Aus der

Universitätsklinik für Neurologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. A. C. Ludolph

Neue 5´-Isoformen des Glutamattransporters EAAT2: RNA-Sequenzen und genomische Organisation

---

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von

Ansgar Felbecker

Hamm (Westfalen), 2002

Amtierender Dekan: **Prof. Dr. R. Marre**

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. Ludolph**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. Brinkmeier**

Tag der Promotion: **11.12.2003**

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS V

TABELLENVERZEICHNIS V

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG 1

1.1. DAS GLUTAMATERGE SYSTEM 1

1.2. DIE NA^+-ABHÄNGIGEN HOCHAFFINEN GLUTAMATTRANSPORTER 2

1.2.1. Der Glutamattransporter EAAT2 3

1.2.2. 5´-Variabilität von EAAT2 4

1.3. STÖRUNG DER GLUTAMATWIEDERAUFNAHME BEI ERKRANKUNGEN 5

1.3.1. Störungen bei chronischer Neurodegeneration 6

1.3.2. Störungen bei akuter Neurodegeneration 8

1.4. REGULATIONSMECHANISMEN DER GENEXPRESSION 8

1.4.1. Spleißprozesse 8

1.4.2. Weitere posttranskriptionelle Regulation 10

1.5. AUFGABEN 12

2. MATERIAL UND GERÄTE 13

2.1. CHEMIKALIEN 13

2.2. DNA-MOLEKULARGEWICHTSMARKER 13

2.3. ENZYME 14

2.4. KITS 14

2.5. VEKTOREN UND BAKTERIEN 14

2.6. OLIGONUKLEOTIDE 14

2.7. RADIOAKTIVE MATERIALIEN 15

2.8. PUFFER UND LÖSUNGEN 15

2.9. VERBRAUCHSMATERIALIEN 16

2.10. ANDERE MATERIALIEN 17

2.11. EDV-PROGRAMME 17

2.12. GERÄTE 17

3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 19

3.1. PCR-TECHNIKEN 19

3.1.1. Standard-PCR ... *19*
3.1.2. RACE ... *19*
3.2. GELELEKTROPHORESE ... 21
3.3. KLONIERUNG VON CDNA ... 22
3.4. RESTRIKTIONSVERDAU ... 25
3.5. AUFBEWAHRUNG VON BAKTERIEN ... 25
3.6. DOTBLOTS ... 25
3.7. DNA-SEQUENZIERUNG ... 28
3.8. NORTHERN BLOTS ... 30

4. ERGEBNISSE ... 34

4.1. RACE ... 34
4.2. DNA-RESTRIKTION ... 35
4.3. IDENTIFIZIERUNG VON INSERTS MITTELS DOTBLOT ... 36
4.4. SEQUENZ-ANALYSE ... 39
4.5. ANALYSE ... 48
4.5.1. Alternative Startkodons und offene Leserahmen ... 48
4.5.2. Genomische Organisation ... 50
4.5.3. Umgebende DNA-Sequenzen ... 51
4.6. NORTHERN BLOTS ... 53

5. DISKUSSION ... 56

5.1. 5´-HETEROGENITÄT VON EAAT2 ... 56
5.2. REGULATORISCHE EIGENSCHAFTEN DER 5´-UTR ... 57
5.2.1. Rolle von uORF als regulatorischer Faktor ... 60
5.3. GENOMISCHE ORGANISATION DER 5'-UTR VON EAAT2 ... 63
5.3.1. Alternatives Spleißen der 5´-Isoformen ... 64
5.4. REGIONALE VERTEILUNGSMUSTER VON 5´-ISOFORMEN ... 66
5.5. AUSBLICK ... 68

6. ZUSAMMENFASSUNG ... 70

7. LITERATURVERZEICHNIS ... 72

8. DANKSAGUNG ... 83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Glutamat – Glutamin – Zyklus 1
Abbildung 2: Verteilung der Glutamattransporter an der exzitatorischen Synapse 2
Abbildung 3: Zusammenfassung der zuletzt publizierten EAAT2-5'-Isoformen 4
Abbildung 4: Exzitotoxizität durch einen erhöhten extrazellulären Glutamatspiegel 6
Abbildung 5: Positionierung der RACE-Primer 20
Abbildung 6: Ergebnisse der RACE 34
Abbildung 7: Restriktionsverdau mit EcoR I 36
Abbildung 8: Bindung der Sonde Ex 2 im DotBlot 36
Abbildung 9: Vergleich von Übernachtkulturen und aufgereinigten Proben im DotBlot 37
Abbildung 10: Hybridisierung mit den Sonden Ex 2 und Ex 6 im DotBlot 37
Abbildung 11: Aufbau der Isoform 15 40
Abbildung 12: Sequenzen der Isoform 15 40
Abbildung 13: Aufbau der Isoform 13 41
Abbildung 14: Sequenzen der Isoform 13 42
Abbildung 15: Neue Kombinationen von bekannten Exons 43
Abbildung 16: Aufbau und Sequenzen des Exons 4 45
Abbildung 17: Aufbau und Sequenzen des Exons 6 45
Abbildung 18: Zusammenfassende Darstellung der neu beschriebenen Isoformen 46
Abbildung 19: Bindung von Primer und DotBlot-Sonde Nr. 6 47
Abbildung 20: Darstellung der genomischen Organisation der neuen Isoformen 50
Abbildung 21: Positionierung der Primer für die Synthese der Northern Blot Sonden 53
Abbildung 22: Northern Blot SP6-T_3 54
Abbildung 23: Anordnung der RNA-Proben auf den Northern Blots (Firma Clontech) 54
Abbildung 24: Northern Blot SP6-T_1 55
Abbildung 25: Northern Blots T7-T_3 und T7-T_1 55
Abbildung 26: Genomische Organisation aller bisher beschriebenen Isoformen 65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Besonderheiten der Isoform 15 in einzelnen Klonen 41
Tabelle 2: Besonderheiten der Isoform 13 in einzelnen Klonen 41
Tabelle 3: Besonderheiten in Klonen mit zuvor beschriebenen Exons 44
Tabelle 4: Startkodons und uORF der in dieser Arbeit beschriebenen Exons 48
Tabelle 5: Exon- und Intronlängen der beschriebenen Isoformen 51
Tabelle 6: Spleißstellen der beschriebenen Exons 52

Abkürzungsverzeichnis

5´-UTR	5´-Untranslatierte Region
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α-*amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
AP1, AP2	*Adaptor primer* 1 bzw. 2
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASCT	*Alanine-serine-cysteine-transporter*
ATG	Adenosin-Thymidin-Guanosin (Startkodon im genetischen Kode)
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare; Längenangabe für doppelsträngige Nukleotidsequenzen
cDNA	*complementary* (komplementäre) DNA
CDS	*Coding sequence* (Proteinkodierende DNA-Sequenz)
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
EAAC	*Excitatory amino acid carrier*
EAAT	*Excitatory amino acid transporter*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2	*eukaryotic initiation factor 2*
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter (entspricht EAAT1)
GLT-1	Glutamattransporter-1 (entspricht EAAT2)
GLTR	Glutamattransporter
GTRAP3-18	*glutamate transporter associated protein 3-18*
HBGTII	*Human brain glutamate transporter II*
IRES	*Internal ribosome entry site*
kb	Kilobasenpaare (10^3 bp)
M	Einheit der molekularen Masse (1 mol · l^{-1})
Mb	Megabasenpaare (10^6 bp)
mRNA	*messenger RNA* (Boten-RNA)
NaOH	Natronlauge
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
nt	Nukleotide; Längenangabe für einsträngige Nukleotidsequenzen
ORF	*open reading frame* (offener Leserahmen)

PAC1	*pituitary adenylate cyclase*
PACAP	*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*
PCR	*Polymerase chain reaction* (Polymerase-Kettenreaktion)
RACE	*rapid amplification of cDNA ends*
RNA	*Ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Sodiumdodecylsulfat
snRNA	*small nuclear RNA*
T_m	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
uATG	*upstream ATG* (vor der proteinkodierenden Sequenz gelegenes ATG)
uORF	*upstream open reading frame*
UTR	Untranslatierte Region
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Das glutamaterge System

Die Aminosäure Glutamat übernimmt weitreichende Aufgaben im menschlichen Organismus, von denen die Funktion als quantitativ wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter [32] im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen soll. Glutamat ist unverzichtbar bei praktisch allen motorischen, mnestischen und kognitiven Funktionen [18,64]. Seine Freisetzung erfolgt im wesentlichen nach aktionspotentialvermitteltem Ca^{2+}-Einstrom in den Intrazellularraum [83]. Auf der postsynaptischen Seite werden Glutamatrezeptoren aktiviert, bei denen man ionotrope mit den Subklassen NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren [25] von den G-Protein-gekoppelten metabotropen Rezeptoren unterscheiden kann [19].

Einmal sezerniert, kann Glutamat nicht verstoffwechselt werden, weshalb seiner Entfernung aus dem synaptischen Spalt entscheidende Bedeutung zukommt. Zwar leistet auch die Diffusion einen wichtigen Beitrag zur Reduktion von Glutamat an der Synapse, aber für eine effektive Kontrolle der insgesamt niedrigen extrazellulären Glutamatkonzentration werden plasmamembranale Glutamattransporter benötigt, von denen bisher drei Systeme bekannt sind [18]: Ein Cl^--abhängiges und ein protonenabhängiges System sowie das Na^+-abhängige hochaffine System mit derzeit fünf beschriebenen Subtypen (EAAT1-5, s. 1.2). Wichtigste Aufgaben vor allem des Na^+-abhängigen hochaffinen Systems sind:

- Bewahrung einer niedrigen extrazellulären Glutamatkonzentration mit zwei Hauptfunktionen: Ein niedriges Ausgangsniveau an Glutamat ermöglicht die präzise Wirkung synaptisch freigesetzter Transmitter, außerdem muß Glutamat als potentiell neurotoxische Substanz kontrolliert werden [18].
- Wiederverwertung von Glutamat über den Glutamat-Glutamin-Zyklus [33]: Aufnahme von Glutamat in Gliazellen → dort Umwandlung in Glutamin (Glutamin-Synthetase) → Abgabe in den synaptischen Spalt → Aufnahme des Glutamins in Neuronen → Umwandlung in Glutamat (Glutaminase) → erneute Nutzung als Transmitter.

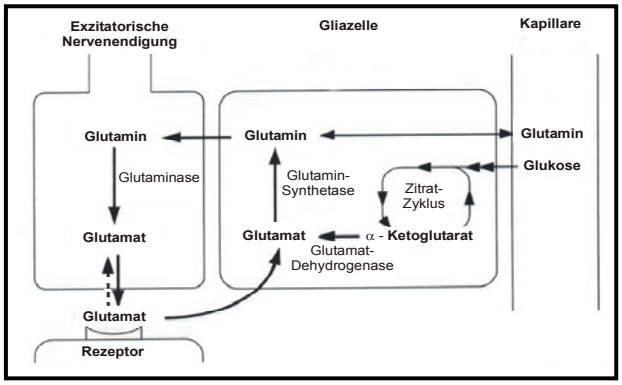

Abbildung 1 Glutamat – Glutamin – Zyklus
modifiziert nach [52]

In Neuronen ist der Na^+-unabhängige, ATP-verbrauchende Transport in Vesikel ein wichtiger Mechanismus zur intrazellulären Aufbewahrung von Glutamat [18]. Allerdings haben sich jüngst die Hinweise vermehrt, dass auch andere, nicht-vesikuläre Prozesse bei

der Lagerung und Freisetzung von Glutamat eine Rolle spielen könnten [48]. Die Glutamatkonzentrationen liegen durch diese Mechanismen zwischen etwa 1µM (extrazellulär), 10-30mM (intrazellulär) und 100 mM (intravesikulär) [19,33].

1.2. Die Na^+-abhängigen hochaffinen Glutamattransporter

Erste Beweise für einen hochaffinen Glutamat-/Aspartat-Transport in Gliazell-Membranen gab es schon 1977 [8]. Nach heutigem Kenntnisstand umfaßt die Gruppe der Na^+-abhängigen hochaffinen plasmamembranalen Glutamattransporter die 5 Typen EAAT1-5, die untereinander Homologien von 50-60% aufweisen [4,5]. Zur gleichen Familie gehören die Transporter für neutrale Aminosäuren ASCT1 und 2, zu denen 30-40%ige Homologien bestehen [60]. Die Verteilung der Glutamattransporter in den verschiedenen Geweben ist sehr unterschiedlich. EAAT2 ist der dominierende Transporter im Großhirn des Menschen, wohingegen EAAT1 im Kleinhirn überwiegt [4,19,96,108,117]. Beide erscheinen im Gegensatz zu ihrer mRNA physiologischerweise nur auf Gliazellen, nicht auf Neuronen, was für die anderen Transporter – besonders EAAT3 – gezeigt wurde [4,19,109]. Aufgrund bisher bestehender Schwierigkeiten im Nachweis von EAAT3 ist seine Rolle noch am unsichersten [19]. Offen bleiben bisher auch die Fragen, ob EAAT3 in nennenswerter Weise auf synaptischen Membranen vorkommt, wo aufgrund verschiedener Untersuchungen ein bisher noch unbekannter Aufnahmemechanismus für Glutamat erwartet wird [19,41,61], ob diese Rolle durch eine Variante von EAAT2, die mit bisherigen Untersuchungen nicht erfasst werden konnte, übernommen wird [104] oder ob es doch noch weitere Glutamattransportwege gibt. Eine quantitativ eher untergeordnete Rolle spielen EAAT4, der praktisch ausschließlich in den Purkinjezellen des Kleinhirns vorkommt und EAAT5, ein für die Retina spezifischer Glutamattransporter [19].

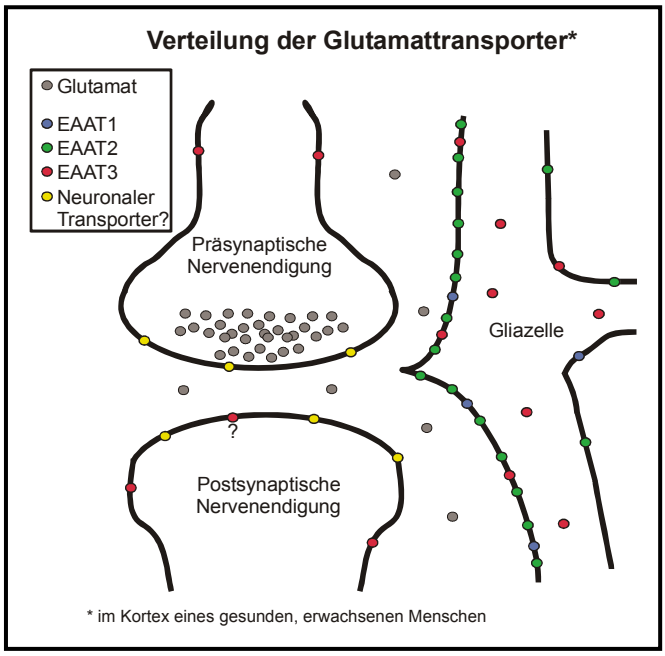

Abbildung 2 Verteilung der Glutamattransporter an der exzitatorischen Synapse Das Vorkommen von EAAT3 oder einem anderen Glutamattransporter direkt an der Synapse ist noch ungeklärt. EAAT3 wird überwiegend intrazellulär nachgewiesen und kann von dort in die Membran transferiert werden [19].

Zumindest die Transporter EAAT1-3 sind nicht auf das ZNS begrenzt, sie finden sich in verschiedenen Geweben in sehr unterschiedlichen Konzentrationen. So wurde beispielsweise in der Bauchspeicheldrüse der Glutamattransporter EAAT2 isoliert [69], in der Leber fanden sich Varianten von EAAT2 mit unterschiedlichen N-und C-Termini [121], und andere Gewebe wie die Niere [126] beherbergen die EAAT2-mRNA, ohne dass bisher eine Expression gezeigt wurde. Gerade in der Bauchspeicheldrüse könnte der Transporter wichtige Funktionen bei der Regulation der Insulinfreisetzung erfüllen, da Glutamat auch als intrazellulärer Botenstoff in ß-Zellen fungiert [68].

1.2.1. Der Glutamattransporter EAAT2

Der Glutamattransporter EAAT2 wurde 1992 erstmals an Ratten als GLT-1 [91], 2 Jahre später auch an Menschen [110] als ein 574 Aminosäuren umfassendes Protein nachgewiesen. Es folgte die Aufklärung der genomischen Struktur mit der Lokalisation auf dem Chromosom 11p11-p13 [119]. Das EAAT2-Gen umfaßt mehr als 50 kb genomischer DNA, wobei die elf proteinkodierenden Exons mit Längen zwischen 127 und 251 Nukleotiden von Introns mit Längen zwischen 2,2 und 15 kb unterbrochen werden [75]. EAAT2 wird ubiquitär im gesamten ZNS exprimiert [79] mit den höchsten Konzentrationen in Kortex, Hippocampus und Striatum [60], aber darüberhinaus auch in vielen peripheren Organen, so z.B. im Pankreas [69]. Der quantitativ wichtigste Glutamattransporter im ZNS [18] ist bisher nur auf Gliazellen nachgewiesen worden [17,60,79]. Der Transport von Glutamat entgegen dem Konzentrationsgradienten kostet Energie, die indirekt durch den Ko-Transport von 3 Na^+-Ionen und 1 H^+-Ion in die Zelle und einem K^+-Ion aus der Zelle geliefert wird [19]. Der eigentliche Energielieferant ist also die Na^+/K^+-ATPase, die den Ionengradienten aufrecht erhält. Fehlt die Energie für dieses Enzym, sistiert auch der Glutamattransport in die Zelle und kann sich im weiteren Verlauf sogar umkehren [7,67].

Während die Expression von EAAT2 im ZNS bisher lediglich auf Gliazellen gezeigt wurde, findet sich die mRNA der kodierenden Sequenzen auch in Neuronen [10]. Möglicherweise muß diese Auffassung in naher Zukunft revidiert werden, denn jüngste Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass EAAT2 sehr wohl auf Neuronen exprimiert wird, allerdings mit einer Variation am C-Terminus, welche die Darstellung mit den bisherigen Methoden verwehrte [104]. Bekannt ist darüber hinaus, dass die Expression in Neuronen in der Embryonalphase und bei pathologischen Prozessen [35] möglich und beispielsweise für die korrekte Entwicklung von Neuronen wichtig ist. Was bleibt, ist die Feststellung, dass die Fähigkeit zur Expression von EAAT2 den meisten Zellen im ZNS anhand von

vorhandener mRNA gegeben ist, eine Expression jedoch überwiegend in Gliazellen stattfindet. Ein Schlüssel für die Hemmung der Expression könnte in der Länge der mRNA liegen, die mit 11,3 kb im Durchschnitt etwa 6,6 mal länger ist als die kodierende Sequenz [91] und damit lange untranslatierte Sequenzen enthält. (→ 1.4)

1.2.2. 5´-Variabilität von EAAT2

Wenn im vorherigen Abschnitt von einer durchschnittlichen Länge der EAAT2-mRNA von 11,3 kb die Rede war, so bezieht sich dies in erster Linie auf die stark variablen untranslatierten Regionen (UTR) am 5´- und 3´-Ende der kodierenden Sequenzen. Es existieren mehrere veröffentlichte Transkriptvarianten von EAAT2, wobei der proteinkodierende Bereich recht konstant ist [5,69,74,81,110]. Interessant ist das Auftreten von alternativen Startkodons, die teilweise die Polypeptidsequenz um einige AS verlängern. Vereinbarungsgemäß wird in dieser Arbeit für die proteinkodierende Sequenz (CDS) der ORF des Transkriptes HBGTII [110] verwendet.

Es wurden bisher zahlreiche 5´-UTR-Sequenzmotive kloniert, die teilweise in sehr variablen Kombinationen auftreten [74,81,105,106]. Zuletzt wurde eine Zusammenfassung der bekannten Exons zu 9 Isoformen publiziert [106], die im Folgenden dargestellt sind.

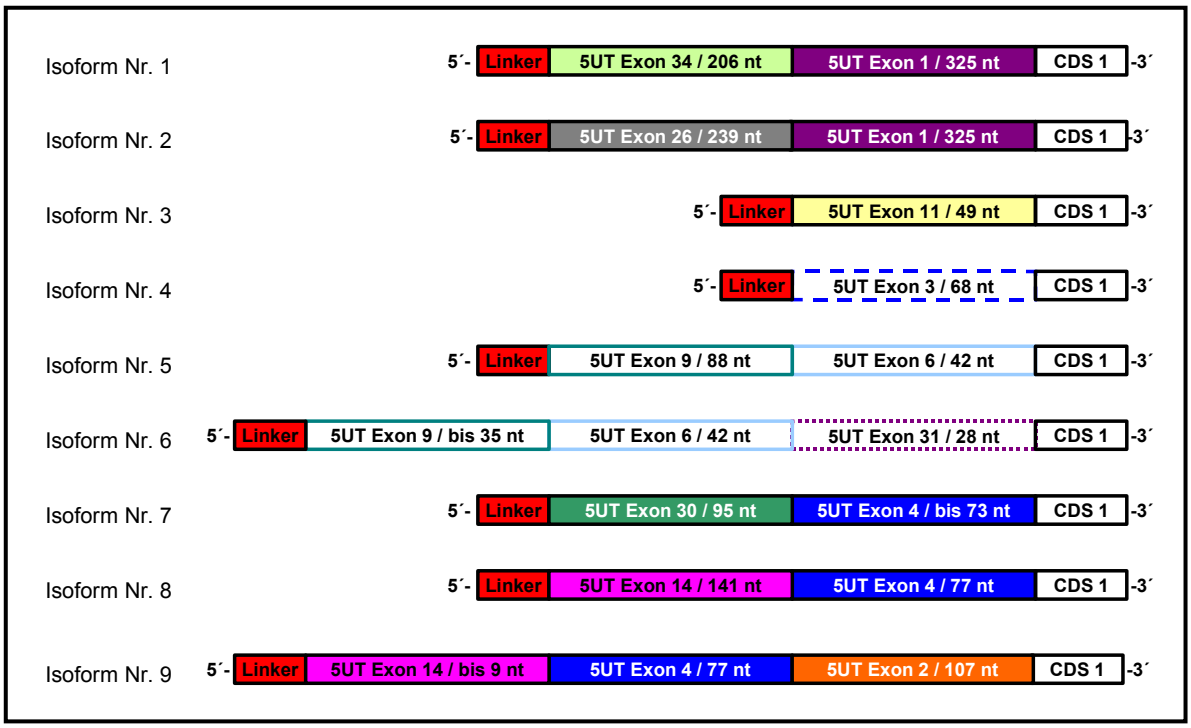

Abbildung 3 Zusammenfassung der zuletzt publizierten EAAT2-5´-UTR-Isoformen [106]

Die Beschreibung der untranslatierten mRNA-Sequenzen mit Hilfe von cDNA-Analysen stellt die Basis für eine Aufklärung der genomischen Organisation der UTR-Bereiche des

Glutamattransporters EAAT2 dar, die in dieser Arbeit unter anderem erfolgen soll. Dabei bietet sich gleichzeitig die Möglichkeit, eine neue, an der genomischen Organisation orientierte Nomenklatur der 5´-UTR-Exons zu erarbeiten.
Drei der beschriebenen Isoformen enthalten stromaufwärts gelegenen alternative Translationsstartkodons, die den offenen Leserahmen der kodierenden Sequenz um fünf, neun oder 25 Aminosäuren gegenüber dem Start im Exon CDS1 verlängern.

1.3. Störung der Glutamatwiederaufnahme bei Erkrankungen

Glutamattransporter spielen in der Pathogenese verschiedener chronischer neurodegenerativer wie akuter neurologischer Erkrankungen eine Rolle, möglicherweise auch bei Erkrankungen peripherer Organe. Unbeantwortet ist in vielen Fällen allerdings noch die Frage, an welcher Stelle Glutamat in die Krankheitsentstehung eingreift.
Schon früh wurde gezeigt, dass eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration Neuronen abtöten kann [7,85], wobei geringfügig erhöhte Konzentrationen von 4 µM (normal etwa 0,6µM) für diesen Effekt ausreichen [63]. Beobachtet wurde eine früh (nach Minuten) und eine spät (nach Stunden) eintretende Toxizität [19]. Es wurden mindestens vier pathophysiologische Mechanismen beschrieben, wobei den ersten drei eine prolongierte Neuronendepolarisation zugrunde liegt (s. Abb. 4, S. 6):

- Erhöhter Na^+- und Wassereinstrom führt zu osmotischer Zellschwellung, die für den frühen Zelltod verantwortlich und zunächst potentiell reversibel ist.
- Massiver Ca^{2+}-Einstrom aktiviert verschiedene Enzymkaskaden (Lipasen, Nukleasen, Proteasen, Kinasen), die zur verzögerten Zellyse führen [63]. Unter anderem fördert der erhöhte Ca^{2+}-Spiegel auch die Freisetzung von Arachidonsäure und Sauerstoffradikalen, die beide hochaffine Glutamattransporter hemmen und so einen *Circulus vitiosus* initiieren können [124].
- Der erhöhte intrazelluläre Na^+-Gehalt führt über eine Aktivierung der Na^+-/K^+-ATPase mit anderen energievebrauchenden Prozessen zu einem ATP-Mangel. Für die Exzitotoxizität von Glutamat spielt die Umkehr der Transportrichtung von Glutamattransportern bei unzureichender Energiezufuhr eine wichtige Rolle [7,67]. Die exzessive Glutamatfreisetzung induziert den Zelltod auch von umliegenden glutamatrezeptortragenden Neuronen.
- Unabhängig von Glutamatrezeptoren verhält sich ein Mechanismus, bei dem aufgrund des Überangebotes von Glutamat über einen Cystin/Glutamat-Antiporter der intra-

zelluläre Cystinspiegel sinkt, was zu einer Abnahme an Glutathion als antioxidativer Substanz und über diesen Mechanismus zum Zelltod führt [21].

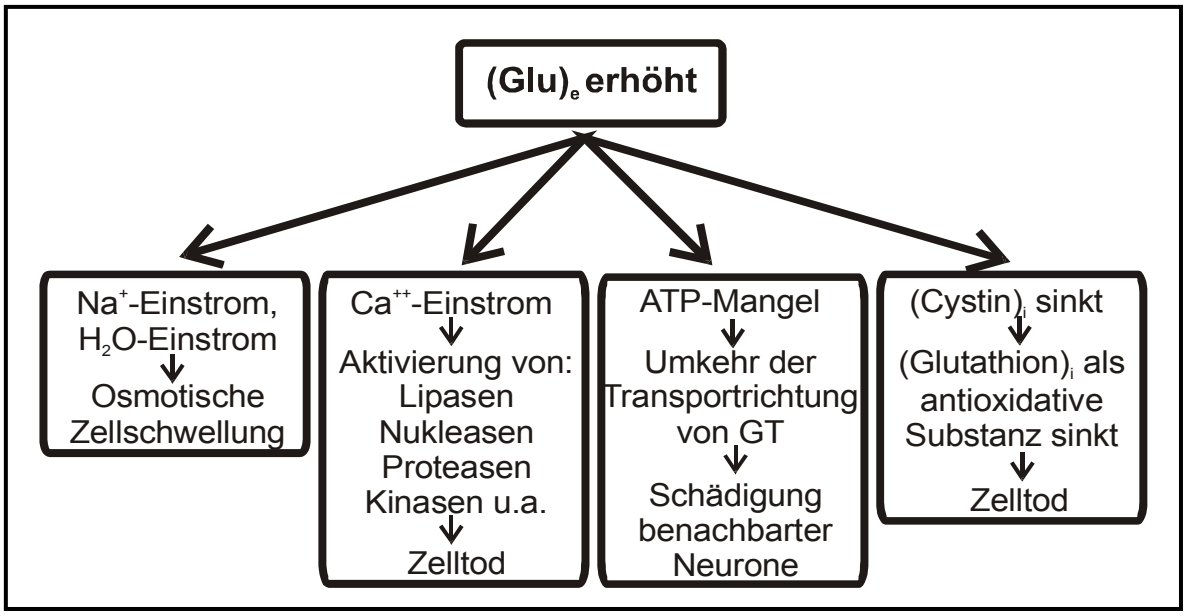

Abbildung 4 Exzitotoxizität durch einen erhöhten extrazellulären Glutamatspiegel $(Glu)_e$: extrazelluläre Glutamatkonzentration, $(Cystin)_i$: intrazelluläre Cystinkonzentration, $(Glutathion)_i$: intrazelluläre Glutathionkonzentration, GT: Glutamattransporter

Wenn also eine geringfügig erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration verheerende Folgen für die umliegenden Zellen hat, liegt es nahe, den Glutamattransportern EAAT1-5 eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten zuzuordnen, stellen sie doch die einzige nennenswerte bekannte Möglichkeit dar, Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu entfernen. In der Tat führt die künstliche Ausschaltung der Glutamattransporter EAAT1 und 2 bei Mäusen jeweils zu einem signifikanten Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration mit nachfolgenden neurodegenerativen Erkrankungen [98]. Eine Regulation der Transporter erfolgt u.a. durch von Neuonen sezernierte Stoffe wie PACAP [31], durch Wachstumsfaktoren [132], eine Unterbrechung von erregenden afferenten Bahnen [61] und wohl auch durch weitere – teilweise noch unbekannte, von Neuronen abgegebene – extrazelluläre Faktoren [36]. Auf Proteinebene greift die Phosphorylierung des Transporters mittels der Proteinkinase C an [13], ebenso dürfte die Translokation von membranalen Transportern ins Zytoplasma und umgekehrt eine Rolle spielen [27].

1.3.1. Störungen bei chronischer Neurodegeneration

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen spielen im Verlaufe der Krankheitsentstehung eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration und eine erniedrigte EAAT2-Proteinexpression eine Rolle. Dabei ist es schwierig, zwischen kausalen und sekundären Effekten zu unterscheiden, da Glutamat in unzählige Funktionen im ZNS ein-

greift und schon eine minimale Veränderung einer Variablen (Bildung, Abbau, Rezeptoren, Transporter, freie Glutamatkonzentration) Folgen für das ganze System hat. Vieles spricht im Moment dafür, dass die glutamatvermittelte Neurotoxizität eher am Ende einer Kaskade steht, in die viele unterschiedliche Prozesse gemeinsam einmünden [63,64,65].

So wurde auch bei der **ALS**, einer Erkrankung, die in Folge einer chronischen Motoneurondegeneration in der Regel innerhalb weniger Jahre zum Tode führt, eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration nachgewiesen, ebenso wie eine signifikant verminderte EAAT2-Expression im motorischen Kortex und im Rückenmark [95,97] bzw. in den Vorderhornzellen des Rückenmarks [102]. Untersuchungen an einer Variante von EAAT2, die bei einem Patienten mit ALS gefunden wurde, ergaben eine verminderte Kapazität, Glutamat aus dem synaptischen Spalt zu entfernen [120]. Allerdings bestätigte sich die Vermutung, verschiedene alternative Spleißvarianten des Transporters EAAT2 [76] könnten spezifisch für die Pathogenese der ALS sein, bisher nicht, sie zeigten sich bei ALS-Patienten genauso wie in der Kontrollgruppe [77,78]. Dadurch rückte die Möglichkeit ins Zentrum des Interesses, dass alternative Spleißformen der UTR die Genregulation beeinflussen. Diesem Regulationsmechanismus könnte über eine Veränderung der Proteinexpression, -aktivität und -stabilität eine Schlüsselrolle bei der glutamatvermittelten akuten wie chronischen Neurotoxizität zukommen [65], und hiermit ließe sich möglicherweise auch die Frage beantworten, weshalb bei der ALS selektiv bestimmte Motoneuronen geschädigt werden, während andere (z.B. des okulomotorischen Systems) regelmäßig ausgespart bleiben.

Auch bei anderen neurologischen Krankheiten wurde nach glutamatgekoppelten Störungen im Verlaufe der Pathogenese geforscht. So zeigte sich bei der **Demenz vom Alzheimer Typ** eine verminderte EAAT2-Proteinaktivität im frontalen Kortex und anderen Hirnarealen [71] bei unveränderter EAAT2-mRNA-Konzentration. Amyloid-Precursor-Protein-Produkte könnten einen steuernden Einfluß auf die EAAT2-Expression haben [72]. Auch in der Entstehung der **Wernicke-Enzephalopathie** wurde erhöhten extrazellulären Glutamatspiegeln eine Schlüsselrolle zugeschrieben, und dazu paßt der jüngst veröffentlichte Befund einer signifikant erniedrigten GLT-1- und GLAST-Konzentration in Teilen des Thalamus [42]. Andere Beispiele mit Hinweisen auf eine pathophysiologische Funktion der Glutamattransporter sind die **Temporallappenepilepsien** [73,93,111], die **spongiforme Enzephalopathie** [12] und der **Morbus Huntington** [6]. Auch bei der **Multiplen Sklerose**, der eine primär entzündliche Genese zugeschrieben wird, zeigte sich eine signifikant erniedrigte EAAT2-Konzentration im Umfeld aktiver Läsionen [127].

1.3.2. Störungen bei akuter Neurodegeneration

Bei akuten Nervenzellschädigungen gibt es ebenso Hinweise auf eine Beteiligung der hochaffinen Glutamattransporter in der Pathogenese [64]:

- In der klinischen Traumatologie ist eine posttraumatische Progredienz kortikaler Defekte im Verlauf von mehreren Tagen bekannt. Experimentelle Daten aus verschiedenen Modellen weisen auf eine Beteiligung glutamatvermittelter Schädigungsprozesse als mögliche Grundlage dieses klinischen Phänomens hin. Dabei wurden in einem Traumamodell der Ratte zwischen 6 und 72 Stunden nach dem Trauma fallende EAAT2-Spiegel gemessen [94]. Hirnregionen mit niedrigen EAAT2-Spiegeln wie Teile des Hippocampus sind besonders von einer Hypoxie betroffen [34].
- Verschiedene Ätiologien (beispielsweise bei Ischämie, Hypoxie oder Hypoglykämie) können über den Mechanismus eines ATP-Mangels und den Zusammenbruch des Na^+/K^+-Ionengradienten zu einer Einstellung oder Umkehrung des Glutamattransportes führen. Darüber hinaus kommt es nach solchen Prozessen zu einer Herabregulation des EAAT2-Proteins [94]. Die so insgesamt exzessiv erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration könnte auch den Untergang von Zellen erklären, die an das primäre Areal angrenzen und zunächst nicht betroffen waren [64,94].

1.4. Regulationsmechanismen der Genexpression

Lange Zeit herrschte die Meinung vor, die Expression menschlicher Gene werde hauptsächlich über die Transkription gesteuert, erst in den letzten Jahren wurden mit der Konzentration auf posttranskriptionelle Abläufe auch dort zahlreiche Regulationsmechanismen bekannt. Dazu gehören (alternatives) Spleißen, Variationen in der Prozessierung der RNA mit einer m^7G-Kappe am 5´-Ende und einem 3´-Poly(A)-Terminus, Produktion einer nicht funktionellen mRNA durch Belassen von Intronsequenzen, die Stabilität der mRNA und diverse Einflüsse von untranslatierten Regionen [22]. Eine Zwischenrolle nehmen Sequenzen ein, die von alternativen Promotern der DNA abgelesen werden [16], hier liegt möglicherweise eine Regulation auf transkriptioneller Ebene vor, die Effekte daraus werden aber erst später wirksam.

1.4.1. Spleißprozesse

Der Vorgang des konstitutiven Spleißens (engl. *splicing*) dient dazu, Introns der prä-mRNA zu entfernen und die Exons korrekt zu ligieren. Der Spleißvorgang wird von einem snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particles*)-Komplex katalysiert, der den prä-

mRNA-Strang nach Spleißstellen absucht. Typische Spleißstellen folgen einer Konsenssequenz, die wie folgt aussieht [38]:

5´-Spleiß-Stelle (Exon / Intron): (C/A) A G // **g t** (a/g) a g t

3´-Spleiß-Stelle (Intron / Exon): $\mathbf{(t/c)_n}$ n (t/c) **a g** // G

(//: Schnittstelle, unterstrichen sind die für die Funktion wichtigsten Basen)

Beim Spleißvorgang werden die Introns an den dargestellten Stellen herausgeschnitten, unter Verwendung eines meist etwa 30 bp aufwärts des 3´-Endes gelegenen Adenosins (*branch point,* Konsensussequenz uneinheitlich) zu einer Lassostruktur geformt und die Exons ligiert. Allerdings ist es anhand dieser Sequenzen allein nicht möglich, Spleißstellen präzise vorherzusagen. Offensichtlich spielen bei der Auswahl von Spleißstellen noch zahlreiche unverstandene Faktoren eine Rolle [112]. Unter anderem stellen die sekundäre Struktur der abgelesenen RNA sowie mögliche weitere Faktoren [20,38] regulative Elemente dar. So kann das Spleißen an günstigen Stellen verhindert, aber auch an ungünstigen Stellen ermöglicht werden. Dies kommt insbesondere dem alternativen Spleißen zugute, bei dem andere als die üblichen Spleißstellen angesteuert werden können [45,113,115], wenn auch in der Mehrzahl der Fälle die alternativen Spleißstellen kaum Abweichungen von der Konsensussequenz zeigen [113].

Die Abhängigkeit von bestimmten extra- oder intrazellulären Bedingungen belegt die pathogenetische Relevanz von Spleißvorgängen [20,116]. Etwa 15% aller Erbkrankheiten, die auf Punktmutationen zurückzuführen sind, resultieren aus der Nutzung alternativer Spleißstellen, unter anderem in Folge von Mutationen im Bereich von konstitutiven Spleißstellen [59]. Ein Beispiel für die Koppelung von Einzelmutationen im Bereich von Spleißstellen mit der Produktion von alternativen Spleißvarianten und damit einem defekten Protein ist die häufigste Form der autosomal-dominanten hereditären spastischen Paraparese [118]. Mit der Auswertung der bisherigen Daten des *Human genome project* ist klar geworden, dass die Vielzahl der menschlichen Proteine in keinster Weise mit der eher kleinen Zahl an Genen korreliert. Jüngste Berechnungen gehen davon aus, dass deutlich über 40% der menschlichen Gene bis zur Translation alternative Spleißprozesse durchlaufen [80].

Mit alternativem Spleißen bietet sich der Zelle bei Ablesung eines Genortes die Möglichkeit der Produktion einer großen Anzahl von funktionell unterschiedlichen Proteinen. Ein extremes Beispiel für diese Erhöhung der Diversität stellt die Produktion eines K^+-Kanals im Innenohr dar, der je nach Lokalisation der sensorischen Zelle aus einer möglichen Anzahl von 576 verschiedenen Varianten desselben Gens exprimiert wird [112].

1.4.1.1. Alternatives Spleißen bei EAAT2

Mehrere Arbeiten der letzten Jahre lassen kaum einen anderen Schluß zu, als dass es sich auch bei den Mechanismen, die zur Komplexität der UTR des Glutamattransporters EAAT2 führen, um alternative Spleißprozesse handelt [81,82,105] (→1.2.2). Während man bei den UTR noch weit davon entfernt zu sein scheint, ein Organisationsprinzip der gespleißten Exons zu erkennen, sehen die Ergebnisse bei der proteinkodierenden Region von EAAT2 übersichtlicher aus: Es wurden vier Isoformen identifiziert, die durch alternatives Spleißen entstanden sind. In zwei Transkripten (EAAT2-C1 und EAAT2-C3) wird ein kodierendes Exon ausgelassen, in einem weiteren (EAAT2-C2) existieren interne Spleißstellen in benachbarten Exons, so dass diese zusammengefügt werden, und im Falle von EAAT2-C4 werden zwei entfernte Exons zusammengespleißt, so dass insgesamt 702 nt der EAAT2-mRNA eliminiert werden [74].

1.4.2. Weitere posttranskriptionelle Regulation

Mit der Produktion der mRNA und ihrem Export in das Zytoplasma sind die Regulationsmöglichkeiten für die Zelle noch nicht abgeschlossen. Grundsätzlich ist schon allein die Anwesenheit von langen untranslatierten Sequenzen am 5´-Ende der mRNA ein regulierender Faktor für die Expression eines Proteins [3,24]. Prinzipielle weitere Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation seien kurz beschrieben:

- Vor dem Translationsstartkodon liegende uATG können die Expression des Proteins verhindern, herabregulieren oder auch verstärken. Das derzeit anerkannte Modell für die Translationsinitiation (*scanning model*) stammt von M. Kozak und besagt, dass ein 40S-ribosomaler Initiationskomplex mit verschiedenen Initiationsfaktoren (besonders eIF2) die mRNA vom 5´-Ende her nach dem ersten Startkodon absucht [53,88,92]. Wichtig für dessen Nutzung ist vor allem das Ableseumfeld [53,55] des Kodons.
- Bestimmte Sequenzen in der UTR – besonders GC-reiche Regionen – bilden sekundäre Strukturen der mRNA aus [70], welche die Ablesung eines uATG wie auch des CDS-ATG beeinträchtigen können. Die thermodynamischen Eigenschaften dieser Strukturen bedingen Wechselwirkungen mit dem 40S-Ribosomenkomplexes mit der Folge, dass sie vor einem Startkodon eher hemmend, danach aber auch fördernd auf die Translationseffizienz wirken können [46,100].
- Auch auf mRNA-Ebene existieren Regulationsfaktoren, die durch eine Bindung an bestimmte Sequenzen wirken. Eine besondere Bedeutung kommt möglicherweise sogenannten *internal ribosome entry sites* (IRES) zu, da sie unter bestimmten Umständen

eine Bindung des Initiationskomplexes mitten in der mRNA, also auch nach praktisch untranslatierbaren Sequenzen zulassen [49,122]. Darüber hinaus existieren RNA-bindende Proteine, die wohl am besten erforschten Vertreter sind die IRPs (*iron regulatory proteins*), deren Angriffsstelle Sequenzen der 5′-UTR von verschiedenen mRNAs sind [50].

- Grundsätzlich ist es möglich, dass noch nach der Transkription einzelne Basen der mRNA ausgetauscht werden (*RNA-Editing*) [14,15], auch für Glutamatrezeptoren wurde diese Möglichkeit gezeigt [114].
- Die Stabilität der mRNA im Zytoplasma ist ausschlaggebend dafür, wie lange eine Translation möglich ist, sie variiert zwischen wenigen Minuten und mehreren Tagen [11,22]. Damit ist auch sie ein regulatorischer Faktor [99]. Sie kann beeinflußt werden durch *trans*-aktive Faktoren wie RNA-bindende Proteine, Nukleasen oder antisense-RNA-Stränge und *cis*-aktive Elemente in der mRNA-Struktur [43]. Wesentlich für die Stabilität der gesamten mRNA ist auch die Struktur der UTR [90].

1.5. Aufgaben

Die elementare Rolle der hochaffinen Na^+-abhängigen Glutamattransporter EAAT – und insbesondere ihres wichtigsten Vertreters EAAT2 – bei der Wiederaufnahme von Glutamat aus dem extrazellulären Raum des ZNS ist gut belegt. Während über die Organisation des EAAT2-Gens sowie die Funktion des EAAT2-Proteins inzwischen wesentliche Aspekte bekannt sind, herrscht weitgehende Unklarheit bezüglich der Steuerungsmechanismen, denen der Transporter unterworfen ist. Nach bisherigen Veröffentlichungen liegen Hinweise für eine erhebliche Komplexität der EAAT2-Genregulation vor. Ein wichtiger Bestandteil der EAAT2-Expression sind verschiedene Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Organisation der 5´-Untranslatierten Regionen des Glutamattransporters EAAT2 darzustellen. Zur Identifizierung neuer 5´-Isoformen der EAAT2-RNA werden Primer in schon publizierten Exons der 5´-UTR positioniert, um mit Hilfe der RACE-Methode eine Komplettierung der EAAT2-RNA-Sequenzinformation zu erhalten. Die so nach Klonierung und Sequenzierung erhaltenen Motive werden mit bisher veröffentlichten Isoformen abgeglichen.

Desweiteren soll die genomische Grundlage der 5´-Heterogenität aufgeklärt und die Entstehung von 5´-Isoformen der EAAT2-RNA durch alternative Spleißmechanismen nachgewiesen werden. Mit Kenntnis der genomischen Organisation soll eine einheitliche Nomenklatur der EAAT2-Isoformen und ihrer Exon- / Intron-Organisation abgeleitet werden.

Erste Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von 5´-EAAT2-Isoformen für eine topisch-differentielle Expression des Glutamattransporters im zentralen Nervensystem und ausgewählten anderen Geweben sollen mit der Durchführung von Expressions-Arrays gefunden werden.

2. Material und Geräte

2.1. Chemikalien

2-Propanol pro analysi	Merck
Acryl Amide / Bis solution, 29:1 (3,3%C)	BioRad
Agarose NA	Pharmacia Biotech
Alconox® Detergent powder	Alconox Inc.
Ammoniumpersulfat (APS)	Pharmacia Biotech
Borsäure pro analysi	Merck
Bromphenol blau	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma
Eisessig	Roth
Ethanol absolut	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Sigma
Harnstoff	Roth
Isopropanol	Merck
Kanamycin	Sigma
LB-Agar (Lennox L Agar)	Gibco BRL
LB-Medium (Lennox L Broth Base)	Gibco BRL
Li Chrosolv® Wasser für Chromatographie	Merck
Mineralöl	Sigma
N`-N`-Dimethylformamid	Sigma
NaOH	Merck
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	USB
TEMED (N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin)	Pharmacia Biotech
Tris Base	USB
Tris Electrophoresis Purity Reagent	BioRad

2.2. DNA-Molekulargewichtsmarker

Lambda DNA-Hind III / øX-174 DNA-HAE III Digest 27-4054-01	Pharmacia Biotech
DNA Molekulargewichtsmarker „*100 base pair ladder*“	Pharmacia Biotech
DNA Molekulargewichtsmarker „*100 bp molecular ruler*“	BioRad

2.3. Enzyme

Cloned Taq DNA-Polymerase recombinant (5 U/µl) (incl. Puffer)	Gibco BRL
EcoR I (10 U/µl) (incl. Puffer)	Roche
Polynucleotid-Kinase (incl. Puffer)	Roche

2.4. Kits

Human Multiple Tissue Expression (MTE ™) Array	Clontech
Marathon-Ready cDNA, human brain	Clontech
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
SP6/T7 Transkription Kit	Roche
Thermo Sequenase™ dye terminator cycle sequencing pre-mix kit	Amersham

2.5. Vektoren und Bakterien

pCR® 2.1-TOPO Vektor (aus *Original TA Cloning Kit*)	Invitrogen
Epicurian Coli® XL2-Blue MRF' Ultracompetent Cells	Stratagene

2.6. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (außer AP1 und AP2) wurden über die Firma *Interactiva Biotechnologie GmbH* bezogen. Angegeben sind jeweils auch die Schmelztemperaturen T_m.

- **RACE**:
  - **AP1** (T_m=71°C) 5'-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-3'
  - **AP2** (T_m=74°C) 5'-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC-3'
  - **Ex 2** (T_m=70°C) 5'-TGC GGA GTA TTC AAT CAT CTA TTC CTA CTC AAA ATA GAG GGG-3'
  - **Ex 3** (T_m=72°C) 5'-GGA AAA AGG CAA AGC GGG AGG CAG ACA GG-3'
  - **Ex 6** (T_m=72°C) 5'-CTC CCA CGT CTG GGG GTC CCA GGT CC-3'
  - **Ex 11** (T_m=72°C) 5'-TCC ACG CTG TAG GGT CTT CCT CCT GCT GAC C-3'
- **DotBlots:**
  - **Ex 2** (T_m=57°C) 5'-CCT ACT CAA AAT AGA GGG GAT ATT CAG C-3'
  - **Ex 4** (T_m=59°C) 5'-TCT GGG GAA CGC CCC CTC-3'
  - **Ex 6** (T_m=60°C) 5'-CCC AGG TCC AGC GGA GTC G-3'

Ex 13 (T_m=59°C) 5‘-GAA TTC AGC GGC CGC TGA AT-3‘

- **Sequenzierung:**

  M13-rev (T_m=36°C) 5‘-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3‘

  M13-forw (T_m=44°C) 5‘-GTA AAA CGA CGG CCA G-3‘

- **Synthese der Northern-Array-Sonden:**

  SP6_hEAAT2_A2_as (T_m=75°C) 5‘-GGG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAC TGC AGG GCC AAA AAG AAG AAA CC-3‘

  T7_hEAAT2_A8_s (T_m=66°C) 5‘-CTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA TTG TCA TTT TAA AAA TGT AAA CT-3‘

  SP6_hEAAT2_A8_as (T_m=67°C) 5‘-GGG ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAA GTT TAC ATT TTT AAA ATG ACA AT-3‘

  T7_hEAAT2_A9_s (T_m=71°C) 5‘-CTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT TTT GAC ACA TGC TGC CA-3‘

2.7. Radioaktive Materialien

γ-ATP^{32}	Amersham
α-CTP^{32}	Amersham

2.8. Puffer und Lösungen

- **Kulturmedien**

LB Medium: 20 g Lennox L Both Base in 1000 ml dH_2O; autoklavieren; nach dem Abkühlen auf 60°C 25 mg Kanamycin zusetzen

LB Agar: 32 g Lennox L Agar in 1000 ml dH_2O; autoklavieren; nach Abkühlen auf 60°C 25 mg Kanamycin zusetzen; Platten gießen

Kanamycin: 10 mg/ml

- **Gelelektrophorese**

Agarosegel 2% : 2 g Agarose NA in 100 ml 1x TAE durch Erhitzen auflösen, 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugeben, Gel gießen, polymerisieren lassen

10xTAE-Puffer:

48,6 g	Tris-Base (0,4 M)
23,0 ml	Eisessig (100%)
2,9 g	EDTA (10mM)
	auf 1000 ml dH_2O

10xLaufpuffer:	0,5844 g	EDTA
	10,0 g	Glycerol
	0,1 g	SDS
	0,02 g	Bromphenol blau
		auf 20 g mit dH_2O auffüllen
Ethidiumbromid:	10 mg/ml	

- **Dot Blots**

Waschlösung A:	1 mM	EDTA
	40 mM	$NaHPO_4$ pH 7.2
	5 %	SDS
Waschlösung B:	1 mM	EDTA
	40 mM	$NaHPO_4$ pH 7.2
	1 %	SDS
		jeweils auf 1000 ml mit H_2O auffüllen

- **Sequenzierung**

10x TBE Puffer:	108,0 g	*Tris Electrophoresis Purity Reagent*
	55,0 g	Borsäure
	7,4 g	Na_2EDTA
		auf 1000 ml mit dH_2O (Li Chrosolv® Wasser) auffüllen

- **Northern Blots**

20x SSC:	175,3 g	3,0 M NaCl
	88,2 g	0,3 M $Na_3Citrat \bullet H_2O$
Waschlösung I:	2x SSC	
	1% SDS	
Waschlösung II:	0,1x SSC	
	0,5% SDS	

2.9. Verbrauchsmaterialien

Falcontubes 15 ml, 50 ml	Greiner
Membranfilter RC 58	Schleicher & Schuell
PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym

Petrischalen 94/16 mm TC	Greiner Labortechnik
Safe-Lock 0.2, 0.5, 1.5, 2.0 ml	Eppendorf
Safeseal-tips 5.0, 10, 100, 200, 1000 µl	Biozym
Standardtips 2.5, 20, 100, 1000, 2500 µl	Eppendorf
DotBlot-Membranen	Zeta-Probe

2.10. Andere Materialien

Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Filme 18x24	Kodak
Filmkassetten BioMax Intensifying Screen	Kodak
Phosphorscreen	Molecular Dynamics
Kassetten für *Phosphorscreen*	Molecular Dynamics

2.11. EDV-Programme

Elektrophoresegele:	*Gel Doc 1000, Molekular Analyst™ (BioRad)*
Sequenzierung:	*ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer)*
Sequenz-Analyse:	*Basic Local Alignment Search Tool (BLAST [2])*
	DNA-Star Inc. „MegAlign 4.0“, „EditSequ 4.0“

2.12. Geräte

ABI Prism™ 377 DNA-Sequencer	Perkin Elmer
Analysenwaage BP 1105	Sartorius
Autoklav, Modell 2540 EL	Tuttnauer
Bio-Dot Microfiltration Apparatus	BioRad
Elektrophorese Kammer (Sub-Cell GT-System), versch. Größen	BioRad
Eraser PROlite 5000 S (für Phosphorscreens)	Kaiser
GS Gene Linker	BioRad
Heiz- und Magnetrührer (IKAMAG RH)	Janke & Kunkel
Hybridisierungsflaschen 300 x 35 mm	Biometra
Hyperprocessor	Amersham
Liquid Szintillation Analyzer (TriCarb 2100 TR)	Canberra-Packard
Mikrowelle	AEG
Millipore Q plus PF	Millipore
Mini Shaking Hybridisierungsofen	Biometra

pH-Meter (Modell 256, MultiCal R)	WTW
Photodokumentationssystem für Agarosegele (Gel Doc 1000)	BioRad
PhosphorImager Storm 860	Molecular Dynamics
Power Supply (Power Pac 200)	BioRad
Schüttelinkubator, Modell 3033	GFL
Scotsman AF-10	Automatic Ice Mach.
ThermoBlock (neoBlock 1)	neoLab
Thermocycler (Uno-/Trio-Thermoblock)	Biometra
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
Vakuum Regulator 260 BR	BioRad
Vakuumfiltrationseinheit	Sartorius
Vakuumzentrifuge Centrivac PLCT 60 E VR-1	Heraeus
Vortex MS 1	Bender & Hobein
Wasserbad (Typ 1013)	GFL
β/γ-Detektor LB 122	Berthold

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. PCR-Techniken

3.1.1. Standard-PCR

Mit PCR (*Polymerase Chain Reaction*) wird eine gebräuchliche *in vitro*-Methode in der Molekularbiologie bezeichnet, mit deren Hilfe sich DNA-Fragmente definierter Länge in großer Anzahl amplifizieren lassen. Verwendung finden zwei Primer (Oligonukleotide), die an den Enden der zu amplifizierenden Sequenz ansetzen und zu jeweils einem DNA-Strang komplementär sind. Neben den Primern muß sich eine ausreichende Menge an Desoxyribonukleinsäuren (dNTP) im Ansatz befinden, sie sind die „Bausteine" der zu synthetisierenden DNA-Stränge.

In wiederkehrenden Zyklen aus Denaturierung der DNA, Bindung der Primer an die denaturierte DNA (*annealing*) und Verlängerung der an die Matrizen-DNA gebundenen Primer (*extension*) werden die gewünschten DNA-Abschnitte vermehrt, es kommt bei jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Stränge. Zur Synthese der Stränge verwendet man hitzestabile *Taq-Polymerase*, ein Enzym des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*, das im Gegensatz zu menschlichen Enzymen die kurzzeitige Erhitzung auf über 90°C übersteht und bei einem Temperaturoptimum von etwa 70°C arbeitet.

Für ein optimales Ergebnis sollte das zu vervielfältigende DNA-Segment nicht größer als 1-3 kb sein, darüberhinaus müssen die Bedingungen wie die Zeit für die Bindung des Primers und die Synthese der Stränge sowie die entsprechenden Temperaturen im Einzelfall optimiert werden.

Anwendung fand die PCR in dieser Arbeit an mehreren Stellen, so bei der Überprüfung der isolierten Plasmide auf vorhandene Inserts, bei der Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung oder bei der Synthese der Sonden für die Northern Arrays.

3.1.2. RACE

Mit RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) bezeichnet man eine modifizierte PCR-Methode, die es ermöglicht, bekannte cDNA-Abschnitte in einer Richtung in unbekannte Regionen zu verlängern. Nötig ist also nur die Synthese eines Primers am Rande einer bekannten mRNA-/cDNA-Region, nicht wie bei der klassischen PCR zweier Primer.

Verwendet als Ausgangsmaterial wurde *human brain Marathon Ready cDNA* der Firma *Clontech*. Für die Synthese von cDNA aus zytosolischer mRNA wird von der Firma *Clontech* mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkiptase* zunächst eine Einzelstrangkopie von einer polyA$^+$-RNA angefertigt, dieser Strang erhält einen Komplementärstrang durch eine *DNA-*

Polymerase. Anschließend wird der Doppelstrang mit Hilfe des Enzyms *T4-DNA-Ligase* mit einem Adapter versehen, an den mitgelieferte Primer wie der AP1-Primer binden. Durch diese Aufarbeitung wird eine zufällige Auswahl aller im verwendeten Hirngewebe vorhandenen mRNA in cDNA mit einem immer gleichen Ende verwandelt, zu dem der AP1-Primer wie ein Schlüssel paßt.

So ist es also möglich, mit Hilfe eines im bekannten mRNA-Bereich gelegenen reversen genspezifischen Primers cDNA-Sequenzen zu amplifizieren, die von dem bereits bekannten mRNA-Bereich über ein unbekanntes Areal bis zu dem Adapter reichen.

Um die Spezifität der Experimente zu erhöhen, wurden Primer gewählt, die in der schon bekannten 5´-UTR liegen, und nicht im genkodierenden Bereich (CDS). Natürlich nimmt man damit in Kauf, dass unter Umständen nicht mehr alle vorhandenen Exons auch amplifiziert werden, man erreicht also eine geringere Sensitivität. Die Positionierung der Primer soll anhand der folgenden Grafik anschaulich gemacht werden:

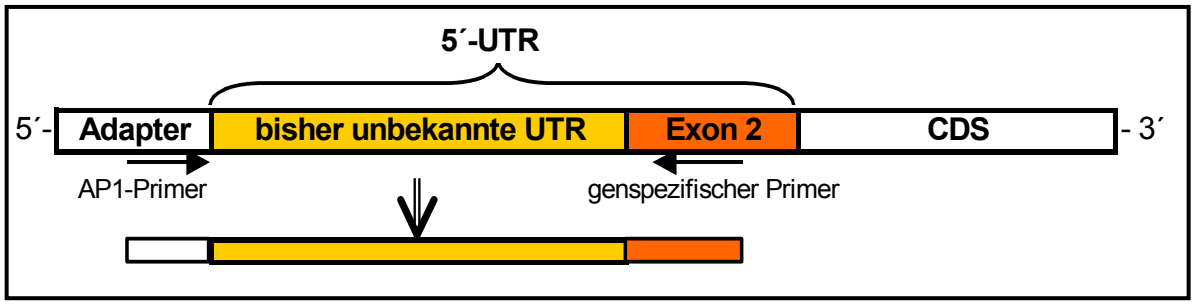

Abbildung 5 Positionierung der RACE-Primer und das entstehende PCR-Produkt am Beispiel von Exon 2. Die Adapter-Sequenz wurde von der Firma *Clontech* unspezifisch an die 5´-Enden der cDNA-Sequenzen gekoppelt, an sie bindet der AP1-Primer. Der genspezifische Primer wurde als reverser Primer der bekannten Sequenz des Exons 2 von der Firma *Interactiva Biotechnologie GmbH* produziert. (5´-UTR: 5´-Untranslatierte Regionen, AP1: *Adaptor Primer 1*, CDS: *Coding sequence*, proteinkodierende Sequenz)

<u>Der Reaktionsansatz der RACE im Überblick:</u>

Master Mix:	34,0 µl ddH_2O
	5,0 µl 10x cDNA *PCR Reaction Buffer*
	1,0 µl dNTP Mix (10mM)
	1,0 µl *Advantage cDNA Polymerase Mix (50x)*
	41,0 µl

Ansatz:	41,0 µl Master Mix
	5,0 µl *Marathon Ready cDNA*
	2,0 µl AP1-Primer
	2,0 µl genspezifischer Primer
	50,0 µl

Ansatz Positiv-Kontrolle: 2,0 µl G3PDH Primer anstatt genspezifischer Primer
Ansatz Negativ-Kontrolle: 5,0 µl ddH_2O anstatt *Marathon Ready cDNA*

Zur Optimierung der Ergebnisse wurde eine *Touchdown-PCR* durchgeführt. Dabei wird in den ersten PCR-Zyklen die *Annealing*-Temperatur erst langsam gesenkt, um zu erreichen, dass bei den ersten Durchgängen eine etwas bessere Bindung der genspezifischen Primer im Gegensatz zum AP1-Primer stattfindet. So kann im Idealfall die Ausgangsmenge der gewünschten DNA-Sequenz erhöht und damit die Spezifität angehoben werden. Die Methode ist nur erfolgreich, wenn die verwendeten genspezifischen Primer eine ausreichend hohe Schmelztemperatur T_m aufweisen, worauf bei diesen Versuchen geachtet wurde.

Thermocycler-Programm:

1. Schritt:	1 min	94°C		
2. Schritt:	30 sec	94°C	↺	5x
	1 min	68°C		
3. Schritt:	30 sec	94°C	↺	5x
	3 min	66°C		
4. Schritt:	30 sec	94°C	↺	32x
	3 min	64°C		
5. Schritt:	3 min	64°C		
6. Schritt:	∞	4°C		

Zur weiteren Erhöhung der Spezifität wurde eine *Nested-PCR* durchgeführt. Dazu werden zwei weitere Primer gewählt, die knapp innerhalb des zuvor amplifizierten DNA-Fragments liegen, so dass die Anzahl der gewünschten DNA-Abschnitte noch einmal exponentiell vermehrt wird.

3.2. Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich eine Eigenart der Nukleinsäuren zu Nutze: Sie besitzen negative Ladungen, und zwar in etwa proportional zu ihrer molekularen Größe. Läßt man sie in einem konstanten elektrischen Feld über ein Agarose- oder Polyacrylamidgel mit unterschiedlich großen Poren wandern, so bleiben die DNA-Fragmente je nach ihrer molekularen Größe an unterschiedlichen Stellen im Gel hängen. Die Laufstrecke der Fragmente ist proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Kleinere Nukleotide legen also in der gleichen Zeit einen weiteren Weg im Gel zurück als große

Nukleotide, und zur relativen Größenbestimmung dient ein Größenmarker mit bekannt großen DNA-Bruchstücken, der parallel aufgetragen wird.

Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente nutzt man unterschiedliche Gelkonzentrationen, z.B. beim Agarosegel 1,0-2,0%ige Gele für Fragmente von ca. 800 bis 5000 bp, 2,0-2,5%ige Gele für kleinere DNA-Abschnitte ab 200 bp. Die Agarose wird mit 1xTAE-Puffer, pH 8,0 (→ Kap. 2.8) angesetzt und zum Kochen gebracht, bis sie vollständig gelöst ist. Um die Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, wird der erhitzten Agarosemischung Ethidiumbromid zugegeben, was sich zwischen die einzelnen Basen einer Nukleinsäure setzt („interkaliert") und die Eigenschaft besitzt, bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (Wellenlänge 254 nm oder 300 nm) zu fluoreszieren. Gute Ergebnisse erbrachte eine Konzentration von 0,5µg Ethidiumbromid (10mg/ml) pro 1 ml Gellösung. Gegossen wird das Gel nach einer kurzen Abkühlung auf etwa 60°C in einen Gelschlitten mit einer Dicke von 0,7 cm, wobei durch Einsetzen eines Kammes die Kammern für den Probenauftrag freigehalten werden. Das Auftragsvolumen betrug stets 10µl bei folgender Zusammensetzung:

4,0 – 8,5	µl DNA (je nach Konzentration)
1,5	µl 10x-Probenpuffer (pH 7,2, s. Kap. 2.8)
x	µl H_2O
10,0	µl

Von den Laufbedingungen in der Elektrophoresekammer (gefüllt mit 1x-TAE-Puffer, pH 8,0) hängt ab, wie präzise die Banden aufgetrennt werden, in der Regel waren folgende Bedingungen aureichend:

Spannung	80 V
Laufzeit	20 – 30 min

3.3. Klonierung von cDNA

Für die weitere Arbeit mit den amplifizierten RACE-Produkten empfiehlt es sich, mittels Klonierung die Nukleotide in kompetenten Escherichia-coli-Zellen zu vermehren. Die Aufnahme eines DNA-Abschnittes in die Plamid-DNA der Bakterienzellen erfolgte dabei ohne vorherige Selektion der DNA, d.h. im Prinzip unspezifisch.

3.3.1. Ligation

Für den Einbau der PCR-Produkte in einen Vektor fand der „*pCR 2.1-TOPO Vektor*" der Firma *Invitrogen* Verwendung. Dieser Vektor liegt linearisiert vor, also nicht geschlossen wie die Plasmid-DNA. Da an den 3´-Enden jeweils ein überhängendes Desoxythymidin angehängt wurde und die mit der *Taq-Polymerase* produzierten PCR-Produkte an ihrem

3´-Ende ein überhängendes Desoxyadenosin besitzen, besteht bei dieser Kombination eine relativ große Klonierungseffizienz. Für den Einbau der Oligonukleotide in den linearisierten Vektor bedarf es einer *DNA-Ligase*, eines Enzyms, das die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den freien 3´-Hydroxylgruppen und den 5´-Phosphatgruppen katalysiert. Bei dem verwendeten Vektor der Firma *Invitrogen* ist anstatt der Ligase eine Topoisomerase kovalent an den Vektor gebunden, welche die gleiche Funktion erfüllt. Mit dieser Methode erfolgt eine effiziente Ligation bereits in Minuten, nicht nach Stunden wie bei der zuzugebenden Ligase.

Weitere Funktionen des Vektors sind eine Eco-R-I-Schnittstelle in unmittelbarer Nachbarschaft der *Multiple Cloning Site* (MCS), mit deren Hilfe sich das Insert wieder „herausschneiden" läßt, Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin sowie verschiedene Sequenzmotive wie Bindungsstellen für *M13 Forward* und *M13 Reverse Primer*, die bei der späteren Sequenzierung genutzt werden.

Laut Herstellerangaben erfolgt eine effiziente Ligation bei Insertgößen von 400 – 1000 bp. Der Ligationsansatz betrug 5,0 µl, es wurden 2,0 µl des PCR-Produktes, 2,0 µl H_2O und 1,0 µl *pCR 2.1 TOPO-Vektor* eingesetzt und vier Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt und in E.coli-Zellen transformiert.

3.3.2. Transformation kompetenter E. coli-Zellen

Bei der Transformation wird freie DNA in kompetente prokaryontische Zellen eingebaut, wozu sich besonders gut Escherichia-coli-Zellen eignen, aufgrund ihrer Fähigkeit, exogene DNA effizient aufzunehmen. Der Schritt der Herstellung kompetenter E.-coli-Zellen entfiel durch die Verwendung von „*Epicurian Coli XL2-Blue MRF' Ultracompetent Cells*" der Firma *Stratagene*. Für die Transformation wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Auftauen der Zellen auf Eis, 40 µl der Zellsuspension in vorgekühlte Gefäße
- Zugabe von 0,7 µl β-Mercaptoethanol (0,5M), 10 min auf Eis
- Zugabe von 2 µl Ligationsansatz, 30 min auf Eis
- 40 sec Inkubation bei 42°C im Wasserbad (aktive Aufnahme der DNA), 2 min auf Eis
- Zugabe von 450 µl LB-Medium, vorgewärmt auf 37°C
- 1 Stunde Schüttelinkubation bei 37°C (Resistenzexpression)

Anschließend wurden die Zellen auf Eis gelagert und umgehend auf LB-Agar-Platten (versetzt mit 50 µg/ml Kanamycin, s. Kap. 2.8) aufgetragen, jeweils eine Platte mit einer Menge von 50 µl, 100 µl und 200 µl transformierter Zellen. Die Platten wurden daraufhin über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zugabe des Antibiotikums bewirkt einen starken

Selektionsdruck auf die E.coli-Zellen, die ein Resistenzgen tragen, so dass es nur zu einer Vermehrung der plasmidtragenden Zellen kommt.
War ein Zellwachstum sichtbar, wurden Klone mit Pipettenspitzen von den Platten gepickt, in einer Übernachtkultur vermehrt und mit Hilfe der DotBlot-Methode auf enthaltene Inserts überprüft. Auf die Blau/Weiß Selektion mit Hilfe des Enzyms β-Galaktosidase wurde verzichtet, da laut Herstellerangaben erst bei Insertgrößen über 1500 bp mit einer sicheren Unterdrückung der Bildung des Enzyms zu rechnen ist.

3.3.3. Anreicherung der transformierten Bakterienzellen

Die Anreicherung transformierter E.coli-Zellen erfolgte mit Hilfe von Übernachtkulturen. Dabei vermehren die Bakterienzellen auch die ihnen zuvor eingefügte Plasmid-DNA mit. Für die Übernachtkulturen wurden 4 ml LB-Medium mit 25µg/ml Kanamycin versetzt, anschließend ein einzelner Zellklon von der Agarplatte gepickt, wozu zuvor im Autoklaven sterilisierte Pipettenspitzen verwendet wurden. Beides zusammen wurde nun mittels Schüttelinkubation bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. Das zugesetzte Antibiotikum soll wiederum das Wachstum fremder Bakterienzellen ohne das zugeführte Plasmid verhindern, da diese kein Resistenzgen gegen Kanamycin besitzen.

3.3.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die in der Übernachtkultur vermehrten E.coli-Zellen wurden bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde weiter verwendet, es enthält aber neben der erwünschten Plasmid-DNA auch gewisse Mengen an DNA, RNA, Proteinen und Zelltrümmern aus den verwendeten Escherichia-coli-Zellen.
Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA fand das „*QIAprep Spin Miniprep Kit*“ der Firma Qiagen Verwendung. Dabei werden mittels alkalischer Lyse die Bakterienzellen aufgelöst und anschließend unter Anwesenheit eines Puffers mit hoher Salzkonzentration die Plasmid-DNA spezifisch an eine Membran gebunden, während alle anderen Zellbestandteile ausgewaschen werden. Anschließend wird ein Puffer mit niedriger Salzkonzentration hinzugegeben, der die Bindung der Plasmid-DNA an die Membran wieder aufhebt, so dass die aufgereinigte Plasmid-DNA ausgewaschen wird und hochkonzentriert in dem Eluat vorliegt.
Bei der Durchführung der Isolierung wurde den Herstellerangaben entsprechend verfahren.

3.4. Restriktionsverdau

Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen und gleichzeitig einen ersten Anhaltspunkt über die Größe der Inserts zu erhalten wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Der Vektor ist so gestaltet, dass sich auf beiden Seiten der *Multiple Cloning Site* (MCS), in die das Insert eingefügt wurde, Eco-R-I-Schnittstellen befinden, an welche die Restriktionsendonuklease EcoR I bindet und den DNA-Strang zerschneidet. Somit bleiben nach einer Inkubationszeit (1 h bei 37°C) pro Plasmid zwei lineare Doppelstränge zurück: Zum einen das Insert, zum anderen der Rest des Vektors. 10 µl Restriktionsansatz enthalten 10 U EcoR I, 1x Puffer H und 10 µg Plasmid-DNA.
Bei der anschließenden Gelelektrophorese wurde entsprechend Kapitel 3.2 verfahren.

3.5. Aufbewahrung von Bakterien

Die Überlebenszeit von Bakterien ist je nach Medium und Lagerungsbedingungen sehr variabel. Während sie in Kulturmedien bei 4°C lediglich einige Wochen überleben, kann man sie auf Agarplatten für einige Monate am Leben erhalten. Deswegen wurde parallel zu jeder Übernachtkultur eine Kultur auf einer Masterplatte angelegt. Um jedoch eine Langzeitlagerung zu gewährleisten, wurden von allen relevanten Klonen Glyzerolkulturen angelegt, die bei –80°C für mehrere Jahre gelagert werden können. Dafür wurde zunächst erneut eine Übernachtkultur angelegt, davon 1,5 ml abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl einer 20%igen (v/v) Glycerol/LB-Medium-Lösung resuspendiert.

3.6. DotBlots

Mit Einführung der DotBlot-Methode ergab sich die Möglichkeit, größere Mengen von Klonen (bis zu 96 pro Durchgang) spezifisch auf vorhandene Inserts zu überprüfen. Damit erübrigte sich der Restriktionsverdau mit Endonukleasen, da in einem Durchgang wesentlich mehr Proben untersucht werden können und man darüberhinaus spezifische Informationen über die erhaltenen Inserts erhält, wohingegen beim Restriktionsverdau lediglich ungefähre Aussagen über die Insertgröße gemacht werden können. So konnte auch die Zahl der Proben, die mittels *MiniPrep* aufgereinigt und später sequenziert wurden, begrenzt werden auf jene Klone mit voraussichtlich interessanten Inserts.

3.6.1. Blotten der Membranen

Bei der DotBlot-Hybridisierung werden denaturierte einzelne DNA-Stränge auf eine positiv geladene Membran (*Zeta-Probe® Membran*) aufgebracht, dort fixiert und anschließend mit radioaktiv markierten DNA-Sonden gebunden und sichtbar gemacht. Es handelt sich also im Prinzip um eine modifizierte *Southern-Blot-Methode*. Der Ansatz für den Denaturierungsschritt zu Beginn des Blots setzt sich folgendermaßen zusammen:

10,0 µl	DNA
2,0 µl	0.5 M EDTA (Endkonzentration: 10 mM EDTA)
40,0 µl	1 M NaOH (Endkonzentration: 0,4 M NaOH)
48,0 µl	H_2O
100,0 µl	

In Voruntersuchungen ergab sich, dass vergleichbare Ergebnisse mit dem Einsatz von 50 µl der kompletten Übernachtkultur an Stelle von 10 µl aufgereinigter DNA zu erzielen waren, womit sich die aufwendige Aufreinigung der Proben erübrigte. Eine Positivkontrolle wur-de – soweit vorhanden – mit einem Klon durchgeführt, der die gesuchte DNA-Sequenz sicher enthält. Dabei wurden 5,0 µl aufgereinigte DNA und dementsprechend 53,0 µl H_2O eingesetzt. Eine Negativkontrolle wurde stets mit 58,0 µl H_2O und ohne Zusatz von DNA durchgeführt.

Das praktische Vorgehen beim Aufbringen der DNA auf die Membranen:

- Anfeuchten der *Zeta-Probe®* -Membran in destilliertem Wasser für etwa 10 min
- Einbau der feuchten Membran in den *Bio-Dot Microfiltration Apparatus* der Firma BioRad
- Auftragen von 500 µl TE-Puffer in alle Kammern zur Rehydration der Membran
- Kurzes Anlegen eines Vakuums, anschließend Nachziehen der Schrauben am Apparat
- Abdichten der nicht benutzten Kammern mit Tapeband, um eine Austrocknung der Membran nach Anlegen des Vakuums zu verhindern
- Auftragen des Ansatzes wie oben beschrieben, 10 min stehen lassen
- Anlegen des Vakuums, bis alle Proben durch die Membran gezogen sind
- Zugabe von 500 µl 0.4 M NaOH in jede Kammer
- Erneute Vakuumfiltration

Nach dem Blotten der Membran wurde sie aus dem Apparat entfernt, an der Luft angetrocknet und anschließend mit dem „*GS Gene Linker UV Chamber*“ der Firma Bio-Rad gebacken. Dabei wurde das Programm C-L mit einer kumulativen Energie von 125 mJoule gewählt, um die DNA-Stränge auf der Membran mittels UV-Licht zu fixieren.

3.6.2. Hybridisierung

Die Hybridisierung der Membranen gliedert sich in folgende Abschnitte:

a) Prähybridisierung

b) Hybridisierung

c) Posthybridisierung bzw. Waschschritte

a) Prähybridisierung

Für die Prähybridisierung wurden die Membranen in hitzeresistente Kontainer mit Schraubverschlüssen gegeben. Herstellung der Hybridisierungsflüssigkeit:

292.2 mg	EDTA (Endkonzentration: 1mM EDTA)
350 ml	20% SDS (Endkonzentration: 7% SDS)
500 ml	1 M $NaHPO_4$ pH 7.2 (Endkonzentration: 0.5 M $NaHPO_4$)

Das Ganze mit Wasser auf 1 Liter Gesamtvolumen auffüllen.

Pro Membran wurden 10 ml der Hybridisierungsflüssigkeit in den Behälter gegeben, es können auch mehrere Membranen gleichzeitig bearbeitet werden. Der Kontainer wird nun für 15 Minuten bei 50°C in dem Hybridisierungsofen belassen.

b) Hybridisierung

Für die Hybridisierung mußten zunächst geeignete Sonden hergestellt werden. Verwendung fanden synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Firma Interactiva, die bereits bekannten 5´-UTR-Bereichen entsprechen. Sie wurden in einem ersten Schritt radioaktiv gelabelt. Das Labeln der Sonde erfolgte wie alle folgenden Experimente, in denen mit radioaktivem ^{32}P gearbeitet wurde, unter den geeigneten Sicherheitsvorkehrungen.

Für das radioaktive Labeling der DNA-Sonden wird γ-ATP, dessen Phosphor durch radioaktives ^{32}P ersetzt ist, mit Hilfe einer *Phosphonucleotidkinase* an das 5´-Ende der DNA gebunden. Der Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

10,0 µl	Oligonukleotid-Primer
3,0 µl	Puffer für Polynucleotidkinase
1,0 µl	Polynucleotidkinase
4,0 µl	γ-ATP^{32}
12,0 µl	H_2O
30,0 µl	

Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wird er mittels des „*QIAquick Nucleotide Removal Kit*“ der Firma *Qiagen* aufgereinigt. Dabei wurde den Herstellerangaben für radioaktive Proben entsprechend verfahren.
Von der so mit radioaktivem Phosphor versehenen DNA-Sonde werden nun 5 µl in die Hybridisierungsflaschen zu der Hybridisierungsflüssigkeit gegeben und das Ganze bei 50°C für 4 bis 24 h, in der Regel über Nacht, im Hybridisierungsofen belassen.

c) Waschschritte

Bei den Waschschritten gilt es, stufenweise große Teile der vorhandenen Radioaktivität aus der Hybridisierungsflüssigkeit zu entfernen, ohne sie von der Membran abzuwaschen. Es wird je einmal mit Waschlösung A und B (s. Kap. 2.8) für 20 min bei 50°C gewaschen.
Nach Abschluß der Waschschritte sollte die Membran nicht mehr trocken werden, dazu wird sie in eine Plastikfolie eingeschlagen. Zur Autoradiographie wird die Membran für mindestens 72 h auf einen Screen der Firma *Molecular Dynamics* gelegt und sorgfältig verschlossen. Der Screen kann nach Benutzung eradiziert und wiederverwendet werden.
Für die Auswertung des belichteten Screens wurde der *PhosphorImager Storm 860* der Firma *Molecular Dynamics* verwendet.
Falls mit der gleichen Membran weitere Hybridisierungen durchgeführt werden sollen, kann sie mit kochender 0.5%iger SDS-Lösung gestrippt und so von gebundenen Sonden befreit werden.

3.7. DNA-Sequenzierung

Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht mit Modifikationen auf der Methode der automatischen DNA-Sequenzierung nach Sanger [101]. In einer PCR mit nur einem Primer (*cycle-sequencing* Methode) werden fluoreszenzmarkierte 2,3-Didesoxynukleotide – mit unterschiedlichen Farbstoffen für die vier unterschiedlichen Nukleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin und Thymidin – zugegeben, die nach einer gewissen Zeit in jeden Strang eingebaut werden und dort für den Abbruch der weiteren Synthese des DNA-Stranges sorgen, da die 3´-OH-Gruppe für die Ausbildung der Phosphordiesterbindung nicht mehr vorhanden ist. Da dies nach dem Zufallsprinzip an immer unterschiedlichen Stellen passiert, ergibt sich ein Gemisch aus verschieden langen DNA-Strängen, an deren Beginn immer die Primersequenz steht und deren Ende stets mit einem fluoreszensmarkierten Nukleotid endet. Trägt man dieses Gemisch auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel auf und läßt es unter Elektrophoresebedingungen laufen, so kommen wiederum die kleinsten Fragmente

weiter im Gel als die Großen. Das Erkennen der Fluoreszenzfarbstoffe übernimmt ein Laser, der das Gel abtastet, anregt und das von den Farbstoffen emittierte Licht unterschiedlicher Wellenlänge wieder aufnimmt. Anschließend erzeugt ein Computer aus der Information, wie weit jeder DNA-Strang mit einem markierten Nukleotid im Gel gewandert ist, eine Abfolge von Basen, die der ursprünglichen Anordnung im DNA-Strang entspricht.

Die Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung erfolgte mit dem „*Thermo Sequenase™ dye terminator cycle sequencing pre-mix kit*“ der Firma *Amersham*. Als Primer wurden *M13 forward* (T_m=44°C) und *M13 reverse* (T_m=36°C) Primer verwendet, die komplementär zu Sequenzen sind, die auf beiden Seiten der *Multiple Cloning Site* des Vektors liegen.

Ansatz:

8,0 µl	*Sequencing reagent pre-mix*
8,0 µl	DNA-Probe
1,0 µl	Primer (*M13 forward* oder *M13 revers*)
3,0 µl	H_2O
20,0 µl	

Thermocycler-Programm:

1. Schritt:	30 sec	96°C	
2. Schritt:	30 sec	94°C	30x
3. Schritt:	15 sec	45°C	
4. Schritt:	4 min	60°C	
5. Schritt:	∞	4°C	

Für die anschließende Aufreinigung der Proben und Abtrennung der überschüssigen Produkte wurde das „*QIAquick PCR Purification Kit*“ der Firma *Qiagen* verwendet. Die erhaltene Menge von 30 µl Eluat für die Sequenzierung wurde mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge getrocknet, das Pellet in 3 µl *loading dye*-Puffer der Firma *Amersham* resuspendiert. Anschließend wurden die Proben nochmals bei 70°C im Wasserbad denaturiert (2 – 5 min) und waren nun bereit zum Auftrag auf das Polyacrylamidgel (Auftragsmenge 1,5 µl).

Die Herstellung des 5%-igen Polyacrylamidgels erfolgte nach folgendem Ansatz:

31,5	g	Harnstoff
12,6	ml	Acrylamid, 30% / Bis Solution, 29:1
9,0	ml	10x TBE (s. Kap. 2.8)
30,0	ml	dH_2O (Li Chrosolv® Wasser)
450,0	µl	10% APS
45,0	µl	TEMED

Aufgrund der Empfindlichkeit des Lasers war hierbei besonders auf die Vermeidung von Verunreinigungen zu achten. Gleiches gilt für die Säuberung der Glasplatten, zwischen denen das Gel gegossen wird. Sie wurden mehrmals mit Alconox Waschlösung, NaOH und Alkohol gereinigt, bevor das Gel blasenfrei eingebracht wurde. Bis zur vollständigen Polymerisation gilt es etwa eine Stunde zu warten.

Die Elektrophoresebedingungen:

Spannung:	2500 V
Stromstärke:	50 mA
Laser Power:	40 mW
Temperatur:	51°C
Laufzeit:	8,5 h
Run Module:	Run 2x A29/1

Die Elektrophoresekammer und der Laser sind im „*ABI Prism 377 DNA-Sequencer*“ der Firma *Perkin Elmer* zusammengefaßt. Es können bis zu 36 Proben gleichzeitig aufgetragen werden, die maximalen Leseweiten liegen bei dieser Methode zwischen 500 und 800 Nukleotiden. Ebenfalls von der Firma *Perkin Elmer* stammen die zur Aufnahme der Daten und zur Analyse verwendeten EDV-Programme „*ABI Prism Collection Software 1.1*“ und „*Sequence Analysis 3.0*“.

3.8. Northern Blots

Für eine gewebespezifische Analyse des Vorkommens der UTR-Motive wurden Northern Blots mit kommerziellen *Human Multiple Tissue Expression (MTE ™) Arrays* der Firma *Clontech* benutzt. Auf diesen ist die mRNA von 76 verschiedenen menschlichen Geweben sowie 8 verschiedene Kontrollen aufgebracht. Das Labeling der Sonden mit radioaktivem P^{32} erfolgte mit dem *SP6/T7 Transcription Kit* der Firma *Roche*, das besonders für die Verwendung von langen DNA-Fragmenten geeignet ist und sich durch eine hohe Spezifität der erhaltenen RNA-Transkripte auszeichnet. Zur Positionierung der verwendeten Sonden siehe Kapitel 4.6.

3.8.1. Sonden-Herstellung

Die Sonden wurden mit PCR-Technik und Primern der Firma *Interactiva Biotechnologie GmbH* aus den die entsprechenden Exons tragenden Klonen (55, 59, 64) gewonnen. Dabei wurden die Primer so kreiert, dass zwei Sonden mit ca. 250 bzw. 350 nt entstanden, welche Teile des neuen Motives 5UT-Ex8 (Exons 47a-d und 49a-c) abdecken. An die Enden der Primer wurde entweder eine SP6- oder eine T7-Sequenz angehängt und mitamplifiziert, an die bei der anschließenden in-vitro-Transkription die SP6- bzw. T7-Polymerase angreifen konnte. Bei der Herstellung der Sonden via PCR waren einige Versuche notwendig, um die recht unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Primer (T_m zwischen 66°C und 75°C) auf einen Nenner zu bringen.

3.8.2. Sonden-Markierung

Die mittels PCR erstellten Sonden wurden mit dem *SP6/T7-in-vitro-Transkiptions-Kit* der Firma *Roche* gelabelt. Dabei beginnt je nach Ansatz eine SP6- oder eine T7-Polymerase mit der Ablesung der Stränge in 3´-Richtung und der Transkription eines neuen Stranges, so dass zumindest in einem Ansatz in die amplifizierte Sequenzen hineingelesen wird. Bei der Transkription werden neben den Nukleotiden dATP, dUTP und dGTP auch die mit P^{32} radioaktiv markierten $dCTP^{32}$-Nukleotide in den entstehenden Strang eingebaut.

Der Ansatz für die Markierung der Sonden mittels Transkription:

2,0 µl	10x Puffer
2,0 µl	DNA-Sonde (PCR-Produkt)
3,0 µl	dNTP-Mix (Verhältnis dATP : dUTP : dGTP = 1 : 1 : 1)
2,5 µl	[α^{32}P] CTP
1,0 µl	SP6- oder T7-Polymerase
1,0 µl	*RNA-Inhibitor RNasin*
8,5 µl	H_2O
20,0 µl	

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte ein DNA-Verdau mit 2,0 µl *DNAse I* (wiederum Inkubation für 30 min bei 37°C) und das Abstoppen der Reaktion mit 2,0 µl 0,2 M EDTA. Die so erhaltenen Proben wurden mit dem „*Nucleotide removal Kit*“ der Firma *Qiagen* von überschüssigen Nukleotiden getrennt.

Zur Kontrolle der inkorporierten Menge an Radioaktivität wird nun eine Messung mit 1,0 µl des Eluats mit dem „*Liquid Szintillation Analyzer (TriCarb 2100 TR*)“ der Firma *Canberra-Packard* durchgeführt.

3.8.3. Hybridisierung

Als Hybridisierungslösung wurde die mitgelieferte Lösung „*ExpressHyb*“ der Firma *Clontech* verwendet und mit 1,5 mg (159,6 µl) *sheared salmon testes DNA* der Firma *Sigma* versetzt, welche die Hybridisierungsreaktion effektiver gestaltet. Von den 15 ml eingesetzter Lösung wurden 10 ml zur Prähybridisierung der Arrays benutzt (30 min bei 65°C). Gleichzeitig wird die Hybridisierung mit folgendem Ansatz vorbereitet:

30,0 µl	C_0t-1 DNA (Sigma)
16,0 µl	*salmon testes* (150 µg)
50,0 µl	20x SSC (s. Kap. 2.8)
55,0 µl	gelabelte Probe
49,0 µl	H_2O
200,0 µl	

Nach einem weiteren Denaturierungsschritt mit Erhitzen des Ansatzes auf 95°C für 5 min wird er anschließend für 30 min bei 68°C inkubiert. Nun erfolgt die Entfernung der Prähybridisierungslösung aus dem Kontainer und die Zugabe der restlichen 5 ml *ExpressHyb* mit 200 µl der gelabelten Probe.

Im Hybridisierungsofen wird der Blot mindestens 6 h, in der Regel über Nacht belassen.

3.8.4. Waschen

Die Waschschritte werden mit zwei verschiedenen Waschlösungen (→ 2.8) durchgeführt:

4x Waschen mit Waschlösung I bei 65°C für 20 min

2x Waschen mit Waschlösung II bei 55°C für 20 min

Unmittelbar nach dem letzten Waschschritt werden die Membranen in Plastikfolie gehüllt, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.8.5. Exponieren

Nach dem Waschen werden die hybridisierten Blots zunächst bei –80°C auf einem *Phosphorscreen* exponiert (18-24h) und dieser anschließend mit dem *PhophorImager „Storm 860“* der Firma *Molecular Dynamics* betrachtet. Danach erfolgt die Exponation auf Filmen der Firma *Kodak* (1 h, 3 h und 6 h, ebenfalls bei –80°C) und deren Entwicklung mit dem *Hyperprocessor* der Firma *Amersham Pharmacia*. Der Vorteil in der primären Exponation auf Phosphorscreens liegt in deren Darstellung einer größeren Linearität von Graustufen (10^5 im Vergleich zu 10^2 bei den Filmen). So kann eine bessere erste Aussage über das Gelingen der Hybridisierung gemacht werden.

3.8.6. Wiederverwendung der Membranen

Zur wiederholten Verwendung der *Human Multiple Tissue Expression (MTE ™) Arrays* ist es notwendig, die hybridisierten Sonden von den Membranen zu entfernen. Dazu wird 0,5%ige SDS-Lösung zum Kochen gebracht und die Blots hineingegeben. Nach 5-10-minütigem Kochen soll die Lösung mit den Membranen abkühlen. Der Erfolg der Reinigung wird grob mit einem ß-/y-Detector geprüft, bei vorhandener Restradioaktivität wird das Strippen wiederholt. Zur Kontrolle werden die Membranen nochmals auf einem Phosphorscreen bei –80°C exponiert.

Die gestrippten Membranen können wiederverwendet oder bei –20°C für einige Zeit gelagert werden.

4. Ergebnisse

4.1. RACE

Die zur Amplifikation von cDNA-Abschnitten der 5´-UTR durchgeführte RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) brachte mit Anwendung einer *Touchdown-PCR* gute Ergebnisse, was auch daran lag, dass die Schmelztemperaturen der Primer ähnlich waren. Ob die rechnerisch ermittelte Schmelztemperatur auch der realen optimalen Bindungstemperatur während der PCR entspricht, ist schwer vorherzusagen, da dort verschiedene Einflüsse eine Rolle spielen. So hat der wichtige AP1-Primer eine Schmelztemperatur T_m von 71°C, allerdings liegt seine effektive Schmelztemperatur einige Grade niedriger, da von 27 bp nur 22 bp auch wirklich binden. Die Schmelztemperaturen der genspezifischen Primer lagen bei 70°C (Ex 2) bzw. 72°C (Ex 3, 6, 11). Nur da die effektive Schmelztemperatur von AP1 etwas unter jener der genspezifischen Primer liegt, konnte das Prinzip der *Touchdown-PCR* funktionieren.

Die Ergebnisse der RACE nach Darstellung mittels Gelelektrophorese:

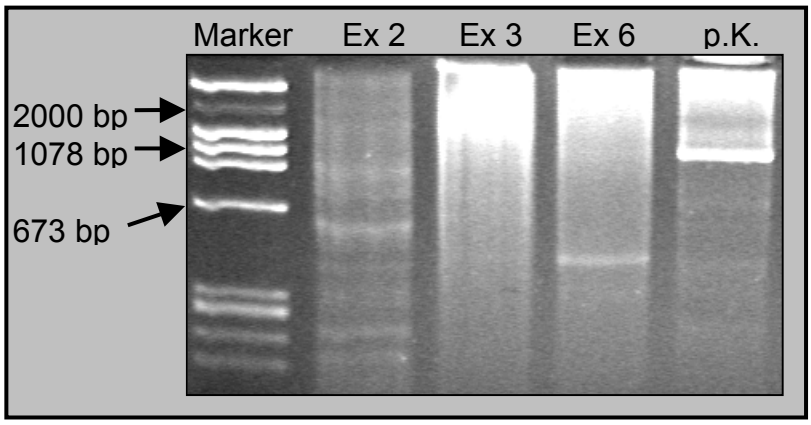

Abbildung 6 Ergebnisse der RACE mit Primern in den Exons 2, 3 und 6 in der Gelelektrophorese (Marker: *„Lambda Hind III*“, wichtige Größen sind angegeben; Ex2: Primer in Exon 2; Ex 3: Primer in Exon 3; Ex 6: Primer in Exon 6; p.K.: Positivkontrolle G3PDH-Primer von *Clontech*, der eine Bande bei 1009 bp erzeugt; bp: Basenpaare)

Wie man erkennt, liefert die Gelelektrophorese für die RACE-Produkte mit den Primern Ex 2 und Ex 6 differenzierbare Banden, wohingegen der Primer Ex 3 keine Bande zeigt. Für Ex 2 ist eine Bande bei ca. 550 bp zu erkennen, weitere Banden bei 200 bp und 300 bp. Dies spricht dafür, dass in dem Ansatz mehrere unterschiedlich lange Fragmente enthalten sind, die sich alle an das Exon 2 in der 5´-UTR anschließen. Dagegen ist beim Ex 6 nur eine Bande bei ca. 500 bp zu erkennen. Der als Positivkontrolle verwendete Primer für eine Gensequenz der G3PDH wurde von der Firma *Clontech* mitgeliefert und zeigt eine solitäre Bande bei 1009 bp.

Die Durchführung einer *nested-PCR* brachte keine weitere Verbesserung der Ergebnisse, allerdings wurde auch darauf verzichtet, nochmals neue genspezifische reverse Primer weiter im spezifischen Bereich zu erstellen. Dadurch wurde also eine *nested-PCR* mit dem AP2-Primer und dem alten genspezifischen Primer durchgeführt.
Da das Ergebnis vergleichbar war, wurden von beiden Ansätzen Ligationen durchgeführt, sie wurden beide transformiert und in verschiedenen Konzentrationen plattiert.
Verwendung bei der Transformation fanden *„Epicurian Coli XL2-Blue MRF` Ultracompetent Cells*“ der Firma *Stratagene*. Da der Hersteller ausdrücklich darauf hinweist, dass eine blau/weiß-Selektion mit Galaktosidase erst ab Insertgrößen von 1500 bp sinnvoll ist, wurde hierauf verzichtet. Dies brachte jedoch zunächst das Problem mit sich, dass im weiteren Verlauf die Kolonien unspezifisch ohne Hinweis auf enthaltene Inserts verwendet werden mußten. Es wurden also größere Mengen von Übernachtkulturen angelegt, insgesamt 238 aus den RACE-Ansätzen mit dem Primer Ex 2, 50 aus den RACE-Ansätzen mit dem Primer Ex 6.

4.2. DNA-Restriktion

Zur Identifizierung enthaltener Inserts wurde ein Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease EcoR I durchgeführt. Dabei wird ein Nukleotidstrang von diesem Enzym immer dann durchschnitten, wenn ein Doppelstrang die Palindromsequenz GAATTC aufweist. Die Plasmide der verwendeten E.coli-Zellen enthalten auf beiden Seiten der inserttragenden *Multiple Cloning Site* eine solche Schnittstelle. Trägt man den Restriktionsansatz auf ein Elektrophoresegel auf, so sollten bei vorhandenem Insert immer mindestens zwei Banden erscheinen. Die eine mit unterschiedlichen Größen (in diesen Versuchen zwischen 100 und 600 bp) entspricht dem Insert, die andere in der Größe von 3900 bp dem restlichen Vektor. Allerdings ist es auch möglich, dass mehrere Banden im kleineren Bereich auftreten, dies ist dann der Fall, wenn innerhalb des Inserts noch Eco-R-I-Schnittstellen mit der Sequenz GAATTC vorhanden sind.
Da mit dem Restriktionsverdau keine Aussage über die Qualität der enthaltenen Inserts zu machen ist, abgesehen von der ungefähren Insertgröße, wurde diese Methode mit Einführung der Dot-Blot-Methode (→ 4.3) verlassen.
Dennoch sei in der Abbildung 7 auf der folgenden Seite eine beispielhafte Darstellung eines solchen Restriktionsverdaus gegeben.

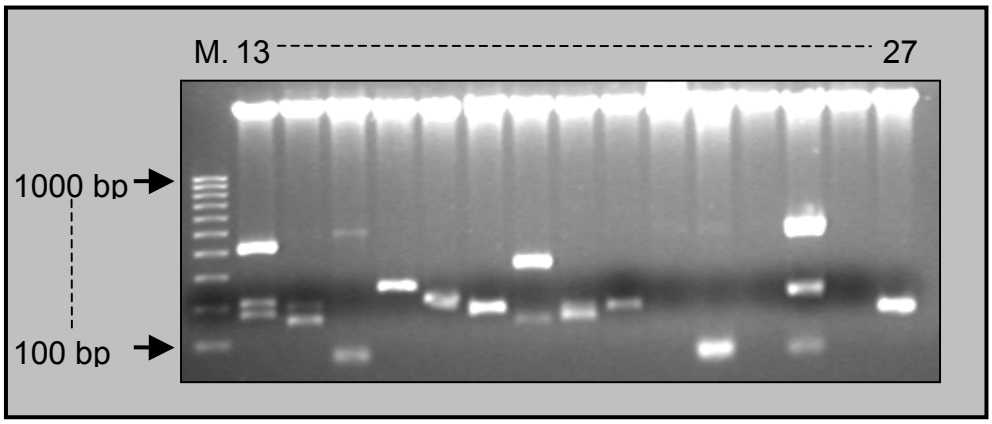

Abbildung 7 Restriktionsverdau mit EcoR I Der Restriktionsverdau zeigt einige Klone mit mehr als zwei Inserts, diese enthalten interne Eco-R-I-Schnittstellen. (M.: *Marker 100 bp*, Banden im Abstand von 100 bp zwischen 1000 bp und 100 bp; 13-27: Klone aus RACE mit Primer Nr. 2; bp: Basenpaare)

4.3. Identifizierung von Inserts mittels DotBlot

Die Identifizierung von inserttragenden Klonen mittels Restriktionsverdau wurde nach einiger Zeit durch Einführung der DotBlot-Methode abgelöst. Damit war es möglich, bis zu 96 Proben pro Membran auf den Gehalt von spezifischen Sequenzen zu überprüfen. In der Praxis erwies es sich als außerordentlich hilfreich, die Klone vor der weiteren Verwendung auf Inserts zu screenen und anschließend nur ausgewählte Klone weiter zu bearbeiten und zu sequenzieren. Die Lage der Sonden wurde so gewählt, dass sie weiter im spezifischen Bereich binden als die Syntheseprimer, jedoch am gleichen Exon. Diese Lokalisation sollte sicherstellen, dass es nur in solchen Fällen zu einem positiven Signal kommt, in denen der DNA-Strang über den Primer hinaus in gewünschter Richtung weiter synthetisiert wurde. Da jedoch dieser Bereich der Sonde beispielsweise bei dem Exon 2 nur neun von insgesamt 28 Nukleotiden umfaßte, ist auch die Möglichkeit der Bindung an Sequenzen nicht auszuschließen, in denen das Exon 2 nicht korrekt fortgesetzt wurde.

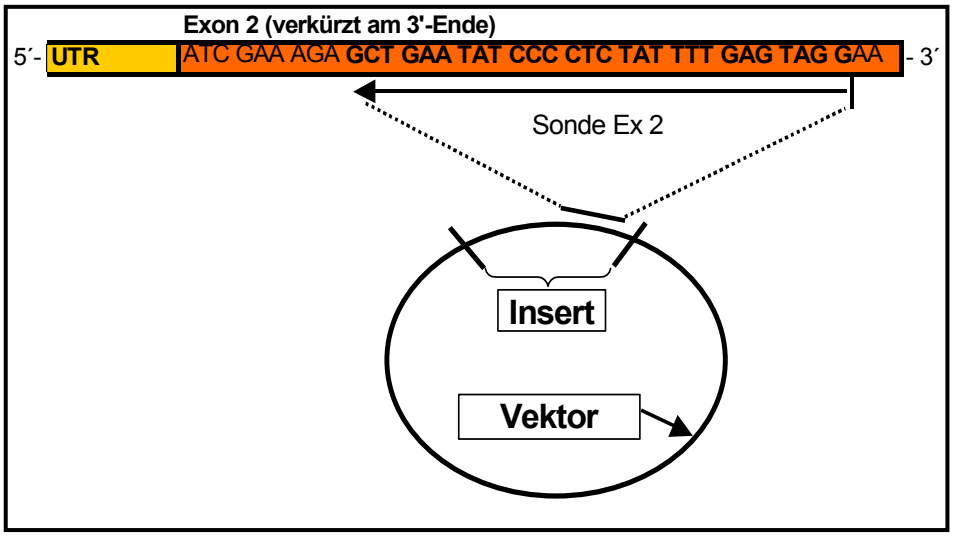

Abbildung 8 Bindung der Sonde Ex 2 im DotBlot Die Sonde Ex 2 bindet nur an Klone, die ein Insert mit dem Exon 2 tragen. Klone ohne oder mit anderen Inserts werden nicht erkannt. (UTR: Untranslatierte Regionen)

Die Bindung der DotBlot-Sonden an die im Vektor lokalisierten Inserts illustriert die Abbildung 8 auf der vorhergehenden Seite.

Sequenzen, die durch Synthese aus dem Primer Ex 2 entstanden, wurden mit der Sonde Ex 2 untersucht, einige von ihnen zusätzlich noch auf die Existenz von Exon 6. Es ergab sich eine genaue Übereinstimmung mit den späteren Ergebnissen der Sequenzierung.

Einen Vergleich zwischen dem Auftrag von 50 µl einer Übernachtkultur gegenüber dem Auftrag von 10 µl aufgereinigter DNA gibt die Abbildung 9. Dieser Versuch erleichterte die folgende Arbeit insofern, dass vergleichbare Ergebnisse mit aufgereinigter DNA wie mit kompletten Übernachtkulturen zu erzielen waren, so dass die Aufreinigung mittels *MiniPrep* auf die Klone beschränkt werden konnte, die im DotBlot ein positives Signal lieferten. Hybridisiert wurde mit der Sonde Ex 2.

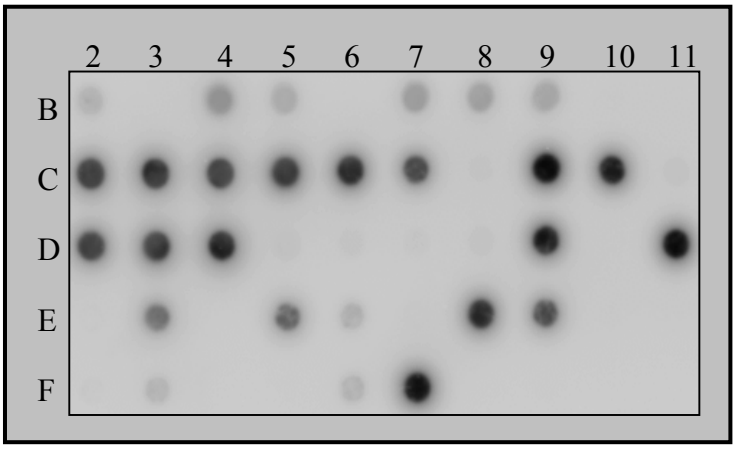

Abbildung 9 Vergleich von Übernachtkulturen und aufgereinigten Proben im DotBlot Übernachtkulturen (Auftragsvolumen 50µl, B2-B11) gegenüber aufgereinigten DNA-Proben (Auftragsvolumen 10µl, C7-D6). Es zeigen sich qualitativ vergleichbare Ergebnisse bei quantitativ unterschiedlichen Signalen. F7: Positivkontrolle mit 5 µl DNA (Klon UA4), F8: Negativkontrolle mit 50 µl H_2O.

Zwei andere Blots (s. Abb. 10) zeigen die Aussagekraft des Verfahrens zur Erkennung von besonders interessanten Klonen schon vor der Sequenzierung.

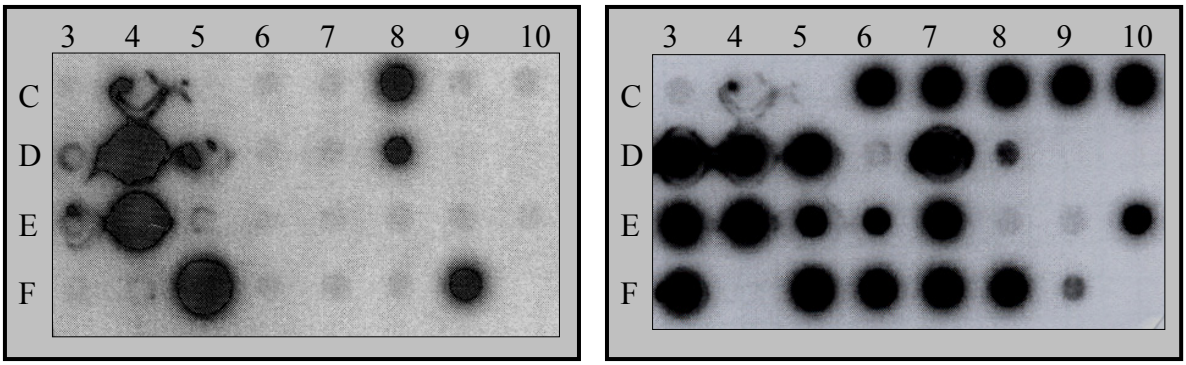

Abbildung 10 Hybridisierung mit den Sonden Ex 2 und Ex 6 im DotBlot Die gleiche Membran wurde erst mit der Sonde Ex 6 hybridisiert (links), danach mit der Sonde Ex 2 (rechts). Die Positivkontrolle in F9 wurde mit dem Klon L7 durchgeführt, der das Exon 6 enthält. Deswegen schwaches Signal der Positivkontrolle in Blot 2 (Restaktivität); F10 Negativkontrolle mit H_2O.

Hybridisiert wurde zunächst mit der weniger spezifischen Sonde Ex 6, danach mit der Sonde Ex 2. Während es bei Auftrag von Sonde Ex 6 fünf positive Signale gibt, ergeben sich bei Hybridisierung mit der Sonde Exon 2 noch 16 weitere positive Signale. Alle Signale, die im zweiten Blot erscheinen, im ersten jedoch nicht, stellen folglich Klone dar, die zwar mit dem Exon 2 starten, aber anders als mit Exon 6 fortgeführt werden, so dass hier die Wahrscheinlichkeit höher ist, dass es sich um neue Sequenzen handelt. Somit sind diese Klone besonders interessant für die Sequenzierung, es wurden aber auch ausgewählte wietere Klone sequenziert, sowohl zur Kontrolle, als auch um sicher zu gehen, dass nicht über das bekannte Exon 6 hinaus noch weitere unbekannte Exons zu finden sind.

Ein Problem zeigte sich bei Blots von Klonen aus der RACE mit Primer Nr. 6. Hier gab es kein einziges positives Signal, auch und vor allem nicht bei Hybridisierung mit der Sonde Ex 6. Dies spricht dafür, dass der Primer Nr. 6 schon bei der RACE nicht an der gewünschten Stelle gebunden hat und stattdessen andere Sequenzen amplifiziert wurden. Diese Vermutung bestätigte sich bei der Sequenzierung der entsprechenden Klone (→ 4.4), und ein Homologievergleich mit veröffentlichten Sequenzen mittels BLAST [2] (→ 4.5) ergab eine nahezu 100%ige Homologie mit der mRNA eines spannungsabhängigen Na^+-Kanals, der ubiquitär in menschlichen Zellen vorkommt. Somit konzentrierten sich also die weiteren Untersuchungen auf die Klone, die mit Primer Nr. 2 gewonnen wurden.

4.4. Sequenz-Analyse

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit etwa 200 Klone sequenziert, zunächst unspezifisch, später selektiert nach Ergebnissen im DotBlot. Die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigten die zu Beginn der Arbeit geäußerte Erwartung, mit Hilfe von Primern weit im spezifischen 5´-UTR-Bereich neue untranslatierte mRNA-Bereiche benennen zu können. Im Wesentlichen lassen sich die Ergebnisse der Sequenzierung und des anschließenden Homologievergleichs mit bereits bekannten Sequenzen in drei Unterpunkte gliedern:

a) Neue 5´-UTR-Sequenzen
b) Bekannte Exons in neuen Kombinationen
c) Modifikationen von bekannten Exons und Exongrenzen

Die bereits beschriebenen Exons beziehen sich auf veröffentlichte Sequenzen [81,105, 106]. Es soll in der oben angegebenen Reihenfolge zunächst auf die neuen Sequenzen eingegangen werden. Eine prinzipielle Herausforderung bei der Untersuchung der 5´-UTR ist die komplexer werdende Nomenklatur, die sich durch immer detaillierter werdende Kenntnisse dieser Regionen ergibt. Durch die Identifikation der meisten bisher beschriebenen 5´-UTR-Exons auf genomischer Ebene ergibt sich die Gelegenheit, die Nomenklatur zu vereinheitlichen und die Informationen zu straffen (→ 4.5.2). Allerdings wurden in den zunächst folgenden Kapiteln dieser Arbeit die alten Numerierungen aus Gründen der direkten Vergleichbarkeit noch beibehalten, es wird jedoch bei jeder Darstellung auf die neue Benennung im Kapitel 4.5.2 verwiesen.

a) Neue 5´-UTR-Sequenzen

Bei den in dieser Arbeit neu beschriebenen Sequenzen handelt es ich um eine Reihe von Exons bzw. möglichen Exons der 5´-UTR des Glutamattransporters EAAT2, die sich im Wesentlichen zu zwei Isoformen zusammenfassen lassen. Dabei enthält jede Isoform mehrere neue Exons, deren Fragmente unterschiedlich lang sind in verschiedenen Klonen, die jedoch immer im gleichen Kontext erscheinen. Die Numerierung der Isoformen (13 und 15) sowie der einzelnen Exons (47a-d, 48, 49a-c) erfolgte in Fortführung der bereits veröffentlichten Sequenzen.

In den folgenden Abbildungen sind Stopkodons (TAA, TGA und TAG) blau markiert, Startkodons (ATG) rot. Auf die verschiedenen Startkodons und ihr Umfeld, das für die Ablesewahrscheinlichkeit wichtig ist, wird weiter unten eingegangen.(→ 4.5.1)

Anteile der Isoform 15 fanden sich in insgesamt 17 Klonen, wobei nur die Klone 43 und 52 die ganze Länge des Exons zeigen (s. Abb. 11). Den Unterschied zur Isoform 13 (s.u.) markieren die 30 Nukleotide des Exons 48 (5UT-Ex12). Für die Exons 47 und 49 gelang die Aufklärung der genomischen Organisation, sie bilden mit dem Exon 2 das neue Exon 5UT-Ex8. Dagegen steht dieser Schritt für das Exon 48 noch aus, es erhält vorbehaltlich die Bezeichnung 5UT-Ex12. Die Klone mit Teilen der **Isoform 15** im Überblick:

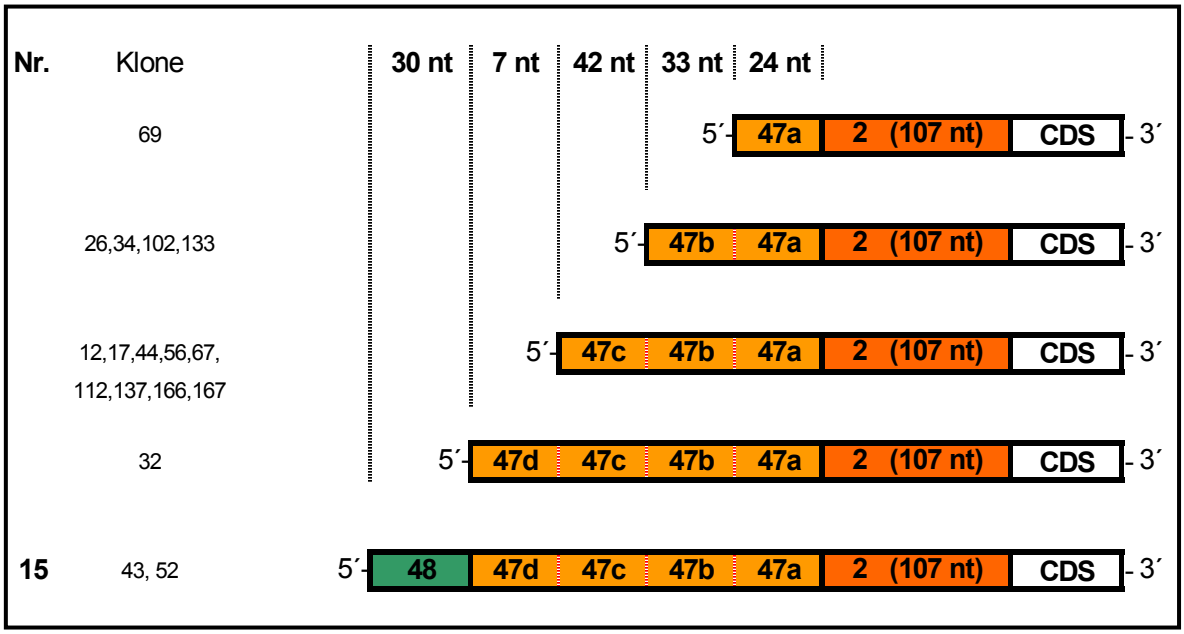

Abbildung 11 Aufbau der Isoform 15 Darstellung der Isoform 15 und der betreffenden Klone. Das Exon 2 ist Teil des genomischen Exons 5UT-Ex8, ebenso wie Exon 47a-d. Das Exon 48 findet sich in dem genomischen Klon nicht, es erhält vorbehaltlich die Bezeichnung 5UT-Ex12. CDS: *coding sequence*, nt: Nukleotide

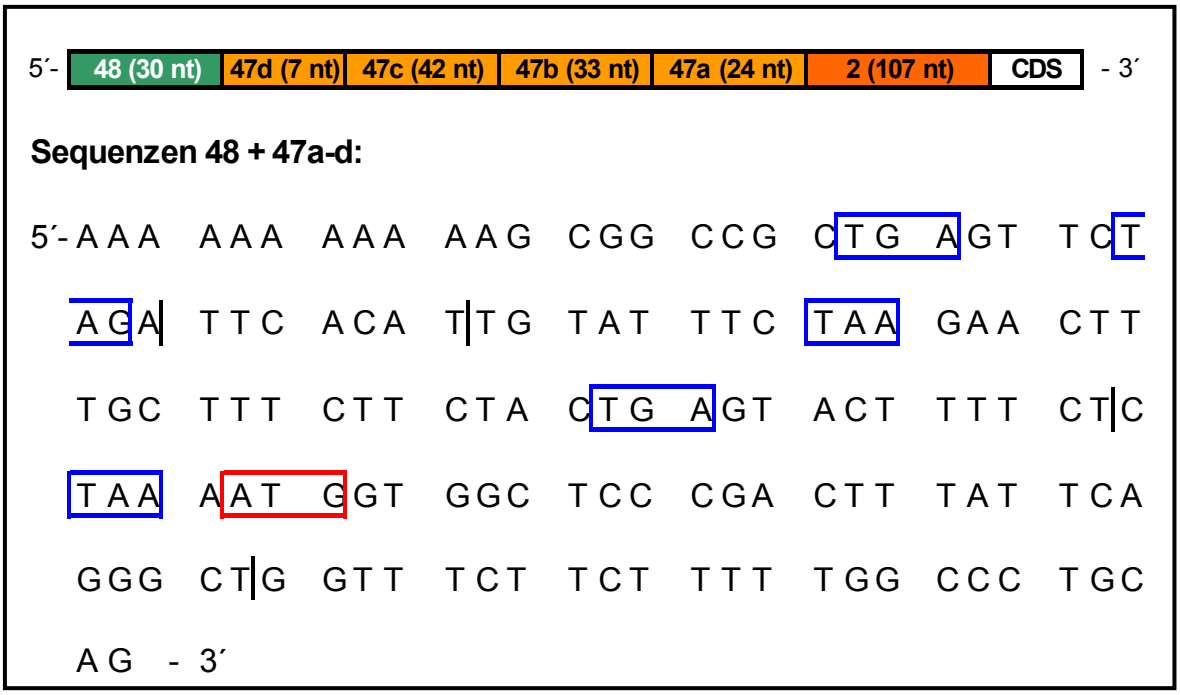

Abbildung 12 Sequenzen der Isoform 15 mit den Exons 47 (Teil von 5UT-Ex8) und 48. Das Motiv enthält 5 Stopkodons (blau) und ein uATG (rot), das aufgrund seines Umfeldes eine hohe Ablesewahrscheinlichkeit besitzt und einen uORF mit 66 Nt ergibt (s. Kap. 4.5.1). (CDS: *coding sequence*, nt: Nukleotide)

Tabelle 1 Besonderheiten der Isoform 15 in einzelnen Klonen (nt: Nukleotide)

Klon	Besonderheiten	Klon	Besonderheiten
32	in 47a T statt C in Pos. 22 Konsequenz: Stopkodon **TAG**	56	in 47c G statt A in Pos. 4
44	47c auf 7 nt verkürzt	167	47c auf 29 nt verkürzt

Während die Isoform 15 mit dem Exon 48 ein Motiv enthält, für das sich bisher kein Äquivalent auf genomischer Ebene findet, stellt die Isoform 13 zusammen mit dem Exon 2 eine 552 Nukleotide umfassende Einheit dar, die sich zusammenhängend auf einem genomischen Klon findet. Teile der **Isoform 13** fanden sich in 10 Klonen:

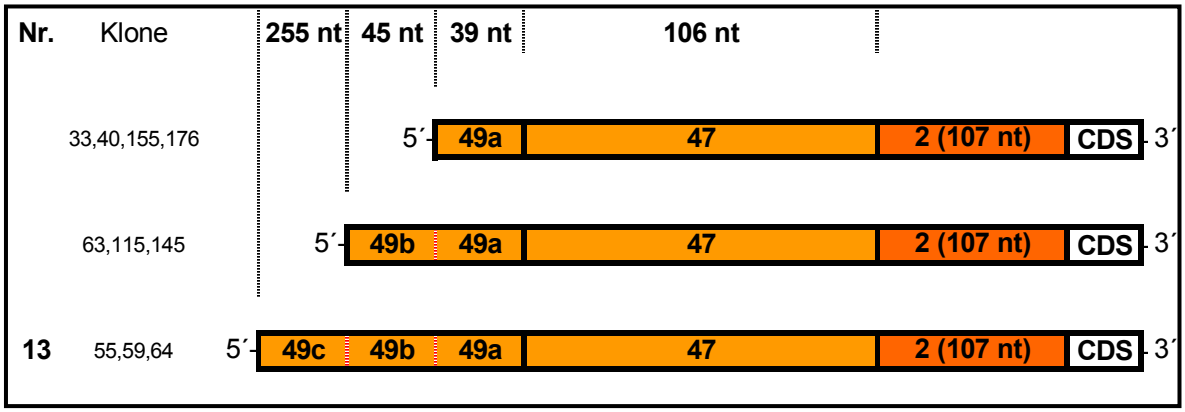

Abbildung 13 Aufbau der Isoform 13 Darstellung der Isoform 13 und der betreffenden Klone Sie setzt sich zusammen aus den Exons 2, 47 und 49 und enspricht in ihrer vollen Länge dem genomischen Exon 5UT-Ex8. (CDS: *coding sequence*, nt: Nukleotide)

Tabelle 2 Besonderheiten der Isoform 13 in einzelnen Klonen (nt: Nukleotide)

Klon	Besonderheiten	Klon	Besonderheiten
40	49a verkürzt auf 36 nt	64	49c: T statt C in Pos. 2 49c: T fehlt in Pos. 31 49c: T statt G in Pos. 83
55	49c beginnt mit ATTTGT... 49c: T fehlt in Pos. 31	155	49a verkürzt auf 27 nt

Die Sequenzen der Isoform 13 sind auf der folgenden Seite dargestellt (s. Abb. 14). Aus den dargestellten Daten wird deutlich, dass für die Interpretation der Exongrenzen dem Exon 48 eine entscheidende Rolle zukommt, da seine Existenz eine Exongrenze zwischen Exon 47 und 49 wahrscheinlich macht. Wenn auch dieses Exon noch nicht auf genomischer Ebene lokalisiert werden konnte, gibt es doch im Moment keinen zwingenden

Hinweis darauf, dass es sich um einen Artefakt handelt, so dass hier zunächst alle Versionen dargestellt werden.

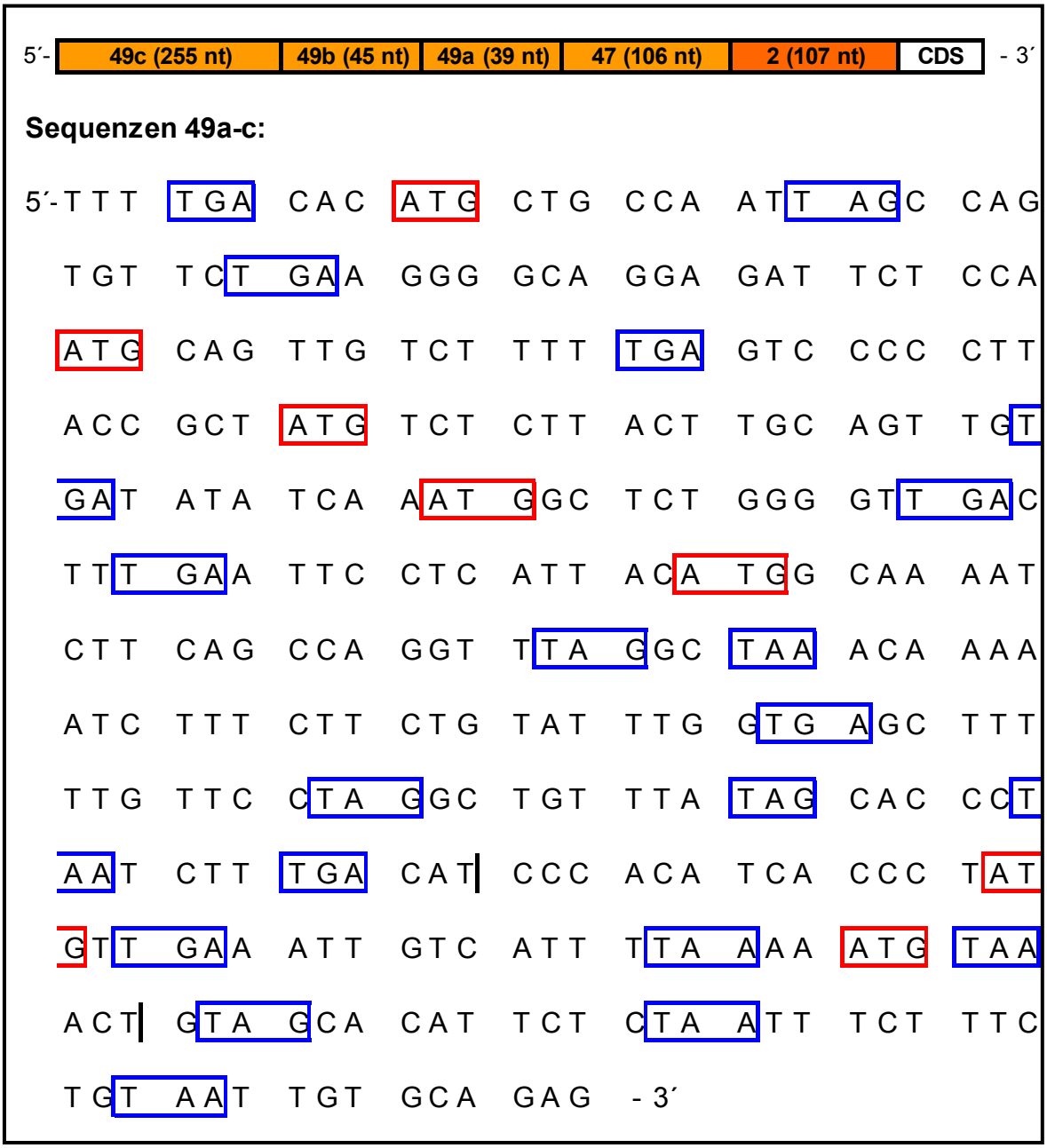

Abbildung 14 Sequenzen der Isoform 13 Das Exon 49 als Teil der Isoform 13 (5UT-Ex8). Dieses Exon enthält 20 Stopkodons (blau) und 7 uATG (rot, s. Kap. 4.5.1). (CDS: *coding sequence*, nt: Nukleotide)

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass mit der vorliegenden Arbeit acht neue Sequenzmotive der 5´-UTR des Glutamattransporters EAAT2 beschrieben werden. Sie erstrecken sich über insgesamt 475 Nukleotide bei einzelnen Längen zwischen 7 und 255 nt. Inwieweit die Grenzen der Motive auch Exongrenzen entsprechen, müssen künftige Untersuchungen zeigen. Die genomische Organisation zeigt die neuen Sequenzen in direkter Nachbarschaft des Exons 2, in dem die Primer für die RACE lokalisiert waren. Einige der beschriebenen

Bereiche haben ein hohes Vorkommen an Start-und Stopkodons. Deren Analyse und mögliche Bedeutung werden weiter unten behandelt (s. Kap. 4.5.1).

b) Bekannte Exons in neuen Kombinationen

Schon früher wurde beschrieben, dass es im Bereich der untranslatierten Regionen des Glutamattransporters EAAT2 eine überraschende Vielfalt an Exons mit sehr variablen Kombinationsmöglichkeiten gibt. Diese Beobachtung wird in dieser Arbeit bestärkt. Im Anschluß an die Sequenz des Exons 2 mit dem dort positionierten Primer folgen zahlreiche Exons, die schon beschrieben wurden, jedoch nicht im Anschluß an Exon 2. Sie folgten zuvor entweder direkt auf die CDS oder auf andere Exons. Dabei hat die Kombinationsvielfalt auch ihre Grenzen: Die Aneinanderreihung muß immer in der Reihenfolge der Exons auf der DNA bleiben, so dass die verschiedenen Kombinationen durch Auslassung von bestimmten DNA-Bereichen entstehen. So war die Abfolge der Exons immer gleich, es wurde kein einziger Klon gefunden, in dem diese prinzipielle Anordnung verlassen worden wäre. Auf die Darstellung der einzelnen Sequenzen wird hier verzichtet, solange sie nicht von den Originalsequenzen abweichen (→ c)). Diese können in den zitierten Arbeiten nachgelesen werden.

Es fanden sich bekannte Exons in neuer Reihenfolge in 30 Klonen:

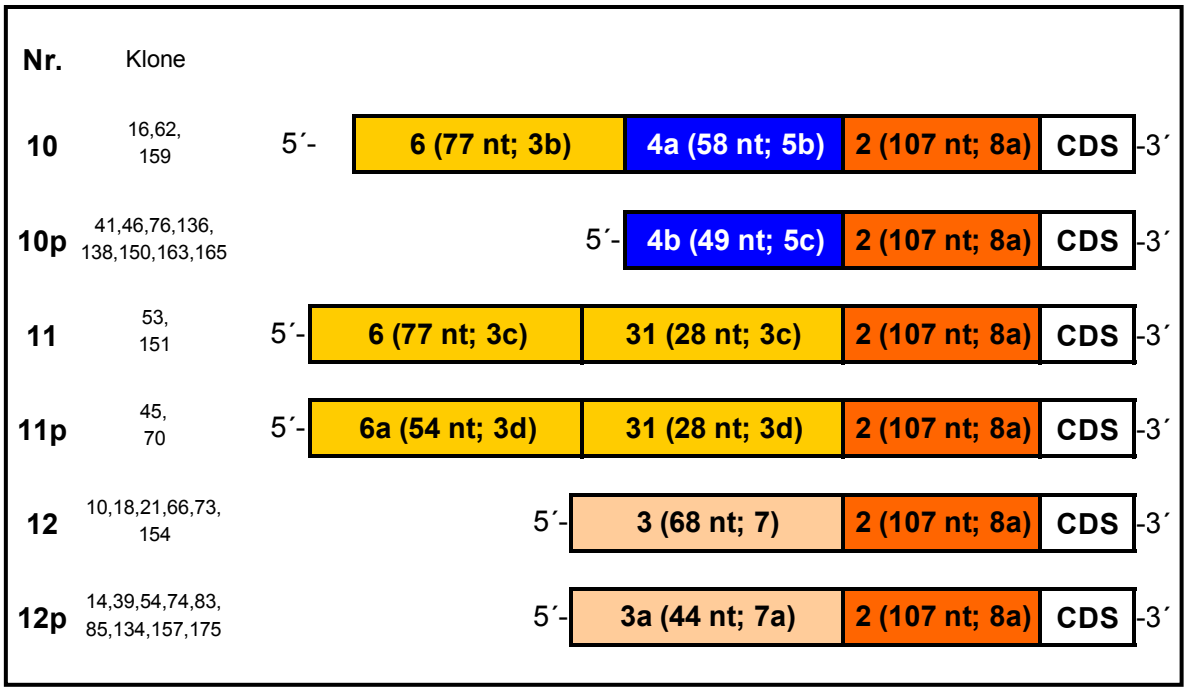

Abbildung 15 Neue Kombinationen von bekannten Exons Die Nummern bezeichnen die Isoformen, ein p hinter der Nummer eine verkürzte Form. Jeweils in Klammern angegeben sind die Länge des Exons und die Bezeichnung in der neuen Nomenklatur, die sich an der genomischen Organisation orientiert (→ 4.5.2). (CDS: *coding sequence*, nt: Nukleotide)

Tabelle 3 Besonderheiten in Klonen mit zuvor beschriebenen Exons (nt: Nukleotide)

Klon	Besonderheiten	Klon	Besonderheiten
16	in Ex 4a: C statt T an Pos. 12	109	in Ex 6a: A statt G an Pos. 27 in Ex 6a: C statt G an Pos. 30 in Ex 4a: G statt C an Pos. 7
21	in Ex 3: C statt T an Pos. 41	136	in Ex 4b: T statt G an Pos. 15
46	in Ex 4b: C statt G an Pos. 15	157	in Ex 3a: T statt G an Pos. 44
53	in Ex 9a: A statt C an Pos. 1	165	in Ex 4b: T statt G an Pos. 43 → dadurch entsteht **ATG**-Kodon
73	in Ex 3: G statt A an Pos. 21		

In einigen Sequenzen gibt es Abweichungen von den bisher veröffentlichten Basenabfolgen, diese werden im nächsten Kapitel näher dargestellt. Abgesehen davon scheint es aber in weiteren Fällen auch an bestimmten Positionen unterschiedliche Varianten zu geben, auch darauf wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

c) Modifikationen von bekannten Exons und Exongrenzen

Die in dieser Arbeit gefundenen, schon früher veröffentlichten Exons der 5´-UTR des Glutamattransporters EAAT2 stimmen in einigen Details nicht mit den bisher publizierten Sequenzen überein, so dass die hypothetischen Exongrenzen von einzelnen Exons an dieser Stelle modifiziert werden sollen.

In der vorliegenden Arbeit erschienen verschiedene Exons in einer verkürzten Form. Zum Teil sind diese Sequenzen schon in früheren Arbeiten in einer kurzen Form publiziert worden und später aus Gründen der Vereinfachung zusammengefaßt worden. Bei der Numerierung wird die zuletzt gültige Nummer des Exons beibehalten und verkürzte Formen mit kleinen Buchstaben (z.B. 4a, 4b,...) gekennzeichnet. Die Sequenzen der ursprünglichen Exons werden zur besseren Übersicht noch einmal dargestellt und die Ansatzstellen der verkürzten Varianten mit Pfeilen markiert. Abweichungen von den ursprünglichen Sequenzen sind fett markiert. Auch hier wird an den entsprechenden Stellen auf die neue Nomenklatur im Kapitel 4.5.2 verwiesen.

Das **Exon 4** (früher: Exons 15, 18 und 4) findet sich in insgesamt 11 Klonen:

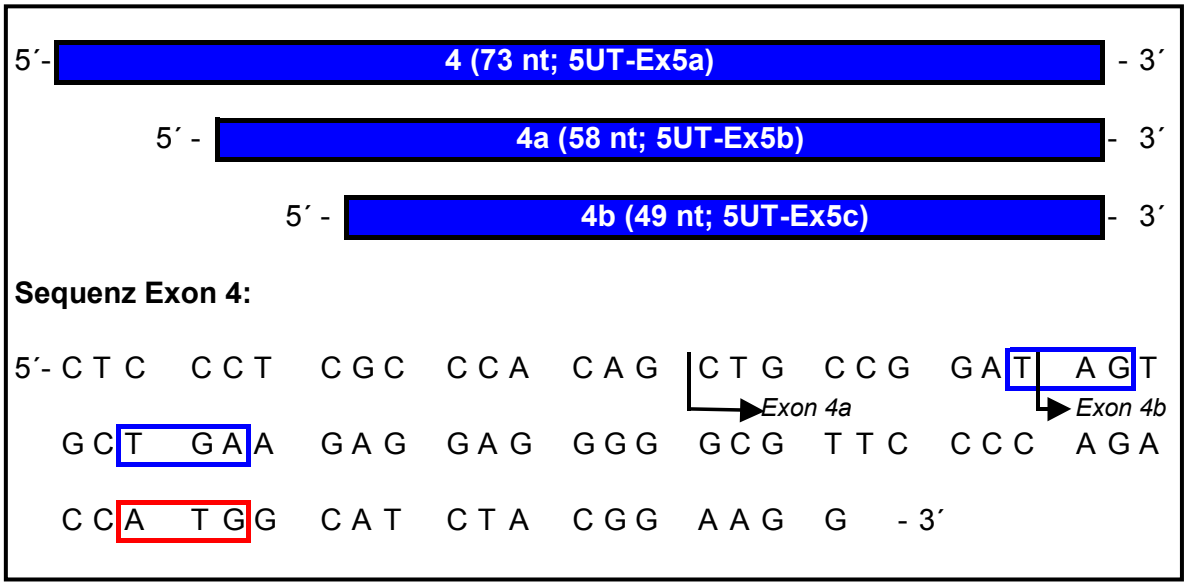

Abbildung 16 Aufbau und Sequenzen des Exons 4 Exon 4 findet sich in den Isoformen 10 und 10p, wobei letztere eine Verkürzung der ersten darstellt. Es gehört zu den Exons, die innerhalb ihrer Sequenz alternative Spleißstellen aufzuweisen scheinen, es finden sich verkürzte Exons mit 58 und 49 nt (s. Übersicht Abb. 15, S. 43). Exon 4 findet sich in einem DNA-Klon zusammen mit Exon 14 als Teil des genomischen Exons 5UT-Ex5. (nt: Nukleotide)

Das Exon 4 findet sich nie in seiner vollen Länge, sondern nur in einer um 15 nt und einer um 24 nt verkürzten Form. Beide stimmen mit keiner früher veröffentlichten Sequenz überein. Während die letztere ausschließlich in der Isoform 10p als verkürzte Variante im Anschluß an Exon 2 auftritt, wird die erste Form als Isoform 10 stets von den Exons 6a und 9a gefolgt. Dieses Exon enthält ein uATG sowie ein weiteres im Klon 165, das durch einen Basenaustausch an Position 43 (T statt G) entsteht (s. Tab. 3, Seite 44).

Das **Exon 6** (früher Exons 21, 19, 9 und 6) wird ebenfalls nie in seiner zuletzt veröffentlichten kompletten Form mit 90 nt angetroffen:

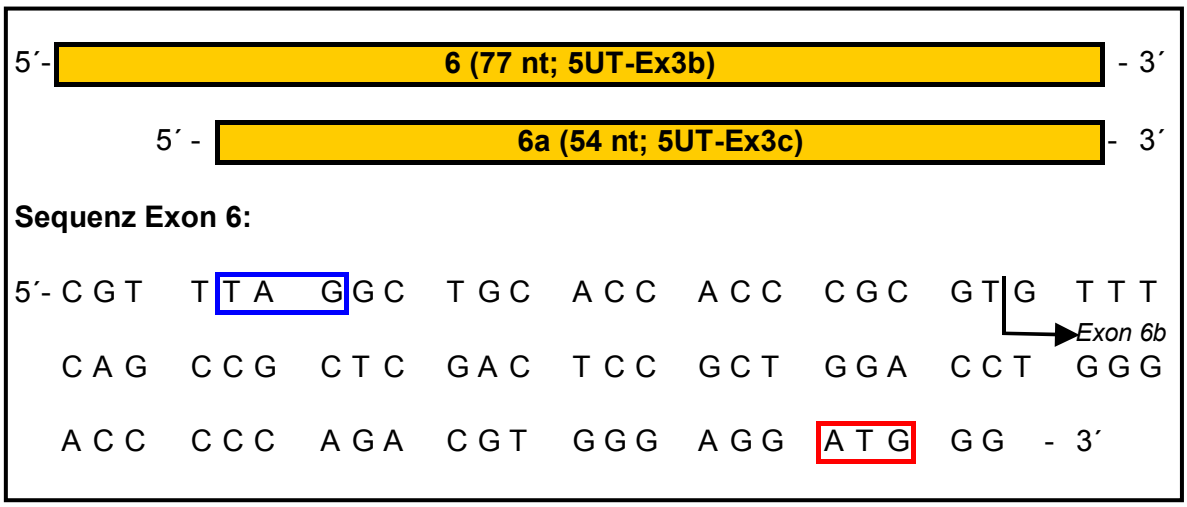

Abbildung 17 Aufbau und Sequenzen des Exons 6 Es ist Teil des genomischen Exons 5UT-Ex3, wo es von den Exons 9 und 31 flankiert wird. Es enthält ein Stopkodon (blau) und ein uATG (rot), bei dessen Ab-lesung ein uORF generiert wird, der im Exon 2 (5UT-Ex8) terminiert wird. (nt: Nukleotide)

Es ergibt sich in 5 Klonen eine auf 77 nt verkürzte Form, die genau den schon früher veröffentlichten Exons 9 und 6 entspricht. In zwei weiteren Klonen ist das Exon 6 auf 54 nt verkürzt, diese Sequenz entspricht keinem früheren Exon. Auch das Exon 6 beinhaltet ein uATG (s. Kap. 4.5.1). In der neuen Nomenklatur, die sich an der genomischen Organisation orientiert, erhält das Exon 6 zusammen mit den Exons 9 und 31 die Bezeichnung 5UT-Ex3. Dies ist eines der am stärksten zergliederten genomischen Exons, es finden sich sowohl am 5´-Ende wie auch am 3´-Ende alternativ gespleißte Varianten (s. Kap. 4.5.2). Die Abbildung 18 faßt die in dieser Arbeit beschriebenen und die für deren Verständnis relevanten 5´-Isoformen des humanen Glutamattransporters EAAT2 zusammen.

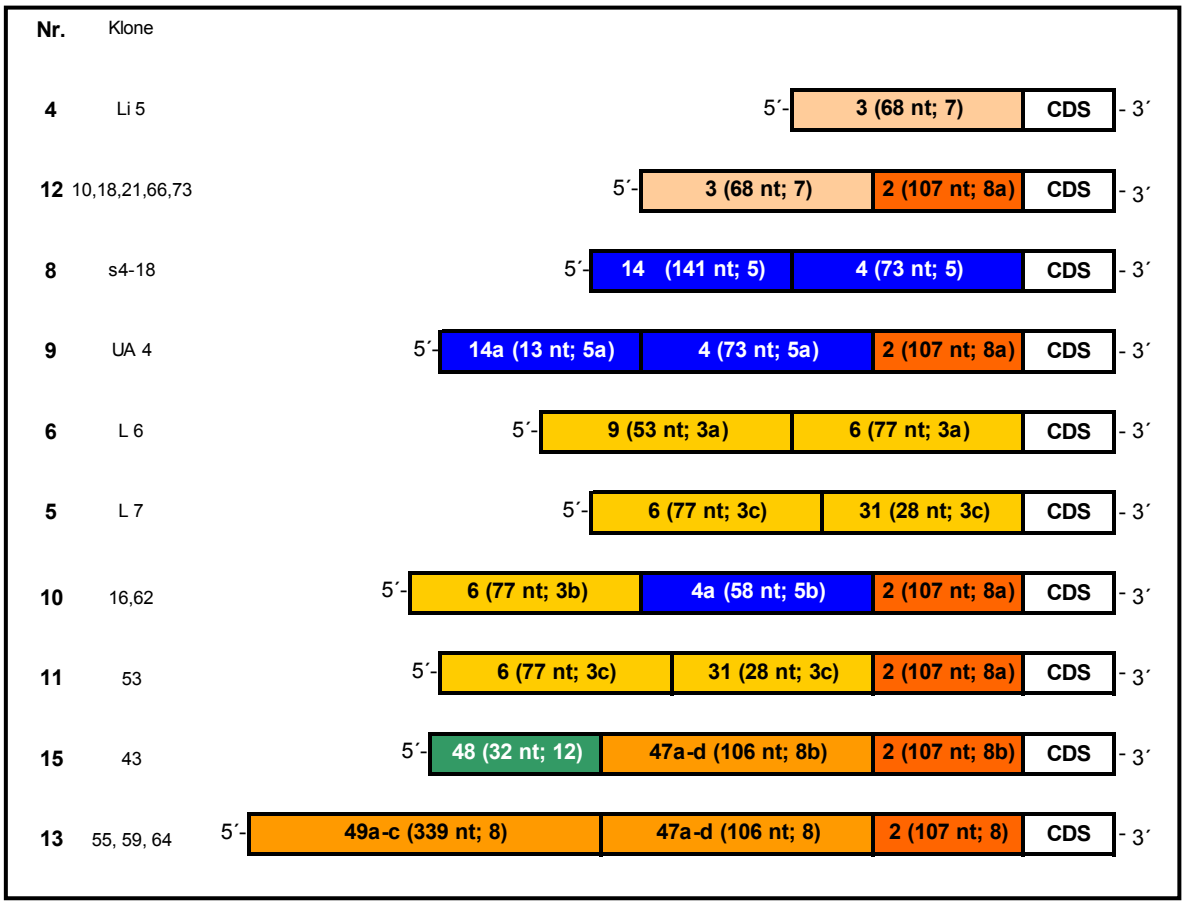

Abbildung 18 Zusammenfassende Darstellung der neu beschriebenen Isoformen (Nr. 10-13, 15) und die für ihr Verständnis relevanten Isoformen der EAAT2-5´-UTR. In Klammern die Länge der einzelnen Motive und zusätzlich die Zahl, die auf die Numerierung der Exons in der neuen genomischen Nomenklatur verweist (→ 4.5.2). Die Isoform 15 beinhaltet ein Exon, für das es noch kein Äquivalent auf einem genomischen Klon gibt, so dass es hier unter Vorbehalt aufgeführt wird. (CDS: *coding sequence*, nt: Nukleotide)

Abschließend sei an dieser Stelle noch auf eine Modifikation im Exon 2 hingewiesen, die sich interessanterweise in 22 Klonen aus unterschiedlichen RACE-Durchgängen findet: Der Start des Exons beginnt hier mit einem ATG-Kodon, was durch den Austausch von C durch G an Position 3 erreicht wird. 33 andere Klone zeigen diese Veränderung nicht und folgen der bisher veröffentlichten Sequenz. Aufgrund der Häufigkeit des Auftretens ist

eher nicht von einem Sequenzierungsfehler auszugehen, so dass sich die Frage stellt, ob man es hier mit einer häufigeren Variante, möglicherweise entstanden über eine posttranskriptionelle Modifikation durch *RNA-Editing*, zu tun hat. Interessant ist die Stelle für ein Startkodon deswegen, weil die Ablesewahrscheinlichkeit maßgeblich von der Base an Position –3 beeinflußt ist [56] (→ 4.5.1), und die ist in diesem Falle abhängig davon, welches Exon vor das Exon 2 gefügt wurde.

Während sich die bisher dargestellten Sequenzierungsergebnisse auf einen Primer im Exon Nr. 2 bezogen, seien im Folgenden noch die Resultate der Untersuchungen mit Primern im Exon 6 gezeigt. Nach einer deutlichen Bande in der RACE-Analyse zeigten sich bei der weiteren Untersuchung der daraus entstandenen Klone keine spezifischen Signale in den DotBlots. Und dies bestätigte sich auch bei der Sequenzierung. Es wurden 26 Klone sequenziert, und bei keinem einzigen folgte auf die Primersequenz die korrekte Sequenz des Exons 6, sondern eine Fortsetzung mit bis zu 176 nt langen Sequenzen (s. Abb. 19).

All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei der Auswahl des Primers Nr. 6 eine Sequenz gewählt wurde, die nicht den gewünschten cDNA-Bereich, sondern andere, möglicherweise häufiger vorkommende Abschnitte amplifizierte. Homologiebestimmungen mittels BLAST-Analyse [2] ergaben weitreichende Übereinstimmungen mit proteinkodierenden Sequenzen ubiqitär vorkommender Natriumkanäle. Es bleibt zu klären, ob mit der Synthese von neuen Primern bessere Ergebnisse erzielt werden können.

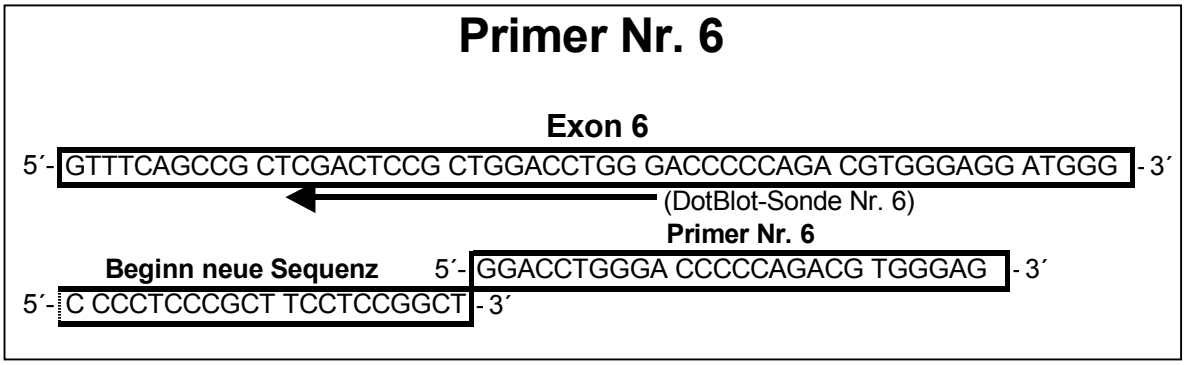

Abbildung 19 Bindung von Primer und DotBlot-Sonde Nr. 6 Die Anwendung von Primer Nr. 6 brachte keine Fortsetzung der gewünschten Sequenz, dementsprechend auch keine positiven Signale im DotBlot.

4.5. Analyse

4.5.1. Alternative Startkodons und offene Leserahmen

Es wurde in den vorherigen Kapiteln schon mehrfach angedeutet, dass die untersuchten 5´-Untranslatierten Regionen des humanen Glutamattransporter EAAT2 eine auffällige Häufung von Startkodons (ATG) aufweisen, deshalb folgt an dieser Stelle eine genauere Betrachtung der gefundenen uATG-Kodons und der entstehenden uORF, falls es zu einer Ablesung kommt. Alle gefunden uORF werden schon innerhalb der 5´-UTR durch Stopkodons (TAA, TGA, TAG) terminiert, die einzige Ausnahme bilden drei uATG im Exon 2: Von diesen liegen zwei im gleichen Leserahmen wie die proteinkodierende Sequenz, so dass das Protein um 7 bzw. 25 Nukleotide verlängert würde. Ein weiteres uATG liegt in einem anderen Leserahmen, es würde nach 141 Nukleotiden im proteinkodierenden Bereich terminiert. Wichtig für die Wahrscheinlichkeit, ob ein Startkodon abgelesen wird, ist die umgebende Basenabfolge, die sogenannte „Konsensussequenz" [56]. Danach sind besonders wichtig die Positionen –3 und +4, an denen ein A oder G stehen sollte. Die folgende Tabelle erläutert die verschiedenen uATG und ihr Ableseumfeld:

Tabelle 4 Startkodons und uORF der in dieser Arbeit beschriebenen Exons

Exon	Anzahl uATG	Nr. uORF	Länge des uORF Nt	AS	Ablesewahrscheinlichkeit (Konsensussequenz [56])
2	3 (+1)	(uORF2-1)	(36)	(11)	(**N**NN**ATGG** → variabel)
		uORF2-2	75+CDS	25+CDS	TAG**ATGA** → niedrig
		uORF2-3	141	46	CAA**ATGG** → niedrig
		uORF2-4	21+CDS	7+CDS	**ATCATGA** → hoch
3	1	uORF3-1	51	16	**G**AC**ATGA** → mittel
4	1 (+1)	uORF4-1	63	20	**ACCATGG** → hoch
		(uORF4-2)	39	12	**G**GA**ATGA** → mittel
6	1	uORF6-1	63	20	**AGGATGG** → hoch
47	1	uORF47-1	66	21	**AAAATGG** → hoch
49	7	uORF49-1	63	20	CAC**ATG**C → niedrig
		uORF49-2	18	5	CCA**ATG**C → niedrig
		uORF49-3	96	31	**G**CT**ATG**T → mittel
		uORF49-4	60	19	CAA**ATGG** → niedrig
		uORF49-5	93	30	TAC**ATGG** → niedrig
		uORF49-6	21	6	CCT**ATG**T → niedrig
		uORF49-7	6 (66)	1(21)	**A**AA**ATG**T → hoch

uATG bzw. uORF, die nur durch Austausch einer Base entstehen, sind in Klammern gesetzt. Das Ableseumfeld beim uORF2-1 ist variabel, weil es von dem Exon abhängt, das vor Exon 2 gekoppelt wird. Dem uORF49-2 folgt unmittelbar ein Stopkodon, wird dieses jedoch überlesen, gelten die Zahlen in Klammern. Die Ablesewahrscheinlichkeit ist hoch, wenn ein A oder ein G an Pos. –3 mit einem G an Pos. +4 auftritt. Nur ein G an Pos. –3 schafft ein mittleres Umfeld, andere Basen sorgen für ein weiches Umfeld, das kaum zu einer Ablesung führt. [57] (uATG: Startkodon, uORF: *upstream open reading frame*, Nt: Nukleotide, AS: Aminosäuren, CDS: *coding sequence* = proteinkodierende Sequenz)

Allerdings ist eine Übereinstimmung mit der Konsensussequenz keine unabdingbare Voraussetzung für eine Ablesung, sie begünstigt sie lediglich. Eine besondere Häufung an uATG-Kodons zeigt das Exon 49, das 7 Startkodons trägt. Gleichzeitig beinhaltet es aber auch 20 Stopkodons (TAA, TAG, TGA), so dass alle uORF noch im gleichen Exon terminiert werden, abgesehen nur von uORF49-7, der im Exon 47 endet. Zwar ist das Ableseumfeld bei den meisten ATG in diesem Exon nicht ideal, gerade solche uORF können aber bei der Regulation eines Genproduktes wichtige Aufgaben übernehmen (→ 5.2.1).
Weiterhin besonderer Erwähnung bedarf das Exon 2, das zwar schon früher beschrieben wurde, aber doch als Basis aller Isoformen ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist. Das Exon 2 enthält nach bisher veröffentlichter Sequenz drei uATG, man sollte aber davon ausgehen, dass es sich um vier handelt. Das vierte uATG wurde in knapp der Hälfte der sequenzierten Klone als Basenaustausch von C nach G gefunden, und diese Sequenz stimmt auch mit der des genomischen Klons RP4-683L5 (Genbank-Kode AC090625, → 4.5.2) überein. Trotzdem ist es nicht von der Hand zu weisen, dass in mehr als der Hälfte der Fälle die bisher publizierte Version gefunden wurde (ATC), man sollte also zunächst beide gleichwertig behandeln. Dieses Startkodon hat durch seine Position ganz zu Beginn des Exons ein variables Ableseumfeld, befindet sich z.B. Exon 47 vor Exon 2, ist das Umfeld mittelmäßig. Befinden sich Exon 4 oder Exon 46 davor, so ist die Konsensussequenz ideal. Zwar wird auch dieser uORF2-1 noch im gleichen Exon terminiert, regulatorische Funktionen wie Interferenzen mit den anderen Startkodons dieses Exons erscheinen aber doch wahrscheinlich. Die verbleibenden drei uATG treffen alle erst in der proteinkodierenden Sequenz auf Stopkodons, uORF2-2 und uORF2-4 liegen „*in frame*“, verlängern also das entstehende Protein um 7 bzw. 25 Aminosäuren. Der uORF2-3 liegt „*out of frame*“, durch ihn wird ein alternatives Polypeptid generiert, das 47 Aminosäuren umfaßt.
Auf mögliche Bedeutungen einer solchen Häufung von uATG wird später in dieser Arbeit ausführlich eingegangen (→ 5.2.1).

4.5.2. Genomische Organisation

Die Aufklärung der genomischen Organisation der 5´-UTR ergab sich aus einem Homologievergleich der beschriebenen Sequenzen mit publizierten genomischen DNA-Klonen. Benutzt wurden hierzu verschiedenene Programme, die von dem Amerikanischen *National Institute of Health* (NIH) via Internet angeboten werden, so z.B. das *Basic linear alignment search tool* (BLAST) [2].

Die beschriebenen UTR-Sequenzen finden sich weitestgehend auf dem Klon RP4-683L5 (Genbank-Kode AC090625), sie erstrecken sich über einen Bereich von etwa 30 kb mit einem Abstand zur CDS von 72 bis 97 kb. Zur Verdeutlichung der Organisation der in dieser Arbeit beschriebenen Isoformen dient die folgende Abbildung:

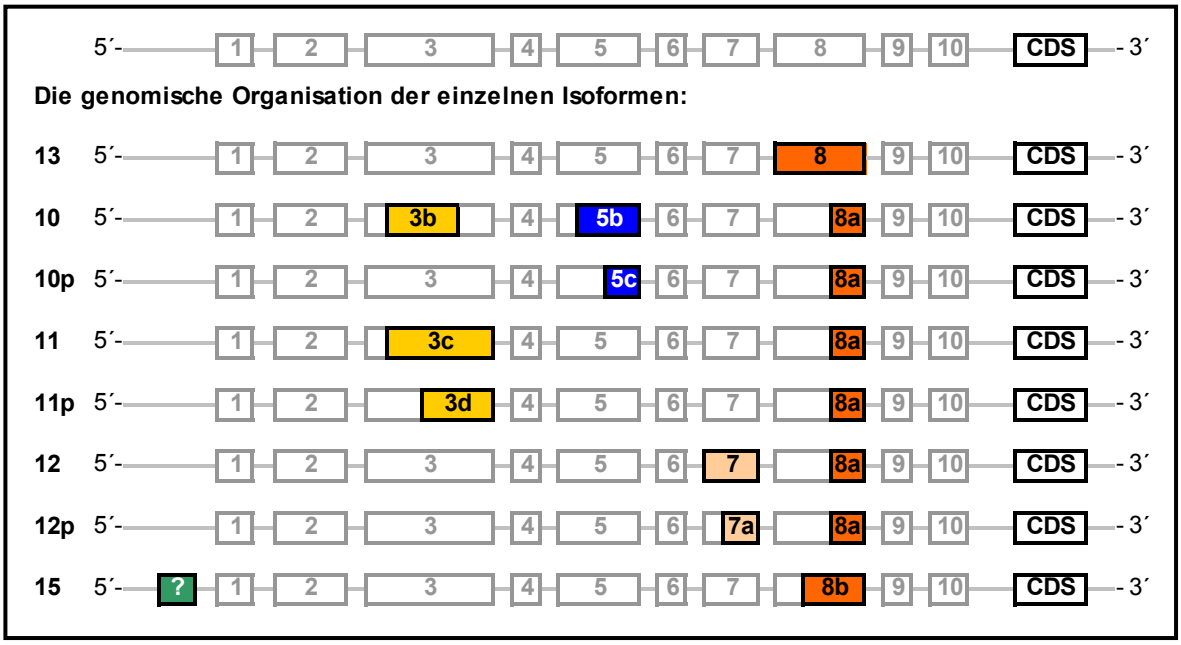

Abbildung 20 Darstellung der genomischen Organisation der neuen Isoformen Grau unterlegt sind alle weiteren Exons, deren genomische Lokalisation nun bekannt ist. Die Isoform 15 enthält einen bisher nicht auf genomischer Ebene lokalisierten Anteil, der mit einem Fragezeichen gekennzeichnet ist und vorbehaltlich die Bezeichnung 5UT-Ex12 erhält. Zur Größe von Exons und Introns siehe Tabelle 5. (CDS: *coding sequence*)

Für den Transporter selbst ist die Entschlüsselung der genomischen Struktur schon früher gelungen [110], er ist mit seinen elf kodierenden Exons auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 positioniert. Die Sequenzen des proteinkodierenden Bereiches werden alle durch den Klon RP1-68D18 (Genbank-Kode AL133330) erfaßt. Sie erstrecken sich über einen Bereich von etwa 72 kb, wobei die elf Exons von bis zu 15 kb langen Introns unterbrochen werden. Vor dem ersten Exon sind auf diesem Klon noch 29,195 kb in 5´-Richtung beschrieben, dort findet sich nur das genomische UTR-Exon 5UT-Ex10. Durch Kenntnis des oben beschriebenen Klons RP4-683L5 und einer überlappenden Sequenz von 2000 bp lassen sich die in der Tabelle 5 beschriebenen Introngrößen ermitteln. Es ergibt sich ein

Abstand von knapp 72 kb zwischen dem letzten in dieser Arbeit beschriebenen Exon der 5´-UTR und dem ersten proteinkodierenden Exon. Im Extremfall kann die Distanz sogar nahezu 100 kb betragen. Tabelle 5 faßt die Größe der verschiedenen Exons und Introns zusammen.

Tabelle 5 Exon- und Intronlängen der beschriebenen Isoformen

Isoform	Exon	Exonlänge	Position auf genomischem Klon RP4-683L5	Intronlänge
10	3b	77 nt	14.749 – 14.826	927 nt
	5b	58 nt	15.752 – 15.810	19.267 nt
	8a	107 nt	35.079 – 35.186	76.897 nt
11 (p)	3c (3d)	106 nt (82 nt)	14.749 (14.773) – 14.855	20.223 nt
	8a	107 nt	35.079 – 35.186	76.897 nt
12 (p)	7 (7a)	68 nt (44 nt)	21.005 (21.029) – 21.073	14.005 nt
	8a	107 nt	35.079 – 35.186	76.897 nt
13	8	552	34.634 – 35.186	76.897 nt

Die Intronlängen geben für jede Isoform den Abstand zum nächsten exprimierten Exon auf der DNA an, unabhängig davon, ob dazwischen liegende Exons ausgelassen werden.Die Intronlänge nach Exon 8 / 8a bezeichnet den Abstand zum ersten proteinkodierenden Exon auf dem genomischen Klon RP1-68D18 (nt: Nukleotide)

4.5.3. Umgebende DNA-Sequenzen

Durch Kenntnis der genomischen Umgebung der Sequenzen war es als nächster Schritt möglich, Aussagen über die Organisation von möglichen Spleißstellen und anderen Sequenzen zu machen, die bei der RNA-Synthese herausgeschnitten werden. Hierzu gehören unter anderem auch die sogenannten TATA-Boxen, die als Bindungsstelle für den Ribosomenkomplex der snRNA dienen, der die Transkription initiiert. Eine umfassende Analyse von Angriffsstellen für Transkriptionsfaktoren im Umfeld der Exons muß Thema zukünftiger Arbeiten sein.

Zunächst soll auf die Anordnung von möglichen Spleißstellen der untersuchten Exons eingegangen werden. Die hypothetischen Spleißstellen im Überblick zeigt die Tabelle 6 auf der folgenden Seite. Die Bezeichnungen der Exons beziehen sich auf die neue Nomenklatur (→ 4.5.2), es werden alle alternativen Spleißstellen angegeben, die sich im Verlauf dieser Arbeit zeigten. Zum Verständnis der Tabelle: Die 5´-Spleißstelle meint das 5´-Ende des Introns, also das 3´-Ende des Exons und umgekehrt. Wird ein Intron herausgeschnitten, so werden die beiden benachbarten Exons zusammengeführt durch Schnitte an den 3´- und 5´-Enden des Introns. So muß man also für die Abfolge 5UT-Ex8 → CDS 1 die 5´-Spleißstelle von Exon 5UT-Ex8 und die 3´-Spleißstelle der CDS-Exon1 betrachten.

Bei der genaueren Untersuchung der Exonenden und ihres genomischen Umfeldes zeigt sich, dass in einigen Fällen die angrenzenden Sequenzen nicht der anerkannten Konsensussequenz für Spleißstellen [38] folgen, die jedoch bei alternativ gespleißten Exons auch möglicherweise an Bedeutung verliert [80].

Tabelle 6 Spleißstellen der beschriebenen Exons

Exon	Alternative Exons	5´-Spleißstelle (Exon/Intron)	3´-Spleißstelle (Intron/Exon)
CDS Ex1			**ttc ttg** att **c**ta / **G**
5UT-Ex8		**CAG** / **gt**t t**g**a	aca tac tca tta / T
	5UT-Ex8a (97 nt)		**ttg gcc ctg cag** / A
	5UT-Ex8b (213 nt)		aa**t tgt gc**a g**ag** / A
5UT-Ex7		G**AG** / **gta** ctg	cag agc tgg tga / C
	5UT-Ex7a (44 nt)		tga a**tc t**ga g**a**c / C
5UT-Ex5	5UT-Ex5a	AG**G** / **gtg agg**	ggc g**tc cgc t**tt / C
	5UT-Ex5b (58 nt)		**cct cgc cc**a **cag** / C
5UT-Ex3	5UT-Ex3c (106 nt)	GG**G** / tg**a** gtg	cgc tga ata att / **G**
	5UT-Ex3d (82 nt)		**ca**c **ca**c **cc**g **c**gt / **G**
	5UT-Ex3b (77 nt)	GG**G** / **gtg ggt**	gca gct ggg **cc**g / C

Fett markiert und unterstrichen sind alle Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz [38]: (C|A)AG/gta(a|g)agt (5´-Spleißstelle) und $(t|c)_n n(t|c)ag/G$ (3´-Spleißstelle); „/“ markiert die eigentliche Spleißstelle. (nt: Nukleotide)

Abschließend erfolgte ein Homologievergleich der beschriebenen Motive mit Konsensussequenzen von Bindungsstellen regulatorischer Elemente. Vorteilhaft, wenn auch nicht unabdingbar, für eine effiziente Transkription ist die Anwesenheit von TATA-Box-Strukturen vor dem Beginn der abgelesenen Sequenz, sie unterstützen die Bindung einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase zusammen mit anderen Faktoren. TATA-Box-Motive finden sich vor dem Exon 5UT-Ex3 an der Position –24, vor dem Exon 5UT-Ex5a an der Position –48, vor dem Exon 5UT-Ex7 an der Position –84 sowie vor dem Exon 5UT-Ex8 an der Position –115.

4.6. Northern Blots

Für eine Betrachtung des Expressionsmusters der neu beschriebenen Isoformen in menschlichen Geweben wurden die kommerziellen „*Multiple Tissue Expression Arrays*“ der Firma *Clontech* verwendet. Die Sonden für die Hybridisierung wurden mit Hilfe einer PCR so geschaffen, dass zwei jeweils doppelsträngige Sequenzen mit ca. 250 bzw. 350 nt als Kopie der neuen Exons 47 und 49 entstanden. Die an die Enden der Primer gekoppelten SP6- bzw. T7-Sequenzen wurden mit amplifiziert, so dass *sense*-Stränge (5´→3´) mit dem T7-Motiv am 5´-Ende und *antisense*-Stränge mit dem SP6-Motiv am 5´-Ende entstehen. Beide binden bei der in-vitro-Transkription an die komplementären mRNA-Stränge und werden nach stromabwärts (also in 3´-Richtung) verlängert, so dass nur bei den SP6-gekoppelten Proben eine Bindung an die gesuchte mRNA stattfindet. Zur Verdeutlichung der Positionierung der Primer und der entstehenden Sonden dient die Abbildung 21.

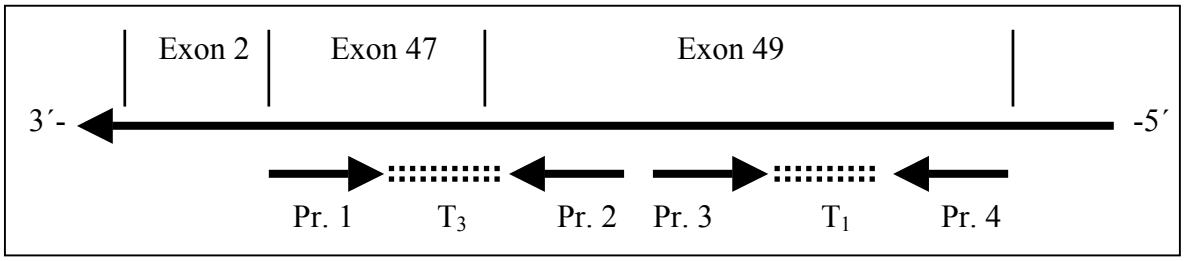

Abbildung 21 Positionierung der Primer für die Synthese der Northern Blot Sonden Aus den Primern Pr. 1 (= Primer SP6_hEAAT2_A2_as) und Pr. 2 (= Primer T7_hEAAT2_A8_s) entsteht die Sonde T_3 (Exons 47a-d + 49a-b). Aus den Primern Pr. 3 (= SP6_hEAAT2_A8_as) und Pr. 4 (=T7_hEAAT2_A9_s) entsteht die Sonde T_1 (Exons 49b-c) wiederum mit dem SP6-Anker am 3´-Ende und dem T7-Anker am 5´-Ende.

Damit ergeben sich vier Hybridisierungen bei den Northern Arrays, jeweils eine pro Sonde mit der SP6-Polymerase und eine mit der T7-Polymerase. Alle Blots wurden sowohl auf *Phosphorscreens* (Exponationszeit bei SP6-Blots 21 h, bei T7-Blots 10 h) als auch auf Filmen (Exponationszeiten bei SP6-Blots 6,5 – 3,5 – 1,5 – 1 h, bei T7-Blots 6 – 3 – 1 – 0,5 h) exponiert. Es zeigte sich ein differentielles Expressionsmuster besonders der Sonde, welche die Exons 47 und 49 a-b repräsentiert (T_3), wie den Blots auf den nächsten Seiten zu entnehmen ist. Die Hybridisierungen mit einer T7-Polymerase erbrachten ubiquitär dezente Signale, ebenfalls ohne Darstellung der Negativkontrollen in Spalte 12. Somit sind sehr schwache Signale in den dargestellten Blots eher nicht als signifikant zu werten. Es zeigte sich bei den T7-Blots ein stärkeres Hintergrundsignal, weshalb für die Darstellung hier (Abb. 25, Seite 55) eine kurze Exponationszeit gewählt wurde. Offensichtlich ergaben sich beim Entfernen der SP6-Sonden und der Wiedervervendung der Membranen Schwierigkeiten mit der Bindung der Sonden oder dem Waschen der Membranen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für das – wenn auch schwach – vorhandene Signal in den T7-Blots

wäre die Existenz von Genorten, von denen beide DNA-Stränge abgelesen werden [103], so dass die Signale auch der komplementären mRNA eines anderen Produktes zugehörig sein könnten.

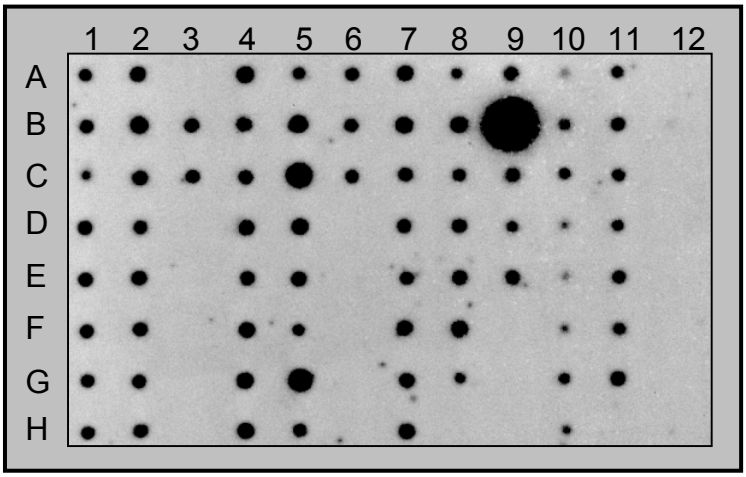

Abbildung 22 Northern Blot SP6-T_3, entspricht dem 3´-Ende der beschriebenen Motive, liegt also am nächsten zu 5UT-Ex2 bzw. der kodierenden Sequenz. (Reihe 12: Kontrollproben negativ; Exponationszeit: 3,5 Stunden auf *Kodak Intensifying Screen*) Die einzelnen Gewebeproben lassen sich anhand von Abb. 23 zuordnen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	whole brain	cerebellum, left		heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
B	cerebral cortex	cerebellum, right	accumbens nucleus	aorta	stomach	colon, desending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
C	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	*E. coli* rRNA
D	parietal lobe	amygdala		atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	*E. coli* DNA
E	occipital lobe	caudate nucleus		ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	Poly r(A)
F	temporal lobe	hippo-campus		ventricle, right	ilocecum		lymph node	testis		Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human C_0t -1 DNA
G	p. g.* of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone morrow	ovary		colorectal adeno-carcinoma, SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
H	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

* paracentral gyrus

Abbildung 23 Anordnung der RNA-Proben auf den Northern Blots (Firma *Clontech*)

Es zeigen sich deutlich positive Signale für die RNA von Pankreas (B9), Duodenum (C5) und Appendix (G5), ansonsten recht einheitliche mittelstarke Antworten der meisten übrigen Proben. Auffallend geringe Signale geben die verschiedenen Tumorgewebe in Reihe 10, und überhaupt nicht dargestellt sind die Negativkontrollen in Reihe 12. Von den

betrachteten Hirnarealen hybridisiert die Sonde am stärksten mit der RNA des Zerebellums (A2+B2).

Die Spezifität der Hybridisierung sollte recht hoch sein, da im Falle der Sonde T_1 der komplementäre Bereich 279 bp und im Falle der Sonde T_3 190 bp umfaßt.

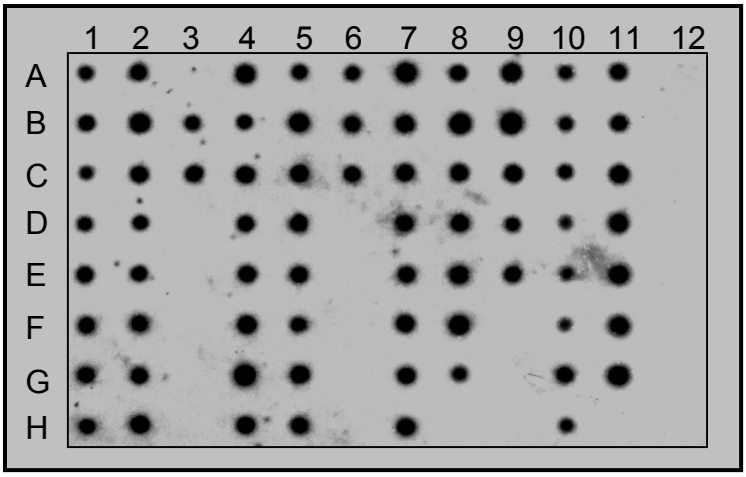

Abbildung 24 Northern Blot SP6-T_1, liegt in der Mitte der beschriebenen Sequenzen. (Exponationszeit 3,5 h auf *Kodak Intensifying Screen*) Für die Zuordnung der RNA-Proben vgl. Abb. 23 auf Seite 54.

Der Blot SP6-T_1 zeigt nicht die deutliche Anfärbung der Pankreas-RNA (B9), dafür ein ähnlich gleichmäßiges Muster der übrigen Proben. Wiederum imponieren besonders intestinale Gewebe wie Pankreas (B9), Duodenum (C5) und Leber (A9), jedoch auch noch andere periphere Organe wie Herz (A4 / G4), Niere (A7) und Plazenta (B8). Ebenfalls deutlich positive Signale geben die embryonalen Gewebe (Reihe 11). Nicht zur Darstellung kommen die Negativkontrollen in Reihe 12, eine schwache Darstellung zeigen verschiedene Neoplasien (Reihe 10). Wiederum dominiert bei den Hirnproben die zerebelläre RNA (A2+B2).

Die T7-Blots seien im Folgenden dargestellt:

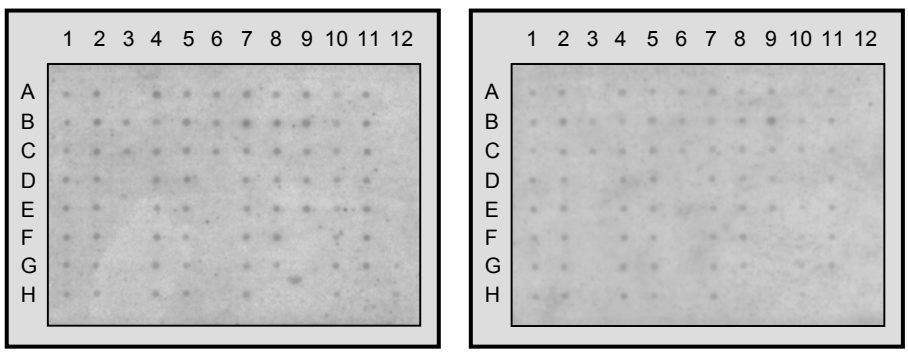

Abbildung 25 Northern Blots T7-T_3 und T7-T_1 Die Hybridisierungen mit den Sonden T7-T_3 (links) und T7-T_1 (rechts) ergaben ubiquitär dezente Signale unter Aussparung der Negativkontrollen in den Reihen 12. (Exponationszeit auf *Kodak Intensifying Screen* jeweils eine Stunde)

5. Diskussion

5.1. 5´-Heterogenität von EAAT2

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein aktuelles Thema der posttranskriptionellen Regulation des Glutamattransporters EAAT2 bearbeitet. Dabei wurde mit den 5´-Untranslatierten Regionen ein Teilaspekt der EAAT2-Regulation untersucht. Diese Arbeit erfolgte in Fortführung und Vertiefung anderer Projekte der Arbeitsgruppe. In Vorarbeiten wurde bereits eine 5´-Heterogenität der EAAT2-RNA nachgewiesen. Eigene Beobachtungen wiesen darauf hin, dass die zuvor beschriebene Charakterisierung von 5´-RNA-Sequenzen des EAAT2 unvollständig ist. Gegenstand des vorliegenden Projektes war die Charakterisierung neuartiger 5´-Isoformen von EAAT2.

Die Ergebnisse der Arbeit beweisen die Existenz weiterer 5´-Isoformen von EAAT2. Es lassen sich drei wesentliche Schlußfolgerungen ziehen. Die 5´-Sequenzen des EAAT2 zeigen

- eine differente Länge,
- variable 5´-regulatorische Motive sowie
- die Kodierung unterschiedlich expandierter Aminotermini des EAAT2-Proteins.

Neben zwei Isoformen, die neuartige Sequenzmotive mit einer Gesamtlänge von 445 bp enthalten, werden drei weitere Isoformen beschrieben, die bereits publizierte Sequenzen in neuen Kombinationen enthalten. Allen gemeinsam ist die Sequenz des Exons 5UT-Ex8a an ihrem 3´-Ende als Verbindung zum proteinkodierenden Bereich. Zusätzlich zu den fünf neuen Isoformen sind in früheren Arbeiten zwölf weitere Isoformen der 5´-UTR [81,106] beschrieben worden. Rechnet man noch Modifikationen von verschiedenen Exons hinzu, die teilweise in verkürzter Form auftreten, so erhöht sich die Variabilität der beschriebenen Regionen um ein Vielfaches.

Die verschiedenen 5´-Isoformen unterscheiden sich stark in ihrem Gehalt an uATG-Kodons als mögliche regulatorische Motive. Während einige eine Häufung alternativer Startkodons aufweisen und damit eine effektive Translation des EAAT2 fast unmöglich machen dürften [54], enthalten andere Isoformen wenige uATG-Kodons.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen 5´-Isoformen enthalten an ihrem 3´-Ende ein Sequenzmotiv mit zwei Startkodons, die in einem Leserahmen mit dem proteinkodierenden Bereich liegen, vorher nicht terminiert werden und damit den N-Terminus des EAAT2-Proteins um sieben bzw. 25 Aminosäuren verlängern.

Durch die große 5´-Variabilität des EAAT2, die mit dieser Arbeit bestätigt wurde, entsteht ein buntes Muster von an ihrem 5´-Ende differenten mRNA-Strängen des hochaffinen Glu-

tamattransporters EAAT2. Offensichtlich ist die komplette Organisation und Funktion der 5´-UTR des hochaffinen Glutamattransporters EAAT2 noch weit davon entfernt, verstanden zu werden. Durch die Verwendung von Primern mit größerer Entfernung zum Translationsbeginn, also weit im spezifischen Bereich der bekannten 5´-UTR, wurde zwar einerseits ein weiteres Stück der 5´-Heterogenität von EAAT2 beleuchtet, andererseits wurde aber auch klar, dass die komplexe Organisation dieser Regionen noch lange nicht entschlüsselt ist. Vergleichbar komplexe 5´-UTR sind bisher in erster Linie bei hochgradig regulierten Proteinen wie Wachstumsfaktoren, Proto-Onkogenen oder Interleukinen beschrieben worden [54,122], wohingegen Haushaltsgene eher einer einfachen Regulation zu unterliegen scheinen. In diesem Kontext macht die Komplexität der 5´-UTR des EAAT2 durchaus Sinn, da er an zahlreichen elementaren Funktionen des zentralen Nervensystems wie höheren kognitiven und mnestischen Prozessen beteiligt ist. Es überrascht also nicht, dass der Glutamattransporter EAAT2 mit seiner großen 5´-Variabilität in Analogie zu anderen auf diesem Wege kontrollierten Genprodukten [46,122] eine potente Steuerungsmöglichkeit besitzt.

Der scheinbare Widerspruch zwischen der ubiquitären Expression des EAAT2 und den ohne Zweifel sehr unterschiedlichen Erfordernissen des differentiellen Glutamattransportes in unterschiedlichen Hirnregionen, Geweben und in verschiedenen Zelltypen ist nur durch das Vorhandensein von sehr feinen und schnell modulierbaren Regulationsmechanismen zu lösen. Dabei scheinen große Teile des Proteins stets übereinzustimmen, was die Bedeutung der variablen 5´-Untranslatierten Regionen des Transporter unterstreicht, denn für diese gibt es erste Hinweise auf eine topisch-differentielle Expression (siehe Kap. 5.4).

5.2. Regulatorische Eigenschaften der 5´-UTR

Die 5´-Untranslatierten Regionen verschiedener mRNA-Sequenzen standen im Mittelpunkt einer wachsenden Menge an Publikationen, die in den letzten Jahren erschienen sind. Offensichtlich steuern zahlreiche Gene die Expression ihres Genproduktes auf diesem Wege, so dass die untranslatierten Regionen über bisher wenig beachtete Mechanismen zu einer Funktionalität führen. Diese regulatorischen Mechanismen bestehen überwiegend in einer Translationsinhibition durch verschiedene RNA-Sequenzmotive. Die in dieser Arbeit dargestellten Sequenzen bieten an verschiedenen Stellen Anlaß zu der Annahme, dass sie regulatorische Aufgaben erfüllen können.

Als ein wichtiger Faktor für die Effizienz der Expression des Genproduktes ist die Länge der 5´-UTR an sich gezeigt worden [3,24]. Diese variiert in den beschriebenen 5´-Isofor-

men zwischen 200 und 550 bp, was ein erster Hinweis auf regulatorische Aufgaben ist. Ein Steuerungselement in 5´-Untranslatierten Regionen, das auch in den beschriebenen Isoformen in großer Zahl vorhanden ist, stellen alternative Startkodons dar. Einzelne Sequenzmotive enthalten eine große Anzahl an uATG-Kodons, die eine Translation praktisch unmöglich machen. In diesen Fällen stellt sich die Frage nach dem biologischen Nutzen eines Transkriptes, das offensichtlich nicht zur Translation vorgesehen ist. Interessant ist, dass bestimmte Zellen unter besonderen Bedingungen die Fähigkeit zeigen, durch Nutzung anderer Promoter die uATG-reichen Sequenzen zu entfernen und so eine fast explosionsartig gesteigerte Proteinexpression auszulösen [129]. Für die Zellen bietet sich dadurch die Möglichkeit einer schnellen Reaktion auf Veränderungen [122]. Gerade für die Exons 47 und 49 als Teil des genomischen Exons 5UT-Ex8, die eine Häufung von 8 relativ kurzen uORF zeigen, ist ein solcher Mechanismus sehr wahrscheinlich. Auf die Auswirkungen von uATG-Kodons im Einzelnen wird im Kapitel 5.2.1 ausführlich eingegangen.

Desweiteren beschreiben verschiedene Autoren die Bedeutung von stabilen sekundären Strukturen in der UTR für eine präzise Translationsinitiation [39,40,46,54,99,100]. Ausgesprochen G/C-reiche Regionen, wie sie für die Ausbildung von stabilen sekundären Strukturen besonders typisch sind, finden sich in den beschriebenen Sequenzen zwar nicht, doch schließt dies die Bildung sekundärer Strukturen nicht grundsätzlich aus. Eine computergestützte Untersuchung der Sequenzen hinsichtlich der Entstehung sekundärer Strukturen und ihrer thermodynamischen Verhältnisse war nicht Thema dieser Arbeit.

Bei den erwähnten translationsinhibierenden UTR-Sequenzen muß es sich nicht zwingend um funktionelle mRNA im engeren Sinne handeln. Vielmehr können sich durchaus auch inkomplett entfernte Introns vor der funktionellen mRNA befinden und dementsprechend zu cDNA umgeschrieben werden. Es sind einige interessante Beispiele dafür veröffentlicht worden, dass Transkripte wichtiger Genprodukte an ihrem 5´-Ende noch Intronsequenzen enthalten [23,57]. An den regulatorischen Eigenschaften dieser Sequenzen im Sinne einer Translationinhibition ändert dies jedoch nichts.

Alle beschriebenen Prinzipien der posttranskriptionellen Genregulation gilt es in einen erweiterten Kontext zu stellen, der im Februar 2001 mit Abschluß des Humanen Genomprojektes [47] eine breite Beachtung fand. Als ein Ergebnis des humanen Genomprojektes ergab sich eine überraschend geringe Zahl humaner Gene (~ 30.000), die für eine weitaus größere Zahl von Proteinen (~ 250.000) kodieren. Die Anzahl der Gene ist damit nur unwesentlich größer als die von Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* mit 19.099 [30]. Das Genom der Reispflanze umfasst nach neuen Erkenntnissen sogar bis zu 55.000 Gene [131].

Mit diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass die Komplexität und Diversität menschlicher Proteine keine primäre genomische Grundlage hat, sondern vielmehr das Ergebnis von postgenomischer Regulation und Modifikation ist. Mit anderen Worten ist nicht die Anzahl der Gene, sondern die Vielfalt der posttranskriptionellen Regulation für die phylogenetische Höherentwicklung von essentieller Bedeutung. Diese Diversifizierungsprozesse sind in keinem anderen System so bedeutend wie im Zentralen Nervensystem des Menschen. Damit stellt die vorliegende Arbeit mit der Betrachtung regulatorischer Prozesse auch einen Beitrag zum besseren Verständnis dieses hochaktuellen Themas dar.

Neben der offensichtlichen Bedeutung von Genregulationsmechanismen für die physiologischen Funktionen der Genregulation ist ebenso eine Störung dieser Prozesse für das Pathogeneseverständnis von menschlichen Erkrankungen relevant. Ein Beispiel für die Funktion einer UTR-Sequenz, die in ihrer Morphologie mit vielen uATG-Kodons sehr den in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzen ähnelt, bietet sich bei Betrachtung der mRNA des thrombozytenstimulierenden Faktors Thrombopoietin: Während im gesunden Zustand eine sehr geringe Translationsrate aufgrund einer mit uORF beladenen 5´-UTR vorherrscht, kommt es im Falle der hereditären Thrombozytämie zu einem veränderten Spleißen mit Verlust der uATG-tragenden Sequenzen. Die resultierende Überproduktion an Thrombopoietin führt dann zur Krankheit [128]. Gibt es auch bei EAAT2 Hinweise auf 5´-Sequenzen, die eine deletäre Überproduktion des Transporters verhindern?

Dass EAAT2 bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen eine Schlüsselrolle spielt, ist durch verschiedene Arbeiten belegt worden [97,98,102], allerdings bestätigte sich nicht der zunächst geäußerte Verdacht einer Beteiligung alternativ gespleißter EAAT2-Transkripte an der Ätiologie neurodegenerativer Erkrankungen wie der ALS [77,78]. Es ist inzwischen belegt, dass die Expression und Lokalisation der Glutamattransporter variabel auf extra- und intrazelluläre Veränderungen reagieren kann [36]. Dazu zählen u.a. Arachidonsäure, NO, freie Radikale, Phorbolester, Glutamatrezeptoragonisten, TNF-α, Glukokortikoide, Dopamin, α- und β-Agonisten sowie Zustände von Ischämie, kortikostriatalen Läsionen und Hyperosmolarität. Über welche molekularen Wege jedoch die Regulation erfolgt, konnte in den meisten Fällen bisher nicht beantwortet werden [36]. Ob Steuerungsprozesse von interagierenden Proteinen wie GTRAP3-18 geleistet werden, welches durch Bindung an das intrazelluläre Carboxyende der Transporter deren Kapazität modifiziert, ist noch unklar [62].

Auch auf zerebrale Schädigungen wie kortikale und thalamusnahe Läsionen reagieren Zellen im ZNS mit einer veränderten EAAT2-Expression und modifizierten EAAT2-

mRNA-Spiegeln [61]. Es wurde unter anderem gezeigt, dass bei den resultierenden Veränderungen die mRNA einen deutlich stärkeren Anstieg zeigt als die tatsächlich gemessene EAAT2-Expression. Viele dieser Ergebnisse weisen auf eine Schlüsselrolle der posttranskriptionellen Regulation hin, die mit der Beschreibung der Komplexität der 5´-UTR des Transporters in dieser Arbeit indirekt gestützt wird. Ob sich jedoch bei der ALS wie bei der hereditären Thrombozytämie eine direkte kausale Beziehung zwischen bestimmten alternativ gespleißten UTR-Exons und der Krankheitsentstehung finden läßt, oder ob es sich um einen Teil eines komplexen Regulationssystems handelt, wird sich noch zeigen müssen. Erste Hinweise auf eine pathogenetische Bedeutung unterschiedlicher 5´-Isoformen des EAAT2 für die Pathogenese der ALS liefert die Untersuchung verschiedener UTR-Isoformen im transgenen Mausmodell der familiären ALS [82]. Dabei zeigte sich eine gesteigerte Expression der Variante mEAAT2/5UT4 bei verringerter Expression von mEAAT2/5UT5 in einem frühen Stadium der Erkrankung.

5.2.1. Rolle von uORF als regulatorischer Faktor

Ein wichtiger Ansatzpunkt für eine Regulation der Translation eines Genproduktes auf mRNA-Ebene ist die Frequenz und Lokalisation von uATG-Kodons. Nach dem *scanning model* und der Regel, dass normalerweise das erste Startkodon mit einem guten Ableseumfeld [55], das der Initiationskomplex findet, auch abgelesen wird [54,56], müßte die Anwesenheit von uATG die Ablesung des korrekten ORF eines Proteins verhindern. Dass dies nicht immer so ist, wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt [57,58]. Möglichkeiten, das Startkodon dennoch mehr oder weniger effizient abzulesen, gibt es mindestens drei: *leaky scanning* (Auslassen von uATG-Kodons), Re-Initiation nach Ablesen eines kleinen uORF und die direkte Ansteuerung von „internen“ ATG-Kodons an *internal ribosome entry sites (IRES)* [122]. Folgende Szenarien zur Auswirkung von uATG-Kodons sind denkbar [56]:

- Ein *in frame* liegendes uATG-Kodon mit gutem Ableseumfeld verlängert das kodierte Protein in diesen Varianten um einige AS. Ein solches uATG findet sich im Exon 5UT-Ex8a (uATG2-4), es kommt zur Expression eines Transporters mit einem um 7 AS verlängerten N-Terminus.
- Ein *in frame* liegendes uATG-Kodon mit schwachem Ableseumfeld wird zu einem Teil abgelesen, zu einem anderen Teil überlesen (*leaky scanning*). So entstehen zwei Proteine mit unterschiedlichen N-Termini aus dem gleichen Gen. Ein Beispiel hierfür findet sich ebenfalls im Exon 5UT-Ex8a (uATG2-2), es ergibt sich bei Ablesung ein

Protein mit einem um 25 AS N-Terminus. Das Modell des *leaky scanning* besagt, dass ein solches uATG-Kodon mit weichem Ableseumfeld, wenn es vor einem ATG-Kodon mit besserer Umgebung liegt, eine Möglichkeit der Zelle sein kann, die Expression unterschiedlicher Produkte von dem selben Genort zu steuern [54], wobei die Häufigkeit der beiden Produkte von feinen Änderungen in der Umgebung und der sekundären Struktur der mRNA abhängig ist.

- Ein *out of frame* liegendes uATG-Kodon mit gutem Ableseumfeld verhindert die Expression des funkionstüchtigen Proteins, hierfür findet sich in den dargestellten Motiven kein Beispiel.
- Ein *out of frame* liegendes uATG-Kodon mit schwachem Ableseumfeld wird inkonstant abgelesen (*leaky scanning*) und reduziert damit die Expression des Genproduktes. Ein Beispiel hierfür ist das uATG2-3.
- Ein uATG-Kodon, das im Verlauf der UTR auf ein Stopkodon (UAA, UAG, UGA) trifft, produziert eine – meist kurze – Oligopeptidsequenz. Nach Ablesen dieses uORF ist eine Re-Initiation des Ribosomenkomplexes in Abhängigkeit von umgebenden Sequenzen des uORF [37,58] bei einer geringen Länge des uORF [66] möglich, so dass eine Ablesung des proteinkodierenden Bereiches zwar reduziert, aber weiter vorhanden ist [1]. Bedingung für eine effiziente Re-Initiation ist auch ein ausreichend großer Abstand zum nächsten ATG-Kodon, damit wieder Translationsfaktoren wie eIF-2 oder Met-tRNA gebunden werden können. Die 13 übrigen uATG-Kodons erfüllen diese Voraussetzung und bieten damit die Möglichkeit der Re-Initiation.

In den beschriebenen 5´-UTR finden sich unterschiedliche Häufigkeiten von solchen uATG-Kodons, je nachdem welche Exons kombiniert werden. Das Exon 5UT-Ex8a als Basis der beschriebenen Isoformen zeigt eine Besonderheit: Durch einen Basenaustausch kann es drei oder vier uATG-Kodons aufweisen. Da das uATG2-1 am Beginn der Sequenz liegt, ist sein Ableseumfeld variabel. So ist die Wahrscheinlichkeit für eine Ablesung hoch, wenn es auf das Exon 5UT-Ex7 folgt, mittelmäßig jedoch in Fortsetzung des Exons 5UT-Ex8. Ob es sich hier um einen weiteren potentiellen Regulationsmechanismus handelt, beispielsweise durch einen Basenaustausch, muß noch verifiziert werden. Beschrieben wurde die Möglichkeit einer solchen mRNA-Modifikation (*RNA-Editing*) in verschiedenen Fällen [14].

Eine weitere Möglichkeit, ein intern gelegenes Startkodon nach praktisch untranslatierbaren Sequenzen zu erreichen, stellt die interne Initiation an IRES (*Internal ribosome entry*

sites) dar [49,122]. Von einigen Autoren wird jedoch die Existenz bzw. Relevanz eines solchen Mechanismus angezweifelt [56].

Ein anderer Nutzen der uORF könnte darin liegen, dass sie tatsächlich abgelesen werden und das entstehende Oligopeptid regulatorische Funktionen für die weitere Ablesung des mRNA-Stranges trägt. Dieses Modell dient im Augenblick dazu, zu erklären, weshalb es bei Ablesung mancher uORF auch zu einer Verstärkung der Expression des proteinkodierenden Bereiches kommt [133].

Welchen Zweck könnten nun die geschilderten Mechanismen in der Regulation des Glutamattransporters EAAT2 erfüllen? Folgende Antworten hierauf wären denkbar:

- Steuerung der regionalen Expression von EAAT2,
- Steuerung (Inhibition und Disinhibition) der Translationsrate sowie
- Kodierung von qualitativ unterschiedlichen Transporterisoformen.

Diese Mechanismen sind nach derzeitigem Stand Hypothesen, die noch nicht endgültig bewiesen sind. Dennoch spiegeln sie wieder, was nach der Analyse der in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzen zusammen mit den Northern Arrays und Ergebnissen anderer Projekte der gleichen Arbeitsgruppe im Augenblick als wahrscheinlicher Erklärungsansatz für die Komplexität der 5´-Isoformen des EAAT2 dienen kann.

Welche Auswirkungen allein die Mutation eines einzelnen uATG auf die ursprüngliche Proteinexpression haben kann, zeigt das Beispiel des Retinoidsäure-Rezeptors ß2: Die Veränderung eines einzelnen uATG führt hier zur starken Expression des Rezeptors im Herzen und dem Gehirn, wo er sich ansonsten kaum findet [133]. Eine Arbeit aus dem Jahre 1997 von Savitsky et al. erscheint im Kontext der beschriebenen Motive besonders erwähnenswert [103]: Von dieser Arbeitsgruppe wurde die Pathogenese der Ataxia teleangiectatica untersucht, und es fand sich eine 5´-UTR vor dem proteinkodierenden Bereich, die mit zwölf verschiedenen Varianten, variablen Längen (146-884 nt), einem hohen uATG-Gehalt (1-18 pro Variante) und verschiedenen sekundären Strukturen stark an die EAAT2-5´-UTR erinnert. Zwar steht auch hier eine genaue Beschreibung der Funktion einzelner Varianten noch aus, aber durch den einfacheren kausalen Zusammenhang zwischen veränderter Proteinexpression und Krankheitsentstehung könnte hier viel zum Verständnis der pathogenetischen Bedeutung veränderter 5´-UTR-Spleißvarianten von EAAT2 beigetragen werden.

5.3. Genomische Organisation der 5´-UTR von EAAT2

Durch die Identifikation der meisten bekannten Exons der EAAT2-5´-UTR auf einem genomischen Klon in unmittelbarer Nachbarschaft der Lokalisation von EAAT2 auf der DNA wurde ein weiterer wichtiger Schritt zur Aufklärung der Organisation der 5´-UTR getan. Es wird nun über den Kontext der beschriebenen Sequenzen deutlich, dass einige Exons in unmittelbarer Nachbarschaft auf der DNA liegen, während die Distanz zwischen den meisten 5´-UTR-Sequenzen und dem proteinkodierenden Bereich sehr groß ist: Je nach Exon müssen Intronlängen zwischen 70 kb und über 100 kb entfernt werden. Die Exons finden sich in 10 separaten genomischen Exons auf der DNA. Damit entspricht die Anzahl der UTR-Exons nahezu der Anzahl der proteinkodierenden Exons (elf), was eine elementare funktionelle Bedeutung dieser Regionen zumindest sehr nahe legt. Auf die Bedeutung der Diversifizierung menschlicher Proteine ohne eine direkte genomische Grundlage, sondern mittels posttranskriptioneller Regulationsprozesse wurde bereits weiter oben eingegangen. Offensichtlich ist auch EAAT2 ein Protein, das seine gewebe- und zellspezifische Expression und Funktionalität über posttranskriptionelle Mechanismen reguliert.

Innerhalb einiger genomischer Exons finden sich zusätzliche alternative 3´- und 5´- Spleißstellen, was die Varianz der entstehenden Isoformen nochmals deutlich erhöht. Einen Überblick über die differentielle Nutzung von Exons bei der Generierung von Isoformen gibt die Abbildung 26 auf der Seite 65. Die in der Vergangenheit beschriebenen Motive waren überwiegend einfache Kombinationen [81,105], in denen auf die CDS unterschiedliche Exons von einer Genregion folgten. Mit dieser Arbeit wird deutlich, dass prinzipiell die überwiegende Zahl der UTR-Exons auch auf das alternativ gespleißte und inserierte Exon 2 folgen können, so dass hier regelmäßig zwei und mehr genomische Exons miteinander verknüpft werden.

Durch die Kenntnis umgebender Sequenzen der UTR-Exons wird es in Zukunft möglich sein, putative regulatorische DNA-Sequenzen, die nicht transkribiert werden wie Promoterregionen und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und Spleißstellen genauer zu beschreiben.

Als basale Transkriptionsfaktoren, die für eine effiziente Bindung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase bei der RNA-Synthese hilfreich sind, können TATA-Box-Motive angesehen werden. Solche Motive finden sich im Vorfeld von vier der genomischen Exons (5UT-Ex3, 5a, 7 und 8), anderen fehlen diese Sequenzen. Dabei bedeutet jedoch die Abwesenheit von TATA-Box-Elementen keineswegs, dass eine Ablesung der Isoformen

unmöglich wird. Vielmehr ist auch eine TATA-Box-unabhängige, heterogene Transkriptionsinitiation bekannt [107].
Eine umfassende Untersuchung des Einflusses von Transkriptionsfaktoren auf die Ablesung der beschriebenen Isoformen ist nicht Thema dieser Arbeit und sollte Gegenstand weiterer, vor allem funktioneller Untersuchungen sein.
Die Auswertung der Grenzen der einzelnen Exons auf genomischer Ebene zeigte, dass einige der putativen Spleißstellen eher nicht der Konsensussequenz für konstitutionelles Spleißen folgen [38]. Aufgrund der Heterogenität der entstehenden Isoformen und der Annahme, dass alternative Spleißprozesse an deren Entstehung beteiligt sind, verwundert diese Beobachtung jedoch nicht, denn gerade alternative Spleißvorgänge können sich auch außerhalb der Normen für konstitutionelles Spleißen bewegen [80].
Funktionelle Untersuchungen aller hier beschriebenen Elemente müssen zeigen, inwieweit sie Aufgaben bei der Regulation von EAAT2 erfüllen.
Nicht zuletzt haben die Erkenntnisse über die genomische Organisation der Exons noch einen weiteren wichtigen Effekt: Es bietet sich die Gelegenheit, mit einer neuen Nomenklatur, die auf der Lokalisation auf DNA-Ebene beruht, die Organisation der EAAT2-5´-UTR etwas übersichtlicher zu gestalten.

5.3.1. Alternatives Spleißen der 5´-Isoformen

Zu den zunehmend beachteten Mechanismen der komplexen Regulation vieler Genprodukte zählen auch die in der vorliegenden Arbeit behandelten Spleißprozesse in der Synthese der EAAT2-mRNA. Duch alternatives Spleißen erhält die Zelle die Möglichkeit, bei Ablesung eines Genortes eine große Anzahl unterschiedlicher mRNA mit unter Umständen modifizierten Funktionen zu synthetisieren. Damit ist dieser Mechanismus vor allem beim Menschen ein wesentlicher Beitrag dazu, eine Diversifizierung des menschlichen Genoms in dem Sinne zu erreichen, dass aus einer begrenzten Anzahl Gene eine fast zehnmal so große Anzahl funktioneller Proteine generiert wird.
Alternatives Spleißen kommt sowohl in proteinkodierenden Bereichen wie auch in der UTR vor [80]. Gerade durch alternatives Spleißen in Bereichen, die für die posttranskriptionelle Regulation des Genproduktes verantwortlich sind, werden umfangreiche Steuerungsmechanismen geschaffen. Zu diesen Bereichen zählen ohne Zweifel auch 5´-Untranslatierte Regionen, wie sie bei EAAT2 in dieser Arbeit beschrieben werden.

Wie der Abbildung 26 zu entnehmen ist, gibt es bei den bisher bekannten 5´-Isoformen von EAAT2 ein breites Spektrum an alternativ gespleißten Exons, die aus einem Pool von zehn bisher bekannten genomischen UTR-Exons zusammengefügt werden.

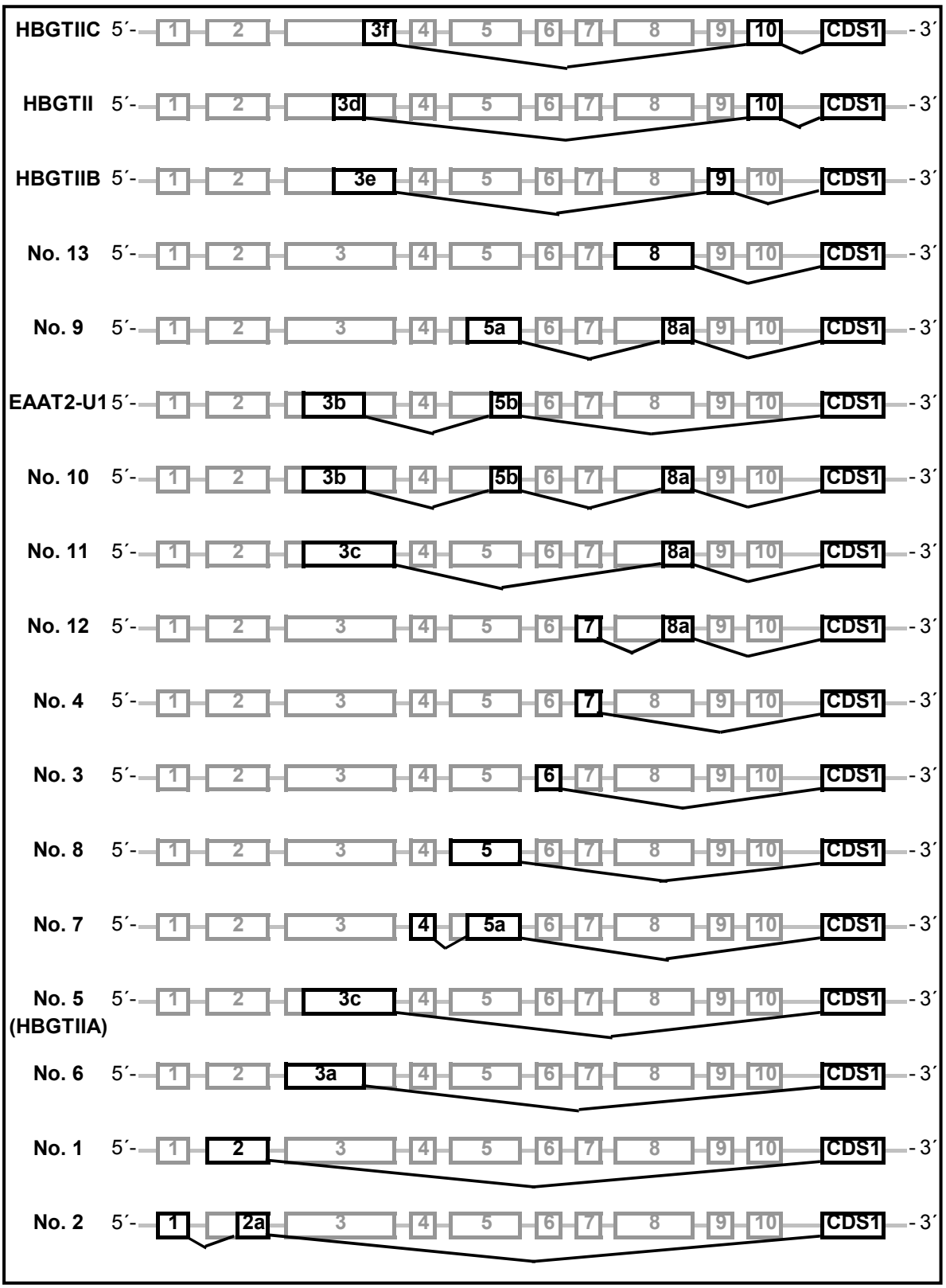

Abbildung 26 Genomische Organisation aller bisher beschriebenen Isoformen Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht, die Größen der Introns variieren zwischen einigen 100 bp und etwa 100.000 bp, ebenso die der Exons zwischen 49 bp und 552 bp. (bp: Basenpaare, CDS: *coding sequence*, HBGTIIA-C: *Human brain glutamate transporter II A-C*, EAAT2-U1: *Excitatory amino acid transporter 2-U1*)

Es können zum Einen Motive wie das 5´-Ende von 5UT-Ex8 (Exon 49, 255 bp) ausgewählt werden, die mit einer Häufung von sieben uATG-Kodons eine effektive Translation des Transporters sehr unwahrscheinlich machen. Oder aber es werden Exons wie 5UT-Ex7 vor den proteinkodierenden Bereich gefügt, die nur ein uATG enthalten, das aufgrund seines Sequenzumfeldes über eine eher niedrige Ablesewahrscheinlichkeit verfügt, so dass es nur zu einer geringgradigen Hemmung der EAAT2-Translation kommen dürfte.
Eine weitere Option bietet sich durch das Spleißen von Exon 5UT-Ex8a vor den proteinkodierenden Bereich. Dieses Exon enthält zwei alternative Startkodons, so dass die Polypeptidsequenz von EAAT2 um sieben bzw. 25 Aminosäuren verlängert wird. Was dies für die Funktionaltät des EAAT2 für Konsequenzen hat, muß noch gezeigt werden, auf jeden Fall können aber geringe Variationen am N-Terminus die Stabilität eines Proteins und damit seine Verfügbarkeit in der Zelle massiv ändern [123]. Bewiesen wurde auch die Relevanz eines beispielsweise durch alternatives Spleißen veränderten Genproduktes für eine modifizierte Expression mehr oder weniger funktioneller Proteine [20,116]. Interessante Parallelen lassen sich zu dem zerebralen Glycin-Transporter GLYT1 erkennen: Er erhält durch alternatives Spleißen des gleichen Genortes zwei unterschiedliche N-Termini mit einem abweichenden Bereich von 10 bzw. 15 AS, gegen die spezifische Antikörper produziert wurden und so ein differentielles Verteilungsmuster nachgewiesen wurde [51]. Die funktionellen Effekte alternativen Spleißens umfassen neben der veränderten Stabilität und Translationseffizienz der mRNA auch Änderungen in der Proteinlokalisation und –aktivität bis zur völligen Ausschaltung [113].

5.4. Regionale Verteilungsmuster von 5´-Isoformen

Die hauptsächliche Bedeutung der glutamatvermittelten Neurotransmission liegt sicherlich im zentralen Nervensystem, welches folglich im Mittelpunkt dieser Arbeit steht. Damit überrascht es nicht, dass auch für den Glutamattransporter EAAT2 als wichtigstem Modulator der extrazellulären Glutamatkonzentration eine praktisch ubiquitäre Präsenz im ZNS erwachsener Menschen nachgewiesen wurde, wobei es in der Quantität der Expression durchaus regionale Unterschiede gibt [79].
Das Vorkommen glutamatabhängiger Signalübertragung ist aber keineswegs auf das ZNS beschränkt, sondern Glutamat ist auch elementar an der neuroendokrinen Transmission beteiligt. Eine wichtige Rolle spielt Glutamat beispielsweise an den Inselzellen des Pankreas, dort wurde neben Glutamatrezeptoren, deren Blockade die Insulinsekretion moduliert [25] auch der Glutamattransporter EAAT2 nachgewiesen [69]. Gerade in der Bauch-

speicheldrüse könnte der Transporter wichtige Funktionen bei der Regulation der Insulinfreisetzung erfüllen, da Glutamat auch als intrazellulärer Botenstoff in ß-Zellen fungiert [68]. Verschiedene hochaffine Glutamattransporter finden sich in nahezu allen menschlichen Geweben in sehr unterschiedlichen Konzentrationen. So fanden sich beispielsweise in der Leber Varianten von EAAT2 mit unterschiedlichen N-und C-Termini [121], und andere Gewebe wie die Niere [126] beherbergen die EAAT2-mRNA, ohne dass eine Expression stattzufinden scheint.

Vor dem Hintergrund des differentiellen Vorkommens von EAAT2 im ZNS wie in peripheren Organen bei gleichzeitigem Vorhandensein von EAAT2-mRNA in vielen Zellen, wo keine Translation stattfindet [10], wird die Bedeutung der Kenntnis differentieller Expressionsmuster der 5´-Isoformen als Hinweis auf mögliche Regulationsmechanismen klar. Wie soll eine topisch-differentielle Regulation von EAAT2 durch die in dieser Arbeit beschriebenen 5´-untranslatierten Regionen aussehen? Eine Antwort hierauf könnte der Vergleich mit der Regulation der Argininosuccinatsynthetase geben. Sie zeigt bei identischen kodierenden Regionen des Enzyms gewebespezifische Funktionsunterschiede, indem sie in der Leber für die Harnstoffproduktion und in den Endothelzellen für die Bildung von NO verantwortlich ist. Welcher Weg eingeschlagen wird, ist entscheidend abhängig von der Anwesenheit eines etwa 50 Nukleotide langen Abschnittes in den 5'-Untranslatierten Regionen des Enzyms [87].

Ein Mosaikstein für ein umfassendes Verständnis der 5´-UTR des hochaffinen Glutamattransporters EAAT2 ist also die Kenntnis eines regionalen, entwicklungsspezifisch und pathogenetisch differentiellen Verteilungsmusters der einzelnen Isoformen. In dieser Arbeit wurden regionale Verteilungsmuster der neu beschriebenen Sequenzen mittels *Northern Arrays* erstellt, die Ergebnisse zeigen eine gewebespezifische Betonung der untersuchten Sequenzen. Gerade die am weitesten zum 3´-Ende gelegenen Motive gaben starke Signale für mRNA aus Pankreas, Duodenum und Appendix. Dies deutet darauf hin, dass die Expression des im Pankreas beschriebenen Glutamattransporters EAAT2 mit den ATG-reichen Motiven des UTR-Exons EAAT2-5UT-Ex8 posttranskriptionell reguliert sein könnte. Dagegen zeigen sich in den untersuchten Hirnregionen weniger signifikante Unterschiede, hier ist von einem ubiquitären Vorkommen dieser Motive auszugehen.

Weitere Arbeiten müssen folgen, um ein differentielles Expressionsmuster aller beschriebenen UTR-Sequenzen in verschiedenen Geweben und bei pathologischen Zuständen zu ermitteln. Ebenso müssen funktionelle Untersuchungen zeigen, welchen Effekt die UTR-Motive bei der Translation des Transporters EAAT2 erfüllen.

5.5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Beitrag zu einer Vervollständigung des Wissens über die strukturellen Merkmale der EAAT2-RNA und der genomischen Organisation des Transporters geleistet. In der Zukunft werden vor allem funktionelle Untersuchungen folgen müssen, um Aussagen über die physiologische Relevanz der verschiedenen UTR-Motive bei der Steuerung der Expression des Transporters machen zu können. Dabei gilt es sowohl Steuerungsmechanismen der Transkription wie auch der Translation zu erfassen.

Auch die Frage nach weiteren 5´-UTR-Isoformen und ihrer genomischen Organisation gilt es in Zukunft zu vertiefen. Im Zuge dieser Arbeit sollten auch Exon- / Introngrenzen festgelegt und mit den Kombinationsmöglichkeiten von einzelnen Exons die Heterogenität der EAAT2-5´-UTR weiter erforscht werden. Zur Komplettierung der bisher bekannten genomischen Organisation wird es ein dringendes Anliegen sein, die Sequenzinformation der genomischen Region, in der sich die 5´-UTR-Motive finden, in 5´-Richtung zu vervollständigen.

Erste Hinweise auf ein topisch-differentielles Verteilungsmuster der unterschiedlichen 5´-Isoformen sowohl im zentralen Nervensystem wie auch in peripheren Organen sollten Anlaß dazu sein, in Zukunft beispielsweise mittels *in situ*-Hybridisierungen und *multiple-tissue-RNA-Array*-Experimenten alle beschriebenen Isoformen dahingehend zu untersuchen und ein möglichst genaues Verteilungsmuster zu erstellen.

Die Aufklärung der EAAT2-Genregulation unter physiologischen Bedingungen ist Voraussetzung für die Untersuchung der EAAT2-Proteinexpression bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen mit nachgewiesener EAAT2-Proteinexpressionstörung und liefert damit mögliche Ansatzpunkte für potentielle neue diagnostische und therapeutische Ansätze. In aktuellen Untersuchungen am transgenen Mausmodell der ALS in der eigenen Arbeitsgruppe entstanden Hinweise auf eine krankheitsspezifische und präklinische Veränderung von EAAT2-Spleißprozessen. Diese Beobachtung ist für die zukünftige Identifizierung eines frühen biologischen Markers für die chronische Neurodegeneration von besonderer Relevanz. Daher wird es in der Zukunft von Interesse sein, die Expression von 5´-EAAT2-Spleißvarianten im Krankheitsverlauf der ALS zu untersuchen und krankheitsassoziierte Spleißprodukte zu identifizieren.

Die zukünftige Entwicklung eines biologischen Markers bei der ALS und anderen Formen der chronischen Neurodegeneration ist von prinzipiellem Interesse, da eine effektive Therapie dieser Erkrankungen vor allem bei einer frühzeitigen Diagnosestellung möglich ist.

Gerade durch eine frühzeitige Diagnose können mögliche neue therapeutische Optionen wie eine pharmakologische EAAT2-Steuerung konsequent genutzt werden, wenn sie auch keine kausale Therapie darstellen. Bisher nur ein theoretischer Ansatz wäre beispielsweise eine gezielte regionspezifische Modulation der Expression des Glutamattransportes ohne Beeinflussung der EAAT2-Expression in anderen Hirnregionen.

Ein zukünftiger Ansatzpunkt für eine pharmakologisch modifizierte EAAT2-Expression könnte das neuronale Polypeptid PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) sein [31]. Es führt über verschiedene Spleißvarianten des Rezeptors PAC1 zur abgestuften Aktivierung von Proteinkinase A- und Proteinkinase C-Isoformen und darüber zu einer differentiellen EAAT2-Expression in Gliazellen. Auch andere Ansatzpunkte wie die Gabe von EGF (*epidermal growth factor*)-Analoga, welche die EAAT2-Expression stimulieren [132] und damit den Neuronenverlust bei akuter wie chronischer Neurodegeneration begrenzen könnten, bieten möglicherweise in der Zukunft neue Behandlungschancen.

Detailliertes Wissen um die Regulation der topischen Expression der EAAT2-Isoformen auf Translationsebene könnte bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen dazu beitragen, die extrazelluläre Glutamatkonzentration regionenspezifisch niedrig zu halten und somit die glutamaterg vermittelte Exzitotoxizität zu vermindern oder zu verhindern. Dadurch wäre eine gezielte Neuroprotektion gefährdeter Hirnstrukturen ohne wesentliche Beeinflussung anderer Regionen möglich.

6. Zusammenfassung

Die große Bedeutung von Glutamat als wichtigstem exzitatorischen Transmitter im zentralen Nervensystem ist bekannt. Doch die gleichzeitige Fähigkeit von Glutamat, als potentiell neurotoxischer Stoff Hirnareale irreversibel zu schädigen, verlangt eine sehr genaue Regulierung besonders der extrazellulären Glutamatkonzentration. Diese gelingt nach heutigem Kenntnisstand in nennenswerter Weise nur durch die Aufnahme von Glutamat über Glutamattransporter, die vorzugsweise in Gliazellen lokalisiert sind. Während über die Morphologie und Funktion der Transporter gute Kenntnisse vorliegen, sind die Mechanismen, welche ihre Expression modulieren, noch weitgehend unklar. In Analogie zu anderen Genprodukten wird den 5´-Untranslatierten Regionen der Glutamattransporter eine zentrale Rolle im Rahmen dieser Regulation zugeschrieben.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die 5´-Heterogenität des humanen Glutamattransporters EAAT2[1] auf drei verschiedenen Ebenen untersucht. Neben der strukturellen Beschreibung auf RNA[2]-Ebene gelang die Aufklärung der Organisation auf DNA[3]-Ebene, und darüberhinaus ergaben sich mit der Beschreibung einer topisch-differentiellen Expression erste Hinweise auf eine Funktion der behandelten Regionen.

Eine wesentliche Aufgabe in der Steuerung der Expression plasmamembranaler Glutamattransporter wird posttranskriptionellen Regulationsmechanismen zugedacht. Diese werden zu einem wesentlichen Teil durch 5´-Untranslatierte Regionen der mRNA[4] übernommen, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt. Es ist – anknüpfend an vorausgegangene Arbeiten – deutlich geworden, dass der Glutamattransporter EAAT2 zu den Genprodukten gehört, die über eine außerordentliche Heterogenität in ihren 5´-Untranslatierten Regionen verfügen. Dabei werden alle beschriebenen Isoformen aus zehn derzeit bekannten genomischen Exons durch alternatives Spleißen zusammengestellt, wobei zusätzlich interne alternative Spleißstellen in einzelnen Exons die Komplexität der 5´-Untranslatierten Regionen nochmals deutlich erhöhen.

Auf der Basis der Kenntniss der RNA-Struktur war eine weitere Aufklärung der genomischen Organisation des EAAT2 möglich. Dabei wurde deutlich, dass neben den elf zuvor charakterisierten proteinkodierenden Exons weitere zehn Exons von untranslatierten Regionen existieren. Die Erkenntnis, dass sich praktisch ebenso viele putativ regulatorische

[1] *Excitatory amino acid carrier 2*

[2] *Ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure)

[3] *Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)

[4] *messenger ribonucleic acid* (Boten-Ribonukleinsäure)

wie proteinkodierende Exons von EAAT2 finden, kann als indirekter Hinweis darauf dienen, dass es sich hier um einen wichtigen biologischen Mechanismus handelt. Die Beschreibung der genomischen Organisation der 5´-Untranslatierten Regionen des Glutamattransporters EAAT2 in dieser Arbeit erweitert das Wissen um die Zusammensetzung einzelner Isoformen aus alternativ gespleißten Exons maßgeblich.

Offensichtlich existieren verschiedene Varianten der 5´-Untranslatierten Regionen nebeneinander, möglicherweise mit einem differentiellen topischen Verteilungsmuster. Belege hierfür ergaben sich durch Northern Blot Experimente in Form von Expressions-Arrays in dieser Arbeit, die eine differentielle Expression bestimmter Sequenzmotive im zentralen Nervensystem und darüberhinaus auch ein Vorkommen in peripheren Geweben wie Pankreas, Appendix und Duodenum zeigten. Damit ist ein erster Hinweis auf eine funktionelle Verteilung der beschriebenen 5´-Isoformen im zentralen Nervensystem und bei der neuroendokrinen Kontrolle peripherer Gewebe gelungen.

Über die Aufgaben der untranslatierten Regionen kann bisher nur spekuliert werden, funktionelle Experimente sind erforderlich, um die Bedeutung der 5´-Heterogenität auf Expressionsebene sowie hinsichtlich elektrophysiologischer und pharmakologischer Eigenschaften zu überprüfen.

Die Bedeutung der Heterogenität der untranslatierten Regionen der hochaffinen Glutamattransporter für die Pathogenese von neurologischen Erkrankungen kann mit dem derzeitigen Kenntnisstand noch nicht abschließend eingeschätzt werden. Eine pathogenetische Beteiligung von EAAT2-Spleißprozessen ist aufgrund der EAAT2-Expressionsstörung bei akuten (Ischämie, Trauma, Hypoxie) und chronischen (ALS[5], Morbus Huntington, Temporallappenepilepsie) Krankheiten möglich und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen an Patienten und Modellsystemen dieser neurologischen Erkrankungen.

[5] Amyotrophe Lateralsklerose

7. Literaturverzeichnis

1. Abastado J-P, Miller PF, Hinnebusch AG. A quantitative model for translational control of the GCN4 gene of Saccharomyces cerevisiae. *New biol.* 1991; **3:** 511-524
2. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25:** 3389-3402
3. Arrick BA, Lee AL, Grendell RL, Derynck R. Inhibition of translation of transforming growth factor-β3 mRNA by its 5´-Untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* 1991; **11:** 4306-4313
4. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; **94:** 4155-4160
5. Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* 1994; **14:** 5559-5569
6. Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A. Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease – an in situ hybridization study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1997; **56:** 440-454
7. Attwell D, Barbour B, Szatkowski M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 1993; **11:** 401-407
8. Balcar VJ, Borg J, Mandel P. High affinity uptake of L-Glutamate and L-Aspartate by glial cells. *J. Neurochem.* 1977; **28:** 87-93
9. Balvay L, Libri D, Fiszman LY. Pre-mRNA secondary structure and the regulation of splicing. *Bioessays* 1993; **15:** 165-169
10. Berger UV, Hediger MA. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anat. Embryol. (Berl.)* 1998; **198:** 13-30
11. Brawerman G. Determinants of mRNA stability. *Cell.* 1987; **48:** 5-6
12. Brown DR. Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J. Neurochem.* 1999; **73:** 1105-1113
13. Casado M, Bendahan A, Zafra F, Danbolt NC, Aragón C, Giménez C, Kanner BI. Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1993; **268:** 27313-27317

14. Cattaneo R. Different types of mRNA editing. *Annu. Rev. Genet.* 1991; **25:** 71-88
15. Cech TR. RNA Editing: World´s smallest introns? *Cell.* 1991; **64:** 667-669
16. Chu SC, Wu H-P, Banks TC, Eissa NT, Moss J. Structural diversity in the 5´-Untranslated region of cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase mRNA. *J. Biol. Chem.* 1995; **270:** 10625-10630
17. Danbolt NC, Storm-Mathisen J, Kanner BI. An [Na^++K^+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 1992; **51:** 295-310
18. Danbolt NC. The high affinity uptake system for excitytory amino acids in the brain. *Prog. Neurobiol.* 1994; **44:** 377-396
19. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 2001; **65:** 1-105
20. Daoud R, Da Penha Berzaghi M, Siedler F, Hubener M, Stamm S. Activity-dependent regulation of alternative splicing patterns in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 1999; **11:** 788-802
21. Davis JB, Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 1994; **652:** 169-173
22. Day DA, Tuite MF. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J. Endocrinol.* 1998; **157:** 361-371
23. Denhez F, Lafyatis R. Conservation of regulated alternative splicing and identification of functional domains in vertebrate homologs to the drosophila splicing regulator, suppressor-of-white-apricot. *J. Biol. Chem.* 1994; **269:** 16170-16179
24. Devarajan P, Gilmore-Hebert M, Benz EJ. Differential translation of the Na,K-ATPase subunit mRNAs. *J. Biol. Chem.* 1992; **267:** 22435-22439
25. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev*. 1999; **51:** 7-61
26. Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol. Ther.* 1999; **81:** 163-221
27. Dowd LA, Robinson MB. Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na^+-dependent L-glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *J. Neurochem.* 1996; **67:** 508-16
28. Dunlop J, Lou Z, Zhang Y, McIllvain HB. Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter. *Br. J. Pharmacol.* 1999; **128:** 1485-1490

29. Eberwine J, Miyashiro K, Kacharmina JE, Job C. Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; **98:** 7080-7085
30. European Union Chromosome 3 Arabidopsis Sequencing Consortium. Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 2000; **408:** 820-2
31. Figiel M, Engele J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J. Neurosci.* 2000, 20(10): 3596-3605
32. Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 1984; **42:** 1-11
33. Fonnum F. Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1993; **60:** 47-57
34. Fujita H, Sato K, Wen T-C, Peng Y, Sakanaka M. Differential expression of Glycine Transporter 1 and three glutamate transporter mRNA in the hippocampus of gerbils with transient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999; **19:** 604-615
35. Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 1997; **17:** 8363-8375
36. Gegelashvili G, Schousbou A. High affinity glutamate transporters: Regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* 1997; **52:** 6-15
37. Grant CM, Miller PF, Hinnebusch AG. Sequences 5´of the first upstream open reading frame in GCN4 messenger RNA are required for efficient translation reinitiation. *Nucleic Acids Res.* 1995; **23:** 3980-3988
38. Green MR. Pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Genet.* 1986; **20:** 671-708
39. Grens A, Scheffler IE. The 5´- and 3´-Untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA affect the translational efficiency. *J. Biol. Chem.* 1991; **265:** 11810-11816
40. Guan KL, Weiner H. Influence of the 5´-end region of aldehyde dehydrogenase mRNA on translational efficiency. *J. Biol. Chem.* 1989; **264:** 17764-17769
41. Gundersen V, Danbolt NC, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience* 1993; **57:** 97-111
42. Hazell AS, Rao KV, Danbolt NC, Pow DV, Butterworth RF. Selective down-regulation of the astrocyte glutamate transporters GLT-1 and GLAST within the medial thalamus in experimental Wernicke`s encephalopathy. *J. Neurochem.* 2001; **78:** 560-568

43. Hentze MW. Determinants and regulation of cytoplasmatic mRNA stability in eucaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1991; **1090:** 281-292
44. Hentze MW. Translational regulation: versatile mechanisms for metabolic and developmental control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; **7:** 393-398
45. Honda S, Harada N, Takagi Y. The alternative exons 1 of the mouse aromatase cytochrome P-450 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; **1305:** 145-150
46. Imataka H, Nakayama K, Yasumoto K, Mizuno A, Fujii-Kuriyama Y, Hayami M. Cell-specific translational control of transcription factor BTEB expression. *J. Biol. Chem.* 1994; **269:** 20668-20673
47. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409:** 860-921
48. Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U. Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; **96:** 8733-8
49. Jackson RJ, Kaminski A. Internal initiation of translation in eukaryotes: The picornavirus paradigm and beyond. *RNA* 1995; **1:** 985-1000
50. Jackson RJ, Wickens M. Translational controls impinging on the 5´-Untranslated region and initiation factor proteins. *Curr. Opinion Genet. Dev.* 1997; **7:** 233-241
51. Jursky F, Tamura S, Tamura A, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J. Exp. Biol.* 1994; **196:** 283-295
52. Kanaka T. Enzymes responsible for glutamate synthesis and degradation. In: Otterson OP, Storm-Mathisen J (Hrsg.). Handbook of chemical neuroanatomy, Vol. 18: Glutamate, 1. Auflage, Elsevier Science B.V., S. 203-230
53. Kozak M. Context effects and inefficient initiation at non-AUG Codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell. Biol.* 1989; **9:** 5073-5080
54. Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *J. Cell. Biol.* 1991; **115:** 887-903
55. Kozak M. Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented ny G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* 1997; **16:** 2482-2492
56. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 1999; **234:** 187-208

57. Kozak M. Do the 5´-Untranslated domains of human cDNAs challenge the rules for initiation of translation (or is it vice versa)? *Genomics* 2000; **70:** 396-406
58. Kozak M. New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol. Cell. Biol.* 2001; **21:** 1899-1907
59. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* 1992; **90:** 41-54
60. Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 1995; **15:** 1835-1853
61. Liévens JC, Salin P, Had-Aissouni L, Mahy N, Kerkerian-Le Goff L. Differential effects of corticostriatal and thalamostriatal deafferentation on expression of the glutamate transporter GLT1 in the rat striatum. *J. Neurochem.* 2000; **74:** 909-919
62. Lin CI, Orlov I, Ruggiero AM, Dykes-Hoberg M, Lee A, Jackson M, Rothstein JD. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 2001; **410:** 84-88
63. Lipton SA, Rosenberg PA. Mechanism of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 1994; **330:** 613-622
64. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999; **79:** 1431-1568
65. Ludolph AC, Meyer T, Riepe MW. The role of excitotoxicity in ALS – what is the evidence? *J. Neurol.* 2000; **247 [Suppl. 1]:** I/7-I/16
66. Luukkonen BGM, Tan W, Schwartz S. Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J. Virol.* 1995; **69:** 4086-4094
67. Madl JE, Burgesser K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 1993; **13:** 4429-4444
68. Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 1999; **402:** 685-9
69. Manfras BJ, Rudert WA, Trucco M, Boehm BO. Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human brain and pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; **1195:** 185-188

70. Manzella JM, Blackshear PJ. Regulation of rat ornithine decarboxylase mRNA translation by its 5´-Untranslated region. *J. Biol. Chem.* 1990; **265:** 11817-11822
71. Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer`s disease. *Ann. Neurol.* 1996; **40:** 759-766
72. Masliah E, Alford M, Mallory M, Rockenstein E, Moechars D, Van Leuven F. Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Exp. Neurol.* 2000; **163:** 381-387
73. Mathern GW, Mendoza D, Lozada A, Pretorius JK, Dehnes Y, Danbolt NC, Nelson N, Leite JP, Chimelli L, Born DE, Sakamoto AC, Assirati JA, Fried I, Peacock WJ, Ojemann GA, Adelson PD. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 1999; **52:** 453-472
74. Meyer T, Speer A, Meyer B, Sitte W, Küther G, Ludolph AC. The glial glutamate transporter complementary DNA in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1996; **40:** 456-459
75. Meyer T, Ludolph AC, Morkel M, Hagemeier C, Speer A. Genomic organization of the human excitatory amino acid transporter gene GLT-1. *Neuroreport* 1997; **8:** 775-777
76. Meyer T, Münch C, Knappenberger B, Liebau S, Völkel H, Ludolph AC. Alternative splicing of the glutamate transporter EAAT2 (GLT-1). *Neurosci. Lett.* 1998; **241:** 68-70
77. Meyer T, Münch C, Liebau S, Fromm A, Schwalenstöcker B, Völkel H, Ludolph AC. Splicing of the glutamate transporter EAAT2: a candidate gene of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1998; **165:** 954
78. Meyer T, Fromm A, Münch C, Schwalenstöcker B, Fray AE, Ince PG, Stamm S, Gron G, Ludolph AC, Shaw PJ. The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. *J. Neurol. Sci.* 1999; **170:** 45-50
79. Milton ID, Banner SJ, Ince PG, Piggott NH, Fray AE, Thatcher N, Wilson Horne CH, Shaw PJ. Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1997; **52:** 17-31
80. Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res.* 2001; **29:** 2850-2859

81. Münch C, Schwalenstöcker B, Knappenberger B, Liebau S, Völkel H, Ludolph AC, Meyer T. 5´-Heterogenity of the human excitatory amino acid transporter cDNA EAAT2 (GLT-1), *Neuroreport* 1998; **9:** 1295-7
82. Münch C, Ebstein M, Seefried U, Zhu B, Stamm S, Landwehrmeyer GB, Ludolph AC, Schwalenstöcker B, Meyer T. Structure and expression of alternatively spliced 5´-sequences of the mouse EAAT2 glutamate transporter and regulation in a transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. *Publikation in Vorbereitung*
83. Nicholls D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990; **11:** 462-468
84. Ohnuma T, Tessler S, Arai H, Faull RLM, McKenna PJ, Emson PC. Gene expression of metabotropic glutamate receptor 5 and excitatory amino acid transporter 2 in the schizophrenic hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000; **85:** 24-31 G7
85. Olney JW, de Gubareff T. Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea. *Nature* 1978; **271:** 557-9
86. Olson AL, Edgington NP, Moye-Rowley WS, Pessin JE. Characterization of 5´-Heterogeneity of the rat GLUT4/Muscle-Adipose glucose transporter gene product. *Endocrinology* 1995; **136:** 1962-1968
87. Pendleton LC, Goodwin BL, Flam BR, Solomonson LP, Eichler DC. Endothelial argininosuccinate synthase mRNA 5'-UTR diversity: Infrastructure for tissue specific expression. *J. Biol. Chem.* 2002; im Druck
88. Pestova TV, Hellen CUT. Ribosome recruitment and scanning: what's new? *Trends Biochem. Sci.* 1999; **24:** 85-87
89. Phelps DE, Hsiao K-M, Li Y, Hu N, Franklin DS, Westphal E, Lee EY-HP, Xiong Y. Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor $p18^{INK4c}$ expression during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 1998; **18:** 2334-2343
90. Pierrat B, Lacroute F, Losson R. The 5´untranslated region of the PPR1 regulatory gene dictates rapid mRNA decay in yeast. *Gene* 1993; **131:** 43-51
91. Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 1992; **360:** 464-467
92. Preiss T, Hentze MW. From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999; **9:** 515-521
93. Proper EA, Hoogland G, Kappen SM, Jansen GH, Rensen MGA, Schrama LH, van Veelen CWM, van Rijen PC, van Nieuwenhuizen O, Gispen WH, de Graan PNE.

Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 2002; **125:** 32-43

94. Rao VLR, Baskaya MK, Dogan A, Rothstein JD, Dempsey RJ. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) protein in rat brain. *J. Neurochem.* 1998; **70:** 2020-2027
95. Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1992; **326:** 1464-1468
96. Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994; **13:** 713-725
97. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1995; **38:** 73-84 G49
98. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996; **16:** 675-686
99. Sachs AB. Messenger RNA Degradation in eukaryotes. *Cell* 1993; **74:** 413-421
100. Sagliocci FA, Vega Laso MR, Zhu D, Tuite MF, McCarthy JEG, Brown AJP. The influence of 5′-secondary structures upon ribosome binding to mRNA during translation in yeast. *J. Biol. Chem.* 1991; **268:** 26522-26530
101. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; **74:** 5463-5467
102. Sasaki S, Komori T, Iwata M. Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2000; **100:** 138-144
103. Savitsky K, Platzer M, Uziel T, Gilad S, Sartiel A, Rosenthal A, Elroy-Stein O, Shiloh Y, Rotman G. Ataxia teleangiectasia: structural diversity of untranslated sequences suggests complex post-transcriptional regulation of ATM gene expression. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25:** 1678-1684
104. Schmitt A, Asan E, Lesch KP, Kugler P. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 2002; **109:** 45-61

105. Schwalenstöcker B. Charakterisierung der 5´-Heterogenität des Glutamattransporters EAAT2 (GLT-1) durch molekulare Klonierung. *Diplomarbeit TFH Berlin* 1998

106. Schwalenstöcker B. Molekulare Charakterisierung von 5´-RNA-Spleißvarianten des Glutamattransporters EAAT2. *Arbeit im Rahmen des Eignungsfeststellungsverfahrens Universität Ulm* 2001

107. Sepulveda AR, Carter BZ, Habib GM, Lebovitz RM, Liebermann MW. The mouse γ-glutamyl transpeptidase gene is transcribed from at least five separate promoters. *J. Biol. Chem.* 1994; **269:** 10699-10705

108. Shashidharan P, Plaitakis A. Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human cerebellum. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; **1216:** 161-164

109. Shashidharan P, Huntley GW, Meyer T, Morrison JH, Plaitakis A. Neuron-specific human glutamate transporter: molecular cloning, characterization and expression in human brain. *Brain Res.* 1994; **662:** 245-250

110. Shashidharan P, Wittenberg I, Plaitakis A. Molecular cloning of human brain glutamate/aspartate transporter II. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; **1191:** 393-396

111. Simantov R, Crispino M, Hoe W, Broutman G, Tocco G, Rothstein JD, Baudry M. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in rat hippocampus following kainate-induced seizure activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999; **65:** 112-123

112. Smith CW, Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 2000; **25:** 381-388

113. Smith CWJ, Patton JG, Nadal-Ginard B. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* 1989; **23:** 527-577

114. Sommer B, Köhler M, Sprengel R, Seeburg PH. RNA-Editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 1991; **67:** 11-19

115. Stamm S, Zhang MQ, Marr TG, Helfman DM. A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons. *Nucleic Acids Res.* 1994; **22:** 1515-1526

116. Stevens BR, Kakuda DK, Yu K, Waters M, Vo CB, Raizada MK. Induced Nitric oxide synthesis is dependent on alternative spliced CAT-2 encoding L-arginin transport in brain astrocytes. *J. Biol. Chem.* 1996; **271:** 24017-24022

117. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression and functional analysis of a Na^+-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1992; **89:** 10955-10959

118. Svenson IK, Ashley-Koch AE, Pericak-Vance MA, Marchuk DA. A second leaky splice-site mutation in the spastin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; **69:** 1407-1409

119. Takai S, Kawakami H, Nakayama T, Yamada K, Nakamura S. Localization of the gene encoding the human L-glutamate transporter (GLT-1) to 11p11.2-p13 by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 1996; **97:** 387-389

120. Trotti D, Aoki M, Pasinelli P, Berger UV, Danbolt NC, Brown RH, Hediger MA. Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J. Biol. Chem.* 2001; **276:** 576-582

121. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett.* 1997; **416:** 312-316

122. Van der Velden AW, Thomas AAM. The role of the 5´-Untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; **31:** 87-106

123. Varshavsky A. The N-end rule: Functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **93:** 12142-12149

124. Volterra A, Trotti D, Racagni G. Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 1994; **46:** 986-992

125. Weinberg AD, Swain SL. IL-2 receptor (Taq Antigen) protein expression is down-regulated by the 5´-untranslated region of the mRNA. *J. Immunol.* 1990; **144:** 4712-4720

126. Welbourne TC, Matthews JC. Glutamate transport and renal function. *Am. J. Physiol.* 1999; **277:** F501-F505

127. Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple Sclerosis : Altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann. Neurol.* 2001; **50:** 169-180

128. Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas APC, Skoda RC. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. *Nat. Genet.* 1998; **18:** 49-52

129. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; **88:** 2692-2696

130. Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Nagashima M, Tanaka K, Inoue Y. Glutamate transporter GLT-1 is transiently localized on growing exons of the mouse spinal cord before establishing astrocytic expression. *J. Neurosci.* 1998; **18:** 5706-5713

131. Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H. A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. indica). *Science* 2002; **296:** 79-92

132. Zelenaia O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD, Robinson MB. Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glial glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transription factor NF-kB. *Mol. Pharmacol.* 2000; **57:** 667-678

133. Zimmer A, Zimmer AM, Reynolds K. Tissue specific expression of the retinoic acid receptor β2: Regulation by short open reading frames in the 5´-noncoding region. *J. Cell. Biol.* 1994; **127:** 1111-1119

8. Danksagung

Bei Herrn **Professor Dr. A.C. Ludolph** bedanke ich mich sehr herzlich für die freundliche Übernahme der Doktorvaterschaft, die konstante Unterstützung des Projekts sowie für die Anregungen und wertvollen Diskussionsbeiträge, die diese Arbeit erst ermöglicht haben. Er hat damit meine Ausbildung entscheidend gefördert. Weiterhin danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts, die zum erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit führte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **PD Dr. Thomas Meyer** für die Überlassung des Themas sowie die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Seine engagierten Hilfestellungen, besonders bei der Auswertung der Ergebnisse und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft haben entscheidend zur zügigen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Frau **Dipl.-Ing. Birgit Schwalenstöcker** danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden sowie die permanente und ausdauernde Anleitung und Unterstützung, insbesondere während der experimentellen Phase.

Bei allen Mitarbeitern unserer Laborgemeinschaft, der Experimentellen Neurologie der Universität Ulm, bedanke ich mich für die gute und angenehme Zusammenarbeit sowie die zahlreichen Tips und Ratschläge bei allen anfallenden praktischen Problemen.

Meinen Eltern danke ich für die langjährige Unterstützung in jedem Abschnitt meiner Ausbildung.