

7 ANHANG

7.1 Patientenproben

Tabelle 4: Untersuchte Patienten Berlin

Laufende Nr.	Zelllinien-Nr.	Laufende Nr.	Zelllinien-Nr.
1	X	16	2618
2	2417	17	2675
3	2422	18	2676
4	2423	19	2677
5	2436	20	2679
6	2438	21	2680
7	2445	22	2683
8	2446	23	2689
9	2454	24	2694
10	2477	25	2698
11	2490	26	3093
12	2491	27	3094
13	2496	28	3097
14	2516	29	3345
15	2537	30	7903

7.2 Oligonukleotide

7.2.1 Adapter-Primer

Tabelle 5: Adapter-Primer

Primer	Primersequenz
<i>RBgl24RHind24</i>	5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'
<i>RHind12</i>	5'-AGCTTGCGGTGA-3'

7.2.2 CACNA1F Primer

Tabelle 6: CACNA1F Primer, Fragmentgrößen und PCR Bedingungen

Primer	Primersequenz	Länge (nt)	Tm-2°C (°C)	MgCl ₂ (mM)
Exon1F	5'-ACAAACGTCCCATTGTCAC-3'	230	59	2.0
Exon1R	5'-GCAATGGGTGGGTCAGAG-3'			
Exon2F	5'-ATACCCTGTCCCTCCCTGAC-3'	343	58	2.0
Exon2R	5'-CTCCTGGTACCCTGATGACC-3'			
Exon3F	5'-GAGGTTCCCAAGGGAGTAGG-3'	247	58	2.0
Exon3R	5'-GTCTGGCTGGAAGGAGTGAG-3'			
Exon4F	5'-AGGAGCAGGTGGAGTACGTATTC-3'	180	58	2.0
Exon4R	5'-GGTAGGAAGGCGACTAGGGT-3'			
Exon5F	5'-ATCCCAAGGCCTGACCTC-3'	226	58	2.0
Exon5R	5'-ACCCTCCACCTCCGACCT-3'			
Exon6F	5'-CTTATTTCTGCCTCCCCCTC-3'	247	58	2.0
Exon6R	5'-AGCATTGGATCTAGGAACCG-3'			
Exon7F	5'-GCCTGCTTCGAAGCCCCAAG-3'	258	58	2.0
Exon7R	5'-CTCTGTGCCACAGTCCAC-3'			
Exon8F	5'-GGATGCATGCCTTTTCTCTC-3'	197	58	2.0
Exon8R	5'-GTTTGCCAGGCACAAAGAAG-3'			

Exon9F Exon9R	5'-TAGCCCTCTATCCTCCTCCC-3' 5'-GGAGGGCAGACCACATCTAA-3'	271	58	2.0
Exon10F Exon10R	5'-AATTGTCCTTTCTCTCCCTGC-3' 5'-CCTGGCTGGACCCCCACC-3'	130	58	2.0
Exon11F Exon11R	5'-AGGTCGACCACTATCCCCA-3' 5'-GGACTTGAGTCAGGGTTTGG-3'	186	59	2.0
Exon12F Exon12R	5'-TTTACGACACACACCTCCCA-3' 5'-ATCCAAAGGTCATGAGGGCT-3'	143	59	2.0
Exon13F Exon13R	5'-AGGGCAGGCTTAGGTAGGTG-3' 5'-AGAAGGAATAGGAGGGTGGG-3'	259	58	2.0
Exon14F Exon14R	5'-GATCATCCCTGCCTCTCTCC-3' 5'-CTTCCCCCTCCCCTAATACA-3'	275	58	2.0
Exon15F Exon15R	5'-AGCCTATTTGAGCCCAACCT-3' 5'-ACCCATCCCATGGTCTCC-3'	297	58	2.0
Exon16F Exon16R	5'-GAGCTCCACAGTGA CT TCCC-3' 5'-ACCCTGCCTATAGACCACCC-3'	228	58	2.0
Exon17F Exon17R	5'-GTGGTCTATAGGCAGGGTGC-3' 5'-GACTGTGTTAGGGGTGGAGC-3'	165	59	2.0*
Exon18F Exon18R	5'-GTAGTGATCCCCCTTAGCCC-3' 5'-ACAGGTAGTGGTGGGAGTGG-3'	152	58	2.0 *
Exon19F Exon19R	5'-CCTCACCATTGATGACTCCC-3' 5'-TGTCTGCCTGAGCTCTTCC-3'	149	58	2.0
Exon20F Exon20R	5'-TTTTGCTTTCTCTGGTGCC-3' 5'-CTCACCCCCTGCCACTTC-3'	200	58	2.0
Exon21F Exon21R	5'-TCAGGGCCAGA ACT GTATCC-3' 5'-GTCCCCTCAGCTCCTAGCTC-3'	249	58	2.0
Exon22F Exon22R	5'-ATTTGACTGAGGAGGAAGCTG-3' 5'-GGACTGGGGTCCCATTAGTC-3'	267	58	2.0
Exon23-24F Exon23-24R	5'-TCCCCAGGTCTGAGTCTAGC-3' 5'-GTCCTGTGGGTTTGGGTG-3'	349	58	2.5 *
Exon25-26F Exon25-26R	5'-GTAGCCATATGCTTGGGTGC-3' 5'-AGTCTTTGGGAGGGGTCCT-3'	330	58	2.5 *
Exon27F Exon27R	5'-AACCTGTTTGCACATCCACA-3' 5'-CTGCCTCATCCCCTGATAAA-3'	208	59	2.0
Exon28F Exon28R	5'-ACCTGCCCCACCTCTAC-3' 5'-ACCATCCATAGGGGGTCAG-3'	273	58	2.0
Exon29F Exon29R	5'-ATGCCCTGCCCTGGTATG-3' 5'-ATAGGGTCAGGAGTCTGGCG-3'	223	58	2.0
Exon30F Exon30R	5'-AATATTTGGTTGGGTGTGGC-3' 5'-CCCAAGGAATTCATCCACTG-3'	225	58	2.0
Exon31F Exon31R	5'-GACAGGGCACTGCTTTTCTC-3' 5'-CAGGAGTAGGGAGGATGTGC-3'	230	58	2.0
Exon32F Exon32R	5'-CTCACCTTGTTCA TTTGGGC-3' 5'-GGACATGGGAAAAGAAGCAG-3'	142	59	2.0
Exon33F Exon33R	5'-AAATGCAA ACT GAGCATCCC-3' 5'-ATTTGAAATGGGTATGGCA-3'	284	58	2.0
Exon34F Exon34R	5'-GACTGCATCTCCAGTAGGC-3' 5'-ATTCTTAACCCATCCCCTGC-3'	242	58	2.0
Exon35F Exon35R	5'-GTAGGGGTGGCAGGTAGACA-3' 5'-GTGGCAGGGGAGTGAGTAGA-3'	297	58	2.0
Exon36F Exon36R	5'-GATGTAGCCCCTGGTGAGAA-3' 5'-GGTGGTTGTGAGGAAATGGT-3'	304	58	2.0
Exon37F Exon37R	5'-ACAGTGTTCTGCCCTTACC-3' 5'-TAATGAGATGCAGCAGTCGG-3'	272	58	2.0

Exon38F	5'-AGTGGTACCTCCCCAACTCC-3'	200	58	2.0
Exon38R	5'-CCACCCTTGCCATGTGATAG-3'			
Exon39F	5'-ACATTCGTTCTGCATACCC-3'	244	58	2.0
Exon39R	5'-ATGAGTTTGCTCCTTGCACC-3'			
Exon40F	5'-TCTTCCTATTGGCTCATGCC-3'	199	58	2.0
Exon40R	5'-AGCGATCATCTGCCATTCAG-3'			
Exon41F	5'-CCCTGTGTGATCTTGCCTTC-3'	196	58	2.0
Exon41R	5'-CCATCCACACTAGGCCCTG-3'			
Exon42F	5'-AAGTTCAGACCCTGAGCTGC-3'	244	58	2.0
Exon42R	5'-CAATCAAGTTCCTGGGAGAG-3'			
Exon43F	5'-GTGCATGCAACACTCAGTCC-3'	291	58	2.0
Exon43R	5'-CTCAACTTCCTGCCTCCTGA-3'			
Exon44F	5'-ATCTGGTCTGCCTAACGTGC-3'	204	58	2.0
Exon44R	5'-CAGTCCCACCCCTCCTC-3'			
Exon45F	5'-GACTGTTTGTGCCCATCTC-3'	265	58	2.0
Exon45R	5'-TTCCCAGATCTCTGTCTG-3'			
Exon46F	5'-CTGACATTGCTATTTGCCCC-3'	199	58	2.0
Exon46R	5'-CATCTCTCCAGACCCAGAC-3'			
Exon47F	5'-AGCGGTGAGTCCTAGACCCT-3'	347	58	2.0
Exon47R	5'-GACTCCTTCCGTCCTCCTC-3'			
Exon48F	5'-CGTCAACACTGATCCACCT-3'	280	58	2.0
Exon48R	5'-GAATTCAGAGGGCGTGGAC-3'			

Alle Amplifikationen außer mit * markiert, wurden mit Ampli *Taq* Polymerase durchgeführt. Bei den mit * versehenen Reaktionen war die Amplifikation der Fragmente nur mit Ampli *Taq* Gold möglich. T_m (Schmelztemperatur) – 2 °C stellt die Annealing Temperatur dar.

7.2.3 Humane NYX Primer

Tabelle 7: Humane NYX Primer, Fragmentgrößen und Bedingungen

Position	Primer	Primersequenz	Größe (nt)	T _m -2°C (C°)	MgCl ₂ (mM)
Exon 3	GARP1F GARP1R	5'-TTCTCCTCCTTCCCGACTC-3' 5'-GGCGTGATGAAGGACAGG-3'	310	54	2,5
Exon 3	GARP2F GARP2R	5'-GTCTCCATCGACCTGGACC-3' 3'-CGGCAGGCTGCTAGGTCTA-3'	244	58	2,0
Exon 3	GARP3F GARP3R	5'-GACCTGCGCTACCTGCAC-3' 5'-TGGCCTGCAGGCTGAGCGA-3'	264	58	2,0
Exon 3	GARP4F GARP4R	5'-ACCTGACGCACGCGCACCT-3' 5'-CCAGGTAGAGCAGCTCGAGC-3'	308	58	2,0
Exon 3	GARP5F GARP5R	5'-GCACGCTCAACCTGGGTG-3' 5'-CGGAGCCCTCCATCCAGT-3'	293	58	1,5
Exon 3	GARP6F GARP6R	5'-ACCCGTGGTGCTGCGACT-3' 5'-GCCAGCAGCTTGAGAGG-3'	258	58	2,0
Exon 3	GARP7F GARP7R	5'-CCTCACCACGTCCAGTCC-3' 5'-CAAACACACTCAAGCCCAGT-3'	296	58	2,0
Exon 1-2	Ex1-2FOR Ex1-2REV	5'-CCGGGGATAAAGCCGATTGG-3' 5'-GAAGTCTGTGGCTTCCACC-3'	792	56	1.5
Exon 1-2	Ex1-2 FOREnd	5'-CTTAGCCCAACACCAGGGTC-3'	-	56	-

Exon 1	Kontr.83843 Poly. 83843 RevPoly	5'-GGGGTTTCCTCTCCATCCA-3' 5'-GGGGTTTCCTCTCCATCCG-3' 5'-GCTTAGGACCACCCAGCC-3'	321	58	-
Exon 1	Kontr.83878 Poly.83878 RevPoly	5'-GTCAGTGATGCCATCTGAGT-3' 5'-GTCAGTGATGCCATCTGAGC-3' 5'-GCTTAGGACCACCCAGCC-3'	287	58	-
Exon 3	GARP1F GARP2R	5'-TTCTCCTCCTTCCCGACTC-3' 5'-CGGCAGGCTGCTAGGTCT-3'	440	58	2.5
Exon 3	GARP3F GARP5R	5'-GACCTGCGCTACCTGCAC-3' 5'-CGGAGCCCTCCATCCAGT-3'	699	58	1.5
Exon 3	F8 R6	5'-GCTCAACGACAACCTGCTG-3' 5'-ACAAACACACTCAAGCCCAG-3'	787	58	1.5
Exon 3	GARP7F	5'-CCTCACCACGTCCAGTCC-3'	-	58	-
Exon3	GARP3R	5'-TGGCCTGCAGGCTGAGCGA-3'	-	62	-
Exon 3	GARP2F	5'-GTCTCCATCGACCTGGACC-3'	-	58	-
Exon 3	Kontr. 109889For Mut. 109889For GARP3R	5'-CGGGCCTCCTGCGGGTGC-3' 5'-CGGGCCTCCTGCGGGTGA-3' 5'-TGGCCTGCAGGCTGAGCGA-3'	494	62	2.0
Exon 3	Kontr. 109912For Mut. 109912For GARP3	5'-CGAGCTCCCGTGCGAGGC-3' 5'-CGAGCTCCCGTGCGAGGA-3' 5'-TGGCCTGCAGGCTGAGCGA-3'	482	60	2.0
Exon3	Mut.2618F Ktr.2618.F GARP6R	5'-CCCGGGCTCCGTGGCCGT-3' 5'-CCCGGGCTCCGTGGCCGG-3' 5'-GCCAGCAGCTTGGAGAGG-3'	173	57	2.0
Exon3	Mut.2438.F Ktr.2438.R GARP1R	5'-GGCCTGCGCCCGCGCTTC-3' 5'-GGCCTGCGCCCGCGCTTG-3' 5'-GGCGTGATGAAGGACAGG-3'	216	57	2.0

Alle Amplifikationen wurden mit HotStar Polymerase mit Q-Lösung von Qiagen durchgeführt. Ist ein Bindestrich anstelle der Fragmentgröße, bzw. der MgCl₂ Konzentration aufgeführt, handelt es sich um Sequenzierprimer.

7.2.4 Maus Nyx Primer

Tabelle 8: Maus Nyx Sequenzier-, RACE- und PCR Primer und Bedingungen

Position	Primer	Sequenz	Größe (nt)	Tm-2°C (°C)
Nyx 5'UTR	5'UTR 2.5.01	5'-GACTGCACTGATGGTGCTTG-3'	-	60
Nyx	5'Walk 16.04.01	5'-CATTGCTGTGACGAGACACC-3'	-	60
Nyx	5'Walk03.04.01	5'-CATCAGGCAAGGATGTAAGC-3'	-	58
Nyx	5'Walk 27.03.01	5'-CATCAGCAATAAGCAGTCTGC-3'	-	60
Nyx	5'RACE EX1	5'-CATCCTGGAGGTCTGCCCATAGTG-3'	-	s.2.2. 3.2
Nyx	5'RACE EX2	5'-GAAGCAGGATCAGCATCCCTTGGC-3'	-	s.2.2. 3.2

<i>Nyx</i>	Maus Exon3 upstream	5'-CATTCCGGTCCAGATCGATG-3'	-	60
<i>Nyx</i>	5'Maus RACE	5'-GGCCATTCCGGTCCAGATCGATG-3'	-	s.2.2.3.2
<i>Nyx</i>	3'Maus RACE	5'-GCTACAAGGCCACGTTTCTCTC-3'	-	s.2.2.3.2
<i>Nyx</i>	Maus Exon3 downstr.	5'-GCTACAAGGCCACGTTTCTC-3'	-	60
<i>Nyx</i>	3'Maus cDNA Primer	5'-GCACTCTGCGTCTTAACTCTG-3'	-	58
<i>Nyx</i> 3'UTR	5'RACE im 3'UTR	5'-CATGAGTTACGTGCTGAGCCCGCC-3'	-	
<i>Nyx</i> Ex1/2	Ex1/2 SondeFOR Ex1/2 SondeREV	5'-CAGTCAACCCTGCATGCATG-3' 5'-CAGGATCAGCATCCCTTGGC-3'	486	60
<i>Nyx</i> RT EX2- EX3	Maus_RT FOR(EX2-EX3) Maus Exon3 upstream	5'-GCCAAGGGATGCTGATCCTG-3' 5'-CATTCCGGTCCAGATCGATG-3'	190	60
<i>Gapdh</i>	GapdhF GapdhR	5'-GACCACAGTCCATGCCATCACT-3' 5'-GGCCATTCCGGTCCAGATCGATG-3'	452	58
<i>Cask</i>	mCaskFor mCaskRev	5'-GCTTCTCCTTGGCTATCTGAG-3' 5'-CCAGTCAAGGTAACAGGATC-3'	393	58

Alle Amplifikationen wurden mit Ampli *Taq* Polymerase , mit 1.5 mM MgCl₂ durchgeführt. Die Bedingungen für die RACE Bedingungen sind unter Methoden 2.2.3.2 beschrieben.

7.2.5 NYX Primer für die *E.coli*-Expressionskonstrukte

Tabelle 9: NYX *E.coli* Expressionskonstrukte: Primer, Fragmentgrößen und PCR Bedingungen

Position	Primer	Primersequenz	Größe (nt)	Tm-2°C (C°)	MgSO ₄ (mM)
N-term <i>NYX</i>	Konstrukt1. SphI.F Konstrukt1. HindIII.R	5'-GGATCCGCATGCTGCGCC CGCGCTTGTC-3' 5'-GCTAATTAAGCTTGCGGT CCAGCGGTTGCC-3'	725	56	1.5
C-term <i>NYX</i>	Konstrukt2. SphIF Konstrukt2. HindIII	5'-GGATCCGCATGCGTGGCG CGCGCCTGGTTCGCTGAC-3' 5'-GCTAATTAAGCTTTCAGT CCATCTGCAGGC-3'	641	56	1.5
NC- <i>NYX</i>	Konstrukt1. SphI.F Konstrukt2. HindIII	5'-GGATCCGCATGCTGCGCC CGCGCTTGTC-3' 5'-GCTAATTAAGCTTTCAGT CCATCTGCAGGC-3'	1366	56	1.5

Die Amplifikation wurde mittels *Pfu* Polymerase erzielt.

7.2.6 NYX Primer für Säugorzellen-Expressionskonstrukte

**Tabelle 10: Humane und Maus NYX Expressionskonstrukte für Säugorzellen:
Primer, Fragmentgröße und PCR**

Position	Primer	Primersequenz	Größe (nt)	Tm-2°C (C°)	MgCl ₂ (mM)	
NYX	1.NYX.FOR	5'-CTCGGGAGATCTGGTAAG CCTATCCCTAACCTCTCCT CGGTCTCGATTCTACGTGCG CCCGCGCTTGTCCT-3'	1493	62	1.5	
	2.NYX.FOR	5'-GCACTTGGTACCATGAAA GGCCGAGGGATGTTGGTCCT GCTTCTGCATGCGGTGGTCC TCGGCCTGCCAGCGCCTGG GCCGTGGGGCCTGCGCCG GTAAGCCTATCCCTAACCC- 3'		60		1.5
	1+2.NYX.REV	5'-GATCGAGAATTCTCAGTC CATCTGCAGGCCAAA-3'				
Nyx	1.Nyx.FOR	5'-GGTAAGCCTATCCCTAAC CCTCTCCTCGGTCTCGATT TACGTGTCTGCGGGCCTGCC CTG-3'	1412	60	1.5	
	2.Nyx.FOR	5'-GCACTTGGTACCATGCTG ATCCTGCTTCTTCATGCGGT GGTCTTCAGTCTGCCCTACA CCAGGGCCACCGAGGCCGG TAAGCCTATCCCTAACCC-3'		60		1.5
	1+2.Nyx.REV	5'-GATCGAGAATTCTCA CTCCCTCTGCAGGCCCC-3'				
NYXΔGPI	NYXΔGPIFOR NYXΔGPIREV	5'-GCACTTGGTACCATGAAA GGCCGAGGGATGTTG-3' 5'-GAGCTAGAATTCTCAGGA GGAGAGGCTGTCGGA-3'	1395	61	4	
NyxΔGPI	NyxΔGPIFOR NyxΔGPIREV	5'-GATCTAGGTACCATGCTG ATCCTGCTTCTTCATG-3' 5'-GAGCTAGAATTCTCACCG AAAGCTGTCATTCAACG-3'	1371	63	4	
NyxΔSS	NyxΔSSFOR NyxΔSSREV	5'-GATCTAGGTACCATGCTG ATCCTGCTTGGTAAGCCTAT CCCTAACCC-3' 5'-GAGCTAGAATTCTCAGGA GGAGAGGCTGTCGGA-3'	1405	60	3.5	
Nyx ΔGPI ΔSS	Nyx ΔGPIΔSS FOR Nyx ΔGPIΔSS REV	5'-GATCTAGGTACCATGCTG ATCCTGCTTGGTAAGCCTAT CCCTAACCC-3' 5'-GAGCTAGAATTCTCACCG AAAGCTGTCATTCAACG-3'	1305	58	4	

Alle Amplifikationen wurden mit HotStar Polymerase mit Q-Lösung von Qiagen durchgeführt.

7.2.7 NYX Promotorprimer

Tabelle 11: NYX Promoterstudie: PCR- und Sequenzier-Primer, Fragmentgrößen und Bedingungen

Position	Primer	Primersequenz	Größe (nt)	Tm-2°C (C°)	MgSO ₄ (mM)
moInsert	Nyxpro1FOR Nyxpro 1REV	5'-GATCGACTCGAGGCAGTTC CCTGCTGCATTG-3' 5'-CTAGCTCTCGAGCACTGCC TATGTGAGATCAG-3'	1010	59	1.5
moInsert	Mo-Insert(For)	5'-GCGTGACTAAGATTTCG GC-3'	-	60	-
huInsert	NYXpro1FOR NYXpro1REV	5'-GATCGACTCGAGGCTGCA ATGGGAGAGAAACC-3' 5'-CTAGCTCTCGAGGGGTCC TAATAAGGACACAC-3'	1118	58	2.5
huInsert	Hu-Insert(For)	5'-GAACCTCGGTGCCCTCTG-3'	-	58	-
pCR-BlundII-TOPO	M13For	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	-	48	-
pCR-BlundII-TOPO	M13Rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	-	48	2.0
pGL3-Basic Vector	RVprimer3 (for)	5'-CTAGCAAAATAGGCTGTC CC-3'	-	58	-
pGL3-Basic Vector	pGL3 REV Pri	5'-CTCCAGCGGTTCCATCTT CC-3'	-	62	-

Alle Amplifikationen wurden mit ProofStart Polymerase von Qiagen durchgeführt. Ist ein Bindestrich anstelle der Fragmentgröße, bzw. der MgCl₂ Konzentration aufgeführt, handelt es sich um Sequenzierprimer.

Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg, D, Metabion, Planegg-Martinsried, D und Gibco BRL Life Technology Inc., Gaithersburg, USA bezogen.