

Molekulargenetische Untersuchungen von  
Komponenten des Knorpel-/  
Knochengewebes

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

**Christiane Stelzer**  
geb. in Germersheim

**Mainz, 2000**

**Dekan:**

**Prof. Dr. J. Markl**

**1. Berichtstatter:**

**2. Berichtstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2000**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	13
2.1	Isolierung von DNA	13
2.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus Blut	13
2.1.2	Isolierung von DNA für die Plasmidsequenzierung	13
2.1.3	Isolierung großer Mengen Plasmid- und Cosmid-DNA	14
2.1.4	Isolierung von Phagen-DNA	14
2.2	Isolierung von RNA	15
2.2.1	Isolierung von RNA aus Zellen	15
2.2.2	Isolierung von RNA aus Gewebe	15
2.2.3	DNase I-Behandlung	15
2.3	DNA Standardmethoden	16
2.3.1	Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	16
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA	16
2.3.3	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen	17
2.3.4	Fällung von DNA	17
2.3.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	17
2.4	Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren	18
2.4.1	Klonierung von PCR-Fragmenten in den modifizierten Vektor pBluescript II SK <sup>+</sup> (T-Vektor)	18
2.4.2	Ligation	18
2.4.3	Transformation und Selektion positiver Klone	19
2.4.4	Elektroporation	19
2.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	20
2.6	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	20
2.7	Radioaktive bzw. nicht-radioaktive Markierungstechniken	21
2.7.1	Radioaktive DNA Markierung durch "Random primed oligo labeling"	21
2.7.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit S <sup>35</sup> für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	21
2.7.3	Nick-Translation	21
2.8	Hybridisierungstechniken	22
2.8.1	DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern	22
2.8.2	RNA-DNA Hybridisierung	22
2.8.3	Plaquefilterhybridisierung	23
2.8.4	Koloniefilterhybridisierung	23
2.8.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung an Gewebeschnitten	23
2.8.6	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) an Chromosomenpräparaten	25
2.9	Herstellung der humanen Chondrozyten cDNA-Bank	25
2.9.1	In-vivo-Exzision von pBluescript aus λ ZapII mit Hilfe des ExAssist <sup>TM</sup> /SOLR <sup>TM</sup> Systems	26
2.10	Tierhaltung und Präparation von Mausembryonen	26

2.11	Serial Analysis of Gene Expression (SAGE).....	27
2.11.1	Kultivierung der Zellen und Isolierung von RNA bzw. mRNA.....	27
2.11.2	cDNA-Synthese.....	27
2.11.3	Restriktion der biotinylierten cDNA mit NlaIII und Kopplung an magnetische Kügelchen.....	28
2.11.4	Herstellung der doppelsträngigen Linker.....	28
2.11.5	Ligation der doppelsträngigen Linker.....	29
2.11.6	Abtrennen der cDNA von Streptavidin Beads durch Restriktion mit dem Enzym BsmF1.....	30
2.11.7	Herstellen von glatten Enden und Ligation zur Herstellung von Ditags.....	30
2.11.8	PCR-Amplifikation und Aufreinigung der Ditags.....	30
2.11.9	Restriktion der Ditags mit Nla III und Aufreinigung.....	31
2.11.10	Herstellung von Ditag-Konkatemeren und Aufreinigung.....	31
2.11.11	Herstellung von Datenbanken für die Auswertung der erhaltenen SAGE-Sequenzen.....	32
2.12	DNA-Sequenzierung.....	32
2.13	Computerauswertung von DNA-Sequenzen.....	33
2.14	Proteine.....	33
2.14.1	Stabile Transfektion von 293-Zellen.....	33
2.14.2	Protein-Extraktion.....	34
2.14.3	SDS-Gelelektrophorese.....	34
2.14.4	Proteintransfer (Western Blot).....	35
2.14.5	Immunologischer Nachweis.....	35
2.15	Reagenzien und Materialien.....	36
2.15.1	Puffer und Lösungen.....	36
2.15.2	Radioisotope, Enzyme.....	38
2.15.3	Bakterienstämme.....	38
2.15.4	Molekulargewichtstandards.....	39
2.15.5	Chemikalien und Materialien.....	39
2.15.6	Primersequenzen.....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (FGFR3).....	43
3.1.1	Aufklärung der genomischen Struktur des humanen <i>FGFR3</i> -Gens und Vergleich mit der murinen <i>Fgfr3</i> -Sequenz.....	44
3.1.2	Mutationsanalyse.....	54
3.1.3	Expression der alternativen Spleißformen des <i>FGF-Rezeptor 3</i> -Gens.....	63
3.2	Isolierung und Charakterisierung von EST-Klonen aus einer humanen Chondrozyten cDNA-Bibliothek.....	68
3.2.1	Auswertung der Sequenzdaten und Homologievergleich.....	69
3.2.1.1	EST-Klone mit Homologie zubekanntem Genen.....	70
3.2.1.2	EST-Klone mit Homologie zu Sequenzen unbekannter Funktion.....	77
3.2.1.3	EST-Klone ohne Homologie zu Sequenzen der nr-Datenbank bzw. der EST-Datenbank.....	85
3.2.1	Ausarbeitung einer Strategie zur Isolierung weiterer EST-Klone aus der humanen Chondrozyten cDNA-Bibliothek.....	88

3.2.3	Isolierung und Analyse des EST-Klons Efc34	90
3.2.3.1	Analyse von Efc34	90
3.2.3.2	Chromosomale Lokalisation des EST-Klons Efc34	93
3.2.3.3	Isolierung eines homologen Maus-Gens mfc34	94
3.2.3.4	Verifizierung und Analyse der ermittelten mfc34 Gensequenz	96
3.2.3.5	Northern Analyse zur Bestimmung der Transkriptgröße von mfc34	99
3.2.3.6	Chromosomale Lokalisation von mfc34	101
3.3	Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)	103
3.3.1	Herstellung einer Chondrosarkom-SAGE-Bank	105
3.3.2	Auswertung der Sequenzdaten	108
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>112</b>
4.1	Das humane <i>FGFR3</i> -Gen	112
4.1.1	Merkmale der FGFR-Familie	112
4.1.2	Die genomische Struktur des humanen <i>FGFR3</i> -Gens in Vergleich mit der murinen <i>Fgfr3</i> Sequenz	113
4.1.3	Klinisches Spektrum der <i>FGFR3</i> -Defekte und ihre molekulare Ursache	115
4.1.4	Mutationsanalyse	118
4.1.5	Expression alternativer Spleißvarianten des murinen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (Fgfr3)	123
4.2	Methoden zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene	124
4.3	Analyse von EST-Klonen aus einer humanen Chondrozyten-cDNA-Bank	129
4.3.1	Homologievergleich der erhaltenen EST-Sequenzen	130
4.3.2	Gesamtbewertung der durchgeführten Sequenzierungen	134
4.3.3	Detaillierte Analyse des Klons Efc34	135
4.4	Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)	137
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>140</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>155</b>
7.1	Danksagung	155
7.2	Lebenslauf	156
7.3	Veröffentlichungen	158

## Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abb. 1:</b>	Schematische Darstellung der Extremitätenentwicklung	3
<b>Abb. 2:</b>	Gliedmaßenentwicklung, Achsen und beteiligte Gene	5
<b>Abb. 3:</b>	Röhrenknochen, Wachstumsfuge, Aufbau und Genexpression	7
<b>Abb. 4:</b>	Aufbau des FGFR-Rezeptor 3	44
<b>Abb. 5:</b>	Gelelektrophoretische Auftrennung der Cosmidklone 385.1 und 385.12	45
<b>Abb. 6:</b>	Nukleotidsequenz der 5'-flankierenden Region des humanen <i>FGFR3</i> -Gens	46
<b>Abb. 7:</b>	Vergleich der humanen mit dem murinen 5'-Bereich des <i>FGFR3</i> -Gen	47
<b>Abb. 8:</b>	PCR-Strategie zur Ermittlung der Exon/Intron-Struktur des humanen <i>FGFR3</i> -Gens	49
<b>Abb. 9:</b>	Sequenzierungsstrategie des mit der Primerkombination C/F amplifizierten PCR-Fragments	50
<b>Abb. 10:</b>	Schematische Darstellung der genomischen Struktur von <i>FGFR3</i>	51
<b>Abb. 11:</b>	<i>De novo</i> Mutationsnachweis im <i>FGFR3</i> -Gen eines Hypochondropasie Patienten	57
<b>Abb. 12:</b>	Dreidimensionale Struktur der modellierten IgIII-Domäne von FGFR3	58
<b>Abb. 13:</b>	Northern Blot Analyse transfizierter 293-Zelllinien	60
<b>Abb. 14:</b>	Western Blot Analyse transfizierter 293-Zellen	61
<b>Abb. 15:</b>	Inhibierung der Glykosylierung durch Tunicamycin	62
<b>Abb. 16:</b>	Aufbau und Sequenz des alternativ gespleißten Bereichs des <i>FGFR3</i> -Gens mit abgeleiteten Hybridisierungs sonden	63
<b>Abb. 17:</b>	Im Dunkelfeld aufgenommene Autoradiogramme von sich entwickelnden Mäusen hybridisiert mit spezifischen Sonden [FGFR3-IIIc: A, B, D; Exon FGFR3-IIIb: C, E] und einer Negativkontrolle	66
<b>Abb. 18:</b>	Expressionsmuster von <i>FGFR3</i> in der Blase bzw. in der Wirbelsäule der Maus am Tag E20 der Entwicklung	67
<b>Abb. 19:</b>	DNA-Sequenzvergleich des EST-Klons Efc190 mit der EST-Datenbank	81
<b>Abb. 20:</b>	Peptidsequenzvergleich des EST-Klons Efc190 mit BLASTX	82
<b>Abb. 21:</b>	Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Isolierung weiterer Klone aus der humanen Chondrozyten cDNA-Bank	88
<b>Abb. 22:</b>	Herstellung spezifischer Sonden	89
<b>Abb. 23:</b>	DNA-Sequenzvergleich des 5'-Bereichs von EST-Klon Efc34 mit einem murinen cDNA-Klon	91
<b>Abb. 24:</b>	Sequenz des EST-Klons Efc34	91
<b>Abb. 25:</b>	DNA-Sequenzvergleich des 3'-Bereichs von EST-Klon Efc34 mit einer humanen cDNA-Sequenz	92
<b>Abb. 26:</b>	Aminosäurevergleich des humanen EST-Klons Efc34 mit einem RNA-Erkennungsmotiv von <i>Drosophila melanogaster</i>	92
<b>Abb. 27:</b>	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung des PAC-Klons „PDJ183R8S11“	93
<b>Abb. 28:</b>	Sequenzierungsstrategie des murinen Klons mfc34	95
<b>Abb. 29:</b>	Schematische Darstellung aller möglichen Spleißvarianten	97
<b>Abb. 30:</b>	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des mfc34 Gens	99
<b>Abb. 31:</b>	Northern Blot Analyse des murinen mfc34 Gens	100
<b>Abb. 32:</b>	Dot Blot Analyse des murinen mfc34 Gens	101
<b>Abb. 33:</b>	Lage von mfc34 auf Maus-Chromosom 4	102
<b>Abb. 34:</b>	Graphische Darstellung der SAGE-Methode	104
<b>Abb. 35:</b>	„SYBR-Green“-gefärbte Polyacrylamid-Gele mit Beispielen verschiedener Schritte der SAGE-Methode	107
<b>Abb. 36:</b>	Überblick über alle bisher beschriebenen Mutationen im <i>FGFR3</i> -Gen und die damit assoziierten Erkrankungen	120
<b>Abb. 37:</b>	Die humane FGFR3-Aminosäure-Sequenz der Immunglobulin-Domäne IIIc im Vergleich mit FGF-Rezeptoren anderer Spezies	122

## Verzeichnis der Tabellen

<b>Tab. 1:</b>	Sequenzen der Primer zur Herstellung der Linker	29
<b>Tab. 2:</b>	Sequenzen der Primer zur Herstellung von Sonden für das EST-Projekt	42
<b>Tab. 3:</b>	Sequenzinformation der 9 abgeleiteten Primersequenzen zur Ermittlung der Exon-Intron Grenzen des <i>FGFR3</i> -Gens	48
<b>Tab. 4:</b>	Exon/-Introngrenzen im <i>FGFR3</i> -Gens	52
<b>Tab. 5:</b>	Vergleich des humanen mit dem murinen <i>FGFR3</i> -Gen	53
<b>Tab. 6:</b>	PCR-Primer zur Amplifikation der <i>FGFR3</i> Exons 2-18	54
<b>Tab. 7:</b>	Nachgewiesene <i>FGFR3</i> -Mutationen	55
<b>Tab. 8.1:</b>	Zusammenfassung aller EST-Klone, die Homologie zu Proteinen der extrazellulären Matrix zeigen	71
<b>Tab. 8.2:</b>	Zusammenfassung aller EST-Klone mit Homologie zu cDNAs die an der Translation beteiligt sind	71
<b>Tab. 8.3:</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Genen zeigen, die an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt sind	73
<b>Tab. 8.4</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Proteinen des Cytoskeletts zeigen	74
<b>Tab. 8.5</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Proteasen besitzen	74
<b>Tab. 8.6</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Membranproteinen zeigen	75
<b>Tab. 8.7</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Genen aufzeigen, die an der Transkription beteiligt sind	75
<b>Tab. 8.8</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu mitochondrialen Genen besitzen	76
<b>Tab. 8.9:</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Genen mit sonstigen Funktionen besitzen	76
<b>Tab. 9</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu BACs, PACs bzw. Cosmiden besitzen	77
<b>Tab. 10</b>	Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu verschiedenen cDNAs besitzen	78
<b>Tab. 11</b>	Gewebeverteilung der EST-Klone, die Homologie zu Sequenzen der EST-Datenbank zeigen	79
<b>Tab. 12</b>	Übersicht über die durch UniGene-Analyse und anschließenden Homologievergleich gewonnenen Erkenntnisse	83
<b>Tab. 13</b>	Ergebnis der Datenbankvergleiche gegen die htgs-Datenbank	87
<b>Tab. 14</b>	Prozentuale Verteilung aller ausgewerteten „Tags“	109
<b>Tab. 15</b>	Liste der 40 häufigsten „Tags“ und deren Homologie	110
<b>Tab. 16</b>	Darstellung der 27 „Tags“ die nach ersten Untersuchungen keine Homologie zeigen	111
<b>Tab. 17</b>	Merkmale der fünf beschriebenen Hochdurchsatzmethoden der differentiellen Genexpression	129
<b>Tab. 18</b>	Funktionelle Einteilung bekannter EST-Sequenzen	130

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
abs.	absolut
ACH	Achondroplasie
Ac	Acetat
AER	apikale Ektodermleiste
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cM	centi-Morgan
cpm	„counts per minute“
C-terminal	carboxyterminal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dpc	„days postconception“
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	„expressed sequence tag“
EtOH	Ethanol
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptoren
FISH	„fluorescence <i>in situ</i> -hybridization“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
ges.	gesättigt
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HCH	Hypochondroplasie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
k.o.	„knockout“
konz.	konzentriert
$\mu$	mikro
M	molar
MBp	Megabasenpaare
min	Minute
MOPS	3-( <i>N</i> -morpholin)propansulfonsäure



N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PBS	„phosphate buffered saline“-Puffer
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglycol
PZ	Progressionszone
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	„reverse transcriptase polymerase chain reaction“
SAGE	„serial analysis of gene expression“
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SSC	„standard saline citrate“-Puffer
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TD	Thanatophore Dysplasie
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Trismethyl-ethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	„Units“ (Enzymeinheiten)
Upm	Umdrehungen pro Minute
3'-UTR	3'-nicht translatierte Region
5'-UTR	5'-nicht translatierte Region
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid
WT	Wildtyp
ZPA	Zone polarisierender Aktivität

## 1. Einleitung

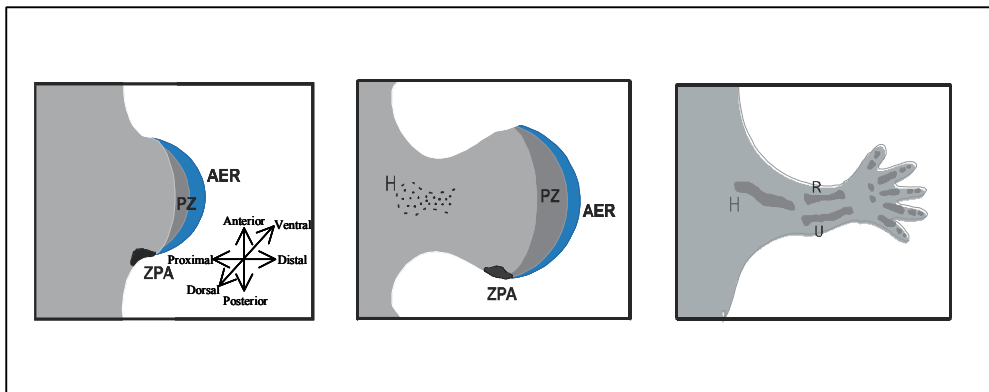
Bei der Krankheitsgruppe der Osteochondrodysplasien handelt es sich um genetisch bedingte Entwicklungsstörungen des Knorpel-Knochengewebes, wobei die Gruppe hunderte zum Teil sehr seltene Erkrankungen umfasst. Ein wesentliches Kennzeichen einiger dieser Krankheitsbilder ist der Kleinwuchs, oft verbunden mit abnormalen Körperproportionen. Als einzelne Erkrankung gesehen, ist das Vorkommen der Osteochondrodysplasien sehr selten, als Gesamtgruppe auch unter Einbeziehung anderer Erkrankungen des Knorpel-Knochensystems wie z. B. der Osteoarthritis stellen die Krankheiten ein großes gesundheitliches Problem dar. Zu Beginn der 90er Jahre war es mit Hilfe der Molekularbiologie möglich, verantwortliche Gene einzelner Skeletterkrankungen zu klonieren und die dem Pathomechanismen zugrundeliegenden Defekte zu identifizieren. Die Entdeckung und weitere Untersuchung der beteiligten Gene trägt zum Verständnis der Ätiologie und der pathogenetischen Zusammenhänge zwischen einzelnen Skelettdysplasien bei und ermöglicht eine umfangreiche molekulare Diagnostik. Darüber hinaus hat sie entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Etablierung neuer therapeutischer Strategien (Übersichtsartikel: Mundlos und Olson, 1997a, b; Dreyer et al., 1998). Zum besseren Verständnis der Krankheitsursachen der Osteochondrodysplasien werden die heute bekannten wesentlichen Grundlagen der normalen Abläufe von Entwicklung, Wachstum, Umbau und Homöostase des Skelettsystems im folgenden kurz dargestellt (Übersichtsartikel: Karsenty, 1998; 1999).

Grundsätzlich lässt sich das Skelett in drei Elemente, die sich von verschiedenen embryonalen Zelllinien ableiten, einteilen. Das kraniofaziale Skelett stammt aus Neuralleisten-Zellen und ist somit ektodermalen Ursprungs. Im Gegensatz dazu leitet sich das restliche Skelett von mesodermalen Zellen ab. Das Axialskelett hat seinen Ursprung in Sklerotomzellen, das Extremitätenskelett entsteht aus dem lateralen Plattenmesoderm. Trotz der unterschiedlichen Herkunft dieser Skelettanteile spielen in allen drei Skelettarten dieselben Zelltypen eine Rolle. Es handelt sich hierbei um knorpelbildende Chondrozyten mesodermalen Ursprungs, um knochenbildende Osteoblasten, die auf Neuralleisten- oder Mesodermanteile zurückgehen und um knochenresorbierende Osteoklasten, die aus Vorläufern der Makrophagen-Monocyten-Linie hervorgehen (Karsenty, 1998). In den letzten Jahren konnten durch molekulargenetische Untersuchungen wesentliche Vorgänge bei der Organogenese des Skeletts aufgeklärt werden (Übersichtsartikel: Tickle, 1995; Erlebacher, 1995; Johnson und Tabin, 1997; Karsenty, 1998).

Bei der Entwicklung des Skeletts und dem Aufbau seiner unterschiedlichen Funktionsstrukturen lassen sich mehrere Abschnitte unterscheiden. In der Phase der Musterbildung kommt es zur Kondensation mesenchymaler Zellen in den Bereichen, die dazu bestimmt sind, Knochen zu bilden. Es entsteht ein Modell des Stützapparates. In der sich anschließenden Phase der Morphogenese, welcher die Prozesse der Organogenese und Histogenese umfasst, kommt es zu der Gestalt- und Formentwicklung der einzelnen Skelettelemente. Die Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen zu Chondrozyten bzw. Osteoblasten und Osteoklasten, sowie die Einwanderung von Blutgefäßen resultiert in der Entstehung von Knorpel bzw. Knochengewebe. Im Rahmen der Histogenese kommt es zur Bildung spezifischer extrazellulärer Matrix. Die folgende Phase des Wachstums betrifft vor allem das im Rahmen der enchondralen Ossifikation stattfindende Längenwachstum, wobei Endgröße und Proportionen festgelegt werden. Den Abschluss bildet die Phase der Homöostase, in der die Knochensubstanz durch kontinuierlichen An- und Abbau erneuert, ihre Form und Größe aber im wesentlichen nicht mehr verändert wird.

### **Phase der Musterbildung (*Patterning*)**

Der Begriff der Musterbildung des Skeletts definiert sich aus der richtigen Anzahl und Form aller Skelettelemente, sowie aus der Anwesenheit der entsprechenden Knochen in der richtigen Anordnung. Vor allem die Entwicklung des Extremitätenskeletts unterlag intensiven Untersuchungen und ist ein geeignetes Beispiel, um die Prozesse der Musterbildung genauer zu erläutern (Johnson und Tabin, 1997). Systematische Untersuchungen bei Huhn und Maus führten zu der Entdeckung zahlreicher Transkriptionsfaktoren und Signalproteine, die für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der drei Entwicklungsachsen verantwortlich sind (Innis und Mortlock, 1998, Manouvrier-Hanu, 1999). Es handelt sich hierbei um die proximal-distale Achse, die sich am Beispiel der Vorderextremitäten vom Extremitätenansatz bis zur Spitze (von Schulter bis zur Fingerspitze) erstreckt, die anterior-posteriore Achse, die parallel zur Körperachse (von Daumen zum kleinen Finger) verläuft, und um die dorsal-ventrale Achse, die vom Handrücken zur Handfläche führt (Abb.1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Extremitätenentwicklung**

Die Extremitätenentwicklung beginnt mit der Bildung einer Knospe aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen. An der Spitze der Knospe befindet sich eine verdickte Schicht aus sich rasch teilenden Zellen, die apikale Ektodermleiste (AER). Im darunterliegenden Mesoderm liegt die Progressionszone (PZ). Am posterioren Rand liegt ein weiteres Organisationszentrum, die Zone polarisierender Aktivität (ZPA). Die Entwicklung der Extremitätenknospe schreitet von proximal nach distal fort [H = Humerus, R = Radius, U= Ulna].

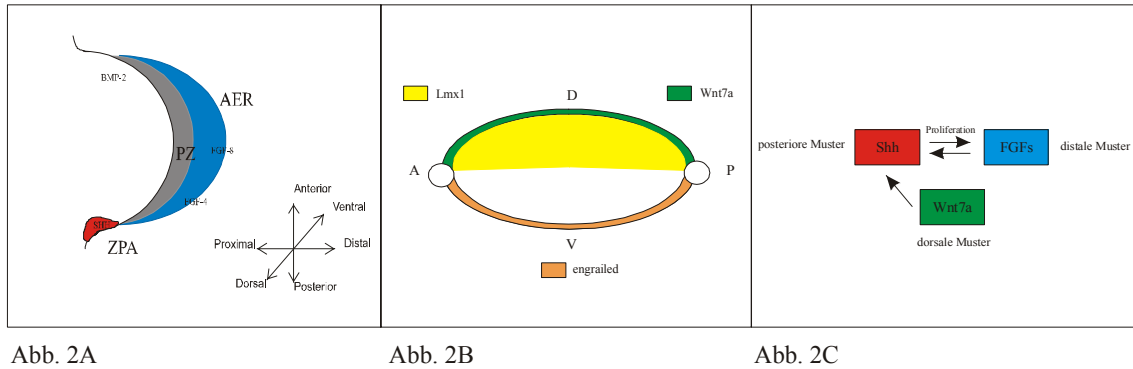
Die Extremitäten der Vertebraten entwickeln sich zunächst als Knospe aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen. An der Spitze der Knospe befindet sich eine Schicht aus sich rasch teilenden undifferenzierten Zellen, die sogenannte Wachstumszone (Progressionzone) (Abb. 1). Ummantelt ist die Extremitätenknospe von Ektoderm, der sogenannten apikalen Ektodermleiste (AER). Wesentliche Signale der apikalen Ektodermleiste werden durch Wachstumsfaktoren der FGF-Familie übermittelt. Fgf-8 wird in der gesamten apikalen Ektodermleiste exprimiert, Fgf-4 lediglich in dem posterioren Bereich (Abb. 2A) (Crossley et al., 1996). So kontrolliert die apikale Ektodermleiste das Auswachsen der Extremitäten entlang der proximal-distalen Achse. Zahlreiche Mitglieder der Fgf-Familie (Fgf-2, 4, 8) können die apikale Ektodermleiste funktionell ersetzen und ein Auswachsen der Extremitätenknospe verursachen (Übersichtsartikel: Cohn und Tickle, 1996).

Die Musterbildung entlang der anterior-posterior Achse ist abhängig von einem Organisationszentrum am posterioren Rand der Mesenchymknospe, das als Zone polarisierender Aktivität (ZPA) bezeichnet wird (Saunders und Gassling, 1968) (Abb. 1). Sonic hedgehog scheint die Schlüsselkomponente bei der anterior-posterioren Musterbildung zu übernehmen (Riddle et al., 1993) (Abb. 2A). Sonic hedgehog wird in der ZPA exprimiert (Abb. 1), es ist an zahlreichen Musterbildungsprozessen, z. B. in den Somiten und im Neuralrohr, beteiligt. *Shh*-"knock-out" Mäusen fehlen distale Gliedmaßenstrukturen, es entwickeln sich lediglich proximale Strukturen (Chiang et al., 1996). Zwischen der Zone

polarisierender Aktivität und der apikalen Ektodermleiste gibt es einen positiven Rückkopplungsmechanismus. So wurde gezeigt, dass *Fgf4* die *Shh*-Expression im posterioren Mesenchym aufrecht erhält und die *Shh*-Expression wiederum die *Fgf4*-Expression in der apikalen Ektodermleiste induziert (Laufer et al., 1994; Niswander et al., 1994). Weitere Faktoren, die an den Wechselwirkungen zwischen AER und ZPA beteiligt sind, stellen die sogenannten Gli-Zinkfingerproteine und die Wachstumsfaktoren BMP-2 und BMP-4 dar. Gli-Zinkfingerproteine sind für die Aktivierung von *hedgehog*-Zielgenen erforderlich, zu denen die BMPs zu zählen sind. Ihre transkriptionelle Induktion durch *Shh* bewirkt, dass die BMPs einen Konzentrationsgradienten entlang der Wachstumszone bilden. Auch Retinsäure liegt in posterioren Regionen in erhöhter Konzentration vor. Retinsäure regt die *sonic hedgehog*-Expression an (Riddle et al., 1993). Retinsäure ist möglicherweise für die Einleitung der Knospenbildung erforderlich, da eine Hemmung der Retinsäuresynthese das Auswachsen der Gliedmaßenknospe verhindert. Schließlich ist die Gruppe der *Homöobox (HOX)*-Gene zu nennen, die u. a. die proximodistale Entwicklung der Gliedmaßen festlegen.

Durch Untersuchungen an verschiedenen Mausmutanten konnten Gene gefunden werden, welche die Entwicklung der dorsal-ventralen Achse in Wirbeltiergliedmaßen steuern. *Wnt-7a*, ein sezerniertes Signalprotein aus der *Wnt*-Familie, ist eines davon. Das Gen *Wnt-7a* wird im dorsalen Ektoderm exprimiert. Eine wesentliche Funktion von *Wnt-7a* besteht darin, die Expression des LIM-Homöobox-Gens *Lmx1b* im angrenzenden Mesoderm zu induzieren (Abb. 2B). Dieses Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor, der im Mesoderm ein dorsales Muster spezifiziert. Mutationen, die z. B. das *Wnt-7a* Gen inaktivieren, führen zu Extremitäten, in denen dorsale Gewebe eine ventrale Entwicklungsrichtung einschlagen (Parr und McMahon, 1995). Es entsteht eine spiegelsymmetrische, beidseitig ventral gestaltete Extremität. Die Expression des Gens *engrailed* ist für das ventrale Ektoderm charakteristisch (Abb. 2B). Wird *engrailed* ausgeschaltet, kommt es zu einer doppelt dorsalen Extremität (Loomis et al., 1996).

In Abb. 2A-C sind die wichtigsten Gene, die an der Ausbildung der drei Entwicklungsachsen beteiligt sind, und deren Wechselwirkungen schematisch dargestellt (Übersichtsartikel: Tickle, 1996; Schwabe et al., 1998). Es handelt sich um ein vorläufiges, stark vereinfachtes Modell. Eine übergeordnete Regulationseinheit aller drei Entwicklungsachsen ist nicht bekannt. Jedoch ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren weitere essentielle Gene der Musterbildung entdeckt werden.



**Abb. 2: Gliedmaßenentwicklung, Achsen und beteiligte Gene**

Darstellung der Transkriptionsfaktoren und Signalproteine, die bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der drei Achsen des Koordinatensystems bei den sich entwickelnden Extremitäten Schlüsselfunktionen übernehmen. Es handelt sich um die proximal-distale (P-D) Achse (Schulter → Fingerspitze), die anterior-posteriore (A-P) Achse (Daumen → kleiner Finger) und die dorsal-ventrale (D-V) Achse (Handrücken → Handteller).

**(2A) Längsschnitt durch die Wachstumszone einer Extremitätenknospe.**

Die an der Randleiste des Ektoderms verdickte Zone (AER) sezerniert Wachstumsfaktoren (FGF4, FGF8) die zur Bildung der proximal-distalen Achse beitragen. Der Wachstumsfaktor sonic hedgehog stellt eine Schlüsselkomponente der anterior-posterior Musterbildung.

**(2B) Querschnitt durch die Wachstumszone einer Extremitätenknospe.**

Wnt-7a wird im dorsalen Ektoderm exprimiert, engrailed im ventralen Ektoderm. Wnt-7a aktiviert Lmx-1 im dorsalen Mesoderm, dieses Gen ist an der Spezifizierung dorsaler Strukturen beteiligt.

**(2C) Wechselwirkung zwischen den Signalproteinen.**

Eine übergeordnete Regulationseinheit aller drei Entwicklungsachsen ist nicht bekannt.

**Phase der Morphogenese und Wachstum**

Der Phase der Musterbildung schließt sich der Prozess der Morphogenese an, der durch die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen in Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten bestimmt wird. Für die Knorpel-Knochenbildung sind zwei prinzipiell unterschiedlich ablaufende Programme verantwortlich. So unterscheidet man die desmale (direkte) Ossifikation von der chondralen Ossifikation, wo ein zunächst vorläufig gebildetes Knorpelmodell im Laufe der Entwicklung durch Knochen ersetzt wird.

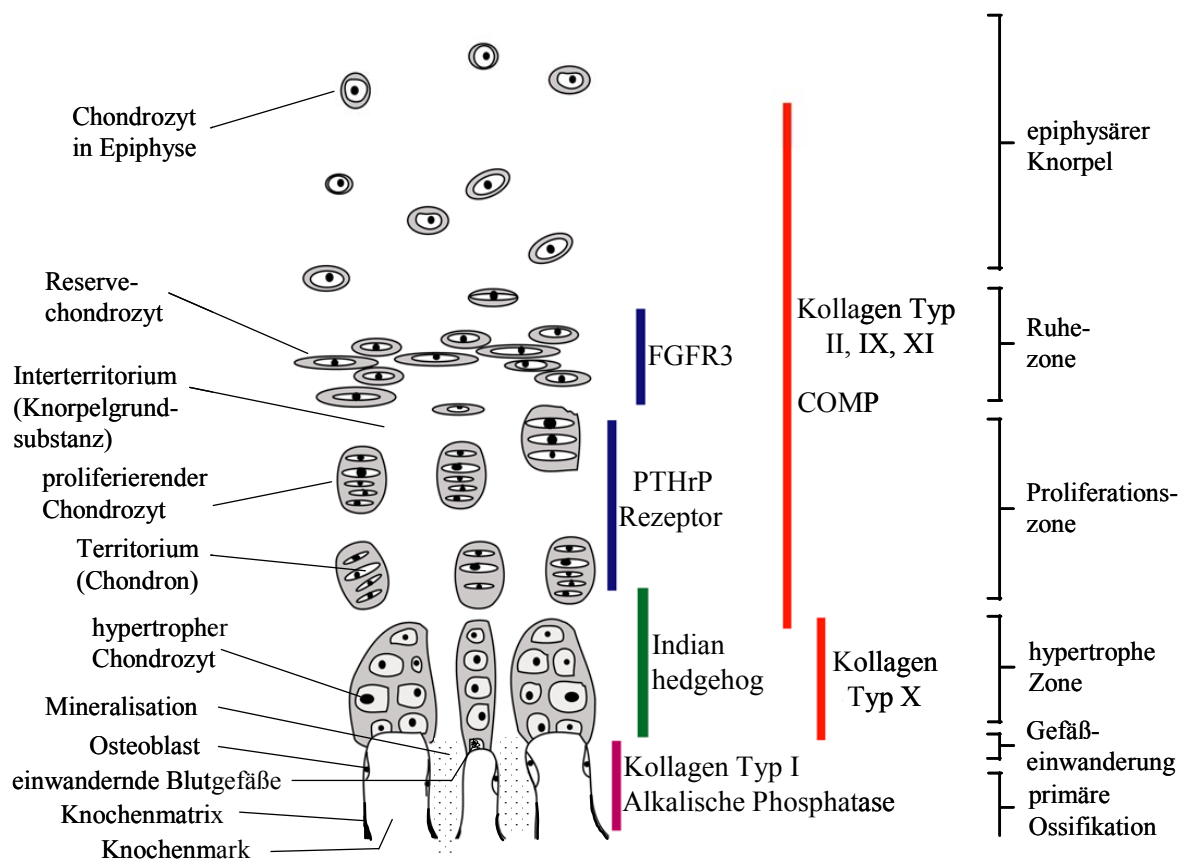
Bei der desmalen Ossifikation wird mesenchymales Gewebe direkt in Knochengewebe umgewandelt. Zunächst verdichtet sich das Mesenchym in Bereichen der Skelettanlage und wird verstärkt vaskularisiert. Die mesenchymalen Zellen differenzieren zu Osteoblasten, sie bilden das Osteoid bestehend aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Kollagen. Die Zellen scheiden das von ihnen gebildete Material in die Umgebung ab, mauern sich dadurch ein und

werden zu Osteozyten. Durch Auflagerung weiterer Knochenschichten entstehen nach und nach immer neue Knochenbälkchen und später eine zusammenhängende Knochenmasse. Zu den Bindegewebsknochen, die durch desmale Ossifikation entstehen, gehören die meisten Schädelknochen sowie Teile der Clavicula.

Bei der chondralen Ossifikation kommt es zu einer Ansammlung undifferenzierter, mesenchymaler Zellen im Zentrum der Extremitätenknospen (Horton und Hecht, 1993). Die mesenchymalen Zellen exprimieren zunächst noch Typ I Kollagen. Liegt das gesamte Extremitätenskelett als Knorpelmodell (Anlage) vor, durchlaufen die Chondrozyten im Rahmen der Chondrogenese einen weiteren Differenzierungsprozess von ruhenden Chondrozyten über proliferierende Chondrozyten mit Chondrozyten-spezifischer Expression von Typ II, IX, XI Kollagen und weiteren Matrixproteinen hin zu hypertrophen Chondrozyten mit Expression von Typ X Kollagen (Horton und Hecht, 1993, Mundlos, 1994) (Abb. 3). Ein möglicher Faktor, der die Differenzierung von Stammzellen zu Chondrozyten reguliert, ist der im Knorpel exprimierte Transkriptionsfaktor Sox9, der auch die Expression von Kollagen Typ II reguliert. (Bi et al., 1999). Am Ende des Prozesses steht die Einwanderung von Blutgefäßen aus dem Perichondrium, das Absterben der hypertrophen Chondrozyten durch Apoptose und der Austausch von Knorpel durch Knochenmatrix durch einwandernde Osteoblasten.

Parallel zu dem Differenzierungsprozess findet innerhalb der Wachstumsfuge das Längenwachstum statt. Die Wachstumsfuge besteht aus funktionell und morphologisch unterschiedlichen Schichten (Abb. 3). Epiphysenwärts findet sich zunächst die Ruhezone bestehend aus Reservechondrozyten. In Richtung Diaphyse schließt sich die Proliferationszone, bestehend aus säulenartig angeordneten proliferierenden Chondrozyten, an. Hier steht die Zellteilung und somit das Knorpelwachstum im Vordergrund. Die dabei stattfindende Matrixsynthese resultiert aus der Expression von Genen, die für Knorpelmatrixproteine codieren. Die extrazelluläre Matrix spielt in der sich anschließenden hypertrophen Zone eine besondere Rolle, insbesondere da sie hier durch den spezifischen Einbau von Typ X Kollagen gekennzeichnet ist. Darauf folgt die Verknöcherungszone, wo mineralisierter Knorpel durch Chondro- und Osteoklasten abgebaut und gleichzeitig durch einwandernde Osteoblasten Knochengewebe (primäre Ossifikation) aufgebaut wird. Charakteristisch für die Zone der primären Ossifikation ist eine vermehrte Produktion von Kollagen Typ I und alkalischer Phosphatase.

Der Prozess der chondralen Ossifikation läßt sich in zwei zeitlich etwas gegeneinander versetzte Vorgänge unterteilen, die perichondrale und die enchondrale Ossifikation. Bei den knorpelig angelegten Röhrenknochen erfolgt die sekundäre Verknöcherung im Bereich der Diaphyse (Knochenschaft) zunächst über die Bildung einer sich von außen kontinuierlich verdickenden Knochenmanschette, vom Perichondrium her (perichondrale Ossifikation) und anschließend von innen (enchondrale Ossifikation).



**Abb. 3: Röhrenknochen, Wachstumsfuge, Aufbau und Genexpression**

Schematische Darstellung eines Röhrenknochens mit Epiphyse, Metaphyse und Diaphyse (links). Detaillierte Abbildung des Aufbaus der Wachstumsfuge im Bereich der Metaphyse mit Darstellung der Expressionsmuster einiger wichtiger Gene, die an dem Prozess der enchondralen Ossifikation beteiligt sind. Rezeptoren (blau), strukturelle Proteine (orange) sowie sekretorische Faktoren (grün) sind farblich voneinander abgehoben (rechts). Nach Dreyer et al., 1998; Zabel und Winterpacht, 2000.

An den hier beschriebenen Differenzierungsprozessen sind eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beteiligt. Wesentlichen Einfluss auf die Chondrozytendifferenzierung bei der enchondralen Ossifikation in der Wachstumsfuge hat der "parathyroid hormone-related protein"-Rezeptor (PTHrPR) im Zusammenspiel mit PTHrP. Das von prähypertrophen Chondrozyten in der Zone zwischen Proliferation und Hypertrophie exprimierte Indian



hedgheg-Protein (Ihh) sendet ein positives Signal an das Perichondrium aus, was dort von dem Hedgehog-Rezeptor patched (ptc) über den Transkriptionsfaktor Gli umgesetzt wird und die PTHrP Produktion im periartikulären Perichondrium (gelenknahe Region) induziert. PTHrP inhibiert die Rate der Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten durch Aktivierung des in der prähypertrophen Zone exprimierten PTH/PTHrP-Rezeptors. Durchlaufen die prähypertrophen Chondrozyten die weitere Differenzierung in Richtung hypertrophe Zellen, schalten sie die Ihh-Produktion ab und das positive Signal in Richtung PTHrP-Produktion unterbleibt, der inhibitorische Effekt von PTHrP auf die Chondrozytendifferenzierung wird aufgehoben (Vortkamp et al., 1996; Lanske et al., 1996).

Wesentlichen Einfluss auf das Knochenwachstum hat der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-3 (FGFR3). Die Generierung einer *Fgfr3* "knock-out"-Maus zeigte, dass diese Tiere größer als vergleichbare Wildtyp-Mäuse sind (Deng et al., 1996, Colvin et al., 1996). Histologische Untersuchungen ließen eine vergrößerte Wachstumsfuge erkennen, verursacht durch eine Ausdehnung der hypertrophen Zone. Die Vergrößerung ist auf diesen Bereich der Wachstumsfuge beschränkt und auf eine verstärkte Proliferation und Reifung der proliferierenden Chondrozyten zurückzuführen. Aufgrund dieser Erkenntnisse geht man davon aus, dass FGFR3 als negativer Regulator des Wachstums fungiert. Funktionell hat FGFR3 einen hemmenden Einfluss, der über FGFR3 laufende Regelkreis sorgt für einen Gleichgewichtszustand der in verschiedenen Zonen der Wachstumsfuge lokalisierten proliferierenden und dann sich differenzierenden Chondrozyten.

Eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren bzw. Transkriptionsfaktoren, die am Wachstum beteiligt sind, sind bekannt und beschrieben (Übersichtsartikel: Stevens und Williams, 1999).

### **Phase der Homöostase**

Knochen unterliegen auch nach Abschluss des Wachstums einem ständigen Umbau. Die Knochensubstanz wird durch Osteoklasten kontinuierlich resorbiert und durch Osteoblasten in einer Weise wieder ersetzt, dass die Knochenmasse immer konstant bleibt. Fortschritte bei dem Verständnis des Differenzierungsprozesses von Osteoklasten wurden wegen fehlender Osteoklasten-Zelllinien vor allem aufgrund genetischer Experimente mit Mäusen gemacht. So konnten dadurch zwei lösliche Faktoren und vier Transkriptionsfaktoren isoliert werden, die wesentlich zur Osteoklastendifferenzierung beizutragen scheinen (Karsenty et al., 1999).

Störungen innerhalb dieses Regelkreises führen zum Verlust (Osteoporose) oder zur Überproduktion (Osteopetrose) von Knochensubstanz (Übersichtsartikel: Lazner et al., 1999). Die hormonell gesteuerten Regulationsvorgänge, die dieses Gleichgewicht erhalten, sind nur teilweise verstanden. Faktoren, die das Gleichgewicht aufrechterhalten, sind u. a. Östrogene, Vitamin D und das Parathormon. Ein weiterer involvierter Faktor ist z. B. das lysosomale Enzym Cathepsin K (Hou et al., 1999).

## **Skelettdefekte**

Die Vielzahl der hier beschriebenen Gene, die an der Entwicklung, am Wachstum und an der Aufrechterhaltung des Skeletts beteiligt sind, spiegelt gleichzeitig die Mannigfaltigkeit der Erkrankungen wieder, die aufgrund von Defekten in diesen Genen entstehen können. Inzwischen sind über 150 verschiedene Formen von genetisch bedingten Erkrankungen des Knorpel-/ Knochengewebes oder Osteochondrodysplasien beschrieben, welche mit einer Gesamthäufigkeit von ungefähr 4–10:10000 vorkommen. Zum Teil handelt es sich um sehr seltene Erkrankungen, wobei die Störungen des Knorpel- bzw. Knochengewebes sich vor allem durch dysproportionierten Minderwuchs manifestieren. Die Einteilung und Nomenklatur der Erkrankungen ist komplex und erfolgte hauptsächlich basierend auf klinischen und röntgenologischen Befunden. Ein Aspekt, der in den letzten Jahren wesentlich zum Verständnis sowie zur Einteilung der verschiedenen Erkrankungen beigetragen hat, ist die Molekularbiologie. Mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen konnten verantwortliche Gene einzelner Skeletterkrankungen kloniert und die den Pathomechanismen zugrundeliegenden Defekte identifiziert werden. Auch die Analyse natürlicher Mausmutanten und die Generierung von Tiermodellen hat bei der Aufklärung entwicklungsbiologischer Grundlagen zu entscheidenden Erkenntnissen geführt.

Ätiopathogenetisch lassen sich die Skelettfehlbildungen in Defekte der Zellentwicklung bzw. Zellsteuerung und in Defekte der Zellfunktion einteilen. Die Defekte der frühen Skelettentwicklung resultieren meistens in abgeschlossenen Organdefekten umschriebener Skelettelemente, deren Ergebnis als Dysostosen bezeichnet werden (Spranger, 1997). Dysostosen werden hauptsächlich durch Mutationen hervorgerufen, die einzelne Schritte der frühen Skelettentwicklung (Zellinduktion, -proliferation, -differenzierung, -kondensation, -apoptose) steuern. Beispiele können für die unterschiedlichen Entwicklungsachsen gegeben werden. So wurde bereits beschrieben, dass die SHH-Genkaskade wichtig für die Ausbildung der anterior-posterioren Achse ist. Mutationen des *SHH*-Gens bewirken das klinische Bild der Holoprosencephalie (Zguricas, 1999, Nanni et al., 1999), während zahlreiche Mutationen in

Genen der SHH-Genkaskade für verschiedene Skelettfehlbildungen verantwortlich sind. Mutationen im *GLI3*-Gen konnten als Ursache der Greig-Cephalopolysyndaktylie, des Pallister-Hall Syndroms und der Postaxialen Polydaktylie Typ A nachgewiesen werden (Vortkamp et al., 1991; Kang et al., 1997; Radhakrishna et al., 1997). Ein weiteres Beispiel stellt die Synpolydaktylie dar, die durch Mutationen im *HOXD13*-Gen verursacht wird (Muragaki et al., 1996).

Störungen der Zellproliferation und -differenzierung sowie Defekte der Zellfunktion, die eine generelle Störung des Skelettsystems als Gewebe bedeuten, werden als Dysplasien bezeichnet. (Spranger, 1997). Hervorgerufen werden diese Dysplasien oft durch bereits pränatal wirksame dominante Genmutationen, die zu fehlerhafter Produktion bzw. Verarbeitung von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix führen. Es handelt sich hierbei um Defekte des Knorpel-/Knochengewebes, die schon bei Geburt manifest sind, wobei dann auch die postnatale Entwicklung des Skelettsystems gestört bleibt. Als Beispiele für die Defekte der Zellfunktion sind die sogenannten Kollagenopathien zu nennen, die durch Mutationen in den Kollagen-Genen Typ I, II, III, IX, X und XI verursacht werden. Bei Defekten des Typ I- als auch des Typ II-Gens verursachen verschiedene Mutationen ein sehr breites Spektrum an Erkrankungen. Die Patienten können von fast normaler Statur sein, schweren dysproportionierten Minderwuchs zeigen oder so schwer betroffen sein, dass ein perinatal tödlicher Verlauf resultiert (Spranger et al., 1994). Mutationen im *COMP* (cartilage oligomeric matrix protein)-Gen, das für einen Matrixbestandteil noch unklarer Funktion codiert, verursachen die Krankheitsbilder der Pseudoachondroplasie und Multiplen Epiphysären Dysplasie (Briggs et al., 1995). Als Beispiel für Störungen im Substratstoffwechsel können Defekte des *DTDST* (diastrophic dysplasia sulfate transporter) Gens genannt werden. *DTDST*-Mutationen führen zu einem pathologischen Sulfatstoffwechsel, dessen Auswirkung u.a. das autosomal rezessiv vererbte Krankheitsbild der Diastrophen Dysplasie sein kann (Hästbacka et al., 1994).

Als bekannteste Störung von Zellproliferation und Zelldifferenzierung ist die Achondroplasie zu nennen (Spranger, 1997). So konnten Mutationen im *Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3* (*FGFR3*)-Gen als Ursache der Achondroplasie, der am häufigsten vorkommenden Skelettdysplasie des Menschen, bei der thanatophoren Dysplasie und bei der Hypochondroplasie gefunden werden (Shiang et al., 1994; Tavormina et al., 1995; Bellus et al., 1995). Funktionell agiert *FGFR3* als negativer Regulator des Knochenwachstums. *Fgfr3*-„knock-out“ Mäuse sind im Vergleich zu normalen Wildtyp-Mäusen deutlich größer (Deng et al., 1996; Colvin et al., 1996). Transfektionsexperimente mit spezifischen ACH- und TD-

Mutationen zeigten eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierung des FGFR3-Rezeptors, wobei die TD-Mutationen eine stärkere Aktivierung des Rezeptors als die ACH-Mutation bewirken (Naski et al., 1996). Bei Vorliegen eines durch Mutation veränderten FGFR3-Rezeptor in der Zellmembran kommt es unabhängig von der Anlagerung von Wachstumsfaktoren zur Zusammenlagerung zweier Rezeptormoleküle (Dimerisierung) und zu einer überschießenden, konstitutiven Rezeptoraktivierung. Die Proliferation von Chondrozyten in der Wachstumsfuge wird dauerhaft gehemmt, die Patienten bleiben klein. Die Hemmung ist bei der Hypochondroplasie schwächer und bei der thanatophoren Dysplasie stärker ausgeprägt (Naski et al., 1996). FGFR3 gehört neben FGFR1, -2 und -4 zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren, die strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind (Johnson und Williams, 1993). Die Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 werden in den frühen Knorpel- und Knochenanlagen, vor allen Dingen während der kraniofazialen Knochenentwicklung, exprimiert (Peters et al., 1992). Dementsprechend konnten bei *FGFR1*- und *FGFR2*-Mutationen als Ursache von Erkrankungen aus der Gruppe der Kraniosynostose-Syndrome nachgewiesen werden (Muenke et al., 1994, Reardon et al., 1994; Wilkie et al., 1995, Übersichtsartikel: Passos-Bueno et al., 1999 ). Kraniosynostosen sind Fehlbildungssyndrome, die durch eine Störung der desmalen Ossifikation hervorgerufen werden und sich durch schwere Schädeldeformierung infolge einer verfrühten Verknöcherung der Schädelnähte auszeichnen. Bei einigen Kraniosynostosen kann zudem auch Syndaktylie beobachtet werden. Transfektionsexperimente mit einer spezifischen FGFR2-C342Y-Mutation zeigten eine ligandenunabhängige, konstitutive Aktivierung des Rezeptors, eine reduzierte Glykosylierung, sowie verminderte Fähigkeit der Ligandenbindung bei Crouzon-Syndrom (Mangasarian et al., 1997). Im Falle einer spezifischen *FGFR2*-Mutation die Apert-Syndrom zur Folge hat, konnte jedoch eine verstärkte Ligandenbindungsfähigkeit nachgewiesen werden (Anderson et al., 1998). Erst durch die Aufklärung der genauen Signalkaskade der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren kann der Mechanismus verstanden werden, den die verschiedenen Mutationen auf die desmale bzw. die chondrale Ossifikation ausüben. Die hier beschriebenen Gendefekte stellen nur einen kleinen Ausschnitt der Osteochondrodysplasien dar, deren molekulargenetischer Defekt aufgeklärt ist. Sie reflektieren jedoch die Komplexität der Skelettentwicklung und verdeutlichen, dass es in jedem Entwicklungsschritt zu Störungen kommen kann, die sich dann in verschiedenen Krankheitsbildern äußern.

## Zielsetzung

Fortschritte bei der Aufklärung der verschiedenen genetisch bedingten Skeletterkrankungen, aber auch das Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Entwicklung des Skelettsystems hängen entscheidend (1) von der weiteren Charakterisierung bekannter, im Knorpel/Knochengewebe aktiver Gene sowie (2) von der Identifizierung neuer Kandidatengene ab.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch unterschiedliche experimentelle Ansätze zu beiden Bereichen beizutragen, im speziellen betraf dies:

(1) Weitere Analyse des bereits bekannten Gens *FGFR3* sowie die Korrelation der Mutationen dieses Gens mit den dadurch bedingten Krankheitsbildern, um so zusätzlichen Aufschluss über die Funktion des Gens bei der normalen und gestörten Skelettentwicklung zu erhalten.

Durch die Aufklärung der genomischen Struktur des humanen *FGFR3*-Gens sollte die Herstellung eines Sets von Primern ermöglicht werden, die zur Mutationsanalyse des kompletten *FGFR3*-Gens bei Patienten mit unklaren Skelettdysplasien eingesetzt werden sollten. Dies ermöglicht ein Mutationsscreening auf genomischer Ebene, was von großem klinischen Interesse ist, da in den wenigsten Fällen Knorpelgewebe der Patienten zur Analyse der *FGFR3*-mRNA zur Verfügung steht.

(b) Die Untersuchung der *FGFR3*-Spleißformen sollte zeigen, ob signifikante Unterschiede bezüglich der zeitlichen und räumlichen Expression existieren, die Hinweise geben auf eine bestimmte entwicklungsbiologische oder krankheitsrelevante Bedeutung.

(2) Evaluierung systematischer Ansätze zur Isolation neuer knorpelspezifischer Gene.

- In einem ersten Ansatz sollte auf der Basis einer humanen Chondrozyten-cDNA-Bibliothek die Möglichkeit eines Knorpel-/ Knochen-EST-Projekts untersucht und beurteilt werden. Es sollten 250 zufällig ausgewählte EST-Klone sequenziert und einer weiterführenden Analyse unterworfen werden. Die Auswertung der Ergebnisse sollte dann Grundlage für eine Strategie zur weiteren Auswertung der Genbank bilden.
- In einem zweiten Versuchsansatz sollte die von Velculescu et al. (1995) veröffentlichte Methode SAGE („serial analysis of gene expression“) auf die Fragestellung der Chondrozyten-Differenzierung angewendet und beurteilt werden. Aufgrund der sehr aufwendigen Technologie umfasste die Zielsetzung die Etablierung der Methode ausgehend von RNA aus einer humanen Chondrosarkom-Zelllinie und die Evaluierung auf ihre Brauchbarkeit zur Untersuchung der oben genannten Thematik.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Isolierung von DNA**

#### **2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Blut**

Die Isolierung von genomischer DNA aus Blut erfolgte mit Hilfe von Qiagen-tip 100 Säulen (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers.

5 ml Vollblut wurden mit 20 ml eiskaltem Puffer G1 vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1300 g für 15 min (4°C) wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert und erneut unter sonst gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in Puffer G2 wurden 150 µl Proteinase K Lösung (20 mg/ml) zugesetzt und bei 50°C für 1 h inkubiert. Die nun klare Lösung wurde dann auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 100 Säule aufgetragen und mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 5 ml Puffer QF von der Säule eluiert. Nach Isopropanolfällung und Waschen der DNA mit 70% Ethanol konnten zwischen 80 und 100 µg DNA isoliert werden.

#### **2.1.2 Isolierung von DNA für die Plasmidsequenzierung**

Die Präparation von Plasmid-DNA für die Sequenzierung mit dem automatischen DNA-Sequenzierer 373A bzw. 377 der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) erfolgte mit Hilfe des "RPM Sample Kits" (Dianova, Hamburg) entsprechend den Herstellerangaben.

Ausgegangen wurde von 3 ml einer Bakterien-Übernachtskultur. Das Reinigungsprinzip beruht darauf, daß nach alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979) die Plasmid-DNA an Glasmilch gebunden wird. Grundsätzlich wurde die DNA in zwei Waschschritten mit Waschpuffer gereinigt, mit 50µl H<sub>2</sub>O eluiert, mit Ethanol gefällt, gewaschen und in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurde 1 µl der DNA-Lösung auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen.

### 2.1.3 Isolierung großer Mengen Plasmid- und Cosmid-DNA

Die Isolierung von größeren Mengen Plasmid- und Cosmid-DNA wurde mit Hilfe des NUCLEOBOND<sup>®</sup> Aufarbeitungskits der Firma Machery und Nagel (Düren) durchgeführt.

In der Regel wurden 500 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) mit 5 µl einer Bakteriendauerkultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C über Nacht inkubiert. Die nach der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) erhaltene Suspension wurde durch Zentrifugation (4°C, 40 min, 15000g) von festen Bestandteilen befreit. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über NUCLEOBOND<sup>®</sup>-AX 500 Säulen. Die mit 12 ml Puffer N5 eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 100 - 200 µl 1x TE-Puffer gelöst.

### 2.1.4 Isolierung von Phagen-DNA

Die DNA-Isolierung aus Phagen erfolgte nach der Methode von Marzluff (unveröffentlicht). Aus NZYDT-Agar wurde ein interessierender Einzelplaque (siehe 2.8.3) ausgestochen und über Nacht in 50 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> bis zur Lyse der Bakterienzellen bei 37°C geschüttelt. Zum Abtöten der restlichen Bakterien wurde der Ansatz nach Zugabe von 500 µl Chloroform weitere 5 min bei 37°C geschüttelt. Nach Abzentrifugation der Bakterienreste (3000 Upm, 4°C, 15 min) wurde der Überstand mit 50 µg RNase A und 50 µg DNase I versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Durch diesen Schritt sollen Reste bakterieller DNA und RNA abgebaut werden. Die Proteinhülle der Phagen wurde in einer anschließenden, einstündigen Inkubation bei 50°C nach Zugabe von 10x Proteinase K Puffer und 300 µl Proteinase K (10 mg/ml) aufgebrochen. Nach Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol und Inkubation auf Eis für 10 min wurde die DNA abzentrifugiert (3000 Upm, 20 min, RT). Das Pellet wurde in 300 µl 1x TE resuspendiert und durch zahlreiche Phenol- bzw. Phenol-Chloroform Extraktionen und eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion gereinigt. Die Fällung der Phagen-DNA erfolgte nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc und 0,6 Volumen Isopropanol. Das Pellet wurde in 250 µl 1x TE aufgenommen und die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

## 2.2 Isolierung von RNA

### 2.2.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des Qiagen total RNA Mini-Kits (Qiagen, Hilden).

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 1x Trypsin-EDTA Lösung (Sigma, Deisenhofen) wurden diese ohne Medium 5 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend konnten die Zellen mit 25 ml PBS abgewaschen werden. Nach 15 minütiger Zentrifugation (1200 Upm, 4°C) wurde das Zellpellet in 1,9 ml Puffer RLT aufgenommen und durch Homogenisierung konnten die Zellen aufgebrochen werden. Die weitere Aufarbeitung der RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.2 Isolierung von RNA aus Gewebe

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenen Geweben erfolgte je nach Gewebemenge mit dem QIAGEN RNeasy Mini RNA Kit (Qiagen, Hilden) oder mit dem QIAGEN RNeasy Midi-Kit (Qiagen, Hilden). Die Präparation erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers. Alle Lösungen, die bei Arbeiten mit RNA verwendet wurden, wurden vor Gebrauch mit 0,2% DEPC-H<sub>2</sub>O versetzt und anschließend autoklaviert.

### 2.2.3 DNase I-Behandlung

Da eine Verunreinigung der isolierten RNA mit DNA in nachfolgenden Reaktionen stört, wurde die RNA mit DNase I behandelt. DNase I ist eine unspezifische Endonuklease, die einzel- und doppelsträngige DNA zu Oligodesoxyribonukleotiden mit einem 5'-Phosphat abbaut. In Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> wird nur ein Strang der DNA hydrolysiert und auf diese Weise werden Einzelstrangbrüche gebildet.

Die Inkubation der RNA erfolgte in einem Reaktionspuffer bestehend aus 1x TE-Puffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT mit 10-30 Units RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon Rot) und 10-30 U DNase I (RNase frei) (Boehringer, Mannheim) für 2 Stunden bei 37°C. Durch



anschließende Aufreinigung über QIAGEN Mini-Säulen (Qiagen, Hilden) wurde die Reaktion abgestoppt und die RNA von Enzym gereinigt.

## **2.3 DNA-Standardmethoden**

### **2.3.1 Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Restriktion von DNA mit Hilfe von Endonukleasen erfolgte entsprechend den Angaben des jeweiligen Enzymlieferanten und unter Benutzung der mitgelieferten Restriktionspuffer. Die verwendete Enzymmenge variierte je nach Aktivität des entsprechenden Enzyms, der Qualität und der Menge der zu restringierenden DNA.

### **2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf horizontal gelagerten Agarosegelen, wobei als Puffersystem 1X TBE verwendet wurde. Die Konzentration der Gele war abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente und lag im Durchschnitt zwischen 0,8% und 2%. Vor der Elektrophorese wurde die aufzutrennende DNA mit 1/6 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt. Die Spannung wurde auf 110 V (25 - 30 mA) begrenzt. Nach Ethidiumbromidfärbung (5 µg/ml in H<sub>2</sub>O) wurden die Agarosegele auf einem Transilluminator (312 nm, Renner, Dannstadt) mit angeschlossenem digitalen Kamerasystem (Herolab E.A.S.Y. System) aufgenommen.

Als Molekulargewichtsstandards dienten Hind III-restringierte λ-DNA (Pharmacia, Freiburg) sowie 123 bp und 100 bp "Leiter" Marker (Gibco BRL, Eggenstein).

Die Auftrennung von RNA-Molekülen erfolgte auf horizontalen 1%-igen Agarosegelen, die 6% Formaldehyd enthielten. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Vor der Elektrophorese wurde 2 Vol. 1,5x "RNA Sample"-Puffer zugegeben. Durch anschließende Inkubation bei 65°C für 5 min wurden die Sekundärstrukturen aufgelöst. Der RNA-Ansatz wurde auf Eis abgekühlt, mit 1/10 Volumen RNA-Blau Marker und 1 µg Ethidiumbromid versetzt und sofort auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente "RNA-Ladder" der Firma GibcoBRL (Karlsruhe). Zur Darstellung der RNA wurde das Gel direkt auf einem UV-

Transilluminator betrachtet und mit dem E.A.S.Y. Videosystem (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

### **2.3.3 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen**

Nach gelelektrophoretischer Trennung wurden die Ethidiumbromid-gefärbten Banden auf einem Transilluminator aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolation der Fragmente aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

### **2.3.4 Fällung von DNA**

Wenn nicht anders beschrieben, wurde die DNA durch Zusatz von 1/10 Volumen 3M NaAcetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol abs. gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13000 Upm wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 15 min zentrifugiert und anschließend vakuumgetrocknet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **2.3.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von kleinen PCR-Fragmenten wurden vertikale Polyacrylamidgele verwendet. Die Acrylamidkonzentration variierte je nach Größe der zu untersuchenden Fragmente und lag zwischen 6% - 20%. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 - 200 V. Als Marker wurden 25 bp bzw. 100 bp Marker (Boehringer, Mannheim) verwendet. Im Anschluß an die Auftrennung wurden die Polyacrylamid-Gele mit 1x SYBR-Green (Biozym, Oldendorf) 15 min gefärbt und direkt auf einem Transilluminator ausgewertet.

## 2.4 Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren

Zur Subklonierung von DNA-Fragmenten wurde der Plasmidvektor pBluescript<sup>®</sup> II SK<sup>+</sup> (Stratagene, Heidelberg) mit dem entsprechendem Restriktionsenzym verdaut und je nach Bedarf mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Boehringer, Mannheim) behandelt. Sowohl die Vektor-DNA als auch die subzuklonierenden Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 2.3.3).

### 2.4.1 Klonierung von PCR-Fragmenten in den modifizierten Vektor pBluescript II SK<sup>+</sup> (T-Vektor)

Zur effektiven Klonierung von PCR-Produkten wurde der linearisierte Vektor pBluescript nach der Methode von Marchuk et al. (1990) an seinen Enden modifiziert.

Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft template-unabhängig an das 3'-Ende von PCR-Produkten ein Desoxyadenosin zu heften. Diese Tatsache wurde ausgenutzt und der Vektor wurde nach Restriktion dem sogenannten „T-Tailing“ unterworfen.

Für die Herstellung wurden 3 µg pBluescript mit dem Restriktionsenzym EcoRV verdaut und am 3'-Ende ein Desoxythymidin (dTTP) angefügt. Die Reaktion erfolgte in einem Ansatz bestehend aus 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH 8.3), 0,1 % Gelatine, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,75 mM dTTP und 5 Units Taq-Polymerase für 1 Stunde bei 75°C. Nach Gelaufreinigung wurde der T-Vektor in ¼ TE-Puffer gelöst und zur direkten Klonierung von PCR-Fragmenten verwendet.

### 2.4.2 Ligation

Die Ligationsreaktion erfolgte mit Hilfe von T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Schwalbach) in dem vom Enzymhersteller empfohlenen Puffer. In der Regel variierte die Menge an eingesetzter Vektor-DNA und einzuklonierender DNA zwischen 50 und 100 ng. Es wurde in einem Reaktionsvolumen von 15 µl über Nacht bei 16°C ligiert. Die Hälfte dieses

Reaktionsansatzes wurde zur Transformation von kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen eingesetzt.

### 2.4.3 Transformation und Selektion positiver Klone

Die Transformation von Bakterien des Stammes *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983).

100 ml SOB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur von DH5 $\alpha$  angeimpft ( $OD_{550}=0,05$ ) und unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,5 erreicht hatte. Die Zellen wurden pelletiert (1200g, 8 min, 4°C), vorsichtig in 30 ml Tbf I resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (800g, 8 min, 4°C) wurden die Bakterien in 4 ml Tbf II vorsichtig resuspendiert und in 200  $\mu$ l-Aliquots bei -70°C eingefroren.

Für die Transformation wurden 50 - 100  $\mu$ l dieser Bakteriensuspension mit der Hälfte des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Vektor-DNA in die Bakterienzellen erfolgte durch einen 1-minütigen Hitzeschock bei 42°C. Nach Zugabe von 1 ml SOB-Medium wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

In der Regel wurden 100 - 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 40  $\mu$ g/ml X-Gal und 50  $\mu$ g/ml IPTG ausgestrichen und für 16 - 20 h bei 37°C bebrütet.

Zur Überprüfung der Insertgröße wurde direkt aus rekombinanten Bakterienkolonien mit den pBluescript spezifischen Primern T<sub>3</sub>A und T<sub>7</sub>A (vgl.2.15.6), wie unter 2.5 beschriebenen, eine PCR durchgeführt.

### 2.4.4. Elektroporation

Die Transformation der SAGE-Konkatemere erfolgte mittels Elektroporation. Dazu wurde 1  $\mu$ l der aufgereinigten Konkatemere mit 20  $\mu$ l ElectroMAX DH10 (GibcoBRL, Karlsruhe) gemischt und eine Minute auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in gekühlte Elektroporationsküvetten (0,1 cm, BioRad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 Kv und 25 $\mu$ F in einem Elektroporationsgerät der Firma BioRad (BioRad Gene Pulser). Der Ansatz wurde in Transformationsröhrchen (2095, Falcon) nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Es wurden jeweils 50  $\mu$ l der Suspension auf Zeocin-haltige LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

## 2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (Saiki et al., 1988) wurde in 20 - 100 µl Ansätzen durchgeführt. In der Regel wurden 50 - 100 ng DNA pro PCR-Reaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 40 mM KCl, 10mM Tris/HCl (pH 8,3), 0,1 mg/ml Gelatine, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 1 µM der beiden Primer, je 200 mM der vier dNTPs sowie 1 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer Cetus, USA). Ausgehend von einem Standardprogramm (1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 72°C, 35 Zyklen) variierten die Amplifikationsbedingungen je nach verwendeter Primerkombination und Matrizen-DNA. Eine initiale 4-minütige Denaturierung und eine abschließende Inkubation bei 72°C für 7 min waren konstant. Die PCR-Reaktion erfolgte entweder in einem TC-1-Gerät (Perkin-Elmer, Weiterstadt) oder in einem PTC-100-Gerät (MJ-Research, USA).

Zur Überprüfung der Amplifikation wurde 1/10 Volumen der PCR-Reaktion auf einem 1 - 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

## 2.6 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente aus RNA wurden diese zunächst mit Hilfe der MMLV-Reversen Transkriptase (GibcoBRL, Karlsruhe) in einen DNA-Einzelstrang überführt. Dazu wurden 4 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 16 µl DEPC-H<sub>2</sub>O für 10 min bei 70°C denaturiert. Nach Zugabe von 6,25 µM Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer, 100 U RNase Inhibitor (MBI Fermentas, St.Leon-Rot), 10 mM DTT, 0,9 mM dNTPs, 1x Reaktionspuffer (GibcoBRL, Karlsruhe) und 300 U MMLV-Reverse Transkriptase wurde der Ansatz für 90 min bei 37°C inkubiert. Durch 10-minütiges Erhitzen auf 95°C wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert.

Für die anschließende PCR wurde in der Regel 2 µl cDNA als Template mit genspezifischen Primern verwendet.

## 2.7 Radioaktive bzw. nicht-radioaktive Markierungstechniken

### 2.7.1 Radioaktive DNA Markierung durch "Random primed oligo labeling"

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelten "random primed oligo labeling" Technik. Für eine Markierung wurden 2 - 5 ng denaturierte Sonden-DNA, 30  $\mu\text{Ci}[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$  (Amersham, Braunschweig), 6  $\mu\text{l}$  „Oligolabelingbuffer“ (OLB), 60  $\mu\text{g}$  BSA, 3 U Klenow-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) in einem 30  $\mu\text{l}$  Ansatz für 2 - 4 h bei 37°C inkubiert. Zur spezifischen Markierung von PCR-Produkten wurde anstelle der Hexamere 0,6  $\mu\text{M}$  entsprechende PCR-Primer in die Reaktion eingesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über Sephadex G-50-Säulen (MicroSpin™ G-50 Columns, Pharmacia) von der markierten DNA getrennt.

### 2.7.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit $\text{S}^{35}$ für die *in situ*-Hybridisierung

Die Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotide (42 – 45 bp) erfolgte mit Hilfe der Terminalen Desoxynucleotidyltransferase (TdT), die matrizenunabhängig Nukleotide an die 3'OH-Enden doppel- oder einzelsträngiger DNA-Moleküle anhängt.

Pro Reaktion wurden 80 ng Oligonukleotid, 5  $\mu\text{l}$  5x Cobalt Puffer (Gibco BRL, Eggenstein), 12  $\mu\text{l}$   $\alpha\text{-}^{35}\text{S}$ -dATP (DuPont, NEN, USA), 20 U TdT (Takara, Amersham) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über Nensorb 20-Säulen (DuPont, NEN, USA) von den markierten Oligonukleotiden getrennt.

### 2.7.3 Nick-Translation

Die Markierung von restringierter PAC-DNA für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde mit Hilfe des „Nick-Translations-Kits“ (Boehringer, Mannheim) nach der Methode von Macgregor und Mizuno (1976) durchgeführt. Es wurde ca. 1  $\mu\text{g}$  Sonden-DNA gemäß den Herstellerangaben markiert. Der Ansatz wurde im Anschluß wie unter 2.3.4 beschrieben gefällt.

## 2.8. Hybridisierungstechniken

### 2.8.1 DNA-DNA-Hybridisierung nach Southern

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mittels Southern-Transfer (Southern, 1975) aus Agarosegelen auf Nylonmembranen (Hybond<sup>TM</sup> N<sup>+</sup>, Amersham) übertragen. Die Agarosegele wurden zunächst für 30 min in Denaturierungspuffer und anschließend für 45 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Als Transferpuffer diente 10x SSC. Der Transfer erfolgte über Nacht (16 - 20 h). Danach wurde die Nylonmembran kurz in 2x SSC gewaschen und für 2 h bei 80°C im Ofen zur Fixierung der DNA gebacken.

Die Prähybridisierung erfolgte bei 65°C für mindestens 4 h in "Church"-Hybridisierungspuffer. Die Hybridisierung der DNA mit der denaturierten radioaktiven Sonde (vgl. 2.7.1) in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  cpm pro ml Hybridisierungspuffer wurde bei 65°C für 16 - 20 h durchgeführt. Im Anschluß wurden die Filter bei 65°C mit zunehmender Stringenz in NaHPO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Puffer, 1% SDS gewaschen, bis die auf einem Müller-Geiger-Zähler gemessene Aktivität zwischen 20 und 50 Zerfälle/Sekunde lag.

Zur Autoradiographie wurden die noch feuchten Filter mit einem Röntgenfilm (RPN8, Amersham) bedeckt und in einer mit Verstärkerfolie (Quanta III, Cronex-Kassette, DuPont) ausgekleideten Filmkassette exponiert. Die Exposition der Filme erfolgte bei -80°C für 3 bis 48 h.

### 2.8.2 RNA-DNA Hybridisierung

Für die Northern-Hybridisierung wurden ungefähr 15 µg Gesamt-RNA auf einem 1%-igen Agarosegel (vgl. 2.3.2) elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluß wurde das Gel 40 min in Hydrolyse-Puffer (50 mM NaOH / 10 mM NaCl), danach zweimal 20 min in Neutralierungs-Puffer (0,2 M Tris pH 7,4/ 10x SSC) inkubiert. Durch diesen Schritt wird die RNA in kleinere Fragmente zerlegt, was einen effektiveren Transfer zur Folge hat. Die RNA wurde danach über Nacht mit 10x SSC als Transferpuffer auf Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham, Braunschweig) transferiert. Die Fixierung erfolgte durch UV-Licht in einem Stratalinker-Gerät (Stratagene, Amsterdam). Die weitere Behandlung des Filters erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben.

### 2.8.3 Plauefilterhybridisierung

Die Identifikation von  $\lambda$ -Klonen mit einer radioaktiven Sonde aus unterschiedlichen cDNA-Banken erfolgte nach der von Benton und Davis (1977) beschriebenen Methode der Plauefilterhybridisierung. Zur Adsorption der Phagen an die Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>, Amersham) wurde diese für 1 Minute (Duplikatfilter: 3 min) auf die Platte gelegt. Es folgte eine 1-minütige Denaturierung in 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH, anschließend zweimal eine jeweils 3-minütige Neutralisierung in 0,5 M Tris pH 7,4 / 1,5 M NaCl und eine abschließende Neutralisierung in 2x SSC-Puffer. Durch 2-stündiges Backen bei 80°C wurde die DNA an der Membran fixiert.

### 2.8.4 Koloniefilterhybridisierung

Zur Identifizierung von rekombinanten Bakterienkolonien wurde die Methode von Grundstein und Wallis (1979) leicht modifiziert. Glycerinkulturen von rekombinanten Bakterien wurden entweder mit einer Pipettenspitze oder, falls sie im 96-Loch-Mikrotiterplatten-Format vorlagen, mit einem 96er Stempel (Sigma, USA) auf Hybond N<sup>+</sup> Filter (Amersham, Braunschweig) überführt. Die Filter wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten (100  $\mu$ g/ml) bei 37°C über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Filter 5 min mit Denaturierungs- und 5 min mit Neutralisierungspuffer behandelt. Nach Fixierung der DNA an die Membran durch Backen (1 Stunde, 80°C) erfolgte die Hybridisierung und Detektion wie unter 2.8.1 beschrieben.

### 2.8.5 *In-situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten

Die radioaktive *in-situ*-Hybridisierung von tiefgefrorenen murinen Gewebeschnitten wurde nach der von Schalling et al. (1990) beschriebenen Methode durchgeführt.

Für die Hybridisierung wurde das markierte Oligonukleotid (vgl. 2.7.2) in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  cpm/ml in dem Hybridisierungspuffer 30 min bei 42°C präinkubiert. Der Hybridisierungspuffer setzt sich zusammen aus 50% Formamid, 4x SSC, 1x Denhardt-Lösung, 1% Sarcosyl, 0,02 M Phosphat-Puffer (pH 7,0), 10% Dextran Sulfat (Pharmacia, Biotech), 500  $\mu$ g/ml Lachs-Sperma-DNA, 200 mM Dithiothreitol. Die bei -20°C gelagerten



murinen Schnitte wurden mit 50 – 100 µl Hybridisierungslösung bedeckt und für 16 Stunden in einer feuchten Kammer (4x SSC, 50% Formamid) bei 42 °C inkubiert.

Zur Entfernung überschüssiger Sonde wurden die Objektträger 4x in 1xSSC bei 55 °C für jeweils 15 min gewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe getrocknet, anschließend wurde eine Exposition auf Amersham Hyperfilm-β-max durchgeführt. Der Film wurde zwischen 5 - 8 Tagen exponiert. Das entwickelte Autoradiogramm erlaubte die grobe Lokalisation der Expression in verschiedenen Embryobereichen. Darüber hinaus zeigten die Kontrollen, ob das Oligonukleotid spezifisch hybridisiert hatte.

Der Nachweis der radioaktiv markierten Sonde erfolgte durch Autoradiographie. Dabei wurden die Objektträger mit einer strahlungssensitiven Emulsion (NTB2, Kodak) beschichtet. Die Schwärzung des Autoradiogramms entsteht durch Wechselwirkung von Atomen in der Photoemulsion mit β-Strahlern des an das Oligonukleotids gekoppelten Isotops. Die Emulsion enthält Silberhalogenide, die durch die Energie der Wechselwirkungen zu metallischem Silber reduziert werden. Die Silberatome aggregieren zu größeren, mikroskopisch sichtbaren Silberkörnern. Dieses latente Bild kann mit normalen photographischen Methoden entwickelt und fixiert werden.

Bei der Durchführung war vor allem darauf zu achten, daß alle Schritte in absoluter Dunkelheit stattfanden. Da das Auflösungsvermögen mit der Schichtdicke der Emulsion abnimmt, wurde diese, 1:1 mit Wasser verdünnt, bei 37°C geschmolzen. Die Objektträger wurden kurz in die luftblasenfreie Emulsion getaucht und über Nacht in vertikaler Position getrocknet.

Die getrockneten Schnitte wurden in lichtdichten Kunststoffbehältern mit einem Trocknungsmittel (Silikagel) bei Raumtemperatur 3 bis 4 Wochen exponiert.

Die mit Emulsion beschichteten Objektträger wurden 5 min in D19 Entwickler (Kodak) entwickelt, kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann 6 min in Kodak 3000 A Fixierer fixiert. Nach einstündigem Waschen mit Leitungswasser wurden die Schnitte einmal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

Die mikroskopische Auswertung der Objektträger erfolgte an einem Axiophot Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Als Filmmaterial wurden S/W-Filme TMX 100 (Kodak) verwendet.

### **2.8.6 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) an Chromosomenpräparaten**

Die chromosomale Lokalisation des humanen MINT-Gens wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nach Seipel (1996) ermittelt. Dazu wurden Metaphasen von menschlichen Lymphozyten nach der Methode von Lemieux (1992) präpariert. Als Hybridisierungssonde diente PstI-restringierte PAC-DNA, die zuvor über Nicktranslation mit Digoxigenin 11-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert wurde (vgl. 2.7.3). Die in Anwesenheit von Cot-1 DNA (GibcoBRL, Karlsruhe) und einzelsträngiger Lachs-Sperma-DNA mit Ethanol gefällte DNA wurde in 50% Formamid und 2x SSC resuspendiert. Nach Denaturierung der DNA bei 75°C (10 min) wurde die Sonde zur Absättigung repetitiver Sequenzen 15 min bei 37°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte sofort im Anschluss bei 37°C (16 Stunden) auf nach Klever et al. (1981) denaturierten Chromosomenpräparaten. Danach wurden die Objektträger dreimal 6 min in 50% Formamid, 2x SSC (42°C), einmal 6 min in 2x SSC (42°C) und einmal 6 min in 0,1x SSC bei 60°C gewaschen. Es folgte eine weitere Inkubation für 20 min bei 37°C in 5% BSA, 0,1% Tween, 4x SSC. Wie von Lichter et al. (1988) beschrieben erfolgte die Detektion der Sonde mit einem monoklonalen anti-Dig-Antikörper (Maus, Sigma), TRITC-markiertem anti-Maus IgG-Antikörper (Kaninchen, Sigma) und TRITC-markiertem anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Ziege, Sigma) zur Verstärkung. Zur Dokumentation wurden die Chromosomenpräparate mit DAPI (Boehringer, Mannheim) gegengefärbt und in einem speziellen Medium (Vector Laboratories, USA) eingebettet. Die Analyse der Bilder wurde mit einem Leica (Bensheim) DMRBE Fluoreszenz-Mikroskop (100x/1.30 Fluotar Ölimmersions-Objektiv) durchgeführt. Dokumentiert wurden die Bilder mit einer CCD-Kamera und einem assoziierten Computer-Software Paket (Applied Imaging, USA).

### **2.9 Herstellung der humanen Chondrocyten-cDNA-Bank**

Die humane Chondrocyten-cDNA-Bank wurden von B. Lee et al. (Houston) hergestellt. Ausgangsmaterial war humanes Knorpelgewebe (20. Schwangerschaftswoche bis 2. Lebensjahr). Die Herstellung erfolgte unter Verwendung eines ZAP-cDNA Synthese-Kits (Stratagene, Heidelberg), der auf der Methode von Gubler und Hoffmann (1983) basiert.

### 2.9.1 In-vivo-Exzision von pBluescript aus $\lambda$ ZapII mit Hilfe des ExAssist<sup>TM</sup>/SOLR<sup>TM</sup> Systems

Der Uni-ZAP-Vektor ist so konstruiert, dass einklonierte DNA-Integrate *in vivo* ausgeschnitten und rezirkularisiert werden können, ohne dass weitere Subklonierungsschritte durchgeführt werden müssen.

Hierzu wurden 100  $\mu$ l der im SM-Medium befindlichen positiven Klone mit 200  $\mu$ l XL1-Blue-Zellen ( $OD_{600}=1,0$ ) und 1  $\mu$ l ExAssist Helferphagen ( $>1 \times 10^6$  pfu/ml) für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml 2x YT-Medium wurde der Ansatz bis zur Ausbildung eines klaren Lysats für 3,5 – 4 h bei 37°C geschüttelt. Zum Abtöten der Bakterien wurde der Ansatz 20 min auf 70°C erhitzt, es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4000 g. 1  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 200  $\mu$ l SOLR-Zellen ( $OD_{600}=1,0$ ) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l des Ansatzes auf LB-Ampicillin Platten (50  $\mu$ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.10 Tierhaltung und Präparation von Mausembryonen

H/H-Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen bei 22°C Raumtemperatur, einer Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 10\%$  und einem Hell-Dunkelzyklus von 12 Stunden gehalten. Die Tiere erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum*. Um schwangere Weibchen zu erhalten, wurden 6 - 8 Wochen alte H/H Weibchen über Nacht mit H/H Männchen verpaart. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf auftrat, wurde als Tag 0,5 der Schwangerschaft gezählt. Die Versuchstiere wurden zwischen 11 und 13 Uhr getötet und frei von Embryonalhüllen präpariert. Für die radioaktive *in situ*-Hybridisierung wurden die Embryonen auf einem Kupferstück auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung von RNA aus Embryonen wurden diese in Flüssigstickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 2.11 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)

Die Methode „Serial Analysis of Gene Expression“ (SAGE) wurde 1995 von V. Velculescu et al. entwickelt und erlaubt die quantitative und qualitative Analyse einer Vielzahl von Transkripten. Der genaue Ablauf der Methode ist unter 3.3 beschrieben.

Zur Etablierung der SAGE Methode wurde RNA aus schnell proliferierenden humanen Chondrosarkoma-Zellen (ATTC Nummer:HTB-94) verwendet.

### 2.11.1 Kultivierung der Zellen und Isolierung von RNA bzw. mRNA

Die humanen Chondrosarcoma-Zellen (ATCC-Nummer: HTB-94) wurden in  $\alpha$ -MEM-Medium, das mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, Glutamin (2mM) und Penicillin-Streptomycin (100  $\mu$ g/ml) komplettiert worden war, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden in T175 Kulturflaschen (Costar, Bodenheim) bis zu einer Konfluenz von 70 - 80% angezchtet, um dann für die RNA-Isolation verwendet zu werden. Die Isolierung der RNA erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

Die Isolierung von polyA<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Das gewonnene Eluat wurde mit 1/10 Volumen 3M NaAc und 2,5 Volumen 100 % Ethanol versetzt und über Nacht bei -70°C gelagert. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 4°C und 13000 Upm wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 20  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.11.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von 5  $\mu$ g polyA<sup>+</sup>-RNA in cDNA geschah mit Hilfe eines biotinylierten oligo-dT-Primers unter Hinzunahme des „cDNA-Synthesis-Systems“ (GibcoBRL, Karlsruhe). Erst- und Zweitstrangsynthese wurden wie vom Hersteller vorgeschlagen durchgeführt. Durch Einbau von ( $\alpha$ <sup>32</sup>P)-dCTP bei der Zweitstrangsynthese konnte die cDNA quantifiziert werden. Die cDNA wurde anschließend durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Extraktion gereinigt und mit 175  $\mu$ l 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc/ 900  $\mu$ l 100% Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 14000 Upm unter Hinzunahme von Glycogen (Boehringer, Mannheim) als Träger. Das Präzipitat wurde luftgetrocknet, in

200 µl 1x TE gelöst und nochmals wie beschrieben gefällt. Nach Waschen mit 100 % Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und in 20 µl LoTE resuspendiert.

### **2.11.3 Restriktion der biotinylierten cDNA mit NlaIII und Kopplung an magnetische Kügelchen**

10 µl biotinylierte cDNA wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl für eine Stunde bei 37°C mit 50 U des Ankerenzym NlaIII (New England Biolabs, Schwalbach) restringiert. Durch anschließende Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die Restriktion abgebrochen und der Ansatz danach mit 3 µl Glycogen (20 µg/µl, Boehringer, Mannheim), 100 µl 10 M NaOAc und 700 µl 100 % Ethanol versetzt. Nach 2-stündiger Inkubation bei –20°C erfolgte eine Zentrifugation von 20 min bei RT und 13000 Upm, das Präzipitat wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl LoTE-Puffer resuspendiert.

Jeweils 10 µl der restringierten, biotinylierten cDNA wurde an 100 µl Dynabeads M-280 Streptavidin Beads (Dyna, Oslo, Norwegen) gebunden. Die magnetischen Kügelchen wurden zunächst zweimal mit jeweils 200 µl 1x B+W-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl 2x B+W-Puffer resuspendiert. Die Kopplung erfolgte nach Zugabe von 90 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl cDNA bei RT für 15 min. Zur Abtrennung der im Überstand befindlichen abgeschnittenen 5'-Bereiche wurden die Kügelchen dreimal mit 200 µl 1x B+W Puffer und einmal mit 200 µl LoTE-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte sofort die Ligation der doppelsträngigen Linker.

### **2.11.4 Herstellung der doppelsträngigen Linker**

Die für die Herstellung der SAGE-Banken benötigten doppelsträngigen Linker wurden aus einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Pharmacia (Freiburg) synthetisiert und im Anschluß an die Synthese über ein Polyacrylamid-Gel aufgereinigt.

**Tabelle 1****Sequenzen der Primer zur Herstellung der Linker.**

Linker 1A	5' TTT <b>GGA TTT GCT GGT GCA GTA CAA</b> CTA GGC TTA ATA GGG ACA TG 3'
Linker 1B	5' TCC CTA TTA AGC CTA GTT GTA CTG CAC CAG CAA ATC(amino mod. C6) 3'
Linker 2A	5' TTT <b>CTG CTC GAA TTC AAG CTT</b> CTA ACG ATG TAC GGG GAC ATG 3'
Linker 2B	5' TCC CCG TAC ATC GTT AGA AGC TTG AAT TCG AGC AG (amino mod. C6) 3'

Fett gedruckt sind die entsprechenden internen Amplifikationsprimer.

Zunächst erfolgte die Kinasierung der Linker 1B und 2B. Dafür wurden 3,15 µg Linker in einem 20 µl Ansatz mit 10x Kinase Puffer, 10 mM ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase (NEB, Bad Schwalbach) 30 min bei 37°C inkubiert. Durch 10-minütige Inkubation bei 65°C erfolgte eine Inaktivierung der Polynukleotidkinase. Anschließend wurden die Linker 1A und 1B bzw. die Linker 2A und 2B in einer Endkonzentration von 200 ng/µl vereinigt, der Ansatz wurde 2 min bei 95°C, 10 min bei 65°C, 10 min bei 37°C und abschließend 20 min bei RT inkubiert.

### 2.11.5 Ligation der doppelsträngigen Linker

Die Kügelchen mit der gekoppelten cDNA wurden in einem Volumen von 40 µl resuspendiert, bestehend aus 10 µl Linker 1 bzw. Linker 2 (200 ng/µl), 8 µl 5x Ligase Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% w/v PEG-8000, [GibcoBRL, Karlsruhe] und 20 µl LoTE-Puffer. Durch 2-minütige Inkubation bei 50°C und 15 min Inkubation bei RT hybridisierten die komplementären Enden der Linker und der cDNA. Die Ligation erfolgte nach Zugabe von 10 U T4-Ligase (GibcoBRL, Karlsruhe) für 2 h bei 16°C.

Nach erfolgter Ligation wurde jeder Ansatz zur Abtrennung nicht-gekoppelte Linker viermal mit 200 µl B+W Puffer und dann zweimal mit 200 µl 1x Puffer 4 (NEB, Bad Schwalbach) gewaschen. Die Restriktion mit BsmF1 (NEB, Bad Schwalbach) erfolgte sofort im Anschluß.

### **2.11.6 Abtrennen der cDNA von Streptavidin Beads durch Restriktion mit dem Enzym BsmF1**

Durch einstündige Restriktion bei 65°C mit BsmF1 (NEB, Bad Schwalbach) wurde der 5'-Bereich der cDNA von den magnetischen Kügelchen abgeschnitten und durch Inkubation in dem magnetischen Partikelrenner (Dynal, Oslo, Norwegen) von dem noch an die Kugeln gebundenen 3'-Bereich abgetrennt. Der Ansatz wurde Phenol/Chloroform aufgereinigt und anschließend Ethanol gefällt.

### **2.11.7 Herstellen von glatten Enden und Ligation zur Herstellung von Ditags**

Zum Auffüllen der durch die BsmF I-Restriktion entstandenen überhängenden Enden wurde Klenow Enzym (Pharmacia, Freiburg) benutzt.

Dazu wurden die zwei cDNA-Ansätze getrennt jeweils mit 1x Zweitstrangpuffer (cDNA-Synthese Kit, GibcoBRL, Karlsruhe), 2x BSA, 500 µM dNTPs und 3 U Klenow Enzym (Pharmacia, Freiburg) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze mit Phenol/Chloroform aufgereinigt und einer Ethanol-fällung unterworfen. Die gewaschenen, getrockneten Pellets wurden in jeweils 6 µl LoTE-Puffer resuspendiert.

Im folgenden Schritt wurden die beiden Fragmente mit den stumpfen Enden durch Inkubation bei 16°C über Nacht ligiert. Hierfür wurde eine hochkonzentrierte T4-Ligase (5U/µl) (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet. Durch Zugabe von 14 µl LoTE-Puffer wurde die Ligation nach 20 h abgebrochen, es erfolgte sofort im Anschluß eine PCR-Amplifikation der Ditags.

### **2.11.8 PCR-Amplifikation und Aufreinigung der Ditags**

Im Anschluß an die Ligation wurde das Reaktionsvolumen mit 14 µl LoTE-Puffer auf 20 µl aufgefüllt. Es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, wobei 1 µl als template in der anschließenden PCR-Reaktion diente. Der PCR-Ansatz setzte sich aus 16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 67 mM Tris pH 8,8; 6,7 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM β-Mercaptoethanol; 6% DMSO; 1,5 mM dNTPs, 350 ng von beiden internen SAGE-Primern und 5 U der AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) zusammen. Es wurde grundsätzlich ein „hotstart“ durchgeführt. Der PCR-Ansatz durchlief 28 Zyklen, mit 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Anlagerung der Primer bei

55°C und 1 Minute Elongation bei 70°C. Es folgte eine abschließende Inkubation für 5 min bei 70°C.

Nach Optimierung der PCR-Bedingungen wurden die Ansätze im 96 Lochformat amplifiziert. Zur Aufreinigung der PCRs wurden jeweils 8 Ansätze vereinigt, mit einem Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und mit Hilfe von Ethanol präzipitiert. Danach wurden 96 aufgereinigte PCR-Ansätze in 216 µl LoTE-Puffer resuspendiert. Die Ausbeute der Produkte wurde zunächst photometrisch bestimmt und dann über 12-%ige Polyacrylamid-Gele aufgetrennt.

Die amplifizierten Fragmente mit einer Größe von 102 bp wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zerkleinert. Die DNA wurde durch Zugabe von 300 µl LoTE-Puffer und 15-minütige Inkubation bei 65°C aus dem Gel eluiert. Es folgte die Abtrennung der DNA-haltigen Flüssigkeit von dem Polyacrylamid-Gel durch Zentrifugation durch SpinX-Säulen (Costar, Bodenheim). Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation wurden die Ditags in insgesamt 81 µl LoTE-Puffer gelöst. Es wurde keine weitere Quantifizierung durchgeführt.

### **2.11.9 Restriktion der Ditags mit Nla III und Aufreinigung**

Die Abtrennung der Linkersequenzen von den Ditags erfolgte durch Restriktion mit 100 U Nla III (NEB, Bad Schwalbach) in einem 100 µl Ansatz für eine Stunde bei 37°C. Nach der Restriktion wurde der Ansatz über Phenol/Chloroform aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 32 µl LoTE-Puffer resuspendiert und auf einem 12%-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die 22 - 26 bp große Ditag-Bande wurde ausgeschnitten und wie oben beschrieben aufgereinigt, einzige Ausnahme war, daß die Elution aus dem Polyacrylamid-Gel nicht bei 65°C, sondern bei 37°C für 15 min stattfand. Die Pellets wurden in 7,5 µl LoTE-Puffer gelöst.

### **2.11.10 Herstellung von Ditag-Konkatemeren und Aufreinigung**

Durch Zugabe von 5 U Ligase (Gibco BRL, Karlsruhe) in ein Ansatzvolumen von 10 µl wurden die aufgereinigten Ditags über Nacht bei 16°C konkatemerisiert.



Durch 15-minütige Inkubation bei 65°C und anschließende Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Konkatemere denaturiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 8%-igen Polyacrylamid Gel. Nach SYBR-Green-Färbung wurden drei Fragmente unterschiedlicher Größe aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und, wie bereits beschrieben, aufgereinigt. Im Anschluß wurden die aufgereinigten Konkatemere in SphI-geschnittenen pZero-Vektor (Invitrogen) ligiert und wie unter 2.4.4 beschrieben durch Elektroporation transformiert.

#### **2.11.11 Herstellung von Datenbanken für die Auswertung der erhaltenen SAGE Sequenzen**

Die erhaltenen SAGE-Sequenzen wurden zunächst mit dem Sequencher™ 3.0-Programm (Gene Codes Corporation, Inc. USA) soweit editiert, dass die Vektorsequenzen entfernt und mögliche Unstimmigkeiten aufgeklärt werden konnten. Sequenzen mit Unklarheiten wurden keiner weiteren Analyse unterworfen.

Im Anschluss wurden die Konkatemersequenzen in das SAGE-Programm (Version 1.00, John Hopkins University, USA) kopiert. Das Programm zerlegt die Konkatemere zunächst in Ditags, nach Ausschluß zu langer bzw. zu kurzer Ditags auch in einzelne Tags. Diese Tags wurden in eine Liste abnehmender Häufigkeit sortiert. Diese Tag-Datenbank konnte innerhalb des SAGE-Programms mit einer entsprechend bearbeiteten Datenbank verknüpft und so ein Homologievergleich der ermittelten Tags durchgeführt werden.

#### **2.12 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode, die 1992 von Lee et al. durch eine Markierung mit fluoreszierenden Didesoxynukleotiden am 3'-Ende modifiziert wurde.

Als template für die Sequenzierung wurden speziell aufgereinigte superzirkuläre Plasmid-DNA (vgl. 2.1.2), PCR-Produkte und Cosmid-DNA eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden durch Zugabe von 1 Volumen 4 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 2 Volumen Isopropanol selektiv von den PCR-Primern getrennt, mit 70% Ethanol gewaschen und vakuumgetrocknet. Für die Sequenzreaktion wurden 20-30 ng DNA eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des „PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kits“ nach Vorschrift des

Herstellers (Applied Biosystems, Weiterstadt) in einer linearen PCR-Reaktion (25 Zyklen: 95°C 15s; 55°C 15s; 4 min 72°C).

Die direkte Sequenzierung von Cosmid-DNA geschah nach Isolierung der DNA mit Hilfe des Nucleobond<sup>®</sup> AX-Kits (Machery und Nagel, Düren) (vgl. 2.1.3) mit genspezifischen Primern. Für die Sequenzierung wurden 300 bis 500 ng DNA eingesetzt. Das Taq-Polymerase-Gemisch wurde nach vierminütiger Denaturierung der Proben-DNA zugegeben. Auch das Sequenzierungs-Programm wurde modifiziert (30 Zyklen: 96°C 30s; 50°C 5s; 60°C 4 min).

Die Gelelektrophorese, die Aufnahme der Fluoreszenzsignale und die automatisierte Auswertung der Sequenzsignale wurden mit dem automatischen Sequenzierungsgerät 373A bzw. 377 der Firma ABI (Weiterstadt) durchgeführt.

## **2.13 Computerauswertung von DNA-Sequenzen**

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Sequencher<sup>™</sup> 3.0 (Gene Codes Corporation, Inc. USA).

Für Homologievergleiche mit Nukleotid- bzw. Proteindatenbanken wurden die Programme „BLASTN“ und „BLASTX“ (Altschul et al., 1990 und 1997) verwendet, die unter der Internetadresse <http://www.ncbi.nih.gov/> durch das “US National Center for Biotechnology Information” zur Verfügung stehen.

## **2.14 Proteine**

### **2.14.1 Stabile Transfektion von 293-Zellen**

Humane 293-Zellen wurden mittels Elektroporation (BioRad Gene Pulser) (960µF, 350V) mit 10µg FGFR3-pcDNA-Konstrukt transfiziert. Das Konstrukt, bestehend aus 4 kBp FGFR3-cDNA in pcDNA3-Vektor, wurde von G. Gross (Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Einzelne Zellen wurden nach Kultivierung in DMEM-Medium mit G418 (1200µg/µl) (PAA Laboratories, Linz, Österreich) in 96 Lochformat-Platten überführt und mit Selektionsmedium weiter kultiviert. Insgesamt wurden sechs mit FGFR3-pcDNA-Konstrukt und drei mit pcDNA-Vektor stabil transfizierte Zelllinien hergestellt.

### 2.14.2 Protein-Extraktion

Zur Isolierung von Proteinextrakt wurden die Zellen nach Abgießen des Kulturmediums mit 5 ml eiskaltem PBS-Puffer gespült. Pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche wurde 1 ml Extraktionspuffer A pipettiert und 10 min auf Eis unter gelegentlicher Bewegung inkubiert. Der Zellrasen wurde dann mit einem Gummiwischer abgeschabt und die lysierte Zellsuspension bei 14000 Upm für 10 min in einer Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert. Der Überstand, der hauptsächlich die Proteine des Cytosols und der Cytomembran enthält, wurde bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei -80°C gelagert.

### 2.14.3 SDS-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist es möglich, Proteine aufgrund ihrer relativen Molekülmasse zu trennen (Laemmli, U. K., 1970). Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an hydrophobe Bereiche der Proteine an, wodurch eine Entfaltung der Proteine und gleichzeitig eine Einführung negativer Ladungen bewirkt wird. Dadurch wird die Eigenladung der Proteinmoleküle vernachlässigbar. Die Konsequenz ist, dass weder die native Form noch die Ladung der aufzutrennenden Proteine bei der Wanderung durch die Gelmatrix ins Gewicht fällt und es durch den Molekularsiebeffekt der Gelmatrix zur Auftrennung der Proteine nach der relativen Molekülmasse kommt.

Zunächst wurde ein 7,5%-iges Trenngel gegossen und mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem Butanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Butanol abgekippt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und 4 min bei 100°C denaturiert. Als Längenstandard dienten 6 µl „Prestained Protein Marker Broad Range“ (NEB, Bad Schwalbach), der ebenfalls denaturiert wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur in einer Minigelapparatur bei 15 mA für 3 - 4 Stunden.

Trenngel (7,5% PAA):	3,75 ml	30% PAA (30:0,8)
	3,75 ml	4xTris Cl/SDS ph 8,8
	7,5 ml	H <sub>2</sub> O
	50 µl	10% APS
	10 ml	TEMED
Sammelgel (3,9% PAA):	650 µl	PAA (30:0,8)

1,25 ml	4x Tris Cl/SDS pH 6,8
3,05 ml	H <sub>2</sub> O
25µl	10% APS
5 µl	TEMED

5x SDS Elektrophorese-Puffer:	15,1 g Tris
	72 g Glycin
	5g SDS
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

#### 2.14.4 Proteintransfer (Western Blot)

Der Proteintransfer aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Ø 0,45 µm, Schleicher und Schüll, Dassel) erfolgte in einer „Tank-Blotting“-Apparatur der Firma BioRad. Der Aufbau des Blots wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Transfer erfolgte mit Towbin-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur und einer angelegten Spannung von 30V.

#### 2.14.5 Immunologischer Nachweis

Durch 2-stündige Inkubation in 1x PBS/ 0,1% Tween/ 5% Magermilchpulver bei RT wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Danach wurde der erste Antikörper entsprechend in 1x PBS/ 0,1% Tween/ 5% Magermilchpulver verdünnt und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen in 1x PBS/ 0,1% Tween für jeweils 5 min wurde der entsprechende Peroxidase-gekoppelte-Zweit-Antikörper, in 1x PBS/ 0,1% Tween/ 5% Magermilchpulver verdünnt, zugegeben. Nach 60 min Inkubation wurde viermal 5 min mit 1x PBS/ 0,1% Tween und zweimal 5 min mit 1x PBS gewaschen. Der Protein-Antikörper-Komplex wurde durch Zugabe einer Entwicklerlösung (50 mM Tris, pH 7,4/ 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 1 mg/ml DAB in 1x PBS-Puffer) sichtbar gemacht und durch erneutes Waschen mit 1x PBS gestoppt.

## 2.15 Reagenzien und Materialien

### 2.15.1 Puffer und Lösungen

Agar-Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml bzw. NZYDT-Medium
Church-Puffer (Hybridisierungspuffer)	1 mM EDTA 0,5 M NaHPO <sub>4</sub> , pH 7,2 7% SDS 1% BSA
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
DNA-Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylenyranol 40% Sucrose
DTM	je 100 µM dATP, dGTP, dTTP in 250 mM TrisCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM β-Mercaptoethanol; pH 7,0
Extraktionspuffer A	10 mM Tris, pH 7,5 140 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % Triton X-100 1 mM PMSF 1 mM DTT
2x FM (Freezing Media)	0,025 M TrisCl, pH 7,0 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 65% Glycerin
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml Aqua bidest, pH 7,5
LoTE-Puffer	3 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,2 mM EDTA, pH 7,5
MOPS (10X)	0,2 M 3(N-morpholin) Propan Sulfonsäure 0,05 M Na-Acetat 0,01 M EDTA, pH 7,0
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 1,5 M NaCl
NZYDT-Medium	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt

	10 g NZ-Amine, pH 7,5
OL	90 OD U 5'-pd(N <sub>6</sub> )/ml TE
OLB	1 M HEPES/ DTM/ OL (25/25/7)
PBS-Puffer	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM KCl 10 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,4
Proteinase K Puffer	3 M NaCl 0,5 M EDTA 1 M TrisHCl, pH 7,8 über Nacht rühren und pH 8,0 einstellen
Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15% Ethanol 0,15% Triton X-100; pH 7,0
Puffer QC	1,0 mM NaCl 50 mM MOPS 15% Ethanol; pH 7,0
Puffer QF	1,24 M NaCl sonst wie Puffer QC
1,5x RNA-“Sample“ Puffer	60% Formamid (deionisiert) 1,5x MOPS-Puffer 9% Formaldehyd
6x SDS-Probenpuffer	7 ml 4x Tris Cl/SDS, pH 6.8 3 ml Glycerol 1g SDS 0,93 g DTT 1,2 mg Bromphenolblau add 10 ml H <sub>2</sub> O
SM-Medium	0,1 M NaCl 50 mM Tris-HCl; pH 7,5 8 mM mM MgSO <sub>4</sub> 0,1% Gelatine
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl ad 1000 ml A. bidest; pH 7,0 2,5 mM KCl und 10 mM MgCl <sub>2</sub>
Standard-Saline-Citrat-Puffer (1X SSC)	0,15 M NaCl 0,015 M Natriumcitrat; pH 7,0
Tris-Borat-Elektrophoresepuffer (1X TBE)	90 mM Tris 90 mM Borsäure

	1,25 mM Na <sub>2</sub> EDTA; pH 8,3
Tris-Acetate-Elektrophoresepuffer	0,04 M Tris-Acetat
1X TAE	0,001 M EDTA
Tfb I	30 mM K-Acetat
	100 mM KCl
	10 mM CaCl <sub>2</sub>
	50 mM MnCl <sub>2</sub>
	15% Glycerin; pH 5,8
Tfb II	10 mM NaMOPS; pH 7,0
	10 mM KCl
	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	15 % Glycerin
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; pH 7,8
	1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
Towbin-Puffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% Methanol; pH 8.3
2x YT-Medium	10 g NaCl
	10 g Hefeextrakt
	16 g Trypton; ad 1000 ml A. bidest.

### 2.15.2 Radioisotope, Enzyme

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP	Amersham (Braunschweig)
[ $\alpha^{35}\text{S}$ ] dATP	Du Pont (Dreieich)
Alkalische Phosphatase	
Klenow-DNA-Polymerase	
Reverse Transkriptase	
RNase A	
Taq-DNA-Polymerase	

### 2.15.3 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , end A1, hsdR17, (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), supE44, thi-1 Lambda <sup>-</sup> , recA1, gyrA96, relA1, $\Phi$ 89dlacZdeltaM15
SOLR <sup>TM</sup>	e14 <sup>-</sup> (mcrA), $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, bcC, recB, recJ, umuC:Tn5(kan <sup>r</sup> ), uvrC, lac, ryA96, relA1, thi-1, endA1, lambda <sup>R</sup> , F <sup>'</sup> proAM, lacI <sup>qZ</sup> M15] Su <sup>-</sup> (nonsuppressing)
XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44,

e1A1, lac, [F<sup>'</sup>proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10(tet<sup>r</sup>)**2.15.4 Molekulargewichtstandards**

λxHindII	Boehringer, Mannheim
100 bp-Leiter	Gibco BRL, USA
123 bp-Leiter	Gibco BRL, USA

**2.15.5 Chemikalien und Materialien**Chemikalien:

Agar-Agar	Difco (USA)
Agarose	Eurogentec (Belgien)
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)
EDTA	Boehringer (Mannheim)
Ethanol	Riedel-de-Haen (Seelze)
Ethidiumbromid	Oncor (USA)
Hefeextrakt	Difco (USA)
IPTG	Boehringer (Mannheim)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
SDS	INC (USA)
Trypton	Difco (USA)
Tris	Boehringer (Mannheim)
Tris-HCl	Gerbu (Gaiberg)
X-Gal	Eurogentec

Alle nicht aufgeführten Chemikalien (Reinheitsgrad "p. a." oder reinst) wurden von folgenden Firmen bezogen:

Merck (Darmstadt)  
 Carl Roth (Karlsruhe)  
 Serva Feinbichemica (Heidelberg)  
 Sigma (USA)

Materialien:

Nylonmembran (Hybond <sup>TM</sup> -N <sup>+</sup> )	Amersham Life Science (Braunschweig)
Röntgenfilme (Hyperfilm <sup>TM</sup> -MP)	Amersham Life Science (Braunschweig)

Geräte:

DNA-Sequenziergerät	ABI PRISM <sup>TM377</sup> Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt) Software: Analysis 2.1.2
---------------------	---



	Power Macintosh 7200/90
Elektroporationsanlage	BioRad Laboratories GmbH (München)
Gel-Imaging-System	Herolab E.A.S.Y. Herolab (Wiesloch)
Hybridisierungssofen	Techne Hybridieser HB-2
Zellkultur-Inkubator	IR 1500 Automatics CO <sub>2</sub> -Inkubator Flow Laboratories
PCR-Geräte	DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus (USA) PTC 200 <sup>TM</sup> und PTC 100 <sup>TM</sup> MJ Research, Inc. (USA)
Photometer	Pharmacia LUC. Ultrospec III Pharmacia (Freiberg)
Sterilbank	antair BSK
Szintillationszähler	Liquid Scintilations Counter WALLACE-1410 Pharmacia (Freiberg)
Zentrifugen	Biofuge A Heraeus Sepatech (Hanau) Eppendorf Zentrifuge 5415C Eppendorf (Hamburg) Hettich Zentrifuge EBA12P Hettich (Tuttlingen) Sigma 3K12 Zentrifuge Sigma (Deisenhofen) Sorvall RT 6000D DuPont (USA) Sorvall RC5C DuPont (USA)

### 2.15.6 Primersequenzen

Alle abgebildeten Primer sind in 5'→3'-Orientierung.

#### Allgemeine Primer:

T <sub>3</sub> A	ATTAACCCTCACTAAAGGG
T <sub>7</sub> A	AATACGACTCACTATAGGG
λgt11-A	GACGACTCCTGGAGCCCG
λgt11-B	CTCGCGGCCAGCGATGGT

#### FGFR3 Primer:

E	CTGAATGCCTCCCACGAGGACT
---	------------------------

D	AGTCCTCGTGGGAGGCATTTCAG
pC1	CTGTGTCCACACCTGTGTCC
pF1	ACATCGAGATGGGAGGAGG
pCF3	CTGCCACCGCCAAAGCCCTGCC
pCF4	GGCTGGTGGGTGGGCTGCGGCT
pCF5	CATTGTCCAGGGGAGCCC
F	GAACCTCCCTGCCGTTCTTCAG
H	GCACGTCCAGCGTGTACGTCTG
I	CTACACCTGCGTCGTGGAGAAC
UR2	CTGCAGGATGGGCCGGTGCG
UR4	CAGTGGCTCAAGCACGTGGA
F1	TCCACTGGGTCTCAG
F2	ATACCAGGTTCTGAGCTGCC
F3	GAGTACACCTGCCTGGCG
F4	CCTGTGTGTCCCTGTGTCC
F5	TCTCCCACATCCTGCCTC
F6	GACCCGTTTCCGTGTCTG
F8	AGCCTTGCGATGCGCAC
F9	ACAGGAGAGGCCTTTGGG
F10	TGGAGCTGCCAGCCTTGC
F15	ACAGGATGCACGTCTCTG
O1	CGGTCCGCCATGACCACCTGGCC
P1	AGGCCATCGGCATTGACAAGGA
S	TGGATCCACAGGGACCTGGCTG
R	CTTCATCACGTTGTCCTCGGTC
U1	TGACCGAGTCTACACTCACCAG
T	CAGCGTGAAGATCTCCAGAG
R	CTTCATCACGTTGTCCTCGGTC
S	TGCATCCACAGGGACCTGGCTG
T	CAGCGTGAAGATCTCCAGAG
U1	TGACCGAGTCTACACTCACCA
U2	CTGCTTGAAGGTGGGCCTCTG
V	GTACATGATCATGCGGGAGTGC
W	CTCACATTGTTGGGGACCAGTG
W1	GTTTGCCACGACCTGCTG
TD1	CCTGTGCGGCCTTTCGAGCAG

Mint-Primer (Maus):

mintf	GCTCACAACCTCCGTCAACAA
mintr	GTCCGATCAAATGCTCCTGT
7sint	CCCTCCAGCACTTCCTCTG
3L2	GGGGCCCCTAAATACGAGT
3L7	CAGATGGAGCTATTTGGCTGCT
5-UPM2	ACCAGCAGCCAAATAGCTCCA
1A2	CTGAAAACCGAGAGGTGCTC
1B1	CTTTCCGTGGAATTACACTTG
3L3	ATGTCCATCGCCTCAGTTT
3L1	TCTGCCTGGCTCCTCTTTAG
1B2	TTCCACAGGAAGCAAGGAG
1D1	TCGGACAAGACATTACGATC
1C2	TGGACTTCGACTCCGAGAAG
m2F	GGGAGGTACGAGGCAGAAGGC
1E1	CGGAAAAGTTTTGGGATCAA
m2R	TAAACTCATGGAAAAGGCCG
1D4	TCCCAAAGCAACGAGAACTC
m6f	ACGGACCTGTGGTAAAGGTG
m3r	ACCAATTTTCCTGCCCTTGGT
m5f	GCAGGAAAATTGGTGGG
1F8	GATGGCTCAGTCCAAGCAT
1F2	ATTCGCGAGGCTCATCATAG
1H1	CCACGGTACGATAAGCTGGA

1G2 TGTCCGCCTTTTCGTTTTT  
 1k1 CTCTGGACCTGGAGAAGCTG  
 1k2 TTTTGAGGGGATGGCTTTT  
 1z1 TACACGCAGGACTGGGAG

**Tabelle 2**

Sequenzen der Primer zur Herstellung von Sonden für das EST-Projekt

Primerbezeichnung	Produkt-Grösse (bp)	Primersequenz	Homologie zu (Acc. No.)	
Koll F1	999	5' CCT CTG GTG CCG AAG GTC 3'	X16468	2684 → 2701
Koll R1		5' TCT CCA CTC TTC CAC TCA GG 3'		36893 → 366
Koll F2	902	5' CTA CTG GAT TGA CCC CAA CC 3'	X06268	369 → 387
Koll R2		5' GCA CCT GAA GGG AGG TCT TC 3'		1271 → 1252
Elo F	923	5' GGA TGG AAA GTC ACC CGT AA 3'	X16869	652 → 671
Elo R		5' CCA AAG TGG TCA CAC AAA ACA 3'		1574 → 1555
Fer F	501	5' CGA TGA TGT GGC TTT GAA GA 3'	M11146	209 → 228
Fer R		5' TAA AGG AAA CCC CAA CAT GC 3'		709 → 690
Ubi F	697	5' TCA AAA TGC AGA TCT TCG TGA 3'	U49869	2078 – 2098
Ubi R		5' GAA TTA ACA GCC ACC CCT CA 3'		2775 – 2756

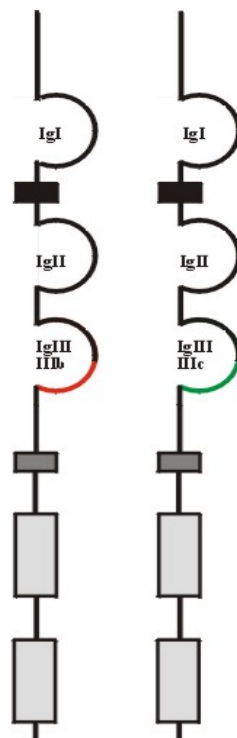
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (FGFR3)

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens als Ursache für verschiedene Skelettdysplasien identifiziert werden. So wurde 1994 erstmals bei Patienten mit Achondroplasie eine Mutation im *FGFR3*-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 nachgewiesen (Shiang et al., 1994). In den folgenden Jahren konnten auch bei Patienten mit Hypochondroplasie (Bellus et al., 1995; Prinos et al., 1995) und Thanatophorer Dysplasie (Tavormina et al., 1995) Mutationen im *FGFR3*-Gen gefunden werden. Jedoch kann nur in etwa 70% der Hypochondroplasie-Patienten die Diagnose mit der bisher publizierten Mutation bestätigt werden. Die Tatsache, dass auch bei einem Patienten mit Crouzon Syndrom mit Acanthosis nigricans (Meyers et al., 1995), sowie bei Fällen mit nichtsyndromischer Kraniosynostose (Bellus et al., 1996) Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens gefunden werden konnten, lässt die Vermutung zu, dass auch an anderen als den bereits publizierten Stellen Veränderungen im *FGFR3*-Gen vorliegen. Aus diesem Grund ist die Aufklärung der genomischen Struktur des *FGFR3*-Gens für die Mutationsanalyse des Gens unerlässlich, insbesondere da somit eine Amplifikation des gesamten codierenden Bereiches auf genomischer Ebene durch Blutuntersuchung ermöglicht wird. Dies ist von klinischem Interesse, da von den wenigsten Patienten Gewebe zur Isolierung der *FGFR3*-mRNA vorhanden ist. Durch Sequenzierung eines entsprechenden Cosmidklons wurde die Exon/Intron Struktur des humanen *FGFR3*-Gens aufgeklärt. Mit Hilfe dieser Information konnte ein Set geeigneter Primer generiert werden, welches die Amplifikation des gesamten codierenden Bereichs des *FGFR3*-Gens ermöglicht und somit die Diagnose wesentlich vereinfacht.

Der FGF-Rezeptor 3 gehört zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR), die der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren angehören. Man kennt bisher vier verschiedene *FGFR*-Gene, die für strukturell sehr ähnlich aufgebaut Proteine (FGFR1-FGFR4) codieren. Sie bestehen aus drei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen (IgI-IgIII), einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Ein gemeinsames Merkmal der Rezeptoren FGFR1-FGFR3 ist das Vorliegen unterschiedlicher Proteinvarianten die aufgrund alternativer Spleißmechanismen entstehen. Im Fall von FGFR3 sind zwei Spleißvarianten bekannt, die sich in einem ungefähr 50 Aminosäure-langen

Abschnitt in der C-terminalen Hälfte der dritten Immunglobulin-ähnlichen Domäne unterscheiden (Abb. 4) (Keegan et al., 1991; Murgue et al., 1994). Die unterschiedlichen Formen werden als FGFR3 IIIb- bzw. FGFR3 IIIc-Variante bezeichnet und unterscheiden sich in ihrer Ligandenbindungsaffinität. Durch Analyse der räumlichen und zeitlichen Expression der *FGFR3*-Spleißformen sollte ihre entwicklungsbiologische Bedeutung eingeschätzt werden bzw. untersucht werden, ob den verschiedenen Varianten aufgrund des Expressionsmuster eine spezifische Krankheitsrelevanz zukommt.



**Abb. 4: Aufbau des FGF-Rezeptor 3**

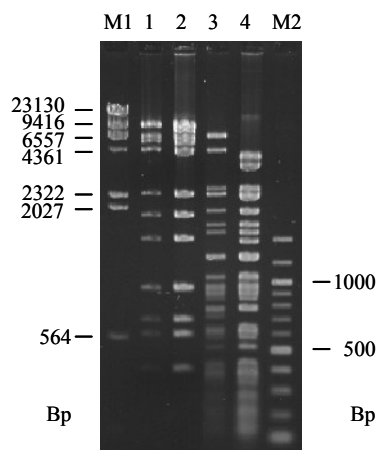
Dargestellt ist der extrazelluläre Anteil mit den drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (IgI – IgIII), die “saure” Domäne (schwarzer Kasten), die Transmembran-Domäne (dunkelgrauer Kasten), sowie die geteilte Tyrosinkinase-Domäne (hellgraue Kästen). Durch alternatives Spleißen kann die *FGFR3 IIIb*- (rot) bzw. die *FGFR3 IIIc*-Variante (grün) erzeugt werden.

### 3.1.1 Aufklärung der genomischen Struktur des humanen *FGFR3*-Gens und Vergleich mit der murinen *Fgfr3*-Sequenz

Zur Aufklärung der Exon/Intron-Struktur des humanen *FGFR3*-Gens standen zwei Cosmid-Klone (pC385.1 und pC385.12) zur Verfügung. Diese Cosmide wurden ursprünglich aus einer gesamtgenomischen Cosmidbank isoliert (Smith et al., 1988) und freundlicherweise von John

Wasmuth zur Verfügung gestellt. Die DNA der Klone pC385.1 und pC385.12 wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Pst1 verdaut. Der Vergleich der Bandenmuster der beiden Klone zeigt weitgehende Übereinstimmung der Fragmentgrößen (Abb. 5). Daraus kann geschlossen werden, dass die beiden Cosmide teilweise überlappende Regionen inseriert haben. Durch Hybridisierungsexperimente mit spezifischen Sonden aus dem 5'- (nt 172- nt 624) bzw. 3'-Bereich (nt 2208 - nt 2487) der bis dahin veröffentlichten *FGFR3*-Sequenzinformation (Acc. Nr.: M58051, Keegan et al., 1991) konnte gezeigt werden, dass das Cosmid pC385.1 die gesamte *FGFR3*-Sequenzinformation enthält (keine Abbildung). Dieser Klon wurde zur weiteren Aufklärung des genomischen Aufbaus herangezogen.

**Abb. 5: Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktion der Cosmidklone 385.1 und 385.12.**



Der Vergleich der Bandenmuster nach Restriktion von 385.1 (Spur 1) und 385.12 (Spur 2) mit Bam H1 zeigt weitgehende Übereinstimmung, wohingegen der Verdau mit Pst 1 von 385.1 (Spur 3) bzw. 385.12 (Spur 4) einige Unterschiede erkennen lässt.

Molekulargewichtsstandart M1: HindIII restringierte  $\lambda$ -DNA, M2: 100 bp Leiter. Die Auftrennung wurde auf einem 1,2%igen Agarose-gel durchgeführt.

Versuche, das 5'-Ende der *FGFR3*-mRNA durch die Primer-Extension Methode genau zu analysieren schlugen fehl, da wahrscheinlich aufgrund sehr starker Sekundärstrukturen die Amplifikation des 5'-Bereichs des Gens nicht möglich war. Deshalb wurde der weiter 5'-wärts gelegene Sequenzabschnitt der bereits bekannten *FGFR3*-Sequenz des humanen *FGFR3*-Gens durch eine "Primerwalking"-Strategie weiter untersucht. Ausgehend von Primer C1 (siehe 2.15.6) wurde die Cosmid-DNA pC385.1 direkt sequenziert. Aus den resultierenden Einzel-sequenzen wurde eine Konsensussequenz erstellt, die in Abb. 6 abgebildet ist. Insgesamt wurden 916 Bp vor dem bekannten Translations-Initiationsstart sequenziert.

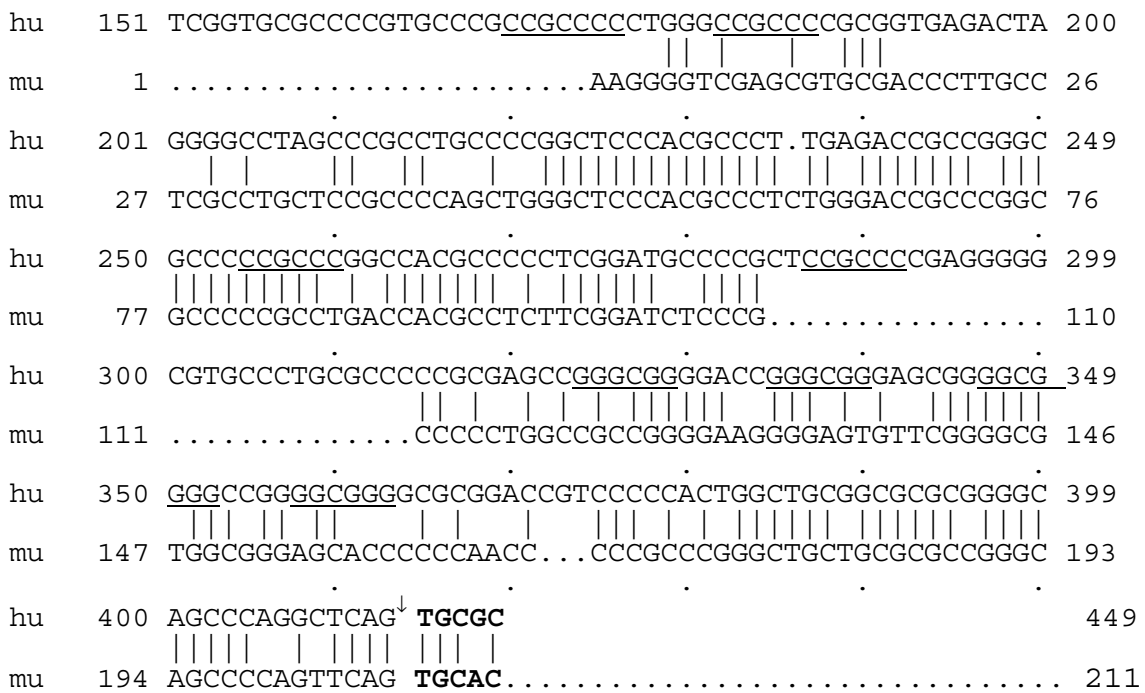
tgccgctcacaccacagggttcactccgcggtatctcggcgaagcctcctgacatcccgaccccccgagacctcccctctgagctcctgagcacag	100
ccccaggggaccggagctgctgatgatacaaacacagcctgcccctcgccctcggtgccccctgcccgcgccccctggggcccccggtgagac	200
taggggctagccccctgcccggctcccacgccccttgagaccgccccgcccccgcccgccacgccccctcggtgccccctgcccggcgagg	300
ggcgtgccctgcccggcgagcggcggggacggcggggagcgggcgggggccccggcgggcgcgagcctccccactggctgcccggcgagg	400
ggcagcccaggtcagTCCCGGTTGGCGGCGCGCTCGCGGCAGCTGGCGCGCGCGCTCCTGCTCTGCCGGTCCGACGGACCGACCGGCGGCGCGCG	500
GCCGGAGGGACGGGGCGGGAGCTGGGCCCGCGGACAGCGAGCCCGAGCGGGAGCCCGCGCTAGCGAGCCGGGCTCCCGCGCTCGCCAGgtccgtgcttg	600
gggccccggcaggctcgcgagggggtccaacggtgctcgcgagggggtcgggcgcggtgtcgcggaaccacagaggtccctgcagcgggccccggcg	700
ggcgcggggttcccctccggaagtgtcgccgccccgccccctgggaggggtttgcagcagccagggaggggagggggaggggaggggacggcg	800
ggggagggggcgccggcgccagggcgccggggagccctgggcgcgcgggcgggcgggggggctgggggtcggaggggtcgggacgcaggagccg	900
gccaccgccccttctgctccctgctcgccccctctaacgagctgcttctctcctcctgagTCTCCCGAGCGGGCGCCCGCTCCCGCGGTGCCCGCGCG	1000
GGCCGTGGGGGGCAGCATGCCCGCGCGCTGCCTGAGGACGCCCGCGCCCCCGCCCCCGCCATGGGGCGCCCTGCCTGCGCCCTCGCGCTCTGCGTGG	1100
ccgtggccatc	

**Abb. 6: Nukleotidsequenz der 5'-flankierenden Region des humanen *FGFR3*-Gens.**

Exon 1 und Exon 2 sind doppelt unterstrichen. Die Translations-Initiationsstelle (ATG) ist durch Fettdruck gekennzeichnet. Konsensussequenzen von möglichen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren (Sp1, Krox24) sind unterstrichen.

Der Homologievergleich dieses Sequenzabschnittes mit dem 5'-untranslatierten Bereich der Maus (Perez-Castro et al., 1995) bis zum Transkriptionsstart zeigt eine Homologie von 60% (Abb.7). Die Homologie zwischen dem murinen Intron 1 und dem vermutlichen humanen Intron 1 beträgt 65%, wohingegen die Homologie der Exons 1 bei 72% lag. Aufgrund dieser hohen Homologie wurde das human Exon 1 wie in Abb. 6 dargestellt lokalisiert. Gemäß dieser Annahme hat das erste Exon eine Größe von 171 Bp mit einem GC-Gehalt von 84%. Das Dinukleotid CpG kommt durchschnittlich alle 5,2 Bp vor, was einer Häufigkeit entspricht, wie sie in CpG-Inseln zu beobachten ist (Bird, 1987). Das häufige Auftreten des Dinukleotids CpG lässt die Vermutung zu, dass es sich bei diesem Abschnitt um eine CpG-Insell handelt, wie sie häufig im 5' regulatorischen Bereich einer Vielzahl von Genen gefunden wird. Der GC-Gehalt von Exon 2 und 3 liegt bei 82% bzw. 70%, das CpG Dinukleotid wird im Mittel alle 6,8 Bp bzw. 16,8 Bp gefunden. Konservierte Sequenzen, die stromaufwärts vom Startpunkt eukaryontischer Transkriptionseinheiten liegen, wie z. B. *TATA*- bzw. *CAAT*-Boxen, konnten nicht nachgewiesen werden. Die weitere Sequenzanalyse zeigt aber zahlreiche potentielle Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, u. a. Sp1 und Ap2. Die genaue Lage dieser Bindungsstellen ist in Abb. 6 eingezeichnet. Der Vergleich mit dem murinen *Fgfr3*-Promoter zeigt weitgehende Übereinstimmung. So konnte auch hier keine *TATA*-Box nachgewiesen werden. Später durchgeführte Untersuchungen an dem murinen *Fgfr3*-Promotor zeigten, dass ein Sequenzabschnitt von ungefähr 1000 Bp vor der bekannten Transkriptions-Initiationsstelle ausreicht um eine Verstärkung der Transkriptionsaktivität zu

erreichen und dass Transkriptionsfaktoren der Sp1-Familie an die wahrscheinliche Promotorsequenz bindet (Perez-Castro et al., 1995; McEwen und Ornitz, 1998).



**Abb. 7: Vergleich der humanen (obere Sequenz) mit dem murinen (untere Sequenz) 5'-Bereich des *FGFR3*-Gens.**

Der Beginn der Nukleotid-Sequenz von Exon 1 ist durch einen Pfeilspitze angedeutet. Konsensussequenzen von Sp1 und Krox24 Bindungsstellen sind unterstrichen.

Die Aufklärung der Exon/Intron Struktur des *FGFR3*-Gens erfolgte mittels PCR und auf der Basis der bekannten Struktur des *FGFR1*-Gens (Johnson et al., 1991). Ein Set von 9 Primer-Sequenzen wurde abgeleitet, mit denen das gesamte Gen, inklusive der Introns, amplifiziert werden konnte (Tab.3). Die Größe der Amplifikationsprodukte variierte zwischen 400 Bp und 5 kbp (Abb. 8). Durch Sequenzierung der genomischen PCR-Produkte und Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der bereits veröffentlichten humanen cDNA (Keegan et al., 1991) konnte die Lokalisation der Introns vorgenommen werden. Auf den folgenden Seiten wird die Sequenzierungsstrategie des 3'-gelegenen Abschnitts des humanen *FGFR3*-Gens erläutert.



**Tabelle 3**

**Sequenzinformation der 9 abgeleiteten Primersequenzen zur Ermittlung der Exon-Intron Grenzen des *FGFR3*-Gens**

Primer	Lokalisation	Accession No.	Primersequenz	Produktgröße	
				cDNA	DNA
UF1	100 -120	NM_000142	5' TCC TCG GAG TCC TTG GGG ACG 3'	222 Bp	5336 Bp
C1	224 - 205	NM_000142	5' GGA CAG CTC AGC TCC ACA GC 3'		
C	172 - 193	NM_000142	5' CAG CAG GAG CAG TTG GTC TTC G3'	454 Bp	2229 Bp
F	624 - 604	NM_000142	5' GAA CTC CCT GCC GTT CTT CAG 3'		
G	509 - 530	NM_000142	5' AGC GGA TGG ACA AGA AGC TGC T3'	460 Bp	635 Bp
UR3	968 - 948	NM_000142	5' TTG AGC ACG GTA ACG TAG GGT 3'		
UF3	948 - 968	NM_000142	5' ACC CTA CGT TAC CGT GCT CAA 3'	122 Bp	1043 Bp
XR1	98 - 77	U22410	5' AAA TTG GTG GCT CGA CAG AGG T3'		
XF1	79 - 98	U22410	5' CTC TGT CGA GCC ACC AAT TT 3'	153 Bp	781 Bp
K	1038 - 1017	NM_000142	5' GTC CTC AAA GGT GAC GTT GTG C 3'		
Pub1	977 - 996	NM_000142	5' GCG CTA ACA CCA CCG ACA AG 3'	222 Bp	715 Bp
Pub2	1198 - 1079	NM_000142	5' TGA ACA GGA AGA AGC CCA CC 3'		
A	1121 - 1139	NM_000142	5' AGG AGC TGG TGG AGG CTG A 3'	621 Bp	1477 Bp
P2	1740 - 1721	NM_000142	5' CCA GAA ACT CCC GCA GGT TAC 3'		
Q	1690 - 1710	NM_000142	5' CTG TAC GTG CTG GTG GAG TAC 3'	580 Bp	1135 Bp
U2	2268 - 2248	NM_000142	5'CTG CTT GAA GGT GGG CCT CTG 3'		
V	2208 - 2229	NM_000142	5' GTA CAT GAT CAT GCG GGA GTG C3'	312 Bp	492 Bp
TD2	2518 - 2495	NM_000142	5' CAC CAG CAG CAG GGA GGG CTG CTA 3'		

Die Primer XR1 und XF1 wurden aus der von Murgue et al. (1994) veröffentlichten *FGFR3* IIIb-Variante abgeleitet.

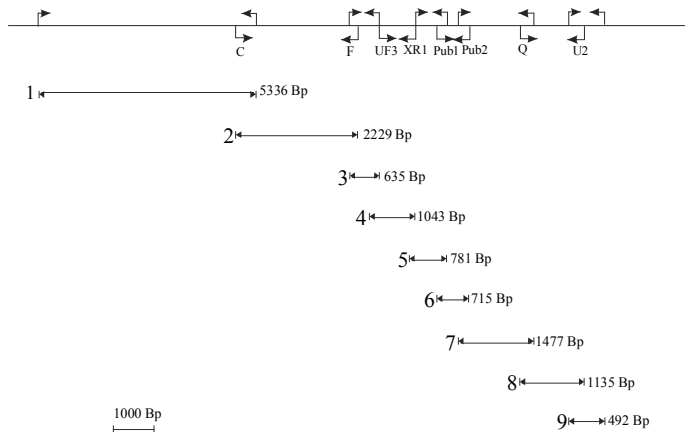


Abb. 8A

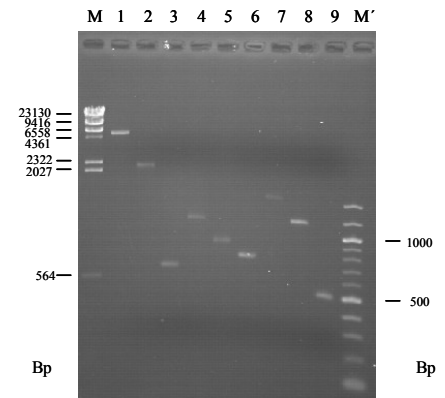


Abb. 8B

**Abb. 8: PCR-Strategie zur Ermittlung der Exon/Intron-Struktur des humanen *FGFR3*-Gen.**

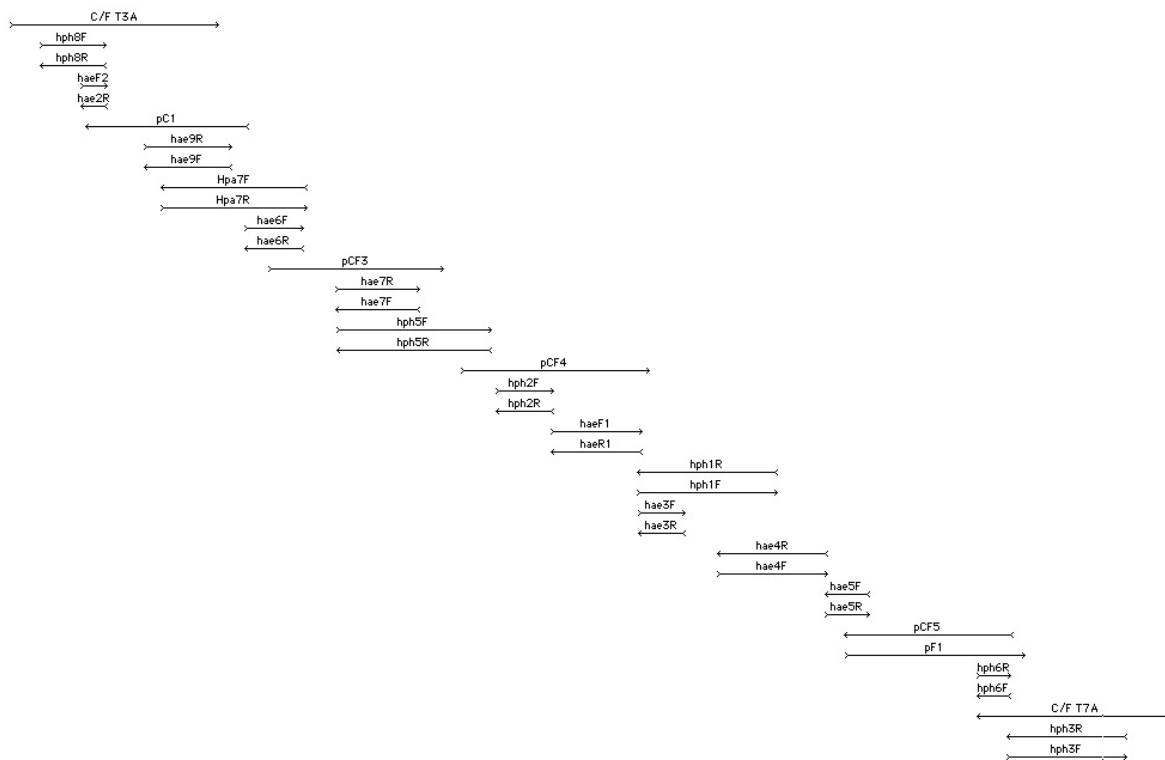
(A) Schematische Darstellung der Primerkombinationen, die zur Ermittlung der genomischen Struktur des *FGFR3*-Gens verwendet wurden.

(B) Gelelektrophoretische Auftrennung der neun generierten PCR-Produkte.

Die Spuren 1-9 entsprechen den in Abb. 8A abgebildeten Fragmenten 1–9. Als Molekulargewichtsstandard wurde Hind-III verdaute  $\lambda$ -DNA (M) bzw. 100 Bp-Leiter (M') verwendet.

Bei der Aufklärung der Exon/Intron-Struktur des *FGFR1*-Gens war es Johnson et al. (1991) nicht möglich, den 5' Bereich des Gens auf genomischer Ebene zu amplifizieren. Sie gingen von einem oder mehreren sehr großen Introns in diesem Bereich aus. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Primerkombination UF1/C1 eine "Expand"-PCR durchgeführt. Auf cDNA-Ebene entsteht mit dieser Primerkombination ein 124 Bp-Fragment. Die Amplifikation mit der Primerkombination und pC385.1-Cosmid-DNA als Matrize ergab ein 5 kBp-Fragment. Zur doppelsträngigen Sequenzierung dieses PCR-Produkts wurde eine "shot-gun"-Klonierung von Rsa I- und Hae III-Restriktionsfragmenten durchgeführt. Restliche, nur einzelsträngig sequenzierte Bereiche wurden mit spezifischen Primern doppelsträngig sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen ergab, dass das 5 kBp-Fragment lediglich ein Intron (Intron 2) umspannt, dessen Größe 5210 Bp beträgt. Die PCR (siehe 2.5) mit der Primerkombination C/F und pC385.1-Cosmid-DNA als Matrize ergab ein 2,2 kBp-Fragment. Durch "shot-gun"-Klonierung von Rsa I- und Hae III-Restriktionsfragmenten konnte eine fast vollständige doppelsträngige Sequenzierung erreicht werden. Restliche, einzelsträngige Bereiche wurden auch hier mit spezifischen Primern doppelsträngig sequenziert. Die

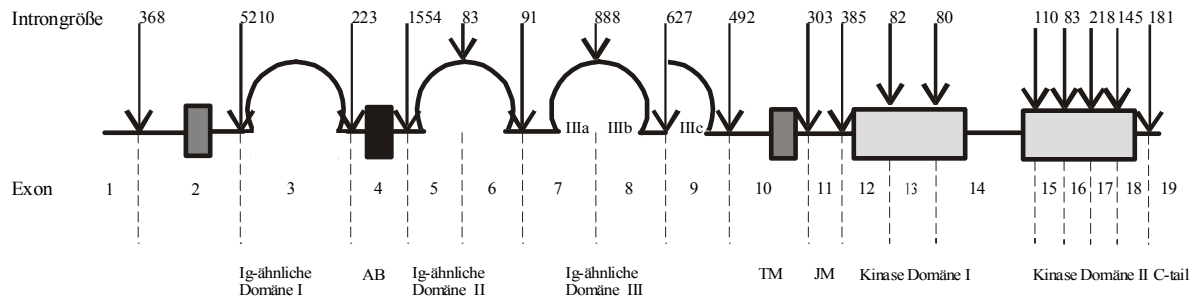
Sequenzierungsstrategie ist in Abb. 9 schematisch dargestellt. Es konnte so die genaue Lokalisation und Größe von Intron 3 (223 Bp) und Intron 4 (1554 Bp) ermittelt werden.



**Abb. 9: Sequenzierungsstrategie des mit der Primerkombination C/F amplifizierten PCR-Fragments.**

Die doppelsträngig sequenzierte Konsensussequenz von 2229 Bp wurde durch Überlappung von 35 Teilsequenzen, die als horizontale Pfeile dargestellt sind, erhalten.

Der weitere Bereich des humanen Gens konnten durch die Primerkombinationen G/UR3, UF3/XR1, XF1/K, Pub1/Pub2, A/P2, Q/U2 und V/TD2 amplifiziert werden. Die jeweiligen Produktgrößen nach Amplifikation mit pC385.1-Cosmid-DNA als Matrize sind in Tabelle 3 aufgelistet. Alle Fragmente wurden in T-Vektor kloniert und mit randspezifischen bzw. intern gelegenen spezifischen Primern doppelsträngig sequenziert. Die Sequenzierungsstrategien sind nicht abgebildet. Die genaue Größe und die Lokalisation der so ermittelten Introns ist der Abb. 10 zu entnehmen.



**Abb. 10: Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *FGFR3***

Zahlen über den Pfeilen geben die Introngröße in Bp an. Pfeile und gestrichelte vertikale Linien zeigen die Lokalisation eines Introns an. Zahlen zwischen den gestrichelten vertikalen Linien zeigen die entsprechende Exonnummer an.

AB: acid box, TM: Transmembran-Domäne, JM: Juxtamembran Domäne, Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne

Die Auswertung aller Sequenzen ergab, dass sich das humane *FGFR3*-Gen aus 19 Exons und 18 Introns zusammensetzt. Es umfasst ungefähr 16 kBp, davon stellen 11 kBp Intronsequenzen und 4,2 kBp Exonsequenzen dar. An allen Exon/Intron-Grenzen konnten konservierte GT und AG Dinukleotide nachgewiesen werden (Tab. 4) (Sharp P. A., 1987). Die Exons haben eine durchschnittliche Größe von 150 Bp. Die Größe der Introns variiert zwischen 80 Bp und 5 kBp, wobei das größte Intron zwischen Exon 2 und Exon 3 lokalisiert ist. Die Lage und die Größe der Introns ist in Abb. 10 zusammengefasst. Die Sequenzen der Introns 2 bis 18 sind unter den Accession-Nummern Y09852 und Y08086-Y08101 in der Genbank/EMBL-Datenbank abgelegt (Wuechner et al., 1997).

Innerhalb der codierenden Region konnten zwei Polymorphismen im Vergleich zu der publizierten cDNA (Keegan et al., 1991) und der Cosmid-Sequenz nachgewiesen werden. Es handelt sich um den Austausch eines C durch ein T an der dritten Position von Codon 294 in Exon 7 und um eine A zu T-Transversion im 3'-untranslatierten Bereich. Keiner dieser Austausche beeinflusst die Aminosäuresequenz und stellen wahrscheinlich seltene Polymorphismen dar. Das Translations-Initiations- bzw. das Terminationscodon (ATG bzw. TGA) sind in Exon 2 bzw. in Exon 19 lokalisiert.

**Tabelle 4**  
**Exon-/Introngrenzen im *FGFR3*-Gen**

Exon	Exon- größe (Bp)	5'Spleißakzeptor	Intron- größe (Bp)	3' Spleißdonor
1	171	GCCAG <b>gt</b> ccgtgcttggggccgg	368	gccttcctcctcctgc <b>ag</b> TCTCC
2	211	GGCAG <b>gt</b> aagaagggaccacta	5210	tgcccatcttccccac <b>ag</b> AAGTC
3	270	GACAG <b>gt</b> gagctctggggccacg	223	gccatctctgccttgc <b>ag</b> ACGCT
4	66	CACAG <b>gt</b> taggagcagggtccagg	1554	acgcacctcggcccgc <b>ag</b> GGGCC
5	170	TCAAG <b>gt</b> ggggcgcggggggtgg	83	gcccgcgtcccgggtgc <b>ag</b> CTGCG
6	124	GCTGG <b>gt</b> gaggccctggggcgg	91	cgatcatctgccccac <b>ag</b> AGCGC
7	191	TCAAG <b>gt</b> ggggccaccgtgtgcac	888	ggtctcttgtccccgc <b>ag</b> TCCTG
8	151	AGCAG <b>gt</b> aacgactctgtcccat	627	tctgctctctctttgt <b>ag</b> ACGGC
9	145	GCCAG <b>gt</b> accggcttctgctgct	492	acgcccattgtctttgc <b>ag</b> CCGAG
10	191	GACAG <b>gt</b> aacagaaagtagatac	303	ccctgctgacccaagc <b>ag</b> GTGTC
11	146	GCCCG <b>gt</b> cagtgtgctgagggc	385	ctctgcctccactgcc <b>ag</b> GCTGA
12	122	GAAAG <b>gt</b> gaggagggggcggcca	82	ccccgcctcctgtcac <b>ag</b> ACGAT
13	111	GGGCG <b>gt</b> taggtgcggtagcggcg	80	aggagcccgtgtcccc <b>ag</b> GGCCC
14	191	AGAAG <b>gt</b> ggggcagggcggcaggt	110	ctcccacccttcccc <b>ag</b> TGCAT
15	123	CCAAC <b>gt</b> gagcccggccctgggg	83	cttcccacaccctccc <b>ag</b> GGCCG
16	71	GACGT <b>gt</b> acgtgtcctgcagagc	218	cctcaccttcccctgc <b>ag</b> CTGGT
17	138	GACCT <b>gt</b> gagtggcatccctggc	145	tgagcgccctgcccgc <b>ag</b> GTACA
18	106	CCGAC <b>gt</b> gagtgtgctctggc	181	cccgcctcccgc <b>ag</b> GAGTA
19	1644			

Die Exonsequenzen sind in Groß-, die Intronsequenzen in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Konsensussequenzen für Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen sind fett gedruckt.

Aufgrund der Kenntnis der genomischen Struktur des murinen *Fgfr3*-Gens (Perez-Castro et al., 1995) war ein direkter Vergleich des Aufbaus und der Sequenz des Maus- und des menschlichen Gens möglich (Tab. 5). Der Vergleich der Nukleotidsequenz der codierenden Region zwischen Mensch und Maus zeigt eine Sequenzübereinstimmung von 82,5%, beim Vergleich der Aminosäuresequenz konnte sogar eine Homologie von 92% nachgewiesen werden. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht zeigt der Vergleich der Intronsequenzen eine durchschnittliche Homologie von 51,9%, wobei die Sequenzübereinstimmungen der meisten Introns zwischen 42% und 58% liegt. Die Introns 1, 8, 12, 13 und 18 zeichnen sich jedoch durch deutlich höhere Werte zwischen 64% und 67% aus. Möglicherweise korreliert diese Übereinstimmung mit konservierten funktionellen Domänen in den entsprechenden Introns (z. B. Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen).

**Tabelle 5**  
**Vergleich des humanen mit dem murinen FGFR3-Gen**

Exon	Exongröße (bp)	Spleißdonorstelle	Introngröße (bp)	Mensch/ Maus Ident.	Spleißakzeptorstelle
1	171 163	<b>GCCAGgncogtgetggggccgg</b> GCCAGgttagtggtgaaggactcg	368 350	64.6%	<b>gccttctctctctctgcagTCTCC</b> agtgtctctctctctctgtagTCTCC
2	211 204	<b>GGCAGgtaagaaggaccacta</b> GGCAGgtaaggactgaccacaagg	5210 5138	53.3%	<b>tgcccatcttccccacagAAGTC</b> gtccccatttactccacagAGGTT
3	270 270	<b>GACAGgtgagctctctggggccacg</b> AACAGgtaagtgtctggtgggtg	223 275	45.8%	<b>gccatctctgctctgcagACGCT</b> cccacttggaaacttgcagATGCT
4	66 54	<b>CACAGgtaggagcagggctccagg</b> CACAGgtgagattagagtcttat	1554 1452	42.1%	<b>acgcacctcgcccgcagGGGCC</b> gggtacttctgccatcagGGGCT
5	170 170	<b>TCAAGgtgggcggcggggggtgg</b> TCAAGgttagtctctgggaaagaaa	83 85	48.0%	<b>gcccgcgtcccgggtgcagCTGCG</b> cagactaactacctgcagCTCCG
6	124 124	<b>GCTGGgtgagggccctggggcgg</b> GCTGGgtgagggccaggccgggt	91 84	52.0%	<b>cgctcatctgccccacagAGCGC</b> cctgactgcctcttgcagAGCGC
7	191 191	<b>TCAAGgtgggccaccggtgtgcac</b> TCAAGgttagtctctatccccggc	888 943	45.2%	<b>ggtctcttgtccccgcagTCTTG</b> agtctcttgtccccgcagTCTTG
8	151 151	<b>AGCAGgtaacgactctgtcccat</b> AGCAGgtaacgactctgtcccat	627 684	64.3%	<b>tctgtctctctctttagACGGC</b> tctgttctctctttagACTGC
9	145 145	<b>GCCAGgtaccggcttctgtctgct</b> GCCAGgtactcgttctgtctgctg	492 460	56.9%	<b>acgcccattgtcttgcagCCGAG</b> aaatttgtatcttgcagCTGAG
10	191 191	<b>GACAGgtaacagaaagtagatac</b> GACAGgtaacagaaagtagatac	303 345	57.6%	<b>ccctgtgaccaagcagGTGTC</b> tctgatgaccaagcagGTGTC
11	146 146	<b>GCCCggtcagtggtgctgagggc</b> ACCCGgtcagtggtggtgagggga	385 318	57.1%	<b>ctctgcctccactgccagGCTGA</b> ctctgtttccatgggtcagGCTGA
12	122 122	<b>GAAAGgtgaggagggggcgccca</b> GAAAGgtgaggagggagggaagt	82 74	67.0%	<b>ccccgcctccgtgcacagACGAT</b> cctctgttccccgcacagATGAT
13	111 111	<b>GGGCggtaggtgcggtagcggcg</b> GGGTGgtaggtcagtggttgggt	80 80	64.5%	<b>aggagccggtgtccccagGGCCC</b> agggtcctgtgcttccagGGCCC
14	191 191	<b>AGAAGgtgggcagggcggcaggt</b> AGAAGgtgggcagagacagggac	110 109	53.1%	<b>ctccccaccttccccagTGCAT</b> ttccttttgtctcttcagTGTAT
15	123 123	<b>CAAACgtgagccccggccctgggg</b> CAAATggccggctcgagatgtgc	83 133	60.0%	<b>ctccccacacctccccagGGCCG</b> acctctccctctgcccagGGCCG
16	71 71	<b>GACGTgtacgtgtctctgcagagc</b> GATGTgtatgtgtccctacatag	218 227	44.7%	<b>cctcaccttccctgcagCTGGT</b> atcctcaattccctgcagTTGGT
17	138 138	<b>GACCTgtgagtgccatccctggc</b> GACCTgtgagcccttgttcatte	145 144	49.1%	<b>tgagcgcctgcccgcagGTACA</b> tagctatacttggccgagGTACA
18	106 106	<b>CCGACgtgagtgctggctctggc</b> CCGACgtaagtgtccctcagtc	181 175	65.2%	<b>cccgctccccgcagcagGAGTA</b> accatgtccaccaaacagGAGTA
19	? 1644				

Humane Sequenzen sind in der oberen Zeile (Fettdruck), murine Sequenzen in der unteren Zeile dargestellt. Exonsequenzen sind durch Großbuchstaben, Intronsequenzen durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet, Exon- bzw. Introngröße, sowie die Spleißdonor- und die Spleißakzeptor-Stellen sind neben den Sequenz-übereinstimmung (%) der humanen und der murinen Intron-Sequenz abgebildet.

**3.1.2 Mutationsanalyse**

Mit Hilfe der ermittelten genomischen Sequenz des *FGFR3*-Gens wurde ein Set von 16 Primerpaaren generiert (Tab. 6), das eine Amplifikation aller Exons auf genomischer Ebene ermöglichte.

**Tabelle 6**  
**PCR-Primer zur Amplifikation der *FGFR3* Exons 2- 18.**

Exon	Primersequenz	Accession Nummer	Lokali-sation	PCR-product (Bp)
1	CGAGGGGGCGTGCCCTGCGCC AGCACCGTTGGACCCCTCCG	L78720	1138-1119	339
2	AGGGGTCGGGACGCAGGAG CCCAACGCCTCTGCCCGCAC	L78720 Y09852	1379-1397 70-51	350
3	GTCTGTAAACGGTGCCGG ACCAGAGAGACCCCCAGC	Y09852 Y08086	5163-5180 107-90	425
4	ATCTGGGAGGGGCACCTGGG GTCCCTCAGCTGCCTGTGAAG	Y08086 Y08087	166-185 98-78	222
5	G TTCAGAGGGGCTCTGCTC AGTGAGCGGAGGCAGCAACC	Y08087 Y08088	1507-1526 72-53	290
6	CAGGCGCGGTGGTTGCTGCC GCACGTCCAGCGTGTACGTCTG *	Y08089 NM 000142.1	43-62 775-754	177
7	CGGCAGTGGCGGTGGTGGTG CCAGCCCAGGAGCCCCAGCG	Y08089 Y08090	45-64 61-42	299
8	TCTCCACATCCTGCGTC GGGCCTTGGAGCTGGAGCTC	Y08090 Y08091	827-841 64-45	277
9	AGGCGGTGCTGGCGCTCGC AGACAGTGGCGAGCAGCAGC	Y08091 Y08092	595-614 50-31	228
10	CAGGCCAGGCCTCAACGCCC AGGCCTGGCGGCAGGCAGC	Y08092 Y08093	473-492 60-40	271
11	CTGTACCTCCACGCCCTGTGCG CTGTTTCACCCCACCACC	Y08093 Y08094	257-278 71-53	264
12	GAGTGGGCGAGTTTGCACTC GCCCCAGCCCTGCTCTGCAC	Y08094 Y08095	351-372 54-34	211
13	GTGCAGAGCAGGCTGGGGGC GCTCCTCAGACGGGCTGCCAG	Y08095 Y08096	34-54 81-60	240
14	CTGGCAGCCCGTCTGAGGAGC CTGCTCCCAGCATCTCAGGGCA	Y08096 Y08097	60-81 74-53	286
15	GGTGGAGAGGCTTCAGCCCT GCCAGGCGTCTACTGGCATGA	Y08097 Y08098	83-102 66-45	217
16	TCATGCCAGTAGGAGCCTGGC GGTCTGGCTCTGCCAGTTC	Y08098 Y08099	45-66 74-54	184
17	CAGCGCAGCCCTGGCCTATTC CCTGAAGGGCTGCCAGTCCCT	Y08099 Y080100	143-163 100-79	314
18	GAAGCGGCGGGGCTCACTCCT ATAGGCGGGTGGCACCAGGC	Y080100 Y080101	120-140 48-29	180
19	GCGAAGAGGGGCTCGGTGGCAC CACCAGCAGCAGGCTGGGCTGCTA	Y080101 M64347	145-166 2254-2231	254

Primersequenzen (5'→3'-Orientierung), die Lage der Primer in den entsprechenden Introns (Accession Nummer) und die resultierende PCR-Produktgröße zur Amplifikation der *FGFR3* Exons 2-18 ist angegeben.

\* Da die 5' Region von Intron 6 sehr GC-reich ist, wurde der Primer an das 3' Ende von Exon 6 gelegt. Deshalb können die letzten 25 Bp von Exon 6 mit diesem Primer nicht ausgewertet werden.

In einer anschließend durchgeführten Mutationsanalyse im Rahmen der Routine-Diagnostik der Mainzer Kinderklinik wurden 171 Patienten untersucht (Tab. 7) (Hilbert et al.,1998) .

**Tabelle 7**

**Nachgewiesene *FGFR3*-Mutationen**

Erkrankung	Anzahl der Patienten	Nachgewiesene Mutation		Anzahl der Patienten mit Mutation (%)
<b>Achondroplasie</b>	83	Gly 380 Arg	GGG→ <b>AGG</b> GGG→ <b>CGG</b>	75 (90%) 2 (3%)
<b>Thanatophore Dysplasie Typ I</b>	8	Arg 248 Cys Tyr 373 Cys	CGC→ <b>TGC</b> TAT→ <b>TGT</b>	7 (88%) 1 (12%)
<b>Thanatophore Dysplasie Typ II</b>	1	Lys 650 Glu	AAG→ <b>GAG</b>	1 (100%)
<b>Hypochondroplasie</b>	79	Asn 540 Lys  Asn 540 Ser Asn 328 Ile	AAC→ <b>AAA</b> AAC→ <b>AAG</b> AAC→ <b>AGC</b> AAC→ <b>ATC</b>	31 (39%) 19 (24%) 1 (1,3%) 1 (1,3%)

Dargestellt ist die Anzahl der untersuchten Patienten sowie die Anzahl derer bei denen eine Mutation nachgewiesen werden konnte (%). Die ausgetauschten Nukleotide sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

Bei 93% der untersuchten Patienten mit diagnostizierter Achondroplasie konnte die klassische Punktmutation in der *FGFR3*-Transmembran-Domäne nachgewiesen werden (Shiang et al., 1994), während eine ebenfalls publizierte Mutation an Position 375 in keinem der Patienten (Superti-Furga et al., 1995) vorlag. Bei 7% der untersuchten Patienten konnte keine Mutation gefunden werden. Die Diagnose der Achondroplasie ließ sich bei diesen Patienten allerdings durch fehlende klinische Daten bzw. Röntgenbilder nicht bestätigen.

Bei allen untersuchten Patienten mit diagnostizierter thanatophorer Dysplasie konnten ebenfalls Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens identifiziert werden. Es waren ausnahmslos bereits publizierte Mutationen (Tavormina et al., 1995; Rousseau et al. 1995).

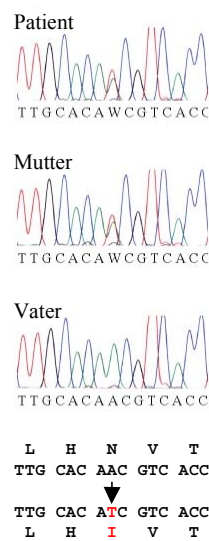
Von 79 untersuchten Patienten mit Verdachtsdiagnose einer Hypochondroplasie (HCH) zeigten 50 (65%) den bereits beschriebenen Austausch eines Asparagin durch ein Lysin an Position 540 innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne 1 (Bellus et al., 1995; Prinos et al., 1995). In einem Patienten konnte eine bis jetzt noch nicht publizierte Transition von A nach G an Position 1659 nachgewiesen werden, die ebenfalls an Position 540 einen Aminosäureaustausch bewirkt, allerdings kommt es hier zu einem Asparagin zu Serinaustausch. Alle bisher beschriebenen HCH-Mutationen sind in der Tyrosinkinase-



Domäne 1 lokalisiert und haben wie die anderen bereits publizierten *FGFR3*-Mutationen eine Liganden-unabhängige Aktivierung des FGF-Rezeptors 3 zur Folge (Raffioni et al., 1998). Bei 28 Patienten konnte keine Mutation an den bereits veröffentlichten Positionen ermittelt werden. Dies läßt sich zum einen durch fehlerhafte Diagnosestellung erklären, zum anderen muß davon ausgegangen werden, dass weitere noch nicht veröffentlichte Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens existieren bzw. weitere Gene für die Erkrankung verantwortlich sind (Rousseau et al., 1996). Um die Vermutung zu klären, ob weitere Mutations-„hot-spots“ innerhalb des *FGFR3*-Gens existieren, wurde die gesamte codierende Region des Gens bei HCH-Patienten untersucht. Der Nachweis einer neuen Mutation bei einer Patientin mit allen klinischen Merkmalen der Hypochondroplasie bestätigte diese Annahme.

Bei der Untersuchung der Patientin in der Universitätsklinik Mainz von Prof. Spranger wurde eine Hypochondroplasie diagnostiziert. Das Mädchen hatte eine Geburtsgröße von 50 cm, bis auf langsames Wachstum verlief die postnatale Entwicklung normal. Im Alter von 20 Monaten zeigte die Patientin geringen Minderwuchs (Körpergröße: 73 cm; Gewicht: 10,7 kg) und abnormale Körperproportionen mit verkürzten Oberarmen und Oberschenkeln. Routinemäßig durchgeführte Blutuntersuchungen (Alkalische Phosphatase, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-I (IGF-I), IGF-Bindeprotein) waren normal. Bis auf den Kleinwuchs gab es keine Auffälligkeiten, das Kind wirkte munter und zeigte eine normale psychomotorische Entwicklung. Die Mutter des Kindes ist 150 cm groß, sie scheint ebenfalls von geringem dysproportioniertem Minderwuchs betroffen, lehnt aber eine klinische Untersuchung ab. Die maternalen Großeltern haben eine Körpergröße von 185 bzw. 170 cm.

Die Untersuchung des gesamten *FGFR3*-Gens bei der Patientin führte zu der Identifizierung einer Transversion von A nach T an Position 1022 (Exon 9). Die Mutation hat den Austausch eines Asparagins durch Isoleucin an Position 328 in der Immunglobulin-ähnlichen Domäne IIIc zur Folge. Die Mutation konnte bei der vermutlich ebenfalls betroffenen Mutter, jedoch nicht beim normalwüchsigen Vater der Patientin nachgewiesen werden (Abb. 11). In 50 weiteren normalwüchsigen Probanden konnte dieser Austausch ebenfalls nicht nachgewiesen werden, was die Annahme bestätigt, dass es sich um die Phänotyp verursachende Mutation handelt (Winterpacht et al., 2000).

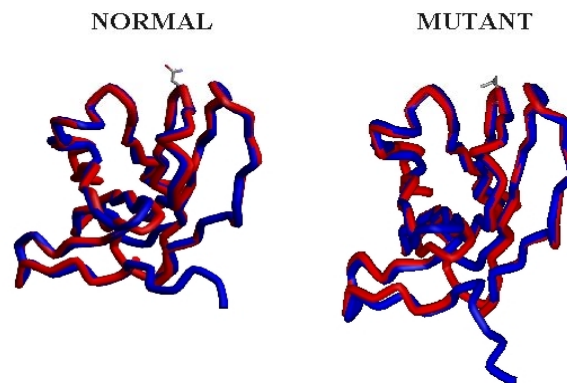


**Abb. 11: De novo Mutationsnachweis im *FGFR3*-Gen eines Hypochondroplasie Patienten**

DNA-Sequenzanalyse von Exon 9 des *FGFR3*-Gens. Die heterozygote Transversion von A nach T die den Austausch eines Asparagins durch Isoleucin zur Folge hat, konnte in der Patientin sowie in der betroffenen Mutter, aber nicht in dem gesunden Vater und in 50 weiteren nicht-betroffenen Probanden (nicht abgebildet) nachgewiesen werden.

Die nachgewiesene Mutation kann zwei krankheitsverursachende Auswirkungen haben. Zum einen kann durch Veränderung der Glykosylierung das Krankheitsbild verursacht werden. Zum anderen kann die Sekundärstruktur des Proteins durch die Mutation verändert werden, woraus dann der beschriebene Phänotyp resultiert.

Um festzustellen, ob der nachgewiesene N328I-Austausch eine Auswirkung auf die Faltung der entsprechenden Region hat, wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Decker (Universität Mainz) ein dreidimensionales Modell des Wildtyp- und des mutierten Rezeptors erstellt (Abb. 12). Das Modell wurde mit Hilfe des Programms "Modeller 4" (Sali und Blundell, 1993) auf Grundlage der bekannten Struktur der Immunglobulindomänen generiert. Ähnliche Modelle für Ig-Domänen wurden schon von anderen Arbeitsgruppen aufgestellt (Gray et al., 1995; Wilkie et al., 1995).



**Abb. 12: Dreidimensionale Struktur der modellierten IgIII-Domäne**

von FGFR-3 (blau) und der FV-Domäne des Antikörper (Proteindatenbank: 1A6U) von *Mus musculus* (C57BL/6) (rot). Der normale FGF-Rezeptor 3 ist auf der linken, der mutierte (N328I) Rezeptor ist auf der rechten Seite abgebildet. Die mutierte bzw. normale Seitenkette ist angedeutet.

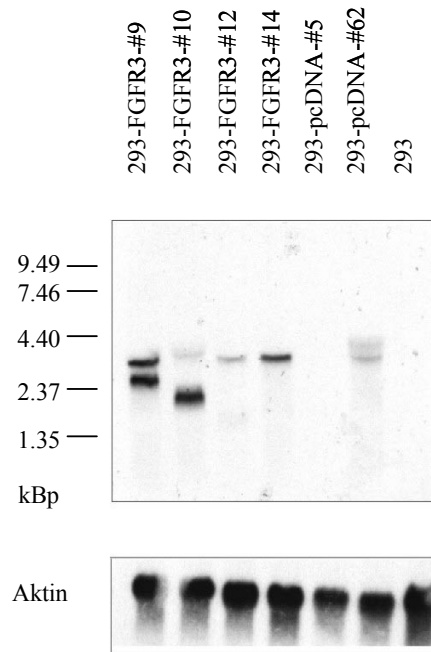
In Abb. 12 ist zu erkennen, dass die dreidimensionale Struktur der modellierten Ig-III Domäne von FGFR3 und die FV-Domäne des Antikörpers (Proteindatenbank: 1A6U) von *Mus musculus* (C57BL/6) sehr gut übereinstimmen. Diese Übereinstimmung wird besonders deutlich in den drei schleifenförmigen Abschnitten der Ig-III Domäne, in der auch die mutierte Aminosäure lokalisiert ist. Da die strukturellen Veränderungen, die durch die Mutation verursacht werden, nur für die direkte Umgebung der mutierten Aminosäure berechnet werden können, ist es nicht möglich, die Auswirkung der Mutation auf die Struktur des gesamten Proteins darzustellen. Trotzdem erscheint es aufgrund dieses Modells unwahrscheinlich, dass es zu größeren strukturellen Umlagerungen kommt, da die mutierte Aminosäure an der Oberfläche einer der drei Schleifen lokalisiert ist.

Vergleicht man die hier beschriebenen Ergebnisse mit der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur von FGF2 gebunden an Ig II und Ig III-Domäne von FGFR1 (Plotnikov et al., 1999), kann davon ausgegangen werden, dass das Asparagin an Position 328 (Position 330 in FGFR-1) nicht an Liganden-Rezeptor bzw. an Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen beteiligt ist. Das bestätigt die Annahme, dass allein der Aminosäure-Austausch nicht die Phänotyp verursachende Wirkung besitzen kann.

Die hier beschriebene Mutation kann jedoch auch, wie bereits erwähnt, durch Veränderung der Glykosylierung des Rezeptors eine krankheitsverursachende Auswirkung haben. Der

Vergleich der vier verschiedenen FGF-Rezeptoren zeigt, dass das durch Isoleucin ersetzte Asparagin an Position 328, sowie die umgebende Glykosylierungs-Consensusstelle (N-V-T) hoch konserviert ist (Abb. 37). Das deutet auf eine funktionelle Bedeutung der entsprechenden Position hin. Untersuchungen verschiedener Mutationen innerhalb des *FGFR2*-Gens, die die konstitutive Aktivierung und die liganden-unabhängige Aktivierung des Rezeptors zur Folge hatten, zeigten, dass die mutierten Formen im Vergleich zu den Wildtyp-Rezeptoren weniger stark glykosyliert waren (Mangasarian et al., 1997). Um festzustellen, ob die Veränderung der Glykosylierung von FGFR3 krankheits-verursachende Auswirkungen hat, wurde eine 293-Zell-Linie mit dem humanen *FGFR3*-Gen stabil transfiziert (siehe 2.14.1). Die Rezeptoraktivität sollte mit der Aktivität nicht-glykosylierten FGFR3 verglichen werden. Die Glykosylierung kann durch Tunicamycin-Behandlung inhibiert werden. Tunicamycin ist ein Antibiotikum, welches zahlreiche biochemische Vorgänge, u. a. die Glykoproteinsynthese, inhibiert. Durch Herstellung eines FGFR3-Rezeptor mit der N328I Mutation sollte dann ebenfalls die Glykosylierung und die Rezeptoraktivität untersucht und mit dem Wildtyp verglichen werden.

Das Expressionskonstrukt mit 2,5 kBp kodierender und 1,5 kBp nicht-kodierender FGFR3-Sequenz in dem Expressionsvektor pcDNA3 wurde von G. Gross (Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Durch Northern-Blot-Analyse wurde die Expression des *FGFR3*-Gens in das Wirtsgenom überprüft (Abb. 13). Von fünf untersuchten Zelllinien zeigte eine (293-FGFR3 #14) die korrekte Integration des *FGFR3*-Gens. Bei den übrigen konnten entweder mehrere Transkripte oder nur eine schwache Expression nachgewiesen werden. In untransfizierten 293-Zellen, sowie in 293-Zellen die nur mit pcDNA3-transfiziert wurden, konnte keine *FGFR3* Expression gezeigt werden (Abb. 13).

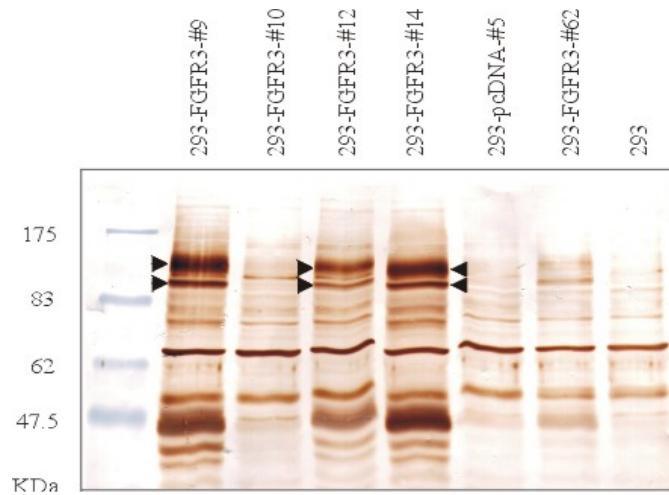


**Abb. 13: Northern Blot Analyse transfizierter 293-Zelllinien**

Das dargestellte Autoradiogramm eines Northern Blots, mit jeweils 15 µg poly (A+) RNA wurde nach Hybridisierung mit dem radioaktiv markiertem *FGFR3*-spezifischem PCR-Produkt E/F und einer Exposition von 18 Stunden erhalten. Aufgetragen sind RNAs verschiedener mit *FGFR3* stabil transfizierter 293-Zelllinien (293-FGFR3 #9, #10, #12, #14 und #62). Nur die 293-FGFR3 #14-RNA zeigte eine starke Expression eines 4 kBp-Fragments. Die anderen Zelllinien scheinen *FGFR3* nur schwach bzw. mehrere Transkripte zu exprimieren. In unbehandelten 293-Zellen bzw. in Zellen, die mit dem leeren Vektor (293-pcDNA) transfiziert wurden, konnte keine *FGFR3*-Expression nachgewiesen werden.

Das untere Autoradiogramm zeigt den gleichen Northern Blot nach Hybridisierung mit einer Aktin-Sonde und Exposition von einem Tag.

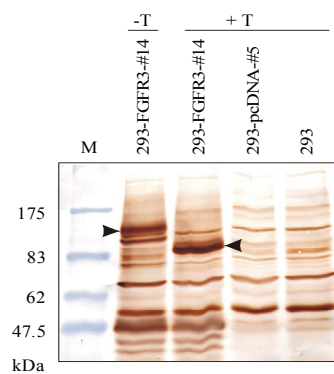
Dieses Ergebnis konnte durch Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 14). *FGFR3* liegt in der Zelle in drei unterschiedlichen Formen vor. Eine nicht-glykosylierte 97 kDa-Form, eine wahrscheinlich unausgereifte 125 kDa-Form, sowie eine fertig prozessierte 135 kDa-Form (Keegan et al., 1991). Die Zelllinie #9, #12 und #14 zeigten deutliche Expression der 97 kDa-Form sowie der beiden größeren, glykosylierten Formen, die wahrscheinlich aufgrund geringer Größenunterschiede nicht als Einzelbanden erkennbar sind. Aufgrund der Northern- und der Western-Blot Analyse wurden alle weiteren Experimente mit der 293-FGFR3- #14 Zelllinie durchgeführt.



**Abb. 14: Western Blot Analyse transfizierter 293-Zellen**

Nach Auftrennung der Proteinextrakte auf einem 7,5% SDS-PAA-Gel wurden diese auf einen Cellulosenitratfilter transferiert und mit FGFR3-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) hybridisiert. Die Proteinextrakte der Zelllinie #9, #12 und #14 zeigten deutliche Expression der verschiedenen FGFR3-Formen. Im Proteinextrakt der Zelllinien #10 und #62 sowie in 293-pcDNA3-Zellen und Proteinextrakt aus unbehandelten 293-Zellen konnte FGFR3 nicht nachgewiesen werden. Die Proteinextrakte wurden keiner Aufreinigung unterworfen, so dass übrige, deutlich schwächere Banden auf unspezifische Hybridisierung zurückzuführen sind.

Durch Zugabe von 5 µg/ml Tunicamycin konnte nach 18-stündiger Inkubation die Glykosylierung vollständig inhibiert werden (Abb. 15). Eine deutlich stärkere FGFR3-spezifische Bande ist im Vergleich zu dem Proteinextrakt aus unbehandelter Zellen zu erkennen. Die auf die Polyacrylamid-Gele aufgetragenen Proteinextrakte wurden keiner Aufreinigung unterworfen, dadurch ist das Auftreten weiterer Banden, die durch unspezifische Hybridisierung entstanden sind, zu erklären.



**Abb. 15: Inhibierung der Glykosylierung durch Tunicamycin**

293-FGFR3 #14, 293-pcDNA und 293-Zellen wurden 18 Stunden mit 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Tunicamycin kultiviert (+T). Das isolierte Proteinextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Cellulosenitrat transferiert. Die anschließende Hybridisierung mit FGFR3-Antikörper zeigte, dass in Anwesenheit von Tunicamycin nur noch die nicht-glykosylierte 97 kDa-Form vorliegt, die nicht behandelten Zellen (-T) zeigten die 125 kDa- und 135 kDa-Form. In 293-pcDNA-Zellen und 293-Zellen konnte FGFR3 nicht nachgewiesen werden.

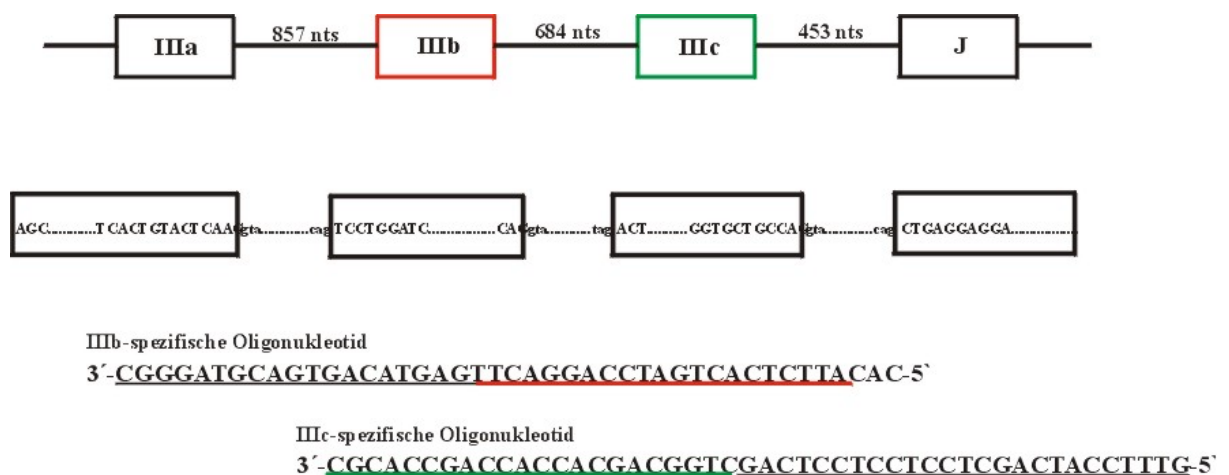
Der Nachweis die FGFR3-Rezeptoraktivität durch Western-Blot Analyse mit einem spezifischen Tyrosinkinase-Antikörper führte zu keinem Ergebnis. Die Vermutung die Glykosylierung beeinflusst die Rezeptoraktivität konnte mit diesem Versuchsansatz nicht bestätigt werden. Andere Methoden wie z. B. Kinase-Assay-Untersuchungen könnten zu einem Ergebnis führen.

Ein FGFR3-Konstrukt mit der N328I-Mutation wurde mit Hilfe eines Mutagenese-Kits (Stratgene) hergestellt. Das Konstrukt ist Ausgangspunkt weitere Untersuchungen und soll dann mit etablierten Methoden auf Rezeptoraktivität untersucht werden.

Trotz der nicht bestätigten Vermutungen stellt die hier beschriebene Mutation ein ausgezeichnetes Modell dar um die Auswirkung der Glykosylierung von normalen und mutierten FGF-Rezeptor auf deren Funktion zu untersuchen und einen Zusammenhang zu assoziierten Krankheiten herzustellen, ein Aspekt dem bis jetzt noch keine detaillierte Bedeutung beigemessen wurde.

### 3.1.3 Expression der alternativen Spleißformen des *FGF-Rezeptor 3*-Gens

Um die entwicklungsbiologische Bedeutung der zwei bekannten *FGFR3*-Spleißvarianten (*IIIb* und *IIIc*-Form) näher zu untersuchen und deren mögliche Relevanz bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen einschätzen zu können, wurden *in-situ*-Experimente mit Exon-spezifischen Sonden durchgeführt. Frühere Untersuchungen (Peters et al., 1993) hatten bereits die spezifische Expression der *IIIc*-Form während der Mausentwicklung zeigen können, das Expressionmuster der *IIIb*-Variante wurde jedoch noch nicht untersucht. Die Experimente wurden aufgrund von Mangel an humanen Untersuchungsgewebe mit Mausgewebe unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E12.5; E14.5, E20.5) durchgeführt. Als Hybridisierungssonden dienten wie in Abb. 16 dargestellt Exon *IIIb* bzw. *IIIc*-spezifische Oligonukleotide.



**Abb. 16: Aufbau und Sequenz des alternativ gespleißten Bereichs des *FGFR3*-Gens mit abgeleiteten Hybridisierungssonden.**

IIIa, IIIb und IIIc deuten Exonsequenzen (Großbuchstaben) an, Kleinbuchstaben kennzeichnen Intronsequenzen. (J: Juxtamembran-Exon). Die für die Versuche verwendete negativ Kontrolle (5'-GTTCCACTGCAAGGTGTACAGTGACGCACAGCCCCACATCCAGTGGCTCAAGCACGTGGA-3') (Nukleotide 854-913; Keegan et al., 1991) ist in der Transmembran-Domäne lokalisiert.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich das Expressionmuster der *FGFR3 IIIc*-Variante deutlich von der *IIIb*-Form unterscheidet. So konnte am Tag E12.5 eine deutliche Expression der *FGFR3 IIIc*-Spleißvariante im Nachhirn, in den Wirbelkörpern, in den Knochen der Extremitäten, sowie in der Leber nachgewiesen werden (Abb. 17A). Eine Expression der *IIIb*-



Variante in diesem Entwicklungsstadium ist nicht nachweisbar (nicht abgebildet). Zwei Tage später (E14.5) ist eine schwache Expression der *IIIb*-Form im Epithelium des Magen-Darm- und des Harntraktes erkennbar (Abb. 17C). Im Gegensatz dazu ist die *IIIc*-Variante stark in dem sich entwickelnden Epithelium des zentralen Nervensystems, in der Wirbelsäule, in den Rippen und im Rückenmark exprimiert (Abb. 17B). Deutliche Expression der *IIIb*-Form ist am Tag E20.5 zu erkennen. Ein Nachweis ist in den epithelialen Strukturen des Magen-Darm-Traktes, des Bronchial- und des Blasentraktes, sowie der epithelialen Zellschicht der Epidermis möglich. Eine sehr spezifische und starke Expression findet man auch in den epithelialen Zellen der sich entwickelnden Barthaare. Innerhalb der sich entwickelnden Knochen kann die *FGFR3 IIIb*-Variante nicht nachgewiesen werden (Abb. 17E). Im Vergleich dazu ist die *IIIc*-Form am Tag E20.5 im zentralen Nervensystem, aber auch im ventralen Rückenmark zu erkennen. Zusätzlich kann eine starke Expression in der Wirbelsäule, in den Rippen und in den Knochen der Extremitäten beobachtet werden. In diesem Entwicklungsstadium findet sich auch in den Knorpelspannen der Trachea und in der Glandula submandibularis eine deutliche Expression. Schwach hingegen ist die Expression in den epithelialen Zellen der Epidermis (Abb. 17D). Die Hybridisierung der "sense"-Probe als Negativkontrolle zeigt kein spezifisches Signal (Abb. 17F).

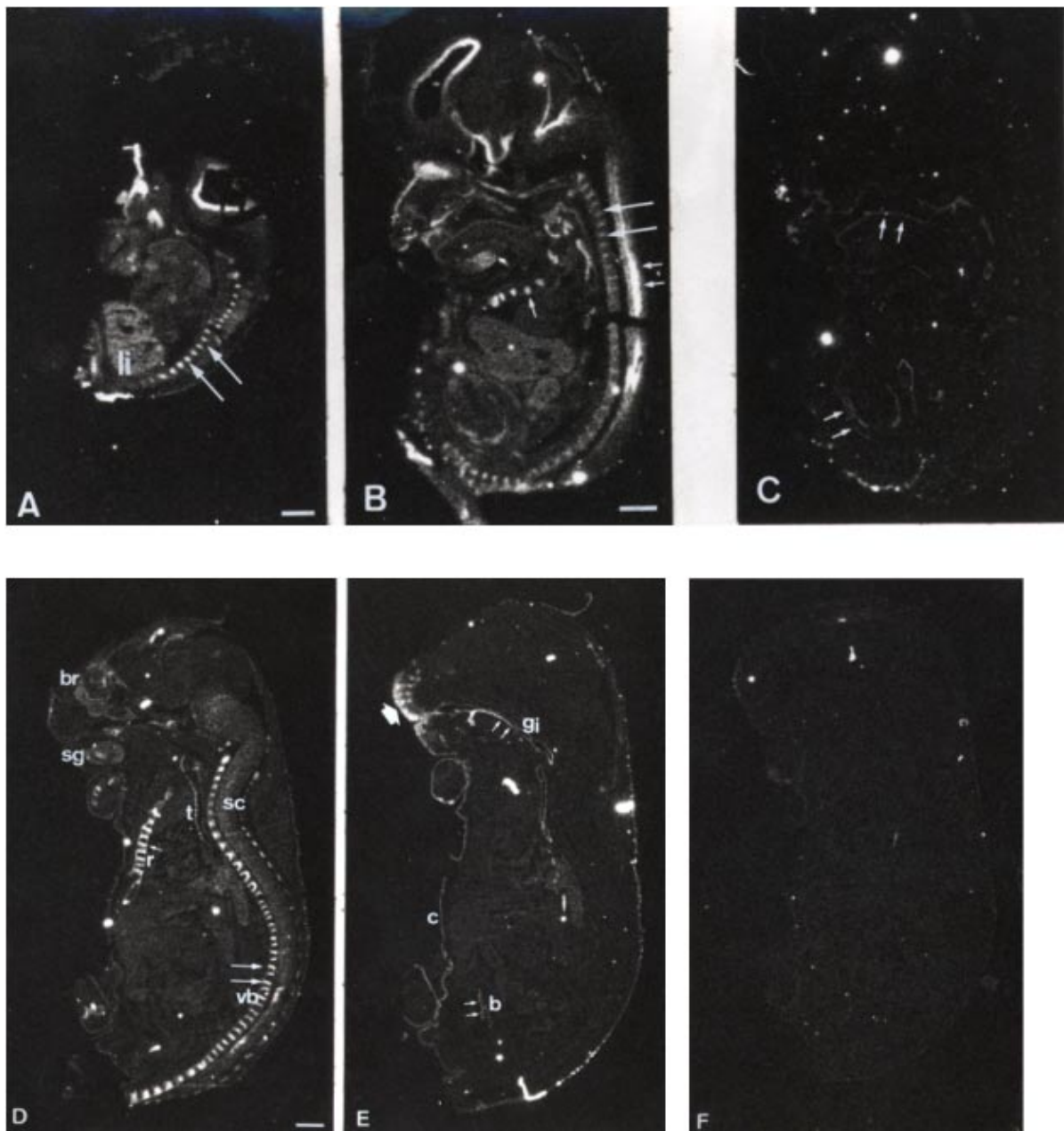
Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression der *IIIb*-Variante im Gegensatz zur *IIIc*-Form, die sehr stark im sich entwickelnden Skelett (Abb. 18D) und im zentralen Nervensystem exprimiert wird, ausschließlich auf epitheliale Zellschichten (Abb. 18A) beschränkt ist.

Histopathologische Untersuchungen an Patienten mit thanatophorer Dysplasie konnten eine erhöhte Menge an *FGFR3* im Knorpel der betroffenen Feten nachweisen, ohne dass die mRNA-Menge verändert schien (Delezoide et al., 1997). Der immunhistochemische Nachweis wurde jedoch mit einem Antikörper durchgeführt der beide *FGFR3*-Spleißvarianten erkennt, sodass es im Moment schwer zu beurteilen ist, welche Bedeutung das unterschiedliche Expressionmuster der beiden *FGFR3*-Varianten für die Pathogenese von Skeletterkrankungen hat.

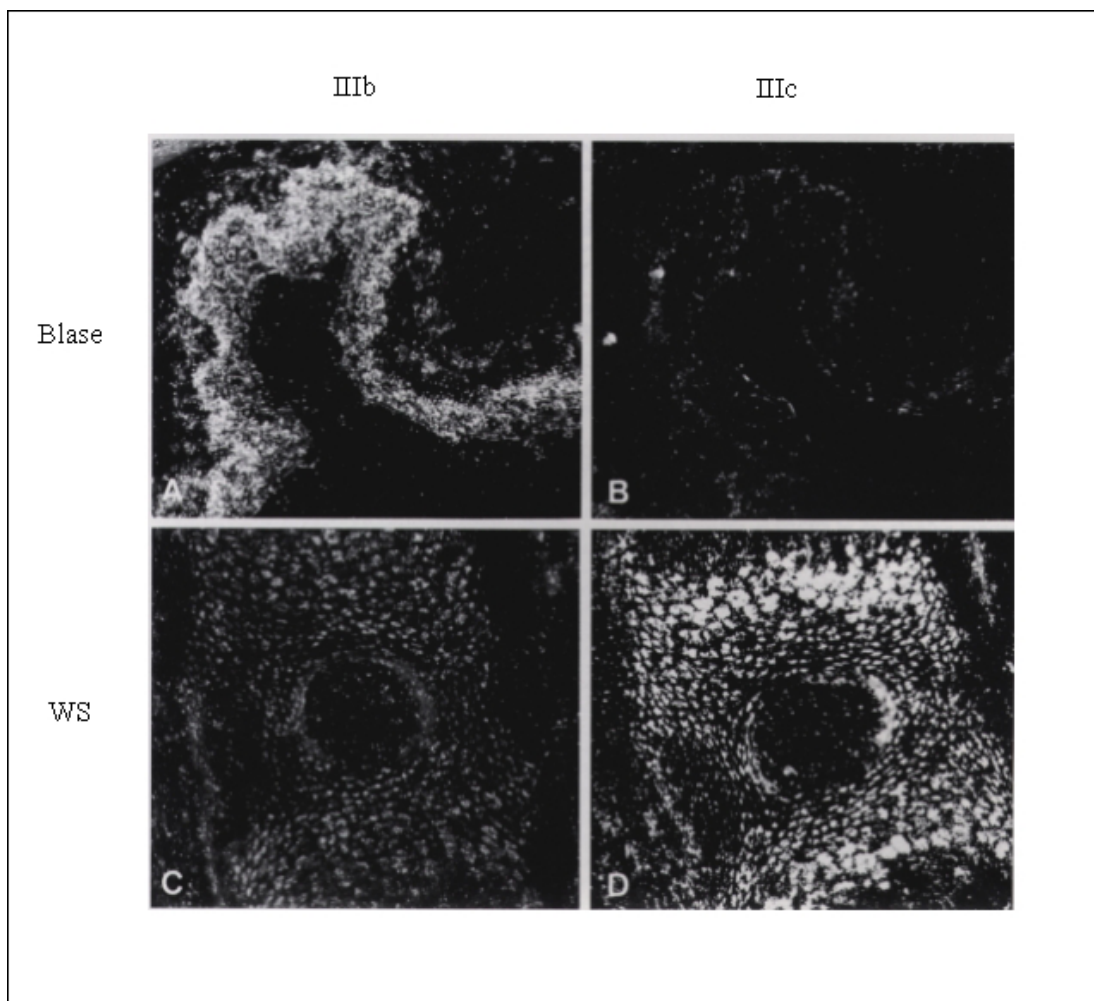
Eine Verbindung zwischen epithelialen Erkrankungen und *FGFR3*-Gendefekten konnte in zwei Fällen erbracht werden. So konnte bei einem Patienten mit Crouzon-Syndrom und Acanthosis nigricans eine Ala391Glu Konversion in der Transmembrandomäne des *FGFR3*-Gens nachgewiesen werden (Meyers et al., 1995). Acanthosis nigricans ist eine seltene Hauterkrankung, die sich in Hyperkeratose und Hyperpigmentierung äußert. Untersuchung des *FGFR3 IIIb*-Exons bei Patienten mit Acanthosis nigricans ohne Skelettbeteiligung könnten weitere Aufklärung bringen. Untersuchungen an Blasen- und Cervixkarzinomen

zeigten, dass in 30% der Fälle Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens nachgewiesen werden konnte. Darüberhinaus konnte durch semiquantitative RT-PCR nur die Expression der *FGFR3 IIIb*-Form in gesunden als auch in entartetem Gewebe nachgewiesen werden (Cappellen et al., 1999).

Dieses Ergebnis, sowie der Nachweis der *FGFR3 IIIb*-mRNA-Expression in epithelialen Geweben ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass die *FGFR3 IIIb* Variante vor allem für die Entstehung epithelialer Strukturen verantwortlich ist.



**Abb. 17:** Im Dunkelfeld aufgenommene Autoradiogramme von sich entwickelnden Mäusen hybridisiert mit spezifischen Sonden [FGFR3-IIIc: A, B, D; FGFR3-IIIb: C, E] und einer Negativkontrolle (F). Sagittale Schnitte wurden am Entwicklungstag E12 (A), E14 (B und C) und E20 untersucht. (A) Die starke Expression der IIIc-mRNA ist in der sich entwickelnden Wirbelsäule (Pfeil) sowie im sich entwickelnden ZNS zu sehen. Deutliche Expression ist auch in der Leber nachweisbar. (B) Starke Expression mit der IIIc-spezifischen Sonde ist am Tag E14 in der Wirbelsäule, in den Rippen und Extremitätenknochen, sowie in den epithelialen Strukturen des ZNS erkennbar. (C) Die FGFR3 IIIb-Expression beschränkt sich auf die epithelialen Strukturen des Magen-Darm-Traktes und der Blase (kurze Pfeile). Am Tag E20 ist schwächere, aber deutliche Expression mit der IIIc-spezifischen Sonde im Rückenmark, starke Expression in der Wirbelsäule, den Rippen und Extremitätenknochen sichtbar. Deutliche Expression ist auch in der Trachea (T) und in der Glandula submandibularis erkennbar. (E) Die IIIb-Expression beschränkt sich auf das Epithel des Magen-Darm Traktes, der Bronchien und der Blase, sowie die epithelialen Zellschichten der Epidermis. Starke Expression ist auch in den epithelialen Zellen der sich entwickelnden Barthaare zu erkennen (dicker Pfeil). (F) Die Hybridisierung einer Sense-Probe zeigt kein Signal.



**Abb. 18: Expressionsmuster von *FGFR3* in der Blase (A,B) bzw. in der Wirbelsäule (C, D) der Maus am Tag E20 der Entwicklung.**

Die *in-situ*-Hybridisierung am Tag 20.5 zeigt einen Gewebeschnitt durch einen kompletten Embryo im Bereich der Blase (A, B) bzw. der Wirbelsäule (C, D). Hybridisierung mit der IIIb-spezifischen Sonde zeigt deutliche Expression in den epithelialen Strukturen der Blase (A), nicht aber in der sich entwickelnden Wirbelsäule (C). Im Gegensatz dazu ist nach Hybridisierung mit der IIIc-spezifischen Sonde keine Expression in den epithelialen Strukturen zu erkennen (B), aber starke Expression in den Wirbelkörpern (D). Da für alle Hybridisierungen die mitgeführten "sense"-Kontrollen negativ waren, wurde auf ihre Darstellung verzichtet.

### 3.2 Isolierung und Charakterisierung von EST-Klonen aus einer humanen Chondrozyten cDNA-Bibliothek

Eine mögliche Strategie zur systematischen Identifizierung von Genen, die bei der Entwicklung, beim Wachstum und bei der Differenzierung von Knorpel und Knochen beteiligt sind, stellt die Herstellung von ESTs (expressed sequence tags) dar, d. h. der teilweisen Sequenzierung von zufällig ausgewählten cDNA-Klonen (ESTs) aus einer geeigneten cDNA-Bibliothek (Adams et al., 1991). Knorpelgewebe setzt sich aus nur wenigen in extrazellulärer Matrix eingemauerten Zellen (Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten) zusammen. Die RNA-Extraktion ist schwierig und in der Regel werden nur geringe Ausbeuten erreicht. Durch Vereinigung mehrerer Knorpelfragmente kann eine ausreichende Menge an RNA gewonnen werden. Ausgegangen wurde bei diesem EST-Ansatz von der einzigen, zur Zeit existierenden cDNA-Bank, die aus humanem, fetalem Knorpel (20. Schwangerschaftswoche bis 2. Lebensjahr) von Dr. B. Lee (Houston, Texas) hergestellt wurde. Ziel dieses Ansatzes war zunächst, durch Sequenzierung einer Anzahl von Klonen die Qualität der cDNA-Bibliothek zu beurteilen. Vorversuche hatten bereits gezeigt, dass die cDNA-Bank knorpelspezifische Gene wie z. B. Kollagen Typ II oder Kollagen Typ X enthält. Des Weiteren konnten bereits zwei Zinkfinger-Gene (Dreyer et al., 1998b; Dreyer et al., 1999) und das für die erbliche multiple Exostose verantwortliche Gen (EXT1) (Ahn et al., 1995) aus der cDNA-Bibliothek isoliert werden. Die Herstellung der cDNA-Bank erfolgte unter Verwendung eines "ZAP"-cDNA Synthese Kits (Stratagene, Heidelberg), der auf der Methode von Gubler und Hoffmann (1983) basiert. Die cDNA wurde mit Hilfe eines modifizierten oligo-dT Primers hergestellt und konnte gerichtet in einen Uni ZAP Vektor (Short et al., 1988) kloniert werden. Dieser Vektor bietet aufgrund seiner cDNA Insertionsstelle im  $\beta$ -Galaktosidase-Locus die Möglichkeit der Farbselektion von rekombinanten Phagen. Die Bestimmung des Phagentiters der cDNA-Bank ergab eine Konzentration von  $2 \times 10^8$  pfu/ml, wobei sich durch Blau/Weiß Selektion ca. 1% der Klone als nicht rekombinant erwiesen. Zur Evaluierung der cDNA-Bibliothek wurden in einer ersten Analyse 384 Klone durch Amplifikation mit vektorspezifischen T<sub>3</sub>A- und T<sub>7</sub>A-Primern auf Integratgröße untersucht. Die durchschnittliche Insertgröße betrug 550 Bp. Es wurden im Folgenden nur solche Klone bearbeitet, deren Insert mindestens 400 Bp groß war. Grundsätzlich wurden die aufgereinigten PCR-Produkte nur von ihrem 5'-Ende mit dem vektorspezifischen T<sub>3</sub>A-Primer ansequenziert, da eine Sequenzierung der PCR-Produkte mit T<sub>7</sub>A-Primer über das polyA-Ende nicht möglich

war. Zur Langzeitkonservierung wurden die untersuchten Phagen in 96 Loch-Format Platten (Costar, Bodenheim) in SM-Medium/10% DMSO überführt und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.1 Auswertung der Sequenzdaten und Homologievergleich

Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe der "Sequencher"-Software Version 3.0 (Gene Codes Corporation) editiert und Vektorsequenzanteile abgetrennt. Die Sequenzen, die mehr als 3% Leseungenauigkeit bzw. kleiner als 100 Bp waren, wurden nicht weiter bearbeitet. Zur Archivierung wurde eine Datenbank aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit sequenzierten Knorpel-ESTs mit Hilfe der "Sequencher"-Software erstellt.

Die ausgewerteten Sequenzdaten wurden auf Homologie zu bereits bekannten Nukleotidsequenzen untersucht. Diese Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms "BlastN" am "US National Center for Biotechnology Information" (NCBI, release 112, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al., 1990) gegen die "nicht-redundante"- (nr) Datenbank. Sequenzen mit einem P-Wert kleiner  $10^{-10}$  wurden als Gene mit signifikanter Homologie angesehen (Claudio et al., 1998). DNA-Sequenzen, die nach "BlastN" Analyse diese Anforderung nicht erfüllten, wurden einem Vergleich gegen die EST-Datenbank unterworfen.

Nach den Ergebnissen der Homologievergleiche lassen sich die ESTs in unterschiedliche Kategorien einteilen. Die erste Kategorie beinhaltet EST-Sequenzen, die signifikante Homologie zu cDNA-Sequenzen besitzen, die bekannten und charakterisierten Genen entsprechen. Von insgesamt 251 sequenzierten Klonen konnten 155 EST-Klone (62%) dieser Kategorie zugeordnet werden (Tab. 8.1-8.9).

In der zweiten Kategorie sind EST-Sequenzen zusammengefasst, die Homologie zu veröffentlichten cDNA-Sequenzen zeigen, über deren Funktion keine Information vorliegt. Es handelt sich dabei zum Teil um PAC-, BAC- oder Cosmid-Sequenzen (Tabelle 9), zum Teil sind es nicht weiter charakterisierte cDNA-Sequenzen (Tabelle 10). In diese Klasse konnten 34 EST-Klone (13%) eingeordnet werden.

Die dritte und vierte Kategorie umfassen 36 EST-Klone (15%), die nach Vergleich mit der nr-Datenbank Homologien mit einem P-Wert größer  $10^{-10}$  aufzeigen, d. h. sie besitzen keine signifikante Homologie zu bekannten Sequenzen. Sie wurden einem Vergleich gegen die EST-Datenbank unterworfen. In der dritte Kategorie sind 25 Klone (10%) zusammengefasst die nach Vergleich mit der EST-Datenbank signifikante Homologien zeigen (Tab. 11 und

Tab. 12). Die vierte Kategorie beinhaltet 11 EST-Klone (4,5%) die auch mit der EST-Datenbank keine Sequenzübereinstimmungen erkennen ließen. Diese EST-Klone sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Der fünften Kategorie wurden Klone zugeordnet, die nicht weiter bearbeitet wurden. Es handelt sich dabei um fünf Klone die Homologie zu repetitiven Sequenzen zeigen, sowie 21 Klone mit verschiedensten Sequenzunregelmässigkeiten, wie z. B. fehlender Vektor-Linker Anteile.

### **3.2.1.1 EST-Klone mit Homologie zu bekannten Genen**

155 EST-Klone (62%), die Homologie zu bekannten Genen zeigen, lassen sich entsprechend ihrer Funktion in neun Gruppen einteilen (Tab. 8.1-8.9). In Tab. 8.1 sind 12 ESTs (4,7%), die Homologie zu Proteinen der extrazellulären Matrix zeigen, zusammengefasst. Die Tatsache, dass fünf unabhängige EST-Klone aus der cDNA-Bank isoliert werden konnten, die Teilen der Typ II Kollagen-cDNA entsprechen, zeigt, dass die cDNA-Bibliothek das spezifische Expressionsmuster von Knorpel widerspiegelt. Der Nachweis weiterer knorpelspezifischer Gene wie Osteonektin, Fibronectin und Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) bestätigt diese Annahme. Tabelle 8.2 fasst die zahlenmässig umfangreichste Gruppe verwandter cDNAs zusammen. Es handelt sich um EST-Klone, die Homologie zu Genen zeigen, die an der Translation beteiligt sind. Die weiteren Gruppen fassen ESTs zusammen die Homologie zu Proteasen, Membranproteinen, Cytoskelettproteinen, mitochondrialen Proteinen besitzen bzw. cDNAs die an verschiedenen Stoffwechselprozessen bzw. an der Transkription beteiligt sind (Tab. 8.3-8.8). In Tabelle 8.9 sind ESTs zusammengefasst, die Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion besitzen, die aber aufgrund geringen Auftretens nicht in einzelne funktionelle Einheiten aufgeteilt wurden.

**Tabelle 8.1**

**Zusammenfassung aller EST-Klone, die Homologie zu Proteinen der extrazellulären Matrix zeigen.**

Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P -Wert	% Übereinstimmung
Efc78	223	Human mRNA for alpha-1 type II collagen	X16468	$e^{-122}$	100
Efc94	305	Human mRNA for alpha-1 type II collagen	X16468	$e^{-162}$	98
Efc117	171	Human mRNA for alpha-1 type II collagen	X06268	$2e^{-90}$	99
Efc131	367	Human mRNA for alpha-1 type II collagen	X06268	0.0	97
Efc157	704	Human mRNA for alpha-1 type II collagen	X06268	0.0	98
Efc38	589	human fibronectin (fn) 3' coding region	K00799	0.0	99
Efc197	228	Human mRNA for fibronectin	X02761	$e^{-109}$	97
Efc48	430	Homo sapiens cartilage oligomeric matrix protein (COMP) mRNA	NM_000095.1	0.0	98
Efc51	261			$e^{-140}$	99
Efc54	587	Human SPARC/osteonectin mRNA	J03040	0.0	98
Efc107	309	Human link protein mRNA, complete cds	U43328	$1e^{-65}$	87
Efc 252	353	Homo sapiens hexabrachion (HXB) mRNA	M55618	$e^{-119}$	98

Die Größe (in Basenpaaren) umfasst die Anzahl der sequenzierten Basen und stellt nicht die tatsächliche Insertgröße dar. Das gilt für alle nachfolgenden Tabellen.

**Tabelle 8.2**

**Zusammenfassung aller EST-Klone mit Homologie zu cDNAs die an der Translation beteiligt sind**

Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P -Wert	% Übereinstimmung
Efc149	288	Human cyclophilin B (hCyPB) mRNA	M60857	$e^{-159}$	99
Efc 44	260	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	$e^{-142}$	99
Efc 91	141	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	$8e^{-74}$	100
Efc 99	312	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	$e^{-120}$	95
Efc 101	148	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	$8e^{-68}$	100
Efc 132	594	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	0.0	99
Efc 137	494	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	0.0	99
Efc 208	275	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	$e^{-153}$	100
Efc 217	241	Human elongation factor EF-1-alpha gene	X16869	0.0	99
Efc19	385	H.sapiens mRNA for elongation factor-1-gamma	Z1153	$e^{-164}$	92
Efc204	448	H. sapiens eukaryotic translation elongation-1-delta	NM_001960.1	0.0	99
Efc216	169	H.sapiens mRNA for elongation factor 2	Z11692	$5e^{-84}$	98
Efc232	62	H.sapiens mRNA for elongation factor 2	Z11692	$3e^{-27}$	100
Efc214	366	Homo sapiens putative translation initiation factor	AF100737	0.0	99
Efc40	298	Human scar protein mRNA	M22146	$e^{-165}$	99
Efc2	483	Human ribosomal protein L23a mRNA	U43701	0.0	98
Efc188	477	Human ribosomal protein L23a mRNA	U43701	0.0	98



Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P-Wert	% Übereinstimmung
Efc3	392	Human ribosomal protein S25 mRNA	M64716	0.0	99
Efc153	343	Human ribosomal protein S25 mRNA	M64716	0.0	99
Efc159	348	Human ribosomal protein S25 mRNA	M64716	$e^{-159}$	95
Efc4	192	Human mRNA for ribosomal protein S11	X06617	$2e^{-07}$	91
Efc23	289	Human mRNA for ribosomal protein S11	X06617	$7e^{-91}$	88
Efc61	359	Human mRNA for ribosomal protein S11	X06617	0.0	99
Efc14	159	H.sapiens mRNA for ribosomal protein L31	X69181	$1e^{-35}$	87
Efc15	199	Human ribosomal protein 15 mRNA	U14966	$e^{-65}$	87
Efc16	270	Homo sapiens ribosomal protein L30 mRNA	M94314	$2e^{-75}$	86
Efc18	450	Human ribosomal protein L3 mRNA, 3' end	M90054	$e^{-117}$	85
Efc33	354	Human ribosomal protein L3 mRNA, 3' end	M90054	$e^{-101}$	89
Efc114	525	Human ribosomal protein L3 mRNA, 3' end	M90054	0.0	98
Efc226	296	Human ribosomal protein L3 mRNA, 3' end	M90054	$e^{-156}$	98
Efc20	197	Human ribosomal protein L35 mRNA	U12465	$3e^{-67}$	90
Efc26	240	Human ribosomal L5 protein mRNA	U76609	$3e^{-44}$	88
Efc178	161	Human ribosomal L5 protein mRNA	U76609	$2e^{-90}$	100
Efc28	185	H.sapiens mRNA for ribosomal protein S18	X69150	$6e^{-10}$	89
Efc50	351	Human ribosomal protein L28 mRNA	U14969	$e^{-171}$	98
Efc55	284	Human ribosomal protein L28 mRNA	U14969	$e^{-148}$	98
Efc52	487	Human L23 mRNA for putative ribosomal protein	X53777	0.0	99
Efc61	359	Human mRNA for ribosomal protein S11	X06617	0.0	99
Efc65	337	H. sapiens ribosomal protein L13 (RPL13) mRNA	NM_000977.1	0.0	99
Efc68	236	Human acidic ribosomal phosphoprotein P2 mRNA	M17887	$e^{-128}$	99
Efc73	414	Homo sapiens ribosomal protein S2 (RPS2) mRNA	NM_002952.1	0.0	99
Efc243	226	Homo sapiens ribosomal protein S2 (RPS2) mRNA	NM_002952.1	$e^{-109}$	98
Efc79	332	Human mRNA for ribosomal protein L32	X03342	$e^{-170}$	97
Efc122	330	Human mRNA for ribosomal protein L32	X03342	$e^{-174}$	97
Efc82	114	H. sapiens ribosomal protein L10a (RPL10A) mRNA	NM_007104.1	$9e^{-58}$	100
Efc87	549	Human ribosomal protein S16 mRNA	M60854	0.0	100
Efc154	594	Human ribosomal protein S16 mRNA	M60854	0.0	99
Efc183	278	Human ribosomal protein S16 mRNA	M60854	$e^{-155}$	100
Efc96	284	Human ribosomal protein S17 mRNA	M13932	$e^{-149}$	98
Efc113	317	H. sapiens ribosomal protein S21 (RPS21) mRNA	NM_001024.1	$e^{-174}$	100
Efc115	484	Homo sapiens ribosomal protein S20	L06498	0.0	99
Efc213	490	Homo sapiens ribosomal protein S20	L06498	0.0	98
Efc227	259	Homo sapiens ribosomal protein S20	L06498	$e^{-128}$	96
Efc142	390	Human acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA	M17885	0.0	98
Efc250	402	Human acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA	M17885	0.0	99
Efc145	77	H. sapiens ribosomal protein L10a (RPL10A) mRNA	NM_007104.1	$1e^{-21}$	92
Efc146	595	Human mRNA for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (hnRNP D)	D55672	0.0	95
Efc147	295	Human ribosomal protein S6 mRNA	J03537	$e^{-144}$	96
Efc150	329	Human mRNA for HL23 ribosomal protein	X55954	$e^{-175}$	98
Efc158	355	Homo sapiens ribosomal protein L18a	L05093	0.0	100
Efc165	333	Homo sapiens ribosomal protein L18a		0.0	98
Efc167	462	Human ribosomal protein L7a (surf 3)	M36072	0.0	95
Efc248	232	H. sapiens ribosomal protein L7a (RPL7A) mRNA	NM_000972.1	$e^{-115}$	99
Efc182	339	H. sapiens ribosomal protein S23 (RPS23) mRNA	NM_001025.1	0.0	99
Efc202	303	H.sapiens mRNA for ribosomal protein L37a	X66699	$e^{-169}$	100
Efc212	450	Human ribosomal protein S10 mRNA	U14972	0.0	99
Efc215	279	Human ribosomal protein S3a mRNA	M77235	$e^{-146}$	98
Efc253	384	Homo sapiens ribosomal protein L30 mRNA	L05095	0.0	99

**Tabelle 8.3**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Genen zeigen, die an verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt sind.**

Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P-Wert	% Übereinstimmung
Efc10	300	Homo sapiens H3 histone, family 3B (H3.3B) (H3F3B) mRNA	NM_005324	$7e^{-98}$	92
Efc185	206	H.sapiens hH3.3B gene for histone H3	.1 Z48950	$e^{-110}$	100
Efc62	550	Human aldolase A mRNA	M11560	0.0	99
Efc84	518	Human mRNA for lactate dehydrogenase-A	X02152	0.0	99
Efc170	517	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SAT) mRNA	NM_002970	0.0	99
Efc81	249	Human ferritin H chain mRNA	M11146	$e^{-138}$	100
Efc110	492	Human ferritin H chain mRNA	M11146	0.0	97
Efc123	491	Human ferritin H chain mRNA	M11146	0.0	96
Efc136	366	Human ferritin H chain mRNA	M11146	0.0	100
Efc155	166	Human ferritin H chain mRNA	M11146	$1e^{-11}$	90
Efc160	614	Homo sapiens hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A	NM_000182.1	0.0	99
Efc177	151	Homo sapiens hydroxymethylbilane synthase gene	M95623	$7e^{-80}$	100
Efc207	231	H.sapiens SOD-2 gene for manganese superoxide dismutase	X65965		98
Efc228	127	Homo sapiens lipoprotein receptor associated protein (LRPAP1) gene	AF035766	$1e^{-56}$	97
Efc231	182	Human chitinase precursor	U58514	$2e^{-83}$	99
Efc236	177	Human smooth muscle myosin alkali light chain (MLC 1sm) mRNA	M22920	$2e^{-68}$	93
Efc237	265	Human geranylgeranyl transferase type II beta-subunit mRNA	U49245	$e^{-144}$	99
Efc246	216	Homo sapiens cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene	M83094	$1e^{-97}$	95
Efc247	299	Homo sapiens cold inducible RNA-binding protein (CIRBP) mRNA	NM_001280.1	$e^{-141}$	98
Efc251	483	Homo sapiens chromosome 3q13 beta-1,4-galactosyltransferase mRNA	AF038662	0.0	99

Bei den verschiedenen Stoffwechselprozessen handelt es sich u. a. um DNA-Metabolismus, Fettsäuremetabolismus, Metabolismus der glatten Muskulatur, Eisenstoffwechsel.

**Tabelle 8.4**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Proteinen des Cytoskeletts zeigen**

Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P -Wert	% Übereinstimmung
Efc13	404	Homo sapiens ARP1 (actin-related protein 1, yeast) homolog A (centractin alpha) (ACTR1A) mRNA	NM_005736.	e <sup>-140</sup>	90
Efc17	220	Human vinculin mRNA	M33308	8e <sup>-90</sup>	96
Efc118	320	Homo sapiens actin, gamma 1 (ACTG1) mRNA	NM_001614.1	e <sup>-161</sup>	96
Efc156	225	Homo sapiens gamma-filamin (ABPL) mRNA	AF089841	2e <sup>-93</sup>	93

**Tabelle 8.5**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Proteasen besitzen**

Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P – Wert	% Übereinstimmung
<i>Efc</i> 29	135	Homo sapiens proteasome subunit HSPC mRNA	AF054185	7e <sup>-22</sup>	91
	507	Homo sapiens proteasome subunit HSPC mRNA	AF054185	0.0	99
	227	Homo sapiens mRNA for 26S proteasome subunit p28	AB009619	e <sup>-136</sup>	97
Efc 119					
Efc239					
Efc 45	520	Human ubiquitin carrier protein (E2-EPF) mRNA	M91670	0.0	97
Efc186	638	Human mRNA for pro-cathepsin L (major excreted protein MEP)	X12451	0.0	98
Efc195	281	Human mRNA for collagenase	X05231	e <sup>-154</sup>	100
Efc45	520	Human ubiquitin gene	U49869	0.0	97
Efc104	176	Human ubiquitin gene	U49869	1e <sup>-94</sup>	100
Efc101	395	Human ubiquitin gene	U49869	0.0	97
Efc184	269	Human ubiquitin gene	U49869	4e <sup>-74</sup>	87
Efc187	522	Human ubiquitin gene	U49869	0.0	97
Efc221	259	Human ubiquitin mRNA, 3' end	M10939	0.0	97

**Tabelle 8.6**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Membranproteinen zeigen**

Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P – Wert	% Übereinstimmung
Efc18 1 Efc201	214 482	Human MHC class I HLA-A2 gene Human MHC class I HLA-B44 mRNA	K02883 M15470	$e^{-111}$ 0.0	99 99
Efc8 Efc46 Efc126	258 119 214	Human 78 kdalton glucose-regulated protein gene Human 78 kdalton glucose-regulated protein gene Human 78 kdalton glucose-regulated protein gene	M19645 M19645 M19645	$6e^{-20}$ $1e^{-35}$ $1e^{-94}$	82 98 94
Efc80	107	Human mRNA for clathrin coat assembly protein	D63643	$2e^{-39}$	92
Efc89	362	Human guanine nucleotide exchange factor p532 mRNA	U50078	$e^{-179}$	97
Efc13 0	304	Human mRNA for heme oxygenase	X06985	$e^{-160}$	98
Efc174	86	Homo sapiens VAMP-associated protein B	AF086628	$9e^{-38}$	100
Efc191	528	Homo sapiens UCP2 mRNA	U82819	$e^{-135}$	100
Efc219	309	H.sapiens mRNA for surface glycoprotein	Z50022	$e^{-160}$	98
Efc222	246	Human lysosomal membrane glycoprotein	M58485	$e^{-128}$	99

**Tabelle 8.7**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Genen aufzeigen, die an der Transkription beteiligt sind**

Klon	Größe (Bp)	Putative Orthologe Gen	Accession No.	BlastN P – Wert	% Übereinstimmung
Efc12	262	Homo sapiens activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4)	NM_001675.1	$1e^{-86}$	89
Efc66	508	H.sapiens NFkB1 gene, exon 24	Z47744	0.0	98
Efc206	499	Homo sapiens hXBP-1 transcription factor DNA	L13850	0.0	99
Efc41	517	H.sapiens max gene	X66867	0.0	98
Efc106	455	Homo sapiens scaffold attachment factor	AF068846	0.0	99
Efc151	603	Homo sapiens nuclear receptor coactivator NCoA-62 mRNA	AF045184	0.0	94
Efc163	210	Homo sapiens nucleophosmin phosphoprotein	U89321	$e^{-110}$	99
Efc234	296	Human nuclear corepressor KAP-1 (KAP-1) mRNA	U78773	$e^{-163}$	99

**Tabelle 8.8**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu mitochondrialen Genen besitzen**

Klon	Größe (Bp)	Putative Ortholge Gen	Accession No.	Blast NP-Wert	% Übereinstimmung
Efc 1	544	Human mitochondrial 16S ribosomal RNA	V00710	0	98
Efc 47	579	H. sapiens mitochondrial genome	V00710	0.0	99
Efc 140	501	H.sapiens mitochondrial DNA, comple genome	X93334	0.0	98
Efc 176	548	H.sapiens mitochondrial DNA, comple genome	X93334	0.0	99
Efc 240	256	Human mitochondrion, complete genome	J01415	$e^{-140}$	99
Efc 245	75	H.sapiens mitochondrial genome	X62996	$5e^{-36}$	100

**Tabelle 8.9**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu Genen mit sonstigen Funktionen besitzen**

Klon	Größe (Bp)	Putative Ortholge Gen	Accession No.	Blast NP-Wert	% Übereinstimmung
Efc39	291	Homo sapiens mRNA for 14-3-3gamma,	AB024334	$e^{-163}$	100
Efc56	530	Homo sapiens mRNA for Epsilon COP	AJ131182	0.0	99
Efc92	496	Homo sapiens cGMP-specific phosphodiesterase (PDE9A2) mRNA	AF048837	0,0	99
Efc144	484	Human p66shc (SHC) mRNA	U73377	0.0	98
<b>Efc30</b>	331	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1) mRNA	NM_003463.1	$2e^{-83}$	91
Efc161	454	Human guanylate kinase (GUK1) mRNA	L76200	0.0	97
<b>Efc31</b>	181	Human atrial natriuretic factor gene (Hormonähnlich)	M54947	$3e^{-64}$	91
Efc69	466	Human prothymosin alpha mRNA (Hormonähnlich)	M14630	$8e^{-64}$	98
Efc88	305	Homo sapiens jun dimerization protein gene	AF111167	$8e^{-66}$	100
Efc198	467	Homo sapiens clathrin, heavy polypeptide-like 2 (CLTCL2) mRNA	NM_004859.1	0.0	99
Efc152	323	Homo sapiens mRNA for EDF-1 protein	AJ005259	$e^{-172}$	98
Efc192	420	H.sapiens mRNA for melanoma growth regulatory protein MIA	X75450	0.0	100
Efc238	181	Human mRNA for cyclin I	D50310	$4e^{-91}$	98

**3.2.1.2 EST-Klone mit Homologie zu Sequenzen unbekannter Funktion**

In den letzten Jahren kam es vor allem aufgrund des humanen Genomprojekts zur vermehrten Sequenzierung von PAC-, BAC- bzw. Cosmidsequenzen und zur Veröffentlichung dieser Sequenzen in Datenbank. Neben der reinen Sequenzinformation liegen zum Teil weitere Informationen bezüglich der chromosomalen Lokalisation aber auch möglicher transkribierter Bereiche vor. In Tabelle 9 sind 11 EST-Klone zusammengefasst, die Homologie zu solchen Sequenzen zeigen. Bei 7 EST-Klonen liegen Informationen bezüglich der chromosomalen Lokalisation vor. Die Homologie der EST-Klone Efc83, Efc193, Efc200 und Efc224 liegt in Bereichen, die als mögliche transkribierte Abschnitte beschrieben werden. Funktionelle Angaben über die möglichen Gene liegen nicht vor.

**Tabelle 9**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu BACs, PACs bzw. Cosmiden besitzen**

<b>Klon</b>	<b>Größe (Bp)</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Accession No.</b>	<b>BlastN P-Wert</b>	<b>% Übereinstimmung</b>
Efc 6	99	Homo sapiens cosmid clone U169D2 from Xp22.1-22.2	U72788.1	1e <sup>-07</sup>	96
Efc36	129	Homo sapiens chromosome 19, cosmid R26529	AC005551	5e <sup>-38</sup>	100
Efc76	449	Homo sapiens clone NH0556H17	AC005237	0.0	99
Efc83	230	Homo sapiens BAC clone NH0414C23 from Y	AC006157	e <sup>-122</sup>	100
Efc128	457	Homo sapiens clone NH0556H17	AC005237	0.0	98
Efc134	463	Homo sapiens chromosome 4 clone C0481P14 map 4p16	AC006160	0.0	100
Efc179	411	Human DNA sequence from clone 554C12 on chromosome 22	AL080242.11	e <sup>-121</sup>	99
Efc193	541	Homo sapiens clone UWGC:y54c125 from 6p21	AC006165	0.0	98
Efc196	510	Homo sapiens clone NH0449G16	AC007684	0.0	93
Efc200	555	Homo sapiens chromosome Y, clone 47511	AC004474	0.0	99
Efc224	220	Homo sapiens PAC RPC14-613B23	AC006059	0.0	99

In Tabelle 10 sind 23 EST-Klone aufgelistet, die Homologie zu cDNA-Sequenzen unbekannter Funktion besitzen. Teilweise gibt es Informationen über chromosomale Lokalisation bzw. über das Expressionsmuster der cDNA-Sequenzen. Funktionelle Angaben über diese cDNAs liegen nicht vor. Bis auf eine Ausnahme zeichnen sich alle EST-Klone durch Homologie zu humanen cDNA-Sequenzen aus. Lediglich der Klon Efc34 zeigt

deutliche Sequenzübereinstimmung zu einem EST-Klon isoliert aus einer murinen Cochlea-cDNA-Bibliothek. Die Charakterisierung dieses Klons wird unter 3.2.3 näher beschrieben.

**Tabelle 10**

**Zusammenfassung aller ESTs, die Homologie zu verschiedenen cDNAs besitzen.**

<b>Klon</b>	<b>Größe (Bp)</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Accession No.</b>	<b>P-Wert</b>	<b>% Übereinstimmung</b>
Efc7	169	Human mRNA for KIAA0102	D14658	4e <sup>-63</sup>	93
Efc22	353	Homo sapiens mRNA for KIAA0721 protein	AB018264	8e <sup>-94</sup>	86
Efc25	330	Human mRNA for KIAA0132 gene	D50922	e <sup>-140</sup>	95
Efc34	536	M.musculus partial cochlear mRNA (clone 28D2)	Z78160	3e <sup>-23</sup>	83
Efc37	275	H.sapiens mRNA for 23 kD highly basic protein	X56932	e <sup>-153</sup>	100
Efc42	520	Homo sapiens mRNA, chromosome 1 specific transcript KIAA0493	AB007962		94
Efc53	114	Homo sapiens CGI-126 protein mRNA, complete cds	AF151884	4e <sup>-63</sup>	100
Efc64	474	Homo sapiens mRNA	HSM800685	0.0	100
Efc90	281	Homo sapiens clone 23698 mRNA sequence	AF052094	e <sup>-157</sup>	100
Efc111	250	Human GOS2 protein gene	M69199	e <sup>-125</sup>	97
Efc116	311	Homo sapiens full length insert cDNA clone ZD67D08	AF086370	e <sup>-160</sup>	98
Efc120	219	Homo sapiens RAD21 (S. pombe) homolog (RAD21) mRNA	NM_006265.1	e <sup>-116</sup>	100
Efc135	611	Homo sapiens mRNA for KIAA0947 protein, partial cds	AB023164	0.0	100
Efc139	202	Homo sapiens HSPC025 mRNA, complete cds	AF083243	e <sup>-104</sup>	100
Efc143	298	Homo sapiens mRNA for GANP protein	AJ010089.1	e <sup>-162</sup>	99
Efc164	147	Homo sapiens brain-specific STE20-like protein kinase 3 (STK3) mRNA	AF083420	2e <sup>-77</sup>	100
Efc175	120	Human mRNA for KIAA0068 gene	D38549	2e <sup>-61</sup>	100
Efc194	263	Human mRNA for KIAA0144 gene	D63478	e <sup>-146</sup>	100
Efc203	260	Homo sapiens CAG repeat domain (ERDA3), mRNA	NM_005878.1	4e <sup>-99</sup>	96
Efc223	375	Homo sapiens clone 23596 mRNA sequence	AF038203	0.0	100
Efc242	297	Homo sapiens mRNA for KIAA0765 protein	AB018308	e <sup>-164</sup>	99
Efc244	459	Homo sapiens HsGCN1 mRNA, partial cds	U77700	0.0	99
Efc249	215	Human (chromosome 3p25) membrane protein mRNA	L09260	e <sup>-101</sup>	96

Die Auswertung der EST-Sequenzen ergab, dass 36 sequenzierte EST-Klone (15%) keine Homologie zu Genen der "non-redundant"-Datenbank besitzen. Diese Klone wurden auf Homologie zu Einträgen der EST-Datenbank untersucht. 25 EST-Klone zeigen Sequenzidentität zu bereits veröffentlichten EST-Sequenzen (Kategorie 3), 11 EST-Klone zeigen auch nach Vergleich gegen die EST-Datenbank keine Homologie an (Kategorie 4, siehe 3.2.1.3).

Die gewebespezifische Verteilung der ESTs die in Kategorie 3 zusammengefasst wurden ist in Tabelle 11 dargestellt. Deutlich wird, dass die meisten EST-Klone "in-silico" in zahlreichen verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen werden konnten.

**Tabelle 11**  
**Gewebeverteilung der EST-Klone, die Homologie zu Sequenzen der EST-Datenbank zeigen.**

Klon	Insert-größe	"in silico"-Expressionsmuster														
		Gehirn	Darm	Magen	Niere	Lunge	Pankreas	Uterus	Plazenta	Hoden	Leber	Milz	Herz	Knochen	Cochlea	Fötus
Efc5	473															
Efc21	300															
Efc24	220															
Efc27	153															
Efc35	171															
Efc43	112															
Efc49	131															
Efc58	244															
Efc59	249															
Efc77	225															
Efc112	425															
Efc126	405															
Efc162	249															
Efc166	216															
Efc168	474															
Efc172	396															
Efc189	125															
Efc190	109															
Efc199	217															
Efc205	559															
Efc210	210															
Efc220	379															
Efc225	220															
Efc235	304															
Efc241	437															

Grau unterlegte Felder zeigen an, dass der EST-Klon in dem entsprechendem Gewebe in der EST-Datenbank als auch in der UniGene-Datenbank nachgewiesen werden konnte. Bei schwarz unterlegten Feldern konnte der Klon nur in der UniGene-Datenbank, bei hellgrau unterlegten Feldern nur in der EST-Datenbank nachgewiesen werden.



Mit Hilfe des UniGene Programms (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) wurden diese EST-Sequenzen weiter analysiert. UniGene ist eine Datenbank, in der überlappende EST-Klone automatisch zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Jede UniGene-Gruppe enthält Sequenzen, die vermutlich ein einziges Gen repräsentieren. Weitere Informationen bezüglich der chromosomalen Lokalisation und des exprimierenden Gewebes sind angegeben. Wie aus Tabelle 5 hervorgeht konnte mit Hilfe dieser Datenbank die Sequenzinformation aller untersuchter EST-Klone verlängert werden. Die Klone Efc21 und Efc235 konnten um etwa 350 Bp verlängert und die übrigen EST-Klone auf über 1000 Bp ausgedehnt werden.

Die erweiterten Sequenzdaten wurden erneut auf Homologie zu bereits bekannten Nukleotid- und auch Proteinsequenzen untersucht. Für den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit Sequenzen aus Proteindatenbanken wurde das Computerprogramm "BlastX" verwendet.

Von den 25 untersuchten EST-Sequenzen konnten sechs eindeutig bekannten Genen zugeordnet werden. Die EST-Klone waren ausnahmslos im 3'-untranslatierten Bereich der entsprechenden Gene lokalisiert, sodass die Zuordnung nur aufgrund der Sequenzverlängerungen möglich wurde. Es handelt sich dabei um die Klone Efc24 (High density lipoprotein binding protein), Efc35 (Spleißfaktor), Efc49 (ATP-bindende Cassette), Efc77 (Translations-Initiations Faktor) und Efc199 (Collagen Typ 9). Die Klone Efc225, Efc59 und Efc168 zeigen auf Nukleotid- bzw. auf Proteinebene eine signifikante Homologie zu humanen, nicht weiter charakterisierten cDNA- bzw. Aminosäuresequenzen.

Der Klon Efc 190 zeigt auf Nukleotidebene eine deutliche Homologie zu der im Huhn gefundenen p52-pro-apototischen Protein mRNA auf (Abb. 19). Die Aminosäuresequenz des Leserahmens +2 bzw. +3 zeigt zu dem entsprechenden Protein eine Homologie zwischen 37% und 100% (Abb. 20).

---

```

gb|AF029071|AF029071 Gallus gallus p52 pro-apototic protein mRNA, complete cds
Length = 1768

Score = 143 bits (72), Expect = 1e-31
Identities = 154/180 (85%), Gaps = 1/180 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 692 gatcagatagaagttgttttagagctaatgctattgcaagccttttcttggtgactgga 751
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1090 gatcagatggaagttgtttatcgagcaaatggtattgcaagtctctttgctggacagca 1149

Query: 752 gcacaagctatgtatcaaggattctggagtgaagcagatgttactcgaccttggctctcc 811
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1150 gcgcaagcaatgtatcaaggattctggaatgaagcagacgtgactcgtcctttgtatca 1209

Query: 812 caggctgtgatcacagatggaaaatacttttctttttctgctaccagctaaatacttt 871
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1210 caggctgtagtacagatggaaaatac-tttgctttcttttaccagctaaatacttt 1268

Score = 58.0 bits (29), Expect = 6e-06
Identities = 62/72 (86%), Gaps = 1/72 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 5 aagtacatggtttaccgacagaccttgcgcgctgantgccgaccgctggtaccagtactt 64
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 277 aagtacatggtgtaccgcaaacctt-cgacctcaacgccgaccgctggtaccggagctt 335

Query: 65 caccaagaccgt 76
      ||| | | | | | | | | |
Sbjct: 336 caccaagaccgt 347

Score = 44.2 bits (22), Expect = 0.089
Identities = 34/38 (89%)
Strand = Plus / Plus

Query: 605 gcagatccttgctgtttacggtcacaccagtttcatct 642
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1003 gcagatccatgctgctatggccacaccagtttcatct 1040

Score = 44.2 bits (22), Expect = 0.089
Identities = 55/66 (83%)
Strand = Plus / Plus

Query: 968 tgtgaaaggttttaatatgatgatgttttacttcagatagttcacttttactgaaatagacc 1027
      ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 1365 tgtgagaggttttaatatgatgaagttctgcttcagttggttggttttctgtaaatagacc 1424

Query: 1028 aaaaga 1033
      ||| | | | |
Sbjct: 1425 aaaaga 1430

```

**Abb. 19: DNA-Sequenzvergleich des EST-Klons Efc 190 mit der EST-Datenbank.**

```

gi|2599492 (AF029071) p52 pro-apototic protein [Gallus gallus]
      Length = 465

      Score = 246 bits (621), Expect(3) = 1e-89
      Identities = 110/158 (69%), Positives = 134/158 (84%)
      Frame = +2

Query: 377 GEEIIPRGHRRRIDDLRYQIDDKPNNQIRISKQLAEFVPLDYSVPIEIPITKCKPKDKLP 556
      GEE++ GHR+GR+D +R+QIDDKP+ QIR+ KQL E VPL+ + ++P + KP KLP
Sbjct: 247 GEEVVVHGHRKGRVDPVRFQIDDKPHLQIRVPKQLPEIVPLESDLG-DVPVVDHKPSKLP 305

Query: 557 LFKRQYENHIFVGSKTADPCCYGHQTQFHLLPDKLRRELLRQNCADQIEVVFRANAIASL 736
      LFK+QYEN +F+GSK ADPCCYGHQTQFHL+PDKL+R+R + N DQIEVV+RAN IASL
Sbjct: 306 LFKKQYENKVFIGSKVADPCCYGHQTQFHLLPDKLKRQRFI IANLEDQIEVVYRANGIASL 365

Query: 737 FAWTGAQAMYQGFWSEADVTRPFVVSQAVITDGKYFSFF 850
      FAWT AQAMYQGFW+EADVTRPFVVSQAV+TDGKYF+FF
Sbjct: 366 FAWTAAQAMYQGFWNEADVTRPFVVSQAVVTDGKYFAFF 403

      Score = 106 bits (263), Expect(3) = 1e-89
      Identities = 47/65 (72%), Positives = 54/65 (82%)
      Frame = +3

Query: 840 FFFFCYQLNLTALTQADQNNPRKNICWGTQSKPLYETIEDNDVKGFNDVLLQIVHFLL 1019
      F FFCYQLNLTALT + Q + RKNICWGT SKPLY+ +ED V+GFND+VLLQ+V FLL
Sbjct: 400 FAFFFCYQLNLTALTAETIQSSRKNICWGTDSKPLYDVVEDGDSVRFNDEVLLQLVGFLL 459

Query: 1020 NRPKE 1034
      NRPKE
Sbjct: 460 NRPKE 464

      Score = 37.9 bits (86), Expect(2) = 0.005
      Identities = 16/21 (76%), Positives = 18/21 (85%)
      Frame = +3

Query: 30 FALXADRWYQYFTKTVFLSGL 92
      FAL ADRWY+ FTKTVF+ GL
Sbjct: 88 FALNADRWYRSFTKTVFPVGL 108

      Score = 24.3 bits (51), Expect(2) = 0.005
      Identities = 9/9 (100%), Positives = 9/9 (100%)
      Frame = +2

Query: 5 KYMVYPQTF 31
      KYMVYPQTF
Sbjct: 80 KYMVYPQTF 88

      Score = 21.6 bits (44), Expect(3) = 1e-89
      Identities = 13/35 (37%), Positives = 17/35 (48%)
      Frame = +3

Query: 183 LXQEHFYLXXXXXXXXXXYBESEVISLPFLDQLVSTL 287
      L QE +Y Y + + PFL QLV+S+L
Sbjct: 185 LLQESYY-QNKKRPFLYRDQHTPAPFLTQLVSSL 218

```

**Abb. 20: Peptidsequenzvergleich des EST-Klone Efc190 mit BLASTX.**

Bei sechs Klonen (Efc5, Efc58, Efc126, Efc172, Efc210 und Efc220) war auf Nukleotidebene keine Homologie zu erkennen, während sie auf Proteinebene schwache Homologie (zwischen 26% und 58%) zu nicht-humanen Proteinen aufwiesen. Aufgrund der Sequenzverlängerung konnte gezeigt werden, dass die Klone Efc162 und Efc241 repetitive Sequenzabschnitte beinhalten. Bei acht (Efc21, Efc27, Efc43, Efc112, Efc166, Efc189, Efc205, Efc235) der 25 untersuchten EST-Klone konnte auch nach Sequenzverlängerung keine Homologie erkannt werden.

Eine chromosomale Lokalisation von 24 der 25 EST-Klone war möglich. Die chromosomale Lokalisation der Klone Efc5, Efc24, Efc59 und Efc77 war nicht eindeutig, sie wurden verschiedenen chromosomalen Loci zugeordnet.

Tabelle 12

Übersicht über die durch UniGene-Analyse und anschließende Homologievergleiche gewonnenen Erkenntnissen

Klon	Größe	UniGene-Cluster	mit UniGene ermittelte Seq.-länge	mögliche chrom. Lokalisation	Homologievergleich mit BlastN	Homologievergleich mit BlastX
Efc5	473	Hs.234972	2486	1, 19	keine Homologie	CAB45750.1: humanes, hypothetisches Protein, Ähnlichkeit zu C. elegans MO4G12 E-Wert: 1e-41, Identities = 96/173 (55%) keine Homologie
Efc21	300	Hs.44104	661	5	keine Homologie	keine Homologie
Efc24	220	Hs.177516	3302	2, 12, 18	NM_005336.1 Homo sapiens high density lipoprotein binding protein (vigilin) E-Wert: 0,0 Identities = 2136/2156 (99%)	NP_005327.1 high density lipoprotein binding protein E-Wert: 0,0 Identities = 361/415 (86%)
Efc27	153	Hs.84153	1302	12	keine Homologie	keine Homologie
Efc35	171	Hs.76122	2204	1	NM_005626.1 H. sapiens Splicing factor, arginine/serin rich-4 E-Wert: 0,0 Identities: 947/947 (100%)	NM-005617.1 Splicing factor, arginin/serine rich -4 E-Wert: 4e-95 Identities: 189/329 (57%)
Efc43	112	Hs15356	1227	2	keine Homologie	keine Homologie
Efc49	131	Hs.211562	10052	9q31.1	NM_005502.1 Homo sapiens ATP-binding cassette 1 (ABCA1) E-Wert: 0,0 Identities = 7024/7031 (99%)	NP_005493.1 ATP-binding cassette 1 E-Wert: 0,0 Identities = 2083/2201 (94%)
Efc58	244	Hs.10283	693	5	keine Homologie	NP_036027.1: sprouty homolog 2 (Mus musculus) E-Wert: 5,0 Identities = 19/56 (33%)
Efc59	249	Hs.11039	2254	1, 4	AF052183 Homo sapiens clone 24804 mRNA sequence E-Wert: 0,0 Identities = 1297/1330 (97%)	NP_014082.1: Polyadenylation Factor I subunit (Saccharomyces cerevisiae) E-Wert: 5e-10 Identities = 51/184 (27%)
Efc77	225	Hs.249247	2424	2, 1, 10	NM_001415.1: Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2 E-Wert: 0,0 Identities = 407/420 (96%)	NP_036140.1: translation initiation factor 2 (Mus musculus) E-Wert: 2e-65 Identities = 126/132 (95%)
Efc112	425	Hs.5422	1214	5	keine Homologie	keine Homologie
Efc126	405	Hs.19348	2360	15	keine Homologie	CAA19260.1 elongation factor 2-like protein [Schizosaccharomyces pombe] E-Wert: 1e-44 Identities = 54/92 (58%)
Efc162	249	Hs.6018	1482	13q32.1-32.2	alu-sequenz	ESTs

Klon	Größe	Unigene-Gruppe	mit Unigene ermittelte Seq. länge	mögliche chrom. Lokalisation	Homologievergleich mit BlastN	Homologievergleich mit BlastX
Efc166	216	Hs.44021	1492	15q21.3	keine Homologie	keine Homologie
Efc168	474	Hs.108972	3554	5	AL117590.1 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434P228 E-Wert: 0,0 Identities = 1897/1923 (98%)	U82987: Bcl-2 binding component 3 [Homo sapiens] E-Wert: 0,55 Identities = 41/114 (35%)
Efc172	396	Hs.109315	1128	20	keine Homologie	P49027 Guanine nucleotide-binding protein (Oryza sativa) E-Wert: 3.1 Identities = 27/83 (32%)
Efc189	125	Hs.103493	1082	19	keine Homologie	keine Homologie
Efc190	109	Hs.28555	1173	5	AF029071 Gallus gallus p52 pro-apoptotic protein mRNA E-Wert: 1e-31 Identities = 154/180 (85%)	AAC60367 p52 pro-apoptotic protein (Gallus gallus) E-Wert: 1e-89 Identities = 110/158 (69%)
Efc199	217	Hs.154850	3690	6q12-q14	NM_001851.1 Homo sapiens collagen, type IX, alpha 1 (COL9A1) mRNA E-Wert: 0,0 Identities = 1605/1610 (99%)	AF036130 collagen type IX alpha I chain E-Wert: 0,0 Identities = 339/521 (65%)
Efc205	559	Hs.24370	2412	12	keine Homologie	keine Homologie
Efc210	339	Hs.3611	1006	11q14	keine Homologie	CAB62631.1: putative protein [Arabidopsis thaliana] E-Wert: 2e-13 Identities = 51/196 (26%)
Efc220	379	Hs.48827	1150	12	keine Homologie	CAB07701.1: similar to Probable rabGAP domains [Caenorhabditis elegans] E-Wert: 5e-37 Identities = 58/123 (47%)
Efc225	220	Hs.181112	1402	13	AF161475 Homo sapiens HSPC126 mRNA E-Wert: 0,0 Identities = 1315/1323 (99%)	AAF29090.1 HSPC (Homo sapiens) E-Wert: 3e-76 Identities: 137/138 (99%)
Efc235	304	Hs.143587	657	-	keine Homologie	keine Homologie
Efc241	437	Hs.9732	980	17	alu-sequenz	ALU SUBFAMILY J

### 3.2.1.3 EST-Klone ohne Homologie zu Sequenzen der nr-Datenbank bzw. der EST-Datenbank

Die vierte Kategorie umfasst 11 Klone (4,5%) die nach Homologievergleichen mit Einträgen der nr-Datenbank und der EST-Datenbank keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen erkennen ließen. Die Sequenzen dieser Klone sind auf den folgenden Seiten dargestellt. Nur die Klone Efc72 und Efc173 besitzen einen durchgehenden offenen Leserahmen. Bei den übrigen EST-Klonen kann es sich um Sequenzabschnitte handeln, die im 3' untranslatierten Bereich liegen. Mögliche poly-Adenylierungssignale sind unterstrichen.

**Efc60**

Länge: 570 Bp

CACATATAGCAAAGAAATTTAATTTTAAAATCAATAACAAAAAGTTTCTACATATATGTGTGTGCATATACAGATACTTTA  
ATATTTTTAACAATTGCTATAATTGTATTTACATCAAGACTTTTCAGTAGGTCAACTTGAAACTCATGCCTTCTCTCCTGTTC  
 TGAAAGAAGCACAGGTTCCGGCACTAAGAGAACTTGAAGAAGGCAATTTGGTTCGTTTGTGAGGCTATTGAACTAAGTGATGAC  
 TCCGTGCTGCACTCCCCGACTCATCTAGGTCCAACAGGAAGGGAGGCCATGGCCATCTGAGGAGTTATTTGGTTGGTGCAA  
 AAGTAATTGTGGTTTTTGGCATTAACTAGAAATTCCTTCTCAGGTCTCAGGTAGGCACATCGCTTTGCCTCTCTATTCTCAGA  
 GGAGCCAATCAAGTGAATGTATACAGAGAATTGCTTGGGGGGAGTGCATCCAATAGTTTGGTTTTGCTTTGACCAAAAAGGCAC  
 TGAAAAAACAGTATGTGGCTGAAGTAACATTAATACGGGCCCATGCCATTTAGCCACTAT

**Efc63**

Länge: 547 Bp

CTTCTCTAGGAGGGAAAAACAGACAAACAAACAAACAAACAAACCTGTGTATGTGGAAGCTGGTTTCATTTTTAAATGTTTAA  
 GCAGCAGTTGGTANTGAGGTTTACAGATAGTGTCAAATCTTGTTTTTGGCAAATACGTCCCTTTTTAGTGCTGCACTGTCATTA  
 CCTGGCAAATGTGCTACCTTGACCAACGTGTTGATCTTTCATACTCAAGTGCCATTTCTTGTAGCTCATTTCCTTTCTGCCTG  
 CTGACCCTTCTGTAGGAACAAAGGTTGGGGGGCAGTACTGAGGAGGAGAAAAGGGTGAGAGAGGAAGAACATCTACAGTG  
 GTGTTAGGAAAACGAACGTGGAATTTATAAACTCCATCTCAGGATCACTCAGTTCAGCTACGAGGAAGAAGATGGAACCAC  
 CCCTCTCTGGAGCCAGGTTGCTTGTCTACTTGAGTCATATTGATTCAAGCAGGAGAACAGACTTTGAAGGCAGCTAGGATGTAT  
 GTGTGCTATACAATGCTGAGCCCAAACCATATCAGGCCTCC

**Efc70**

Länge: 143 Bp

GGCACGAGTTCTTCTTTCTATGAGCTACTTGGGIGTGCTTTCTGTACTTGAGCCATTGGTTCCTCTCTTTTGCTCAAATTAGT  
 TTGGGTTAGGCTTCTGCACTTCTGATCAGTTCAAACTAATTAAAATGGTTCCAGG

**Efc72**

Länge: 172 Bp

CAGAAAGCAGACCCGTGCCGGCCAGCGCACAGGTTCAAGGCATTTGTTGCTATCGGGACTACAATGGCCACGTCGGTCTGGGTGTTAAGTGCT  
 CCAAGGAGGTGGCCACCGCCATCCGTGGGGCCATCATCTGTCCAAGCTCTCCATCTCCCGTGCGCAGAAGCTACT

**Efc98**

Länge: 284 Bp

CCACGGCCAGCGCCACATCAACCGCCAGTCTTTCCTGAAGATGTGCCACGCGAGATTGCGATTGCGCGAGCTCCCGTGCAGCGCGGCCCGG  
 GCGAGCGTTTTGAATACCGAATCAAGGTTAGTGTGTTGAGTGTCTACCTGCCGACCGGACCCAGCACGAGTCGACGCGCTCTTCCAGGTTTT  
 CATCACTGAAGCGGCTGTCGACAAACGTGAGCACATTTCCGAATGCCCGCCTGCAGCCACTTTTGGGCGAGGCGCTCCGGCACCACTGCCGG  
 CT

**Efc100**

Länge: 286 Bp

GGGAgGGCAGGGTGGAGGGGTCTTGCCCTGGGCTGGTGGGAgAGTGGACTGCATGCTCTGTGGACACAAGGCCTCTCTGGCAGGGGATGTGAG  
AAGAGCTTCTGTGCTACGCCACATGGCCTCTGTGGGTATGGAGCCCTGCAGGCCTGGCCACCCTCTGCAGTCTCCTGGCCCCCTCCCTCAG  
CTGTGGGTCTTAGGAGCCCCCAGGAAGGTGATTAGATGGAGCCCTGTGCCACGTCCAAGGCCTGCTACCTCTGGGCCTGGTTCCCACTGGCAC  
TTCG

**Efc105**

Länge: 593 Bp

CTCCGGGTGCCATCCTCCGCGGGGTGAGGTGCCACCAGGAATCCCTTTCCTTAGATTGTCTGATGCTGTGAGTTAGAAGATTCC  
TGTTTCTACTCACACGATTGGGTGCCAGTATACACTGCCATGGTTTLAGAGGAAGCTCTGCCACTAACTGTGTGACTGAGGCAA  
GTGGCTTCACTGCCCTGTGCCTCAGTTTCTCTCCCTGAAAAATGGGAATAAAATGTACTTGACTCATGGGCTTAATGAAGTATCC  
TGGGAGCTCTTGGCTGTAAGGTGCTCAGGACAGGGTGGCATCCACACCCTCAGGGGCCCTGCTACTTTTTATTACCATCTTGAC  
TCTAGGAGCTCCGACCTTGGTTTTCATGGATGCCAATGGAAATCTGTTTTAGACAAATGTGGAAGGCATCCTTAAAGATAAT  
AGGATTAAGTAACAAAAATAAAGAGGAAAAATGATCACCGATGAAGAATGCAAGAGACCACGTGTGTGTGCTTGGGAATGG  
AGGGCCTGAAGGTCCCACCCTCCGCTGGGCCCGCCCTTGCCCCATGTGCTCCCGCTCTCCTGGGGCACCTACCACCTCCTGG  
CTCC

**Efc138**

Länge: 142 Bp

TGAAAGACTAGACTAGCAATAATGGGAAGACAAGTATATCCTTTCTCTCTCTCTCTCTCACACTCACACTCACACTC  
ACACACACACACAAACACATACACACCAACATTCTCTCATCTTATGTCCAGGGAG

**Efc148**

Länge: 558 Bp

ATTTggTTGAAGATGAAGGAgAGCCTCaGGAAGAAATaTCCAGGCACATTAGAgAAATCTTTGGTTATGACCGAAAAAATACCaaAGATGAaAG  
TGATTATGCCTTACGTTACATGGAAAGTAGTTGGAAAGAGCAgCAgAAGGAAGAAAGCAgAGAGCTTAAGACTGGGTATGCAAGAGGACTTACAG  
GAAATGAGACGTGAAGAAgAAgAAATGCNACGTGAAGGGCCAAGAAGCTGAAGAGGCGTTAGCTGCTGCTTTTTATTTTTGTGAAATTCTATAG  
CTGCTCTGCTGCAAGGATTTCTGCCTTCAAGTGAAGAAGCCCTTATCATTTTAGATTTATACTTGGGTACTCAAGGAGAAGGAATGCATA  
CTGTCAATTTGCAGGCTGTCAATTTGAGCATAAAATATTTTCCAGATATTTTCCAGGGTGAATCTGTAATGCAGATGATATAATGCCCACTTGTGC  
TCTTATGAAGTTAACTGTTCaCAGATGCCAgCCTTGATCCTGATGAgCTATGCCCTCTAATGTGGGGCCACTCCCCAGTCAGCCAATC

**Efc171**

Länge: 488 Bp

GCACAATGAATCTACATTCTTGTACAACGTGGTGTCTGCATGCCGTAGATGACTCTGCTGCCTGGAAGTGGGACTTCAAGTGC  
TTTCTGGTATCATGAATCAGCAAAGCTACAACCACCCCATTTCCACTTCTAGCACTCAACTCCCTGCCAAGTTCTGGAGGCAA  
TAGAGTCCCAGTGTGCTCTTTTCTGAACACCCACAGTAATGCTGCTATTATCATTATCATCATCAAACACTAAACCCTT  
GCCAAGTGTCTTCACTTCTGTATTCTGTGTCAGAGAATAATCAACTGAGTGTCCAGTAAATGGCGGTTCCCTCTGCTTGGTAT  
TAAATTGTGTTATCTAAATTGAACCTCACGAACTCTGTCAGATGTCACAATCCCCATTTATAGAGGCTATAGCATGCTCAA  
AGAAATAATTTGCCCAAGGTCACATAGCTCATATAGGTGAAGTGTGGACTGCATTCCCTGCCTA

**Efc173**

Länge: 142 Bp

CAGAAAATGTGAGTTCGTATCCTAGTTATGCCATGTATAAGCTTTGTGCATCTAAGCAAATCACTTATTTTCTCTGTGCTTGTGCCTTTAGTTA  
TAAATGCATGCTTAAATGACAGCGTTAAAACAGGTGTGAAAATACC

Die Sequenzen wurden mit der htgs-Datenbank (High Throughput Genomic Sequences), die Sequenzdaten großer Sequenzierprojekte beinhaltet, verglichen. Bis auf die Klone Efc98 und Efc138 konnten für jeden Klon Sequenzübereinstimmungen festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Sequenzvergleiche sind in Tab. 13 dargestellt. Mit Hilfe dieses Vergleichs konnte die chromosomale Lokalisation von vier Klonen ermittelt werden. Eine genauere Lokalisation war jedoch nicht angegeben.

**Tabelle 13**

**Ergebnis der Datenbankvergleich gegen die htgs-Datenbank**

<b>Klon</b>	<b>Homologie zu</b>	<b>chrom. Lokalisation</b>
Efc 60	Homo sapiens clone NH0362A15	-
Efc 63	Homo sapiens clone RP11-110C15	15
Efc 70	Homo sapiens clone RP4-779E11	20
Efc 72	Homo sapiens clone RP11-291G2	-
Efc 100	Homo sapiens clone BAC 393G12	8
Efc 105	Homo sapiens clone DJ0703P08	-
Efc 148	Homo sapiens clone RP11-504G3	-
Efc 171	Homo sapiens clone RP11-217L21	-
Efc 173	Homo sapiens clone RP11-87N3	17



### 3.2.2 Ausarbeitung einer Strategie zur Isolierung weiterer EST-Klone aus der humanen Chondrozyten cDNA-Bibliothek

Die Auswertung der 253 EST-Klone bestätigt die Eignung der cDNA-Bank zur Isolation Knorpel-/Knochen-spezifischer Transkripte und zeigt, dass neben einer Vielzahl bekannter Gene auch ungefähr 5% neue Gene gefunden werden können. Für die Durchführung eines umfassenden EST-Projekts muß eine Strategie entwickelt werden, mit der der Sequenzieraufwand auf ein Minimum beschränkt wird. Die weitere Vorgehensweise wurde so gewählt, dass häufig vorkommende Transkripte erkannt und ausgeschlossen wurden. Die Strategie ist in Abb. 21 schematisch dargestellt. Die Phagen wurden in einer Dichte von etwa 1000 pro Platte (40 x 40 cm) in Weichagar ausplattiert. Durch Zugabe von IPTG/XGal konnten rekombinante von nicht-rekombinanten Phagen unterschieden werden. Die rekombinante Phagen wurden anschließend auf einen Nylonfilter überführt und mit spezifisch hergestellten Sonden hybridisiert. Als Sonde wurde ein Gemisch häufig vorkommender Transkripte verwendet.

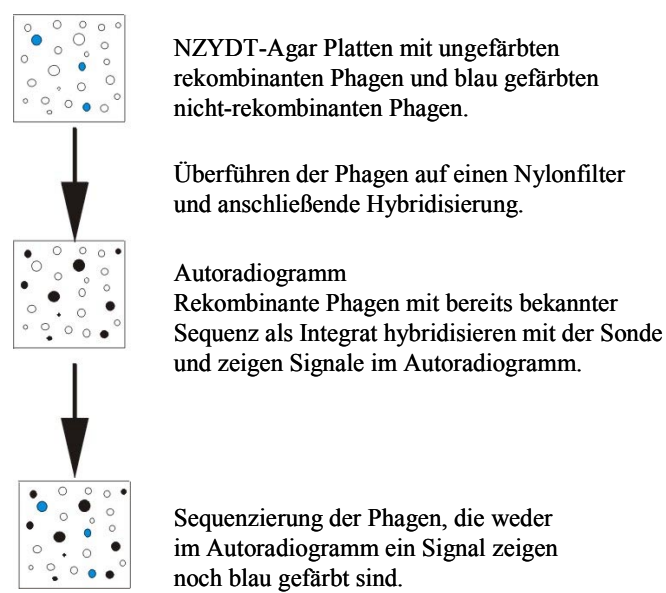
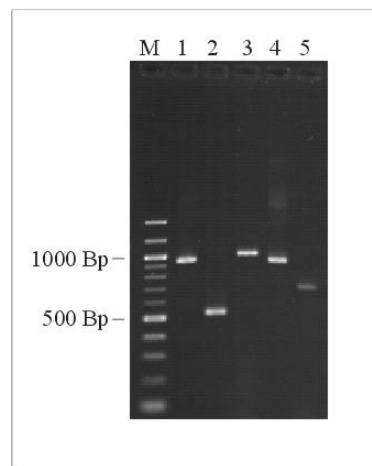


Abb. 21: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Isolierung weiterer Klone aus der humanen Chondrozyten cDNA-Bank.

Die Auswertung der bereits sequenzierten EST-Klone zeigte, dass einige cDNA-Sequenzen besonders häufig in der Chondrozyten-spezifischen cDNA-Bibliothek vertreten sind. Dazu zählen ESTs die Teilen der Typ II Kollagen-, der Ferritin-, der Ubiquitin- bzw. der Elongations Faktor 1-cDNA entsprechen. Von den veröffentlichten cDNA-Sequenzen dieser vier Gene wurden spezifische Primer abgeleitet. Durch RT-PCR mit humaner Chondrosarkoma-cDNA als Template konnten genspezifische Sonden hergestellt werden, welche nach Aufreinigung radioaktiv markiert werden konnten (Abb. 22).

Des Weiteren zeigte sich, dass ribosomale Proteine besonders häufig in der cDNA-Bank vertreten sind. Von 253 ansequenzierten Klonen zeigen 53 Homologie zu ribosomalen Proteinen. 11 Klone (Efc2, Efc3, Efc23, Efc26, Efc33, Efc50, Efc73, Efc87, Efc115, Efc142, Efc158) wurden durch in-vivo Exzision in ein bakterielles System überführt (siehe 2.9.1). Von der präparierten DNA wurde durch EcoR1/ Xho1-Restriktion die Linkersequenzen abgetrennt und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt. Diese Fragmente wurden ebenfalls radioaktiv markiert.



**Abb. 22: Herstellung spezifischer Sonden**

Gelelektrophoretische Auftrennung der aufgereinigten PCR-Produkte, die als Sonden eingesetzt wurden. (1) Elongations Faktor 1, (2) Ferritin, (3) und (4) Kollagen Typ II und (5) Ubiquitin. Als Molekulargewichtsstandard (M) wurde eine 100 Bp "Leiter" verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem 1,2% Agarosegel.

Insgesamt wurden ungefähr 3000 rekombinante Phagen-Klone auf Filter überführt und mit dem beschriebenen, radioaktiv markierten Sondengemisch hybridisiert. 480 Phagen, die weder

eine Blaufärbung noch ein Signal im Autoradiogramm zeigten, wurden anschließend in SM-Medium überführt und über T<sub>3</sub>A/T<sub>7</sub>A-PCR amplifiziert. Die Sequenzierung und die anschließende Auswertung der Sequenzdaten der aufgereinigten PCR-Produkte erfolgte am Baylor College (Houston, Texas). Die erhaltenen Sequenzdaten sind unter der web-Adresse <http://www.hgsc.bcm.tms.edu/~gmei/cDNA/CUAA/aaa.htm> abgelegt.

Die Auswertung der Sequenzdaten ergab, dass 73% (162) der ESTs Homologie zu bekannten Genen zeigen. 22% (8) zeigen dabei Homologie zu verschiedenen ribosomalen Proteinen, jeweils 1,8% weisen Sequenzübereinstimmung zu Elongationsfaktor 1  $\alpha$  bzw. Ferritin auf und 1,3% der untersuchten ESTs sind identisch mit Kollagen Typ II. 5% der untersuchten ESTs stellen repetitive Sequenzabschnitte dar, 9,5% zeigen Homologie zu PAC, BAC- bzw. Cosmidsequenzen. 11% zeigen nach Vergleich gegen die nr-Datenbank keine signifikante Homologie.

Die weitere Auswertung dieser Ergebnisse und die Untersuchung der gefundenen Gene ist Ausgangspunkt einer Promotionsarbeit und wird in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben.

### **3.2.3 Isolierung und Analyse des EST-Klons Efc34**

#### **3.2.3.1 Analyse von Efc34**

Wie bereits unter 3.2.1.2 beschrieben, zeigt der EST-Klon Efc34 in ersten Homologievergleichen auf Nukleotidebene eine 81%ige Homologie zu einem aus einer murinen Cochlea-cDNA-Bibliothek isolierten EST-Klon (Abb. 23). Zu humanen Sequenzen konnte keine Homologie nachgewiesen werden. Zur Ermittlung der vollständigen Sequenzinformation wurde der Phagenklon durch *in-vivo*-Excision (siehe 2.9.1) in pBluescript-Vektor umklont. Mit Hilfe der vektorspezifischen Primer T<sub>3</sub>A und T<sub>7</sub>A konnte das gesamte Integrat sequenziert werden. Die Sequenz ist in Abb. 24 dargestellt. Sie umfasst 693 Bp und beinhaltet Polyadenylierungsstelle und poly(A)-Sequenz.

Z78160|MMZ78160 M.musculus partial cochlear mRNA (clone 28D2)  
 Length = 835  
 Identities = 165/203 (81%), Positives = 165/203 (81%), Strand = Plus / Plus

Query: 37 AGATACAAGCCTTAAAGATGGCCTTTTCCATGAATTTAAGAAATTTGGAAAAGTAACTTC  
 |||||  
 Sbjct: 94 AGACACAAGCCTTAAAGACGGCCTTTTCCATGAGTTTAAGAAGTTTGGCAAGGAGACGTC

Query: 97 AGTGCAGATACATGGAACCTCAGAAGAGAGGTATGGTCTGGTATTCTTTCCGGCAGCAAGA  
 |||||  
 Sbjct: 154 AGTGCAGATCCACGGGGCTCCGAGGAGAGATACGGCCTGGTGTCTTCCGGCAGCAAGA

Query: 157 GGACCAAGAAAAGCCTTGACTGCATCAAAGGAAAACCTTTCTTTGGCATGCAGATTGA  
 |||||  
 Sbjct: 214 GGACCAAGAAAAGCATAGACCGCATCCAAGGGGAAGCTCTTCTTCCGCATGCAGATCGA

Query: 217 AGTAACAGCATGGATAGGTCCAG 239  
 |||||  
 Sbjct: 274 GGAGACTGCATGGGAAGGACCAG 296

Abb. 23: DNA-Sequenzvergleich des 5'-Bereichs von EST-Klons Efc34 mit einer aus einer Maus isolierten cDNA-Klon.

```

1  AGAGAGAATTAATAACTTGGTTTTTTTTGGGAATTTAGATACAAGCCTTAAAGATGGCCT      60
      P34.1F→
61  TTTCATGAATTTAAGAAATTTGGAAAAGTAACTTCAGTGCAGATACATGGAACCTCAGA      120
121 AGAGAGGTATGGTCTGGTATTCTTTCCGGCAGCAAGAGGACCAAGAAAAGCCTTGACTGC      180
           ←P34.1R
181 ATCAAAGGAAAACCTTTCTTTGGCATGCAGATTGAAGTAACAGCATGGATAGGTCCAGG      240
                                           P34.2F→
241 TAAGACACAAGCAAGCTGAGTTTGAGTTACTCATCACACACTGTTTGTGTTGCAGTGT      300
301 ATGAGAGGGCAGCATATGATCCTGAATGAGGACACTATTCTGGCTTTATTTATTGACATA      360
361 TTTCCATTGTCTTCTGTTTTAAAGATGGTTCTATTTATTGTTCAACTTAAATAAAAAACA      420
           ←P34.2R
421 TTGTTTTGGTTAGGGAGGATAGATTTTTCTGTTGCTGGGATTACAGGTGTTAGCTACCAT      480
481 GCCTGGCCTTCATTTTTATAATACAAACCTTGTGTAGAACTTTTTGTTGCCTTATTAATGA      540
561 TTTCTTTTTTCTTTTTTTGAGATGGAGTCTTGCTCTGTCCCCAGGCTGGAGCGGAGTTTG      600
601 CAGTGAGCTGAGGTGAGGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCTGTCTC      660
661 TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

Abb. 24: Sequenz des EST-Klons Efc34.

Das mögliche Polyadenylierungssignal ist eingerahmt. Unterstrichene Primersequenzen wurden zur Isolierung überlappender cDNA-Klone verwendet.

Homologievergleiche mit der Sequenz zeigten im weiter 3'-gelegenen Abschnitt eine Sequenzübereinstimmung von 100% zu dem humanen EST-Klon Z37007 (Abb. 25).

Z37007|HHEA93W H. sapiens partial cDNA sequence; clone HEA93W; single read.

Length = 271

Score = 387 bits (195), Expect = e-105, Identities = 195/195 (100%), Strand = Plus / Plus

```

Query: 263  tgagttactcatcacacacactgtttgtgttcagtgatgagagggcagcatatgatcc 322
          |||
Sbjct: 3    tgagttactcatcacacacactgtttgtgttcagtgatgagagggcagcatatgatcc 62

Query: 323  tgaatgaggacactattctggctttatttattgacatatttccattgtcttctgttttaa 382
          |||
Sbjct: 63   tgaatgaggacactattctggctttatttattgacatatttccattgtcttctgttttaa 122

Query: 383  aagatggttctattttatggttcaacttaataaaaaacattgttttggttagggaggatag 442
          |||
Sbjct: 123  aagatggttctattttatggttcaacttaataaaaaacattgttttggttagggaggatag 182

Query: 443  attttctgttgctg 457
          |||
Sbjct: 183  attttctgttgctg 197
    
```

**Abb. 25: DNA-Sequenzvergleich des 3'-Bereichs von EST-Klon Efc34 mit einer humanen cDNA-Sequenz.**

Der 5'-Bereich der cDNA zeigte bei einer BlastX Suche Homologie zu dem murinen Klon Z78160, sowie zu einer RNA-Erkennungsmotiv von *Drosophila melanogaster* (59% Homologie) (Abb. 26).

```

gb|AAF13218.1|AF188205_1 (AF188205) Spen RNP motif protein long isoform [Drosophila
melanogaster]
Length = 5533
    
```

```

Score = 78.8 bits (191), Expect = 2e-14
Identities = 39/66 (59%), Positives = 48/66 (72%)
Frame = +2
    
```

```

Query: 38  DTSLKDGLFHEFKKFKGKVTSTVQIHGTSEERYGLVFFRQQEDQEKALTASKGKLFQGMQIE 217
          DTSLKDGLFHE+KK GKVT V++ G + ERY LV F++ +D EKAL S K FFG +IE
Sbjct: 567 DTSLKDGLFHEYKKGKVTWVKVVGQNSERYALVCFKKPDDVEKALEVSHDKHFFGCKIE 626

Query: 218 VTAWIG 235
          V + G
Sbjct: 627 VEPYQG 632
    
```

**Abb. 26: Aminosäurevergleich des humanen EST-Klons Efc34 mit einer RNA-Erkennungsmotiv von *Drosophila melanogaster*.**

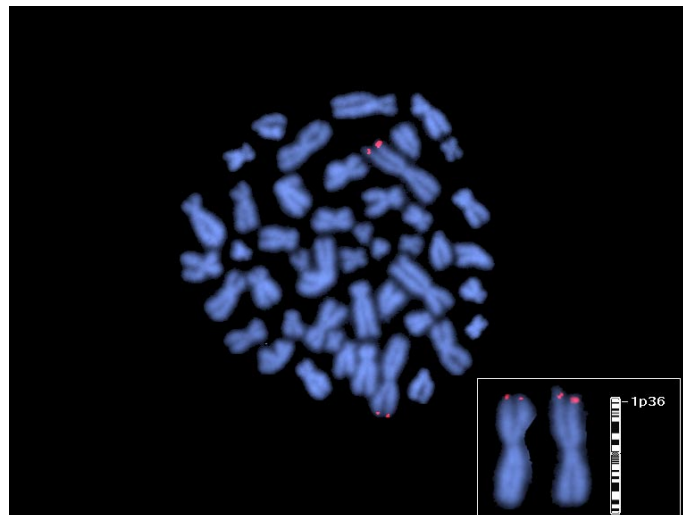
Zur Isolierung eines mit der EST-Sequenz überlappenden cDNA-Klons wurden die in Abb. B eingezeichneten vier Primer P34.1F und P34.1R sowie P34.2F und P34.2R synthetisiert. In einer PCR mit humaner genomischer DNA bzw. humaner cDNA als Matrize lieferte die Primerkombination P34.1F/P34.1R ein 151 Bp Produkt, die Primerkombination P34.2F/P34.2R ein 141 Bp Produkt. Mit der Primerkombination P34.1F und P34.2R konnte weder auf cDNA-Ebene noch auf genomischer Ebene ein Amplifikat nachgewiesen werden. Die mit Hilfe der Primerkombination P34.1F/P34.1R und P34.2F/P34.2F isolierten PCR-Produkte wurden radioaktiv markiert und als Sonden für eine Plauefilterhybridisierung (siehe 2.8.3) eingesetzt. Hybridisiert wurde eine humane fetale Cochlea-cDNA-Bibliothek (16-22

SSW) (C. Morton, unveröffentlicht). Mit keiner der beiden Sonden konnte ein positiver Klon aus der Cochlea-Bibliothek isoliert werden. Auch mit Hilfe der UniGene-Datenbank konnten keine weiteren überlappenden EST-Klone identifiziert werden.

### 3.2.3.2 Chromosomale Lokalisation des EST-Klons *Efc34*

Die chromosomale Lokalisation des Klons *Efc34* erfolgte mittels Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung. Zunächst wurde durch PCR mit der Primerkombination P34.1F/P34.1R ein PAC-Klon aus einer hierarchisch angelegten PAC-Bank des humanen Genoms (Ioannou et al., 1994) isoliert. Die Verifizierung des Klons erfolgte durch direkte Sequenzierung der PAC-DNA mit *Efc34*-spezifischen Primern. Die Hybridisierung der PstI-restringierten, mit Digoxigenin-11-dUTP markierten DNA auf gespreiteten Metaphasechromosomen zeigte ein Signal auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (Abb. 27).

Die Lokalisation konnte später durch Homologievergleich mit der htgs-Datenbank bestätigt werden. Es zeigte sich eine Homologie zu dem humanen Klon 134019 (Accession Nr.: AL034555), der aus der chromosomalen Region 1p36.11-36.33 stammt.



**Abb. 27: Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung des PAC-Klons “PDJ183R8S11”**

an humanen Metaphasechromosomen. Die PAC-Sonde wurde mit anti-DIG-TRITC detektiert und zeigt Signale auf beiden Chromatiden der chromosomalen Region 1p36.

### 3.2.3.3 Isolierung eines homologen Maus-Gens *mfc34*

Wie bereits erwähnt zeigt *Efc34* im 5'-Bereich auf Nukleotidebene eine 81%ige Identität, auf Aminosäureebene eine 57%ige Identität zu einem Maus-EST (Accession Nr.: Z78160). Z78160 wurde aus einer Maus Cochlea-cDNA-Bibliothek isoliert und nicht weiter charakterisiert (Crozet et al., 1997). Im folgenden wird die Isolierung des murinen homologen Maus-Gen (*mfc34*) beschrieben. Von der Mausequenz Z78160 wurden die spezifischen Primer *mfc1F* und *mfc1R* synthetisiert. Durch PCR mit fetaler Maus-cDNA (E11,5) als Matrize wurde ein PCR-Produkt hergestellt, welches in einer Plaquefilterhybridisierung (siehe 2.8.3) gegen eine fetale Maus-cDNA-Bibliothek (E7, Clontech, Palo Alto, USA) als Sonde eingesetzt wurde. Mit dieser Sonde konnten acht positive Einzelphagen isoliert werden (FM1 – FM8). Durch PCR mit der Primerkombination *mfc1F/mfc1R* wurden die Klone FM1, FM3, FM5, FM6, FM7 und FM8 als positiv identifiziert und weiter analysiert. Die Phagen-Integrate wurden mittels „Expand“-PCR mit den Primern  $\lambda$ gt10 und  $\lambda$ gt11 amplifiziert und in den T-Vektor umklontiert (siehe 2.4.1). Die Insertgröße der zu untersuchenden Klone lag zwischen 1,7 kbp und 3 kbp. Die in T-Vektor umklontierten Integrate wurden mit den Primern T<sub>3</sub>A und T<sub>7</sub>A, sowie spezifischen Primern doppelsträngig sequenziert. In Abb. 28 sind die sechs untersuchten Fragmente und die daraus resultierenden Konsensussequenzen dargestellt. Wie aus Abb. 28 hervorgeht zeigt der Klon FM3 in seinem 5'-Bereich (1208 Bp) keine Übereinstimmung zu den übrigen isolierten Klonen.

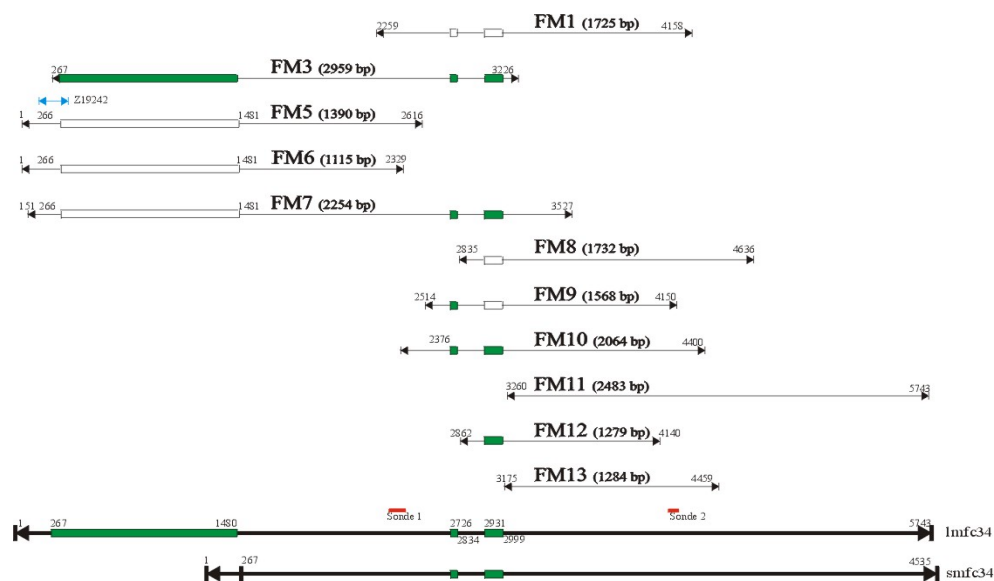
Ein Homologievergleich der Konsensussequenz mit der NCBI-EST-Datenbank zeigt auf Nukleotidebene deutliche Homologie (86%) der ersten 253 Bp der Klone FM5, FM6 und FM7 zu den Basen 1-117 eines EST-Klons (Accession Nr.: Z19242). Der 3'-Bereich (nt118-323) desselben EST-Klons ist homolog (93%) zu den ersten 207 Bp des Klons FM3. Wie in Abbildung 28 angedeutet, stellt somit der EST-Klon Z19242 eine Überlappung zwischen dem Klon FM3 und den Klonen FM5, FM6 und FM7 her. Die ersten 1208 Bp von FM3 stellen wahrscheinlich ein alternativ gespleißtes Exon dar, welches in den übrigen Klonen nicht vorhanden ist. Dieser Abschnitt ist in Abb. 28 bei Klon FM3 farbig unterlegt.

Zwei weitere Bereiche konnten ebenfalls nach genauer Analyse als alternativ gespleißte Exons identifiziert werden. Es handelt sich dabei um deutlich kürzere Sequenzabschnitte von 69 Bp bzw. 99 Bp. Die Klone FM3 und FM7 beinhalten diese Exons, der Klon FM1 jedoch nicht. Die Bereiche sind in Abb. 30 unterstrichen.

Da die bisher ermittelte Sequenz weder ein Polyadenylierungssignal noch eine poly(A)-Sequenz besitzt, wurde eine weitere am 3'-Ende liegende Sonde über PCR hergestellt und die

fetale Maus cDNA-Bibliothek erneut hybridisiert. Es konnten fünf weitere Klone isoliert werden (FM9 - FM13). Die Phagen-Integrate wurden mittels „Expand“-PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und in T-Vektor kloniert. Die Integratgröße variierte zwischen 1,5 kBp und 2,5 kBp. Auf diese Weise konnte die Konsensussequenz auf insgesamt 5743 Bp verlängert werden (siehe Abb. 30). Die Konsensussequenz besitzt weder ein Polyadenylierungssignal noch eine poly(A)-Sequenz und stellt somit keine vollständige cDNA-Sequenz dar.

Auf eine erneute Hybridisierung mit einer weiter 3'-gelegenen Sonde wurde verzichtet, da ein Homologievergleich gegen Ende der Arbeit (Juli 1999) eine Sequenzübereinstimmung von 98% zu dem zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten murinen Gen *MINT* zeigt (Newberry et al., 1999). Ausgeschlossen von dieser Homologie war das wahrscheinlich alternativ gespleißte Exon das durch den Klon FM3 nachgewiesen werden konnte. Auch gab es in der Veröffentlichung keinen Hinweis auf alternativ gespleißte Exons, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 28: Sequenzierungsstrategie des murinen Klon mfc34**

Eine fetale Maus cDNA-Bibliothek (Stratgene) wurde zunächst mit dem radioaktiv markierten PCR-Produkt (Sonde 1) hybridisiert. Von acht isolierten Phagen wurden sechs vollständig sequenziert. Mit Hilfe dieser Sequenzinformation wurde eine zweite Sonde generiert und die cDNA-Bank nochmals untersucht. Es konnten fünf weitere Phagen isoliert und sequenziert werden. Die Sequenzen der 11 Fragmente bilden mindestens zwei mögliche Contigs, die durch RT-PCR verifiziert wurden. Wahrscheinlich alternativ gespleißte Exons sind als Balken gekennzeichnet. Bei Anwesenheit des Exons ist der Balken grün gezeichnet, fehlende Exons sind durch weiße Balken gekennzeichnet.



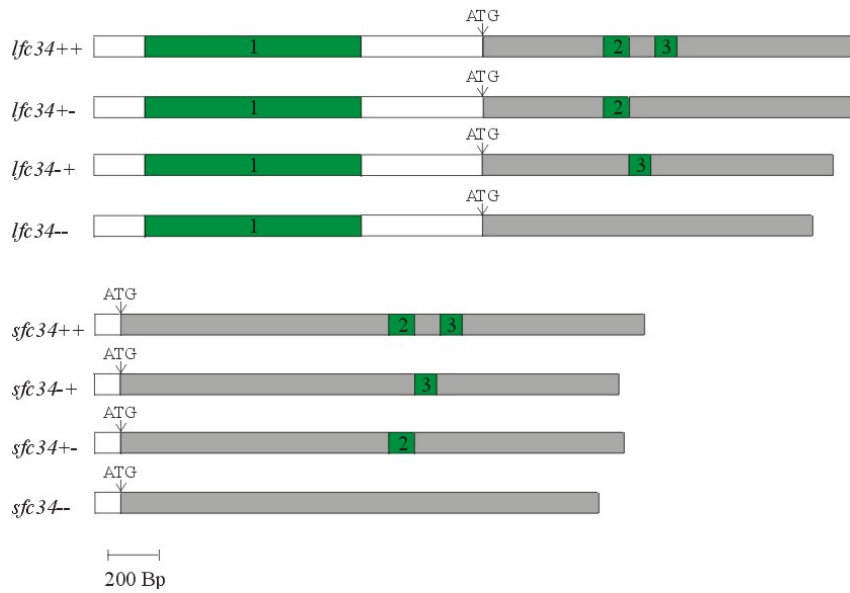
### 3.2.3.4 Verifizierung und Analyse der ermittelten *mfc34* Gensequenz

Um die ermittelte *mfc34* Sequenz zu bestätigen, wurden RT-PCRs mit sequenzspezifischen Primern an fetaler Maus-Gesamt-RNA (E 11,5) durchgeführt. Des Weiteren wurden aus dem 3'-Bereich der publizierten *MINT*-Sequenz spezifische Primer abgeleitet und überprüft ob alternative Exons existieren.

Es konnten, bis auf die Primerkombinationen *mintR/mintF* und 1F3/1F4, bei allen anderen Primerkombinationen auf cDNA-Ebene PCR-Produkte in der erwarteten Länge amplifiziert werden. Nach Auftrennung des mit der Primerkombination *mintR/mintF* hergestellten RT-PCR-Produkts auf einem 1%igem Agarosegel konnten zwei Produkte gleicher Intensität mit den Größen 1513 Bp und 305 Bp nachgewiesen werden. Nach Extraktion dieser Produkte aus dem Gel und anschließender Sequenzierung zeigte sich, dass das 1513 Bp Fragment die 1208 Bp von FM3 beinhaltet, bei dem kleinen 305 Bp Fragment fehlt dieser Abschnitt.

Die RT-PCR mit der Primerkombination 1F3/1F7 zeigt nach Auftrennung der Produkte auf einem 1,5% Agarosegel drei Banden, die aufgrund geringer Größenunterschiede nicht einzeln aus dem Gel extrahiert werden konnten. Der gesamt PCR-Ansatz wurde in T-Vektor kloniert. Untersuchungen der Insertgröße durch  $T_3A/T_7A$ -PCR zeigten das Vorliegen vier unterschiedlich großer Integrate mit 529 Bp, 460 Bp, 439 Bp und 361 Bp. Die Sequenzierung zeigte, dass das 529 Bp Fragment sowohl das 69 Bp als auch das 99 Bp Fragment enthielt, bei den 460 Bp bzw. 439 Bp Fragment fehlte eines der beiden Fragmente, und bei dem 361 Bp Produkt fehlten sowohl das 69 Bp als auch das 99 Bp Fragment.

RT-PCR Analysen mit RNA-Populationen verschiedenster Entwicklungsstadien (E9, E11, E13) bzw. verschiedenster Gewebe (Gehirn, Knochen, Leber) führten immer zur Amplifikation aller möglichen Fragmente, der Nachweis entwicklungspezifischer bzw. gewebsspezifischer Spleißprodukte konnte nicht erbracht werden. Auch konnten durch RT-PCR Analyse mit den aus dem 3'-Bereich des *MINT*-Gens abgeleiteten Primerkombinationen keine weiteren Spleißvarianten nachgewiesen werden.



**Abb. 29: Schematische Darstellung aller möglichen Spleißvarianten.**

Wie in Abb. 29 angedeutet konnte der Nachweis acht verschiedener Spleißvarianten erbracht werden. Die Auswertung der Sequenzergebnisse zeigte, dass aufgrund des Fehlens bzw. Vorhandenseins des 1208 Bp Exons zwei unterschiedliche Translationsstartpunkte existieren und somit zwei unterschiedliche Proteine entstehen. Fehlt das 1208 Bp Fragment (*smfc34+/+*; *smfc34+/-*, *smfc34-/+*, *smfc34-/-*) ist die Konsensussequenz identisch mit der kürzlich veröffentlichten *MINT*-Sequenz (Newberry et al., 1999). *Smfc34* (alle vier möglichen Varianten) besitzt an Position +53 ein ATG-Start-Codon, dessen Umgebung Übereinstimmung zu der nach Kozak (1996) beschriebenen Konsensussequenz für Translationsstarts aufweist. Die Sequenzanalyse ergab einen putativen offenen Leserahmen von 1498 Aminosäuren, wobei in der vorliegenden Arbeit nicht die vollständige proteincodierende Sequenz von *smfc34* isoliert wurde. Die Aminosäuresequenz des veröffentlichten Gens ist im Vergleich zu *smfc34* 2078 Aminosäuren länger. In Abb. 30 ist nur der Bereich abgebildet der deutliche Unterschiede zu der veröffentlichten Sequenz besitzt. Eine Motivanalyse des proteincodierenden cDNA-Bereiches lieferte drei RNA-Erkennungsstellen im N-terminalen Bereich.

Bei Vorliegen des 1208 Bp Exons (*lmc34+/+*; *lmc34+/-*, *lmc34-/+*, *lmc34-/-*) (Abb. 29) wird der putative offene Leserahmen zerstört. Ein möglicher Transkriptionsstart ist an Position +2271 lokalisiert, wobei dessen Umgebung aber nicht der Konsensussequenz für Translationsstarts entspricht. Das Protein wäre um das erste RNA-Erkennungsmotiv verkürzt. Die zwei 69 Bp und 99 Bp alternativen Exons verursachen keine Veränderung des offenen

Leserahmens. Wobei das Fehlen des 99 Bp Exon das dritte RNA-Erkennungsmotiv deutlich verkürzen würde.

1	GGATTTTGTGGACATCAAAGTGCACAGAAAGCTCACAACTCCGTCAACAAAATGGGGAGACCGAGAC	
		M G D R D 5
68	CTCCGCACGGATTATAATGAGCCAGGAAGTATTCAGAGTGCTGCCCGGGACTGGACGAGACAGTTT	
	L R T D Y N E P G T I P S A A R G L D E T V	27
135	CCATAGCGTCTCGTAGTAGAGAGTTTCTGGGTTCCAGAGGAAGTGCCTGGAGGCCCTGCTTATGGTCC	
	S I A S R S R E V S G F R G S A G G P A Y G P	50
202	CCCACCATCACTTCATGCACGAGAAGGACGCTATGAGCGGAGACTCGATGGGTAAAGTTCCAAGGTTT	
	P P S L H A R E G R Y E R R L D G	67
269	CGGTAGGCAGGTATTTTGTATTTGATGTGGTGAGAAACAGAACTCGTATTTAGGGGCCCCAGATGG	
336	ATTTAAAGTTTTGGGCATTCTCAATGTTTCTGTTTTGGGTTGGAGACGGAAGTTATTTCTATCCCA	
403	GTGGCTGGTACCTCACTGAATCGTAGAGGATATTTCTGCAGCAGCTTGGATATCTACCGGGAGATC	
470	ACATGGCGGAAGAGCTCCTGTAGAGCTTCAGTTTGGGGTTACCTGGCTTCTAGAAGGACGTCTCCT	
537	CCCTTGGATATTATCAAGCCTTCCCTGGATATATCCTTACTACCAGATGGAGCTATTTGGCTGCT	
604	GGTTTTGTCTTCGGGCTATTTGGAATATATCCGGAGTATCAGAGCCTACAAAGCTTGTAGAAGCTGA	
671	TGAGCACCTCTCGGTTTTAGTGTGTGAAGTCTACAAACAGATTGGATTGTCAGAGATCTCGCAGAT	
738	CACTGATTCCTCACTTGGATGCTACAAACAATACGCCAGCGTGGAGTGGAAATGTGTGCGTGGGTG	
805	AGGAGGAACGCAGGCTACCCCTGATTCCCATTTGGATCTACTCACTTCCGTGGAATTACACTTGA	
872	TGGAATGGGGAAACTGAGGCGATGGACATTTCTAAATGCTGGATATAGCCGTTCCTAACTGCTGGG	
939	ATGTATGGGATGCTATGAGCTCAAGACTCCAGTAGCCGAGGGAAGAGGATTACTGTGCTTCCGCC	
1006	CGCTGAGGGAACCTTTAGCTTCGGACGTCGATCAGTTGTGGATACAGCAGTCAGACTGTCTGGGCT	
1073	GGATGTCTATAAAGTGAACAGTTACCAGCACTTTGTTCTCACTGGTTGGAATTATAGAAAATTT	
1140	TCCTCGTTTTCCATCTGCTGGCTCCTCTTAGGGATGCAGATTTTTATGAATGTGGATCAATTTAT	
1207	AATGTCTACTATCTCAAGAAAGAAGTCTGGGGTTTTAAGAGTTACAGTTTGTGGGACTCCTTGC	
1274	TTCTGTGGAATTTCTTGTCTGCTCACTAAGATTTTTTTCTTGTGGTTTCATCTAAATATCACTTGA	
1341	CACCCTTGCCACCGAGGAGTGGATTACCCCGTAAGAGGGGCCAATGGGGGAAGTTATGGTACA	
1408	ATTCTCTCCCTAGATTTAATTTGGGATATAGGTCGTGTTCCACAGTTGAAAAAGGGCTTCAGATAA	
		A S D N 71
1475	CAGGGAGCGTGCTTATGAACATAGTGCCATGGACACCATGAACGGGGGACAGGAGCATTTGATCGG	
	R E R A Y E H S A Y G H H E R G T G A F D R	93
1542	ACAAGACATTACGATCAGGATTAATAAGAGACCCCTCGAGAGCGGACTTTACAACACGGGCTCTATT	
	T R H Y D Q D Y Y R D P R E R T L Q H G L Y	115
1609	ACACTTCTCGGAGTCGAAGTCCAACCGCTTTGATGCTCATGACCCCCGATACGAACCTAGGGCCCCG	
	Y T S R S R S P N R F D A H D P R Y E P R A R	138
1676	GGAGCAGTTTACTGCTCCAGTGTGGTACACAGGGATATCTACAGGGACGACATTACCCGGGAGGTA	
	E Q F T L P S V V H R D I Y R D D I T R E V	160
1743	CGAGGCAGAAGGCCAGAGCGCAGTTACCAACACAGCAGGAGTCGCTCACCACATTCGTCCCAGTCTA	
	R G R R P E R S Y Q H S R S R S P H S S Q S	182
1810	GAAACCAGTCCCCGACAGGCTGGCTAGCCAAGCGTCCAGACCCACCAGGTCCCCAGCGGCAGCGG	
	R N Q S P Q R L A S Q A S R P T R S P S G S G	205
1877	CTCCAGGAGTCGATCCTCCAGTAGTGACTCCATCAGCAGCAGCAGCAGCAACTGACAGT	
	S R S R S S S S D S I S S S S S S N T D S	227
1944	AGCGACTCCAGCAGCAGGCCAGTGACGACTTCCGGCCCGCTCTGTTTCAGTCGGCTGCAGTCCCCG	
	S D S S S T A S D D S P A R S V Q S A A V P	249
2011	CACCCACTTCCAGTTGCTTTTCGTCCTTGA AAAAGATGAGCCCCGAAAAGTTTTGGGATCAAAGT	
	A P T S Q L L S S L E K D E P R K S F <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">G I K V</span>	272
2078	TCAGAATCTTCCAGTACGCTCTACAGACACAAGCCTTAAAGACGGCCTTTTCCATGAGTTTAAAGAAG	
	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Q N L P V R S T D T S L K D G L F H E F K K</span>	294
2145	TTTGGCAAGGTGACGTCAGTGCAGATCCACGGGGCCTCCGAGGAGAGATACGGCCTGGTGTCTTCC	
	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F G K V T S V Q I H G A S E E R Y G L V F F</span>	316
2212	GGCAGCAAGAGGACCAAGAAAAGCATTGACCCGATCCAAGGGGAAGCTCTTCTTCGGCATGCAGAT	
	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">R Q Q E D Q E K A L T A S K G K L F F G M Q I</span>	339
2279	CGAGGTGACTGCATGGGTAGGACCAGAAAACAGAGAGTGAAAATGAGTTTCCGGCCCTTGGATGAGAGG	
	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">E V</span> T A W V G P E T E S E N E F R P L D E R	361
2346	ATAGATGAATTCATCCCAAAGCAACGAGAAGTCTTTTATTTGGGAACCTTGA AAAACGACTACTT	
	I D E F H P K A <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">T R T L F I G N L E K T T T</span>	383
2413	ACCACGACCTTCGAAACATCTTTCAGCGCTTTGGAGAAAATTTGGACATTGACATTAAGAAGGTGAA	
	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Y H D L R N I F Q R F G E I V D I D I K K V N</span>	406

2480	CGGGGTGCCTCAGTACGCGTTCTCTGCAGTACTGTGATATCGCTAGTGTGTGTAAGGCCATCAAGAAG G V P Q Y A F L Q Y C D I A S V C K A I K K	428
2547	ATGGACGGAGAGTACCTTGGAAATAACCGCCTCAAGCTGGGTTTGGAAAGAGCATGCCTACCAACT M D G E Y L G N N R L K L G F G K S M P T N	450
2614	GTGTGTGGTTAGATGGGCTTTCTTCAAATGTGTCCGATCAGTATTTAACTCGGCATTTCTGCCGATA C V W L D G L S S N V S D Q Y L T R H F C R Y	473
2681	CGGACCTGTGGTAAAGGTGGTGTGTTGACCGCTTGAAAGGCATGGCTCTGGTTCTCTACAGCGAGATC G P V V K V V F D R L K G M A L V L Y S E I	495
2748	GAGGATGCACAGGCGGCTGTCAAGGAGACCAAGGGCAGGAAAATTGGTGGGAATAAGATTAAGGTGG E D A Q A A V K E T K G R K I G G N K I K V	517
2815	ACTTTGCAAATCGGGAAAGCCAACTGGCATTTTATCACTGCATGGAGAAATCTGGTCAGGATATGAG D F A N R E S Q L A F Y H C M E K S G Q D M R	540
2882	AGACTTCTATGAAATGCTAACAGAGAGAAAGGGCAGGGCAGATGGCTCAGTCCAAGCATGAAGACTGG D F Y E M L T E R R A G Q M A Q S K H E D W	562
2949	AGTGCAGATGCCAGAGCCACATAAATGCCGAGAGGAACGAAGAGGGTCTATGAGTACAGTCAAG S A D A Q S P H K C R E E R R G S Y E Y S Q	584
3016	AACGGACATACTATGAAAATGTTTCGCACTCCAGGCACCTACCCTGAGGACTCCAGGAGGGACTATCC E R T Y Y E N V R T P G T Y P E D S R R D Y P	607
3038	GGCTCGGGGAGAGAGTTTTACTCGGAGTGGGAGACGTACCAAGGAGAGTATTATGACTCCCGGTAC A R G R E F Y S E W E T Y Q G E Y Y D S R Y	629

**Abb. 30: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des mfc34-Gens**

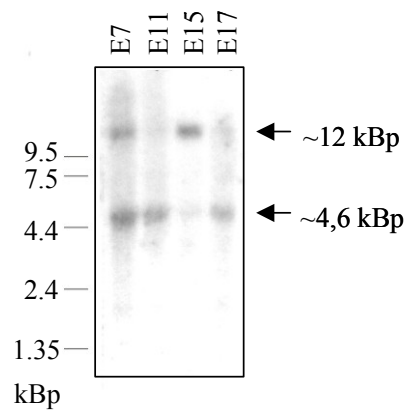
Die durchgehende Numerierung der Nukleotide ist links, die Aminosäurenumerierung ist am rechten Seitenrand angegeben. RRM-Motive sind eingerahmt. Das wahrscheinlich alternativ gespleißte 1208 Bp-Exon ist unterstrichen. Das alternative gespleißte 99 Bp Exon ist rot, das 69 Bp Exon ist blau gekennzeichnet. Der Beginn und das Ende des Ursprungsklons Efc34 ist durch Pfeile gekennzeichnet. Abgebildet sind nur die ersten 629 Aminosäuren, die weitere Sequenz entspricht der unter der Accession-Nummer AF156529 abgelegten Sequenz.

### 3.2.3.5 Northern Analyse zur Bestimmung der Transkriptgröße von mfc34

Zur Bestimmung der Transkriptgröße von mfc34 wurde eine radioaktiv markierte Sonde mit einem Northern Blot (Clontech) hybridisiert. Die Sonde wurde durch RT-PCR aus Maus-Gesamt RNA (E14,5) mit den Primern P34.1F und P34.1R generiert und radioaktiv markiert (siehe 2.7.1). Auf dem Autoradiogramm des Northern-Blots, der in jeder Spur jeweils 2 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA auf verschiedenen Entwicklungsstadien der Maus enthielt, zeigt sich, dass das Gen wahrscheinlich in zwei alternativen Formen exprimiert wird. Nach dreitägiger Exposition konnte bei dem Entwicklungsstadium E7 ein etwa 12 kBp und ein ca. 4,6 kBp großes Transkript nachgewiesen werden. Bei den Entwicklungsstadien E11 und E17 konnte nur das kleinere Transkript und bei E15 nur das große Transkript nachgewiesen werden (Abb. 31).

Die Northern-Blot Analyse bestätigt das durch RT-PCR ermittelte Ergebnis, dass mfc34 in Form unterschiedlich großer Transkripte vorliegt. Im Northern-Blot sind nur die Transkripte

nachweisbar, die sich deutlich in ihrer Größe unterscheiden. Transkripte, die sich in den 69 Bp bzw. 99 Bp Exons unterscheiden, sind im Northern-Blot aufgrund der geringen Größenunterschiede nicht nachweisbar.

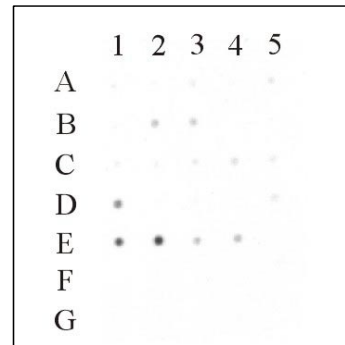


**Abb. 31: Northern Blot Analyse des murinen mfc34 Gens.**

Autoradiogramm eines fetalen Maus-Blots, mit jeweils 2  $\mu\text{g}$  Poly(A<sup>+</sup>) RNA des angegebenen Entwicklungsstadiums nach Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten PCR-Produkt P34.1F/P34.1R (3 Tage Exposition).

Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde ein Maus RNA Master Blot (Clontech) hybridisiert. Dieser enthielt poly(A)<sup>+</sup>-RNA von 22 verschiedenen adulten Mausgeweben und sieben verschiedenen Kontroll-RNAs bzw. -DNAs. Deutliche Signale waren in den RNAs verschiedener Entwicklungsstadien der Maus nachweisbar (3 Tage Exposition) (E11>E7>E25/E17). Sehr schwache Signale waren in der Skelettmuskulatur, in der glatten Muskulatur und in Hoden adulter Mäuse zu finden (Abb. 32).

	1	2	3	4	5
<b>A</b>	<b>Gehirn</b>	Auge	Leber	Lunge	Niere
<b>B</b>	Herz	Skelettmusk.	glatte Musk.		
<b>C</b>	Bauchspeicheldrüse	Schilddrüse	Thymus	submax. Drüse	Milz
<b>D</b>	Hoden	Ovar	Prostata	Nebenhoden	Uterus
<b>E</b>	Embryo E7	Embryo E11	Embryo E15	Embryo E17	
<b>F</b>	Hefe Gesamt RNA	Hefe t-RNA	E. coli RRNA	E. coli DNA	
<b>G</b>	poly r(A)	c <sub>0</sub> t DNA	Maus DNA	Maus DNA	



**Abb. 32: Dot Blot Analyse des murinen mfc34-Gens**

Autoradiogramm eines kommerziell erworbenen RNA-Dot Blots (Clontech) nach Hybridisierung mit dem radioaktiv markierten PCR-Produkt P34.1F/P34.1R (3 Tage Exposition). Deutliche Signale sind bei den RNAs isoliert aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zu erkennen. Schwache Hybridisierung zeigt sich auch in Skelettmuskulatur, glatter Muskulatur und Hoden isoliert aus adulten Mäusen.

### 3.2.3.6 Chromosomale Lokalisation von mfc34

Die chromosomale Lokalisation des Maus mfc34-Gens erfolgte mit Hilfe von Maus/Hamster-Hybridzellen (Radiation Hybrids, Research Genetics, Inc, USA). Mit Hilfe der Primerkombination PXL1.1/1H1 konnten 45 positive und 55 negative Hybridklone identifiziert werden. Die Auswertung und Zuordnung der chromosomalen Lokalisation erfolgte am Jackson Institut (Bar Harbor, USA) ([www.jax.org/resources/documents/cmdata](http://www.jax.org/resources/documents/cmdata)). Die Ergebnisse ergaben eine LOD-Score von 13.7 zu dem chromosomalen Marker D4Mit340. In Abb. 33 ist die Lage von mfc34 auf Maus-Chromosom 4 und die bekannten Marker eingezeichnet.

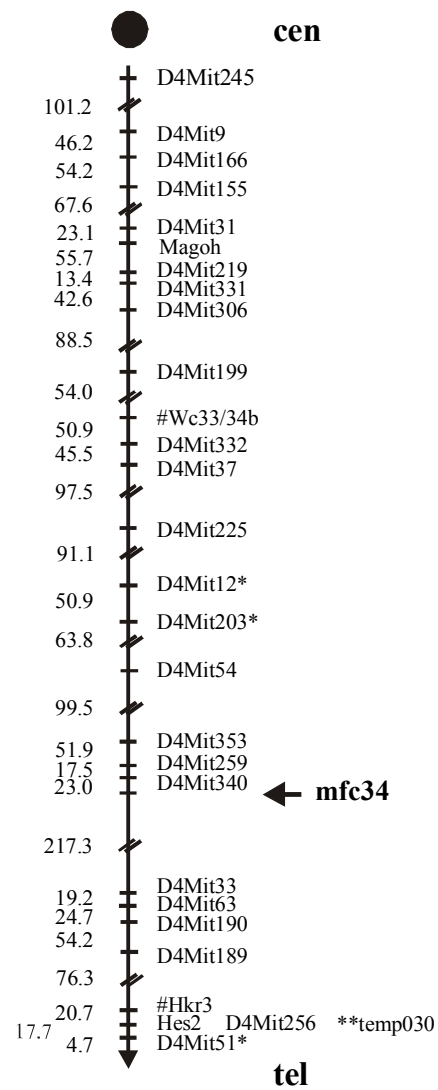


Abb. 33: Lage von mfc34 auf Maus-Chromosom 4

### 3.3 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)

Die Methode SAGE (serial analysis of gene expression) wurde 1995 von V. Velculescu et al. entwickelt und erlaubt die Erstellung globaler Expressionsprofile.

Ausgangsmaterial ist mRNA, die mit Hilfe eines biotinylierten Oligo-d(T)-Primers in doppelsträngige cDNA umgeschrieben wird (Abb. 34). Diese cDNA wird mit einer Restriktionsendonuklease (Ankerenzym) verdaut, von der man annimmt, dass sie jedes Transkript mindestens einmal schneidet. Typischerweise werden Restriktionsenzyme mit einer 4 Bp-Erkennungsstelle verwendet. Durch Bindung an Streptavidin-Kügelchen können die am meisten 3'-gelegenen Restriktionsfragmente der Transkripte isoliert werden. Anschließend wird der Ansatz halbiert und es wird jeweils ein spezifischer Linker kovalent an das 5'-Ende der Fragmente gebunden. Dieser Linker besitzt eine Typ II-Restriktionserkennungsstelle, so dass nach Restriktion mit dem sogenannten „Tagging“ Enzym (z. B. BsmFI) ein Konstrukt aus Linkersequenz und kurzer Sequenzabfolge der cDNA entsteht. Diese kurzen cDNA-Abschnitte welche „Tags“ genannt werden, haben eine Länge von 12-13 Bp und charakterisieren somit ein spezifisches Transkript. Nach Auffüllen der überstehenden Enden werden die beiden Ansätze vereinigt und die „Tags“ kovalent verknüpft. Die so entstandenen „Ditags“ (24-26 Bp), die von Restriktionsschnittstellen des Ankerenzym flankiert werden, dienen als Matrize in einer anschließenden PCR-Reaktion mit Linkerspezifischen Primern. Durch Restriktion mit dem Ankerenzym werden die Linkeranteile abgeschnitten, die „Ditags“ werden über ihre kohesiven Enden konkatemerisiert und in einen geeigneten Vektor kloniert. In der abschließenden Sequenzreaktion erhält man aneinander gereihete „Ditags“ die immer durch die 4 Bp Erkennungsstelle des Ankerenzym voneinander abgegrenzt werden können. Im Durchschnitt enthält jeder Klon 12-15 „Ditags“, so dass in einer Sequenzreaktion 24-30 Transkripte analysiert werden können.



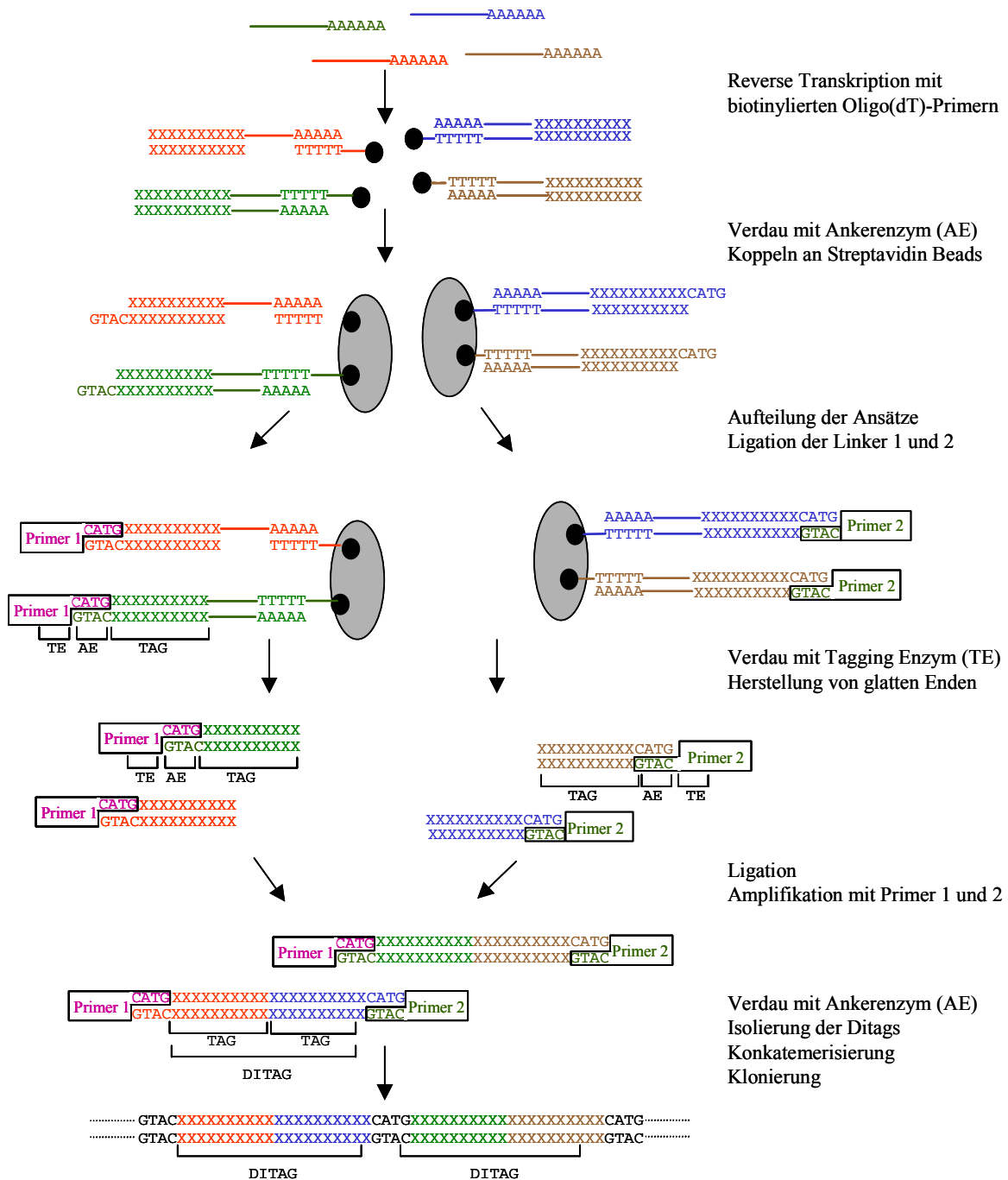


Abb. 34: Graphische Darstellung der SAGE-Methode (Velculescu et al., 1995).

mRNA wird mit einem biotinyliertem Oligo-(dT)-Primer revers transkribiert. Durch Bindung an Streptavidin-Kügelchen und anschließender Restriktion mit dem Ankerenzym (NlaIII) wird das am meisten 3'-gelegene Restriktionsfragment jedes Transkript isoliert. Der Ansatz wird halbiert und es werden zwei spezifische Linker kovalent gebunden. Jeder Linker besitzt eine Typ-II-Restriktions-erkennungssequenz. Nach Restriktion mit dem „Tagging“ Enzym (BsmFI) entsteht ein Konstrukt aus Linkersequenz und kurzer Sequenzabfolge der cDNA („Tag“). Nach Herstellung von glatten Enden, werden die beiden Ansätze wieder vereinigt und die „Tags“ werden ligiert. Die entstandenen „Ditags“ werden amplifiziert. Durch Restriktion mit dem Ankerenzym (NlaIII) werden die Linkeranteile abgetrennt. Nach Konkaterisierung der „Ditags“ werden diese in einen geeigneten Vektor kloniert und sequenziert.

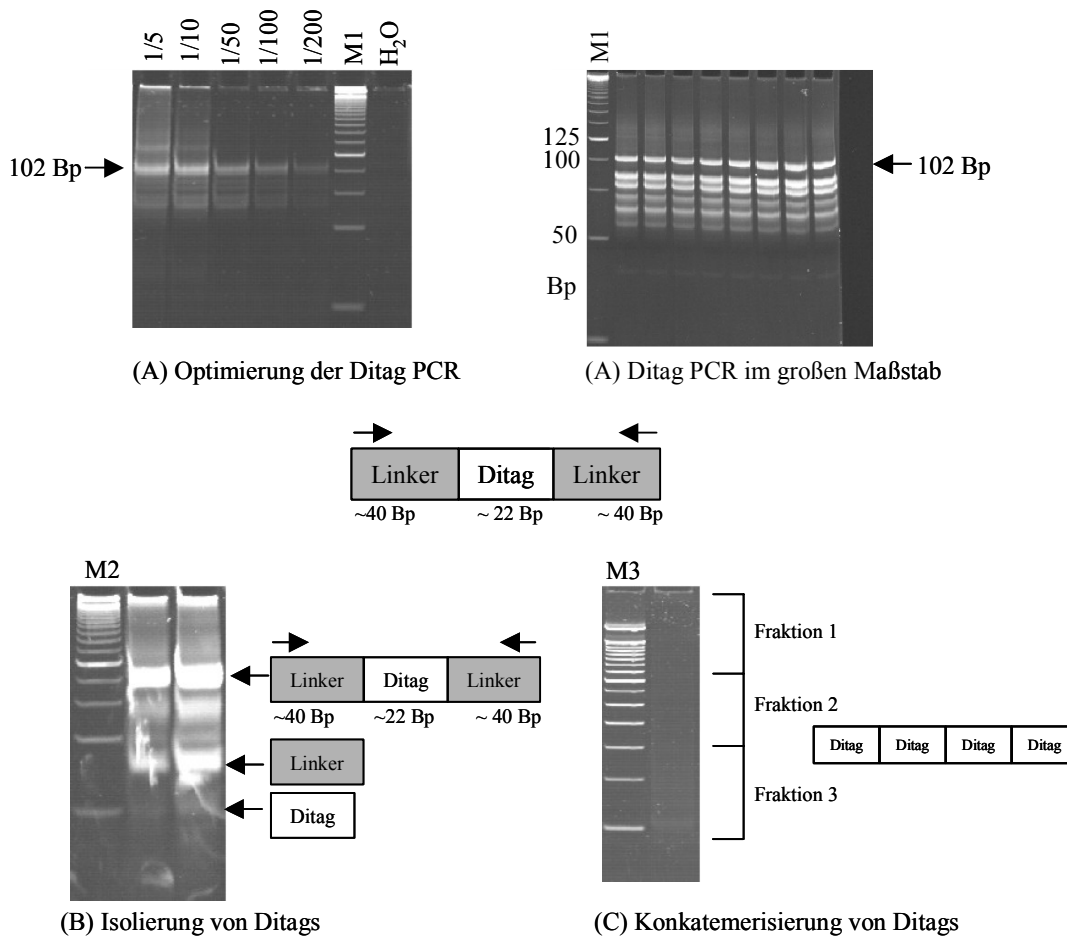
### 3.3.1 Herstellung einer Chondrosarkom-SAGE-Bank

Zur Etablierung der Methode wurde einfach zu isolierende und in großen Mengen verfügbare RNA einer Chondrosarkom-Zell-Linie (ATCC Nummer HTB-94) verwendet. Chondrosarkome (Knorpelsarkom) sind neben Osteosarkomen die zweithäufigst vorkommenden malignen Knochentumore, die sich aus embryonalen oder ausgereiftem knorpeligem Gewebe entwickelt (Pschyrembel, 1994). Die Herstellung der SAGE-Bank diene neben der Etablierung der Methode auch der Charakterisierung der Zell-Linie, die als Referenz für das durchgeführte Knorpel-EST-Projekt herangezogen werden kann.

Aus 540 µg Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Oligotex-mRNA-Kits (Qiagen, Hilden) 5,8 µg mRNA isoliert, die als Ausgangsmaterial für eine cDNA-Synthese diene. Mit Hilfe von biotinyliertem Oligo-d(T)-Primer konnten 3,4 µg doppelsträngige, biotinylierte cDNA hergestellt werden. Nach Restriktion mit NlaIII wurde der Ansatz halbiert und es erfolgte die Kopplung der am meisten 3'-gelegenen Restriktionsfragmente über die biotinylierte oligo-dT-Sequenz an magnetische Streptavidin-Kügelchen. Durch Bindung der Streptavidin-Kügelchen an den magnetischen Partikelrenner (Dynal, Oslo, Norwegen) konnten die am meisten 3'-gelegenen Restriktionsfragmente von den 5'-Bereich jedes Transkript abgetrennt werden. Sofort im Anschluss erfolgte die Ligation des doppelsträngigen Linker an das 3'-gelegene Fragment. Die Herstellung der doppelsträngigen Linker erfolgte aus einzelsträngigen Oligonukleotiden und ist unter 2.11.4 genau beschrieben. Die Linkersequenz ist so konstruiert, dass eine Typ-II-Restriktionserkennungssequenz innerhalb des Linkers liegt. Durch Restriktion mit dem Typ-II-Restriktionsenzym BsmFI wird der Linker einschließlich 10-11 Bp der cDNA abgeschnitten. Die „Linker/Tag“-Konstrukte können von den an den magnetischen Partikelrenner gekoppelten 3'-Fragmenten einfach getrennt und weiter bearbeitet werden. Vor der Ligation der „Tags“ wurden die durch die BsmFI-Restriktion entstandenen überstehenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Die Ligation der „Linker/Tag“-Fragmente über die Linkerenden sollte durch eine Modifikation der Linker an ihren 3'-Enden verhindert werden. Der Ligationsansatz stellt dann das Template für die anschließende PCR-Reaktion dar.

Nach Amplifikation der „Ditags“ mit Linker-spezifischen Primern war eine 102 Bp-Bande, bestehend aus zwei Linkern (≈ 40 Bp) und einem „Ditag“ (≈ 22 Bp), zu erwarten. Wie in Abb. 35A dargestellt konnte mit einer 1/50 Verdünnung der ligierten „Tags“ als Template in der

durchgeführten PCR eine deutliche 102 Bp Bande generiert werden. Insgesamt wurden 5x 96 PCRs durchgeführt, vereinigt und über ein Polyacrylamidgel aufgereinigt. Die isolierte 102 Bp Bande wurde nicht quantifiziert. Die Abtrennung der Linkersequenzen von den „Ditags“ erfolgte durch Restriktion mit NlaIII und anschließender Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel. Die 22-26 Bp großen „Ditag“-Banden wurden so von den 40 Bp großen Linkers, sowie von ungeschnitten „Linker-Ditag“ Anteilen getrennt (Abb. 35B). Nach Konkatemisierung der „Ditags“ war ein Gemisch aus unterschiedlich langen Fragmenten zu erwarten. Einer weiteren Sequenzierung sollten nur die Fragmente unterworfen werden, die aus möglichst vielen aneinandergereihten „Ditags“ bestehen. Aus diesem Grund wurden die konkatemisierten „Ditags“ auf einem 8%igem Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden drei Fraktionen unterschiedlicher Größe aus dem Gel ausgeschnitten (Abb. 35B), aus dem Gel eluiert und in pZero-Vektor kloniert. Die Transformation lieferte aus der ersten Fraktion 1750 Kolonien, aus Fraktion 2 2800 und Fraktion 3 2750 Kolonien. PCR-Analyse mit vektorspezifischen M13F/M13R-Primern zeigte, daß ungefähr 50% der Fraktion-1-Kolonien ein Insert besaßen, wobei die Insertgröße zwischen 500 und 700 Bp variierte. Ungefähr 75% der Fraktion-2-Kolonien besaßen ein Insert mit einer Integratgröße von 250-500 Bp, während bei Kolonien der Fraktion 3 keine Integrate nachweisbar waren.



**Abb. 35:** „SYBR-Green“-gefärbte Polyacrylamid-Gele [Bei (A) und (B) 12%, bei (C) 8%] mit Beispielen verschiedener Schritte der SAGE-Methode.

- (A) Jeweils 1 µl unterschiedlicher Verdünnungen (1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/200) der ligierten „Tags“ dienten als Matrize zur Amplifikation der „Ditags“ (28 Zyklen). Deutlich ist neben mehreren Hintergrund-Banden, eine 102 Bp-Bande, die den amplifizierten „Ditags“ entspricht, zu erkennen. Nach Optimierung der PCR-Bedingungen wurde von der 1/50 Verdünnung die „Ditag“-PCR im 96-Lochformat durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden vereinigt, gefällt und auf einem präparativen Gel aufgetrennt. Die 102 Bp-Bande wurde ausgeschnitten und aufgereinigt.
- (B) Nach Restriktion mit NlaIII zum Abtrennen der Linker-Anteile, wurde der Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die 22-26 Bp große „Ditag“-Bande ausgeschnitten und aufgereinigt.
- (C) Die isolierten „Ditag“ wurden konkaterisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden drei Bereiche unterschiedlicher Größe aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und in pZero-Vektor kloniert. M1 25 Bp-Leiter, M2 20 Bp-Leiter, M3 100 Bp-Leiter.

### 3.3.2 Auswertung der Sequenzdaten

Insgesamt wurden 249 Integrate mittels M13R/M13F-PCR amplifiziert und doppelsträngig sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst mit Hilfe der "Sequencher"-Software Version 3.0 (Gene Codes Corporation) editiert, Vektorsequenz-Anteile wurden abgetrennt. Die editierten Sequenzdaten wurden im Anschluss mit der "SAGE"-Software Version 1.00, die von der John Hopkins Universität (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt wurde, ausgewertet. Das Programm zerlegt zunächst Konkatemere in „Ditags“. Im Anschluß werden die „Ditags“ in „Tags“ getrennt und in 5'→3'-Orientierung in ein Projekt abgelegt. Die Parameter bei der Erstellung des Projekts wurden so gewählt, dass die „Tags“ aus 10 Bp bestehen und die „Ditags“ eine Länge von 24 Bp nicht überschreiten sollten. „Ditags“ die größer als 24 Bp, kleiner als 20 Bp sind bzw. sich aus zwei identischen „Tags“ zusammensetzten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Sequenzierung der 249 Integrate führte zur Generierung von 3335 „Ditags“ (6670 „Tags“), d. h. dass sich im Durchschnitt jedes Integrat aus 13 „Ditags“ zusammensetzt. Von der „Sequencher-Software“ wurden 412 „Ditags“ aussortiert, da diese die erforderlichen Parameter nicht erfüllten, sodass insgesamt 6258 „Tags“ weiter untersucht werden konnten.

Die Auswertung der „Tag“-Sequenzinformation ergab, dass die 6258 „Tags“ 3477 verschiedene Sequenzen repräsentieren. Der Hauptanteil (78,8%) lag als Einzelkopien vor, gefolgt von einer Fraktion von 632 „Tags“ (18,2%) die in einer Kopienzahl zwischen 2 und 5 vorkamen. Lediglich zwei „Tags“ konnten in einer Kopienzahl größer 50 nachgewiesen werden (Tab. 14).

**Tabelle 14**  
**Prozentuale Verteilung aller ausgewerteten „Tags“**

Kopienzahl der einzelnen „Tags“	Anzahl aller „Tags“	Anzahl verschiedener „Tags“	GenBank Treffer
>100	496 (7,9%)	1 ( 0,03%)	0
50 und ≤100	81 (1,3%)	1 (0,03%)	0
10 und ≤50	830 (13,3%)	42 (1,2%)	35 (81%)
>5 und ≤10	451 (7,2%)	62 (1,8 %)	51 (82%)
>1 und ≤5	1661 (26,5%)	632 (18,2%)	383 (60,6%)
1	2739 (43,8%)	2739 (78,8%)	nicht ausgewertet
<b>Gesamt</b>	6248 (100%)	3477 (100%)	469 (63,7%)

Im Anschluss wurden die „Tags“ auf Homologie zu bereits bekannten Nukleotidsequenzen untersucht. Dafür musste innerhalb der „SAGE“-Software eine Datenbank aller verfügbarer humaner Sequenzen (NCBI-release 104) erstellt werden. Nach Kopieren aller in der NCBI-nr-Datenbank veröffentlichten Sequenzen, wurden diese von der „SAGE“-Software in Fragmente zerlegt. Diese Fragmente bestanden aus 10-Bp die sich in 3'-Orientierung direkt an eine NlaIII-Schnittstelle anschliessen. Die Parameter der „SAGE“-Software sind vom Hersteller so eingestellt, dass nur die „Tags“ einem Sequenzvergleich unterworfen werden, die mit mindestens zwei Kopien nachgewiesen werden konnten. Von 3477 verschiedenen „Tags“ wurden demzufolge nur 738 „Tags“ mit der erstellten Datenbank verglichen. Wie aus Tabelle 14 hervorgeht zeigen 469 „Tags“ (63,7) Homologie zu bekannten Sequenzen, 269 „Tags“ zeigen keine Homologie an. In Tabelle 15 sind die 40 häufigsten „Tags“ aufgelistet und die Ergebnisse der Homologievergleiche. Auffällig ist, dass die zwei „Tags“ die am häufigsten nachgewiesen werden konnten, keine Homologie anzeigen. Es stellt sich heraus, dass es sich um Fragmente der verwendeten Linker handelte. Besonders hervorzuheben ist des Weiteren, dass von diesen 40 „Tags“ 16 Homologie zu verschiedenen ribosomalen Proteinen zeigen.

**Tabelle 15**

**Liste der 40 häufigsten „Tags“ und deren Homologie**

<b>„Tag“</b>	<b>Gen (Accession Nummer)</b>	<b>Häufigkeit</b>	<b>Prozent</b>
TCCCTATTAA	keine Homologie (Linker)	496	7,9%
TCCCCGTACA	keine Homologie (Linker)	81	1,3%
TGTGTTGAGA	Translations-Elongationsfaktor 1 alpha (Hs.181165)	44	0,7%
CCCGTCCGGA	Ribosomale Protein L13 (Hs.180842)	40	0,64%
TTGGGGTTTC	Ferritin H chain mRNA (M11146)	37	0,59%
ATGGCTGGTA	mRNA für LLRep3 (X17206)	36	0,57%
TCCCCGTACAT	keine Homologie (Linker)	32	0,51%
GCTTTATTTG	Beta-Aktin Gen (M10277)	31	0,49%
TTGGTGAAGG	Thymosin-beta 4 (Hs.75968)	30	0,48%
CCTAGCTGGA	Cyclophilin A (Hs.182937)	29	0,46%
CGCCGCCGGC	Ribosomale Protein L35 (Hs.182825)	29	0,46%
GTGAAACCCC	Homologie zu 23 verschiedenen Genen (u. a. deoxyribonuclease II; Thymopoietin)	25	0,39%
CGCCGGAACA	Ribosomale Protein L4 (Hs.286)	24	0,38%
AACGCGGCCA	Makrophagen Migration inhibitorischer Faktor (Hs.73798)	23	0,36%
CCCTGGGTTTC	Ferritin (leichte Kette) (Hs.111334)	23	0,36%
CTAGCCTCAC	Aktin (gamma) (Hs.14376)	23	0,36%
AGGCTACGGA	Ribosomale Protein L13a (Hs.119122)	22	0,35%
TGGTGTGAG	Ribosomale Protein S18 (Hs.75362)	22	0,35%
TTGGTCCTCT	Ribosomale Protein L41 (Hs.108124)	21	0,33%
CACAAACGGT	Ribosomale Protein S27 (Hs.195453)	18	0,28%
CTTCCAGCTA	Annexin A2 (Hs.217493)	17	0,27%
CCGTGACTCT	Follistatin-like 1 (Hs.155712)	16	0,25%
GCCCCAATA	Lektin (Hs.227751)	16	0,25%
GCCGTGTCCG	Ribosomale Protein S6 (Hs.241507)	16	0,25%
GTGCTGAATG	Myosin (Hs.77385)	16	0,25%
GTGACCACGG	Glutamate receptor (Hs.36451)	15	0,24%
ATGTGAAGAG	Osteonektin (Hs.111779)	14	0,22%
CAGCAGAAGC	ESTs, Highly similar to GLUTAMATE (Hs.244733)	14	0,22%
CCTGTAATCC	Homologie zu 23 verschiedenen Genen (u. a.: Homo sapiens clone 23716 mRNA sequence; tumor necrosis factor receptor superfamily; cathepsin S)	14	0,22%
GTGAAGGCAG	Ribosomale Protein S3A (Hs.77039)	14	0,22%
AGCTCTCCCC	Ribosomale Protein L17 (Hs.82202)	13	0,20%
CGCTGGTTCC	Ribosomale Protein L11 (Hs.179943)	13	0,20%
GAGGGAGTTT	Ribosomale Protein L27a (Hs.76064)	13	0,20%
GCCTGTATGA	Ribosomale Protein S24 (Hs.180450)	13	0,20%
TACCATCAAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Hs.195188)	13	0,20%
TCCAAATCGA	Vimentin (Hs.2064)	13	0,20%
CCCCCTGGAT	PITSLRE proteins (cell division cycle 2-like 1) (Hs.183418)	13	0,20%
GGCAAGCCCT	Ribosomale Protein (Hs.178551)	12	0,19%
TTGTAATCGT	Ornithine decarboxylase antizyme (Hs.125078)	12	0,19%
AAGGTGGAGG	Ribosomale Protein L18a (Hs.163593)	11	0,17%
AGGGCTTCCA	Ribosomal protein L10 (Hs.29797)	11	0,17%

Im Anschluss wurde ein Homologievergleich gegen eine erstellt EST-Datenbank durchgeführt. Hier zeigten nur noch 27 „Tags“ keine Homologie an, alle übrigen „Tags“

konnten bestimmten ESTs zugeordnet werden. Diese 27 „Tags“ wurden gegen eine öffentliche SAGE-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/SAGEtag.cgi>) verglichen, die sich aus 1728516 „Tags“ aus 41 unterschiedlichen SAGE-Banken zusammensetzt. 14 der 27 untersuchten „Tags“ zeigten Homologie zu ESTS die durch UniGene-Cluster charakterisiert sind.

**Tabelle 16**

**Darstellung der 27 „Tags“ die nach ersten Untersuchungen keine Homologie zeigen**

„Tag“	Gen ( <i>Accession Nummer</i> )	<i>vorkommen in anderen Banken</i>
TCCCCTACAT	keine Homologie	38
CAGCGCGCCC	Hs.152932 : ESTs	35
TCCCATTAAA	keine Homologie	3
TCCGTATTAA	keine Homologie	35
CCGACGTCTT	keine Homologie	0
CGCAAGCTGG	Hs.77886 : lamin A/C	30
GATAGGTCGG	Hs.154721 : iron-responsive element binding protein 1	29
TCCCCGTAAA	keine Homologie	18
TCCCGACATC	keine Homologie	19
TCCCTATTGG	keine Homologie	3
TCCTTATTAA	Hs.148589 : ESTs	37
ATTTTGTGTC	Hs.75056 : adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	28
CCCCGTACAT	keine Homologie	34
CCCGGGCGGC	keine Homologie	0
CGCCGAGCAC	Hs.123426 : ESTs, Weakly similar to predicted using Genefinder [C.elegans]	10
CGCGGCGGCG	Hs.134012 : C1q-related factor	8
CTGCCTCCGT	Hs.12851 : ESTs, Moderately similar to phosphatidylserine synthase-2 [M.musculus]	25
GATACCTGGA	keine Homologie	1
GCCCCCCCGT	Hs.85573 : ESTs, Weakly similar to !!!! ALU SUBFAMILY SX WARNING ENTRY !!!! [H.sapiens]	30
GTATGACCAG	Hs.75416 : KIAA0058 gene product, in 14 anderen Banken	14
GTCCTCACTA	Hs.153445 : Human mRNA for unknown product, partial cds	9
GTTTTATGCG	Hs.34665 : ESTs	12
TCCCCGTAGA	keine Homologie	6
TCCCCTATTA	keine Homologie	32
TCCCGATTAA	keine Homologie	17
TTAGAATGTT	Hs.27379 : ESTs	7
TTGGGGTCCA	keine Homologie	0



## 4. Diskussion

### 4.1 Das *FGFR3*-Gen

#### 4.1.1 Merkmale der FGFR-Familie

Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) regulieren Zellproliferation, Differenzierung und Migration in verschiedenen Geweben über komplizierte Signaltransduktionsmechanismen. Bisher konnten mindestens 18 strukturell ähnliche FGF-Proteine isoliert werden (Ohbayashiet al., 1998), die mit einer Vielzahl von Funktionen wie z.B. Embryonalentwicklung, maligner Transformation, Angiogenese und Wundheilung in Verbindung gebracht werden (Wilkie et al., 1995). Die Weiterleitung der FGF-Signale in das Cytoplasma erfolgt über eine Gruppe von Tyrosinkinase-Rezeptoren, den sogenannten Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR). Zur Zeit sind vier verschiedene Gene (*FGFR1-FGFR4*) (Dionnen et al., 1990; Keegan et al., 1991; Partanen et al., 1991) bekannt, die für strukturell sehr ähnlich aufgebaute Rezeptoren codieren. Die Rezeptoren setzen sich aus einem extrazellulären Anteil mit zwei oder drei glykosylierten Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären, geteilten Tyrosinkinasedomäne zusammen. Die vier humanen FGFR-Proteine weisen eine Aminosäurehomologie von 55-72% (Johnson und Williams, 1993) auf, sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Ligandenbindungsspezifität und in der Gewebeverteilung (Peters et al., 1992; Peters et al., 1993; Miki et al., 1992; Werner et al., 1992). In den letzten Jahren konnten bei den Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren 1, 2 und 3 zahlreiche Mutationen als Ursache unterschiedlicher Skelettdysplasien und Kraniosynostosen ausgemacht werden (Übersichtsartikel: Passos-Bueno et al., 1999; Kannan und Givol, 2000), im FGF-Rezeptor 3 konnten darüber hinaus Mutationen bei verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (Cappellen et al., 1999).

#### 4.1.2 Die genomische Struktur des humanen *FGFR3*-Gens im Vergleich mit der murinen *Fgfr3* Sequenz

Das *FGFR3*-Gen codiert für eine 4,5 kBp große mRNA, die einen offenen Leserahmen von 2193 Nukleotiden umfasst und in die Chromosomenregion 4p16.3 kartiert (Keegan et al., 1991, Thompson et al., 1991). Die Aufklärung der genomischen Sequenz des *FGFR3*-Gens in der vorliegenden Arbeit erfolgte durch teilweise Sequenzierung eines Cosmidklons, der die gesamte humane *FGFR3*-cDNA-Sequenzinformation enthält. Die Sequenzanalyse ergab, dass das *FGFR3*-Gen aus 19 Exons und 18 Introns besteht und ungefähr 16 kBp umfasst. Davon stellen 11 kBp Intronsequenzen und 4,2 kBp Exonsequenzen dar. Die Exons haben eine durchschnittliche Größe von 150 Bp, die Größe der Introns variiert zwischen 80 Bp und 5 kBp.

Die exakte Transkriptions-Initiationsstelle konnte experimentell nicht ermittelt werden, da wahrscheinlich aufgrund starker Sekundärstrukturen die Amplifikation des 5'-Bereichs des Gens nicht möglich war. Dieser Bereich wurde durch direkte Sequenzierung eines genomischen Klons untersucht. Insgesamt wurden 916 Bp vor dem publizierten Translations-Initiationsstart sequenziert. Aufgrund der signifikanten Homologie der ermittelten humanen Sequenz zu dem entsprechenden murinen *Fgfr3*-Sequenzabschnitt (Abb. 7) (Perez-Castro et al., 1995) wurde die Größe und die genaue Position des humanen Exon 1 und Intron 1 festgelegt (Wuechner et al., 1997). Wie bei dem murinen Gen konnten auch bei dem humanen *FGFR3*-Gen keine regulatorischen Sequenzabschnitte wie *TATA*- bzw. *CAAT*-Boxen in der Promotorregion nachgewiesen werden. Statt dessen zeigte die weitere Sequenzanalyse zahlreiche CpG-Inseln, sowie Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, u. a. Sp1, AP2 und KROX24 (Abb. 7). Der Hauptanteil dieser Transkriptionsfaktor-Bindestellen ist innerhalb von 400 Bp in der 5'-flankierenden Region, ein Bereich, der im Vergleich mit der Maussequenz stark konserviert ist. Auch ist der Abstand und die Position der Transkriptionsfaktor-Bindestellen zwischen Maus und Mensch sehr ähnlich. Das Vorliegen dieser regulatorischen Elemente sowie die signifikante Übereinstimmung zu der Maus-Sequenz lassen die Vermutung zu, dass es sich bei dem Sequenzabschnitt um einen regulatorisch wichtigen Abschnitt handelt.

Von McEwen und Ornitz (1998) durchgeführte Untersuchungen am murinen *Fgfr3*-Promotor konnten die beschriebenen Vermutungen bestätigen. Sie zeigten, dass ein Sequenzabschnitt von nur 100 Bp vor der Transkriptions-Initiationsstelle ausreicht, um eine 20-40fache

Verstärkung der Transkriptionsaktivität zu erreichen. Die Aktivität der Transkription wurde zusätzlich durch purinreiche Sequenzmotive innerhalb von Intron 1, woran Mitglieder der Sp1-Transkriptionsfaktor-Familie binden können, verstärkt. Diese Sequenzmotive konnten auch im Intron 1 des humanen *FGFR3*-Gens nachgewiesen werden.

Der weitere Sequenzvergleich der humanen mit der murinen genomischen *FGFR3*-Struktur lässt ebenfalls deutliche Übereinstimmungen erkennen. Der Nukleotidsequenzvergleich der codierenden Region zeigt eine Identität von 85,2% zwischen Mensch und Maus und weist, mit Ausnahme der Exons 1 und 2 (Tabelle 5), die den 5'-untranslatierten Bereich codieren, fast identische Exongrößen auf. Obwohl auch die Introngrößen fast identisch sind, liegt die Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen nur bei durchschnittlich 51,9%. Diese Homologie ist deutlich niedriger als z. B. die Sequenzübereinstimmungen der murinen und humanen *COL2A1* Intronsequenzen, die zwischen 60% und 75% liegen (Ala-Kokko et al., 1996). Die Sequenzübereinstimmung der meisten Introns variiert zwischen 42% und 58%, die Introns 1, 8, 12, 13 und 18 zeigen höhere Übereinstimmungen zwischen 64% und 67%. Möglicherweise resultiert diese höhere Sequenzübereinstimmung auf dort lokalisierten funktionell relevanten Sequenzabschnitten (z. B. Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen).

Ein charakteristisches Merkmal der verschiedenen FGFRs ist das Vorliegen zahlreicher strukturell unterschiedlicher Varianten, die aufgrund alternativen Spleißens entstehen können. Bei den drei FGF-Rezeptoren 1-3 sind u. a. Varianten bekannt, die sich in einem ungefähr 50 Aminosäure-langen Abschnitt in der C-terminalen Hälfte der dritten Immunglobulin-ähnlichen Domäne unterscheiden. Durch gewebespezifisches Spleißen der sich gegenseitig ausschließenden Exons 8 bzw. 9 entstehen so die Varianten IIIb bzw. IIIc, die sich in ihrer Ligandenbindungsspezifität unterscheiden. Durch Untersuchungen an dem *FGFR2*-Gen konnten drei Sequenzabschnitte identifiziert werden, die wesentlichen Einfluss auf das spezifische Spleißen der IIIb-Variante haben (Gilbert et al., 1993; Del Gatto et al., 1995). So wurde u. a. gezeigt, dass eine pyrimidinreiche Sequenz in direkter Nähe der Spleiß-Donorstelle des Introns 7 essentiell für das Spleißen von Exon IIIb ist. Durch Entfernung dieser Sequenz wird das Spleißen von Exon IIIb blockiert (Del Gatto et al., 1995). Dieser Sequenzabschnitt konnte im Intron 7 des murinen als auch des humanen *FGFR3*-Gen nachgewiesen werden. Jedoch kann im Fall von *FGFR3* diese Sequenzabfolge nur erwähnt und ihre mögliche Verknüpfung mit alternativen Spleißmechanismen, aufgrund der Zugehörigkeit der Rezeptoren zu einer Genfamilie, vermutet werden. Weitere Experimente

müssten durchgeführt werden, um die genaue Funktion dieser pyrimidinreichen Sequenz zu ermitteln.

Durch die Aufklärung der genomischen Struktur des humanen *FGFR3*-Gens und die vergleichende Untersuchung mit dem murinen *Fgfr3*-Gen konnten somit Erkenntnisse gewonnen werden, die bei der weiteren Aufklärung der Genfunktion und Genregulation hilfreich sind.

#### 4.1.3 Klinisches Spektrum der *FGFR3*-Defekte und ihre molekulare Ursache

Molekulargenetische Untersuchungen aus den vergangenen Jahren zeigten, dass die Achondroplasie (ACH), die Hypochondroplasie (HCH) sowie die Thanatophore Dysplasie (TD), die aufgrund radiologischer Befunde als sogenannte Achondroplasie-Skelett-dysplasiefamilie zusammengefasst wurden, durch Mutationen im *FGFR3*-Gen hervorgerufen werden (Shiang et al., 1994; Rousseau et al., 1994; Superti-Furga et al., 1995; Bellus et al., 1995A und B; Tavormina et al., 1995). Die Achondroplasie ist die häufigste Osteochondrodysplasie, sie kommt mit einer Frequenz von 1:15000 vor. Sie wird autosomal-dominant vererbt und ist im wesentlichen charakterisiert durch dysproportionierten Kleinwuchs mit rhizomel verkürzten Extremitäten, Makrozephalie mit Hypoplasie des Mittelgesichts. Die Finger sind kurz, häufig findet man einen vergrößerten Abstand zwischen dem 3. und dem 4. Finger ("Dreizackhand"). Die Endgröße liegt um 131 cm (118-143 cm) bei Männern und 125 cm (112-138 cm) bei Frauen. Im Gegensatz zur Achondroplasie ist die Differenzialdiagnose der ebenfalls dominant vererbten Hypochondroplasie schwierig. Grundsätzlich haben HCH-Patienten einen ähnlichen Phänotyp wie ACH-Patienten, die Erwachsenengröße ist etwas größer und liegt zwischen 132 und 147 cm. Die typische Dysproportionierung ist oft nur angedeutet und der Minderwuchs wird meist erst im Kindesalter manifest. Die Häufigkeit der Hypochondroplasie ist aufgrund der schwierigen Abgrenzung u. a. vom konstitutionellen Kleinwuchs nur schwer abzuschätzen. Im Gegensatz hierzu ist die letale Thanatophore Dysplasie schon vor bzw. bei der Geburt aufgrund schwerem dysproportioniertem Kleinwuchs mit ausgeprägtem Makrozephalus und eventuell Kleeblattschädel erkennbar. Die Patienten haben einen schmalen Thorax mit stark verkürzten Rippen, sie sterben aufgrund respiratorischer Insuffizienz meist unmittelbar nach der Geburt. Eine Unterteilung in TD-Typ I bzw. -Typ II erfolgt aufgrund der Form der Femora. Der Typ I

ist durch eine lateralkonvexe Krümmung der Femora charakterisiert, die bei der TD-Typ II fehlt.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass *FGFR3*-Mutationen nicht nur zu dysproportioniertem Kleinwuchs führen, sondern auch bei Erkrankungen aus der Gruppe der Kraniosynostose-Syndrome, die sonst hauptsächlich durch *FGFR1*- bzw. *FGFR2*-Genmutationen bedingt sind (Jabs et al., 1998), nachzuweisen waren. So konnten Meyers und Mitarbeiter (1995) bei einigen Fällen mit Crouzon-Syndrom und Hautveränderungen (*Acanthosis nigricans*) eine Ala391Glu-Mutation im *FGFR3*-Gen aufdecken. Des Weiteren konnten bei Fällen von nichtsyndromatischer Kraniosynostose eine *FGFR3*-Pro259Arg-Mutation nachgewiesen werden (Bellus et al., 1996). Interessanterweise zeigen diese Patienten im Gegensatz zu den Patienten mit Erkrankungen aus der Achondroplasie-Gruppe ein normales Längenwachstum. Somit führen Mutationen im *FGFR3*-Gen nicht nur zu ähnlichen Erkrankungen mit graduell unterschiedlichen Schweregraden, sondern sie können auch die Ursache von phänotypisch sehr verschiedenen Krankheitsbildern sein.

Das Spektrum spezifischer *FGFR3*-Mutationen lässt sich noch weiter ausdehnen. So haben jüngste Untersuchungen gezeigt, dass *FGFR3* auch eine onkogene Funktion zukommen kann. Chesi et al. (1996; 1997, 1998) konnte nachweisen, dass es bei den vom Knochenmark ausgehenden multiplen Myelomen zur Translokation zwischen dem IgH-Locus auf Chromosom 14 und weiteren Loci kommt. In 20-25% der untersuchten multiplen Myelomen konnte der Translokationsbruchpunkt t(4;14) ca. 50-100 kBp von *FGFR3* entfernt nachgewiesen werden (Chesi et al., 1997). Neben der Überexpression des *FGFR3*-Gens in den untersuchten Geweben bzw. Zelllinien konnten auch in wenigen Fällen Mutationen im *FGFR3*-Gen identifiziert werden (Chesi et al., 1997). Aufgrund weiterer Untersuchungen der Translokationsbruchstelle t(4;14) wurde das *WHSC1*- (*MMEST*)-Gen kloniert, das als Folge der Translokation ebenfalls überexprimiert wird (Chesi et al., 1998). Experimente, die die Bedeutung von *FGFR3* speziell in epithelialen Tumoren untersuchten, zeigten, dass in den meisten der untersuchten Blasen- bzw. Cervixkarzinomen auch eine *FGFR3*-Überexpression nachgewiesen werden konnte (Cappellen et al., 1999). Durch RT-PCR-Analyse wurde gezeigt, dass speziell die *FGFR3 IIIb*-Variante, also die vor allem im epithelialen Gewebe exprimierte Form, in entartetem Gewebe nachzuweisen war. Darüber hinaus konnten in 25% der untersuchten Cervixkarzinome und in 35% der Blasenkarzinome spezifische Mutationen

im *FGFR3*-Gen nachgewiesen werden (Cappellen et al., 1999). Alle gefundenen Mutationen waren bereits in TD-Patienten bekannte Mutationen.

Die Suche nach weiteren Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens sowie die genaue Aufklärung der Signalkaskade von *FGFR3* könnte somit nicht nur zum Verständnis der Entstehung von Erkrankungen der Knorpel/Knochenentwicklung beitragen, sondern auch helfen, die Entstehung einiger Krebserkrankungen weiter aufzuklären.

Die Funktion von FGFR3 während der Knorpel-/Knochenentwicklung wurde durch die Generierung von „knock-out“- bzw. transgenen Mäusen und anhand unterschiedlicher Transfektionsexperimente intensiv untersucht. Durch Herstellung einer *Fgfr3*-„knock-out“-Maus konnte gezeigt werden, dass es durch Fehlen des Rezeptors zu einer überschießenden Proliferation von Chondrozyten und damit zu einem verstärkten Längenwachstum kommt. Die *Fgfr3*-„knock-out“-Mäuse sind im Vergleich zu den normalen Wildtyp-Mäusen deutlich größer (Colvin et al., 1996; Deng et al., 1996). Funktionell hat FGFR3 also einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten. Ein beschleunigtes Aufbrauchen der Zellschichten wird verhindert. Durch Transfektionsexperimenten mit FGFR3-Konstrukten, die spezifische ACH- (G380R) und TD (K650E)-Missense Mutationen enthielten (siehe 4.1.4; Abb. 37) konnte gezeigt werden, dass die Mutationen eine konstitutive, Liganden-unabhängige Aktivierung von FGFR3 zur Folge haben (Naski et al., 1996), wobei der Grad der Aktivierung dem Schweregrad des Krankheitsbildes entspricht. Bei Vorliegen eines durch Mutation veränderten FGF-Rezeptor-3 in den Zellmembranen kommt es also, unabhängig von der Anlagerung von Wachstumsfaktoren, zu der für den Rezeptor typischen Zusammenlagerung zweier Rezeptormoleküle (Dimerisierung) und dann zu einer überschießenden, konstitutiven Rezeptoraktivierung. Im Mausmodell der Achondroplasie (Wang et al., 1999; Segev et al., 2000) bzw. der Thanatophoren Dysplasie (Li et al., 1999) ist, ähnlich wie bei ACH-Patienten, eine Verschmälerung der entsprechenden Zonen in der Wachstumsfuge zu beobachten, die dann letztendlich in einem verminderten Längenwachstum resultiert. Die Inhibierung des Zellwachstums in der Wachstumsfuge wird möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor Stat1 („signal transducer and activator of transcription“) vermittelt. Su und Mitarbeiter (1997) zeigten, dass die TD2-Mutation (K644E) die Translokation von Stat1 in den Zellkern zur Folge hat und damit die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21(WAF1/CIP1) induziert, was eine verminderte Proliferation der Chondrozyten und somit eine frühzeitige Differenzierung in der Wachstumsfuge zur Folge

hat. Stat1-Aktivierung und erhöhte p21-Expression konnten auch in einem TD2-Fetus nachgewiesen werden, nicht jedoch in gesunden Feten. So ist die fehlerhafte Stat1-Aktivierung und die mit ihr gekoppelte p21-Expression möglicherweise für die Entstehung von TD2 verantwortlich. Jedoch zeigten Untersuchungen des Mausmodells der Thanatophoren Dysplasie (K644E), dass die FGFR3-Aktivierung nicht nur einen Einfluss auf die Stat1-Aktivierung, sondern auch die Aktivierung von Stat5a und Stat5b zur Folge hat (Li et al., 1999). Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Transfektionsexperimenten (Su et al., 1997) konnte im Mausmodell jedoch keine erhöhte Expression von p21(WAF1/CIP1) nachgewiesen werden (Li et al., 1999). Statt dessen kommt es aufgrund der FGFR3-Aktivität zu einer erhöhten Expression der Zellzyklus-Inhibitoren p16, p18 und p19, die zur ink4-Familie gehören (Li et al., 1999). Der dadurch bedingte Zellzyklusarrest führt zur Ausdehnung der ruhenden Chondrozyten auf Kosten der proliferierenden und reifenden Chondrozyten (Li et al., 1999). Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu klären.

Die stabile Expression von FGFR3<sup>ACH</sup> in einer Ratten-Chondrozyten-Zelllinie (CFK2) zeigte, dass die Mutation u. a. auch eine Veränderung der Expression der Integrin-Untereinheiten zur Folge hat. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die konstitutive Aktivierung des Rezeptors durch die Mutation nicht nur einen Einfluss auf die nachgeschaltete ras-raf-MAPK-Kaskade, sondern auch auf die Integrin-Signalkaskade hat (Henderson et al., 2000).

#### 4.1.4 Mutationsanalyse

Durch Kenntnis der genomischen Sequenz des *FGFR3*-Gens konnte ein Set geeigneter Primer abgeleitet werden, mit dem die Amplifikation des gesamten codierenden Bereichs des *FGFR3*-Gens auf genomischer Ebene ermöglicht wurde. So konnten Mutationsuntersuchungen vereinfacht werden, indem sie auf genomischer Ebene aus Blutproben gewonnener DNA erfolgen konnten. Dies ist deshalb von klinischem Interesse, da von den wenigsten Patienten Gewebe zur Isolierung der *FGFR3*-mRNA zur Verfügung steht. Im Rahmen der Routine-Diagnostik wurden in der Mainzer Kinderklinik bisher bei 171 Patienten Mutationsanalysen durchgeführt. Bei 77 von 83 (93%) der untersuchten Patienten mit diagnostizierter ACH konnte die klassische Punktmutation (1138G-A bzw. 1138G-C) in

der *FGFR3*-Transmembrandomäne nachgewiesen werden (Tab. 7) (Hilbert et al., 1998). Eine ebenfalls publizierte Mutation an Position 375 konnte in keinem der Patienten bestätigt werden (Superti-Furga et al., 1995). Bei 7% der untersuchten Patienten war der Nachweis einer Mutation nicht möglich, allerdings ließ sich die Diagnose der ACH bei diesen Patienten aufgrund fehlender klinischer Daten auch nicht bestätigen.

Bei allen untersuchten Patienten (9) mit diagnostizierter Thanatophorer Dysplasie Typ I bzw. Typ II konnten Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens identifiziert werden. Während bei Patienten mit Thanatophorer Dysplasie Typ II bisher nur eine spezifische Mutation in der Tyrosinkinasedomäne (Lys650Glu) beschrieben ist (Tavormina et al., 1995), findet man bei Patienten mit Thanatophorer Dysplasie Typ I eine Verteilung der Mutationen über das gesamte *FGFR3*-Gen [Arg248Cys; Ser249Cys; Ser371Cys, (Tavormina et al., 1995); Tyr373Cys, Ter807Gly, Ter807Cys, Ter807Arg (Rousseau et al., 1995)].

Im Fall der Hypochondroplasie wurden bis jetzt drei verschiedene Mutationen beschrieben [Asn540Lys (Bellus et al., 1995B; Prinos et al., 1995); Asn540Thr (Deutz-Terlouw, 1998); Ile538Val (Grigelioniene et al., 1998)], die alle in der Tyrosinkinasedomäne lokalisiert sind. Bei Routine-Untersuchungen an der Kinderklinik Mainz konnte bei 50 von 79 analysierten Patienten (65%) die Diagnose HCH durch den Nachweis der bereits publizierten Asn540Lys Mutation bestätigt werden. Bei 28 Patienten konnte keine Mutation an den bereits veröffentlichten Positionen ermittelt werden. Dies lässt sich zum einen durch eine fehlerhafte Diagnosestellung erklären, zum anderen muß aber auch davon ausgegangen werden, dass weitere noch nicht veröffentlichte Mutationen innerhalb des *FGFR3*-Gens existieren bzw. andere Gene für die Erkrankung verantwortlich sind (Rousseau et al., 1996). Um der Vermutung nachzugehen, ob weitere Mutations-„hot-spots“ innerhalb des *FGFR3*-Gens existieren, wurde die gesamte codierende Region von *FGFR3* bei einer Patientin mit der eindeutigen Diagnose einer HCH, aber ohne die übliche Mutation, mit den etablierten Primerpaaren untersucht. So konnte die erste Mutation außerhalb der Tyrosinkinase-Domäne bei einem HCH-Fall identifiziert werden. Die Patientin, die bis auf einen geringen dysproportionierten Minderwuchs keine Auffälligkeiten zeigt, weist eine Transversion von A nach T an Position 1022 (Exon 9) auf. Die Mutation hat den Austausch eines Asparagins durch Isoleucin an Position 328 in der Immunglobulin-ähnlichen Domäne IIIc des *FGFR3*-Gens zur Folge. Die Mutation konnte bei der vermutlich ebenfalls betroffenen Mutter, jedoch nicht beim normalwüchsigen Vater sowie in 50 weiteren normalwüchsigen Probanden



nachgewiesen werden. Das bestätigt die Annahme, dass es sich um die Phänotyp-verursachende Mutation handelt (Winterpacht et al., 2000).

Viele der bis jetzt beschriebenen Mutationen in der extrazellulären, Liganden-bindenden Domäne von *FGFR3* haben die Erzeugung eines Cystein-Restes zur Folge, wodurch es zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors aufgrund Dimerisierung in Abwesenheit von Liganden kommt (Webster et al., 1996). Andere Mutationen betreffen konservierte Aminosäurereste, die für die korrekte dreidimensionale Struktur des FGFR3-Proteins wichtig sind. Bis jetzt konnte noch keine Aminosäurekonversion zu Leucin bzw. Isoleucin gefunden werden. Möglicherweise führt ein solcher Austausch zu einem unauffälligen bzw. unerwarteten Phänotyp. In dem hier beschriebenen Fall kommt es zum Austausch eines Asparagins durch ein Isoleucin, welches Teil einer N-Glykosylierungs-Consensusstelle (N-V-T) ist. Der FGF-Rezeptor 3 besitzt sieben N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne (Thompson et al., 1991; Keegan et al., 1991). Vergleicht man diese N-

hFGFR-3	TAGAN <b>TTD</b> KELEVL <b>SLH</b> <u>N</u> VT <b>F</b> E <b>D</b> AGE <b>Y</b> T <b>C</b> LAGNSIGF <b>S</b> HHS <b>A</b> WL <b>V</b> VLP	
mFGFR-3	.....	100%
cFGFR-3	...V.....I.Y.R.....T...	90%
aFGFR-3	...V.S.....IQF.R.....Y.....T...	83%
hFGFR-1	...V.....M.....H.R.....S.....L.....T...E	83%
hFGFR-2	A..V.....I...YIR.....I.F.....	83%
hFGFR-4	..DI.SS--.V...Y.R..SA.....L.YQ.....T...	69%

Glykosylierungsstelle (N-X-S/T) mit anderen FGF-Rezeptoren erkennt man, dass es sich um einen hochkonservierten Bereich handelt (Abb. 36). Aufgrund dieser Konservierung kann angenommen werden, dass es sich tatsächlich um einen glykosylierten Bereiche handelt, der möglicherweise funktionelle Bedeutung besitzen.

**Abb. 36: Die humane FGFR3-Aminosäure-Sequenz der Immunglobulin-Domäne IIIc**

im Vergleich mit FGF-Rezeptoren anderer Spezies bzw. mit dem humanen FGFR1, FGFR2 bzw. FGFR4-Protein. mFGFR3 (Maus: Acc. No. M81342), cFGFR3 (Huhn: Acc. No. M35195), aFGFR3 (Amphibien: Acc. No. CAA53271), hFGFR1 (Human: Acc. No. AAB19501); hFGFR2 (Human: Acc. No. AAD31561), hFGFR4 (Human: Acc. No. L03840). Mögliche N-Glykosylierungsstellen sind fett gedruckt (N-X-S/T), die betroffene mutierte Aminosäure-Position ist unterstrichen.

Somit kann die nachgewiesene Mutation prinzipiell mehrere Phänotyp-verursachende Auswirkungen haben. Zum einen kann sie durch Veränderung der Glykosylierung des Rezeptors zu einer Fehlfunktion führen und so das Krankheitsbild verursachen, zum anderen kann die Sekundär- und die Tertiärstruktur des Proteins durch die Mutation direkt verändert

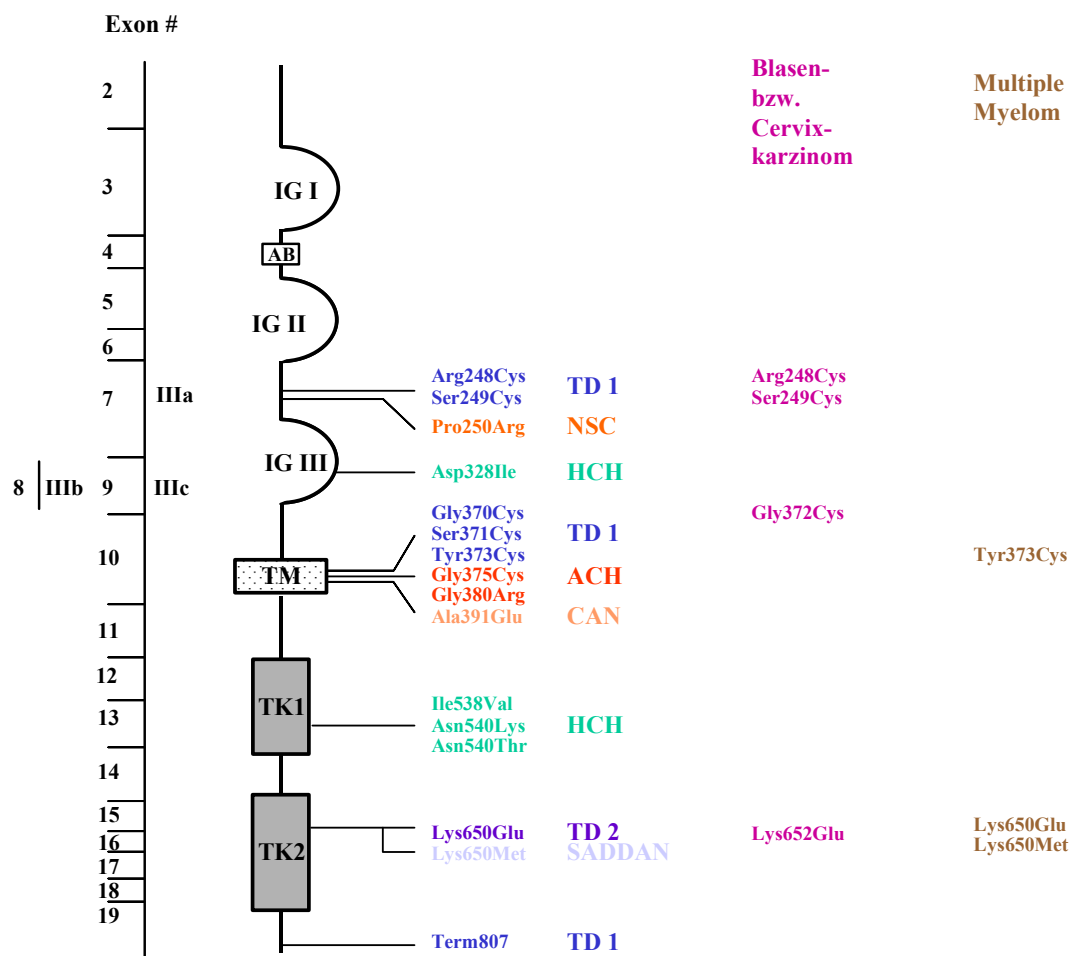
werden. Um die beiden Hypothesen zu überprüfen, wurde die computersimulierte Konstruktion eines dreidimensionalen Modells des Wildtyp-Proteins mit dem mutierten Rezeptorprotein verglichen. Das Ergebnis zeigt, dass die ausgetauschte Aminosäure am äußersten Rand einer Schleife, mit Orientierung nach außen, lokalisiert ist. Die Mutation führt deshalb wahrscheinlich nicht zu einer direkten Störung der Tertiärstruktur (Abb.12). Dies wird durch einen Vergleich mit der veröffentlichten Kristallstruktur von FGF2, gebunden an die Ig-II- und Ig-III-Domänen von FGFR1 verdeutlicht (Plotnikov et al., 1999). Das Asparagin an Position 328 scheint demnach nicht an Liganden-Rezeptor- bzw. an Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen beteiligt zu sein. Der Aminosäure-Austausch allein hat deshalb vermutlich nicht die Erkrankung zur Folge.

Der vorliegende Fall ist von besonderem Interesse, da zum ersten Mal eine Mutation in der extrazellulären *FGFR3*-Domäne bei Hypochondroplasie nachgewiesen werden konnte, an einer Position, die darüber hinaus eine mögliche N-Glykosylierungsstelle darstellt. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die korrekte Glykosylierung eine wichtige Rolle beim Funktionieren der FGF-Rezeptoren spielt und dass Veränderungen im Glykosylierungsmuster zu einer entsprechenden Erkrankung führen können. Untersuchungen an dem mutierten *FGFR2*-Gen, die zu einer Liganden-unabhängigen konstitutiven Aktivierung führen, haben gezeigt, dass die Genprodukte im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor weniger stark glykosyliert sind (Mangasarian et al., 1997). Raffioni und Mitarbeiter (1998) konnten zeigen, dass es durch die K650E-Mutation (in geringerem Ausmass auch durch die N540K-Mutation) zu einer Reduzierung der reifen, glykosylierten Rezeptorform kommt und zu einer Liganden-unabhängigen Phosphorylierung der weniger stark glykosylierten Form. Obwohl beide Formen normalerweise in der Zelle vorliegen, ist eine Phosphorylierung der kleineren Form im Normalfall nicht zu beobachten.

Weitere Experimente, die diese Fragestellung genauer untersuchen, sind geplant. So konnte bereits durch Mutagenese-Experimente ein mutierter Rezeptor kloniert werden. Dieser soll stabil in Zellen exprimiert und die Rezeptoraktivität untersucht soll werden. Außerdem sollen weitere HCH-Patienten ohne klassische Mutation untersucht werden, ob auch sie Mutationen innerhalb der N-Glykosylierungsstellen aufweisen. Auf jeden Fall ist der hier beschriebene Fall ein ausgezeichnetes Modell, um die Auswirkung der Glykosylierung auf die Rezeptoraktivität zu untersuchen, ein Aspekt, der bis jetzt noch nicht genauer untersucht wurde.

Bis jetzt sind bereits einige Erkrankungen beschrieben, die mit einer veränderten Glykosylierung in Verbindung gebracht werden können (Bhatia und Mukhopadhyay, 1998), sehr wenige werden aber durch direkte Mutation einer möglichen N-Glykosylierungsstelle verursacht (Lonnquist et al., 1996; Pariyarath et al., 1996; Ricketts et al., 1996; Wilkie et al., 1995). Bei einem Patienten mit Crouzon-Syndrom konnte ein S275P-Austausch im IgIIIa-Exon von *FGFR2* nachgewiesen werden, wodurch eine wahrscheinliche N-Glykosylierungsstelle zerstört wird (Wilkie et al., 1995). Die mutierte Aminosäure befindet sich in direkter Nachbarschaft zu einer hoch konservierten Homeo-Interaktions-Domäne (McKeehan et al., 1998) und führt einen starken Helixbrecher (Prolin) ein. Es kann deshalb angenommen werden, dass diese Mutation im Gegensatz zu der hier beschriebenen N328I-Mutation die FGFR-Funktion durch direkte Zerstörung der Tertiärstruktur beeinflusst und nicht durch Zerstörung der Glykosylierungsstelle.

Abb. 37 gibt einen Überblick über alle bisher beschriebenen *FGFR3*-Mutationen und die damit assoziierten Erkrankungen.



**Abb. 37:** Überblick über alle bisher beschriebenen Mutationen im *FGFR3*-Gen und die damit assoziierten Erkrankungen.

ACH: Achondroplasie, HCH: Hypochondroplasie; TD I bzw. II: Thanatophore Dysplasie I bzw. II, NSC: nicht-syndromatische Kraniosynostose; CAN: Crouzon-Syndrom mit Acanthosis nigricans, SADDAN: "severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans" (Übersichtsartikel: Passos-Bueno, 1999; Cappellen et al., 1999).

#### 4.1.5 Expression alternativer Spleißvarianten des murinen Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 3 (*Fgfr3*)

Wie bereits erwähnt zeichnen sich *FGFR1*, 2 und 3 durch das Vorliegen zahlreicher strukturell unterschiedlicher Varianten aus, die aufgrund alternativen Spleißens entstehen. So liegen von *FGFR1* und *FGFR2* sowohl sezernierte wie auch membrangebundene Formen vor,

sowie Rezeptoren mit zwei oder drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Im Fall von FGFR3 sind bis jetzt lediglich zwei unterschiedliche Varianten bekannt, die sich in der C-terminalen Hälfte der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 3 unterscheiden (Murgue et al., 1994). Wie bei FGFR1 und FGFR2, bei denen diese Varianten ebenfalls bekannt sind, ändert sich hierdurch die Ligandenspezifität. Während die wesentlich häufiger vorkommende IIIc-Variante verschiedene Liganden binden kann (FGF1, FGF2, FGF4), ist die IIIb-Form durch eine sehr restringierte Bindung (FGF1) ausgezeichnet. Die FGFR3 IIIb-Variante hat wahrscheinlich die am stärksten eingeschränkte Liganden-Bindungseigenschaft von allen vier bekannten FGFRs (Chellaiiah et al., 1994). Um die entwicklungsbiologische Relevanz der zwei verschiedenen FGFR3-Varianten zu untersuchen und mögliche Hinweise auf ein krankheitsrelevantes Expressionsmuster zu erhalten, wurde das Expressionmuster der beiden *FGFR3*-Varianten während der Mausentwicklung untersucht.

Mit Hilfe von Exon IIIb- bzw. IIIc-spezifischen Oligonukleotiden wurden *in situ*-Hybridisierungsexperimente der zwei verschiedenen Formen während unterschiedlicher Phasen der murinen Entwicklung (E12, E14 und E20) durchgeführt. Eine Kreuzhybridisierung der zwei *Fgfr3*-spezifischen Sonden mit dem *Fgfr2*-Gen konnte aufgrund geringer Homologie (51% bzw. 57%) ausgeschlossen werden.

Die Experimente zeigten, dass sich die beiden Formen in ihrem Expressionsmuster deutlich unterscheiden. Die wesentlich häufigere IIIc-Form wird stärker und früher im sich entwickelnden Skelett und im zentralen Nervensystem exprimiert, wohingegen die IIIb-Variante ausschließlich in epithelialen Strukturen nachweisbar war. Die Expression war hier vor allem in epithelialen Strukturen des Gastrointestinaltrakts, der Bronchien, dem Blasenepithel und in den epithelialen Zellschichten der Epidermis nachweisbar.

Die gewonnenen Erkenntnisse stehen im Einklang mit bereits bekannten Ergebnissen bezüglich der Expression von *FGFR1* und *FGFR2* bzw. ihrer entsprechenden IIIb- und IIIc-Varianten. So wird die *FGFR2*-IIIb-Variante auch in erster Linie in epithelialen Strukturen exprimiert.

Wie bereits unter 4.1.3 beschrieben, konnte auch bei Patienten mit Crouzon-Syndrom und Acanthosis nigricans eine Mutation im *FGFR3*-Gen nachgewiesen werden. Gerade die genauere Untersuchung der in der Haut exprimierten *FGFR3*-IIIb Variante könnte die Krankheitsentstehung und die funktionelle Bedeutung dieser Spleißform weiter aufklären helfen.

Von besonderem Interesse ist im Zusammenhang mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten epithelialen Expression der IIIb-Variante zum einen der Nachweis der Überexpression der *FGFR3* IIIb-Variante und zum anderen die Identifizierung spezifischer *FGFR3*-Mutationen in Blasenkarzinomen (und Cervixkarzinomen) (Cappellen et al., 1999). Die in den Tumoren nachgewiesenen somatischen Mutationen (R248C; S249C; G372C und K650E) (siehe Abb. 37) konnten bereits als Keimbahnmutation bei der Thanatophoren Dysplasie Typ I nachgewiesen werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei der Thanatophoren Dysplasie die R248C-Mutation durch die Einführung eines zusätzlichen Cysteinrestes eine intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden kann und so zu einer liganden-unabhängigen Dimerisierung des Rezeptors führt. Die aktivierende Funktion der K650E-Mutation ist auf die Konformationsänderung der Tyrosinkinase-Domäne zurückzuführen (Naski et al., 1996). Welche Auswirkungen die nachgewiesenen Mutationen im Falle der epithelialen Blasen- und Cervixkarzinome haben, muss jedoch noch geklärt werden.

## 4.2 Methoden zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene

Die Identifizierung und weitere Charakterisierung neuer differenziell exprimierter Gene ist für das Verständnis entwicklungsbiologischer Fragestellungen von zentraler Bedeutung und kann auch zum Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Entwicklung des Skelettsystems Wesentliches beitragen. Ziel des 1990 in den USA ins Leben gerufenen internationalen Humangenomprojekts (HUGO) ist zunächst die Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms und die Identifizierung aller Gene. Bis heute ist die vollständige Entschlüsselung der genetischen Information von Chromosom 21 und 22 gelungen und hat zur Entdeckung von 225 bzw. 545 Genen geführt (Dunham et al., 1999; Hattori et al., 2000). Wie aus der öffentlichen Presse am 26. Juni 2000 zu erfahren war, verkündete das Internationale Human Genom Projekt Konsortium und die Firma Celera Genomics die Veröffentlichung eines ersten, noch unvollständigen Sequenzentwurfs des humanen Genoms.

In einem zweiten, wesentlich aufwendigeren Projekt sollen alle entdeckten Gene funktionell analysiert werden. Die Kombination von Methoden zur Identifizierung von differenziell exprimierten Genen mit der dramatisch anwachsenden Sequenzinformation der Humangenomprojekts bzw. großer EST-Projekte wird die Charakterisierung neuer Gene deutlich vereinfachen. Eine ganze Reihe solcher Methoden wurden entwickelt und bereits

erfolgreich angewandt: (1) EST-Sequenzierung; (2) cDNA Microarray Hybridisierung; (3) „Differential display“-Methode; (4) subtraktive Klonierung; (5) SAGE (serial analysis of gene expression).

Zu (1): 1991 wurde von Adams und Mitarbeitern erstmals ein EST-Projekt beschrieben. Die Grundidee ist einfach. Aus einem definierten Gewebe wird RNA isoliert und eine cDNA-Bibliothek hergestellt. Nach der Isolierung einer möglichst großen Anzahl willkürlich ausgewählter cDNA-Klone wird eine einzelsträngige Sequenzierung durchgeführt. Durch jede Sequenzreaktion werden durchschnittlich 300 Bp generiert, die ein bestimmtes Transkript, ein sogenanntes EST („expressed sequence tag“), repräsentieren. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche EST-Projekte für unterschiedliche Gewebe bei Mensch, Maus, Ratte und anderen Organismen beschrieben (Adams et al., 1993; Liew et al., 1994; Adjaye et al., 1997). Mittlerweile sind über 2,000,000 humane ESTs und über 1,000,000 murine ESTs in der NCBI-Datenbank veröffentlicht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>; Stand: 9. Juli 2000). Trotz dieser großen Anzahl an EST-Sequenzen haben Projekte, ausgehend von sehr spezifischen cDNA-Bibliotheken (z. B. aus Maus-Blastozyste), gezeigt, dass die Sammlung der ESTs noch nicht vollständig ist und immer noch bis zu 14% neue, offensichtlich gewebespezifische ESTs gefunden werden können (Mao et al., 1998; Sasaki et al., 1998). Die überlappende Anordnung der verschiedenen ESTs im Rahmen des UniGene-Programms zeigt, dass die sequenzierten Klone ungefähr 86,000 verschiedene Gene repräsentieren, wobei annähernd 11% vollständig sequenzierte cDNAs darstellen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html>). Zahlreiche stark exprimierte Gene werden von sehr vielen ESTs abgedeckt, so ist z. B. das Genprodukt Serumalbumin mit mehr als 1300 EST-Sequenzen in der EST-Datenbank vertreten (Schuler et al., 1996). Durch Herstellung normalisierter cDNA-Banken kann dieses Problem der Redundanz umgangen und der Anteil an schwach exprimierten Genen erhöht werden (Bonaldo et al., 1996).

Ein Sequenzvergleich der cDNA-Sequenzinformation, die durch überlappende Anordnung von EST-Klonen gewonnen werden konnte, mit genomischen Sequenzen ermöglicht darüber hinaus eine Aussage über die Exon/Intron-Struktur des untersuchten Gens. Alternativ gespleißte Exons, die nur in spezifischen Geweben exprimiert und somit nur in bestimmten EST-Banken vorliegen, können identifiziert werden.

Neben der beschriebenen Redundanz der EST-Datenbank stellt die relativ schlechte Qualität der EST-Sequenzen einen gewissen Schwachpunkt der Strategie dar. Da die in der EST-

Datenbank veröffentlichten Klone in der Regel nur einzelsträngig sequenziert und nicht editiert werden, kann von einer Lesegenauigkeit von etwa 97% ausgegangen werden (Hillier et al., 1996). Da für die Synthese der verwendeten cDNA-Bibliotheken zumeist Oligo-dT-Priming verwendet wird, stellen etwa 65% der veröffentlichten EST-Sequenzen das 3'-Ende und somit größtenteils untranslatierten Bereich der cDNAs dar, nur 26% repräsentieren das 5'-Ende. Daher gibt es ein verstärktes Bestreben von zahlreichen öffentlichen, aber auch privaten Organisationen, alle exprimierten Gene zu identifizieren und durch Etablierung neuer Methoden der cDNA-Bibliothek Synthese „volle Länge“-cDNAs zu isolieren und in die entsprechenden EST-Projekte einzubinden (Neto et al., 2000).

Zu (2): Die cDNA-Mikroarray Hybridisierung ist eine Hochdurchsatzmethode, bei der eine sehr große Anzahl von cDNA-Sequenzen auf einen Glass-Objektträger immobilisiert werden. Durch eine anschließende Hybridisierung mit unterschiedlichen RNAs kann die differenzielle Expression verifiziert bzw. untersucht werden (Schena et al., 1995). Es handelt sich um eine Methode, die sich häufig an ein EST-Projekt anschliesst, da neben cDNA-Sequenzen auch Oligonukleotide auf Objektträgern immobilisiert und untersucht werden können (Lockhart et al., 1996). Limitierender Faktor der Methode ist, dass nur die Gene untersucht werden können, deren Sequenz bekannt sind. Jedoch wird durch den schnellen Fortschritt des humanen Genomprojekts auch dieses Problem wahrscheinlich überwunden. Besonderer Vorteil dieser Methode ist, dass durch Herstellung mehrere Objektträger der gleiche Satz von Genen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen und mit verschiedenen Sonden untersucht werden kann. Heller und Mitarbeiter (1997) konnten durch Hybridisierung mit RNA, isoliert aus kultivierten Makrophagen, Chondrozyten und arthrotischem Gewebe die Beteiligung von IL3 an rheumatischer Arthrose nachweisen.

Ein am "National Institute of Health" initiiertes "Skeletal genome anatomy project" (SGAP) plant durch Anordnung von 5000 cDNAs bzw. EST-Sequenzen auf einem Chip, das Expressionsmuster der Gene durch Hybridisierung mit verschiedenen Knorpel- bzw. Knochengewebe-RNAs zu untersuchen. Ergebnisse, die dieses Projekt betreffen, sind jedoch noch nicht publiziert. Ein ähnlicher Microarray-Ansatz ist auch mit Maus-ESTs geplant (<http://www.lsc.pku.edu.cn/meeting/abstract/33t.html>).

Zu (3): Der von Liang und Pardee (1992) entwickelte Methode des "Differential Display" liegt die Idee zugrunde, die RNA-Profile mehrerer Zellpopulationen mittels Gelelektrophorese miteinander zu vergleichen. Dazu werden Subpopulationen der RNA der zu untersuchenden



Gewebe bzw. Zellen in cDNA umgeschrieben, amplifiziert, auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und verglichen. Hierbei werden nur sehr kleine Mengen an RNA benötigt, was die Nachweisempfindlichkeit der Methode sehr groß macht. Differentiell exprimierte Fragmente können dann isoliert und sequenziert werden. Mit dieser hohen Sensitivität ist allerdings auch ein entscheidender Nachteil verbunden. Die geringste Variation der experimentellen Bedingungen kann zu nicht reproduzierbaren Daten führen. Auch ist die Generierung zahlreicher falsch positiver Klone, die keine unterschiedlich exprimierten Gene repräsentieren, von Nachteil. Trotz dieser Problematik, die v. a. die Reproduzierbarkeit betreffen, wurde die Methode bereits mehrfach erfolgreich angewendet. So konnte durch Vergleich der mRNA-Population von differenzierten Chondrozyten mit *in vitro* kultivierten und Retinsäure behandelten Zellen das im Knorpel exprimierte Chondromodulin-I-Gen isoliert werden. (Dietz et al., 1999).

Zu (4): Bei der Methode der Subtraktionshybridisierung wird von einer ersten zu untersuchenden Zellpopulation einzelsträngige cDNA synthetisiert und gegen einen Überschuss von poly(A)-RNA (bzw. cDNA) einer zweiten Zellpopulation hybridisiert. Unter geeigneten Bedingungen hybridisieren die cDNA-Moleküle, die in beiden Zellpopulationen vorhanden sind. Spezifische cDNAs der ersten Zellpopulation, für die keine korrespondierenden Transkripte in der zweiten Zellpopulation vorhanden sind, können angereichert und kloniert werden. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass stark exprimierte Transkripte durch mehrmalige Hybridisierung der cDNAs beider Zellpopulationen eliminiert werden können und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, seltene Transkripte zu detektieren. Die Methode hat unter anderem zur Isolierung einer Reihe tumorrelevanter Gene geführt. Allerdings ist die Methode sehr aufwendig und es können jeweils nur zwei Zellpopulationen miteinander verglichen werden. Der Vergleich einer größeren Anzahl von Zellpopulationen ist somit nicht praktikabel.

Zu (5): Die SAGE Technik ("serial analysis of gene expression") basiert auf der Generierung und quantitativen Auswertung von kurzen, mRNA-spezifischen 12 Bp-Sequenzabschnitten (Velculescu et al., 1995). Die Herstellung einer SAGE-Bibliothek erfordert zahlreiche enzymatische Schritte. Nach Erzeugung von doppelsträngiger cDNA wird diese mit einem 4-Basenpaar-Erkennungsrestriktionsenzym geschnitten. Nach Halbierung des Ansatz wird an jede Hälfte ein spezifisches Linkerpaar ligiert. Besonderheit dieser Linker ist, dass sie eine Typ-II-Restriktionserkennungssequenz besitzen, so dass nach Ligation der Ansätze, die

nachfolgende Amplifikation und Restriktion (z. B. mit BsmFI) der Pools 13-20 Bp lange Fragmente entstehen, die sich aus einem Linkeranteil sowie einer spezifischen cDNA-Sequenz zusammensetzen. Nach anschließender Konkatemisierung und Klonierung dieser Fragmente kann pro Sequenzreaktion ein Satz von bis zu 20 verschiedenen „Tags“ sequenziert werden, wobei jedes „Tag“ ein Transkript repräsentiert. Dadurch kann mit einem geringen Sequenzieraufwand eine Vielzahl von Transkripten analysiert werden. Die relative Häufigkeit der untersuchten Gene (und somit ihre Expressionsstärke) kann durch Auszählen der sequenzierten „Tags“ ermittelt werden. Wesentlicher Vorteil der SAGE-Methode ist, dass eine sehr große Anzahl an Transkripten untersucht werden kann und, dass nach Herstellung mehrerer verschiedener SAGE-Bibliotheken das Expressionsprofil der verschiedenen untersuchten Gewebe bzw. Zellkulturen verglichen werden kann. Zur Auswertung der gewonnenen Sequenzdaten ist allerdings eine spezielle Computer-Software notwendig. Des Weiteren ist, wie auch bei allen anderen beschriebenen Methoden, die Qualität der RNA von wesentlicher Bedeutung. So können geringste Spuren von genomischer Verunreinigung zu irreführenden Artefakten führen.

In Tabelle 14 sind einige Merkmale und Bedingungen der Techniken aufgelistet, die bei der Auswahl der durchzuführenden Methoden zu beachten sind. Eine Schwierigkeit der Hochdurchsatz-Methoden ist es, relevante Gene aus den gewonnenen Daten zu erkennen und weiter zu analysieren. Die genaue bioinformatische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse kann entscheidend dazu beitragen, relevante Gene für die jeweilige Fragestellung zu finden. Auch kann die Untersuchung zahlreicher verschiedener Proben und die weitere Bearbeitung nur der Gene, die bei unterschiedlichen Versuchsansätzen ein auffälliges Ergebnis zeigen, bei der Identifizierung relevanter Gene helfen. Von Bedeutung ist auch das Leistungsvermögen des jeweiligen Labors, so ist die Durchführung eines EST- bzw. SAGE-Projekt nur bei ausreichender Sequenzierkapazität möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Evaluierung eines EST- und eines SAGE-Projektes unter Berücksichtigung der Knorpel-/Knochenentwicklung.

**Tabelle 14**

Merkmale der fünf beschriebenen Hochdurchsatzmethoden der differentiellen Genexpression

	Benötigte Menge	RNA-	Durchsatz	Benötigte Sequenzkapazität	Benötigte bioinformat. Ausrüstung
<b>EST-Sequenzierung</b>	1.0-5,0 µg poly(A)-RNA		gering	hoch	Standard-Datenbankvergleiche
<b>Mikroarray Hybridisierung</b>	mindestens poly(A)-RNA	1µg	hoch	gering	Spezieller Imaging-Computer, Standard-Datenbankvergleich
<b>Differential display</b>	10-100ng poly(A)-RNA		gering-mittel	mittel	Standard-Datenbankvergleich
<b>Subtraktionshybridisierung</b>	10-100ng poly(A)-RNA		mittel	gering	Standard-Datenbankvergleich
<b>SAGE</b>	1.0-5.0 µg poly(A)-RNA		hoch	hoch	Spezielle Software zur Auswertung der erhaltenen Sequenzen, Spezielle Datenbankvergleich

### 4.3 Analyse von EST-Klonen aus einer humanen Chondrozyten-cDNA-Bank

Trotz der Vielzahl der beschriebenen unterschiedlichen EST-Projekte ist noch kein Ansatz veröffentlicht, der sich auf die Charakterisierung des Expressionsprofils von Knorpelgewebe konzentriert. Gründe dafür liegen zum einen in der schweren Verfügbarkeit des Gewebes, zum anderen wird die RNA-Extraktion erschwert, da sich Knorpelgewebe aus nur wenigen, in extrazellulärer Matrix eingebetteten Zellen zusammensetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der Verfügbarkeit einer humanen Chondrozyten cDNA-Bibliothek die Durchführung eines EST-Sequenzierprojekts beurteilt. Die ausgewerteten Sequenzdaten wurden auf Homologie zu bereits bekannten Nukleotidsequenzen untersucht und entsprechend der Funktion der zugrundeliegenden Genprodukte tabellarisch aufgelistet. Ziel des Projektes war zunächst, durch Sequenzierung einer kleineren Anzahl von Transkripten die Qualität der cDNA-Bibliothek zu evaluieren und die Möglichkeiten eines umfassenden EST-Projektes abzuschätzen.

### 4.3.1 Homologievergleich der erhaltenen EST-Sequenzen

Die bei der Durchführung des EST-Projekts gefundenen EST-Sequenzen wurden aufgrund ihrer Homologievergleiche in verschiedene Kategorien eingeteilt. Die Kategorie (1) enthält ESTs mit signifikanten Homologien zu bekannten, auch funktionell charakterisierten Genen (Tabelle 8.1-8.9). In den Kategorien (2-3) sind solche ESTs zusammengefasst, die ebenfalls signifikante Homologien zu Sequenzen der nr- bzw. EST-Datenbank zeigen (Tabelle 9-12), über deren funktionelle Bedeutung aber keine Aussage gemacht werden kann. Die vierte Kategorie umfasst alle EST-Sequenzen, die nur schwache oder keine Homologien zeigen (Tabelle 13). Es handelt sich bei diesen Sequenzen höchstwahrscheinlich um ESTs aus bisher unbekanntem neuen Genen. In der fünften Kategorie sind die ESTs zusammengefasst, die aufgrund von Homologie zu repetitiven Sequenzen bzw. verschiedenen Sequenzunregelmäßigkeiten, wie z. B. fehlender Vektor-Linker Anteile, nicht weiter bearbeitet und auch nicht diskutiert werden.

#### ESTs mit Homologie zu Genen mit bekannter Funktion:

Insgesamt konnten 155 (62%) EST-Klone in Kategorie (1) zusammengefasst werden. Entsprechend ihrer Funktion wurden sie in 9 Untereinheiten eingeteilt. Die Untereinheiten und das prozentuale Vorkommen der entsprechenden ESTs ist in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15**  
**Einteilung der EST-Klone die Homologie zu bekannten, auch funktionell charakterisierten Genen zeigten**

Anzahl der nachgewiesenen ESTs (%)	Funktion der nachgewiesenen ESTs
68 (44%)	Translation
20 (13%)	unterschiedliche Stoffwechselprozesse
13 (8,3%)	sonstige Funktionen
12 (7,7%)	extrazelluläre Matrixproteine
12 (7,7%)	Proteasen
12 (7,7%)	Membranproteine
8 (5,2%)	Transkription
6 (3,9%)	mitochondriale Proteine
4 (2,6%)	Zytoskelettproteine
13 (8,3%)	sonstige Funktion

Die Tatsache, dass Kollagen Typ II und weitere knorpelspezifische extrazelluläre Matrixproteine wie Osteonektin, "Cartilage oligomeric matrix protein" (COMP) oder "Cartilage Link Protein" nachgewiesen werden konnten, zeigt, dass die cDNA-Bank das spezifische Expressionsmuster von Knorpel widerspiegelt. Wesentliche Merkmale einiger Bestandteile der extrazellulären Matrix werden im Folgenden kurz erläutert. Kollagen Typ II macht mehr als 50% der extrazellulären Knorpelmatrix aus und ist somit der wichtigste Faserbestandteil des hyalinen Knorpels (Mundlos, 1994). Mittlerweile sind 10 verschiedene humane Erkrankungen beschrieben, die entweder zu *COL2A1* gekoppelt gefunden wurden bzw. vollständig oder teilweise auf *COL2A1*-Genmutationen zurückzuführen sind (Spranger et al., 1994). Osteonektin (SPARC) ist eine der häufigsten nicht-kollagenen Matrixbestandteile und stellt ungefähr 2,5% der gesamten extrazellulären Matrix dar. Die Expression von Osteonektin konnte in verschiedenen Zonen der Wachstumsfuge, aber auch in weiteren Geweben (fetale Haut, Gefäße, Hoden, Ovarien, Nebenniere) nachgewiesen werden (Mundlos, 1994). Wahrscheinlich übernimmt Osteonektin in den verschiedenen Geweben unterschiedliche Funktionen und ist aufgrund der Fähigkeit, Calcium zu binden, im Knorpel an der Regulation der Mineralisierung beteiligt (Mundlos, 1994). "Cartilage oligomeric matrix protein" (COMP) ist ein weiterer nicht-kollagener Bestandteil der Knorpelmatrix. Das Protein besteht aus fünf identischen Glykoprotein-Untereinheiten, wobei jede Untereinheit EGF-ähnliche und Calcium-bindende (Thrombospondin-ähnliche) Domänen besitzt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten Mutationen als Ursache der autosomal dominanten Osteochondrodysplasien Pseudoachondroplasie (OMIM: 177170) und multiplen epiphysären Dysplasie (MED) (OMIM: 132400) innerhalb des *COMP*-Gens nachweisen (Hecht et al., 1995; Briggs et al., 1995). Es handelt sich bei den Erkrankungen um dysproportionierte Kleinwucherssyndrome mit unterschiedlich starker Ausprägung. "Cartilage link protein" 1 (*CRTL1*) schließlich ist eine andere extrazelluläre Matrixkomponente des Knorpels. Das Protein interagiert mit Proteoglykan bzw. Hyaluronsäure und trägt so zu Stabilität und Dehnbarkeit von Knorpel bei. *CRTL1* besteht aus einer NH<sub>2</sub>-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne und zwei sich wiederholenden Domänen, die an der Interaktion mit Hyaluronsäure beteiligt sind. Durch RNA-*in situ*-Hybridisierung konnte die bevorzugte Expression von *CRTL1* im Knorpel nachgewiesen werden. Sie ist bezüglich der Intensität und Verteilung mit der Expression von Aggrecan zu vergleichen (Mundlos, 1994). *CRTL1* "knock-out" Mäuse zeigen Defekte bei der Knorpelentwicklung und eine verzögerte

Knochenentwicklung mit kurzen Extremitäten (Watanabe und Yamada, 1999). Bis jetzt konnte *CRTL1* mit keiner humanen Erkrankung in Verbindung gebracht werden.

Die Tatsache, dass neben Kollagen Typ II keine weiteren Kollagene isoliert werden konnten und auch der Nachweis von Genen, die bekannterweise an der Knorpelentwicklung beteiligt sind (z. B. *SOX9*, *BMPs* oder *IGF2*), nicht erbracht werden konnte, lässt sich durch die relativ geringe Anzahl der sequenzierten ESTs erklären.

### **ESTs mit Homologien zu Sequenzen unbekannter Funktion:**

In den Kategorien (2) und (3) sind die ESTs zusammengefasst, die Homologie zu Sequenzen der nr- bzw. der EST-Datenbank zeigen, über deren funktionelle Bedeutung aber bisher keine Aussage gemacht werden kann. Teilweise zeigen die ESTs Homologie zu genomischen Sequenzen, die im Rahmen großer Sequenzierprojekte in der Datenbank veröffentlicht wurden. Neben der reinen Sequenzinformation liegen bei einem Teil der veröffentlichten Daten weitere Informationen bezüglich der chromosomalen Information bzw. über mögliche transkribierte Bereiche vor. Kategorie (2) umfasst 34 EST-Klone, von denen 11 Homologien zu Cosmid-, PAC- bzw. BAC-Sequenzen zeigen. Bei sieben der Klone ist eine chromosomale Lokalisation möglich. Eine genaue bioinformatische Untersuchung zeigte, dass vier ESTs in möglichen transkribierten Bereichen liegen, weitere Analysen führten jedoch zu keinen Erkenntnissen, die eine besondere Relevanz bei der Knorpelentwicklung erkennen ließen. Die restlichen 23 EST-Klone der Kategorie (2) zeigten Homologien zu verschiedenen cDNAs, die zum Teil als volle Länge cDNAs vorliegen. Der Klon Efc34 wurde aufgrund seiner Homologie zu einem Maus-EST weiter bearbeitet und wird unter 4.3.3 diskutiert.

In Kategorie (3) sind die ESTs (25) zusammengefasst, die lediglich mit Sequenzen der EST-Datenbank Homologien erkennen ließen. Von den 25 untersuchten ESTs zeigen 13 Homologie zu ESTs aus mindestens 10 verschiedenen cDNA-Banken. Bei diesen Klonen handelt es sich wahrscheinlich um ubiquitär exprimierte Gene, die keine besondere Gewebespezifität aufweisen. Lediglich ein Klon (Efc205) konnte in nur drei verschiedenen Geweben nachgewiesen werden und repräsentiert möglicherweise ein selten exprimiertes Transkript. Mit Hilfe des UniGene Programms (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) konnte die Sequenzinformation aller ESTs dieser Kategorie deutlich verlängert werden. Durch einen erneuten Homologievergleich mit den verlängerten cDNAs konnten sechs der 25 untersuchten Klone eindeutig bekannten Genen zugeordnet werden.

Die Sequenzinformation des Klons Efc205 konnte mit Hilfe des UniGene-Programms von 559 Bp auf 2412 Bp verlängert werden. Ein weiterer Homologievergleich führte zu keinem Ergebnis. Durch das UniGene Programm konnte die chromosomale Lokalisation des Gens auf Chromosom 12 zwischen den Markern D12S322 und D12S327 ermittelt werden. Es handelt sich dabei um eine 3 cM große Region in der u. a. auch die Matrixproteine Lumican an Position 12q22 und Decorin an Position 12q21.3-23 lokalisiert sind (Grover et al., 1995). Lumican und Decorin sind Leucin-reiche Proteoglykane, die u. a. auch in der extrazellulären Matrix von Gelenkknorpel exprimiert werden (Grover et al., 1995). Darüber hinaus konnte durch Kopplungsanalyse die Brachydaktylie Typ C (BdC) in der Region 12q24 lokalisiert werden (Polymeropoulos et al., 1996). BdC ist gekennzeichnet durch die Verkürzung einzelner oder mehrerer Finger oder Zehen (betroffen sind mittlere und proximale Phalangen des zweiten, dritten und fünften Fingers). Jedoch konnte die BdC kritische Region auf einen Bereich von 9 cM um den Marker D12S367 eingegrenzt werden, ein Bereich, der mindestens 65 cM von Efc205 entfernt ist. Somit scheidet Efc205 als Kandidatengen für BdC wahrscheinlich aus.

Auch der EST-Klon Efc190 konnte mit Hilfe des UniGene Programms von 109 Bp auf 1137 Bp verlängert werden. Die überlappenden EST-Klone des „UniGene Cluster“ wurden aus acht cDNAs isoliert, die aus verschiedenen Geweben hergestellt wurden („in-silico“ Expressionsnachweis). Homologievergleiche mit der verlängerten Sequenz zeigten auf Nukleotid- und auf Proteinebene eine signifikante Homologie zu dem pro-apoptotischen Protein p52 des Huhns. (Accession Nummer: AF029071; Sun et al., 1998). Apoptose spielt auch bei der Knorpelentwicklung eine entscheidende Rolle, so konnten apoptotische Zellen in der Wachstumsfuge nachgewiesen werden. Der genaue Reaktionsmechanismus ist noch wenig verstanden, doch ist davon auszugehen, dass neben den bereits bekannten Faktoren (z. B. Bcl-2, I $\kappa$ B, PTHrP) weitere Moleküle an dem apoptotischen Reaktionsmechanismus beteiligt sind. Möglicherweise handelt es sich bei Efc190 um einen solchen Faktor. Durch einen weiteren Homologievergleich mit der NCBI-Datenbank konnte festgestellt werden, dass die vollständige cDNA-Sequenz kloniert und sequenziert ist (Carim et al., 1999). Das ubiquitär in adulten Geweben exprimierte *PDCD9*-Gen (programmed cell death 9) hat einen offenen Leserahmen von 438 Aminosäuren. Darüber hinaus konnte die von mir vermutete chromosomale Lokalisation auf 5q11 durch FISH-Analyse bestätigt werden (Carim et al., 1999). Eine mögliche erbliche Erkrankung, die mit diesem Locus gekoppelt vorliegt, gibt es zur Zeit nicht.

### **ESTs ohne Homologie**

In Kategorie (4) sind ESTs ohne Homologie zu Sequenzen der Datenbanken zusammengefasst. Es handelt sich um wahrscheinlich neue Gene. Nur zwei Klone (Efc72 und Efc173) besitzen einen offenen Leserahmen, eine durchgeführte Motivanalyse führte jedoch zu keinem Ergebnis. Bei den übrigen EST-Klonen handelt es sich möglicherweise um Sequenzabschnitte, die im 3' untranslatierten Bereich der entsprechenden Gene liegen. Durch Homologievergleich gegen die htgs-Datenbank konnten vier EST-Klone bestimmten Chromosomen zugeordnet werden, jedoch ohne Angabe über die genaue Lokalisation auf dem entsprechenden Chromosom, so dass keine Aussagen über mögliche gekoppelte Erkrankungen gemacht werden kann. Weitere experimentelle Untersuchungen dieser ESTs mit dem Ziel, die Sequenzinformation zu erweitern und die gewebe- bzw. entwicklungspezifische Expression zu ermitteln, sind nötig, um die Bedeutung dieser Gene während der Knorpelentwicklung abschätzen zu können.

### **4.3.2 Gesamtbewertung der durchgeführten Sequenzierungen**

Ein Vergleich des erhaltenen Expressionsmuster der Gene mit bekannter Funktion ist seit März 2000 möglich. Ein EST-Projekt ausgehend von humanem Knorpel wurde auf dem 46. jährlichen Treffen der "Orthopaetic Research Society" (12.-15. März 2000, Orlando, FL, USA) vorgestellt. In diesem Projekt wurde aus humanem, fetalem Knorpel (Oberschenkel, 8-12 Schwangerschaftswoche) eine cDNA-Bibliothek hergestellt und 3632 ESTs sequenziert. Davon zeigten 58% Homologien zu bekannten Genen, 19% zu ESTs, 5% zu DNA-Sequenzen und 7% zu repetitiven Sequenzen. 11% der untersuchten Gene zeigten keine Homologie und stellen wahrscheinlich neue Gene dar. Der Vergleich der prozentualen Verteilung der unterschiedlichen funktionellen Klassen mit den hier beschriebenen Ergebnissen zeigt deutliche Übereinstimmungen.

Die Generierung und Auswertung von 253 EST-Sequenzen bestätigte die Eignung der cDNA-Bank zur Isolierung neuer, möglicherweise knorpelspezifischer Gene. Neben einer Vielzahl bekannter Gene konnten 4,5% neue Gene isoliert werden. Des Weiteren zeigten 10% der isolierten Klone Homologie zu noch nicht weiter charakterisierten EST-Sequenzen. Die hier beschriebenen Ergebnisse stellen die Grundlage für ein vom DHGP gefördertes Knorpel-EST-Projekt dar, welches eine umfassende Sequenzierung beinhaltet, woran sich ein



Mikroarray-Ansatz anschließen soll. Ob für dieses Sequenzierprojekt eine Strategie durchgeführt werden soll, mit der ubiquitär exprimierte Gene eliminiert werden, ist in Anbetracht der zunehmenden Automatisierung der Sequenzierung fraglich.

#### 4.3.3 Detaillierte Analyse des Klons Efc34

Der in der vorliegenden Arbeit charakterisierte murine EST Klon Efc34 ist identisch mit einer cDNA (MINT) die von Newberry et al. (1999) publiziert wurde. Bei der Suche nach Interaktionspartnern von Msx-2 konnte das *MINT*-Gen (Msx-2 interacting nuclear target) identifiziert werden. Durch Northern-Blot Analyse konnte die Expression in Hoden sowie in Osteoblasten und Gehirn nachgewiesen werden. Die *MINT*-cDNA codiert für ein Protein von 3576 Aminosäuren. Die Proteinsequenz-Analyse zeigt das Vorliegen von drei N-terminalen RNA-Erkennungsmotiven (RRM) und vier nukleären Lokalisationssignalen (NLS), inklusive einer Msx-2 Bindedomäne (Newberry et al., 1999). Die cDNA-Sequenz von Efc34 wurde aufgrund des Vorliegens der publizierten *MINT*-Sequenz nicht vervollständigt. Der Vergleich der ermittelten Efc34 Sequenz mit der *MINT*-cDNA zeigte einige Unterschiede. So konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis mehrerer alternativ gespleißter Exons erbracht werden (Abb. 29). Während das alternative Spleißen von einem 99 Bp- bzw. einem 69 Bp-Exons keinen vorzeitigen Abbruch des offenen Leserahmens zur Folge hat, wird bei Anwesenheit eines 5'-gelegenen 1208 Bp-Exons der Translationsstart zerstört. Ein möglicher, weiter stromabwärts gelegener Translationsstartpunkt zeigt jedoch keine Übereinstimmung zu der von Kozak (1987) formulierten Consensussequenz für Translationsstarts. Bei der Nutzung dieser Translationsstarts wäre das mögliche Protein um das erste RNA-Erkennungsmotiv verkürzt. Der Nachweis zweier unterschiedlich großer Transkripte in Northern-Blot Analyse mit Größen von 12 kBp und 4,6 kBp bestätigen das Vorliegen mehrerer Varianten (Abb. 31). Newberry et al. (1999) zeigten, dass das reife MINT-Protein in ein N-terminales 110 kDa Fragment und ein C-terminales 250 kDa Fragment gespalten wird. Beide Fragmente konnten im Chromatin nachgewiesen werden. Das 110 kDa Fragment erkennt und reguliert über die drei RRM-Domänen den Osteocalcin-Promotor. Jedes RNA-Erkennungsmotiv setzt sich aus 90 bis 100 Aminosäuren zusammen. Das Motiv kann in einfacher oder in tandemartiger Anordnung in dem Protein vorkommen (Burd und Dreyfuss, 1994). Im Fall des MINT-Protein konnte gezeigt werden, dass es ähnlich wie andere Transkriptionsfaktoren (z. B. hTAFII68,

Bertolotti et al., 1996), die mehrere RRM-Domänen besitzen, sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA binden kann. Somit stellt MINT ein neues Mitglied einer expandierenden Familie von Transkriptionsfaktoren dar, deren Einfluss über die RRM-Domäne durch Interaktion mit einzel- und doppelsträngiger DNA vermittelt wird.

Die funktionelle Verbindung zwischen dem N-terminalen RRM-Fragment, dem C-terminalen Fragment mit Msx2-Bindungseigenschaften und den in der Arbeit nachgewiesenen alternativ gespleißten Varianten muss noch ermittelt werden.

Msx2 ist ein Transkriptionsfaktor der bei der Osteoblastendifferenzierung eine Funktion übernimmt. Das Homöobox-Protein ist ein negativer Regulator der Osteocalcin Transkription in Osteoblasten und Odontoblasten (Newberry et al. 1997; Liu et al., 1999). Jedoch zeigten zahlreiche Untersuchungen, dass Msx2 nicht allein für die transkriptionelle Repression verantwortlich ist (Zhang et al., 1996).

Ein weiterer wesentlicher Faktor der Osteoblastendifferenzierung ist Cbfa1. Das *Cbfa1*-„Knock-out“-Mausmodell konnte wesentlich zum Verständnis der Differenzierungsprozesse von Osteoblasten beitragen. Homozygot mutante *Cbfa1*-Mäuse besitzen ein korrekt ausgebildetes Skelett, was jedoch ausschließlich aus Knorpelgewebe und nicht aus Knochengewebe besteht und auf einen Mangel an Osteoblasten zurückzuführen ist (Otto et al., 1997; Komori et al., 1997).

Durch einen Homologievergleich der murinen MINT-cDNA Sequenz und der eigenen ermittelten Spleißvarianten mit der htgs-Datenbank konnte das humane Gen identifiziert werden (Accession Nummer: AL034555). Der Vergleich der Sequenzen zeigt, dass sich die humane *MINT*-cDNA aus mindestens 24 Exons zusammensetzt und einen Bereich von mehr als 30 kBp umspannt. Der genomische Klon stammt aus der Region 1p36.11-36.33, was die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte chromosomale Lokalisation durch FISH-Analyse bestätigt. Mit dieser Lokalisation befindet sich das humane *MINT*-Gen in einer chromosomalen Region, die als eine von mehreren Kandidatenregionen für Osteopenie angesehen wird (Deveto et al., 1998). Osteopenie ist die Bezeichnung für Knochenveränderungen, die durch Calciummangel infolge von Malabsorption und verminderter Zufuhr hervorgerufen werden. Im hohen Alter ist die Osteopenie von der Osteoporose als Krankheit praktisch nicht zu trennen ist (Pschyrembel, 1994). Innerhalb der Region 1p36.11-36.33 konnten 14 Gene und 22 cDNA-Sequenzen identifiziert werden. Als mögliche Kandidatengene werden zur Zeit das Gen für Lysyl-Hydroxylase (*PLOD*) und das

Gen für Tumor-Nekrose- $\alpha$ -Rezeptor 2 (*TNF $\alpha$ R2*) diskutiert (Deveto et al., 1998). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen diesen beiden Genen und der Skelettentwicklung findet sich insofern, als dass PLOD an der Hydroxylierung von Lysin-Resten von Typ-I-Kollagen beteiligt ist und TNF $\alpha$ R2 eine Funktion bei der Osteoklasten-Physiologie zukommt (Deveto et al., 1998). Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden um zu klären, ob diese Gene für Osteopenie in Frage kommen oder ob und in wie weit MINT in die Erkrankung involviert ist.

#### 4.4 "Serial Analysis of Gene Expression" (SAGE)

Die SAGE- Methode (serial analysis of gene expression) basiert im wesentlichen auf zwei Grundlagen. (1) Ein Sequenzabschnitt von 9-10 Basenpaaren enthält genügend Information, um ein bestimmtes Transkript eindeutig zu identifizieren, vorausgesetzt es liegt an einer bestimmten Position innerhalb dieses Gens. (2) Die Konkaterisierung dieser kurzen Sequenzabschnitte erlaubt eine sehr effiziente Analyse einer Vielzahl von Transkripten (Velculescu et al., 1995). Die Durchführbarkeit der Methode wurde zunächst, ausgehend von humanem Pankreas Gewebe, demonstriert (Velculescu et al., 1995) und es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Subtraktions-cDNA-Bank bzw. zur Differential Display Methode auch eine quantitative Aussage bezüglich der isolierten Transkripte gemacht werden kann. Die Herstellung einer SAGE-Bibliothek, ausgehend von *S. cerevisiae*, verdeutlichte, dass mit der Methode die technischen Voraussetzungen geschaffen waren, alle Transkripte eines bestimmten Organismus zu erfassen und ein sogenanntes Transkriptom zu erstellen (Velculescu et al., 1997). Im Gegensatz zu dem statischen Genom kann das Transkriptom durch externe oder interne Faktoren verändert werden und stellt somit ein dynamisches Bindeglied zwischen dem Genom und seinen physikalischen Merkmalen her (Velculescu, 1999). Durch die Erstellung der Hefe-SAGE-Bibliothek wurden 4665 Gene identifiziert, die in einer Kopienzahl von 0,3 bis mehr als 200 Transkripten pro Zelle vorkommen. Überraschenderweise konnten zahlreiche neue Gene nachgewiesen werden, die zuvor durch Genvorhersageprogramme nicht gefunden wurden. (Velculescu et al., 1997). Weitere Untersuchungen die, die SAGE-Methode benutzten, konzentrierten sich u. a. auf den Vergleich des Expressionsprofil von gesunden bzw. Tumor-Gewebe (Zhang et al., 1997), auf das Expressionsprofil von p53-exprimierenden Zellen (Polak et al., 1997) oder auf das

Nieren-Transkriptom (Virlon et al., 1999). Zahlreiche Verbesserungen der Methode erlauben mittlerweile auch die Herstellung von SAGE-Bibliotheken ausgehend von sehr geringen Mengen an RNA ((Powell, 1998; Kenzelmann und Mühlenmann, 1999; Datson et al., 1999; Chen et al. 2000).

Die Analyse von 3,5 Millionen Transkripten von 19 verschiedenen SAGE-Bibliotheken aus normalen bzw. entarteten Geweben führten zur Identifizierung von ungefähr 84000 Genen und zeigten, dass mehr als 43000 Gene in einem einzelnen Zelltyp exprimiert werden können (Velculescu, 1999). Darüber hinaus konnten einige Gene gefunden werden, die sich durch eine spezifische Expression in bestimmten Zelltypen auszeichnen, eine Masse von Transkripten, die ubiquitär in allen untersuchten Zelltypen nachgewiesen werden konnten und einige wenige Gene, die spezifisch im Tumorgewebe überexprimiert werden (Velculescu, 1999). Trotz unterschiedlicher Anwendungen der SAGE-Methode wurde noch kein Ansatz veröffentlicht, welcher das spezifische Expressionsprofil von Chondrozyten untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst zur Etablierung der Methode, ausgehend von RNA aus einer humanen Chondrosarkom-Zelllinie, eine SAGE-Bibliothek hergestellt. Chondrosarkome (Knorpelsarkom) sind neben Osteosarkomen die zweithäufigst vorkommenden malignen Knochentumore, die sich aus embryonalen oder ausgereiftem knorpeligem Gewebe entwickeln (Pschyrembel, 1994). Nach Herstellung der Bibliothek wurden 249 Klone sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten führte zur Generierung von 3335 "Ditags" (6670 Tags). Nach Eliminierung von 412 "Ditags" durch die "Sequencer-Software" aufgrund nicht erfüllter Programm-Parameter konnten 6258 Tags weiter bearbeitet werden. Diese repräsentieren 3477 verschiedene Sequenzen. Die Analyse der Fragmente ergab, dass 78,8% aller „Tags“ in Form von Einzelkopien vorlagen, 18,2% konnten in einer Kopienzahl zwischen zwei und fünf nachgewiesen werden, lediglich zwei "Tags" kamen in einer Kopienzahl größer 50 vor. Diese "Tags" stellten jedoch Linkersequenz-Anteile dar, ein Ergebnis, was auch bei veröffentlichten Daten beobachtet werden konnte (Velculescu et al., 1995). Aufgrund der voreingestellten SAGE-Software Parameter wurden nur die "Tags" einem Homologievergleich unterworfen, die mit einer Kopienzahl von mindestens zwei nachgewiesen werden konnten. Von den analysierten 738 "Tags" zeigten 63,7% Homologie zu Sequenzen der nr-Datenbank. Ähnlich wie bei der Evaluierung des Chondrozyten EST-Projekts konnten auch bei dem SAGE-Projekt zahlreiche verschiedene ribosomale Proteine (mehr als 300 Tags), sowie das Elongationfaktor-1-alpha (44 Tags) und Ferritin (37 Tags) besonders häufig nachgewiesen werden. Der Nachweis von Kollagen Typ II, als

knorpelspezifischer Bestandteil, konnte wahrscheinlich aufgrund der geringen Anzahl der analysierten „Tags“ nicht erbracht werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung und Evaluierung der SAGE-Methode. Es konnte gezeigt werden, dass die prinzipielle Durchführbarkeit der SAGE-Methode möglich ist und, dass SAGE eine brauchbare Technik darstellt z. B. Veränderungen der Expression von mesodermalen Zellen die in Richtung Chondrozyten differenzieren zu untersuchen. Ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Faktoren, die bei der Chondrozytendifferenzierung eine Funktion übernehmen, könnte die Zelllinie ATDC5 darstellen. ATDC5 wurde aus der murinen Teratokarzinom-Linie AT805 isoliert. Die Zellen differenzieren nach Zugabe von Insulin und bilden knotenähnliche Zell-Aggregate, die Knorpel-spezifische Proteoglykane und Typ II Kollagen produzieren (Atsumi et al. 1990). Durch die Herstellung und den anschließenden Vergleich der Expressionsprofile von SAGE-Bibliotheken aus undifferenzierten und differenzierten ATDC5 Zellen könnten nicht nur Rückschlüsse über Chondrozyten-spezifische Faktoren gewonnen werden, die Bibliotheken würden auch eine Grundlage zum Vergleich mit anderen Bibliotheken bilden. Zum Beispiel können Expressionunterschiede zwischen Osteoblasten und Chondrozytendifferenzierung untersucht werden. Die SAGE-Methode wurde bereits zur Identifizierung von Osteoblasten- bzw. Adipozytenspezifischen Gene angewendet. Ji et al. (2000) zeigte, dass durch die Behandlung einer mesenchymalen Vorläufer-Zelllinie (3T3-F442A) mit BMP-2 die Zellen zu Osteoblasten und Adipozyten differenzieren. Durch Herstellung von SAGE-Bibliotheken aus BMP-2-behandelten bzw. aus unbehandelten Zellen konnte die differenzielle Expression einiger Gene nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Skelettentwicklung wird von zahlreichen genetischen Faktoren gesteuert, die bei Fehlfunktion Ursache unterschiedlichster Erkrankungen des Knorpel-/Knochengewebes sein können. Die Untersuchung von bekannten Kandidatengenen (*FGFR3*) sowie der Versuch der Identifizierung und Charakterisierung neuer Kandidatengene, ist Inhalt der vorliegenden Arbeit.

Das humane *FGFR3*-Gen stellt ein bekanntes Kandidatengen dar, das bei Veränderungen zu einem Spektrum an Erkrankungen führt, das nicht lebensfähige Skelettentwicklungsstörungen, schwere und leichte dysproportionierte Kleinwuchsformen, nicht-syndromatische Kranio-synostosen sowie Tumorerkrankungen umfasst. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die vollständige genomische Struktur des *FGFR3*-Gens aufgeklärt wurde. Hierdurch konnte ein Set von Primern generiert werden, mit dem die genomische Mutationsanalyse des kompletten *FGFR3*-Gens bei Patienten ohne Veränderungen in den bekannten Mutations-„hot spots“ möglich war. Die Anwendung dieser umfassenden *FGFR3*-Diagnostik erbrachte den ersten Nachweis einer HCH-Mutation bei einer Patientin mit Hypochondroplasie (HCH) in der extrazellulären Domäne des *FGFR3*-Gens. Durch Computer-simulierte Strukturanalyse konnte gezeigt werden, dass die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur dieses FGF-Rezeptors durch die Mutation mit großer Wahrscheinlichkeit nicht krankheitsverursachend verändert wird. Die Mutation betrifft jedoch eine mögliche funktionell wichtige N-Glykosylierungsstelle des Rezeptors, was den phänotypischen Effekt der Mutation erklären könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem das Expressionsmuster der zwei bekannten Spleißvarianten (IIIb und IIIc) des *Fgfr3*-Gens zum ersten Mal detailliert untersucht. Anhand von Mausschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstadien konnte nachgewiesen werden, dass die IIIc-Variante bei der Maus in erster Linie in Knorpel-/Knochengewebe exprimiert wird, während sich die IIIb-Variante ausschließlich auf epitheliale Strukturen beschränkt. Dieses Ergebnis war im Hinblick auf den Nachweis der Überexpression der *FGFR3*-IIIb-Variante in epithelialen Tumoren (Cervix- und Blasenkarzinom) und der Identifizierung spezifischer *FGFR3* Mutationen in diesen Tumoren von besonderem Interesse.

Zur Evaluierung systematischer Ansätze zur Isolation neuer knorpelspezifischer Gene wurden in einer ersten umfassenden Serie - ausgehend von einer humanen fetalen Chondrozyten-cDNA-Bank - die Möglichkeiten eines Knorpel-/Knochen-EST-Projekts untersucht und

beurteilt. Die Sequenzanalyse von 251 Klonen, zeigte dass 62% der analysierten Fragmente signifikante Homologie zu cDNA-Sequenzen besitzen, die bekannten und charakterisierten Genen entsprechen. Weitere 23% der sequenzierten Klone zeigten Homologie zu cDNA-Sequenzen unbekannter Funktion bzw. zu Sequenzen der EST-Datenbank während bei 5% keine Homologie nachgewiesen werden konnte. Die ermittelten Ergebnisse zeigen also, dass 5% der untersuchten EST-Klone neue, möglicherweise knorpelspezifische Gene darstellen. Die Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass die verwendete cDNA-Bank zur Isolierung neuer, möglicherweise knorpelspezifischer Gene geeignet ist. Diese Einschätzung wurde dadurch unterstützt, dass im Rahmen der durchgeführten EST-Sequenzierung ein Klon (Efc34) isoliert und charakterisiert wurde, der im Verlauf der Arbeit als Msx2-interagierender Faktor (MINT) publiziert wurde und in der Knorpel-/Knochen-Entwicklung eine wichtige Rolle spielt.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde die von Velculescu et al. (1995) veröffentlichte SAGE („serial analysis of gene expression“-)Methode - ausgehend von RNA einer humanen Chondrosarkom-Zelllinie - etabliert. Die relativ aufwendige Technik konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Auswertung ergab, dass auch die bei dieser Versuchsreihe verwendete Strategie die Möglichkeit eröffnet, systematisch gewebsspezifische Gene zu isolieren.

## 6. Literaturverzeichnis

- ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MOERNO, R. F.; KERLAVAGE, A. R.; MCCOMBIE, W. R.; VENTER, C. J. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome projekt. *Science* **252**: 1651-1656.
- ADAMS, M. D.; KERLAVAGE, A. R.; FIELDS, C.; VENTER, J. C. (1993). 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. *Nat. Genet.* **4**: 256-267.
- ADJAYE, J.; DANIELS, R.; BOLTON, V.; MONK, M. (1997). CDNA libraries from single human preimplantation embryos. *Genomics* **46**: 337-344.
- AHN, J.; LÜDECKE, H-J, LINDOW, S.; HORTON, W. A.; LEE, B.; WAGNER, M. J.; HORSTHEMKE, B.; WELLS, D. E. (1995). Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat. Genet.* **11**: 137-142.
- ALA-KOKKO, L.; KVIST, A.-P.; METSÄRANTA, M.; KIVIRIKKO, K. I.; DE CROMBRUGGHE, B.; PROCKOP, D. J.; VUORIO, E. (1996). Conservation of the sizes of 53 introns and over 100 intronic sequences for the binding of common transcription factors in the human and mouse genes for type II procollagen (COL2A1). *Biochem. J.* **308**: 923-929.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. H.; LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- ANDERSON, J.; BURNS, H. D.; ENRIQUEZ-HARRIS, P.; WILKIE, A. O. M.; HEATH, J. K. (1998). Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum. Molec. Genet.* **7**: 1475-1483.
- ATSUMI, T.; MIWA, Y.; KIMATA, K.; IKAWA, Y. (1990). A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Diff. Dev.* **30**: 109-116.
- BELLUS, G. A.; HEFFERON, T. W.; ORTIZ DE LUNA, R. I.; HECHT, J. T.; HORTON, W. A.; MACHADO, M.; KAITILA, I.; MCINTOSH, I.; FRANCOMANO, C. A. (1995A). Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am. J. Hum. Genet.* **56**: 368-373.
- BELLUS, G. A.; MCINTOSH, I.; SMITH, E. A.; AYLSWORTH, A. S.; KAITILA, I.; HORTON, W. A.; GREENHAW, G. A.; HECHT, J. T.; FRANCOMANO, C. A. (1995B). A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nature Genet.* **10**: 357-359.
- BELLUS, G. A.; GAUDENZ, K.; ZACKAI, E. H.; CLARKE, L. A.; SZABO, J.; FRANCOMANO, C. A.; MUENKE, M. (1996). Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nature Genet.* **14**: 174-176.
- BENTON, W. D.; DAVIS, R. W. (1977). Screening lamdagt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* **196**: 180-182.



- BERTOLOTTI, A.; LUTZ, Y.; HEARD, D. J.; CHAMVON, P.; TORA, L (1996). hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II. *EMBO J.* **15**: 5022-5031.
- BHATIA, P. K. UND MUKHOPADHYAY A. (1998). Protein glycosylation: implications for in vivo functions and therapeutic applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **64**: 155-201.
- BI, W.; DENG, J. M.; ZHANG, Z.; BEHRINGER, R. R.; DE CROMBRUGGHE, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genet.* **22**: 85-89.
- BIRD, A. P. (1987). CpG islands as gene markers in vertebrate nucleus. *Trend Genet.* **3**: 342-347.
- BIRNBOIM, H. C. UND DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acid. Res.* **7**: 1513-1523.
- BONALDO, M. F.; LENNON, G.; SOARE, M. B. (1996). Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res.* **6**: 791-806.
- BRIGGS, M. D.; HOFFMAN, S. M.; KING, L. M.; OLSEN, A. S.; MOHRENWEISER, H.; LEROY, J. G.; MORTIER, G. R.; RIMOIN, D. L.; LACHMAN, R. S.; GAINES, E. S. CEKLENIK, J. A.; KNOWLTON, R. G.; COHN, D. H. (1995). Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat Genet.* **10**: 330-336.
- BURD, C. G. UND DREYFUSS, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621.
- CAPPELLEN, D.; DE OLIVEIRA, C.; RICOL, D.; DIEZ DE MEDINA, S. G.; BOURDIN, J.; SASTRE-GARAU, X.; CHOPIN, D.; THIERY, J. P.; RADVANYI, F. (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat. Genet.* **23**: 18-19.
- CARIM, L.; SUMOY, L.; NADAL, M.; ESTIVILL, X.; ESCARCELLER, M. (1999). Cloning, expression, and mapping of PDCD9 the human homolog of *Gallus gallus* pro-apoptotic protein 52. *Cytogenet. Cell. Genet.* **87**: 85-88.
- CHELLAIAH, A. T.; MCEWEN, D. G.; WERNER, S.; XU, J.; ORNITZ, D. M. (1994). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. *J. Biol. Chem.* **269**: 11620-11627.
- CHEN, J. J.; ROWLEY, J. D.; WANG, S. M. (2000). Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 349-353.
- CHESI, M.; BERGSAGEL, P. L.; BRENTS, L. A.; SMITH, C. M.; GERHARD, D. S.; KUEHL, W. M. (1996). Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. *Blood* **88**: 674-681.
- CHESI, M.; NARDINI, E.; BRENTS, L. A.; SCHROCK, E.; RIED, T.; KUEHL, W. M.; BERGSAGEL, P. L. (1997). Frequenz translocation t(4; 14)(p16.3; q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutation of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet.* **16**: 260-264.
- CHESI, M.; BERGSAGEL, P. L.; SHONUKAN, O. O.; MARTELLI, M. L.; BRENTS, L. A.; CHEN, T.; SCHRÖCK, E.; RIED, T.; KUEHL, W. M (1998). Frequent dysregulation of the *c-maf* protooncogene at 16q23 by translocation to an immunoglobulin locus in multiple myeloma. *Blood* **91**: 4457-4463.

- CHIANG, C.; LITINGTUNG, Y.; LEE, E.; YOUNG, K. E.; CORDEN, J. L.; WESTPHAL, H.; BEACHY, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**: 407-413.
- CLAUDIO, J. O.; LIEW, C.-C.; DEMPSEY, A. A.; CUKERMAN, E.; STEWART, A. K.; NA, E.; ATKINS, H. L.; ISCOVE, N. N.; HAWLEY, R. G. (1998): Identification of sequence-tagged transcripts differentially expressed within the human hematopoietic hierarchy. *Genomics* **50**: 44-52.
- COHN, M. J.; TICKLE, C. (1996). Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *TIG* **12**: 253-257.
- COLVIN, J. S.; BOHNE, B. A.; HARDING, G. W.; MCEWEN, D. G.; ORNITZ, D. M. (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet.* **12**: 390-397.
- CROSSLEY, P. H.; MINOWADA, G.; MACARTHUR, C. A.; MARTIN, G. R. (1996). Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **12**: 84(1):127-36.
- CROZET, F.; EL AMRAOUI, A.; BLANCHARD, S.; LENOIR, M.; RIPOLL, C.; VAGO, P.; HAMEL, C.; FIZAMES, C.; LEVI-ACOBAS, F.; DEPETRIS, D.; MATTEI, M. G.; WEIL, D.; PUJOL, R.; PETIT, C. (1997). Cloning of the genes encoding two murine and human cochlear unconventional type I myosins. *Genomics* **40**: 332-41.
- DATSON, N. A.; VAN DER PERK-DE JONG, J.; VAN DEN BERG, M P.; DE KLOET E. R.; VREUGDENHIL, E. (1999). MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nuc. Acid Res.* **27**: 1300-1307.
- DELEZOIDE, A-L; LASSELIN-BENOIST, C.; LEGEAI-MALLET, L.; BRICE, P.; SENE, V.; YAYON, A.; MUNNICH, A.; VEKEMANS, M; BONAVENTURE, J. (1997). Abnormal FGFR 3 expression in cartilage of thanatophoric dysplasia fetuses. *Hum. Mol. Gen.* **6**: 1899-1906.
- DEL GATTO, F. UND BREATHNACH, R. (1995). Exon and intron sequences, respectively, repress and activate splicing of fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4825-4834.
- DENG, C.; WYNHAW-BORIS, A.; ZHOU, F.; KUO, A.; LEDER, P. (1996). Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is a Negative Regulator of Bone Growth. *Cell* **84**: 911-921.
- DEUTZ-TERLOUW, P. P.; LOSEKOOT, M.; AALFS, C. M.; HENNEKAM, R. C.; BAKKER, E. (1998). Asn540Thr substitution in the fibroblast growth factor receptor 3 tyrosine kinase domain causing hypochondroplasia. *Hum Mutat. Suppl* **1**: 62-5.
- DEVOTO, M; SHIMOYA, K.; CAMINIS, J. OTT, J.; TENENHOUSE, A.; WHYTE M. P.; SEREDA, L.; HALL, S.; CONSIDINE, E.; WILLIAMS, C. J.; TROMP, G.; KUIVANIEMI, H.; ALA-KOKKO, L.; PROCHOP, D. J.; SPOTILA, L. D. (1998). First-stage autosomal genome screen in extended pedigree suggests genes predisposition to low bone mineral density on chromosome 1p; 2p and 4q. *Europ. J. Hum. Genet.* **6**:151-157.
- DIETZ, U. H.; ZIEGELMEIER, G.; BITTNER, K.; BRUCKNER, P.; BALLING, R. (1999). Spatio-temporal distribution of chondromodulin-I mRNA in the chicken embryo: expression during cartilage development and formation of the heart and eye. *Dev. Dyn.* **6**: 233-43.
- DIONNE, C. A.; CRUMLEY, G.; BELLOT, F.; KAPLOW, J. M.; SEARFOSS, G.; RUTA, M.; BURGESS, W. H.; JAYE, M.; SCHLESSINGER, J. (1990). Cloning and expression of two

- distinct high-affinity receptors cross-reaction with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J.* **9**: 2685-2692.
- DREYER, S. D.; ZHOU, G.; LEE, B. (1998). The long and the short of it: developmental genetics of the skeletal dysplasias. *Clin Genet* **54**(6): 464-73.
- DREYER, S. D.; ZHOU, L.; MACHADO, M. A.; HORTON, W. A.; ZABEL, B.; WINTERPACHT, A.; LEE, B. (1998b). Cloning, characterization, and chromosomal assignment of the human ortholog of murine *Zfp-37*, a candidate gene for Nager syndrome. *Mamm. Genom.* **9**:458-462.
- DREYER, S.D.; ZHENG, Q.; ZABEL, B.; WINTERPACHT, A.; LEE, B. (1999). Isolation, characterization, and mapping of a zinc finger gene, ZFP95, containing both a SCAN box and an alternatively spliced KRAB A domain. *Genomics* **62**: 119-22.
- DUNHAM, I; SHIMIZU, N.; ROE, B. A.; CHISSOE, S. ET AL. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* **402**: 489-495.
- ERLEBACHER, A.; FILVAROFF, E. H.; GITELMAN, S. E.; DERYNCK, R. (1995). Towards the molecular understanding of skeletal development. *Cell* **80**: 371-378.
- FEINBERG, A. P. UND VOGELSTEIN, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- GILBERT, E.; DEL GATTO, F.; CHAMPION-ARNAUD, P.; GESNEL, M.-C.; BREATHNACH, R. (1993). Control of BEK and K-SAM splice sites in alternative splicing of the fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 5461-5468.
- GRAY, T. E.; EISENSTEIN, M.; SHIMON, D.; GIVOL, D.; YAYON, A. (1995). Molecular modeling based mutagenesis defines ligand binding and specificity determining regions of fibroblast growth factor receptors. *Biochemistry* **34**: 10325-10333.
- GRIGELIONIENE, G.; HAGENAS, L.; EKLOF, O.; NEUMEYER, L.; HAEREID, P. E.; ANVRET, M. (1998). A novel missense mutation Ile538Val in the fibroblast growth factor receptor 3 in hypochondroplasia. Mutations in brief no. 122. Online. *Hum Mutat.* **11**(4): 333.
- GROVER, J; CHEN, X.-N.; KORENBERG, J. R.; ROUGHLEYS, P. J. (1995). The human lumican gene. *J. Biol. Chem.* **270**: 21942-21949.
- GRUNDSTEIN, M.; WALLIS, J. (1979). Colony hybridization. *Methods Enzymol.* **68**:379-389.
- GUBLER, U.; HOFFMANN, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**: 263-269.
- HÄSTBACKA, J.; DE LA CHAPELLE, A.; MAHTANI, M. M.; CLINES, G.; REEVE-DALY, M. P.; DALY, M.; HAMILTON, B. A.; KUSUMI, K.; TRIVEDI, B.; WEAVER, A. (1994). The Diastrophic Dysplasia Gene Encodes a Novel Sulfate Transporter: Positional Cloning by Fine-structure Linkage Disequilibrium Mapping. *Cell* **78**: 1073-1087.
- HANAHAH, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- HATTORI, M.; FUJIYAMA, A.; TAYLOR, T. D.; WATANABE, H. ET AL. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405**: 311-319.
- HECHT, J. T.; NELSON, L. D.; CROWDER, E.; WANG, Y.; ELDER, F. F. B.; HARRISON, W. R.; FRANCOMANO, C. A.; PRANGE, C. K.; LENNON, G. G.; DEERE, M.; LAWLER, J. (1995). Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene. *Hum. Molec. Genet.* **8**: 123-128.

- HELLER, R. A.; SCHENA, M.; CHAI, A.; SHALON, D.; BEDILION, T.; GILMORE, J.; WOOLLEY, D. E.; DAVIS, R. W. (1997). Discovery and analysis of inflammatory disease related genes using cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:2150-2155.
- HENDERSON, J. E.; NASKI, M. C.; AARTS, M. M.; WANG, D.; CHENG, L.; GOLTZMAN, D.; ORNITZ, D. M. (2000). Expression of FGFR3 with the G380R achondroplasia mutation inhibits proliferation and maturation of CFK2 chondrocytic cells. *J. of bone and min. res.* **15**: 155-165.
- HILBERT, M.; HILBERT, K.; SPRANGER, J.; WILDHARDT, G.; WINTERPACHT, A.; WÜCHNER, C.; ZABEL, B. (1998). Hypochondroplasia, Achondroplasia und thanatophore Dysplasie als Folge von Mutationen des Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor-3-Gens (FGFR3). *Monatschr. Kinderheilkd.* **146**: 687-691.
- HILLIER, L. D.; LENNON, G.; BECKER, M.; BONALDO, M. F.; CHIAPELLI, B.; CHISSOE, S.; DIETRICH, N. et al (1996). Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. *Genome Research* **6**: 807-828.
- HORTON, W. A.; HECHT, J. T. (1993). The Chondrodysplasias In: Royce, P. M.; Steinmann, B. (Eds) *Connective tissue and its heritable disorders. Molecular, genetic, and medical aspects.* Wiley-Loss, New York, 541-675.
- HOU, W. S.; BRÖMME, D.; ZHAO, Y.; MEHLER, E.; DUSHEY, C.; WEINSTEIN, H.; SA MIRANDA, C.; FRAGA, C.; GREIG, F.; CAREY, J.; RIMOIN, D. L.; DESNICK, R. J.; GELB, B. D. (1999). Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis. *J Clin Invest* **103**: 731-738.
- INNIS, J. W.; MORTLOCK, D. P. (1998). Limb development: molecular dysmorphology is at hand! *Clin Genet.* **54**: 78-89.
- IOANNOU, P. A.; AMEMIYA, C.T.; GARNES, J.; KROISEL, P.M.; SHIZUYA, H.; CHEN, C.; BATZER, M.A.; DE JONG, P. J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet.* **6**: 84-9.
- JABS, E. W. (1998). Toward understanding the pathogenesis of craniosynostosis through clinical and molecular correlates. *Clin. Genet.* **53**: 79-86.
- JI, H.; LU, Y. E.; JIA, T.; WANG, M.; LIU, J., XIAO, G.; JOSEPH, B. K. (1997). Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing. *Cancer Res.* **57**: 759-764.
- JI, X.; CHEN, D.; XU, C.; HARRIS, S. E.; MUNDY, G. R.; YONEDA, T. (2000). Patterns of gene expression associated with BMP-2-induced osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal progenitor cell 3T3-F442A. *J. Bone Miner. Metab.* **18**:132-139.
- JOHNSON, D. E.; LU, J.; CHEN, H.; WERNER, S.; WILLIAMS, L. T. (1991). The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanism for generation receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4627-4634.
- JOHNSON, D. E. UND WILLIAMS, L. T. (1993). Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in cancer research* **60**: 1-41.
- JOHNSON, R. L.; TABIN, C. J. (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* **90**: 979-990.
- KANG, S.; GRAHAM, J. M.; OLNEY, A. H.; BIESECKER, L. G. (1997). GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nature Genet.* **15**: 266-268.

- KANNAN, K. UND GIVOL, D. (2000). FGF receptor mutations: Dimerization syndromes, cell growth suppression, and animal models. *IUBMB Life* **49**: 197-205.
- KARSENTY, G. (1998). Genetics of skeletogenesis. *Dev Genet.* **22**: 301-313.
- KARSENTY, G. (1999). The genetic transformation of bone biology. *Gene and Dev.* **13**: 3037-3051.
- KEEGAN, K.; JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T.; HAYMAN, M. J. (1991). Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **88**: 1095-1099.
- KENZELMANN, M. UND MÜHLEMANN, K. (1999). Substantially enhanced cloning efficiency of SAGE (serial analysis of gene expression) by adding a heating step to the original protocol. *Nuc. Acid Res.* **27**: 917-918.
- KLEVER, M.; GROND-GINSBACH, C.; SCHERTHAN, H.; SCHROEDER-KURTH, T. M. (1991). Chromosomal in situ suppression hybridization after Giemsa banding. *Hum. Genet.* **86**: 484-486.
- KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S.; YAMAGUCHI, A., SASAKI, K.; DEGUCHI, K.; SHIMIZU, Y.; BRONSON, R. T.; GAO, Y. H.; INADA, M.; SATO, M.; OKAMOTO, R.; KITAMURA, Y.; YOSHIKI, S.; KISHIMOTO, T. (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755-764.
- KOZAK, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8125-8133.
- KOZAK, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* **7**: 563-74.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- LANSKE, B.; KARAPLIS, A. C.; LEE, K.; LUZ, A.; VORTKAMP, A.; PIRRO, A.; KARPERIEN, M.; DEFIZE, L. H. K.; HO, C.; MULLIGAN, R. C.; ABOU-SAMRA, A. B.; JUPPNER, H.; SEGRE, G. V.; KRONENBERG, H. M. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* **273**: 663-666.
- LAUFER, E.; NELSON, C. E.; JOHNSON, R. L.; MORGAN, B. A.; TABIN C. (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* **79**: 993-1003.
- LAZNER, F.; GOWEN, M.; PAVASOVIC, D.; KOLA, I. (1999). Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet* **8**: 1839-46.
- LEE, L. G.; CONNELL, C. R.; WOO, S. L.; CHENG, R. D.; MCARDLE, B. F.; FULLER, C. W.; HALLORAN, N. D.; WILSON, R. K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2471-2483.
- LEMIEUX, N.; DUTRILLAUX, B.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. (1992). A simple method for simultaneous R- or G- banding and fluorescence in situ hybridization of small copy genes. *Cytogenet. Cell Genet.* **59**:311-312.

- LI, Y.; MANGASARIAN, K.; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C. (1997). Activation of FGF receptors by mutations in the transmembrane domain. *Oncogene* **14**: 1397-1406.
- LI, C.; CHEN, L.; IWATA, T.; KITAGAWA, M.; FU, X.-Y.; DENG, C.-X. (1999). A Lys 644 Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum. Mol. Genet.* **18**: 35-44.
- LIANG, P. UND PARDEE, A. B (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-970.
- LICHTER, P.; CREMER, T.; BORDEN, J.; MANUELIDIS, L.; WARD, D. C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* **80**: 224.234.
- LIEW, C. C.; HWANG, D. M; FUNG, Y. W.; LAURENSEN, C.; CUKERMAN, E.; TSUI, S.; LEE, Y. (1994). A catalogue of genes in the cardiocascular system as identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 10645-10649.
- LIU, Y. H.; TANG, Z.; KUNDU, R. K.; WU, L.; LUO, W.; ZHU, D.; SANGIORGI, F.; SNEAD, M. L.; MAXSON, R. E. (1999). Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev. Biol.* **205**: 260-274.
- LOCKART, D. J.; DONG, H.; BYRNE, M. C.; FOLLETTIE, M. T.; GALLO, M. V. CHEE, M. S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H.; BROWN, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **14**: 1675-1680.
- LONNQVIST, L.; KARTTUNEN, L., RANTAMAKI, T.; KIELTY, C.; RAGHUNATH, M.; PELTONEN, L. (1996). A point mutation creating an extra N-glycosylation site in fibrillin-1 results in neonatal Marfan syndrome. *Genomics* **36**: 468-475.
- LOOMIS, C. A.; HARRIS, E.; MICHAUD, J.; WURST, W.; HANKS, M.; JOYNER, A. L. (1996). The mouse engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* **382**: 360-363.
- MACGREGOR, H. C.; UND MIZUNO, S. (1976). In situ hybridisation of „nick-translated“ 3H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. *Chromosoma* **54**: 15-25.
- MANGASARIAN, K; LI, Y.; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C. (1997). Mutation associated with Crouzon syndrome causes ligand-independent dimerization and activation of FGF receptor-2. *J. Cell. Physiol.* **172**: 117-125.
- MANOUVRIER-HANU, S.; HOLDER-ESPINASSE, M.; LYONNET, S. (1999). Genetics of limb anomalies in humans. *Trends Genet.* **15**: 409-417.
- MAO, M.; FU, G.; WU, J.-S.; ZHANG, Q.-H.; ZHOU, J.; KAN, L.-X.; HUANG, Q.-H; HE, L.-L.; GU, B.-W., HAN, Z.-G.; SHEN, Y.; GU J.; YU, Y.-P.; XU, S.-H.; WANG, Y.-X; CHEN, S.-J.; CHEN, Z. (1998). Identification of genes expressed in human CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem/progenitor cells by expressed sequence tags and efficient full-length cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8175-8180.
- MARCHUK, D. A.; DRUMM, M.; SAULINO, A.; COLLINS, F. S. (1990). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1154-1155.

- MCEWEN, D. G. UND ORNITZ, D. M. (1998). Regulation of the fibroblast growth factor receptor 3 promoter and Intron I enhancer by Sp1 family transcription factors. *J. Biol. Chem.* **9**: 5349-5357.
- MCKEEHAN, W. L.; WANG, F.; KANN, M. (1998). The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **59**: 135-176.
- MEYERS, G. A.; ORLOW, S. J.; MUNRO, I. R.; PRZYLEPA, K. A.; JABS, E. W. (1995). Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat. Genet.* **11**: 462-464.
- MIKI, T.; BOTTARO, D. P.; FLEMING, T. P.; SMITH, C. L.; BURGESS, W. H.; CHAN, A. M.; AARONSON, S. A. (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 246-50.
- MUENKE, M.; SCHELL, U.; HEHR, A.; ROBIN, N. H.; LOSKEN, H. W.; SCHINZEL, A.; PULLEYN, L. J.; RUTLAND, P.; REARDON, W.; MALCOLM, S.; WINTER, R. M. (1994): A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat Genet.* **8**: 269-274.
- MUNDLOS, S. (1994). Expression patterns of matrix genes during human skeletal development. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Vol. **28** No. 3.
- MUNDLOS, S. UND OLSON B. R. (1997a). Heritable diseases of the skeleton: Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J.* **11**: 125-132.
- MUNDLOS, S. UND OLSON B. R. (1997b). Heritable diseases of the skeleton: Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J.* **11**: 227-233.
- MURAGAKI, Y.; MUNDLOS, S.; UPTON, J.; OLSON, B. R. (1996). Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science* **272**: 548-551.
- MURGUE, B.; TSUNEKAWA, S.; ROSENBERG, I.; DEBEAUMONT, M.; PODOLSKY, D. K. (1994). Identification of a novel variant form of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3 IIIb) in human colonic epithelium. *Cancer Res* **54**: 5206-11.
- NANNI, L.; MING, J. E.; BOCIAN, M.; STEINHAUS, K.; BIANCHI, D. W.; DE DIE-SMULDERS, C.; GIANNOTTI, A.; IMAIZUMI, K.; JONES, K. L.; DEL CAMPO, M.; MARTIN, R. A.; MEINECKE, P.; PIERPONT, M. E. M.; ROBIN, N. H.; YOUNG, I. D.; ROESSLER, E.; MUENKE, M. (1999). The mutational spectrum of the Sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum. Molec. Genet.* **8**: 2479-2488.
- NASKI, M. C.; WANG, Q.; XU, J.; ORNITZ, D. M. (1996). Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nature Genet.* **13**: 233-237.
- NETO, E. D., CORREA, R. G. ET AL. (2000). Shotgun sequencing of the human transcriptomes with ORF expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3491-3496.

- NEWBERRY, E. P.; LATIFI, T.; BATTAILE, J. T.; TOWLER, D. A. (1997). Structure-function analysis of Msx2-mediated transcriptional suppression. *Biochemistry* **36**: 10451-10462.
- NEWBERRY, E. P.; LATIFI, T.; TOWLER, D. A. (1999). The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. *Biochemistry* **38**: 10678-90.
- NISWANDER, L.; JEFFREY, S.; MARTIN, G. R.; TICKLE, C. (1994). A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* **371**: 609-612.
- OHBAYASHI, N.; HOSHIKAWA, M.; KIMURA, S.; YAMASAKI, M.; FUKUI, S.; ITOH, N. (1998). Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF-18. *J. Biol. Chem.* **273**: 18161-18164.
- OTTO, F.; THORNELL, A. P.; CROMPTON, T.; DENZEL, A.; GILMOUR, K. C.; ROSEWELL, I. R.; STAMP, G. W.; BEDDINGTON, R. S.; MUNDLOS, S.; OLSEN, B. R.; SELBY, P. B.; OWEN, M. J. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765-771.
- PARIYARATH, R. F.; PAGANI, F.; STUANI, C.; GARCIA, R.; BARALLE, F. E. (1996). L273S missense substitution in human lysosomal acid lipase creates a new N-glycosylation site. *FEBS Lett.* **397**:79-82.
- PARR, B. A.; McMAHON, A. P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* **374**: 350-353.
- PARTANEN, J.; MAKELA, T.P.; EEROLA, E.; KORHONEN, J.; HIRVONEN, H.; CLAEISSON-WELSH, L.; ALITALO, K. (1991). FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *EMBO J.* **10**: 1347-54.
- PASSOS-BUENO, M. R.; WILCOX, W.R.; JABS, E.W.; SERTIE, A.L.; ALONSO, L.G.; KITOH, H. (1999). Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat.* **14**:115-25.
- PEREZ-CASTRO, A.; WILSON, J.; ALTHERR, M. (1995). Genomic organization of the mouse fibroblast growth factor receptor 3 (Fgfr3) gene. *Genomics* **30**: 157-162.
- PETERS, K. G.; WERNER, S.; CHEN, G.; WILLIAMS, L. T. (1992). Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Develop.* **114**: 223-243.
- PETERS, K.; ORNITZ, D.; WERNER, S.; WILLIAMS, L. (1993). Unique expression of the FGF Receptor 3 Gene during mouse organogenesis. *Dev. Biol.* **155**: 423-430.
- PLOTNIKOV, N.; SCHLESSINGER, J.; HUBBARD, S. R.; MOHAMMADI, M (1999). Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* **98**: 641-650.
- POLAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J. L.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**: 300-305.
- POLYMERPOULOS, M. H.; IDE, S. E.; MAGYARI, T.; FRANCOMANO, C. A. (1996). Brachydactyly type C gene maps to human chromosome 12q24. *Genomics* **38**: 45-50.
- POWELL, J. (1998). Enhanced concatemer cloning- a modification to the SAGE (serial analysis of gene expression) technique. *Nuc. Acid Res.* **26**: 3445-3446.



- PRINOS, P.; COSTA, T.; SOMMER, A.; KILPATRICK, M. W.; TSIPOURAS, P. (1995). A common FGFR3 gene mutation in hypochondroplasia. *Hum. Molec. Genet.* **4**: 2097-2101.
- PSCHYREMBEL, W. (1994). *Klinisches Wörterbuch*, 257 Auflage, Walter der Gruyter Verlag.
- RADHAKRISHNA, U.; BLOUIN, J.-L.; MEHENNI, H.; PATEL, U. C.; PATEL, M. N.; SOLANKI, J. V.; ANTONARAKIS, S. E. (1997). Mapping one form of autosomal dominant postaxial polydactyly type A to chromosome 7p15-q11.23 by linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **60**: 597-604.
- RAFFIONI, S.; ZHU, Y.-Z.; BRADSHAW, R. A.; THOMPSON, L. M. (1998). Effect of transmembrane and kinase domain mutations on fibroblast growth factor receptor 3 chimera signaling in CP12 cells. *J. Biol. Chem.* **52**: 35250-35259.
- REARDON, W.; WINTER, R. M.; RUTLAND, P.; PULLEYN, L. J.; JONES, B. M.; MALCOLM, S. (1994). Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nat Genet.* **8**: 98-103.
- RICKETTS, M. H.; GOLDMAN, D.; LONG, J. C.; MANOWITZ, P. (1996). Arylsulfatase A pseudodeficiency-associated mutations: population studies and identification of a novel haplotype. *Am. J. Med. Genet.* **67**:387-392.
- RIDDLE, R. D.; JOHNSON, R. L.; LAUFER, E.; TABIN, C. (1993). Sonic Hedgehog Mediates the Polarizing Activity of the ZPA. *Cell* **75**: 1401-1416.
- ROUSSEAU, F.; BONAVENTURE, J.; LEGEAI-MALLET, L.; PELET, A.; ROZET, J.-M.; MAROTEAUX, P.; LE MERRER, M.; MUNNICH, A. (1994). Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* **371**: 252-254.
- ROUSSEAU, F.; SAUGIER, P.; LE MERRER, M.; MUNNICH, A.; DELEZOIDE, A.-L.; MAROTEAUX, P.; BONAVENTURE, J.; NARCY, F.; SANAK, M. (1995). Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nature Genet.* **10**: 11-12.
- ROUSSEAU, F.; BONAVENTURE, J.; LEGEAI-MALLET, L.; SCHMIDT, H.; WEISSENBACH, J., MAROTEAUX, P.; MUNNICH, A.; LE MERRER, M. (1996). Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia, *J. Med. Genet.* **33**: 749-752.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**: 779-815.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 5463-5467.
- SASKI, N.; NAGAOKA, S.; ITOH, M.; IZAWA, M.; KONNO, H.; CARNINCI, P.; YOSHIKI, A.; KUSAKABE, M.; MORIUCHI, T.; MURAMATSU, M.; OKAZAKI, Y.; HAYASHIZAKI, Y. (1998). Characterization of gene expression in mouse blastocyst using single-pass sequencing of 3995 clones. *Genomics* **49**: 167-179.
- SAUNDERS, J. W.; GASSELING, M. (1968). Ectodermal-mesenchymal interaction in the origin of the limb. In: *Epithelial-mesenchymal interaction*; Fleischmayer; Billingham, R.E (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore: 78-97.
- SCHALLING, M.; FRIBERG, K.; SEROOGY, K.; RIEDERER, P.; BIRD, E.; SCHIFFMAN, S. N.; MAILLEUX, P.; VANDERHAEGHEN, J.-J.; KUGA, S.; GOLDSTEIN, M.; KITAHAMA,

- K.; LUPPI, P. H.; JOUVET, M.; HOEKFELT, T. (1990). Analysis of expression of cholecystokinin in dopamine cells in the ventral mesencephalon of several species and in humans with schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 8427-8431.
- SCHENA, M.; SHALON, S.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**: 467-470.
- SCHULER, G. D.; BOGUSKI, M. S.; STEWART, E. A.; STEIN, L. D.; GYAPAY, G. et al. (1996). A gene map of the human genome. *Science* **274**: 540-546.
- SCHWABE, J. W. R.; RODRIGUEZ-ESTEBAN, C.; BELMONTE, J. C. I. (1998). Limbs are moving, where are they going? *TIG* **14**: 229-235.
- SEGEV, O.; CHUMAKOV, I.; NEVO, Z.; GIVOL, D.; MADAR-SHAPIRO, L.; SHEININ, Y.; WEINREB, M.; YAYON, A. (2000). Restrained chondrocyte proliferation and maturation with abnormal growth plate vascularization and ossification in human FGFR-3<sup>G380R</sup> transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 249-258.
- SEIPEL, B. (1996). Vergleichende cytogenetische Analyse der humanen Chromosomenregion 11p15 und der entsprechenden Sytäniegruppe auf dem murinen Chromosom 7 mit Hilfe der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH). Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- SHARP P. A. (1987). Trans splicing: variation on a familiar theme? *Cell* **50**:147-8.
- SHIANG, R.; THOMPSON, L. M.; ZHU, Y.-Z.; CHURCH, D. M.; FIELDER, T. J.; BOCIAN, M.; WINOKUR, S. T.; WASMUTH, J. J. (1994). Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* **78**: 335-342.
- SHORT, J. M.; FERNANDEZ, J. M.; SORGE, J. A.; HUSE, W. D. (1988). λZAP: a bacteriophage λ expression vector with in vivo excision properties. *Nucl. Acid Res.* **16**: 7583-7600.
- SMITH, B.; SKARECKY, D.; BENGTSSON, U.; MAGENIS, R. E.; CARPENTER, N.; WASMUTH, J. J. (1988). Isolation of DNA markers in the direction of the Huntington disease gene form the G8 locus. *Am. J. Hum. Genet.* **42**: 335-344.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- SPRANGER, J.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B. (1994). The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *Eur J Pediatr* **153**: 56-65.
- SPRANGER, J. (1997). Irrtümer der Skelettentwicklung. *Monatsschr Kinderheilkd.* **145**: 334-341.
- STEVENS, D. A.; WILLIAMS, G.R. (1999). Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. *Mol Cell Endocrinol* **151**: 195-204.
- SU, W.-C.; KITAGAWA, M.; XUE, N.; XIE, B.; GAROFALO, S.; CHO, J.; DENG, C.; HORTON, W. A.; FU, X.-Y. (1997). Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* **386**: 288-292.
- SUN, L., LIU, Y, FREMONT, M.; SCHWARZ, S.; SIEGMANN, M.; MATTHIES, R.; JOST, J. P. (1998). A novel 52 kDa protein induces apoptosis and concurrently activates *c-Jun* N-terminal kinase 1 (JNK1) in mouse C3H10T1/2 fibroblasts. *Gene* **208**:157-166.

- SUPERTI-FURGA, A.; EICH, G. U.; BUCHER, H.; WISSER, J.; GIDEON, A.; GITZELMANN, R.; STEINMANN, B. (1995). A glycine375-to-cystein substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in an newborn with achondroplasia. *Eur. J. Pediatr.* **95**: 215-219.
- TAVORMINA, P. L.; SHIANG, R.; THOMPSON, L. M.; ZHU, Y.-Z.; WILKIN, D. J.; LACHMAN, R. S.; WILCOX, W. R.; RIMOIN, D. L.; COHN, D. H.; WASMUTH, J. J. (1995). Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet.* **9**: 321-328.
- THOMPSON, L.M.; PLUMMER, S.; SCHALLING, M.; ALTHERR, M. R.; GUSELLA, J. F.; HOUSMAN, D. E.; WASMUTH, J. J. (1991). A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4. *Genomics* **11**(4): 1133-42.
- TICKLE, C. (1995) Vertebrate limb development. *Curr Opin Gen Dev.* **5**: 478-484.
- TICKLE, C. (1996) Genetics and limb development. *Devel. Genet.* **19**: 1-8.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*: **270**: 484-487.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; ZHOU, W.; VOGELSTEIN, J.; BASRAI, M. A.; BASSETT, D. E.; HIETER, P.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**: 243-251.
- VELCULESCU, V. E. (1999). Tantalizing transcriptomes- SAGE and its use in global gene expression analysis. *Science* **286**: 1491-1492.
- VIRLON, B.; CHEVAL, L.; BUHLER, J. M.; BILLON, E.; DOUCET, A.; ELALOUF, J. M. (1999). Serial microanalysis of renal transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 15286-91.
- VORTKAMP, A.; GESSLER, M.; GRZESCHIK, K.-H. (1991). GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* **352**: 539-540.
- VORTKAMP, A.; LEE, K.; LANSKE, B.; SEGRE, G. V.; KRONENBERG, H. M.; TABIN, C. J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**: 613-622.
- WANG, Y.; SPATZ, M. K.; KANNAN, K.; HAYK, H.; AVIVI, A.; GORIVODSKY, M.; PINES, M., YAYON, A.; LONAI, P.; GIVOL, D. (1999). A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 4455-4460.
- WATANABE, H.; YAMADA, Y. (1999). Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. *Nat. Genet.* **21**: 225-229.
- WEBSTER, M. K.; DONOGHUE, D. J. (1996). Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.* **15**: 520-527.
- WERNER, S.; DUAN, D. S.; DE VRIES, C.; PETERS, K. G.; JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. (1992). Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* **12**(1): 82-88.

- WILCOX, A. S.; KHAN, A. S.; HOPKINS, J. A.; SIKELA, J. M. (1991). Use of 3' untranslated sequences of human cDNAs for rapid chromosome assignment and conversion to STSs: implication for an expression map of the genome. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1837-1842.
- WILKIE, A. O. M.; SLANEY, S. F.; OLDRIDGE, M.; POOLE, M. D.; ASHWORTH, G. J.; HOCKLEY, A. D.; HAYWARD, R. D.; DAVID, D. J.; PULLEYN, L. J.; RUTLAND, P.; MALCOLM, S.; WINTER, R. M.; REARDON, W. (1995). Apert Syndrome results from localized mutations of *FGFR2* and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat. Genet.* **9**: 165-168.
- WILKIE, A. O. M.; MORRISS-KAY, G. M.; JONES, E. Y.; HEATH, J.K. (1995). Functions of fibroblast growth factors and their receptors. *Curr. Biol.* **5**: 500-507.
- WINTERPACHT, A.; HILBERT, K.; STELZER, C.; SCHWEIKARDT, T.; DECKER, H.; SEGERER, H.; SPRANGER, J.; ZABEL, B. (2000). A novel mutation in *FGFR-3* disrupts a putative N-glycosylation site and results in hypochondroplasia. *Physiol. Genomics* **2**: 9-12.
- WUECHNER, C.; HILBERT, K.; ZABEL, B.; WINTERPACHT, A (1997): Human fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*): genomic sequence and primer set information for gene analysis. *Hum. Genet.* **100**: 215-219.
- ZABEL, B. U. UND WINTERPACHT, A. (2000), Osteochondrodysplasien - genetisch bedingte Störungen der Skelettentwicklung. In: Ganten, D. und Ruckpaul, K. (Hrsg.) Handbuch der molekularen Medizin, Band 7: Monogen bedingte Erbkrankheiten, Teil 2. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (im Druck).
- ZGURICASA, J.; HEUSB, H.; MORALES-PERALTAC, E.; BREEDVELDB, G.; KUYTD, B.; MUMCUE, E. F.; BAKKERA, W.; AKARSUF, N.; KAYG, S. P. J.; HOVIUSA, S. E. R.; HEREDERO-BAUTEC, L.; OOSTRAB, B. A.; HEUTINK, P (1999). Clinical and genetic studies on 12 preaxial polydactyly families and refinement of the localisation of the gene responsible to a 1.9 cM region on chromosome 7q36. *J. Med. Genet* **36**, 33-40.
- ZHANG, H. CATRON, K. M.; ABATE-SHEN, C. (1996). A role for the *Msx-1* homeodomain in transcriptional regulation: Residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 1764-1769.
- ZHANG, L.; ZHOU, W.; VELCULESCU, V. E.; KERN, S. E.; HRUBAN, R. H.; HAMILTON, S. R.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* **276**: 1268-1272.

## **7. Anhang**