

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien wie Chemikalien, Kits, Lösungen, Medien, Enzyme, Plasmide, eingesetzte Primer, Bakterienstämme, Hefestämme und verwendete Datenbanken für die *in silico* Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aufgelistet.

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

In der Tabelle 4 sind die verwendeten Chemikalien und Materialien mit Verweis auf den jeweiligen Hersteller dargestellt.

Tab.4: Verwendete Chemikalien und Materialien

Hersteller	Produkt
Aldrich	Kresolrot-Ladepuffer
Amersham	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP, Rainbow™ Proteinmarker, RNA Guard, MicroSpin™ G-50 Columns, Pd(N) <sub>6</sub> (Random Hexamer)
Applied Biosystems	Taq-DNA-Polymerase, ABI Prism BidDye Terminator Cycle Sequenzierungs-kit
Becton, Dickinson and Company	Difco™ Yeast nitrogen Base w/o Amino Acids
Biorad	Amoniumpersulfat (APS)
Clontech	Multiple Tissue Northern Blots, Advantage-GC PCR Kit
Difco	Bacto-Agar, Bacto-Hefe, Bacto-Tryptone, Hefe Stickstoffbasen
Dynal	Dynabeads Oligo(dT) <sub>25</sub>

---

<b>Hersteller</b>	<b>Produkt</b>
Fermentas	dNTPs, DNA-Längenmarker (1Kb und 100 Bp Leiter)
Fisher	Serologische Pipetten, Zellkulturflaschen, TPP Zellkultur Testplatten
Fluka	Diethylpyrokarbonat (DEPC), Formaldehyd, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
GibcoBRL	TEMED
HT Biotechnology	Hybridime
Invitrogen	Agarose (ultra pure), fötales Kälberserum (FCS), Trypsin/EDTA Lösung, Opti-MEM Medium, RNA-Längenmarker, TRIZOL®Reagenz, X-Gal (5-Brom-4-Chlor-indolyl-D-galaktopyranosid), Reverse Transkriptase, Kanamycin
Kodak	BIOMAX MS Film
Merck	Chloroform, D(+)-Glukose, DMSO, EDTA, Glycerol, PEG <sub>6000</sub>
Millipore	Dialysefilter
New England Biolabs	Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase
Nutricia	Protifar Milchpulver
Pharmacia	Hexanukleotide
Perkin Elmer	Western Lightning Chemiluminescence Substrate
Roche	Protein A Agarose, Heringssperma-DNA, PVDF-Western Membran

---

---

<b>Hersteller</b>	<b>Produkt</b>
Roth	TritonX100, Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung, Ethanol, Methanol, Chloroform, Tween20, Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tablets), Roti+ Membran (NB), Deckgläser und Objektträger
Serva	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), Ethidiumbromid, Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG), BSA, SDS
Sigma	Paraformaldehyd, $\beta$ -Mercaptoethanol, Bradford Reagenz, Ampicillin
TPP	Plastik für Zellkultur (Zellkulturflaschen und 6-well-Platten)
Vector Laboratories	Vectashield™ Mounting Medium
Whatman	3 MM Papier

---

Sonstige Standardchemikalien und Materialien wurden von den Herstellern Appli-Chem, Merck, Roth oder Sigma bezogen.

## 2.1.2 Kits

In Tabelle 5 sind die Kits aufgelistet, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tab.5: **Eingesetzte Kits**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNA	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Qiagen
SuperScript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Herstellung von cDNA	Invitrogen
Quantum RNA Classic I und II 18S	Semiquantitative RT-PCR	Ambion
BD Advantage™ 2 PCR Enzyme System	Amplifikation GC reicher Sequenzen	BD Bioscience
AmpliTaq® DNA Polymerase Kit	PCR	Applied Biosystems
Taq PCR Core Kit	Amplifikation GC reicher Sequenzen	QIAGEN
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Durch PCR induzierte Mutation	Stratagene

### 2.1.3 Medien

In Tabelle 6 sind die Medien aufgelistet, die zur Anzucht von Hefen und Bakterien benutzt wurden.

Tab.6: Medien

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
LB-Medium (Luria-Bertani, Vollmedium)	Standard-Medium bei der Anzucht von <i>E. coli</i>	Sambrook et al., 1989
Low salt LB	Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i> , die mit dem pBudCE4 Vektor transformiert worden sind	10g Trypton 5g NaCl 5g Hefeextrakt 15g Agar
SC (synthetic complete) Drop out media (-URA)	Medium zur Anzucht von Hefen, die mit dem pYES2 Vektor transformiert worden sind	0,4% SC-drop out mix ohne Uracil 1% Hefestickstoffbasen w/o Aminosäuren 2,5% Glukose 3% Bacto Agar
SCM (synthetic complete) Drop out media (-LEU)	Medium zur Anzucht von Hefen, die mit dem pYES2 Vektor transformiert worden sind	0,4% SCM-drop out mix ohne Leucin 1% Hefestickstoffbasen w/o Aminosäuren 2,5% Glukose 3% Bacto Agar
YPD	Vollmedium zur Anzucht von Hefen	2% Pepton 1% Yeast extract 2% D-Glucose 2% Bacto Agar

Bei Verwendung von Flüssigmedien wurde kein Agar zugesetzt.

## 2.1.4 Antikörper

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tab.7: **Verwendete Antikörper**

Antikörper gegen	Herkunft	Hersteller
myc- monoklonal	Maus	Clontech
anti V5 monoklonal	Ziege	Invitrogen
anti-Maus-cy3	Esel	Dianova
anti-Ziege-FITC	Esel	Dianova
anti-Maus-HRP	Ziege	Dianova
anti-Ziege-HRP	Maus	Sigma
Fluorescein Avidin D (FITC-Avidin)	-	Vector
Anti-Digoxygenin-cy3	Maus	Dianova

## 2.1.5 Puffer und Lösungen

In Tabelle 8 sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tab.8: **Puffer und Lösungen**

Name	Zusammensetzung
5X Blotting Puffer (Western Blot)	29,1 g Tris p.a. 14,65 g Glycin 18,75 ml 10% SDS auf 1l (Bidest-Wasser)
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1% (v/v) DEPC, zweifach autoklaviert
Ethidium Bromid	10 mg/ml
Kresolrot	1 mM Kresolrot

---

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Heringssperma DNA	10 mg/ml gescherte Heringssperma-DNA
Lymphozyten Kulturmedium	RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin 20% FCS Penicillin 100 U/ml Streptomycin 100 µg/ml L-Glutamin 2 mM 2,5 µg/ml Phytohemagglutinin (PHA L)
PEG Hybridisierungslösung	250 mM NaCl 125 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 mM EDTA 7% (w/v) SDS 10% (w/v) PEG6000
3,7% Paraformaldehyd (PFA)	3,7% PFA in 1,2 PEM
PEG Puffer	250 mM NaCl 125 mM Di-Natrium-Hydrogenphosphat 1 mM EDTA 7% (w/v) SDS 10% (w/v) PEG <sub>6000</sub>
10x PEM	1 M PIPES 0,05 M EGTA 0,02 M MgCl <sub>2</sub> pH7
5X OLB (-dCTP)	0,1 mM dATP, dGTP, dTTP 1 M HEPES 0,425 mM 5'-pd(N) <sub>6</sub> 25 mM MgCl <sub>2</sub> 250 mM Tris 0,36% (v/v) β-Mercaptoethanol

---

---

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
1X PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
1X PBST	1 ml TWEEN 20 zu 1L 1X PBS
Lysepuffer (für Extraktion von genomischer DNA)	10 mM Tris/HCl pH 7,5 25 mM EDTA 75 mM NaCl pH 7,5
Lysepuffer (für Extraktion von Proteinen)	10 mM Tris/HCl pH7,8 150 mM NaCl 1mM EDTA, 1% Nonidet p-40 1mM PMSF Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette auf 10 ml)
20X SSC	300 mM Natriumcitrat 3 mM NaCl pH 7.0
SDS-PAGE-Puffer	0.125 M Tris 1.25 M Glycin 0.5 % SDS (v/v)
50X TAE	2 M Tris 5,71% (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0
1X TE	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 7,5

---

---

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10X MOPS	200 mM MOPS 10 mM EDTA 85 mM NaAc pH 7,5
NB-Waschpuffer 1	2X SSC 0,1% SDS in DEPC-H <sub>2</sub> O
NB-Waschpuffer 2	0,1X SSC 0,1% SDS in DEPC-H <sub>2</sub> O
RNA-Ladepuffer	50% Formamid 2,2 M Formaldehyd 1 x MOPS 40µg/ml EtBr
Phosphat-Puffer	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2
PLATE Mix	45% PEG 4000 (steril) 1M Li Oac 1M Tris-Cl (pH 7,5) 0,5M EDTA
Elektrophorese Puffer für RNA Gele	1 x MOPS 2,2 M Formaldehyd
SB-Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
SB-Waschpuffer	40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5% SDS

---

## 2.1.6 Zelllinien

In Tabelle 9 sind die Zelllinien und ihre Anzuchtmedien aufgeführt, die für die unterschiedlichen Transfektionen verwendet wurden.

Tab. 9: **Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Medium
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen	DMEM, 10% Fötale Rinderserum
COS7	Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze	DMEM, 10% Fötale Rinderserum
U373MG	Humane Astrozytoma-Zelllinie	EMEM, 2mM Glutamine, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1mM Natrium Pyruvat, 10% Fötale Rinderserum
Neuro2A	Maus-Neuroblastom-Zelllinie	DMEM, 10% Fötale Rinderserum, 1% nicht essentielle Aminosäuren

## 2.1.7 Vektoren

In Tabelle 10 sind die unterschiedlichen Klonierungsvektoren und ihre Eigenschaften aufgeführt. Die Vektorkarten sind dem Anhang zu entnehmen.

Tab.10: **Klonierungsvektoren**

Vektor	Beschreibung	Verwendungszweck
pCMVtag3A	Expressionvektor mit N-terminalem c-MYC Epitop und Kanamycinresistenz	Immunfluoreszenzexperimente mit FTSJ1 und PQBP1
pBudCE4	Expressionvektor mit zwei Klonierungsstellen. Die eine mit C-terminalem c-MYC Epitop, die andere mit C-terminalem V5 Epitop. Zeozinresistenz	Koimmunpräzipitation und Koimmunfluoreszenz mit PQBP1 und POU3F2

Vektor	Beschreibung	Verwendungszweck
pYES2	Expressionsvektor mit Galaktose induzierbarem Promotor	Komplementationsstudien mit FTSJ1
pAE	Expressionsvektor mit konstitutivem Promotor	Komplementationsstudien mit FTSJ1
pGEMTeasy	Klonierungsvektor	Klonierung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

### 2.1.8 Primer und DHPLC-Bedingungen für die Mutationsanalyse von *FTSJ1* und *PQBP1*

Für die Mutationsanalyse (s. Kapitel 2.2.4) wurden Primer ausgewählt, die in den jeweiligen flankierenden Intronsequenzen lokalisiert sind. In Tabelle 11 sind die Primer inklusive PCR-Bedingungen für die Mutationsanalyse von *FTSJ1* aufgelistet und in Tabelle 12 die für *PQBP1*.

Tab.11: Primer für die *FTSJ1* Mutationsanalyse

Exon	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Produkt- größe in Bp
1a	GAA TCG CTG GCA ACT TGC GC	TCC GCC CGC ATT CCT GTC C	2 mM	64°C	380
1b	CTA TTG AGG CAC GCC TGC AC	AGT TGC TTA CTC TGC CAT CC	2 mM	61°C	400
2	GTG GTA GCC CAT TCA TCT GG	AGT CAG CCC ACC TAC CAC AG	2 mM	62°C	301
3	GTT GGA GAA GTG GGT GCA G	GCC CAC ATC AGC CTA GTT TC	3 mM	63°C	205

<b>Exon</b>	<b>Sense Primer Sequenz (5'-3')</b>	<b>Antisense Primer Sequenz (5'-3')</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> Konzentration</b>	<b>T<sub>A</sub> (°C)</b>	<b>Produkt- größe in Bp</b>
4	GGA GCG AAA CTA GGC TGA TG	TGC ATA GAC CCC AGG TAA GG	3 mM	63°C	195
5	ATC TGA GGG CAG CAG CAG TGG	AGG GAG AGG CAG GGA GTA AC	3 mM	61°C	247
6	AAG ATG CAC AGA GCC AGA TG	GCA ATG TTC AGA GCC TGT GG	3 mM	60°C	204
7	AGT ATA TGC AGG CCC AGC TC	GGT GAG AAG GCA AAG ACA GC	2 mM	62°C	244
8	TGG TGG AGT AGA GGG AGG TC	TCA TAG CCC TGA CAG ACA GC	4 mM	62°C	310
9	GCT GTC TTT GCC TTC TCA CC	TTG CAT AAG GTG TGG CAG AG	2 mM	59°C	368
10	AGG CAT CCT GAC CTT GTC C	CTC CCA CCC ACC TAC TGT TG	3 mM	61°C	181
11	ACC ATC TCC CTA CCC CTC TG	TGG GTC AGA AAA AGG CAC AC	3 mM	60°C	291
12	CCT TTC CTG CCT CCC AAT AG	TTG CTC CCT GCT CTA TCT CC	3 mM	62°C	393
13a	TAT GAT GGA GCT CCA CTG CA	TGG CTT CTA TCC AGG TTA AG	3 mM	58°C	390
13b	CCT CTT CAG GAG TGT CCT G	TCT GCT TCA TTC CAA GAG G	3 mM	58°C	302

Exon	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Produkt- größe in Bp
13c	CAG TAC CTG GGA TTT TCC CAC	GCA GAA CCC TTT GGC ATC TG	3 mM	62°C	314

Tab.12: Primer für die *PQBP1* Mutationsanalyse

Exon	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Produkt- größe in Bp
1a	TTC TGC CAT TTG TTC ATT GC	CCT CCA GCT CCA AAA GAG TG	4 mM	60°C	226
1b	GGA TGA GCC CAT TTC TGA AG	TTT GAG GAT GCC TCT CTT GG	3 mM	60°C	376
1	TTT GTT CGT CTG TCC CTA GG	AAC AAA AGT GCC TGT CGA GG	4 mM	60°C	163
2	TCT CTA GGC TCT ACA TGT AG G	ACA ACC AAG GTC AGC ACA GG	3 mM	60°C	248
3	AAG AGT TGA GGA TCC AAG GC	TGA GAA CTG CTA AGA TCA CTC	3 mM	59°C	218
4	TCC TGG GGT GGC AAG AGG	AGT GCA CCC TGC ACC TTG	2 mM	59°C	379
5	GAG GGT GCT GTG GTA CAT GG	CAA TGA GGA ATG GAG GAA GG	3.5 mM	59°C	248
6	ACA TCA CCC ATC CCC ATC CC	TTG CCG ACT TGG GTT GGG C	3 mM	61°C	298

Exon	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Produkt- größe in Bp
IVS4	ATC GGG ACC GCG GGT ATG AC	TGG TGT CCA CGT ACT GAG TC	3 mM	63°C	416
IVS5	TCT ATT GAA GAC TTTG CCC	TCT TGG CCT CAT TCC GC	3 mM	54°C	273

Der Tabelle 13 und der Tabelle 14 kann man das Pufferverhältnis und die Temperaturbedingungen für die DHPLC-Analysen entnehmen.

Tab.13: Bedingungen für die DHPLC-Analyse für *FTSJ1*

Exon	% Puffer B			Temperatur (°C)
	Ladekonzentration	Initialkonzentration	Elutionskonzentration	
1a	56	59	69	64.0-64.9
1b	58-53	61-56	71-66	55.0-64.0
2	54	57	67	62.0-62.8
3	49	52	62	65.0-65.5
4	48-50	51-53	61-63	61.8-64.8
5	51-52	54-55	64-65	61.0-63.0
6	48-50	51-53	61-63	61.8-64.2
7	51-52	54-55	64-65	63.1-63.9
8	53-54	56-57	66-67	63.5-64.8
9	54-56	57-59	67-69	62.8-64.4
10	48-49	51-52	61-62	61.2-62.7
11	53-54	56-57	66-67	62.0-64.8
12	56-57	59-60	69-70	55.4-55.8
13a	56	59	69	56.6-57.8
13b	54.3-53.8	57.3-56.8	67.3-66.8	54.9-56.4
13c	54.6-53.1	57.6-56.1	67.6-66.1	53.2-55.0

Tab.14: Bedingungen für die DHPLC-Analyse für *PQBP1*

Exon	% Puffer B			Temperatur (°C)
	Ladekonzentration	Initialkonzentration	Elutionskonzentration	
1a	48-50	51-53	61-63	61.8-66.0
1b	49-57	52-60	62-70	60.2-64.4
1	45-47	48-50	58-60	62.0-66.0
2	50-52	53-55	63-65	60.5-62.5
3	50-51	53-54	63-64	61.5-63.5
4	54-58	57-61	67-71	60.0-63.6
5	52	55	65	62.1
6	51-54	54-57	64-67	60.2-64.7
IVS4	55-57	58-60	68-70	61.0-63.5
IVS5	51-53	54-56	64-66	60.9-63.2

### 2.1.9 Primer für Expressionsanalysen

In Tabelle 15 sind die Primer und die PCR-Bedingungen für die RT-PCR Experimente für *FTSJ1* aufgeführt. In Tabelle 16 sind die Primer und das Primer/Competimer Verhältnis für die Expressionsanalyse von *NTNG1* mittels semiquantitativer RT-PCR aufgelistet.

Tab.15: RT-PCR Primer für *FTSJ1*

Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCL <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Produktgröße in Bp
Ex2for CTT CAA ACT GCT ACA ACT GG	Ex5rev TGG ATG ATC TCC TTG GCA G	1,5 mM	58°C	238
Ex7for ACA TTG CTA CAC ATG TCC TG	Ex10rev TCC AGC TGG TTG AAA TCT GG	1,5 mM	59°C	250

Tab.16: Primer für semiquantitative RT-PCR für *NTNG1*

Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	Primer/Competimer Verhältnis	T <sub>A</sub> (°C)	Produktgröße in Bp
Ex4for AAC ATG GCA GCC CTA TCA GT	Ex5rev GAA TGT GAG CAC AAC ACT AC	1:9	59°C	455
Ex1for ACC TGT CAA AGT CAC TGA TC	Ex2rev GAG TGA TCC TCA ATG TTC AC	1:15	58°C	261
Ex7for GAA TGT CTG CGA CAA CGA GC	Ex7rev CAC AAT ATG CTC TGC AGC TG	2:8	60°C	475

In Tabelle 17 sind sowohl die Primer als auch ihre Bedingungen für die Herstellung von Sonden zur Detektion von *PQBP1* und *FTSJ1* mRNA aufgeführt.

Tab.17: Primer für Northern Blot Proben

Name	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Produktgröße in Bp
FTSJ1 NB	GAC GGA CGT CAA AGG ACA AG	AAC TGC GGT CCG AAT CAT AG	3 mM	60°C	744
PQBP1 NB Exon4	AGA AAA GTT GGA CCG GAG CC	TTC TTG CTC TTG GGA TAG GG	3 mM	60°C	256
PQBP1 NB IVS4- Exon5	TCG GTG AGA CCA ACA AGG TG	CTG CCG GTC AAA GAG TCA GG	3 mM	61°C	457

### 2.1.10 Primer für X-Inaktivierungsstudien

In Tabelle 18 sind die Primer und Bedingungen aufgelistet, die bei der Analyse des X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1* verwendet wurden.

Tab.18: Primer für X-Inaktivierungsstudien

Name	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCL <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Produktgröße in Bp
PQBP1 Ex1-3	TTG GCC AAG AGA GGC ATC CTC	TGC TTC TCA GCT TCT TGG CC	1,5 mM	60°C	233
HPRT	TGG CGT CGT GAT TAG TGA TG	TAT CCA ACA CTT CGT GGG GT	1,5 mM	60°C	502
RPS4X	TAA AAT CGA TGG CAA GGT CC	CCG CCA GTC TTT TGT CTC TC	1,5mM	60°C	543

### 2.1.11 Primer für *in vitro* Mutagenese

In Tabelle 19 sind die Primer aufgeführt, die bei der *in vitro* Mutagenese der Insertion 641C von *PQBP1* verwendet wurden.

Tab.19: Primer für *in vitro* Mutagenese

Name	Primer Sequenz (5'-3')
InsC for	CAT ACT CAG ACG CCC CCC CGG GGC ACG TGG TCA ACA
InsC rev	TGT TGA CCA CGT GCC CCG GGG GGG CGT CTG AGT AGT

## 2.1.12 Primer zur Klonierung von *FTSJ1*, *PQBP1* und *POU3F2* in verschiedene Expressionsvektoren

Die Primer, ihre Bedingungen und die entsprechenden Restriktionsenzyme die zur Herstellung der betreffenden cDNA und ihrer anschließenden Klonierung in den jeweiligen Expressionsvektor verwendet wurden, sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tab.20: Klonierungsprimer

Name	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Restriktions- enzyme
FTSJ1 pCMVtag3A	TAC ATG GAT CCG ATG GGA CGG ACG TCA AAG GA	TAC ATG TCG ACT TAA GGT GAA CAA CTC ATT TCA TTG	1,5 mM	59°C	Sense Primer <i>Bam</i> HI; antisense Primer <i>Eco</i> RI
PQBP1 WT pCMVtag3A	TAC ATG AAT TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG	TAC ATG TCG ACG CAG GAT CAC CAG AAA GC	3 mM	60°C	Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II
PQBP1 Del.AG pCMVtag3A	TAC ATG AA TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG	TAC ATG TCG ACT CAT ACC CGC GGT CCC GAT C	3 mM	60°C	Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II
PQBP1 Del.AGAG pCMVtag3A	TAC ATG AAT TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG	TAC ATG TCG ACT TAC TGC CTT CTT GCT CTT GG	3 mM	60°C	Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II
PQBP1 Ins.AG pCMVtag3A	TAC ATG AAT TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG	TAC ATG TCG ACT TAC TGC CTT CTT GCT CTT GG	3 mM	60°C	Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II

Name	Sense Primer Sequenz (5'-3')	Antisense Primer Sequenz (5'-3')	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	T <sub>A</sub> (°C)	Restriktions- enzyme
PQBP1 WT pBudCE4	TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG	TAC ATT CTA GAA TCC TGC TGC TTG GTT CG	3 mM	60°C	Sense Primer <i>SalI</i> ; antsense Primer <i>XbaI</i>
PQBP1 Del.AG pBudCE4	TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG	TAC ATT CTA GAT ACC CGC GGT CCC GAT C	3 mM	60°C	Sense Primer <i>SalI</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i>
PQBP1 Del.AGAG pBudCE4	TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG	TAC ATT CTA GAC TGC CTT CTT GCT CTT GG	3 mM	60°C	Sense Primer <i>SalI</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i>
PQBP1 Ins.AG pBudCE4	TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG	TAC ATT CTA GAC TGC CTT CTT GCT CTT GG	3 mM	60°C	Sense Primer <i>SalI</i> ; antsense Primer <i>XbaI</i>
POU3F2 pBudCE4	TAC ATG GTA CCA TGG CGA CCG CAG CGT CTA AC	TAC ATC AGA TCT CTC TGG ACG GGC GTC TGC ACC	3 mM	62°C	Sense Primer <i>KpnI</i> ; antisense Primer <i>BglII</i>
FTSJ1 pYES2	ATA TTA AGC TTG ATG GGA CGG ACG TCA AAG	ATA TAT CTA GAT TAA GGT GAA CAA CTC ATT TC	1,5mM	59°C	Sense Primer <i>BamHI</i> ; antisense Primer <i>SalI</i>
FTSJ1 pAE	ATA TTG GAT CCA TGG GAC GGA CGT CAA AG	ATA TAG TCG ACT TAA GGT GAA CAA CTC ATT TC	1,5mM	59°C	Sense Primer <i>HindIII</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i>

### 2.1.13 Primer für die Bruchpunktklonierung

In Tabelle 21 sind die Primer aufgelistet, die für die Bruchpunktklonierung nach Siebert et al., 1995 (s. Kapitel 2.2.9) verwendet wurden.

Tab.21: Primer für die Bruchpunktklonierung

Name	Funktion	Sequenz (5'-3')
Adapter lang	Adapter	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT
Adapter kurz (für Blunt- Enden mit *5'- Phosphatmodifikation)	Adapter	*ACC TGC CC
AP1	Primer, der spezifische an den Adapter bindet (1.PCR)	GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
AP2	Primer, der spezifische an den Adapter bindet (Nested PCR)	TAT AGG GCT CGA GCG GC
Chr.1 spez. Primer 1	Sequenzspezifischer Primer (1. PCR) für Bruchpunktklonierung	GAA ATT GTA AAA CCT GAT GAT TCT GAA C
Chr.1 spez. Primer 2	Sequenzspezifischer Primer (Nested PCR) für Bruchpunktklonierung	CCT TAA ACT TAA GGC TAT ACA TTC AAC
Chr.1 spez. Primer vorwärts	Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 7	AGC TAC CTA CTG GTG TGG TA
Chr.7 spez. Primer rückwärts	Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 7	CAG ATG AAA GCG CCT TGA AG

Name	Funktion	Sequenz (5'-3')
Chr.7 spez. Primer vorwärts	Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 1	AGG TAC AAC CTA ATT CTC TG
Chr.1 spez. Primer rückwärts	Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 1	AAC CTG ATG ATT CTG AAC TG

### 2.1.14 Datenbanken

In Tabelle 22 sind die Datenbanken aufgeführt, die für die *in silico* Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen benutzt wurden.

Tab.22: **Benutzte Datenbanken**

Name	Internetadresse	Verwendungszweck
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Blast, Alignment, Bestimmung des offenen Leserahmens
UniGene	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene</a>	ESTs und Expressionsmuster
UCSC Human Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway</a>	Versionen: April 2003; Juli 2003 und April 2004 Bestimmung der Genstruktur
NIX Analysis	<a href="http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Webapp/nix/">http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Webapp/nix/</a>	Analyse genomischer Regionen

---

<b>Name</b>	<b>Internetadresse</b>	<b>Verwendungszweck</b>
Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein	<a href="http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html">http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html</a>	Nachweis der Erkennungssequenz, die zur Anheftung eines GPI-Ankers führen könnte
BCM Search Launcher	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html</a>	Alignment mehrerer Nukleotid- oder Proteinsequenzen, Reverse und Complement
XLMR Genes Update WebSite	<a href="http://xlmr.interfree.it/home.htm">http://xlmr.interfree.it/home.htm</a>	Auflistung bisher bekannter Gene auf dem X-Chromosom, die in mutierter Form geistige Behinderung verursachen können
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM</a>	Auflistung aller mendelnden Erbkrankheiten

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit, bzw. mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit von präparierter DNA wurde anhand der Lichtabsorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt. Das Absorptionsmaximum von DNA beträgt 260 nm, das von Proteinen 280 nm. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Verunreinigung der DNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  bestimmt werden, welches bei reiner DNA bei 1,7 bis 1,9 liegt.

Die Präparation von genomischer DNA erfolgte aus lymphoblastoiden Zelllinien oder Fibroblasten. Diese Zellen wurden zuvor kultiviert und auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^5$  angereichert. Danach folgte eine Behandlung mit Trypsin/EDTA für 3 min bei 37°C, die Zellen wurden bei 300 rpm durch Zentrifugation pelletiert und mit PBS gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte über Nacht bei 37°C durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer. Durch eine zusätzliche Zugabe von Proteinase K (50 µg/ml) wurden die Proteine abgebaut. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroformextraktion. Dafür wurde die Nukleinsäureprobe mit dem äquivalenten Volumen eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1) versetzt. Nach der Durchmischung des Ansatzes und Phasentrennung durch Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm wurde die obere Phase abgenommen und mit einem äquivalenten Volumen an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) eine Minute intensiv gemischt und erneut zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren präzipitierten unter Einwirkung von Isopropanol, wodurch zugleich Chloroform-Reste entfernt werden konnten. Danach wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in TE-Puffer resuspendiert. Restriktionverdaus und Ligationen wurden nach Angaben des Herstellers (meist New England Biolabs) durchgeführt. Agarosegelelektrophoresen, die Färbung von DNA mit Ethidiumbromid sowie die Herstellung elektrokompetenter und hitzekompetenter Zellen wurden nach den von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

Die Elektroporation von kompetenten Zellen zur Transformation mit rekombinaten Plasmiden erfolgte mit dem Easyject von Equibio nach Angaben des Herstellers. Für eine Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit benutzt, und die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte über das QIAquick PCR Purification Kit (beide von Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Alle DNA Proben wurden in TE Puffer aufgenommen.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) lassen sich geringste Mengen an DNA vervielfältigen. Dabei amplifiziert das hitzestabile Enzym DNA-Polymerase ein durch zwei entgegengerichtete Primer begrenztes DNA-Fragment in hintereinander geschalteten Zyklen. Ein Zyklus besteht aus drei temperaturabhängigen Schritten: Denaturierung des Doppelstranges (95°C), Anlagerung der Primer an komplementäre Einzelstrangsequenzen bei primer-abhängiger Hybridisierungstemperatur (50-65°C) und Synthese des jeweils komplementären Stranges ausgehend von jedem Primer bei 72°C.

Ein üblicher PCR Ansatz enthielt in einem Volumen von 50 µl:

2 Units DNA-Polymerase, 1x PCR-Puffer, 250 µM dNTP, 1 µM Primer 1, 1 µM Primer 2, DNA (Plasmid-DNA oder chromosomale DNA), 10 mM MgCl<sub>2</sub> und bidestilliertes Wasser.

### 2.2.3 Reverse-Transkription

Die Reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das entsprechend zum RNA Template einen komplementären Strang synthetisieren kann. Das resultierende Produkt wird als cDNA bezeichnet. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA verwendet, die zuvor aus lymphoblastoiden Zelllinien oder Fibroblasten präpariert wurde. Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem TRIZOL® Reagenz nach Vorschrift des Herstellers (GibcoBRL).

Zur Herstellung von cDNA wurde zu 1 µg RNA 1 µl Oligo(dT)-Adaptor-Primer (50 µM) gegeben und auf 13 µl mit Reinst-Wasser aufgefüllt. Nach 5 min bei 70°C wurde der Versuchsansatz sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 5 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTPs (10mM dNTP Mix) und 1 µl Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben und mit Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 50°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Erhitzen (70°C für 15 min) gestoppt. Die resultierende cDNA konnte nun für PCRs verwendet werden.

#### 2.2.4 Mutationanalyse mittels DHPLC

Diese Mutationsanalyse beinhaltet die Vervielfältigung (mittels PCR) der einzelnen Exone der untersuchten Gene mit Primern (s. Tabelle 11 und 12) in den flankierenden Intronsequenzen und die anschließende Analyse dieser PCR-Produkte durch die *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography* (DHPLC). Physikalisch beruht die DHPLC auf dem Prinzip des veränderten Laufverhaltens eines DNA-Heteroduplexes. Ein Heteroduplex besteht aus zwei komplementären DNA-Einzelsträngen, die auf Grund einer Mutation an einer bestimmten Position in einem der beiden Stränge eine einzelsträngige Region bilden, welche das elektrophoretische oder chromatographische Laufverhalten des Heteroduplexes im Vergleich zu dem der Homoduplexe verändert. Bei der DHPLC werden die DNA-Fragmente mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) analysiert (O'Donovan et al., 1998) und die Absorption gemessen. Nukleotidaustausche äußern sich in einem veränderten Elutionsverhalten, das sich bei der photometrischen Auswertung in einem veränderten Absorptionsspektrum äußert und bei der graphischen Darstellung eine Verschiebung des *Peaks* zur Folge hat. Bei der Mutationsanalyse in der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 20 µl der PCR-Ansätze, die auf der DNA zweier männlicher Patienten amplifiziert wurden gemischt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschließend fand ein *Reannealing* für 10 min bei Raumtemperatur statt. Diese DNA-Duplices wurden in die Säule der DHPLC Apparatur injiziert und unter Verwendung eines Aceton-Nitril Gradienten mit einer Durchflußrate von 0,9 ml/min eluiert. Während der Prozedur des Ladens des PCR-Produktes, des Waschens und der letztendlichen Elution des PCR-

Produktes wurde ein Aceton-Nitril-Puffer verwendet mit entsprechend unterschiedlichen Anteilen von Puffer A und Puffer B (s. Tabelle 13 und 14). Die Ladekonzentration des Aceton-Nitril-Puffers hat den geringsten Anteil von Puffer B. Bei der Initialkonzentration des Aceton-Nitril-Puffers steigt der Anteil von Puffer B und bei der Elutionskonzentration ist der Anteil von Puffer B am größten. Die entsprechenden Verhältnisse der beiden Puffer zueinander und das Schmelzprofil der PCR-Fragmente wurde mit dem Transgenomic WAVEMAKER® Programm (Version 4.1) berechnet. Konnte ein abweichendes Elutionsprofil beobachtet werden, wurde das entsprechende PCR-Produkt erneut mit der DNA des Patienten amplifiziert, auf einem Agarosegel separiert, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt und sequenziert.

### **2.2.5 Analyse des X-Inaktivierungsstatus spezifischer Gene**

Der X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1* wurde durch RT-PCR Analysen auf cDNA untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Hamsterhybridzelllinien isoliert (s. Kapitel 2.2.3). Bei den Hamsterhybridzelllinien handelt es sich um zwei unterschiedliche Zelllinien. Eine trägt ein inaktives humanes X-Chromosom und die andere ein aktives humanes X-Chromosom. Auf den cDNAs der Hamsterhybridzellen werden anschließend 3 verschiedene PCR-Produkte mittels RT-PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle werden spezifische Primer für *RPSX4* (Tab.18) verwendet, das der X-Inaktivierung entkommt. Als Negativkontrolle wurden spezifische Primer für *HPRT* (Tab.18) verwendet, welches der X-Inaktivierung unterliegt. Das *PQBP1* Gen wurde mit spezifischen Primern (Tab.18) amplifiziert. Die Amplifikate wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und ausgewertet.

## 2.2.6 Northern Blot

Für die Northern Blot Analysen wurden entweder käufliche Multiple Tissue Blots (BD Biosciences, Heidelberg) oder selbst hergestellte PolyA<sup>+</sup> Northern Blots verwendet.

Die PolyA<sup>+</sup> RNA wurde mittels Oligo(dT) Dynabeads® (DYNAL) nach Anweisung des Herstellers über einen Magneten von der ribosomalen RNA getrennt. Anschließend wurde diese PolyA<sup>+</sup> RNA auf einem 1%igen Agarosegel, das Formamid und MOPS enthält, separiert. Die aufgetrennte PolyA<sup>+</sup> RNA wurde aus dem Agarosegel durch Blotting mittels Kapillarkräften auf eine Hybond XL Membran (Amersham) transferiert und durch UV-Crosslinking fixiert.

Die Prähybridisierung der Northern Blots wurde unter Verwendung von ULTRAhyb (Ambion) durchgeführt.

Als Sonden wurden PCR-Produkte (s. Tabelle 17) verwendet, die auf cDNA amplifiziert worden sind. Diese PCR-Sonden wurden mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPs radioaktiv markiert, wobei die Markierung unter Verwendung von Hexanukleotiden und einem dNTP-Mix ohne dCTP's mittels Klenow Fragment für 1 Stunde bei 37°C stattfand. Die nicht eingebauten Nukleotiden wurden durch Fraktionierung über eine Sephadex G50-Säule (Amersham-Pharmacia-Biotech) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde zu der Prähybridisierungslösung gegeben, und es wurde eine Hybridisierung bei 42°C über Nacht durchgeführt. Danach wurde die Membran 2x für 10 min in NB Waschpuffer 1 und bei Bedarf für 1x 20min bei 60°C in Waschpuffer 2 (s. Tabelle 8) gewaschen. Die verbleibende Radioaktivität der Blots sollte größer als 20 cps sein.

Die Membran wurde auf einer Phosphoimager-Platte über Nacht exponiert, und die Signale wurden am Phosphoimager (Molecular Dynamics Storm 860 Phosphoimager) ausgewertet.

### 2.2.7 Southern Blot

Für die Southern Blot Analyse wurde genomische DNA (18µg pro Ansatz) gereinigt, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Kapitel 2.2.1). Zur Depurinierung der DNA wurde das Gel zunächst für 15 min in 250 mM HCl und für 15 min in Wasser geschwenkt und anschließend zur Denaturierung für 30 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und zur Neutralisation für 30 min in 0,5 M Tris/HCl; pH 7,5/1,5 M NaCl geschüttelt. Der Transfer der DNA auf eine Roti+ Nylonmembran (Roth) wurde mit 10x SSC mit einer Dauer von 16h durchgeführt. Danach wurde die DNA mittels UV Crosslinking auf der Membran fixiert.

Die sich anschließende Präybridisierung fand in PEG-Puffer mit denaturierter Heringssperma-DNA für 1h statt.

Die DNA Sonden wurden radioaktiv mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP], nach der gleichen Vorgehensweise wie bei den Sonden für die Northern Blot Analyse (s. Kapitel 2.2.6), markiert. Zu der markierten Sonde wurde Hybridime (10 µg/ml) gegeben, der Ansatz wurde denaturiert und in die Präybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung fand bei 65°C für 16h statt. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit dem SB Waschpuffer bei 65°C gewaschen bis die Membran eine verbleibende radioaktive Aktivität von 5-15 cps aufwies. Die Membran wurde anschließend mit einem BIOMax Film (Kodak) für 2-3 Tage bei -80°C exponiert und in einer Entwicklermaschine (Curix 60 von AGFA) entwickelt.

### 2.2.8 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Diese Technik ermöglicht es, strukturelle Veränderungen der Chromosomen, wie beispielsweise Translokationen, auf molekularer Ebene nachzuweisen. Die Methode beruht darauf, daß spezifische, fluoreszenzmarkierte Nukleotidsequenzen einer Sonde an die komplementären Nukleotidsequenzen des Chromosoms hybridisieren.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde in diesem Fall mit Biotin oder Digoxigenin markierten DNA-Sonden auf Metaphasechromosomen der Patientin

durchgeführt. Die Metaphasechromosomen wurden aus Blutzellen gewonnen. Menschliches Blut wurde mit Lymphozyten-Kulturmedium für 72h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µg/ml Colcemid zugegeben und erneut für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Chromosomenpräparation (5 mM KCl hypotoner Schock; Methanol-Eisessig-Fixierung) durchgeführt.

Bei den verwendeten DNA-Sonden handelte es sich um PAC- und BAC- Klone, die aus der Sammlung des *UCSC Golden Path* stammen. Der Einbau von Digoxigenin bzw. Biotin erfolgte durch Nick-Translation (Rigby et al., 1977). Der anschließende Nachweis der markierten Sonden erfolgte entweder durch den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper Avidin-FITC (Fluorescein-5-Isothiocyanat) oder für Biotin markierte Sonden mit Anti-Digoxin-Cy3 (Wirth et al., 1999). Fluorophore sind organische Moleküle, die durch die Absorption von Photonen einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Bei der Rückkehr in ihren Grundzustand emittieren sie Energie in Form von Photonen, die über ein Fluoreszenzmikroskop als Signal detektiert werden können.

### **2.2.9 Bruchpunktklonierung**

Durch die Southern Blot Analyse kann der chromosomale Bruchpunktbereich auf etwa 500 bis 1000 Basenpaare eingegrenzt werden. Allerdings ist zu diesem Zeitpunkt nur die Sequenz der Bruchpunktregion des Chromosoms bekannt, das mittels Southern Blot Analyse untersucht worden ist. Um auch die Sequenz des anderen, an der chromosomalen Umstrukturierung beteiligten Chromosoms und damit eine exakte Bestimmung des Bruchpunktes auf Nukleotidebene zu erhalten, wurde eine Bruchpunktklonierung nach Siebert et al., 1995 durchgeführt. Dafür wurde die Patienten DNA mit einem spezifischen Restriktionsenzym (in diesem Fall *DraI*) verdaut und anschließend durch Ethanolpräzipitation gereinigt und gefällt. Durch Alkohol-Fällungen werden Nukleinsäuren aufkonzentriert und gleichzeitig von unerwünschten Pufferkomponenten befreit. Die Nukleinsäurelösung wurde mit 0,05 bis 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 2 bis 2,5 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol versetzt. Der Ansatz mußte entweder über Nacht bei -20°C inkubiert werden. Anschließend konnten

die Nukleinsäuren abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit Ethanol gewaschen werden und schließlich in TE-Puffer aufgenommen werden.

Die verwendeten Adaptoren (in diesem Fall Adapter lang und Adapter kurz) wurden hybridisiert (s. Tab. 21), und es fand eine Ligation mit den Adaptoren und der verdauten DNA statt. Die Adaptoren binden spezifisch an die Restriktionschnittstellen der mit *DraI* verdauten DNA und erlauben die Bindung der Adapterprimer (s. Tab. 21). Diese Adapterprimer ermöglichen die Amplifikation des Bruchpunktfragmentes mit einem sequenzspezifischen Primer, der in der bereits bekannten Sequenz des einen Chromosoms bindet, während der adapterspezifische an den Adapter bindet und somit auch die Amplifikation des unbekanntes Sequenzabschnittes des zweiten Chromosoms ermöglicht. Die Amplifikation wird durch zwei PCRs erlangt. Bei der zweiten PCR handelt es sich um eine *nested* PCR, die es ermöglicht, die meist geringen Mengen des ersten Amplifikats spezifisch zu vervielfältigen. Anschließend wurde das PCR Produkt über Agarosegel-Extraktion aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.1), in den pGEM-TEasy™ Vektor kloniert und sequenziert (s. Kapitel 2.2.10).

### **2.2.10 Sequenzierung**

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde mit dem ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (APPLIED BIOSYSTEMS) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der „Kettenabbruchmethode“ nach Sanger (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs (Lee et al., 1992). Die anschließende Sequenzierung (Auftrennung über Kapillaren und Detektion der Fluoreszenzsignale) wurde von der Servicegruppe des MPI auf einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer durchgeführt.

### 2.2.11 *In vitro* Mutagenese

In das Plasmid pCMVtag3A-PQBP1WT wurden mittels *in vitro* Mutagenese folgende Mutation eingefügt: 641insC. Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine ihrer Größe nach in einer Polyacrylamidmatrix auftrennen. Durch Inkubation der Proteine mit dem stark anionischen Detergenz SDS (in Verbindung mit einem Reduktionsmittel (DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol) und hoher Temperatur) werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. Durch die Bindung an das SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Dadurch wandern sie im Polyacrylamidgel bei der elektrophoretischen Auftrennung entsprechend ihrer Größe zum positiven Pol. Im Wesentlichen diente die Methode von Laemmli (1970) als Grundlage hierfür. Vor dem Auftagen auf das Gel wurden die Proben mit 5  $\mu$ l SDS-PAGE-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN III-Apparatur von BioRad durchgeführt. Ein feinporiges 20%iges Trenngel (s. Tabelle 23) wurde dabei von einem großporigen 5%igen Sammelgel (s. Tabelle 24) überschichtet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel und 200V Spannung. Die Gele wurden für die Westernblot-Analyse weiter verwendet.

Tab.23: Zusammensetzung des Trenngels

Komponente	Volumen (in ml) zur Herstellung von 5ml Trenngel
H <sub>2</sub> O	2,6
Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix (Roth)	1,0
1,5M Tris (pH8,8)	1,3
10% SDS	0,05
10% APS (Biorad)	0,05
TEMED (GibcoBRL)	0,004

Tab.24: Zusammensetzung des Sammelgels

Komponente	Volumen (in ml) zur Herstellung von 5ml Trenngel
H <sub>2</sub> O	0,68
Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix (Roth)	0,17
1,5M Tris (pH6,8)	0,13
10% SDS	0,01
10% APS (Biorad)	0,01
TEMED (GibcoBRL)	0,001

### 2.2.13 Immunoblot (Western Blot)

Mit diesem Verfahren werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylindendifluorid (PVDF)-Membran transferiert, auf der sie mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. In dieser Arbeit wurden die SDS-Gele nach dem Gellauf für 15 min in 1xBlotting-Puffer (mit 20% Methanol) gelegt. Die PVDF-Membranen (Roche) wurden wie folgt vorbereitet: 2 sek in Methanol, 2 min in Wasser, 15 min in Blotting-Puffer. Whatman Papier (Biorad) wurde kurz in Blotting-Puffer getaucht.

Im Anschluß daran wurde der Blot folgendermaßen in einer Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell (Biorad) aufgebaut:

- (Kathode)

Whatman Papier (3 Lagen)

Gel

PVDF-Membran

Whatman Papier (3 Lagen)

+ (Anode)

Es wurde bei 20V für 30 min geblottet.

Im Anschluss daran wurde die Membran zum Blocken in 5% Milchpulver in PBST gelegt und für 30 min bei RT inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBST+1% BSA (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) bei 4°C für 16h. Anschließend wurde 3x für 5 min mit PBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) in PBST für 30 min. Nach erneutem 3x Waschen für jeweils 5 min erfolgte die Detektion mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers.

#### **2.2.14 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmiden**

Bei der transienten (ohne Selektionsdruck) Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA kann mit Hilfe von positiv geladenen polykationischen Lipiden die Komplexierung und Aufnahme der negativ geladenen DNA in die Zellen erleichtert werden. Hierfür wurde das Polyfect Transfektionsreagenz (QIAGEN) sowie das für Polyfect optimierte Medium Opti-MEM von GibcoBRL verwendet. Polyfect ist ein sogenanntes Dendrimer (ein Polymer mit einer symmetrisch fraktalen, räumlichen Struktur), an dessen verzweigten Enden geladene Aminosäuren gebunden sind, die mit der negativ geladenen DNA interagieren. DNA und Polyfect bilden kompakte Strukturen, die an die Zelloberflächen binden und über unspezifische Endozytose in die Zellen aufgenommen werden.

Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Immunfluoreszenzexperimente wurden 1,5 µg DNA pro Deckgläschen, und für die

Transfektion von Zellkulturflaschen (Oberfläche: 150 cm<sup>2</sup>) wurden 24 µg DNA pro Zellkulturflasche, verwendet.

### **2.2.15 Immunfluoreszenz**

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro *well* in eine 6-*well*-Platte ausgesät. Die Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und nach 24 bis 48 Stunden mit 1,2x PEM gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 3,7% Paraformaldehyd in 1,2x PEM für 10 min bei RT. Nach dem Waschen mit PBS wurden sie mit 0,2% TritonX100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Daraufhin wurde 4 mal für je 3 min mit PBS gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS für 20 min bei RT. Daraufhin wurde eine Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS+1%BSA nach Angaben des Herstellers über Nacht durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper in PBS (Verdünnung nach Herstellerangaben) für 30min bei RT inkubiert. Die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und in Mounting-Medium (enthält DAPI) eingebettet. Die Signale wurden anschließend unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) ausgewertet.

### **2.2.16 Zellysate für die Immunopräzipitation**

Die zu lysierenden, transfizierten Zellen wurden ein Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 200 µl kaltem Zellysis-Puffer (10 mM Tris/Hcl pH7,8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet p-40, 1mM PMSF und einem Protease Inhibitor Cocktail) inkubiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch den Zellysis-Puffer und Verwendung einer 21 µm Nadel. Die DNA und Zellwandbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand mit den Proteinen wurde abgenommen und für die Koimmunpräzipitation eingesetzt. Die Konzentration der Proteine wurde mittels Bradford-Assay gemessen.

### 2.2.17 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Assay verwendet. Bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes (465nm ohne Protein, 595nm mit Protein). Die Änderung der Absorption bei 595nm ist proportional zu der an den Farbstoff gebundenen Proteinmenge. Zunächst wurde eine Eichreihe erstellt. Dazu wurde BSA in 1:1000 verdünntem Probenpuffer auf die folgenden Konzentrationen verdünnt: 1µg/ml, 2µg/ml, 4µg/ml, 5µg/ml, 7,5µg/ml, 10µg/ml. Die Proben wurden 1:1000 in H<sub>2</sub>O verdünnt. Je 80µl der BSA-Verdünnungen bzw. der verdünnten Proben wurden mit 20µl Bradford-Reagenz (Sigma) gemischt und in eine Mikrotiterplatte (Falcon) pipettiert. Die Messung der Absorption bei 595nm erfolgte im Spektralphotometer (Anthos 2020). Die Proteinkonzentration der Proben wurde über eine Standardkurve bestimmt.

### 2.2.18 Koimmunpräzipitation von Proteinen

Mittels Koimmunpräzipitation können Proteine bzw. Proteinkomplexe aufgereinigt und angereichert werden. Das zu reinigende Protein wird an einen Antikörper gekoppelt. Über diesen Antikörper kann das Protein dann an die Protein A-Agarose Kügelchen binden.

Protein-A ist ein Protein der bakteriellen Zellwand aus *Staphylococcus aureus*, das eine hohe Affinität zur Fc-Region vieler Immunglobuline der Säuger besitzt. Somit bietet sich dieses Protein zur Aufreinigung und Anreicherung von Immunkomplexen an, da nach der Bindung des Fc-Teils der Fab-Anteil weiterhin für die Antigenbindung verfügbar ist.

Zur Immunpräzipitation der gewünschten Proteine wurden wie bereits beschrieben Zellysate hergestellt (s. Kapitel 2.2.16). Es wurde jeweils 1 mg Protein in 1ml Lysispuffer verdünnt. Zunächst wurde ein *Precleaning* durchgeführt, das unspezifische Bindungen an die Protein-A-Agarose verhindern sollte. Dafür wurden 50 µl Protein-A-Agarose zu dem 1ml Ansatz zugegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Protein-A-Agarose wurde zu dem Überstand

1-2 µg Antikörper gegeben und der Ansatz wurde über Nacht in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 75µl Protein-A-Agarose zugegeben und weitere 2h bei 4°C inkubiert. Die Protein-A-Agarose an die nun der Antikörper mit dem Zielprotein und dem Interaktionspartner des Zielproteins gebunden sind, wurde 3 mal gewaschen, das Pellet in 20 µl Lysispuffer aufgenommen, mit 5x SDS-PAGE-Puffer (5 µl) und 1 M DDT (3,8 µl) versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die Protein-A-Agarose abzentrifugiert und der Überstand, in dem sich der Proteinkomplex befindet, auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Anschließend wurde ein Westernblot durchgeführt mit einem Antikörper spezifisch für das Epitop des überexprimierten Interaktionspartner des Proteins, welches über die Bindung an die Protein-A-Agarose aus dem Proteinmix isoliert wurde.

### 2.2.19 Komplementationsstudien in *S. cerevisiae*

Zur Identifizierung des möglichen funktionellen Homologs des humanen FTSJ1 Proteins wurden verschiedene *S. cerevisiae* Deletionsstämme mit Expressionsvektoren, in die die cDNA des humanen *FTSJ1* kloniert worden ist, transformiert. Bei den Deletionsstämmen handelt es sich um Stämme bei denen die transkriptionelle Einheit eines der drei paralogen Gene zu FTSJ1 durch Insertion des Kanamycin Resistenzgens zerstört wurde (s. Tabelle 25). Außer bei dem SPB1 Deletionsstamm handelt es sich um einen homozygoten *Knockout* der jeweiligen Gene.

Tab.25: *S. cerevisiae* Stämme

Accession Nr.	Deletiertes Gen	Genotyp
YBL4409 (Pintard et al., 2002)	<i>trm7Δ</i>	BMA64; MAT $\alpha$ <i>trm7Δ::TRP1</i> ; <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1-Δ</i> , <i>ura3</i> , <i>can1-100</i>

Accession Nr.	Deletiertes Gen	Genotyp
YBL4363 (Pintard et al., 2002)	<i>trm7Δ</i> + pBL579 (TRM7)	BMA64; MAT $\alpha$ <i>trm7Δ::TRP1</i> ; <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1-Δ</i> , <i>ura3</i> , <i>can1-100</i>
YBR061c (Euroscarf)	<i>trm7Δ</i>	BY4743; Mat <i>a/</i> ; <i>his3</i> 1/ <i>his3</i> 1; <i>leu2</i> 0/ <i>leu2</i> 0; <i>lys2</i> 0/LYS2; MET15/ <i>met15</i> 0; <i>ura3</i> 0/ <i>ura3</i> 0; YBR061c::kanMX4/YBR061c
Y23461 (Euroscarf)	<i>spb1Δ/spb1</i>	BY4743; Mat <i>a/α</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; MET15/ <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; YCL054w::kanMX4/YCL054w
Y04503 (Euroscarf)	<i>mrm2Δ</i>	BY4743; Mat <i>a/α</i> ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; MET15/ <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; YGL136c::kanMX4/YGL136c
Y00000	Kein Gen deletiert $\Rightarrow$ Wildtypstamm	MAT $\alpha$ ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>

Die *FTSJ1* cDNA wurde entweder in den Expressionvektor pAE mit einem konstitutiven Promotor oder in den Expressionvektor pYES2 mit einem Galaktose-induzierbaren Promotor kloniert (verwendete Primer siehe Tabelle 20). Anschließend wurden sie in den entsprechenden Hefestamm mittels der *Modified Lithium Acetate Yeast Transformation* Methode (Kaiser et al., 1994) transformiert. Der Einbau des Plasmids verleiht den Zellen eine URA Prototrophie, was eine Selektion auf Uracil-defizientem Medium ermöglicht. Anschließend wurde eine Kolonie gepickt und über Nacht in Uracil-defizientem Flüssigmedium bei 30° inkubiert. Die Zellsuspensionen der transformierten Stämme und Kontrollen wurden anschließend auf eine OD von 0,3 bei 600nm eingestellt. Anschließend wurde von dieser Suspension eine Verdünnungsreihe hergestellt, bei der jeweils eine Verdünnung um 1:5,4 angefertigt wurde. Insgesamt wurden 5

Verdünnungsschritte durchgeführt, die auf Feststoffmedien aufgestempelt worden sind. Bei der letzten Verdünnung der Suspension sollte idealerweise nur noch eine Kolonie bei der Positivkontrolle wachsen. Durch die Einstellung auf die gleiche OD und eine identische Verdünnungsreihe ist es möglich, das Wachstum unterschiedlicher Hefestämme zu vergleichen.