Abteilung für Neurologie
der Universität Ulm

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A.C. Ludolph

Alternatives RNA-Spleißen des Glutamattransporters EAAT2 im ZNS der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Ulrich Seefried

geboren in Oettingen/Bay.

2001

Amtierender Dekan: Professor Dr. R.Marre

1.Berichterstatter: Professor Dr. A.C. Ludolph

2.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Engele

Tag der Promotion: 26.10.2001

1 Inhaltsverzeichnis

1 INHALTSVERZEICHNIS 3

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 5

3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 6

4 TABELLENVERZEICHNIS 6

5 EINLEITUNG 7
5.1 Das glutamaterge System 7
5.2 Die Na^+ abhängigen hochaffinen plasmamembranalen Glutamattransporter 8
5.2.1 Übersicht über die Glutamattransporterfamilie EAAT 8
5.2.2 Der Glutamattransporter EAAT2 9
5.3 Störung der Glutamatwiederaufnahme bei neurologischen Erkrankungen 10
5.3.1 Prinzip der glutamatvermittelten Neurotoxizität 10
5.3.2 Glutamattransporter-Störungen bei chronischer Neuronendegeneration 10
5.3.3 Akute Neurodegeneration 11
5.4 Expressionsregulation von Genen und deren Mechanismen 12
5.4.1 Alternatives Spleißen 12
5.4.2 Alternatives Spleißen bei EAAT2 13
5.5 EAAT2 der Maus 14
5.6 Aufgaben 16

6 MATERIAL UND GERÄTE 17
6.1 Chemikalien 17
6.2 Marker 17
6.3 Kits 18
6.4 Vektor und Bakterien 18
6.5 Enzyme 18
6.6 Oligonukleotide 18
6.7 Verbrauchsmaterial 18
6.8 EDV Programme 18
6.9 Puffer und Lösungen 19
6.9.1 Gelelektrophorese 19
6.9.2 Klonierung 19
6.9.3 Sequenzierung 20
6.10 Geräte 20

7	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	21
7.1	Agarosegel-Elektrophorese	21
7.2	5‘-RACE	22
7.3	Klonierung von cDNA	24
7.3.1	Ligation	24
7.3.2	Transformation	24
7.3.3	Wachstum und Selektion einzelner Kolonien	25
7.4	Isolierung von Plasmid-DNA	26
7.4.1	Isolierung durch Miniprep	26
7.4.2	Restriktionsverdau	26
7.5	Sequenzierung	27
7.6	Auswertung der erhaltenen Sequenzen	28
8	ERGEBNISSE	29
8.1	RACE	29
8.2	Klonierung	30
8.3	Isolierung von Plasmid-DNA	30
8.4	Sequenzierung	31
8.5	Heterogenität des 5‘-UTR der Maus	32
8.6	Darstellung der vier neuartigen MEAAT2-Isoformen	33
8.7	Vergleich mit publizierten Sequenzen	38
9	DISKUSSION	39
9.1	Nachweis und Charakterisierung neuartiger 5‘-Spleißformen des MEAAT2	39
9.2	Bedeutung der neuartigen MEAAT2 - 5‘-UTR - Isoformen	40
9.2.1	Die 5‘-UTR	40
9.2.2	Alternative proteinkodierende Sequenz	41
9.2.3	uATG und uORF	41
9.2.4	Regulatorische Elemente im 5‘-UTR	42
9.3	Bedeutung der neuartigen 5‘-Isoformen für die Pathogenese	43
9.4	Ausblick	44
9.5	Schlußfolgerung	45
10	ZUSAMMENFASSUNG	46
11	LITERATURVERZEICHNIS	48
12	DANKSAGUNG	54

2 Abkürzungsverzeichnis

5‘-UTR	5‘-Untranslatierte Region, mRNA-Bereich, der nicht translatiert wird
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose; degenerative Motoneuronerkrankung
AP1, AP2	Adaptor Primer 1 bzw. 2
AS	Aminosäure
ATG, atg	Startkodon im genetischen Code
bp	Basenpaare; Längenangabe doppelsträngiger Nukleotidsequenzen
CDS	Codierende Sequenz (Proteinkodierende DNA-Sequenz)
C-Terminus	Carboxyterminus eines Peptids, das die freie Carboxylgruppe trägt
cDNA	Complementary (Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5‘-triphosphat
EAAC-1	*Excitatory amino acid carrier*-1
EAAT	*Excitatory amino acid transporter*
EtBr	Ethidiumbromid
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLTR	Glutamattransporter
GLT-1	Glutamattransporter-1
HBGT	*Human brain glutamate transporter*
HGlut1	*Human glutamate transporter 1*
IF, eIF	Initiationsfaktor; eukaryotischer Initiationsfaktor
IPTG	Isopropylthio-ß-D-Galaktopyranosid
kDa	kiloDalton (atom. Masseneinheit)
MM	Mus musculus: Hausmaus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nt	Nukleotide; Längenangabe einer einsträngigen Nukleotidsequenz
N-Terminus	Aminoterminus eines Peptids, das die freie Aminogruppe trägt
ORF	*open reading frame*; Offener Leserahmen; translatierte DNA
PrP106-126	pathogenetisch bedeutsames Peptid für Prionerkrankungen
RACE	*Rapid amplification of cDNA ends*; PCR-Methode
mRNA	messenger (Boten-)RNA
snRNA	*small nuclear RNA*
TAE	Puffer aus Tris-Base, Eisessig und EDTA
TBE	Puffer aus Tris Base, Borsäure und Na_2EDTA
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-ß-D-Galaktosid

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übergang vom 5'-UTR zum proteinkodierenden Bereich von vier humanen EAAT2-Varianten 13
Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Isoformen des MEAAT2 15
Abbildung 3: Flußdiagramm der angewendeten Methoden 21
Abbildung 4: Bindungsstellen der Primer AP1, AP2, MO5 und MO21 22
Abbildung 5: Darstellung des linearisierten Vektors pCR®2.1 24
Abbildung 6: Erste und *nested PCR* 29
Abbildung 7: Restriktionsverdau der vier Klone mit neuen Sequenzmotiven 30
Abbildung 8: Die vier verschiedenen neuen Isoformen von MEAAT2 32
Abbildung 9: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT1 33
Abbildung 10: Darstellung der beiden uORF von MEAAT2-5UT1 33
Abbildung 11: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT2 34
Abbildung 12: Darstellung der drei uORF von MEAAT2-5UT2 34
Abbildung 13: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT3 35
Abbildung 14: Darstellung des uORF von MEAAT2-5UT3 35
Abbildung 15: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT4 36
Abbildung 16: Darstellung der vier uORF von MEAAT2-5UT4 37
Abbildung 17: Vergleich der neuen Isoformen mit bereits bekannten Transporterformen des Menschen und der Maus 38

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die bisher publizierten fünf verschiedenen Na^+-abhängigen hochaffinen Glutamattransportertypen 8
Tabelle 2: Übersicht über die sieben bisher publizierten MEAAT2 14
Tabelle 3: Die beiden uORF von MEAAT2-5UT1 33
Tabelle 4: Die drei uORF von MEAAT2-5UT2 35
Tabelle 5: Der uORF von MEAAT2-5UT3 36
Tabelle 6: Die vier uORF von MEAAT2-5UT4 37
Tabelle 7: Darstellung der uATG der vier neuartigen Isoformen 37

5 Einleitung

5.1 Das glutamaterge System

Glutamat ist der quantitativ bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter, der bei vielen Funktionen des ZNS, einschließlich motorischer, mnestischer und kognitiver Funktionen, eine wichtige Rolle spielt [7]. Die physiologische glutamaterge Transmitterfreisetzung erfolgt durch Aktionspotentiale Ca^{++}-abhängig aus präsynaptischen Vesikeln [44]. Glutamat aktiviert postsynaptisch Glutamatrezeptoren, von denen zur Zeit drei verschiedene Klassen bekannt sind: Ligandengesteuerte Ionenkanal-Rezeptoren (Klasse 1) wie NMDA-Rezeptoren und Non-NMDA (AMPA/Kainate)-Rezeptoren sowie G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Klasse 2). Da es für Glutamat keinen extrazellulären Metabolismus gibt, muß es durch einen zellulären Wiederaufnahmemechanismus (membranständige Transporterproteine) aus dem synaptischen Spalt entfernt werden [7].

Gegenwärtig sind drei Systeme von Glutamattransportern bekannt: Das Na^+ -abhängige hochaffine System, ein Cl^--abhängiges und ein Protonen-abhängiges, die sich in ihrem pharmakologischen und funktionellem Verhalten erheblich voneinander unterscheiden [2, 22].

Für das Na^+ abhängige hochaffine System, das Gegenstand dieser Arbeit ist, sind folgende Funktionen zu differenzieren:

- Rückführung von Glutamat in präsynaptische neuronale Zellen: Nach Wiederaufnahme von Glutamat durch Gliazellen wird das durch die Glutamin-Synthetase entstandene Glutamin in den Extrazellulärraum abgegeben oder als Substrat im Zitratzyklus oxidiert. Neurone können extrazelluläres Glutamin aufnehmen, wieder zu Glutamat resynthetisieren und in Vesikeln speichern.
- Modulation und mögliche Beteiligung an der Termination der Signaltransmission.
- Schutz der Neurone vor Exzitotoxizität durch Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration [7, 61].

In Neuronen erfolgt der Transport in die Vesikel Na^+-unabhängig, mit einer geringen Affinität und für Glutamat-Anionen spezifisch. Er wird durch ein ATPase-abhängiges Membranpotential an der Innenseite der Vesikel, das Protonen in die Vesikel pumpt, aufrechterhalten. Die extrazelluläre Glutamatkonzentration beträgt ca. 1 µM, die zytoplasmatische ca. 1 mM, im Vesikel ca. 0,5 M [10, 44].

5.2 Die Na^+ abhängigen hochaffinen plasmamembranalen Glutamattransporter

5.2.1 Übersicht über die Glutamattransporterfamilie EAAT

Gegenwärtig sind die fünf Transporter EAAT1 - 5 bekannt, die molekular charakterisiert sind. Sie unterscheiden sich in mehreren Merkmalen:

- Topik und Anzahl der transmembranalen Domänen.
- Expressionsmuster histologisch, zellulär und subzellulär [14].
- Pharmakologische Eigenschaften [3].

EAAT2 wird ubiquitär im Gehirn und Rückenmark exprimiert [41], während EAAT1 bevorzugt im Cerebellum [52], aber auch, wie EAAT3, in Organen außerhalb des ZNS nachgewiesen wurde [3]. EAAT4 wurde bisher nur im Cerebellum und EAAT5 nur retinal kloniert [4, 11]. EAAT1 und EAAT2 sind astrogliäre, EAAT3 und EAAT4 neuronenspezifische Transporter.

Tabelle 1: Übersicht über die bisher publizierten fünf verschiedenen Na^+-abhängigen hochaffinen Glutamattransportertypen mit Angabe der Namen, Organismen, Genbankloki sowie der Autoren und der Literaturangabe. Abk.: genom., genomische DNA. Alle anderen Transporter sind aus cDNA isoliert.

Name	Mensch	Tiere	Gen Bank	Autor/Erstbeschreiber	Lit.
EAAT1		GLAST (Ratte)	X 63744	Storck 1992	64
	HBGT		L 19158	Shashidaran 1993	56
	EAAT1		U 03504	Arriza 1994	3
	HGLUT1		D 26443	Kawakami 1994	23
	Glast1(genom.)		Z31703-	Stoffel 1996	63
		MGlut1 cDNA (Maus)	--------	Tanaka 1993	68
		mGlut1 (genom. Maus)	D 63816	Hagiwara 1996	17
EAAT2		**GLT1** (Ratte)	X 67857	Pines 1992	46
	HBGT2		U 01824	Shashidaran 1994	58
	EAAT2		U 03505	Arriza 1994	3
	GLTR		Z 32517	Manfras 1994	32
		Maus → Tabelle 2			
EAAT3		EAAC1(Frosch)	L 12411	Kanai, Hediger 1992	20
	HBGT3		U 08989	Shashidaran 1994	57
	EAAT3		U 03506	Arriza 1994	3
	HEAAC1		U 06469	Kanai 1994	21
		mEAAC1 (Maus)	D 43797	Mukainaka/Tanaka 1995	42
EAAT4	EAAT4		U 18244	Fairman 1995	11
		mEAAT4 (Maus)	D 83262	Maeno-Hikichi 1997	31
EAAT5	EAAT5		U 76362	Arriza 1997	4

5.2.2 Der Glutamattransporter EAAT2

EAAT2 wird ubiquitär im ZNS exprimiert, überwiegend in perisynaptischen Gliazellen [3, 7, 52]. Lokalisationen mit hoher Expression sind der Kortex, Nucleus caudatus, Nucleus basalis Meynert, Hippocampus und das spinale Vorderhorn [41]. Es zeigte sich, daß der astrogliäre Transporter EAAT2 für über 90% der Glutamat-Wiederaufnahme verantwortlich ist, wobei der Verlust von EAAT2 einen starken Anstieg der synaptischen Glutamatkonzentration zur Folge hat [69].

Beim Transport werden zwei Na^+ und ein H^+ im Kotransport mit einem Glutamat-Anion entlang ihres über der Membran liegenden elektrochemischen Gradienten in die Zelle aufgenommen, ein K^+ aus der Zelle heraustransportiert [7]. Der elektrochemische Na^+/K^+-Gradient muß durch die Na/K-ATPase aufrechterhalten werden, da sonst der Transport sistiert oder sich dessen Richtung umkehrt [44].

Die erstmalige Klonierung von EAAT2 erfolgte im Hirngewebe der Ratte. GLT1 (Ratte) kodiert für ein Protein mit 573 Aminosäuren (1719 nt), die relative molekulare Masse beträgt 64 kDa [46].

In weiteren Untersuchungen konnten drei humane EAAT2-Transkripte charakterisiert werden. Der proteinkodierende Bereich von EAAT2 (62,1 kDa) ist zu 95% [3], von GLTR zu 87,5% [32] und von HBGTII zu 88% [58] identisch mit GLT1. Das menschliche EAAT2 Gen liegt auf Chromosom 11p13-p12 [27] bzw. 11p11.2-p13 [67]. Es umfaßt mehr als 50 Kilobasen genomischer DNA und enthält zehn proteinkodierende Exons, die zwischen 127 und 251 Nukleotide lang sind. Dazwischen liegen Introns mit einer Länge von 2,2 bis ca.15 Kilobasen Länge [37].

Die proteinkodierenden Bereiche von EAAT2 und GLTR sind identisch, die 5‘-UTR von EAAT2 ist im Vergleich zu GLTR am 5‘-Ende um 56 Basen verkürzt. Dagegen hat HBGTII eine am N-Terminus um neun Aminosäuren verkürzte proteinkodierende Sequenz. Durch ein anderes UTR-Exon fehlt das Translationsstartkodon, so daß diese erst beim nächsten *in-frame* liegenden ATG beginnt, das im Exon CDS1 liegt [58].

Weitere 5‘-UTR-Transkriptvarianten von EAAT2 mit sich wiederholenden und neuen Sequenzen, die durch **alternatives Spleißen** entstanden sind, wurden beschrieben [54].

5.3 Störung der Glutamatwiederaufnahme bei neurologischen Erkrankungen

Eine Störung der EAAT2-Expression ist bei verschiedenen akuten und chronischen neurologischen Erkrankungen in den entsprechenden Hirnregionen nachgewiesen. Eine primäre Funktionsstörung des Transporters im Sinne eines inaktiven, funktionslosen Proteins ist bisher nicht bekannt.

5.3.1 Prinzip der glutamatvermittelten Neurotoxizität

Die extrazelluläre Glutamatkonzentration muß durch die plasmamembranären Glutamattransporter sehr niedrig (0,6 µM) gehalten werden, da erhöhte Konzentrationen (2 - 5 µM) neurotoxisch wirken können [29].

Das Prinzip der Exzitotoxizität beschreibt die durch erhöhte synaptische Glutamatkonzentration exzessive postsynaptische Glutamatrezeptor-Aktivierung (Ionenkanalöffnung). Die prolongierte Neuronendepolarisation löst drei Mechanismen aus, die zum Untergang von Neuronen führen:

a) Erhöhten Na^{+}- und Wasser-Einstrom mit der Folge der osmotischen Zellschwellung, die (initial potentiell reversibel) für den frühen Zelltod verantwortlich ist.
b) Exzessiver Ca^{++}-Einstrom, der verschiedene Enzymkaskaden (Lipasen, Nukleasen, Proteasen und Kinasen) aktiviert, die schließlich zur (verzögerten) Zellyse führt.
c) Andauernde Glutamat-Freisetzung durch Zelluntergang oder Ca^{++}-induzierter postsynaptische Glutamatvesikel-Exozytose mit der Folge der Ausbreitung der Exzitotoxizität [9].

5.3.2 Glutamattransporter-Störungen bei chronischer Neuronendegeneration

Eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration [50] und stark erniedrigte EAAT2–Proteinexpression im Rückenmark und im motorischen Kortex wurden bei der **amyotrophen Lateralsklerose** (ALS) nachgewiesen [53], wobei die vorhandenen Transporter sich als funktionell aktiv erwiesen und keinen Affinitätsverlust zeigten [51]. Andere Untersuchungen weisen diesen EAAT2-Transporter-Verlust nur im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks auf [13].

Mutationsuntersuchungen des EAAT2 Gens auf DNA- und RNA-Ebene konnten genomische Ursachen ausschließen. Sie zeigten verschiedene alternative EAAT2-Spleißvarianten sowohl bei ALS Patienten als auch bei Kontrollen, so daß die ALS-Spezifität dieser Transkripte in Frage steht. Vielmehr ist anzunehmen, daß

alternativ gespleißte mRNA-Isoformen die posttranskriptionelle Genregulation beeinflussen [39]. Eine negativdominante Herabregulation des normalen Glutamattransporters durch aberrante EAAT2-Spleißformen oder ihre Proteine wurde berichtet [28].

Bei Patienten mit **Epilepsie** und Hippocampussklerose zeigte sich iktal und periiktal eine erhöhte Glutamatkonzentration im Hippocampus. Es wurden Neuronenverluste sowie eine verminderte EAAT2-Protein-Expression im Hippocampus-Hilus und Sommer'schen Sektor (CA1) beschrieben [35]. Untersuchungen in einem Rattenmodell der Epilepsie ergaben eine verminderte GLT-1 mRNA Expression im Kortex, Striatum, CA1 und stärker ausgeprägt im Colliculus inferior, während das GLT-1-Protein nicht signifikant vermindert war [1].

Bei Patienten mit **Demenz vom Alzheimer Typ (DAT)** fand sich eine verminderte EAAT2-Proteinaktivität im frontalen Kortex [33], Cingulus caudatus und Hippocampus, nicht jedoch im occipitalen und motorischen Kortex [55]. Die EAAT2-mRNA ist im Gegensatz zur Proteinkonzentration nicht vermindert [26, 34]. Es wird diskutiert, daß proteolytische Amyloid-Precursor-Protein-Produkte die posttranskriptionelle EAAT2-Regulation negativ beeinflussen [34].

In Mausmodellen gibt es Hinweise dafür, daß bei **spongiformer Enzephalopathie** (Creutzfeld-Jacob-Erkrankung) die Glutamatwiederaufnahme in Astrozytenkulturen gehemmt wird. Das pathogenetisch bedeutsame Polypeptid PrP106-126 des humanen Prionproteins ist möglicherweise dafür verantwortlich [6].

Bei **Morbus Huntington** wurde eine Verminderung der EAAT2-mRNA in Korrelation zur Schwere der Erkrankung in verschiedenen Bereichen des Neostriatums beschrieben [5].

5.3.3 Akute Neurodegeneration

Auch bei akuten neurologischen Erkrankungen wurden Veränderungen des Glutamattransporter-Systems beschrieben [9, 29, 49]:

- Mechanische Zellschädigung bei Schädel-Hirn-Trauma führt zu exzessiver Glutamatfreisetzung.
- ATP Mangel bei akuter Ischämie, Hypoxie oder Hypoglykämie führt durch Hemmung der Na/K-ATPase zu einem intrazellulärem Na^+-Anstieg (Abfall des elektrochemischen Gradienten), worauf der Na^+-Glutamat-Kotransport sistiert oder sich dessen Richtung umkehrt und die extrazelluläre

Glutamatkonzentration ansteigt. Die exzessive Glutamaterhöhung führt Glutamatrezeptor-vermittelt zur Exzitotoxizität.

- EAAT2-Expressionsstörungen nach Ischämie, Hypoxie und Trauma wurden berichtet, die zur prolongierten Neuronenschädigung beitragen. Bei **Schädel-Hirn-Trauma** wurde eine transiente Herabregulation des GLT1-Proteins [48], bei **ischämischem Insult** der GLT1-mRNA beobachtet [70].

5.4 Expressionsregulation von Genen und deren Mechanismen

Die Expression eines Gens wird überwiegend über die Transkription gesteuert [65]. Zunehmend wird aber auch die Bedeutung der posttranskriptionellen Modifikationen der prä-mRNA an der Expressionsregulation erkannt, vor allem die Entstehung sowie die Struktur und Funktion der untranslatierten Bereiche der mRNA [60]. Diese sind zentraler Gegenstand dieser Arbeit.

Verschiedene Mechanismen wie 5‘-Capping und 3‘-Polyadenylierung sowie Spleißen und auch alternatives Spleißen determinieren die Struktur der reifen mRNA. Initiationsfaktoren, regulatorische Proteine und Response-Elemente beeinflussen die Translationsrate und die mRNA-Stabilität, besonders über Interaktionen mit den untranslatierten Regionen [8, 18, 47].

5.4.1 Alternatives Spleißen

Neben dem konstitutiven Spleißen kommt dem alternativen Spleißen der prä-mRNA eine zunehmende Bedeutung zu [19, 60]. Beim konstitutiven Spleißen werden die Introns an ganz bestimmten Stellen, den *5‘-* und *3‘-splicing-consensus-sequences* und der *branch-point sequence*, durch das *spliceosome*, einem Komplex aus snRNA und Proteinen, herausgeschnitten und die Exons ligiert. Beim alternativen Spleißen werden andere als die üblichen Spleißstellen verwendet. Durch Veränderungen der stark konservierten konstitutiven Spleißstellen können die snRNA-Untereinheiten U1, U2 und U5 intensiver an kryptische Spleißstellen binden [60]. Die verschiedenen Formen alternativen Spleißens und die Veränderungen der Spleißstellen wurden insbesondere im Gehirn systematisch untersucht [62].

Die durch alternatives Spleißen entstandene heterogene reife mRNA kann qualitativ und quantitativ andere Funktionen aufweisen. Das Translationsprodukt kann auch an einer anderen Lokalisation verwendet werden [60].

5.4.2 Alternatives Spleißen bei EAAT2

Bei Untersuchungen an humanem Hirngewebe wurden drei 5‘-UTR-Transkriptvarianten von EAAT2, HBGTIIA-C kloniert. HBGTIIA hat einen fünf Aminosäuren längeren N-Terminus als HBGTII, der durch Deletion einer 119 Nukleotide langen Sequenz zustande kommt. Die anderen beiden Varianten bestehen aus neuen und bereits bekannten Exons [36]. Zwei weitere 5‘-UTR-Isoformen von EAAT2 wurden beschrieben, die aus bekannten Exons von EAAT2 und HBGTII sowie den drei Varianten HBGTIIA-C zusammengesetzt sind [43].
Auch in der Aminosäurenkodierenden Region wurden zwei Isoformen identifiziert, die durch alternatives Spleißen entstehen. In einem spezifischen Transkript EAAT2-C1 wird ein kodierendes Exon deletiert, bei EAAT2-C2 existieren interne Spleißstellen in benachbarten Exons [38].
Daraufhin wurde die Heterogenität des regulierenden 5‘-UTR näher untersucht und mehr als neun 5‘-Isoformen kloniert, die aus zum Teil schon bekannten Exons und neuen Sequenzen bestehen. Insgesamt wurden mindestens acht verschiedene Exons identifiziert, die unterschiedlich miteinander kombiniert sind und auch den N-Terminus betreffen. Drei Isoformen enthalten stromaufwärts gelegene Translationsstartkodons. Dadurch ist der offene Leserahmen bei diesen Isoformen um fünf, neun bzw. 25 Aminosäuren gegenüber HBGTII verlängert [54].

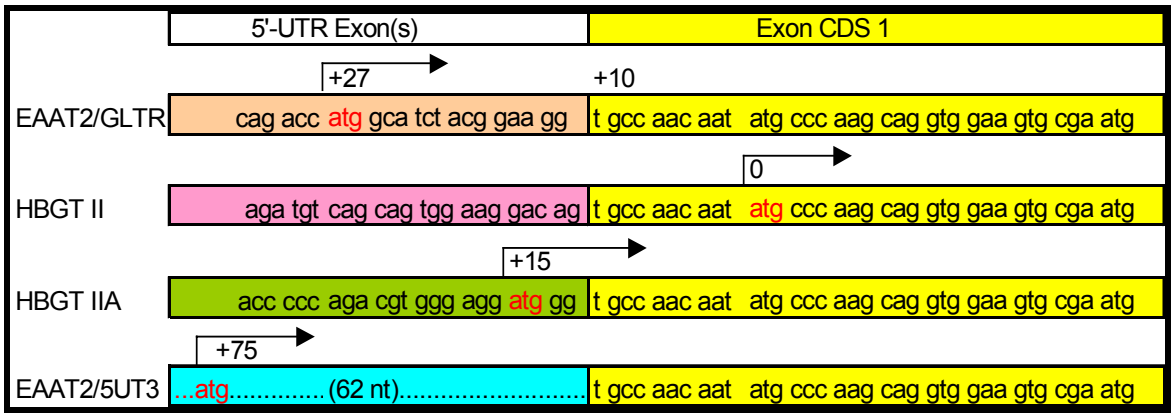

Abbildung 1: Übergang vom 5‘-UTR zum proteinkodierenden Bereich von vier humanen EAAT2-Varianten.
Bei HBGTII startet die Translation erst im Exon CDS1 (gelb). Bei EAAT2/GLTR, HBGTIIA und EAAT2/5UT3 sind durch alternativ gespleißte Exons stromaufwärts vom Exon CDS1 die offenen Leserahmen (ORF) um 27, 15 bzw. 75 nt erweitert. Die Startkodons atg sind rot dargestellt, der ORF mit Pfeilen sowie mit der atg Nukleotidposition stromaufwärts vom HBGTII-ORF (0) markiert. 5‘-UTR Exon(s): 5‘-untranslatierte Region Exons. Siehe auch Anmerkung zur Nomenklatur.

Anmerkung zur Nomenklatur: siehe 5.5 EAAT2 der Maus (S.15).

5.5 EAAT2 der Maus

Verschiedene hochaffine Glutamattransportergruppen der Maus wurden identifiziert und publiziert. Sie zeigen zu den entsprechenden humanen Transportern Homologien von über 90% (Tab.1). Die histologische und zelluläre Expression entspricht dem bereits bei anderen Organismen bekanntem Muster [42].

Tabelle 2: Übersicht über die sieben bisher publizierten murinen EAAT2.
Angegeben sind die Namen der Transporter, der Genbank-Lokus, der Autor sowie die Literaturangabe. MM: Mus Musculus (Hausmaus).

Name	Gen-Bank	Autor/Erstbeschreiber	Lit.
MM EAAT2 mRNA	U 11763	Kirschner 1994	24
MEAAT2	U 24699	Sutherland 1995	66
MM glutamate transporter mRNA	U 75371	Peng 1996	45
MGLT-1	D 43796	Mukainaka/Tanaka 1995	42
MM mGLT-1 mRNA	AB007810	Utsunomiya-Tate/Kanai 1997	71
MM mGLT-1A mRNA	AB007811	Utsunomiya-Tate/Kanai 1997	71
MM mGLT-1B mRNA	AB007812	Utsunomiya-Tate/Kanai 1997	71

Vom gliären Transportertyp MEAAT2 sind bisher sieben Nukleotidsequenzen publiziert, wovon zwei jedoch bisher ausschließlich aus der Leber isoliert wurden [71]. Fünf werden nur im ZNS, bevorzugt im Neokortex, Hippocampus, Cerebellum, Rückenmark und in der Retina exprimiert [66].

MM mGLT-1 mRNA (AB007810), MGLT-1 (D43796) und MM EAAT2 mRNA (U11763) sind hinsichtlich der Aminosäurensequenz identisch, unterscheiden sich nur in fünf bzw. sieben Nukleotiden.

Bei MM glutamate transporter mRNA (U75371) sind acht Nukleotide sowie zwei Aminosäuren substituiert, bei einer ebenso langen CDS von 1719 bp (573 AS). Dagegen besitzt MEAAT2 (U24699) bei 15 Nukleotidsubstitutionen vier andere Aminosäuren und der C-Terminus hat zwei zusätzliche Aminosäuren.

Die 5‘-UTR Sequenzen sind bis auf wenige Nukleotidsubstitutionen und -deletionen identisch mit unterschiedlichen Längen von 182, 187, 615 und 659 bp.

Die beiden leberspezifischen Isoformen MM mGLT-1A und -1B entstehen vermutlich durch alternatives Spleißen. Während bei Variante A die sechs N-terminalen durch drei andere Aminosäuren substituiert werden, findet sich bei

Variante B zusätzlich der Ersatz der 22 C-terminalen durch 11 andere Aminosäuren. Die Leberspezifischen besitzen außerdem einen von den übrigen Varianten verschiedenen 5‘-UTR mit 27 bzw. 38 bp Länge [71].
Untersuchungen auf genomischer Ebene wurden bei MEAAT2 bisher nicht berichtet. Ebenso sind keine Isoformen im ZNS bekannt.

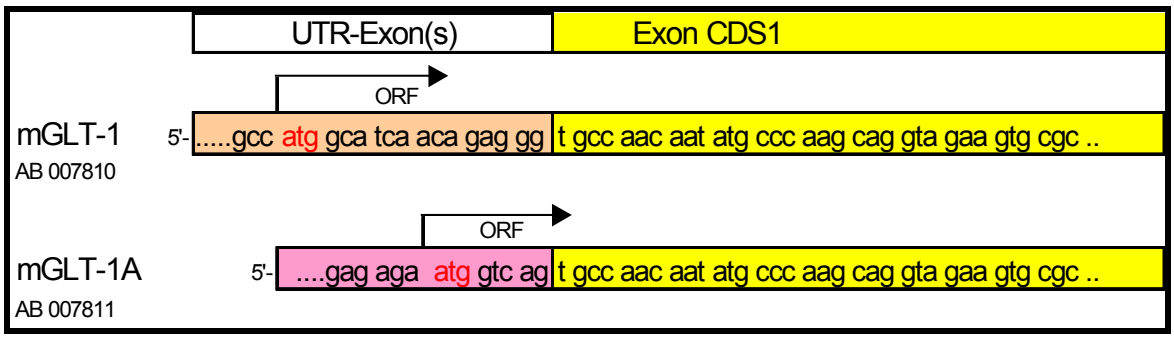

Abbildung 2: Darstellung der verschiedenen Isoformen des MEAAT2.
Analog der humanen Varianten ist das Exon CDS1 gelb dargestellt. Stromaufwärts davon befinden sich unterschiedliche UTR-Exons, die jeweils das Startkodon atg enthalten. Das ZNS-spezifische UTR-Exon ist okerfarben, das der leberspezifischen Isoform ist rosa markiert. Der offene Leserahmen (ORF) der ZNS-Isoform ist am 5‘-Ende um neun Nukleotide verlängert. Der ORF ist mit Pfeilen markiert.

Anmerkung zur Nomenklatur:

Sowohl bei den humanen als auch bei den murinen EAAT2 existiert derzeit keine einheitliche Nomenklatur. Deshalb wird für diese Arbeit folgendes definiert:

- Das **Exon CDS1** (codierende Sequenz; immer gelb dargestellt) ist das erste gemeinsame proteinkodierende Exon aller (M)EAAT2-Isoformen.
- Alle Exons stromaufwärts vom Exon CDS1 werden immer als **UTR-Exon(s)** (untranslatierte Region-Exon(s)) bezeichnet, obwohl dort (außer bei HBGTII) der proteinkodierende Bereich, der als offener Leserahmen (*open reading frame* = ORF) bezeichnet wird, beginnt.
- Aufgrund der hohen Homologie zwischen dem murinen und humanen EAAT2 wird in dieser Arbeit analog der humanen Nomenklatur bei der Maus das **Exon CDS1** als das erste gemeinsame proteinkodierende Exon definiert, wenngleich der ORF bei allen bisher bekannten MEAAT2-Isoformen in stromaufwärts gelegenen Exon(s) (hier als **UTR-Exons** bezeichnet) beginnt.

5.6 Aufgaben

EAAT2 spielt bei der Wiederaufnahme des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat aus dem synaptischen Spalt im gesamten ZNS eine entscheidende Rolle. Verschiedene Untersuchungen zeigten auf, daß bei diversen akut und chronisch neurologischen Erkrankungen EAAT2 vermindert exprimiert wird. Es wird diskutiert, daß unter anderem Regulationsstörungen des EAAT2-Gens verantwortlich dafür sind.

Die EAAT2-Genregulation unter normalen und pathogenetischen Bedingungen ist allerdings bisher nur unvollständig verstanden. Daher rücken Erkenntnisse über regulatorische Mechanismen in den Mittelpunkt des Interesses. Die Befunde im humanen ZNS zeigen eine sehr komplexe Regulation, insbesondere posttranskriptionell. Aus diesem Grund ist ein vereinfachtes Modell hilfreich und notwendig. Die Maus wurde aus folgenden Gründen als Modell gewählt:

- Durch den Wegfall postmortaler Zeiten können dadurch bedingte artifizielle Veränderungen minimiert werden.
- Untersuchungen sind sowohl im allgemeinen zeitlichen Verlauf als auch im Krankheitsverlauf besser möglich, bereits in präklinischen (symptomfreien) Phasen.
- In transgenen Mausmodellen können kontrollierte Situationen hergestellt und analysiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, neuartige MEAAT2-Spleißformen möglichst umfassend zu identifizieren und nach folgenden Gesichtspunkten zu charakterisieren:

- Gibt es alternatives 5‘-Spleißen auch bei der murinen RNA von EAAT2?
- Sind diese Spleißmechanismen mit denen des Menschen vergleichbar?
- Sind sie vergleichbar komplex oder einfacher als beim Menschen?

6 Material und Geräte

6.1 Chemikalien

2-Propanol pro analysi	Merck
Acryl Amide/Bis solution, 29:1 (3,3%C)	Bio Rad
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
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Sigma
Harnstoff	Roth
IPTG (Isopropylthio-ß-D-Galaktopyranosid)	Sigma
Kanamycin	Sigma
LB Medium (Lennox L Broth Base)	Gibco BRL
LB-Agar (Lennox L Agar)	Gibco BRL
Li Chrosolv®Wasser für Chromatographie	Merck
Mineralöl	Sigma
N‘-N‘-Dimethylformamid	Sigma
Natrium Hydroxid Plätzchen pro analysi	Merck
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	USB
TEMED (N,N,N‘,N‘- Tetramethylethylendiamin)	Pharmacia Biotech
Tris Base	USB
Tris Electrophoresis Purity Reagent	Bio Rad
x-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl- ß-D-Galaktosid)	Sigma

6.2 Marker

DNA Molekulargewichtsmarker *100 base pair ladder*	Pharmacia Biotech

6.3 Kits

Advantage cDNA PCR Kit	Clontech
Mouse brain, whole Marathon-Ready cDNA	Clontech
Original TA Cloning Kit	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Thermo Sequenase Dye Terminator cycle sequencing pre mix kit	Amersham

6.4 Vektor und Bakterien

pCR®2.1 linearisiert, im *Original TA Cloning Kit* enthalten	Invitrogen
Epicurian Coli®XL2-Blue MRF ultracompetent cells	Stratagene

6.5 Enzyme

EcoRI (10 U/µl) Boehringer Mannheim
incl. 10x SuRE/CUT-Puffer H

6.6 Oligonukleotide

Primer MO5:	5‘-GAA GGC TAT CAA CAT GAC CAC ATC;	T_m = 54,2 °C;
Primer MO21:	5‘-CAT GCG CAT GCC CAG GTT TC;	T_m = 60,8 °C;
Primer AP1:	5‘-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC;	T_m = 71,0 °C;
Primer AP2:	5‘-ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC;	T_m = 77,0 °C;
M13 forward:	5‘-GTA AAA CGA CGG CCA G;	T_m = 43,6 °C;
M13 revers:	5‘-CAG GAA ACA GCT ATG AC;	T_m = 36,2 °C;

Alle Oligonukleotide sind von Interactiva Biotechnologie GmbH

6.7 Verbrauchsmaterial

Cellstar PP-Röhrchen, steril 15 ml	Greiner Labortechnik
PCR Softtubes 0,2 ml, 2 ml	BIOzym Diagnostik
Petrischalen 94/16 mm TC	Greiner Labortechnik
Original Eppendorf Standartips 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf Reference

6.8 EDV Programme

Elektrophorese Gele:	Gel Doc 1000, Molekular Analyst ™(Bio-Rad)
Sequenzierung:	ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer)
Auswertung der Sequenzierungen:	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
	DNA-Star Inc.

6.9 Puffer und Lösungen

6.9.1 Gelelektrophorese

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

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

0,5M EDTA: 186,1 g Ethylendiamintetraessigsäure
auf 800 ml dH_2O
pH 8,0 einstellen mit NaOH.

10xProbenpuffer: 0,5844g EDTA
10 g Glycerol
0,1 g SDS
0,02 g Bromphenolblau
auf 20 g mit dH_2O auffüllen.

DNA Molekulargewichtsmarker *100 base pair ladder*
200 µl *100 base pair ladder*
650 µl dH_2O
150 µl 10xProbenpuffer
1000 µl Marker

Ethidiumbromid: 10 mg/ml Stammlösung Sigma

6.9.2 Klonierung

LB Medium: 20 g Lennox L Broth Base in 1000 ml dH_2O; autoklavieren; nach dem Abkühlen auf unter 80°C 25 mg Kanamycin dazugeben.

Agarplatten: 32 g Lennox L Agar in 1000 ml dH_2O; autoklavieren; nach Abkühlen auf unter 80°C 25 mg Kanamycin dazugeben; Platten gießen und abkühlen lassen.

ITPG stock solution: 23,8 mg ITPG auf 1 ml dH_2O (100 mM).

x-Gal: 40 mg in 1 ml N‘-N‘-Dimethylformamid (0,943g/ml).

Kanamycin Stammlösung: 10 mg/ml.

6.9.3 Sequenzierung

Gel:	30 ml dH_2O (Li Chrosolv®Wasser)
	31,5 g Harnstoff
	9,0 ml 10x TBE
	12,6 ml (30%) Acryl Amide
	450 µl APS
	45 µl TEMED.
10x TBE Puffer:	108 g Tris Electrophoresis Purity Reagent
	55 g Borsäure
	7,4 g Na_2EDTA
	auf 1000 ml dH_2O (Li Chrosolv®Wasser).

6.10 Geräte

ABI Prism™ 377 DNA-Sequenzer	P.E. Applied Biosystems
Analysenwaage BP 1105	Sartorius
Autoklav, Modell 2540EL	Tuttnauer
Centrivac PLCT 60 E VR-1	Heraeus
Elektrophoresekammer (sub-Cell GT-System)	Bio-Rad
Heiz und Magnetrührer (IKAMAG RH)	Janke & Kunkel
Labor pH-Meter (pH 526, MultiCal R)	WTW
Mikrowelle	AEG
Millipore Q plus PF	Millipore
Photodokumentatiossystem (Gel-Doc 1000)	Bio-Rad
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf Reference
Schüttelinkubator, Modell 3033	GFL
Scotsman AF-10	Automatic Ice Machines
Thermocycler (UNO-/TRIO-Thermoblock)	Biometra
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus
Vakuum Regulator 260 BR	Bio-Rad
Vortex MS1	Bender & Hobein
Wasserbad (Typ 1013)	GFL

7 Molekularbiologische Methoden

Ziel dieser Arbeit ist es, neue, bisher unbekannte regulatorische 5‘UTR-Sequenzen des murinen Glutamattransporters MEAAT2 zu identifizieren.

Als Matrize verwendet man kommerzielle cDNA, die aus PolyA-mRNA des gesamten Mäusegehirns mittels Reverser Transkriptase synthetisiert wurde, wobei die zwei (genunspezifischen) Linkeroligonukleotide AP1 und AP2 jeweils an die 3‘- und 5‘-Enden ligiert wurden. Aus diesem Pool werden genspezifische cDNA-Moleküle zunächst in einer *RACE*, dann durch Klonierung amplifiziert. Schließlich werden die erhaltenen cDNA-Produkte isoliert, sequenziert und analysiert.

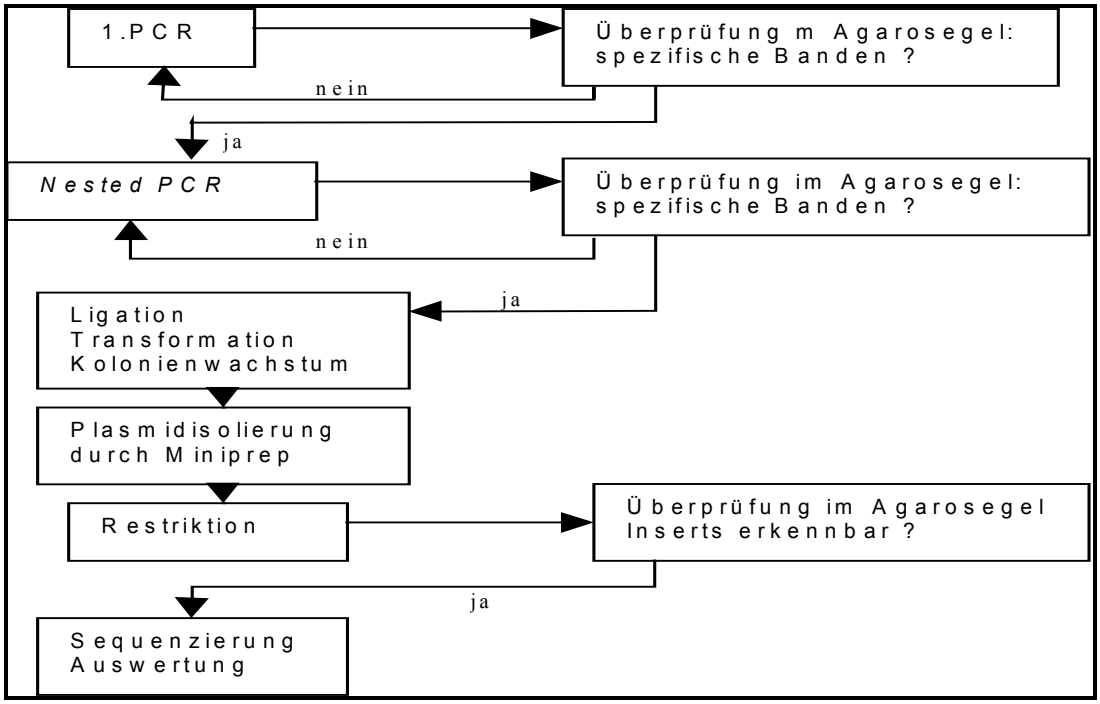

Abbildung 3: Flußdiagramm der angewendeten Methoden.

7.1 Agarosegel-Elektrophorese

Um den Erfolg der PCR und des Restriktionsverdaus mit EcoRI zu überprüfen, werden 9 µl PCR- bzw. Restriktionsverdau-Produkt, mit 1 µl 10xProbepuffer gemischt, sowie zur DNA-Fragmentgrößenbestimmung in eine benachbarte Geltasche 5 µl des DNA Molekulargewichtsmarkers *100 base pair ladder* (mit 10xProbepuffer), auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente umgekehrt proportional weit zu ihrer Größe im elektrischen Feld. Nach dem Anfärben der Banden mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml Gel) werden die Anzahl, Abgrenzbarkeit und Größe der Banden beurteilt sowie deren Konzentration geschätzt.

7.2 5‘-RACE

Bei der *RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)*, einem speziellen PCR-Verfahren, um cDNA-Enden zu vervielfältigen, werden aus dem gesamten cDNA-Pool des Mäusegehirns unter Verwendung des MEAAT2-spezifischen Primers MO5 sowie des Adapter-Primers AP1 (bekannte und neue) 5‘-Enden der CDS und 5‘-UTR des MEAAT2 amplifiziert (Abb. 4).

Die *RACE-PCR* wird als *touchdown-PCR* durchgeführt, um die Spezifität zu erhöhen. Dabei wird im gemeinsamen *Annealing*- (Hybridisierungs-) und *Extension*- (Verlängerungs-) Schritt die Temperatur abhängig von den Schmelztemperaturen der Primer stufenweise herabgesetzt.

Um die Spezifität weiter zu erhöhen, wird anschließend eine zweite, sog. *nested*- (verschachtelte) *PCR* durchgeführt. Deren Primer AP2 und MO21 besitzen komplementäre Sequenzen auf dem Produkt der 1.PCR:

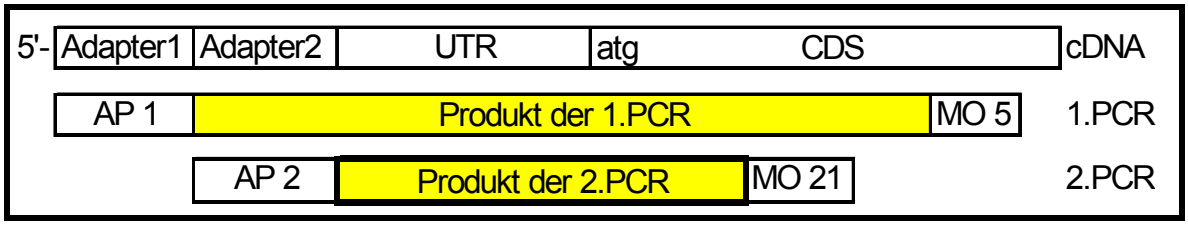

Abbildung 4: Bindungsstellen der Primer AP1, AP2, MO5 und MO21.
Die genspezifischen Primer MO5 und MO21 hybridisieren mit entsprechenden Sequenzen ca. 100 bzw. 200 bp stromabwärts des Translationsstartkodons atg in der kodierenden Sequenz CDS, die universellen Primer AP1 und AP2 mit den entsprechenden Adaptersequenzen (Adapter1 bzw. 2) am 5‘-Ende der untranslatierten Region UTR der cDNA.

RACE – Reaktionsansatz

Master Mix:
- 5 µl *10x cDNA PCR reaction buffer*
- 1 µl dNTP Mix (10 mM)
- 1 µl *50x Advantage cDNA Polymerase Mix*
- 36 µl dH_2O
- 43 µl *Master Mix* Ansatz (*Advantage cDNA PCR Kit*; Clontech)

1.PCR:
- 43 µl *Master Mix*
- 5 µl *Marathon-Ready cDNA* (*Mouse brain*; Clontech)
- 1 µl Adapter-Primer1 (AP1) (10 µM)
- 1 µl Primer MO5 (10 µM)
- 50 µl 1.PCR Reaktionsansatz

mit 30 – 50 µl Mineralöl überschichten

Thermocycling Programm

Schritt 1:	94°C	1 min	
Schritt 2:	94°C	30 sec	
	70°C	4 min	5 Zyklen Schritt 2
Schritt 3:	94°C	30 sec	
	68°C	4 min	5 Zyklen Schritt 3
Schritt 4:	94 °C	30 sec	
	66°C	4 min	29 Zyklen Schritt 4
Schritt 5:	4°C	∞	

Anschließend werden 9 µl des PCR Produktes auf dem Agarosegel analysiert.

2. PCR (*nested PCR*): 43 µl *Master Mix* (siehe oben)
5 µl 1.PCR-Produkt (1:50 mit dH_2O verdünnt)
1 µl Adapter-Primer AP2 (10 µM)
1 µl Primer MO21 (10 µM)
50 µl *nested* PCR-Reaktionsansatz

mit 30 – 50 µl Mineralöl überschichten

Thermocycling Programm:

Schritt 1:	94°C	1 min	
Schritt 2:	94°C	30 sec	
	68°C	4 min	5 Zyklen Schritt 2
Schritt 3:	94°C	30 sec	
	66°C	4 min	5 Zyklen Schritt 3
Schritt 4:	94 °C	30 sec	
	64°C	4 min	21 Zyklen Schritt 4
Schritt 5:	4°C	∞	

Kontrolle des (*nested*) 2.PCR-Produkts auf dem Agarosegel.

7.3 Klonierung von cDNA

7.3.1 Ligation

Die gewonnenen *nested* PCR-Produkte werden ohne Aufreinigung in den Plasmidvektor pCR®2.1 ligiert, d.h. durch ein Enzym an einer speziell konformierten Stelle in das Plasmid eingebaut. Das molare Verhältnis Vektor:Insert sollte etwa 1:1 bis 1:3 betragen, um eine bestmögliche Effizienz zu erreichen *(Original TA Cloning Kit;* Invitrogen).

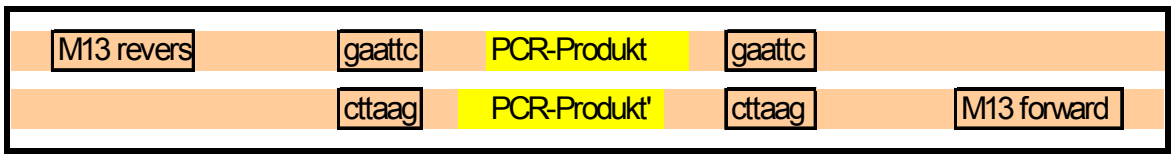

Abbildung 5: Darstellung des linearisierten Vektors pCR®2.1
Die Insertionsstelle des PCR-Produkts (gelb) in den doppelsträngigen Vektor (orange) ist von EcoR1-Schnittstellen (g/aattc) flankiert. Ca. 60 bis 80 bp davon entfernt befinden sich auf den entgegengesetzten Strängen die Bindungsstellen für die Primer *M13 forward* bzw. *M13 revers*.

Ansatz:

2 µl	PCR Produkt
1 µl	10x Ligationspuffer
1 µl	Vektor pCR®2.1 (25 ng/µl)
1 µl	T4-Ligase
5 µl	dH_2O
10 µl	Ligationsansatz *(Original TA Cloning Kit;* Invitrogen).

Dieser Ansatz wird für 12 bis 24 Stunden bei 14°C inkubiert

7.3.2 Transformation

Anschließend wird der Vektor mit dem PCR-Produkt in *Epicurian Coli XL2-blue MRF'-Ultracompetent cells®* transformiert (Protokoll von Stratagene). Dabei nehmen die speziell vorbehandelten prokaryotische Zellen den Vektor auf. Dieser Vorgang wird durch Hitzeschockbehandlung im 42°C Wasserbad beschleunigt.

- Ein *Aliquot* von 100 µl der kommerziell erhältlichen Zellsuspension, die aufgrund ihrer Temperaturempfindlichkeit bei –80°C gelagert werden muß, wird in einem gekühlten Tube auf Eis aufgetaut.
- 2 µl β-Mercaptoethanol dazugeben (25 mM), um die Aufnahmeeffizienz zu erhöhen (im Kit von Stratagene enthalten).
- 10 min auf Eis stehen lassen.
- 2 µl Ligationsprodukt dazugeben.

- 30 min auf Eis stehen lassen.
- 30 – 45 sec im 42°C warmen Wasserbad inkubieren. Dadurch wird die aktive Aufnahme des Vektors durch die Zellen beschleunigt.
- 2 min auf Eis stellen.
- 0,9 ml vorgewärmtes (37°C) LB-Medium dazugeben und 1 h bei 37°C in den Schüttelinkubator stellen.

7.3.3 Wachstum und Selektion einzelner Kolonien

Zum Kolonienwachstum werden 50 - 200 µl der inkubierten Zellsuspension auf vorbereitete Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Die Agarplatten (LB-Agar mit 25 µg/ml Kanamycin) wurden vorher zur Blau-Weiß-Kontrolle mit je 40 µl IPTG und x-Gal beschichtet und getrocknet. Der verwendete Plasmidvektor enthält ein Kanamycin-Resistenzgen, so daß vektortragende Kolonien einen Selektionsvorteil haben.

Blau-Weiß-Kontrolle: Der Einbau des PCR-Produkts in den Vektor führt zur Unterbrechung des lacZα-Gens, das für das inaktive α-Fragment einer β-Galaktosidase kodiert. Das somit unvollständig translatierte α-Fragment kann sich nicht mit dem Ω-Fragment (F'-Plasmid des Wirtsbakteriums) zur aktiven β-Galaktosidase verbinden. X-Gal wird deshalb nicht abgebaut, die Kolonien bleiben weiß, während blaue Kolonien kein Insert tragen. Gelegentlich zeigen im Agarosegel auch blaue Kolonien Inserts. Diese Inserts sind zu klein, um das lacZα-Gen translations-wirksam zu unterbrechen und die Entstehung des α-Fragments der β-Galaktosidase zu verhindern. Nach Angaben von Invitrogen ist die Blau-Weiß-Kontrolle nur bei Inserts mit mindestens 1500 bp Länge sinnvoll.

Stammplatten und Übernachtkultur

Um Bakterienkolonien auf den Agarplatten zu selektieren, werden einzelne weiße (und auch blaue) Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und auf eine numerierte Stammplatte und eine Übernachtkultur übertragen.

Die Stammplatte kann nach einer Inkubation ohne Schütteln für 12 - 16 Stunden bei 37°C mehrere Wochen bei +4°C aufbewahrt werden.

Die Übernachtkultur dient der Vermehrung der isolierten Kolonien mit dem Insert-tragenden Vektor. Dazu wird die kolonienhaltige Pipettenspitze in 4 ml LB Medium mit 25 µg/ml Kanamycin gegeben und 12 - 16 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend ist die Lagerung bei +4°C für wenige Tage oder die Isolierung der Plasmid-DNA möglich.

7.4 Isolierung von Plasmid-DNA

7.4.1 Isolierung durch Miniprep

Um das PCR-Produkt zu sequenzieren und zu analysieren, muß zunächst das Plasmid aus der Bakterienkolonie der Übernachtkultur herausgelöst und gereinigt werden. Dies wird entsprechend dem QIAGEN Miniprep Protokoll durchgeführt (*QIAprep miniprep handbook*):

Dabei werden die Bakterien der Übernachtkultur nach dem Abzentrifugieren alkalisch lysiert und nach der Neutralisation mit einem salzhaltigen Puffer wird die Plasmid-DNA an eine Silikonmembran gebunden. Nach mehreren Waschschritten, um RNA, Proteine und andere Zellbestandteile zu entfernen, wird die Plasmid DNA schließlich aus der Membran eluiert.

7.4.2 Restriktionsverdau

Mit Hilfe des Restriktionsendonuklease EcoR1 wird das PCR-Produkt aus dem Plasmid herausgeschnitten (Abb. 5) und kann auf dem Agarosegel beurteilt werden.

Restriktionsansatz:

8 µl	Plasmid-DNA
1 µl	Puffer H
1 µl	EcoR1 (10 U/µl)
10 µl	Ansatz

Diesen Ansatz bei 37°C für eine Stunde inkubieren.

Anschließend wird der Erfolg der Klonierung, Isolierung und Restriktion auf dem Agarosegel überprüft (S. 21).

7.5 Sequenzierung

Die durch *RACE*, Klonierung und Isolierung gewonnenen geeigneten Inserts werden nun mittels automatischer Sequenzierung analysiert und ihre Primärstruktur ermittelt.

Das Prinzip beruht auf der Synthese von DNA-Strängen, wobei es durch den Einbau von Didesoxynukleotiden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind, zum Kettenabbruch kommt. Es entstehen DNA-Stränge mit unterschiedlicher Länge, die im elektrischen Feld umgekehrt proportional zu ihrer Länge wandern und deren fluoreszierende letzte Nukleotide von einem Laser abgelesen werden. Als Matrize dient die durch Klonierung und Isolierung gewonnene Plasmid-DNA (Vektor+Insert). Die Primer *M13 forward* bzw. *M13 revers* binden an die entgegengesetzten Stränge des doppelsträngigen Vektors (Abb. 5) und initiieren die Synthese der DNA-Stränge durch die DNA Polymerase, die ebenso wie die Nukleotide und Puffer im *Sequencing reagent pre-mix* enthalten ist (Protokoll: *Thermo Sequenase Dye Terminator cycle sequencing pre mix kit* Amersham).

7.5.1 Cycle sequencing

Ansatz:
- 8 µl *Sequencing reagent pre-mix*
- 1 µl *Primer M13 forward* bzw. *revers* (10 mM)
- 11 µl Plasmid-DNA
- 20 µl Ansatz

Mit 10 - 20 µl Mineralöl überschichten.

Cycling Programm:

Schritt 1:	96°C	1 min		
Schritt 2:	94°C	30 sec		
	45°C	15 sec		
	60°C	4 min	30 Zyklen Schritt 2	
Pause:	4°C	∞		

7.5.2 QIAquick PCR Purification

Um aus dem *cycle sequencing-PCR-Produkt* restliche Nukleotide, Primer, Enzyme und Salze zu entfernen, wird es mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt (Protokoll: *QIAquick spin handbook* aus dem *PCR Purification Kit*):

Nach Zugabe eines salzhaltigen Puffers, Filterung an einer Silikonmembran und Waschschritten werden die *cycle sequencing-PCR-Produkte* schließlich aus der Filtermembran eluiert und vakuumgetrocknet. Unmittelbar vor dem Auftagen auf das Gel werden die Pellets in Laufpuffer gelöst und kurz denaturiert.

7.5.3 Vorbereitung des Gels

Da die Erkennung der fluoreszierenden Dideoxynukleotide durch den Laser sehr empfindlich ist, müssen auch geringste Verunreinigungen der Glasplatten und des Gels vermieden werden.
Die Platten werden mit dem entfettenden Alconox und mit 2 Molarer NaOH gereinigt, danach mit Isopropanol überschichtet und getrocknet. Anschließend wird der Plattensatz zusammengebaut.

Das Gel besteht aus:	30 ml	dH_2O
	31,5 g	Harnstoff
	9 ml	10xTBE
	12,6 ml	(30%) Acryl-Amid
		Gelansatz

Nach der Vakuumfilterung des Gels und Zugabe von 450 µl APS und 45 µl TEMED zur beschleunigten Polymerisation wird es ohne Luftblasen zwischen die Glasplatten gegossen und ca. 1 Stunde polymerisieren lassen. Der Kamm wird entfernt und die Taschen für die Proben von restlichem Harnstoff gereinigt.

7.5.4 Auftragen der Proben und Lauf

1 – 2 µl der mit *loading dye* aufgelösten Proben werden auf die Taschen aufgetragen und die Apparatur zusammengebaut. Als Laufpuffer dient 1x TBE.
Schließlich wird das Programm ABI Prism 377 gestartet

7.6 Auswertung der erhaltenen Sequenzen

Die erhaltenen Basenabfolgen werden mit bereits bekannten murinen und humanen Sequenzen verglichen. In den neuartigen Klonen werden alternative Startkodons, offene Leserahmen und regulatorische Sequenzmotive identifiziert sowie potentielle Exongrenzen festgelegt. Dazu werden der manuelle Vergleich sowie verschiedene Computerprogramme wie BLAST und DNA-Star eingesetzt. Schließlich werden die neuen Sequenzen graphisch dargestellt und diskutiert.

8 Ergebnisse

8.1 RACE

Um aus dem cDNA Pool des Mäusegehirns möglichst viele verschiedene neue Sequenzen zu amplifizieren, wurden insgesamt vier *RACE* durchgeführt.

Die genspezifischen Primer MO5 und MO21 haben mit T_m = 54,2°C bzw. 60,8°C eine niedrige Schmelztemperatur, während diejenige der korrespondierenden Primer AP1 und AP2 mit T_m =71°C bzw. 77°C wesentlich höher liegt. Die Wahl der geeigneten Temperaturen für die PCR mußte deshalb empirisch modifiziert werden. Mit Hilfe der *touchdown PCR* und einer *nested PCR* gelang es, spezifische PCR-Produkte zu erhalten.

Die Auswertung der ersten PCR der vier *RACE* auf einem 1,5%igen Agarosegel ergab unterschiedlich intensive und breite Banden mit Größen von ca. 50 bis fast 1000 bp (Abb. 6).

Da bei diesen breiten Banden von mehreren hundert Basenpaaren (bp) Länge auch unspezifische Produkte und Artefakte zu erwarten waren, wurden die *nested PCR* durchgeführt. Diese zeigten zum Teil mehrere, aber schmale, relativ scharfe Banden bei ca. 200, 400, 600 und 700 bp (Abb. 6).

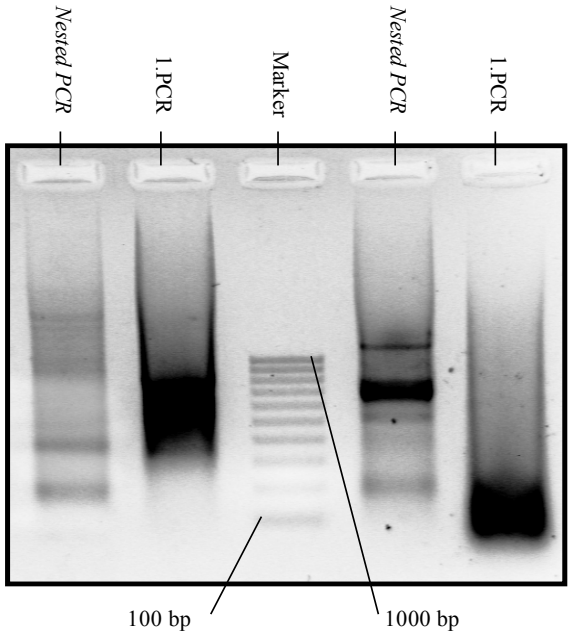

Abbildung 6: Erste und *nested PCR* der ersten beiden *RACE.*
Dargestellt auf 1,5%igem Agarosegel mit 0,1µg/ml EtBr. Mit Hilfe des *100 base pair ladder* als Marker können die Größen der Banden abgeschätzt werden (100bp und 1000bp Bande gekennzeichnet). Während die ersten PCR beider *RACE* eine breite verschmierte Bande ergeben, zeigen sich in der *nested PCR* der ersten *RACE* (rechts) mehrere kräftige, schmale Banden, in der *nested PCR* der zweiten *RACE* (links) mehrere schwache, schmale Banden.

8.2 Klonierung

Die vier Ligationen und Transformationen mit Hilfe des kommerziellen *TA Cloning Kits* inklusive des pCR®2.1-Vektors sowie den kommerziellen *Epicurian Coli®XL2-Blue MRF ultracompetent cells* verliefen problemlos.

Insgesamt wurden über 1000 einzelne weiße und blaue Kolonien gepickt und davon Übernachtkulturen (mit entsprechenden Stammplatten) angelegt. Da die Inserts retrospektiv kleiner als 1500 bp waren, war die Blau-Weiß-Kontrolle nicht aussagekräftig und wäre nicht erforderlich gewesen.

8.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Aufreinigung des Vektors mit Insert aus den Übernachtkulturen wurde entsprechend dem Protokoll mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* problemlos durchgeführt.

Die Inserts wurden mit dem Restriktionsenzym EcoR1 aus dem Vektor herausgeschnitten und anschließend auf dem Agarosegel vom Vektor elektrophoretisch getrennt. Die Schnittstellen von EcoR1 (g/aattc) liegen beiderseits auf dem Vektor direkt neben der PCR-Insertionsstelle (Abb.5).

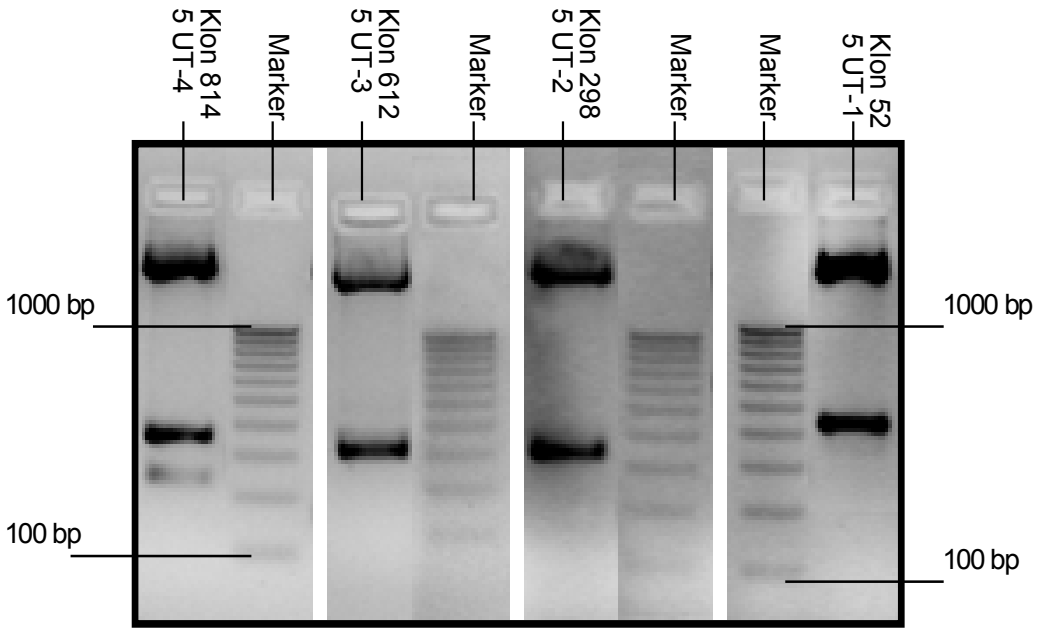

Abbildung 7: Restriktionsverdau der vier Klone mit neuen Sequenzmotiven mit EcoR1.
Auf 2%igem Agarosegel. Marker ist der *100 base pair ladder* (100 bp- und 1000 bp- Bande dargestellt). Alle Klone zeigen eine Bande größer als 1000 bp, die den linearisierten Vektor darstellt. Klon 52 (5UT1) zeigt ein Insert mit über 400 bp Länge, Klon 298 (5UT2) eins mit ca. 350 bp, Klon 612 (5UT3) eins mit ca. 300 bp und Klon 814 (5UT4) zeigt zwei Inserts mit 250 und ca. 400 bp Länge.

Dabei zeigten sich pro Klon mindestens zwei Banden. Eine starke Bande lag bei weit über 1000 bp und entspricht dem linearisierten Vektor (ca. 3900 bp) (Abb. 7).
Des öfteren erkannte man eine schwächere Bande bei ca. 500 bp, die, wie sich zum Teil erst nach der Sequenzierung herausstellte, den nicht linearisierten, ungeschnittenen Vektor darstellt. Dabei bleibt unklar, ob ein Insert enthalten ist oder nicht (nicht dargestellt).
Die Banden, die Inserts darstellen, waren unterschiedlich stark und hatten eine Größe zwischen 250 und ca. 1000 bp. Gelegentlich waren bei einigen Klonen auch mehrere Inserts erkennbar. Das Insert enthielt dann eine Schnittstelle von EcoR1.

8.4 Sequenzierung

Insgesamt wurden 224 Klone mit den unterschiedlichsten Bandengrößen ausgewählt und entsprechend den Protokollen zum Sequenzieren vorbereitet. Dabei konnten Insertbanden mit *Nonsense*-Produkten oder Sequenzen anderer Gene auf dem Agarosegel nicht sicher abgegrenzt werden. Screening-Tests wie z.B. *Northern-Blotting-in situ-Hybridisierung* können hilfreich sein, um MEAAT2 tragende Klone vor der Sequenzierung sicher zu identifizieren.
Gelegentlich gelang es nicht, nach dem *Cycle sequencing* und der Aufbereitung ein eingetrocknetes *Pellet* zu erhalten. In diesen Fällen mußte die Konzentration der Plasmid-DNA im *cycle sequencing* Ansatz empirisch modifiziert werden.
Die Primer *M13 forward* und *M13 revers* binden jeweils an den entgegengesetzten Strängen und Seiten ca. 60 - 80 bp vom Insert entfernt (Abb. 5). Aufgrund der Größe der Inserts und der Teile des Vektors zwischen den Primern und dem Insert, die immer mitsequenziert wurden, war die Leserate einer Sequenzierung oft nicht ausreichend. Es mußten daher die meisten Inserts von beiden Strängen her sequenziert werden, um die gesamte neuartige Nukleotidsequenz zu identifizieren und darzustellen.

8.5 Heterogenität des 5‘-UTR der Maus

Durchschnittlich waren in den Ergebnisdateien ca. 150 bis 300 bp auswertbar lesbar. Von den 224 sequenzierten Klonen zeigten 109 Klone ein MEAAT2-spezifisches Insert:

- Die unvollständige CDS stromaufwärts von MO21 des MEAAT2 wurde 44 mal dargestellt.
- 54 mal gelang es, Sequenzen von MEAAT2 mit dem bereits bekannten UTR zwischen sechs und 130 bp zu identifizieren.
- Schließlich zeigten sich vier bisher unbekannte Sequenzvarianten von MEAAT2, MEAAT2-5UT1 - 4, die insgesamt elf mal gewonnen wurden (Abb.8).

Es wurden vier unterschiedlich lange neue Sequenzmotive identifiziert. Zwei diverse Motive wurden drei- bzw. sechsmal aus unterschiedlichen Klonen isoliert, während die Motive 5UT3 und 5UT4 nur jeweils einmal auftraten. Bei allen vier Isoformen liegt das neue Sequenzmotiv direkt stromaufwärts des bekannten Exons CDS1. Bei MEAAT2-5UT2 und 5UT3 ist zwischen die bekannten Exons UTR (blau) und CDS1 (gelb) ein neues Motiv (ocker bzw. rosa) insertiert. Die Sequenzen ergaben im Homologievergleich sowohl mit bereits publizierten Sequenzen (BLAST) als auch untereinander (MegAlign) keine gemeinsamen Motive.

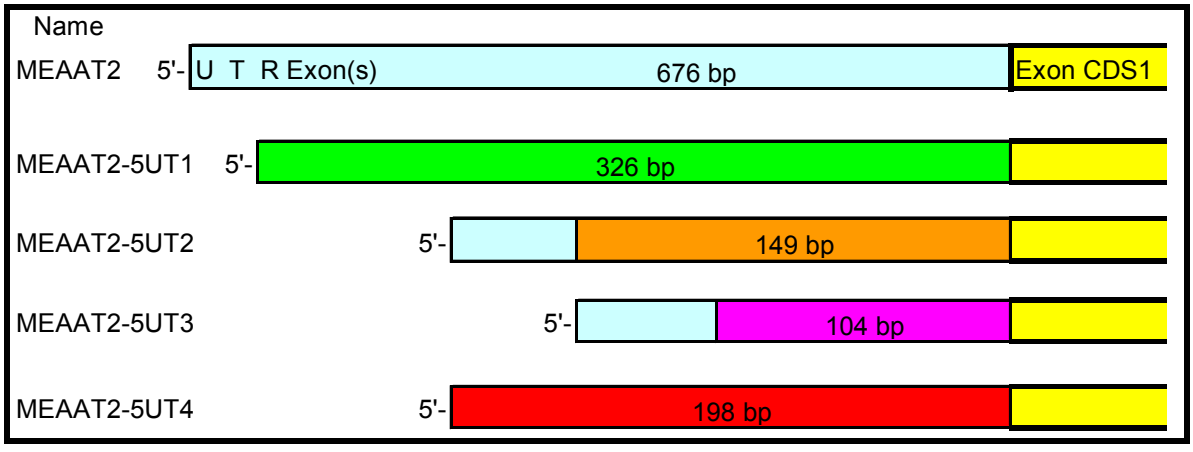

Abbildung 8: Die vier verschiedenen neuen Isoformen von MEAAT2.
Identische Nukleotidsequenzen sind gleichfarbig markiert. Als Vergleich dient MEAAT2 mit dem bekannten ersten gemeinsamen Exon CDS1 (gelb) und dem(n) bekannten 5‘-UTR-Exon(s) (blau). Alle vier neuen Isoformen zeigen ein neues Motiv direkt stromaufwärts des bekannten Exon CDS1. Bei MEAAT2-5UT2 und –5UT3 ist das neue Motiv zwischen die bekannten Exons UTR und CDS1 insertiert. Die neuen Sequenzmotive sind mit Längenangaben (bp) dargestellt.

8.6 Darstellung der vier neuartigen MEAAT2-Isoformen

MEAAT2-5UT1 zeigt ein neues Motiv mit 326 Nukleotiden stromaufwärts des bekannten Exon CDS1. Darin finden sich zwei alternative Translationsstartkodons uATG und ein im gleichen Leserahmen liegendes, gemeinsames Stopkodon. Die zwei uATG initiieren die beiden kompetitiven uORF1 und 2. Der uORF1 kodiert für ein 19 AS langes putatives Polypeptid, uORF2 für dessen 13 AS langen C-Terminus. Der ORF beginnt erst im Exon CDS1.

```
      +334                                  +316
5'-  TGA TGA CCA CAG GCC GGG CAA TGG GAT TTT CCT GCC ACT CTA
AAG CAA GAG CCA GAG GGT GAA TCG CTC TTT CCC AGT CCA GCA CCA
GCT GAC CCC TGG ATT TTA AAG AAG GAA AGG CCT GAT ACT TTG ATT
TTC AAA CAT TCC AAG TTA CCC TGA GTT GTC AAA TCA GCC AGA GAT
CCA GAG TTC TTC GGG GAC TAC CTT TTG CTG GGA GGA ATT TGG CAG
TCT TGG TTC TTG TTA CCC ATT TTG GCC CTA GAT CCT CTC TCT CAC
GTT GTG CTC CTG GAT TCT CCT CAG CCA AGT GCA AGA AGG AGC CTT
                                  0
GAT TCC GGA TTC AG-T GCC AAC AAT <atg> ccc aag cag gta gaa
gtg cgc atg cat gac agc cac ctc agc tcc gat g
```

Abbildung 9: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT1.
Die beiden untranslatierten Startkodons uATG (rot, mit Positionsangabe stromaufwärts vom ORF) und das gemeinsame, im gleichen Leserahmen liegende Stopkodon (unterstrichen) definieren zwei uORF (untranslatierte ORF). Der hauptsächliche ORF (offener Leserahmen; klein geschrieben) beginnt erst im Exon CDS1 (gelb) mit <atg> (0).



Abbildung 10: Darstellung der beiden uORF von MEAAT2-5UT1.
Das bekannte Exon CDS1 ist gelb, das neue Motiv Exon 5UT1 grün dargestellt. Der darin enthaltene uORF1(untranslatierte ORF) beginnt am untranslatierten Startkodon uATG1 und enthält den kürzeren im gleichen Leserahmen liegenden uORF2. Der ORF (offene Leserahmen) beginnt im Exon CDS1 (gelb) mit ATG.

Tabelle 3: Die beiden uORF von MEAAT2-5UT1.
Angegeben ist der Startpunkt der uATG stromaufwärts vom authentischen ATG, die Länge (nt, Nukleotide) der uORF und die putative Polypeptidsequenz.

	uATG	nt uORF	Putatives Polypeptid
uORF1	+334	60 nt	MTTGRAMGFSCHSKARARG.
uORF2	+316	42 nt	MGFSCHSKARARG.

Bei **MEAAT2-5UT2** ist ein 148 bp langes Motiv zwischen das bekannte Exon UTR mit dem bekannten ATG und das Exon CDS1 insertiert. Es enthält zwei uATG.

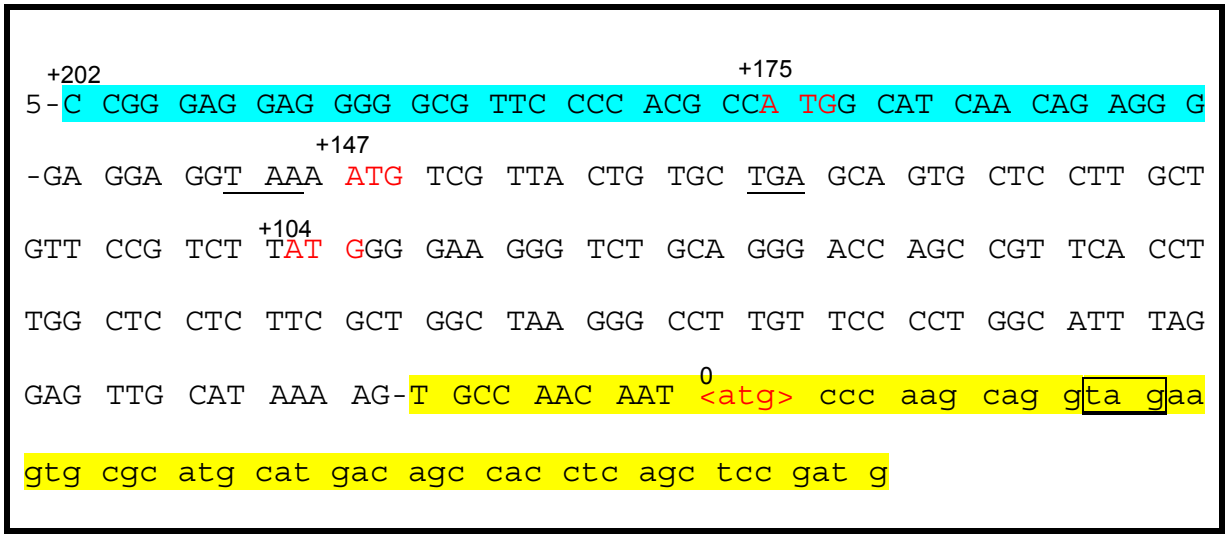

Abbildung 11: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT2.
Sie ist zwischen die bekannten Exons UTR (blau) und CDS1 (gelb) insertiert. Die drei untranslatierten Startkodons uATG sind rot mit Position stromaufwärts vom authentischen <atg>, dazu im Leserahmen liegende Stopkodons unterstrichen dargestellt. Der ORF (offener Leserahmen; klein geschrieben) beginnt erst im Exon CDS1 (gelb) mit <atg> (0). Der uORF3 (untranslatierter ORF) wird erst im ORF terminiert (umrandetes Stopkodon tag).

Die Translation des Transporters (ORF) beginnt erst im Exon CDS1. Die drei uATG initiieren drei uORF. Das bei MEAAT2 verwendete Translationsstartkodon aus den Exon UTR (blau) initiiert den uORF1. Es wird durch ein Stopkodon in dem neuen Motiv terminiert und kann nicht mehr als authentisches Translationsstartkodon verwendet werden. Der uORF3 reicht in den MEAAT2-proteinkodierenden Bereich des Exon CDS1 hinein und kodiert ein putatives Polypeptid mit 39 AS.

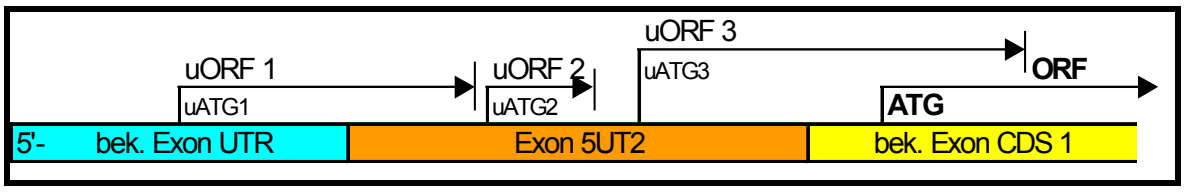

Abbildung 12: Darstellung der drei uORF von MEAAT2-5UT2.
Der uORF1 (untranslatierter ORF) beginnt im bekannten Exon UTR (blau) mit dem untranslatierten Startkodon uATG1, uORF2 und 3 beginnen im neuen Exon 5UT2 (orange). Der uORF 3 reicht bis in den ORF (offener Leserahmen) im bekannten Exon CDS1 (gelb).

Tabelle 4: Die drei uORF von MEAAT2-5UT2.
Angegeben ist der Startpunkt der uATG stromaufwärts vom authentischen ATG, die Länge (nt, Nukleotide) sowie die putative Polypeptidsequenz der drei uORF (untranslatierte offene Leserahmen).

	uATG	uORF	Polypeptidsequenz
uORF1	+175	27 nt	MASTEGRR.
uORF2	+147	18 nt	MSLLC.
uORF3	+104	120 nt	MGKGLQGPAVHLGSSSLAKGLVPLAFRSCIKVPTICPSR.

Auch bei **MEAAT2-5UT3** ist ein neues Motiv mit 104 bp zwischen die bekannten Exons UTR und Exon CDS1 insertiert. Es enthält ein Startkodon und drei Stopkodons. Das **a**tg im bekannten Exon UTR ist durch ein **t**tg substituiert.

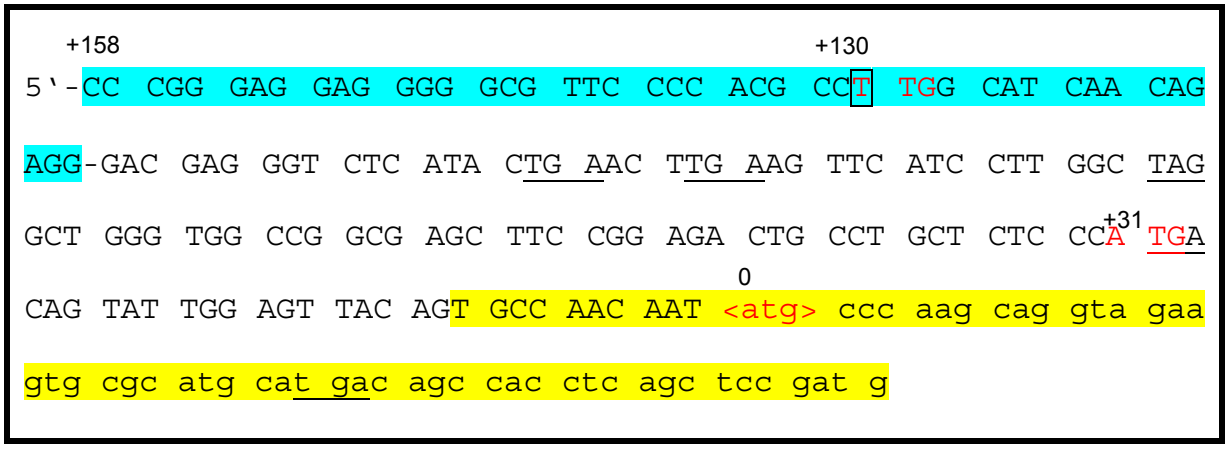

Abbildung 13: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT3.
Sie ist ebenfalls zwischen die bekannten Exons UTR (blau) und CDS1 (gelb) insertiert. Das untranslatierte Startkodon atg ist rot, Stopkodons sind unterstrichen. Das bekannte ATG im Exon UTR ist durch ein TTG (+130) ersetzt. Der ORF (offener Leserahmen) beginnt (klein geschrieben) mit <atg> (Position 0) im bekannten Exon CDS1 (gelb). Der uORF (untranslatierter ORF) reicht bis in den proteinkodierenden Bereich (ORF) hinein.

Das uATG1 im neuen Motiv startet einen uORF, der 63 nt lang ist und bis in den proteinkodierenden Bereich von MEAAT2 im Exon CDS1 hineinreicht. Er kodiert für ein putatives Polypeptid mit 20 AS.

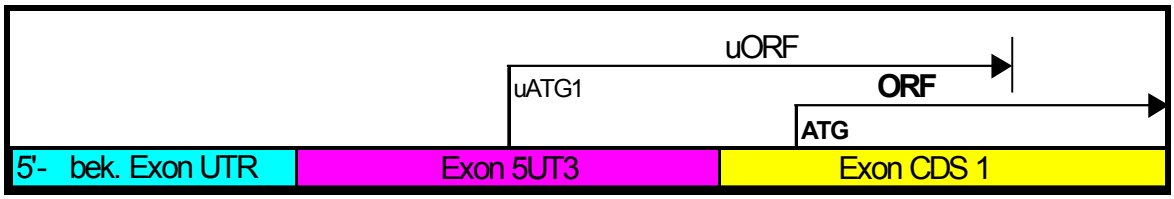

Abbildung 14: Darstellung des uORF von MEAAT2-5UT3.
Der uORF1 (untranslatierter ORF) beginnt mit uATG1 (untranslatiertes Startkodon) im neuen Exon 5UT3 (violett) und endet erst im ORF (offener Leserahmen) im Exon CDS1 (gelb).

Tabelle 5: Der uORF von MEAAT2-5UT3.
Angegeben ist der Startpunkt des uORF (untranslatierte offene Leserahmen) stromaufwärts vom authentischen ATG, die Länge (nt; Nukleotide) und die putative Polypeptidsequenz.

	uATG	Länge uORF	Polypeptid
uORF1	+31	63 nt	MTVLELQCQQYAQAGRSAHA.

MEAAT2-5UT4 zeigt ein neues Motiv mit 198 Nukleotiden, das unmittelbar stromaufwärts des Exons CDS1 liegt. In dem neuen Motiv liegen vier uATG.

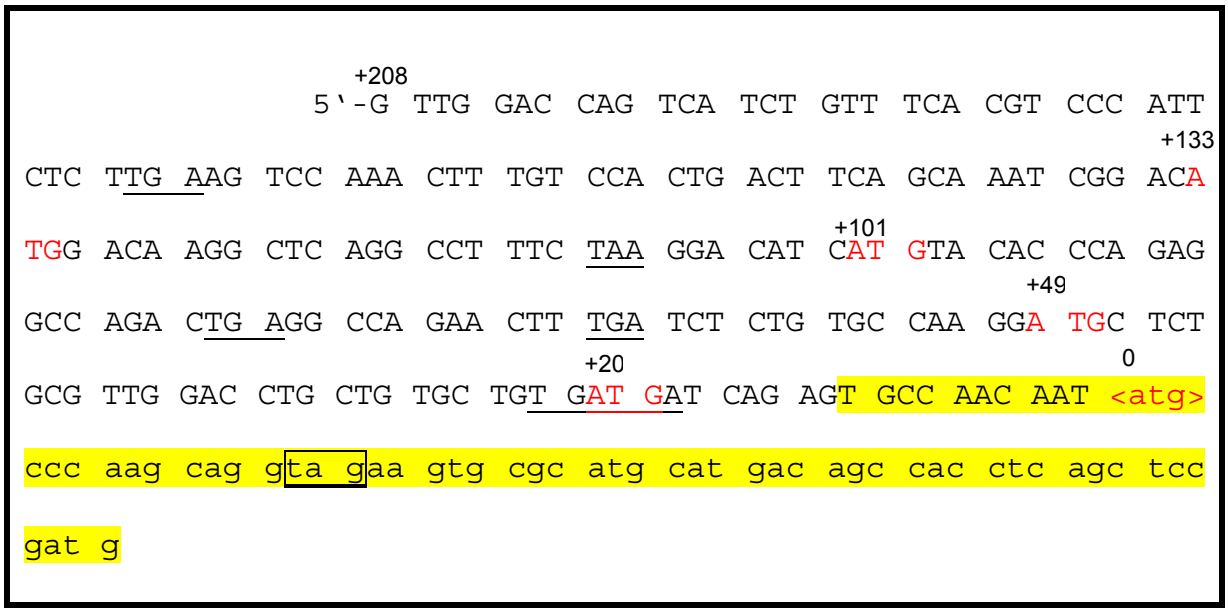

Abbildung 15: Nukleotidsequenz der neuen Isoform MEAAT2-5UT4.
In dem neuen Motiv liegen vier untranslatierte Startkodons uATG (rot) und sechs Stopkodons (unterstrichen). Die Positionen der uATG sind numeriert. Der ORF (offener Leserahmen; klein geschrieben) beginnt im bekannten Exon CDS1 (gelb) mit <atg> (Position 0). Das Stopkodon des uORF4 (untranslatierter ORF), das im ORF liegt, ist umrandet gekennzeichnet.

Durch die vier uATG werden vier uORF initiiert. Der uORF1 kodiert für ein 37 AS langes putatives Polypeptid, der uORF3 für die neun C-terminalen Aminosäuren des uORF1-Polypeptids. Der uORF2 liegt innerhalb des uORF1, durch den anderen Leserahmen wird ein differentes putatives Protein kodiert. Der uORF4 beginnt überschneidend am Stopkodon von uORF1/3 mit einem anderen Leserahmen und reicht bis in den ORF hinein, der erst im Exon CDS1 beginnt.

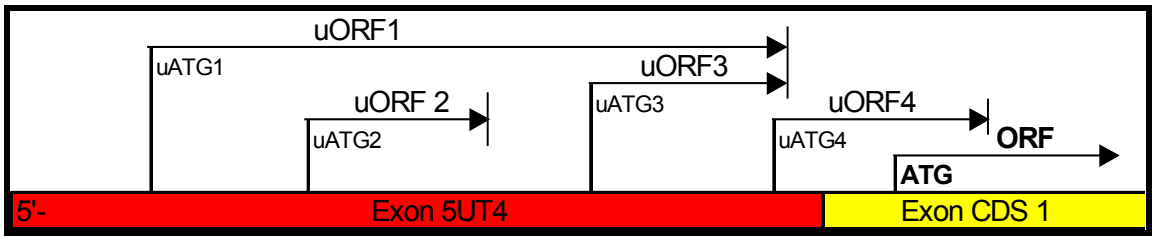

Abbildung 16: Darstellung der vier uORF von MEAAT2-5UT4.
Das bekannte Exon CDS1 ist gelb dargestellt, das neue Motiv Exon 5UT4 rot. Es enthält vier untranslatierte Startkodons uATG, die je einen uORF (untranslatierter ORF) initiieren. Die kurzen uORF2 und 3 liegen im uORF1. Der uORF 4 beginnt mit einem anderen Leserahmen am gemeinsamen Stopkodon von uORF1/3 und reicht bis in den ORF (offener Leserahmen) im bekannten Exon CDS 1.

Tabelle 6: Die vier uORF von MEAAT2-5UT4.
Angegeben ist der Startpunkt der uATG stromaufwärts vom authentischen ATG, die Länge (nt; Nukleotide) und die putative Peptidsequenz der vier uORF. Der uORF3 entspricht dem C-Terminus von uORF1 (unterstrichen).

	uATG	Länge uORF	Polypeptid
uORF1	+133	114 nt	MDKAQAFLRTSCTPRGQTEARTLISVPRMLCVGPAVL.
uORF2	+101	24 nt	MYTQRPD.
uORF3	+49	30 nt	MLCVGPAVL.
uORF4	+20	36 nt	MIRVPTICPSR.

Darstellung der uATG

In den vier neuen MEAAT2-Isoformen finden sich insgesamt zehn uATG. Dabei zeigt sich in unterschiedlichem Ausmaß eine Übereinstimmung mit der *consensus sequence* für die Translationsinitiation: (-6) -gcc a/gcc ATG g- (+4).

Isoform	uATG	Sequenz
5 UT1	uATG 1	--tg ATG a--
	uATG 2	--cgg gca ATG g--
5 UT2	uATG 1	--cac gcc ATG g--
	uATG 2	--ggt aaa ATG g--
	uATG 3	--cgt ctt ATG g--
5 UT3	uATG 1	--tct ccc ATG a--
5 UT4	uATG 1	--tcg gac ATG g--
	uATG 2	--gac atc ATG t--
	uATG 3	--cca agg ATG c--
	uATG 4	--gct gtg ATG a--

Tabelle 7: Darstellung der uATG der vier neuartigen Isoformen.
Angegeben ist die Bezeichnung des uATG, die Isoform sowie die Basenabfolge. Übereinstimmungen in den für die *consensus sequence* besonders bedeutsamen Nukleotiden (–3) a/g und (+4) g sind rot unterlegt.

8.7 Vergleich mit publizierten Sequenzen

Im Vergleich mit bereits bekannten humanen und murinen Sequenzen zeigen die neuen Sequenzmotive keine Homologien. Die publizierten humanen Transporter sowie die bekannten Transporter der Maus haben ein authentisches Translationsstartkodon im Exon UTR, 5, 8, 17 bzw. 65 nt stromaufwärts des ersten gemeinsamen Exon CDS1.

Die vier neuen murinen Isoformen MEAAT2-5UT1 – 5UT4 haben, ebenso wie HBGTII, kein *in frame* liegendes atg in den Exons UTR, so daß die Translation beim ersten Translationsstartkodon atg im Exon CDS1 beginnt. Es wird im Gegensatz zu (M)EAAT2 ein um neun Aminosäuren (27 Nukleotide) verkürztes Transporterprotein kodiert. Die neuen Klone können somit als mausspezifische Varianten von HBGT II aufgefaßt werden.

Der Vergleich des humanen Exon CDS1 mit der entsprechenden murinen Sequenz zeigt eine Nukleotidübereinstimmung von 85%.

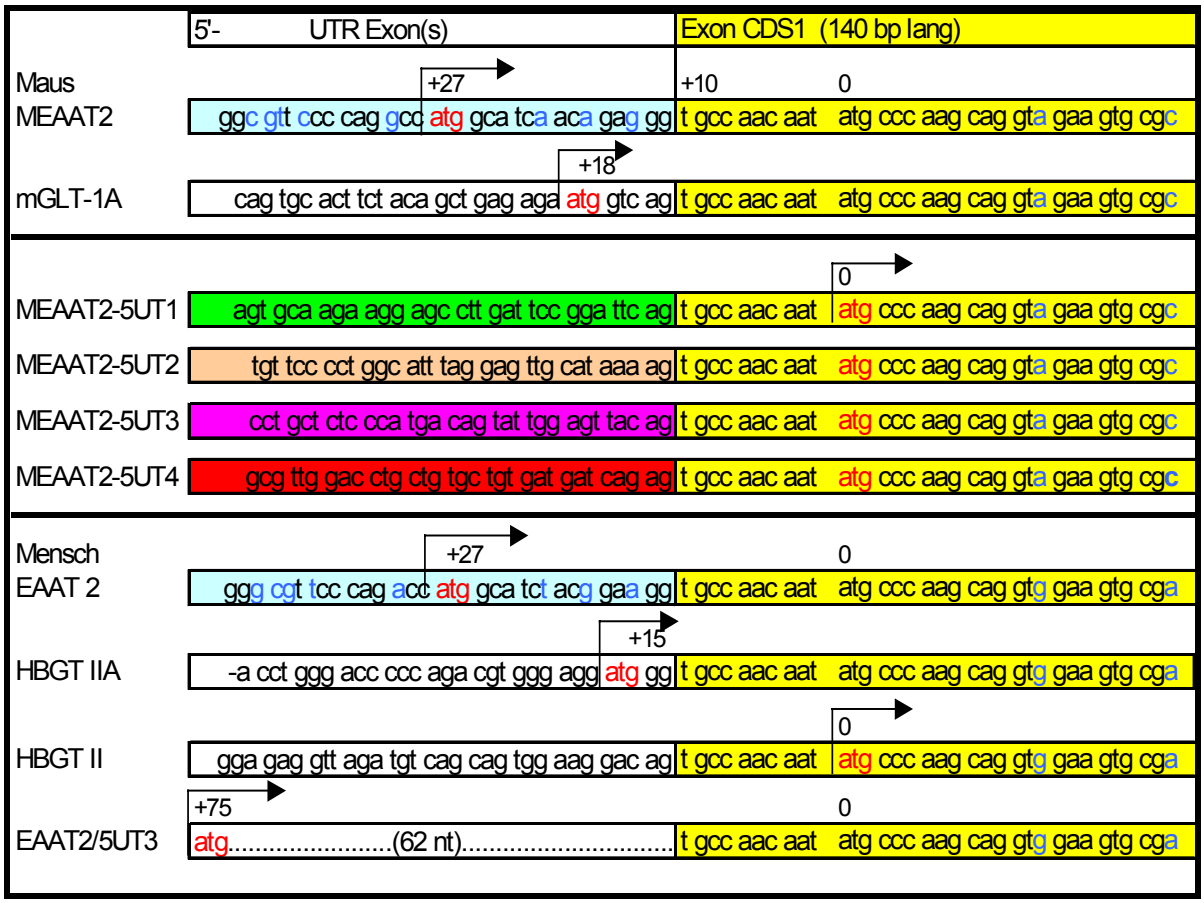

Abbildung 17: Vergleich der neuen Isoformen mit bereits bekannten Transporterformen des Menschen und der Maus.
Die vier neuen Isoformen MEAAT2-5UT1 - 4 zeigen analog zu HBGTII kein *in frame* liegendes Translationsstartkodon atg im Exon UTR, im Gegensatz zu allen anderen humanen und murinen Transkripten. Die Translation beginnt daher erst im allen gemeinsamen Exon CDS1 (gelb) mit atg (Position 0). Der ORF ist mit Pfeil und Positionsangabe stromaufwärts des Translationsstartpunktes von HBGTII (0), speziesspezifische Nukleotide blau dargestellt.

9 Diskussion

9.1 Nachweis und Charakterisierung neuartiger 5‘-Spleißformen des MEAAT2

In 11 der 109 MEAAT2 spezifischen Klonen konnten die vier verschiedenen, bisher unbekannten 5‘-UTR-Isoformen des murinen Glutamattransporters MEAAT2, MEAAT2-5UT1 – 5UT4, identifiziert werden.

Es zeigte sich dabei eine variable Anordnung von Sequenzmotiven stromaufwärts des ersten gemeinsamen proteinkodierenden Exons CDS1, analog zu humanen EAAT2-Isoformen. Bei den Isoformen MEAAT2-5UT2 und –5UT3 ist ein neues Sequenzmotiv zwischen die beiden bekannten Exons UTR und CDS1 insertiert, während die beiden anderen Isoformen –5UT1 und -5UT4 keine bisher bekannten UTR-Motive am 5‘-Ende enthalten (Abb. 8). Keines der vier neuen Motive kann derzeit in kleinere (hypothetische) Exons unterteilt werden. Ebenso finden sich darin keine homologen Sequenzen oder Sequenzabschnitte zu humanen Isoformen.

Der Entstehungsmechanismus der neuen Transkriptvarianten ist nicht exakt nachgewiesen. Die Insertion der neuen Motive zwischen zwei bekannte Exons bei zwei Isoformen sowie die konstante 5‘-Exongrenze von CDS1 bei allen bekannten und neuen (M)EAAT2 Transkripten lassen allerdings auf alternatives Spleißen schließen. Bei vielen anderen Genen ist dies systematisch untersucht und belegt worden [62]. Andererseits könnte auch unvollständiges Spleißen vorliegen, so daß Intronsequenzen enthalten sind, was als eigenständiger Regulationsmechanismus (*retained intron*) nicht ungewöhnlich ist [25, 62].

Die Aufklärung der genomischen Organisation des 5‘-UTR von (M)EAAT2 ist erforderlich. Sie hat folgende Ziele:

- Identifizierung der gesamten genomischen 5‘-UTR-Nukleotidsequenz.
- Identifizierung der Exon-Intron-Grenzen im 5‘-UTR.
- Die Bestimmung der Lage der neuen hypothetischen Exons auf dem genomischen DNA-Strang.
- Identifizerung regulatorischer Sequenzmotive.

Untersuchungen dazu werden zur Zeit von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. Damit kann die Existenz von alternativem Spleißen im 5‘-UTR von (M)EAAT2 bewiesen werden und die Lage der neuen putativen 5‘-UTR Exons auf dem genomischen Strang bestimmt werden.

9.2 Bedeutung der neuartigen MEAAT2 - 5‘-UTR - Isoformen

Standen bisher die proteinkodierenden Sequenzen (CDS) eines Gens im Mittelpunkt des Interesses der molekularbiologischen und humangenetischen Forschung, so wird in den letzten Jahren die Bedeutung der 5‘-untranslatierten Sequenzen für die posttranskriptionelle Expressionsregulation eines Gens zunehmend diskutiert. In zahlreichen Untersuchungen hierzu wurden Strukturen und Funktionen des 5‘-UTR analysiert. Bei vielen Genen werden differentielle 5‘-UTR als allgemeine Regulationsmechanismen während der embryonalen Entwicklung, Zelldifferenzierung, Wachstum sowie bei verschiedenen pathogenetischen Modellen und auch bei Neoplasien beschrieben [72].

9.2.1 Die 5‘-UTR

Die meisten eukaryotischen 5‘-UTR der reifen mRNA sind ca. 20 – 100 Nukleotide lang und besitzen überwiegend inhibitorische Strukturen für die Translationsregulation [25]. Experimentelle Studien zeigten, daß überdurchschnittlich lange 5‘-UTR eine verstärkte inhibitorische Wirkung auf die Translation haben. Sie kommen besonders häufig bei großen regulatorischen Genfamilien vor [72] und enthalten oft uATG stromaufwärts des authentischen Startkodons, die uORF initiieren sowie komplexe sekundäre Strukturen und regulatorische Elemente [8, 72]. Dabei fanden sich jedoch auch unvollständig gespleißte (unreife) mRNA, in denen noch Introns enthalten waren [25]. Ob diese eine regulatorische Bedeutung haben und gegebenenfalls welche, ist im Detail noch unklar. Die inhibitorische Wirkung des 5‘-UTR kann allerdings schwer prognostiziert werden, da es auch Hinweise gibt, daß eine Verlängerung der 5‘-UTR zu einer Steigerung der Translationseffizienz führt, bedingt durch vermehrte Bindungskapazität für die Ribosomenkomplexe [8].

Der Vergleich mit den bekannten (M)EAAT2 - 5‘-UTR der Genbank von über 600 bp Länge zeigt, daß die neuen 5‘-UTR stromaufwärts vermutlich nicht vollständig sind. Gegenstand dieser Arbeit ist jedoch nicht die komplette Aufklärung der 5‘-UTR-Sequenzen, sondern die Charakterisierung der Prinzipien der MEAAT2-Regulation. Welchen spezifischen Einfluß die neuen 5‘-UTR-Sequenzen im einzelnen auf die Translationseffizienz haben, und ob darin Introns enthalten sind, kann gegenwärtig nicht exakt bestimmt werden. Auch bei den bekannten (M)EAAT2-Isoformen wurde darüber bisher wenig berichtet. Die Existenz von gewebsspezifischen Promotoren bei MEAAT2 wird diskutiert [71].

9.2.2 Alternative proteinkodierende Sequenz

Wie bei den humanen EAAT2-Isoformen existieren auch bei der Maus mindestens drei Isoformen mit differentiellen N-Termini. Neben der bekannten konstitutionell gespleißten und der leberspezifischen Form konnten in dieser Arbeit vier neuartige MEAAT2-Transkriptvarianten mit einem verkürzten offenen Leserahmen (ORF) identifiziert werden (Abb. 17). Bei der ebenfalls am N-Terminus verkürzten leberspezifischen Isoform konnte keine Affinitätsänderung zu Glutamat nachgewiesen werden [71].

Differentielle N-Termini sind im allgemeinen an der Regulation der Stabilität des Proteins sowie als zelluläres Sortierungssignal entscheidend beteiligt. Bei anderen Genen ist dies bereits eindrucksvoll nachgewiesen [15]. Die Bedeutung der um neun Aminosäuren verkürzten putativen Polypeptide ist bei MEAAT2-5UT1-4 im Detail noch ungeklärt.

9.2.3 uATG und uORF

uATG: Entsprechend dem ribosomalen *scanning model* sucht der Ribosomenkomplex vom 5‘-Ende her ein geeignetes ATG, das eine für eine effektive Bindung möglichst optimale *consensus sequence* hat. Dort beginnt die Translation, die am nächsten im Leserahmen liegenden Stopkodon endet [15].

In mehreren Untersuchungen wurde die *consensus sequence* für die Translationsinitiation statistisch analysiert. Dabei zeigte sich die Sequenz -gcc a/gcc AUG g- als optimale *consensus sequence*, wobei dem Purin a/g in Position –3 und dem Nukleotid g in Position +4 eine besondere Bedeutung zukommt [25].

MEAAT2-5UT1 - 4 zeigen im 5‘-UTR jeweils ein bis vier stromaufwärts gelegene alternative Translationsstartkodons (uATG) in relativer Nähe zum (Haupt-)ORF. Nur vier dieser zehn alternativen Translationsstartkodons zeigen eine gute Übereinstimmung mit der *consensus sequence*, während die anderen in den besonders wichtigen Positionen –3 und +4 andere Basen vorweisen (Tab.7). Es ist bisher nicht genau bekannt, ob diese uATG der neuen MEAAT2-Transkripte wirklich vom Ribosomenkomplex effektiv erkannt werden oder ob entsprechend dem *leaky* (=undicht) *scanning* Prozeß einige oder alle uATG übersprungen werden, wie bei anderen mRNA gezeigt [25]. Für eine individuelle Beurteilung der vier neuartigen Isoformen sind weitergehende Untersuchungen erforderlich.

uORF: Bei vielen Genen ist sowohl eine inhibitorische als auch seltener eine stimulierende Wirkung der uORF auf die Translationsrate beschrieben worden. Dabei ist die inhibitorische Wirkung um so größer, je näher der uORF am stromabwärts gelegenen authentischen ORF liegt oder sogar in diesem endet, da der Ribosomenkomplex für eine Re-Inititation etwas Zeit benötigt. Darüber hinaus ist für lange uORF (über 30 nt) eine verstärkte Inhibition nachgewiesen [8, 15, 25].
Während die beiden uORF von MEAAT2-5UT1 über 250 Nukleotide stromaufwärts des authentischen ATG enden (Abb. 9) und somit wahrscheinlich eine geringe Inhibition der Translation des ORF (Re-Initiation möglich) bewirken, reichen bei den anderen drei neuen MEAAT2-5UT-Isoformen die uORF in den proteinkodierenden Bereich hinein und verhindern somit, falls sie translatiert werden, wahrscheinlich eine Re-Initiation. Die individuelle Bedeutung der putativen MEAAT2-uORF-Polypeptidsequenzen ist derzeit noch unklar, ebenso wie effektiv sie translatiert werden und welche regulatorische Wirkung sie auf die Translation des ORF besitzen. Eine exakte Beurteilung der Funktion der uATG und uORF ist mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich. Hier müssen *in vitro* Translations- und Expressionsexperimente weitergehende Erkenntnisse bringen. Diese werden derzeit in verschiedenen Arbeitsgruppe durchgeführt.

9.2.4 Regulatorische Elemente im 5‘-UTR

Sekundärstrukturen im 5‘-UTR, die Bindungsstellen für regulatorische Moleküle wie Initiationsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Hormone oder den 43S-Ribosomenkomplex enthalten, können ebenfalls die Translationsrate positiv oder negativ beeinflussen. Dies ist für viele mRNA detailliert dargestellt worden [8, 15]. Bei den vier neuen MEAAT2-Transkripen wurden entsprechende Strukturen jedoch bisher nicht identifiziert.
Kokulturen von Gliazellen und Neuronen erhöhen die GLT-1 Proteinexpression. Es wird diskutiert, daß ein oder mehrere Moleküle, von Neuronen sekretiert, an der EAAT2-Regulation beteiligt sind [49]. Untersuchungen mit den Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor-*α und *transforming growth factor-*α zeigten eine Induktion der GLT-1-mRNA und der GLT-1-Proteinexpression. Allerdings scheint dies zum Teil auf der Transkriptionsebene stattzufinden [73].

9.3 Bedeutung der neuartigen 5‘-Isoformen für die Pathogenese

Eine verminderte Wiederaufnahme von Glutamat durch eine EAAT2-Expressionsstörung und die daraus folgende Neurotoxizität (Exzitotoxizität) bildet einen Teil der gemeinsamen Endstrecke bei der akuten und chronischen Neurodegeneration. Die Pathogenese der chronischen Neurodegeneration, im Mausmodell der familiären ALS gezeigt, beginnt allerdings lange Zeit vor der klinischen Symptomatik, vermutlich bedingt durch oxidativen Streß. Dabei sind auch glutamaterge Funktionen frühzeitig beteiligt [16]. Transporterstörungen im Sinne eines inaktiven, funktionslosen Proteins konnten bisher nicht gezeigt werden. Vielmehr wird eine Expressionsstörung von EAAT2 diskutiert, die auf einer gestörten, insbesondere posttranskriptionellen Regulation beruht [28, 49].

Eine Vielzahl an Untersuchungen zeigte eine topisch differentielle (M)EAAT2-Expression bei verschiedenen akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen, allerdings wurden dabei präklinische Stadien oder alternativ gespleißte Isoformen bisher nicht untersucht (S.10ff).

Die neuartigen MEAAT2-Spleißformen wurden aus gesundem Mäusegehirn isoliert und sind damit keine krankheitsspezifischen Isoformen. Sie unterscheiden sich im regulatorisch bedeutsamen 5‘-UTR erheblich voneinander. Es ist anzunehmen, daß sie eine Funktion für die topische Expressionsregulation haben. Im Mausmodell der familiären ALS konnte bereits in der präklinischen (symptomfreien) Phase eine quantitative Expressionsminderung einer der neuartigen MEAAT2-Spleißformen, im Mausmodell der chemisch induzierten Hypoxie eine posthypoxische regionenspezifisch gegenläufige Expression zweier neuartiger MEAAT2-Spleißformen nachgewiesen werden. Sie zeigen somit eine zeitliche und topische Regulation im Verlauf der Erkrankungen, die bei der familiären ALS im Mausmodell bereits in der präklinischen Phase nachweisbar ist [40].

Es ist anzunehmen, daß die Ursache für die differentielle Expression einzelner neuartiger physiologischer MEAAT2-Isoformen in den Strukturen des 5‘-UTR wie z.B. uATG oder uORF liegt, da sie sich lediglich im 5‘-UTR unterscheiden. Die exakten Mechanismen dazu sind jedoch bisher nicht bekannt und Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Kenntnisse über die Struktur und die Funktion der (M)EAAT2-Isoformen unter physiologischen und pathogenetischen Bedingungen bilden die Grundlagen, in dieses System präventiv und therapeutisch gezielt einzugreifen. Die Erstellung eines murinen Modells in dieser Arbeit leistet aufgrund vielfältiger Analyse- und

Interventionsmöglichkeiten im Mausmodell einen wichtigen Beitrag, um entsprechende Strategien zur Prävention der glutamatergen Neurotoxizität zu entwickeln.

9.4 Ausblick

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wurden zeitlich und topisch differentielle Störungen der (M)EAAT2-Expression beschrieben, für eine neuartige MEAAT2-Isoform bereits lange Zeit vor der klinischen Symptomatik. Sie zeigen, daß die Regulation von MEAAT2-Spleißformen sehr früh im Krankheitsverlauf eine Bedeutung hat und diese Spleißformen deswegen vielleicht auch als geeignete biologische Marker für eine frühzeitige Diagnostik benutzt werden können [40].
Im murinen Modell der familiären ALS ließ sich durch den frühzeitigen Einsatz von Riluzol, Gabapentin und Vitamin E, bereits in der präklinischen Phase, sowohl der klinische Verlauf als auch die Überlebenszeit deutlich positiv beeinflussen [16]. Dies verdeutlicht den großen Nutzen einer möglichst frühen Diagnostik, insbesondere bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen, durch die die neuroprotektiven Effekte bei frühem Behandlungsbeginn noch gesteigert werden können [30].
Zwei interessante Substanzen sind charakterisiert worden. Sie könnten als potentiell neuroprotektive Substanzen zur Verminderung exzitotoxischer Schädigungen durch Glutamat beitragen. MS 153, eine pharmakologische Substanz, reduziert in einem Mausmodell der zerebralen Ischämie die extrazelluläre Glutamatkonzentration. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Eine indirekte Modulation der EAAT2-Aktivität wird diskutiert [59]. Das neuronale Polypeptid PACAP 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. Ob auch posttranskriptionelle Modifikationen daran beteiligt sind, ist derzeit noch unklar [12]. 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.

9.5 Schlußfolgerung

Die Regulation und Expression des EAAT2-Gens zur Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist bisher nur unvollständig verstanden. Aufgrund der Komplexität im humanen ZNS unter physiologischen und pathogenetischen Bedingungen ist ein vereinfachtes Mausmodell erforderlich.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden gelang es, vier neue 5‘-UTR Transkriptvarianten des murinen EAAT2-Gens zu klonieren und ihre cDNA-Sequenzen zu identifizieren. Sie entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich im 5‘-UTR sowie durch eine verkürzte proteinkodierende Sequenz (ORF) von den bisher bekannten (M)EAAT2-Isoformen. Die Analyse der Nukleotidsequenzen zeigt, daß die neuen Sequenzmotive über eine Vielzahl regulatorischer Elemente wie uATG, uORF sowie einen verkürzten N-Terminus verfügen, deren exakte Funktionen allerdings bisher nur unvollständig verstanden sind.

In dieser Arbeit gelang es, nachzuweisen, daß es alternatives Spleißen auch im Mausmodell in vereinfachter Form gibt und im Vergleich zum humanen Modell analoge Prinzipien und Mechanismen der Genregulation existieren.

Alternativ gespleißte 5‘-UTR-Isoformen werden bei verschiedenen Genen als allgemeine Regulationsmechanismen der Genexpression beschrieben. Eine topische und zeitliche differentielle Expression einzelner MEAAT2-5‘-UTR-Isoformen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen als Beteiligung an der Genregulation wird angenommen und wird derzeit in Mausmodellen untersucht. Erste Ergebnisse bestätigen diese Annahme.

Die Analyse physiologischer und pathogenetischer Bedingungen kann jetzt, im Mausmodell hergestellt, einen entscheidenden Beitrag liefern zum Verständnis der komplexen EAAT2-Regulation bei Gesunden wie auch bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen und sind damit mögliche Ansatzpunkte für potentielle neue diagnostische und therapeutische Ansätze zur Neuroprotektion.

10 Zusammenfassung

Glutamat ist der quantitativ und qualitativ bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Die Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt wird überwiegend durch den astrogliären Glutamattransporter EAAT2 (excitatory amino acid transporter 2) erreicht. Seine intakte Funktion ist für die exakte Regulation des potentiellen Exzitotoxins Glutamat unerläßlich. Bei vielen akuten und chronisch neurologischen Erkrankungen ist eine zeitliche und topische Expressionsstörung des EAAT2 nachgewiesen, die durch verminderte Glutamatwiederaufnahme zu erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentrationen und damit mittels exzessiver Glutamatrezeptoraktivierung zur Nervenzellschädigung führt (Exzitotoxizität). Ein primärer Transporterdefekt ist bisher nicht bekannt. Klonierungsarbeiten von EAAT2 zeigten jedoch eine Vielzahl proteinkodierender und untranslatierter EAAT2-mRNA-Isoformen (messenger/Boten-RNA), die durch alternatives Spleißen entstanden sind und ein differentielles topisches Expressionsmuster zeigen. Die Regulation dieser EAAT2-Isoformen und ihre Expression sind bisher allerdings nur unvollständig verstanden. Es gibt zunehmend Hinweise für eine Beteiligung dieser Regulationsmechanismen bei der akuten und chronischen Neurodegeneration.

Aufgrund der Komplexität der humanen EAAT2-Expressionsregulation und der unzureichenden Untersuchungsmöglichkeiten entstand diese Arbeit mit dem Ziel, im Mausmodell analoge, aber vereinfachte und damit besser untersuchbare Regulationsmechanismen zu identifizieren.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden gelang es, vier alternativ gespleißte, murine EAAT2-Isoformen zu identifizieren und charakterisieren. Die neuen Nukleotidsequenzen unterscheiden sich im 5‘-untranslatierten Bereich von der bisher bekannten MEAAT2-Form. Sie enthalten jeweils bis zu vier alternative Translationsstartkodons (uATG), die je einen kurzen alternativen offenen Leserahmen (uORF) initiieren und einen um neun Aminosäuren verkürzten Amino-Terminus des putativen MEAAT2-Polypeptides. Ihre Funktionen als regulatorische Elemente sind allgemein etabliert und charakterisiert, für die vier neuen MEAAT2-Transkriptvarianten im einzelnen jedoch noch unvollständig verstanden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß alternatives Spleißen des EAAT2-Gens in vereinfachter Form auch im Mausmodell existiert und daß analoge Prinzipien und Mechanismen der Genregulation vorhanden sind.

Die exakte Bedeutung der neuen Isoformen für die Expressionsregulation von MEAAT2 unter physiologischen und pathogenetischen Bedingungen wird derzeit in pathogenetischen Mausmodellen der akuten und chronischen Neurodegeneration untersucht. Diese Untersuchungen können einen entscheidenden Beitrag liefern zum Verständnis über die Zusammenhänge zwischen alternativ gespleißten MEAAT2-Transkripten und deren Bedeutung für die zeitliche und topische Expressionsregulation.

Eine Übertragung der im Mausmodell gewonnenen Kenntnisse über Störungen der EAAT2-Expressionsregulation der alternativ gespleißten Isoformen auf den Menschen bietet Ansatzpunkte für die Identifizierung potentieller biologischer Marker zur frühen Diagnostik sowie für die Entwicklung therapeutischer Strategien in Form gezielter pharmakologischer Beeinflussung der EAAT2-Expression bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen.

11 Literaturverzeichnis

(1) **Akbar** MT, Rattray M, Williams RJ, Chong NWS and Meldrum BS: Reduction of GABA and glutamate transporter messenger RNAs in the severe-seizure genetically epilepsy-prone rat. Neuroscience 85: 1235-1251 (1998).

(2) **Amara** SG and Arriza JL: Neurotransmitter transporters: three distinct gene families. Curr Opin Neurobiol 3: 337-344 (1993).

(3) **Arriza** JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP and Amara SG: Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. J Neurosci 14: 5559- 5569 (1994).

(4) **Arizza** JL, Eliasof S, Kavanaugh MP and Amara SG: Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4155-4160 (1997).

(5) **Arzberger** T, Krampfl K, Leimgruber S and Weindl A: Changes of NMDA Receptor Subunit (NR1,NR2B) and glutamate transporter (GLT-1) mRNA expression in Huntington's disease - An in situ hybridization study. J Neuropathol Exp Neurol 56: 440-454 (1997).

(6) **Brown** DR **:** Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. J Neurochem 73: 1105 -1113 (1999).

(7) **Danbolt** NC: The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. Prog Neurobiol 44: 377- 396 (1994).

(8) **Day** DA and Tuite MF: Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. J Endokrinol 157: 361-371 (1998).

(9) **Doble** A: The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. Pharmacol Ther 81: 163-221 (1999).

(10) **Erecinska** M and Silver JA: Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. Prog Neurobiol 35: 245-296 (1990).

(11) **Fairman** WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP and Amara SG: An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. Nature 375: 599-603 (1995).

(12) **Figiel** M and Engele J: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. J Neurosci 20: 3596-3605 (2000).

(13) **Fray** AE, Ince PG, Banner SJ, Milton ID, Usher PA, Cookson MR and Shaw PJ: The expression of the glial glutamate transporter protein EAAT2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. Eur J Neurosci 10: 2481-2489 (1998).

(14) **Gegelashvili** G and Schousboe A: High affinity glutamate transporters: Regulation of expression and activity. Molec Pharmacol 52: 6-15 (1997).

(15) **Gray** NK and Wickens M: Control of translation initiation in animals. Annu Rev Cell Dev Biol 14: 399-458 (1998).

(16) **Gurney** ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK and Hall ED: Benefit of Vitamin E, Riluzole, and Gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 39: 147-157 (1996).

(17) **Hagiwara** T, Tanaka K, Takai S, Maeno-Hikichi Y, Mukainaka Y and Wada K: Genomic organization, promoter analysis, and chromosomal localization of the gene for the mouse glial high-affinity glutamate transporter Slc1a3. Genomics 33: 508-515 (1996).

(18) **Hentze** MW: Determinants and regulation of cytoplasmic mRNA stability in eukaryotic cells. Biochim Biophys Acta 1090: 281-292 (1991).

(19) **Horowitz** DS and Krainer AR: Mechanisms for selecting 5‘ splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. Trends Genet 10: 100-106 (1994).

(20) **Kanai** Y and Hediger MA: Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. Nature 360: 467-471 (1992).

(21) **Kanai** Y, Stelzner M, Nußberger S, Khawaja S, Hebert SC, Smith CP and Hediger MA: The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter: Insights into structure and mechanism of transport. J Biol Chem 269: 20599-20606 (1994).

(22) **Kanner** BI: Glutamate transporters from brain: a novel neurotransmitter transporter family. FEBS Lett 325: 95-99 (1993).

(23) **Kawakami** H, Tanaka K, Nakayama T, Inoue K and Nakamura S: Cloning and expression of a human glutamate transporter. Biochem Biophys Res Commun 199: 171-176 (1994).

(24) **Kirschner** MA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA and Amara SG: Mouse excitatory amino acid transporter EAAT2: isolation, characterization and proximity to neuroexcitability loci on mouse chromosome 2. Genomics 24: 218-224 (1994).

(25) **Kozak** M: Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene 234: 187-208 (1999).

(26) **Li** S, Mallory M, Alford M, Tanaka S and Masliah E: Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. J Neuropathol Exp Neurol 56: 901-911 (1997).

(27) **Li** X and Francke U: Assignment of the gene SLC1A2 coding for the human glutamate transporter EAAT2 to human chromosome 11 bands p13-p12. Cytogenet Cell Genet 71: 212-213 (1995).

(28) **Lin** C-L G, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L and Rothstein JD: Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. Neuron 20: 589-602 (1998).

(29) **Lipton** SA and Rosenberg PA: Mechanism of disease: Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. N Engl J Med 330: 613-622 (1994).

(30) **Ludolph** AC, Meyer T, Riepe MW: Antiglutamate therapy of ALS – which is the next step? J Neural Transm Suppl 55: 79-95 (1999).

(31) **Maeno-Hikichi** Y, Tanaka K, Shibata T, Watanabe M, Inoue Y, Mukainaka Y and Wada K: Structure and functional expression of the cloned mouse neuronal high-affinity glutamate transporter. Brain Res Mol Brain Res 48: 176-180 (1997).

(32) **Manfras** BJ, Rudert WA, Trucco M and Boehm BO: Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human brain and pancreas. Biochim Biophys Acta 1195:185-188 (1994).

(33) **Masliah** E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M and Hansen L: Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. Ann Neurol 40: 759-766 (1996).

(34) **Masliah** E, Alford M, Mallory M, Rockenstein E, Moechars D and van Leuven F: Abnormal glutamate transport function in mutant amyloid precursor protein transgenic mice. Exp Neurol 163: 381-387 (2000).

(35) **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 and Adelson PD: Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. Neurology 52: 453-472 (1999).

(36) **Meyer** T, Speer A, Meyer B, Sitte W, Küther G and Ludolph AC: The glial glutamate transporter complementary DNA in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 40: 456-459 (1996).

(37) **Meyer** T, Ludolph AC, Morkel M, Hagemeier C and Speer A: Genomic organization of the human excitatory amino acid transporter gene GLT-1. Neuroreport 8: 775-777(1997).

(38) **Meyer** T, Münch C, Knappenberger B, Liebau S, Völkel H and Ludolph AC: Alternative splicing of the glutamate transporter EAAT2 (GLT-1). Neurosci Lett 241: 68-70 (1998).

(39) **Meyer** T, Fromm A, Münch C, Schwalenstöcker B, Fray AE, Ince PG, Stamm S, Grön G, Ludolph AC and Shaw PJ: The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. J Neurol Sci 170: 45-50 (1999).

(40) **Meyer** T: Publikation in Vorbereitung.

(41) **Milton** JD, Banner SJ, Ince PG, Piggott NH, Fray AE, Thatcher N, Horne CHW and Shaw PJ: Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. Brain Res Mol Brain Res 52: 17-31 (1997).

(42) **Mukainaka** Y Tanaka K, Hagiwara T and Wada K: Molecular cloning of two glutamate transporter subtypes from mouse brain. Biochim Biophys Acta 1244: 233-237 (1995).

(43) **Münch** C, Schwalenstöcker B, Knappenberger B, Liebau S, Völkel H, Ludolph AC and Meyer T: 5'-heterogeneity of the human excitatory amino acid transporter cDNA EAAT2 (GLT-1). Neuroreport 9: 1295-1297 (1998).

(44) **Nicholls** D and Attwell D: The release and uptake of excitatory amino acids. Trends Pharmacol Sci 11: 462-468 (1990).

(45) **Peng** J-B and Guo L-H: Molecular cloning of a glial glutamate transporter from neonatal mouse brain. unveröffentlicht 1996; Gen Bank Lokus MMU 75371.

(46) **Pines** G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E and Kanner BI: Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. Nature 360: 464-467 (1992).

(47) **Preiss** T and Hentze MW: From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. Curr Opin Genet Dev 9: 515-521 (1999).

(48) **Rao** VLR, Baskaya MK, Dogan A, Rothstein JD and Dempsey RJ: Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) protein in rat brain. J Neurochem 70: 2020-2027 (1998).

(49) **Robinson** MB: The family of sodium-dependent glutamate transporters: A focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. Neurochem Int 33: 479-491 (1999).

(50) **Rothstein** JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Strauch BL and Coyle JT: Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 28: 18-25 (1990).

(51) **Rothstein** JD, Martin LJ and Kuncl RW: Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 326: 1464-1468 (1992).

(52) **Rothstein** JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N and Kuncl RW: Localization of neuronal and glial glutamate transporters. Neuron 13: 713-725 (1994).

(53) **Rothstein** JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin L and Kuncl RW: Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 38: 73-84 (1995).

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

(55) **Scott** HL, Tannenberg AEG and Dodd PR: Variant forms of neuronal glutamate transporter sites in Alzheimer's disease cerebral cortex. J Neurochem 64: 2193-2202 (1995).

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

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

(58) **Shashidharan** P, Wittenberg J and Plaitakis A: Molekular cloning of human brain glutamate/aspartate transporter II. Biochim Biophys Acta 1191: 393-396 (1994).

(59) **Shimada** F, Shiga Y, Morikawa M, Kawazura H, Morikawa O, Matsuoka T, Nishizaki T and Saito N: The neuroprotective agent MS-153 stimulates glutamate uptake. Eur J Pharmacol 386: 263-270 (1999).

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

(61) **Sonnewald** U, Westergaard N and Schousboe A: Glutamate transport and metabolism in astrocytes. Glia 21: 56-63 (1997).

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

(63) **Stoffel** W, Sasse J, Düker M, Müller R, Hofmann K, Fink T und Lichter P: Human high affinity, Na^+-dependent L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST-1 (EAAT-1): gene structure and localization to chromosome 5p11-p12. FEBS lett 386: 189-193 (1996).

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

(65) **Strachan** T and Read AP: Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 10-23 (1996).

(66) **Sutherland** ML, Delaney TA and Noebels JL: Molecular characterization of a high-affinity mouse glutamate transporter. Gene 162: 271-274 (1995).

(67) **Takai** S, Kawakami H, Nakayama T, Yamada K and 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 97: 387-389 (1996).

(68) **Tanaka** K: Cloning and expression of a glutamate transporter from mouse brain. Neurosci Lett 159: 183-186 (1993).

(69) **Tanaka** K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M and Wada K: Epilepsy and Exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. Science 276: 1699-1702 (1997).

(70) **Torp** R, Lekieffre D, Levy LM, Haug FM, Danbolt NC, Meldrum BS and Ottersen OP: Reduced post-ischemic expression of a glial glutamate transporter GLT-1 in the rat hippocampus. Exp Brain Res 103: 51-58 (1995).

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

(72) **Van der Velden** AW and Thomas AAM: The role of the 5‘ untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. Int J Biochem Cell Biol 31: 87-106 (1999).

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

12 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 kritischen 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** und Herrn **Dr. Christoph Münch** 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.