGGGGGGAGGGAGCGCCCCCAGACATTCAGGACATCACCCCTGCCCAAGCACGCAA      120
TAAACACTGACAAGAAAAGTTTTTATTTCTGGTTCAACTTTTTTTTTTTTCCCTGGAA      180
TATAGACTGAAGAATGGGAATAAACACGAATAAATAACAAAGCGAGGCCGCGCACGCCGG      240
GATGCGCCTGGCTGCAGCCGGCGAGGCTATTGTCTCCCCGCCCTGAAGCCAGCCCCGGCG      300
TCTTTCTCCAGCTCGTTTCCTTTCCCGGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTCT      360
TTTTTAAAAGACGCCCCCTCCAGCCCCCTCGCCGGTGACCTTGGCCGCCTCGGATGCTC      420
TGATTCCACGCGGCTCGCTCTAACTTGCCCCCGCGCCGGCCGGGCCATGGCCGCGTCGG      480
AGGACGGGAGCGGCTGCCTCGTGTGCGGGGGCCGCTCGCAGAGTGACCCAGCGTCCTCA      540
CCGACTCCTCGCCACCTCCTCCGCGGACGCCGGGAGAACCAG                          585
```

**Anlage 3:** Sequenz des Exons 1B2 des Menschen.

```
GACAGTGTCTCACTCTGTGCGCCAGGCCGGAGTGACAGTGCAGTGCAGCCATCTCGGCTCACTGTG      60
ACCTCTGCCTGCCTGGTTCAAGCAATTCTTGCTGCAGGGTTCAAGCAATTCTCCTGCCT      120
CAGCCTCCCAGTGGCTGGGACTACAG                                          147
```

**Anlage 4:** Sequenz des Startexons 1C des Menschen.

```
ACCTTTCAGGGAGATTTGAGAGAAAGACTCCAGAAGCCCGCGGGGAGAGCAGGGGTTCTG      60
GGGAAGATAAAGCCCTTCATCCAGGATCCCTCTGTGACCATAAG                    104
```

**Anlage 5:** Sequenz des Startexons 1D des Menschen.

```
CATTCAAACCCAGTCCATTCTGGCTCATGGGGCCCAAGCCTTGCTCTGCTGCCCCAGGCT      60
GTGTAGGATGCATCTGCGGTGGCCATTCTTCTCTCCAGAGGTCCTTCTAGGACTGACTT      120
TGTGGAGATTCTGTGCTGGTAGGTGGCGGGGCAAGACACGCTGTCTCTCCCCCTGGAAG      180
GAGTCAGTCCAGCAAGAAACCTGATGAAACCAGTGACTCCAGCTCTGG                229
```

**Anlage 6:** Sequenz der Exons 2-13 des Menschen inklusive Exon fünf, der offene Leserahmen ist fett hervorgehoben.

ATGAGATGGACCAAACGCCCCCGGCGCGTCTGAATATCTGGTCTCAGGGATTGGAATC	60
CCCCGTGTGAGGAGGAACAGCAAACCTGGCCACCTGGGCAGGATCTTCAAACCTGGAAAT	120
GGAGGAAAAAGAAAAACGAAAACTGAAGCAGACAACGTCAGCGCTGGAGAAGAAGATGG	180
CCGGCAGGCAAGGCCGAGAGGAGCTCATCAAGAAGGGGCTGCTGGAGATGATGGAGCAGG	240
ATGCTGAAAGCAAAACTTGCACCCCGATGGAGGACCCCGATCTGTACAGAGTGAACCAC	300
CCACTCCCAAGTCGGAGACGCTGACTTCAGAAGATGCCAGCCCGGAAGCCCCTTGGCCA	360
CTGGGACGGACCAGGTCTCCCTGGACAAGCCACTGTCTCAGCTGCCCACTTGGACGATG	420
CAGCCAAGATGCCTTCTGCATCCAGTGGTGAAGAAGCAGACGCTGGCAGCCTCCTGCCCA	480
CCACCAATGAGCTCTCCAAGCCTTAGCTGGGGCTGACTCCCTGGACAGTCTTCCCAGAC	540
CTCTGGAGAGATCCGTGGGCCAGCTCCCCAGCCCCCACTGCTGCCCACTCCGCCACCCA	600
AGGCAAGCTCCAAAACCAAAAAATGTACAGGCCAAGCCACACTCTTCCAAGCCTCCA	660
GCATGAAGAGTGCCGACCCTTCCCTCCGGGCCAGCTCTCCACACCCACGGGGTCTCCGC	720
ATCTCACCAAGTCCACCGGCCTTTCGGCCCAAGCCGCTCATTTGAGGAGCTGCACAGG	780
CGCTGGCCACGAAGCACCGCCAGGACAGTTTTCAAGGAAGAGAAAGTAAAGGGTCTCCAA	840
AGAGGCGGCTGGATGTCGGTCTGTGCGAGAACGTCCAGCGTGGAGCGGGGCAAGGAGAGG	900
AGGAGGCTTGGAGCTTTGACGGGGCATTGGAGAACAAGCGAACTGCCGCTAAGGAATCTG	960
AGGAGAACAAGGAGAACCTGATCATAAATTCTGAACTCAAAGACGACTTGCTTTTGTATC	1020
AGGACGAGGAGGCGTGAACGACTCCATTATTTCTGGAACACTGCCACGGAAATGCAGGA	1080
AGGAGTCTCTGGCCGTGAAGCTAAGGAACCGGCCAAGCAAACAGGAACTAGAAGACCGGA	1140
ACATTTTCCCAGAAAGACTGATGAAGAGAGACAGGAGATCCGGCAGCAGATCGAGATGA	1200
AGCTTTCCAAACGGCTGAGCCAAAAGACCTGCCGTGGAAGAGCTGGAGAGAAAGAAATATCT	1260
TGAAACAAAGGAATGATCAGACAGAGCAGGAAGAAAGAAAGAGAAATCAAGCAAAGATTGA	1320
CAAGAAAGCTTAATCAGAGACCCACTGTTGATGAATTAAGAGACAGAAAAATTTCTGATAC	1380
GATTCAGTGATTACGTGGAAGTAGCAAAAGCGCAGGACTATGACAGGAGGGCAGACAAAC	1440
CCTGGACGAGACTGTCAGCAGCAGATAAAGGCAGCAATTCGTAAAGAATTAATGAGTACA	1500
AAAGTAATGAAATGGAGGTACATGCATCAAGCAAGCACTTGACAAGATTCCACAGGCCAT	1560
AGAGATTTTCTTCTGAGAAGAATTTGTGTTTAAATTTTTTGGATACCAACACTGAACATTCA	1620
TCAGGGAACCTTCTGAAAGTTCAGCTCAAGACTACCCTACCTGCTGTGTTTGTGAGAAGA	1680
GTAGGATCACACACAGGTGCAATCTTGACCACACTTACCTGCAAGAGGAGTAACCAGA	1740
GGACACACTTCCTTCTTCTTTGGTGTCTGAGGAGTGTGAACTGTTGGGGTCAGTTAAGA	1800
CCCAACATAACTCTATCAGAAGAAAAGTGTGTTTGCCTTTCAACCTTGTTTTACAGTTC	1860
TGCAGTGTAATGGAGGACGGGCAACGTGCATGTGCAGGCTCACCCTCCAGGCCTCTGA	1920
CATGAGGGACATGTGACAGTGTCAATCAGTATTATGTTCAAAGACATTTTTTATCCTGAT	1980
CATAATTAATTTGAAAAGTCTTTAAGTTCATGTTACACAAGATGATTTACCGCATTATAC	2040
TTTTCTTTTTTATATAATGTCTAACAAAAAATACAGCTGCAACATTTTGATTCTCTGTTA	2100
ATTTTGTCTTTAATTAATGACTACTTATTGCAGGAAATT	2141

**Anlage 7:** Sequenz der Exons 2-13 des Menschen ohne Exon fünf, der offene Leserahmen ist fett hervorgehoben.

ATGAGATGGACCAAACGCCCCCGGCGCGTCTCTGAATATCTGGTCTCAGGGATTTCGAACTC	60
CCCCGTGTGAGGAGGAACAGCAAACCTGGCCACCCCTGGGCAGGATCTTCAAACCCCTGGAAAT	120
GGAGGAAAAAGAAAAACGAAAACTGAAGCAGACAACGTCAGCGCTGGAGAAGAAGATGG	180
CCGGCAGGCAAGGCCGAGAGGAGCTCATCAAGAAGGGGCTGCTGGAGATGATGGAGCAGG	240
ATGCTGAAAGCAAAACTTGCAACCCCGATGGAGGACCCCGATCTGTACAGAGTGAACCAC	300
CCACTCCCAAGTCGGAGACGCTGACTTCAGAAGATGCCAGCCCGGAAGCCCCTTGCCA	360
CTGGGACGGACCAGGTCTCCCTGGACAAGCCACTGTCTCAGCTGCCCACTTGGACGATG	420
CAGGCCAAGCCACACTCTTCCAAGCCTCCAGCATGAAGAGTGCCGACCCTTCCCTCCGGG	480
GCCAGTCTCTCCACACCCACGGGGTCTCCGCATCTCACCACGGTCCACCGGCCTTTCCCC	540
CAAGCCGCGTCATTGAGGAGCTGCACAGGGCGCTGGCCACGAAGCACCGCCAGGACAGTT	600
TTCAAGGAAGAGAAAAGTAAAGGGTCTCAAAGAGGGCGGCTGGATGTCCGTCTGTCGAGAA	660
CGTCCAGCGTGGAGCGGGGCAAGGAGAGGGAGGCTTGGAGCTTTGACGGGGCAATTGG	720
AGAACAAGCGAACTGCCGCTAAGGAATCTGAGGAGAACAAGGAGAACCCTGATCATAAAT	780
CTGAACTCAAAGACGACTTGCTTTTGTATCAGGACGAGGAGGCGCTGAACGACTCCATTA	840
TTTTCTGGAACACTGCCACGGAATGCAGGAAGGAGCTCCTGGCCGTGAAGCTAAGGAACC	900
GGCCAAGCAAACAGGAACTAGAAGACCGGAACATTTTCCCCAGAAGGACTGATGAAGAGA	960
GACAGGAGATCCGGCAGCAGATCGAGATGAAGCTTTCAAACGGCTGAGCCAAAGACCTG	1020
CCGTGGAAGAGCTGGAGAGAAGAAATATCTTGAAACAAAGGAATGATCAGACAGAGCAGG	1080
AAGAAAGAAGAGAAATCAAGCAAAGATTGACAAGAAAGCTTAATCAGAGACCCACTGTTG	1140
ATGAATTAAGAGACAGAAAAATCTGATACGATTCAGTGATTACGTGGAAGTAGCAAAAAG	1200
CGCAGGACTATGACAGGAGGGCAGACAAACCCCTGGACGAGACTGTCAGCAGCAGATAAGG	1260
CAGCAATTCGTAAGAATTAATGAGTACAAAAGTAATGAAATGGAGGTACATGCATCAA	1320
GCAAGCACTTGACAAGATTCCACAGGCCATAGAGATTTTCTTCTGAGAAGAATTTGTGTT	1380
TAATTTTTTGATACCAACACTGAACATTCATCAGGGAACCTTCTGAAGTTCAGCTCAAG	1440
ACTACCCTACCTGCTGTGTTTTGTGAGAAGAGTAGGATCACACACACAGGTGCAATCTTGA	1500
CCACACTTACCTGCAAGAGGAGTAACCAGAGGACACACTTCTTCTTCTTTGGTGTCTG	1560
AGGAGTGTGAACCTGTTGGGGTCAAGTTAAGACCCAACATAACTCTATCAGAAGAAAAGTGT	1620
TGTTTGCCTTTCAACCTTGTTTTACAGTTCTGCAGTGTAATGGAGGACGGGCAACGTGCA	1680
TGTGCAGGCTCACCCTCCAGGCCTCTGACATGAGGGACATGTGACAGTGTCATTCAGT	1740
ATTATGTTCAAAGACATTTTTATCCTGATCATAATTAATTTGAAAACCTTTTAAGTTCA	1800
TGTTACACAAGATGATTTACCGCATTATACTTTTCTTTTTTATATAATGTCTAACAAAA	1860
AATACAGCTGCAACATTTTTGATTCCTGTTAATTTGTTCTTTAATTAATGACTACTTAT	1920
TGCAGGAAATT	1931

**Anlage 8:** Putative Aminosäuresequenz des humanen Proteins inklusive Exon fünf.

MDQTPPARPEYLVSGIRTPPVRRNSKLATLGRIFKPWKWRKKKNEKLKQTTSALEKKMAG	60
RQGREELIKKGLLEMMEQDAESKTCNPDGGPRSVQSEPTPKSETLTSEDAQPGSPLATG	120
TDQVSLDKPLSSAAHLDDAAKMPSSASSGEEADAGSLLPTTNELSQLAGADSLDSPRPL	180
ERSVGLPSPPLLPTPPPASKSTTKNVTGQATLQASSMKSADPSLRGQLSTPTGSPHL	240
TTVHRPLPPSRVIEELHRALATKHRQDSFQGRESKGS PKRRLDVRLSRTSSVERGKEREE	300
AWSFDGALENKRATAAKESEENKENLIINSELKDDLLLYQDEEALNDSIISGTLPRKCRKE	360
LLAVKLRNRPSKQELEDRNIFPRRTDEERQEI RQQIEMKLSKRLSQRPAVEELERRNILK	420
QRNDQTEQEEERREIKQRLTRKLNQRPTVDELDRKILIRFSDYVEVAKAQDYDRRADKPW	480
TRLSAADKAAIRKELNEYKSNEMEVHASSKHLTRFHRP	518

**Anlage 9:** Putative Aminosäuresequenz des humanen Proteins ohne Exon fünf.

MDQTPPARPEYLVSGIRTPPVRRNSKLATLGRIFKPWKWRKKKNEKLKQTTSALEKKMAG	60
RQGREELIKKGLLEMMEQDAESKTCNPDGGPRSVQSEPTPKSETLTSEDAQPGSPLATG	120
TDQVSLDKPLSSAAHLDDAGQATLQASSMKSADPSLRGQLSTPTGSPHLTTVHRPLPPS	180
RVIEELHRALATKHRQDSFQGRESKGS PKRRLDVRLSRTSSVERGKEREEAWSFDGALEN	240
KRATAAKESEENKENLIINSELKDDLLLYQDEEALNDSIISGTLPRKCRKELLAVKLRNRP	300
SKQELEDRNIFPRRTDEERQEI RQQIEMKLSKRLSQRPAVEELERRNILKQRNDQTEQEE	360
RREIKQRLTRKLNQRPTVDELDRKILIRFSDYVEVAKAQDYDRRADKPWTRLSAADKAA	420
IRKELNEYKSNEMEVHASSKHLTRFHRP	448

**Anlage 10:** Sequenz des Startexons 1A der Maus.

AACGGGTCTGGCCTTCAGGGAGATGCGTGGCCAAGGCAGGGGGCACGCCCGCTGGCCCCG	60
GCCTCTGCGCTCACTGCTGCGTGCTTTGGGCCCAAGACACCACCACCGGAGGCTTGGA	120
GCAAG	125

**Anlage 11:** Sequenz des Startexons 1B der Maus.

GTTTTCCAACAGATGCTCCAAGAACAGCTTTT CAGATTAAAGCAATTGCAAGAGCAAAGAT	60
TCTCCTTTTTTCCCTTTTTTTTTTCGGGGGGGTGGGGGGTGGGGTGGGGGAGGGAGCACCCCC	120
AGACATTCCTGGACATCTCCCCCAGCCCCAAGCACGCCATAAACACTGACAAGAAAAAGT	180
TTTTATTTCTGGTTCAACTTTTTTTTTTTTCCCTGGAATATAAGCAGAAGAATGGGAATA	240
AATACGAATAAATAACAAAGCGAGGCCGCGCAAGCCGGGATGCGCCTGGCTGCAGCCTGC	300
AAGGCTTTTGTCTCCCCACCCTGAAGCCAGCCTGGCGTCTCCTCCGTTCTTTTTCTTTC	360
CTGGTCCCTTTTGCTTTTCCCTTTTAAAAAAGACGCCCTCTCCAGCCCCCTCGCCGGTGAC	420
CTTGCCGCCTAGGATGCTCTGATTCGCATCTCCCTCCAACCTGCCCCCTGCGTCGCCTT	480
TCCCATGGCCGCATCCGAGGACGGCAGCAGCTGCCTTGTGTGCGGGGGCCGCTCGCAGAG	540
TGACCCAGCTTCTCAGCGACTCCTCAGCCACCTCCACGGACGCCGGGGAGAACCCAG	599

**Anlage 12:** Sequenz des Startexons 1C der Maus.

RCTTCTTAAAGTCAGAAGCCATGCTTTGAAACAGTACCACACTCAATGCAAACAGCCAAC	60
CAGATGCTAAGTCTGAACTTCAGAAGGATGAAGTCAGGCACTGCAGCAGTGCGCACGCGC	120
GCACGCCATCGGCCTCCGGGGAGTGGGCCAGCCGCTGTGGTG	163

**Anlage 13:** Sequenz des Startexons 1D der Maus.

AGTCTCTGCCTCCAGGGCACCAGGGAACATCCAGGAGCTGCAGGGAAGCCGAGCTGCTG	60
GGGAAAATGGAGCCTTCCATCCAGAGCCACCCCTTGACCTTGGCCATGAG	110

**Anlage 14:** Sequenz der Exons 2-13 der Maus mit kurzem 3'-Bereich, der offene Leserahmen ist fett hervorgehoben.

ATGAGATGGACAAAAC	TCCCCAGCACGCTCAGAGCCTCTGGTCTCAGGGATTCGAACTC	60
CCCCTGTGAGGAGGAACAGCAAGCTGGCCACCTGGGCAGGATCTTCAAACCTTGAAAT		120
GGAGGAAAAAGAAAAACGAGAACTGAAGCAGACGACGTCAGCGCTGGAGAAGAAGATGG		180
CTGGCAGGCAAGGCCGGGAGGAACTCATCAAGCAGGGACTGCTGGAGATGATGGAGCAAG		240
ATTCTGAAAATAAGGCATGCAGTCCAAGGAAGGCTCCAACCTGTGCAGAGTGAGCCGC		300
CCGCTGGCGAGCAGGAGACGCTGACCTCGGAGGGCGCCAGCCCAGGAAAGCCCTCGGCCA		360
GTGGAACAGATCAGGTGTCCAGGATGAGCTTCTGTCCTCCGATGCTCATCTGGATGATA		420
CAGCCAATATACCGTCTGCATCCACTGCGGAAGAAGCAGACGCTGGCAGCCTCCTGCCCA		480
CCACTGATGAGCCCTCTCAAGCCTTAGCTGGGTCTGACTCCCTGGACAGTCTTCCAGAT		540
CCCTGGAGAGATCTGTGAGCCAGCTCCCCAGCCCTCCACTGCTGCCACCCCGCCACCCA		600
AGGCCAGCTCTAAAGCCACAAAAAATGTACAGGACAAGCTGCGCTCTTCCAAGCCCCA		660
GCATGAAGAACAATGAGCCGGCTCTCAGAGGACAGCTTGCCACCCACAGGGTCCCTC		720
ATGTCACCACTGTCCACCGGCCACTGCCCCAGCCGCGTGATGGAGGAGCTGCATAGGG		780
CACTGGCTACAAAGCACCGTCAGGACAGTTTTCAAGGGCGGGAATGCAGAGGGTCTCCAA		840
AGAAGCGGATGGATGTGCGTCTGTCTAGGACGTCCAGCATGGAGCGGGCAAGGAGAGGG		900
ACGAGGCGTGGAGCTTTGACGGGGCCTCAGAGAACAAGTGGACGGCTACCAAAGACTCCG		960
AGGAGAACAAGGAGAATCTGATGCTGAGCTCCGAGCTCAAGGATGACATGCTCCTGTATC	1020	
AGGACGAGGAGGCGCTCAATGACTCCATCATCTCGGAACTTTGCCGAGGAAATGCAAGA	1080	
AGGAGTTGCTGGCAGTGAAGCTGAGGAACCGGCCGAGCAAGCAGGAGCTAGAGGACCGGA	1140	
ACATCTTCCCAGGAGGACCGATGAGGAGAGACAGGAGATCCGACAGCAGATAGAGATGA	1200	
AGCTGTCCAAAAGGCTGAGCCAGAGACCCGCCGTGGAGGAACTGGAGAGAAGAAATATCC	1260	
TGAAACAAAGGAATGATCAGACAGAGCAGGAAGAAAGGAGAGAAATCAAGCAAAGATTAA	1320	
CAAGAAAGCTTAACCAGAGACCCACTGTTGATGAATTGAGAGACAGAAAAATCTGATCC	1380	
GTTTCAGTGATTATGTGGAAGTAGCAAGAGCACAGGACTATGACAGGAGGGCAGACAAGC	1440	
CCTGGACAAGACTGTCAGCAGCAGATAAGGCAGCAATTCGTAAAGAATTAATGAATATA	1500	
AAAGTAACGAAATGGAGGTACACGCATCCAGCAAGCACTTGACAAGATTCCACAGGCCAT	1560	
AGAGATTTTCTTCTGAGAAGAATTTGTGTTTAAATTTTTGATACCAACACTGAACATTCAT	1620	
CAGGGAACTTTCTCAAGTCTAACTGCTGTGTTTGTGAGAAGAGCAGAATCACGGAGACG	1680	
CAATCCTGACCACTGACTACAAGAGGAGCAACCCAGAGGATACACTCCCCTCTCTGGTGT	1740	
CTGAGGAGTGTGAACCGTTGGGGTCACTTTAGGCCAGAGTAACTCTCCAGAAGAAAAC	1800	
TTGTTTGCCTTCAACCTTGTTTTCCAGTTCTGCAGCGTCATGGAGGATGGGCGGGCGCCA	1860	
TGCATGTGCAGGCTCACACTCCAGCCTCCGCCACGCCACGAGGGACCTGTGACCCAGTG	1920	
TCATTAGTATTTTGTGAGAAGACATTTTTATCCTAATGATTTGAAAATAAGTTCATG	1980	
TTATAGAGTGGTTTACTGTACTATACTTTCTTTTTTATATGATGTCTAACAAAAAAA	2040	
AATACAGCTCCAACATTTTGATTCCTGTTAATTTGTTCTTTAATTAATGACTACTTAT	2100	
TACAGGAAATGAA	2113	

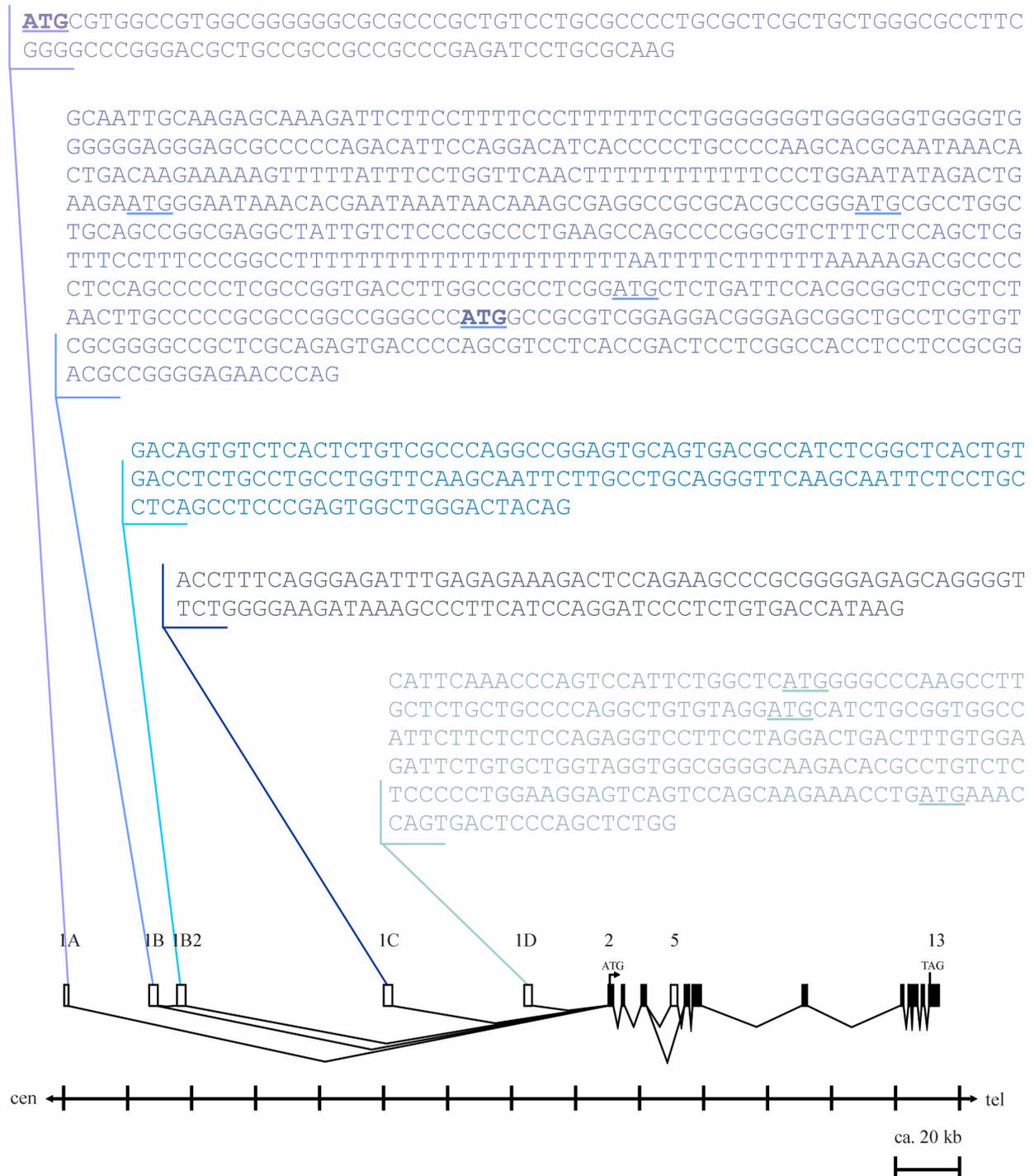
**Anlage 15:** Sequenz der Exons 2-13 der Maus mit langem 3'-Bereich, der offene Leserahmen ist fett hervorgehoben.

ATGAGATGGACCAAAC	TCCCCAGCACGCTCAGAGCCTCTGGTCTCAGGGATTCGAACTC	60
CCCCTGTGAGGAGGAACAGCAAGCTGGCCACCTGGGCAGGATCTTCAAACCTTGAAAT		120
GGAGGAAAAAGAAAAACGAGAACTGAAGCAGACGACGTCAGCGCTGGAGAAGAAGATGG		180
CTGGCAGGCAAGGCCGGGAGGAACTCATCAAGCAGGGACTGCTGGAGATGATGGAGCAAG		240
ATTCTGAAAATAAGGCATGCAGTCCAAGGAAGGCTCCAACCTGTGCAGAGTGAGCCGC		300
CCGCTGGCGAGCAGGAGACGCTGACCTCGGAGGGCGCCAGCCCGGAAGCCCTCGGCCA		360
GTGGAACAGATCAGGTGTCCAGGATGAGCTTCTGTCTCCGATGCTCATCTGGATGATA		420
CAGCCAATATACCGTCTGCATCCACTGCGGAAGAAGCAGACGCTGGCAGCCTCCTGCCCA		480
CCACTGATGAGCCCTCTCAAGCCTTAGCTGGGTCTGACTCCCTGGACAGTCTCTCCAGAT		540
CCCTGGAGAGATCTGTGAGCCAGTCCCCAGCCCTCCACTGCTGCCACCCCGCCACCCA		600
AGGCCAGCTCTAAAGCCACAAAAAATGTACAGGACAAGCTGCGCTCTTCCAAGCCCCA		660
GCATGAAGAACAAATGAGCCGGCTCTCAGAGGACAGCTTGCCACCCACAGGGTCCCTC		720
ATGTCACCACTGTCCACCGGCCACTGCCCCAGCCGCGTGATGGAGGAGCTGCATAGGG		780
CACTGGCTACAAAGCACCGTCAGGACAGTTTTCAAGGGCGGAATGCAGAGGGTCTCCAA		840
AGAAGCGGATGGATGTGCGTCTGTCTAGGACGTCCAGCATGGAGCGGGCAAGGAGAGGG		900
ACGAGGCGTGGAGCTTTGACGGGGCCTCAGAGAACAAGTGGACGGCTACCAAAGACTCCG		960
AGGAGAACAAGGAGAATCTGATGCTGAGCTCCGAGCTCAAGGATGACATGCTCCTGTATC		1020
AGGACGAGGAGGCGCTCAATGACTCCATCATCTCGGAACTTTGCCGAGGAAATGCAAGA		1080
AGGAGTTGCTGGCAGTGAAGCTGAGGAACCGGCCGAGCAAGCAGGAGCTAGAGGACCGGA		1140
ACATCTTCCCAGGAGGACCGATGAGGAGAGACAGGAGATCCGACAGCAGATAGAGATGA		1200
AGTGTCCAAAGGCTGAGCCAGAGACCCCGGTGGAGGAACTGGAGAGAAGAAATATCC		1260
TGAAACAAAGGAATGATCAGACAGACAGCAGGAAGAAAGGAGAGAAATCAAGCAAAGATTA		1320
CAAGAAAGCTTAACCAGAGACCCACTGTTGATGAATTGAGAGACAGAAAAATCTGATCC		1380
GTTTTAGTGATTATGTGGAAGTAGCAAGAGCACAGGACTATGACAGGAGGGCAGACAAGC		1440
CCTGGACAAGACTGTCAGCAGCAGATAAGGCAGCAATTCGTAAAGAATTAATGAATATA		1500
AAAGTAACGAAATGGAGGTACACGCATCCAGCAAGCACTTGACAAGATTCCACAGGCCAT		1560
AGAGATTTTCTTCTGAGAAGAATTTGTGTTTTAATTTTTGATACCAACTGAACATTCAT		1620
CAGGGAACTTTCTCAAGTCTAACTGCTGTGTTTGTGAGAAGAGCAGAATCACGGAGACG		1680
CAATCCTGACCACTGACTACAAGAGGAGCAACCCAGAGGATACACTCCCCTCTCTGGTGT		1740
CTGAGGAGTGTGAACCGTTGGGGTCACTTTAGGCCAGAGTAACCTCCCAGAAGAAAAC		1800
TTGTTTGCCTTCAACCTTGTTTTCCAGTTCTGCAGCGTCATGGAGGATGGGCGGGCGCCA		1860
TGCATGTGCAGGCTCACACTCCAGCCTCCGCCACGCCACGAGGGACCTGTGACCCAGTG		1920
TCATTCAGTATTTTGTGAGAAGACATTTTTATCCTAATGATTTGAAAATAAGTTTCATG		1980
TTATAGAGTGGTTTACTGTACTATACTTTCTTTTTTATATGATGTCTAACAAAAAAA		2040
AATACAGCTCCAACATTTTGATTCTGTTAATTTGTTCTTTAATTAATGACTACTTAT		2100
TACAGGAAATGAATAAAGGCTTTCAC'TTTCTTGGGGTTGGGATGAGGTATAGCTGGGGAC		2160
TTTGAAAAAAAAGTCAAGCCTTTTGAATATAAACACAAGAAAGGAAATGCCAACTTT		2220
GTTCTCTGTAGATTCTGTCAAATATATACAGGCTTGTGCCTTGACAACTAGTTACCATT		2280
TTTTCAAGTTAATTAATTGAAAATTTATGAAAGAGTATTGAACACATTTAACCTAGAAGG		2340
AACTTACTGGAAACCTAACAAAAGGAAAATCTATACCTTCTTTAAGAAAAGTTGTAAGT		2400
TTTCATTTGTCTGCATTATCAAAACCCCTATTATAAGAGGTTTAGATGGAATGAAGGTTT		2460
GGAGTAAGTAGTTTACTGAAATACAAGGGGAAGAAATGAGCTGACAAACAATAAAAATCC		2520
CCTACGTTTGT		2532

**Anlage 16:** Putative Aminosäuresequenz des murinen Proteins.

MDQTPPARSEPLVSGIRTPPVRNSKLATLGRIFKPWKWRKKNEKTKQTTSALEKKMAG	60
RQGREELIKQGLLEMMEQDSENKACSPKEGSQPVQSEPPAGEQETLTSEGAQPGSPSASG	120
TDQVSQDELLSSDAHLDDTANIPASATAEADAGSLLPTTDEPSQALAGSDSLDSPRSL	180
ERSVSQLPSPPLPTPPPKASSKATKNVTFQALFQGPSMKNNPALRGQLATPTGSPHV	240
TTVHRLPSPSRVMEELHRAATKHRQDSFQGRECRGSPKRMVDVRLSRTSSMERGERDE	300
AWSFDGASENKWTATKDSEENKENLMLSSELKDDMLLYQDEEALNDSIISGTLPRKCKKE	360
LLAVKLRNRPSPKQLEDRNIFPRRTDEERQEIQQIEMKLSKRLSQRPAVEELERNILK	420
QRNDQTEQEERREIKQRLTRKLNQRPVDELDRKILIRFSDYVEVARAQDYDRRADKPW	480
TRLSAADKAAIRKELNEYKSNEMEVHASSKHLTRFHRP	518

**Anlage 17:** Darstellung des 5'-Bereiches des Menschen. Die ATG-Codons in den Startexons sind unterstrichen, und fett hervorgehoben wenn sie *in frame* mit dem putativen Translationsstart in Exon 2 sind.



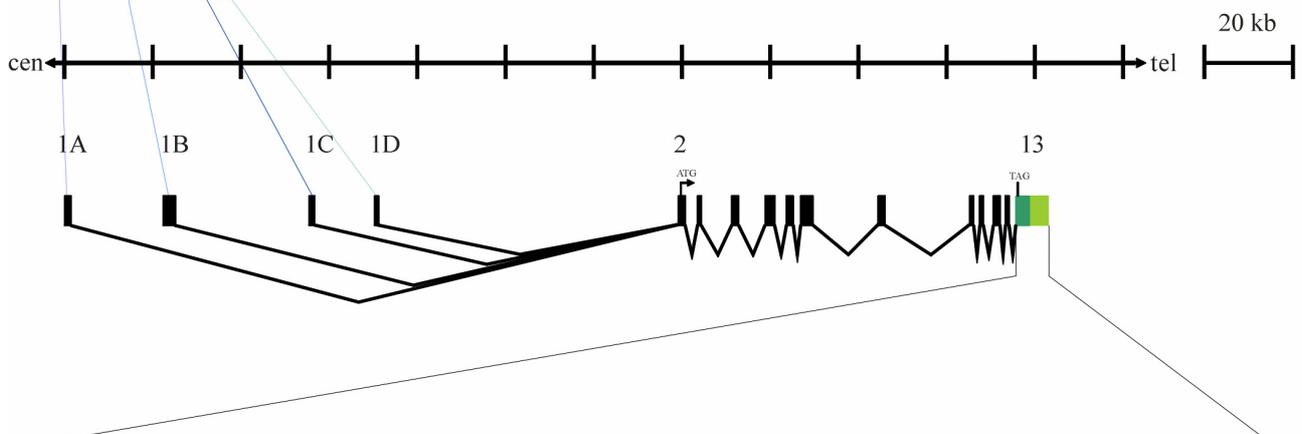
**Anlage 18:** Darstellung des 5'- und 3'-Bereiches der Maus. Die ATG-Codons in den Startexons sind unterstrichen, und fett hervorgehoben wenn sie *in frame* mit dem putativen Translationsstart in Exon 2 sind. Die unterschiedlichen 3'-Bereiche sind farblich unterschieden und die enthaltenen Polyadenylierungssignale sind unterstrichen.

AACGGGTCTGGCCTTCAGGGAGATGCGTGGCCAAGGCAGGGGGCACGCCCGCTGGCCCCGCGCCTCT  
GCGCTCACTGCTGCGTGCCTTTGGGCCCAAGACACCACCACCGGAGGCTTGGAGCAAG

GTTTTCCAACAGATGCTCCAAGAACAGCTTTCAGATTAAAGCAATTGCAAGAGCAAAGATTCTC  
CTTTTTCCCTTTTTTTCGGGGGGGTGGGGGGTGGGGTGGGGGGAGGGAGCACCCCAGACATTC  
CTGGACATCTCCCCAGCCCCAAGCACGCCATAAACACTGACAAGAAAAAGTTTTTATTTCTTG  
GTTCAACTTTTTTTTTTCCCCTGGAATATAAGCAGAAGAATGGGAATAAATACGAATAAATAAC  
AAAGCGAGGCCGCGCAAGCCGGGATGCGCCTGGCTGCAGCCTGCAAGGCTTTTGTCTCCCCACC  
CTGAAGCCAGCCTGGCGTCTCCTCCGTTCTTTTTCTTCTGGTCCCTTTTGTCTTTCTTTT  
AAAAAGACGCCCTCTCCAGCCCCCTCGCCGGTGACCTTGGCCGCCTAGGATGCTCTGATTCCG  
CATCTCCCTCCAACCTTGCCCTGCGTCGCTTTCCATGGCCGCATCCGAGGACGGCAGCAGCT  
GCCTTGTGTGCGGGGGCCGCTCGCAGAGTGACCCAGCTTCTCAGCGACTCCTCAGCCACCTC  
CACGGACGCCGGGGAGAACCCAG

RCTTCTTAAAGTCAGAAGCCATGCTTTGAAACAGTACCACACTCAATGCAAACAGCCAACC  
AGATGCTAAGTCTGAACTTCAGAAGGATGAAGTCAGGCACTGCAGCAGTGCGCACGCGCGC  
ACGCCATCGGCCTCCGGGGAGTGGGCCAGCCGCTGTGGTG

AGTCTCTGCCTCCAGGGCACCAGGGAAACATCCAGGAGCTGCAGGGAAGCCGAGCT  
GCTGGGGAAAATGGAGCCTTCCATCCAGAGCCACCCCTTGACCTTGGCCATGAG



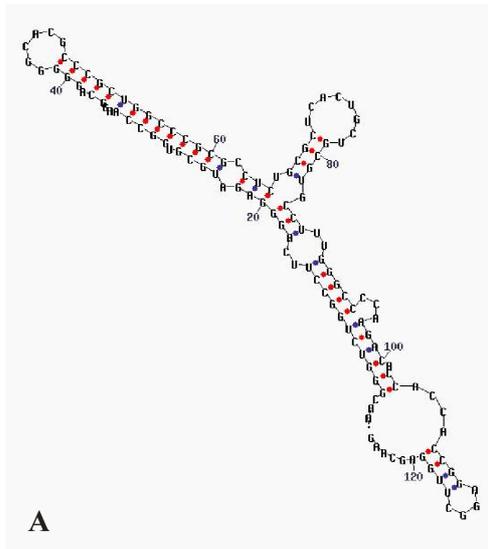
ATTCCACAGGCCATAGAGATTTTCTTCTGAGAAGAATTTGTGTTTAAATTTTTGATACCAACACTGA  
ACATTCATCAGGGAACCTTTCCTCAAGTCTAACTGCTGTGTTTGTGAGAAGAGCAGAATCACGGAGA  
CGCAATCCTGACCACTGACTACAAGAGGAGCAACCCAGAGGATACACTCCCCTCTCTGGTGTCTGA  
GGAGTGTGAACCGTTGGGGTCACTTTAGGCCAGAGTAACCTCTCCAGAAGAAAACCTTGTGTGCCT  
TCAACCTTGTTTCCAGTTCTGCAGCGTCATGGAGGATGGGCGGGCGCCATGCATGTGCAGGCTCA  
CACTCCAGCCTCCGCCACGCCACGAGGGACCTGTGACCCAGTGTCAATCAGTATTTTGTGAGAA  
GACATTTTTATCCTAATGATTTGAAAATAAGTTCATGTTATAGAGTGGTTTACTGTACTATACTT  
TCTCTTTTTTATATGATGTCTAACAAAAAAAAAATACAGCTCCAACATTTTGATTCTGTTAATTT  
TGTTCTTTAATTAAATGACTACTTATTACAGGAAATGAATAAAGGCTTTCACCTTCTTGGGGTTGG  
GATGAGGTATAGCTGGGACTTTGAAAAAAAAAAGTCAGCGCTTTTGAATATAAACACAAGAAAG  
GAAATGCCAACTTTGTTCTCTGTAGATTCTGTCAAATATATACAGGCTTGTGCCTTGACAACTAG  
TTACCATTTTTTCAAGTTAATTAATTGAAAATTTATGAAAGAGTATTGAACACATTTAACCTAGAA  
GGAACCTACTGGAAACCCTAACAAAAGGAAAATCTATACCTTCTTTAAGAAAAGTTGTAAGTTTTTC  
ATTTGTCTGCATTATCAAAACCCCTATTATAAGAGGTTTAGATGGAATGAAGGTTTGGAGTAAGTA  
GTTTACTGAAATACAAGGGGAAGAAATGAGCTGACAAACAATAAAAATCCCCTACGTTTGT

**Anlage 19:** Abbildung der zwei CpG-Inseln im 5'-Bereich des *Scapinin*-Gens der Maus. Die Sequenzen der enthaltenen Startexons 1A bzw. 1B sind fett hervorgehoben.

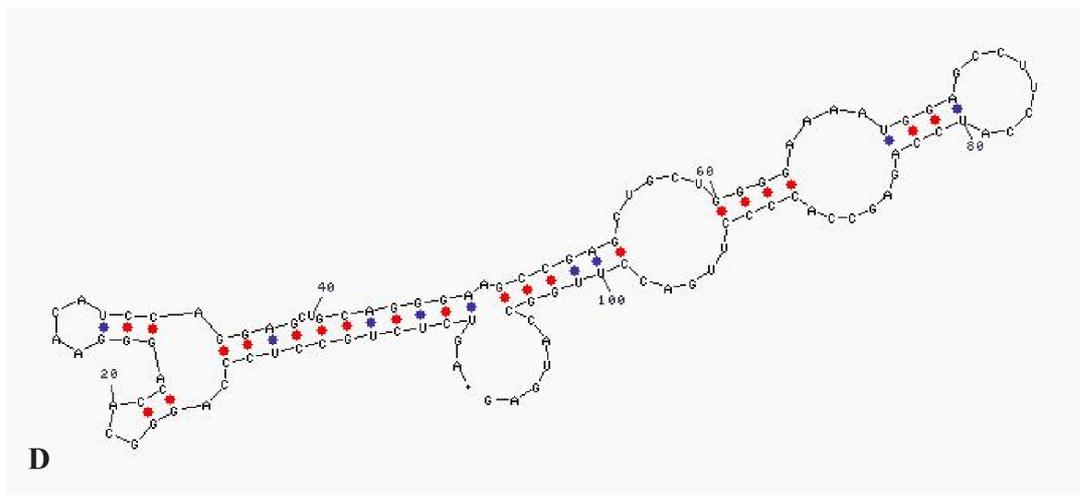
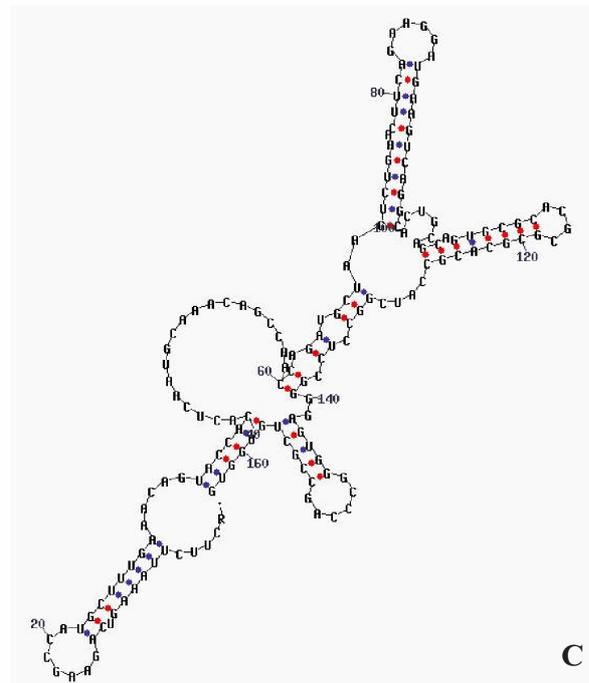
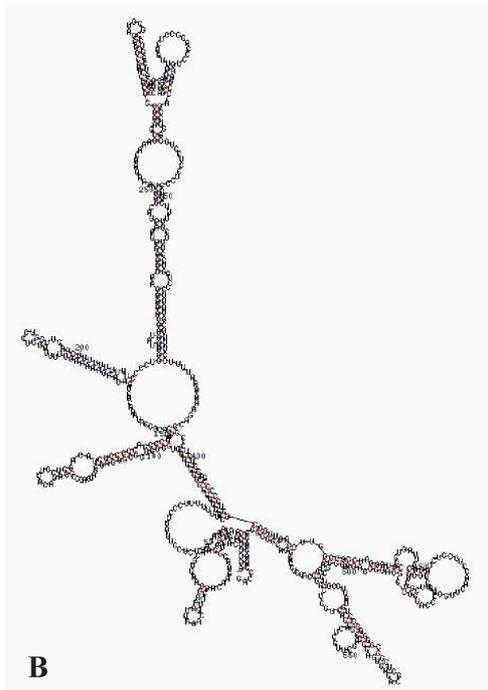
CACTGCTGAGCCCCTCTGCGCCTCCGCCCTGAGAAGGGGCCGAGCCTTTCAAGGCGGCGC	60
CGCCCCGCTCCAGTCCCGCCCCGCCCGCCAGCACCTCCCGGGGCCCGGCTCTGCACC	120
GTGCTCTGAGGGGCGGACGCAGCCCGGAGTCTCACGGGT <b>CKGGCCTTCAGGGAGATGCGT</b>	180
<b>GGCCAAGGCAGGGGGCACGCCCGCTGGCCCGCGCCTCTGCGCTCACTGCTGCGTGCCTTT</b>	240
<b>GGGCCCCAAGACACCACCACCGGAGGCTTGGAGCAAG</b> GTAAGTGCGAAGGGGATCTAAGG	300
TCCCCGGCGCACGCCGGGCTGGGCGACCTGTCCAGAACCTTACTGGTACTGCCCTTGACT	360
GCCGTGCACAGCTCGGATGCCTGCCGGCTGCTCCCAGCCACAGCGCCGGCGCGTCTCTGC	420
TTC	423
<b>CCTCCGTTCTTTTTCTTTCCTGGTCCCTTTTGCTTTTCCTTTTAAAAAGACGCCCTCTC</b>	60
<b>CAGCCCCCTCGCCGGTGACCTTGGCCGCCTAGGATGCTCTGATTCCGCATCTCCCTCAA</b>	120
<b>CTTGCCCTCGCGTGCCTTTCCCATGGCCGCATCCGAGGACGGCAGCAGCTGCCTTGTGT</b>	180
<b>CGCGGGCCCGCTCGCAGAGTGACCCAGCTTCTCAGCGACTCCTCAGCCACCTCCACGG</b>	240
<b>ACGCCGGGAGAACCAGGTA</b> CTGGGCCCGGCGGGGCGGCCAGGCGGGGT	291

**Anlage 20:** Abbildung der drei CpG-Inseln im 5'-Bereich des *SCAPININ*-Gens des Menschen. Die Sequenzen der enthaltenen Startexons 1A bzw. 1B sind fett hervorgehoben und Bereiche in denen der GC-Gehalt laut CpG-Plot über 80 % liegt sind unterstrichen.

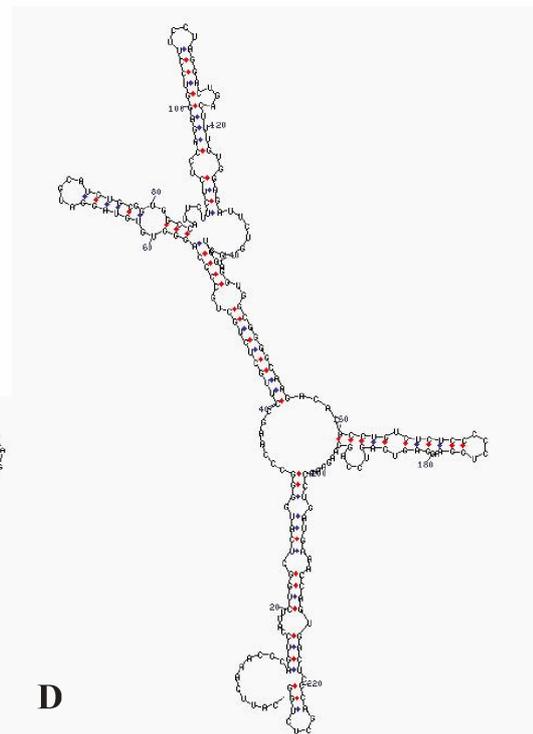
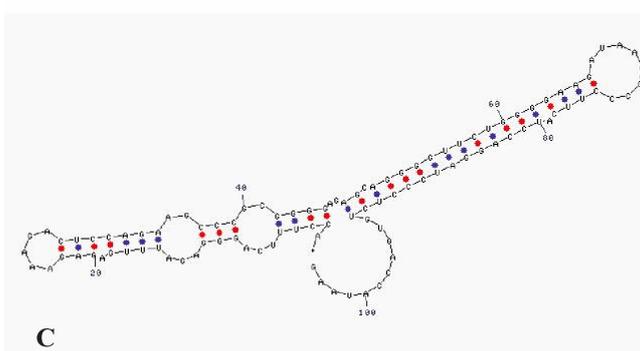
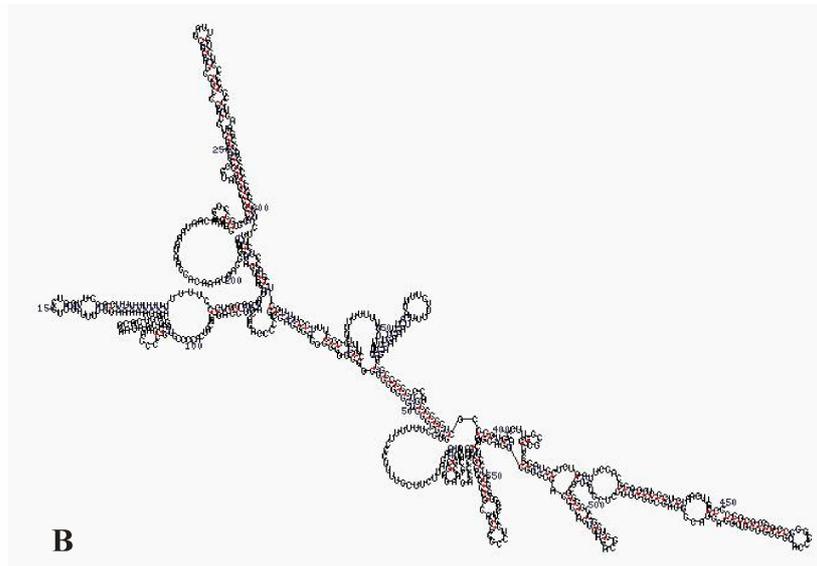
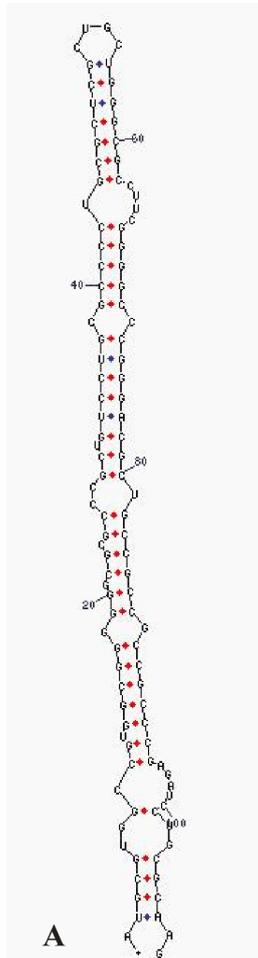
CCAGCCATTTTACACACCAGACCACTGAGGCTCAGAGAGGCCAAGCGACTCGCCCCCGG	60
CCCCACAGCGGCTCCAGCGCTGCTGCCTGTTTACAGCGCGGGGAACCGGCGGCTACACCT	120
CCCGCCCGGCTGTCCCTTTAACGTTTCTAGGGCATCCCTGGAAGGCCCGGGCACGGCGCT	180
<u>GAGGTCTCCGCTCCCGCTCCCGCTCGCCCCGGGCGAGGCTGCGGCTCCGGGCGGGTCAAGG</u>	240
<u>TCGCAGCGGAGCCCCCTCGGAGCCCCCGCCCGGCGGAGAGGCCGCGCCTCGCGTGGCGGGCGC</u>	300
<u>CGCCCCCGGCCCTGGTCCCGGTCCCGCCCCCGCGCGCCTCCCCGCGGCCCGGGTCCCGC</u>	360
<u>TCCGCGGCCCTCCGGCGGGATGCGTGGCCGTGGCGGGGGGCGCGCCCGCTGTCCTGCGCC</u>	420
<u>CCTGCGCTCGCTGCTGGGCGCCTTCGGGGCCCGGGACGCTGCCGCCGCCGCCGAGATCC</u>	480
<u>TGCGCAAGGTAAGCGCGCGCTGCGGGGAGGGGACGCGGGACGTGGGGCCCGGGGTGCCCG</u>	540
<u>CCGGGCACGAGGCGCTGGGGGACGACTCCTCCTGAATCCCTTGCCCTTGGCCGTTGCGGG</u>	600
<u>TGGCCGGGAGGCCCGCTGCGCCCCAGCCACAGAGGTGGGCGCCCCGGGTCTCGGGCTTA</u>	660
CC	662
<u>CCCCCTCAGCCCCCTCGCCGGTGACCTTGGCCGCCTCGGATGCTCTGATTCCACGCGGCT</u>	60
<u>CGCTCTAACTTGCCCCCGCGCCGGCCGGGCCCATGGCCCGCTCGGAGGACGGGAGCGGCT</u>	120
<u>GCCTCGTGTGCGGGGGCCGCTCGCAGAGTGACCCAGCGTCTCACCAGACTCCTCGGCCA</u>	180
<u>CCTCCTCCGCGGACGCCGGGGAGAACCAGGTAACGGGCTGGGCGGGGGCGGCGGGCGGG</u>	240
<u>TCGGGGAGGCCCGAGGCAGGTGGCGCTGAGAGCAGGACCCCGCGAGGCTCCGCGCCCCCGC</u>	300
<u>CTGCATTCGGGGAGCCGCGGCAGGAACCCGCGCTCGGCCCCCGCGGTTCTATCCCCAGTC</u>	360
TGCGAGGGCTGGGGCGCCTCGGAGCCCTTTGTC	393
AGGCTTCCTTTCTCGGGTGTGACCGGCTGGGGGAAGAGAGGCAGACCCGTGGCCGCT	60
CCGCCCAGCGCCGGTTCTGGGCCATTCCCTCCCTCCCACTGCCGGGCCCCAGCTCCGGA	120
CGTCCCGCTTGGGCATCTGCTCCTGGAAGGCAGCGCTCCGCAGCTGAGGCCACCGCGCT	180
GAGGGCTTCCACCAGGCGCTGACTCCAGCGGGCCTGGCGCACCTGGGCGCGCTAGCCC	240
CCGGACAGGTGTGCTGGGCAGAGCCGCCGGCAGGGAGACGAAGGGCGTGCGCCAGGACAG	300
AGCCCGTTTTCTGTGACAGCGTGTGACTCCGTCCACTCTTCCACCCCCATGGCAGCGTTG	360
ATTGTTTAGGTGATAAACCG	380



**Anlage 21:** Abbildung der jeweils energetisch günstigsten Faltung der mRNAs der Startexons der Maus. Die Buchstaben bezeichnen das jeweilige Startexon.



**Anlage 22:** Abbildung der jeweils energetisch günstigsten Faltung der mRNAs der Startexons des Menschen. Die Buchstaben bezeichnen das jeweilige Startexon.



## Danksagung

An dieser Stelle sei allen gedankt, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, im speziellen:

Herrn Prof. Hansmann für die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten, die Freiheiten beim Bearbeiten des Themas sowie seine konstruktiven Anmerkungen, die wesentlich zur Entstehung der Arbeit beigetragen haben,

Herrn Prof. Gunter Reuter für die Betreuung am Fachbereich Biologie,

Dr. Dietmar „Longo“ Schlote für seine engagierte Betreuung, die mir die Möglichkeit gab, von ihm zu lernen und von seinen Erfahrungen zu profitieren. Darüber hinaus für seine Diskussionsbereitschaft, seine Hilfe bei der Überwindung von aufgetretenen Problemen, für seinen Einsatz zur Beschaffung und Haltung der *Mus musculus castaneus* und seine wichtigen Hinweise beim Verfassen von Publikationen,

Dipl.-Biol. Falko Matthes für die täglichen interessanten Gespräche und Anregungen, praktische Hilfe und ganz persönliche Unterstützung,

Dr. Eckhard Fiedler für die Unterstützung bei der Präparation von hirnspezifischem Mausgewebe und vielen hilfreichen Hinweisen,

allen ehemaligen und verbliebenen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik und Medizinische Biologie für die gute Arbeitsatmosphäre im Laboralltag,

Dr. M. Hess und PD Dr. C. Hoang-Vu für schnelle und unbürokratische Hilfe

und

Doreen Röder für ihre Hilfe beim Binden der Dissertation.

Mein ganz spezieller Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die jahrelange Unterstützung.

Bianca, Linus und Fenja danke ich, dass sie da sind.

Halle (Saale), im September 2007

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich habe noch keinen vergeblichen Promotionsversuch unternommen und die vorliegende Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Sebastian Worch

# Lebenslauf

## persönliche Daten

---

Name: Sebastian Worch  
Geschlecht: männlich  
geboren am: 24. März 1976 in Aschersleben/Sachsen-Anhalt  
Nationalität: deutsch  
wohnt in: Harz 50, 06108 Halle (Saale)  
Familienstand: ledig, zwei Kinder  
Telefon: 0345/7792268  
email: s\_worch@yahoo.de

## Schulbildung

---

09/82 bis 07/90 Polytechnische Oberschule in Dessau  
08/90 bis 07/91 Oberschule mit Leistungsklassen in Dessau  
08/91 bis 06/94 Gymnasium in Dessau  
06/94 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,7)

## Wehrdienst

---

07/94 bis 06/95 Grundwehrdienst in Delmenhorst

## Studium

---

ab 10/95 Studium der Biologie (Diplom)  
06/99 bis 07/99 molekulargenetisches Praktikum  
Human Genetics Unit, School of Biochemistry and Genetics  
University of Newcastle upon Tyne  
01/00 bis 09/00 Diplomarbeit  
Titel: „Isolierung und Untersuchungen zur Struktur und Expression zweier  
Gene aus dem Bereich des humanen Chromosoms 20q13“  
10/2000 Zuerkennung des Diploms (Note 1,1)

## Berufstätigkeit

---

11/00 bis 11/05 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik und  
Medizinische Biologie in Halle  
ab 11/05 Abschluss der experimentellen Arbeiten und Anfertigung der Dissertation  
Titel: „Untersuchungen zur Struktur und Expression des  
*SCAPININ/Scapinin*-Gens bei Mensch und Maus“