

**Sequenz und Struktur des Proenteropeptidase-Gens
als Basis für Mutationsanalysen bei
angeborenem Enteropeptidasemangel**

Cornelius Alexander Bück

2008

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Sequenz und Struktur des Proenteropeptidase-Gens
als Basis für Mutationsanalysen bei
angeborenem Enteropeptidasemangel**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Cornelius Alexander Bück

aus Esslingen

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. Andreas Holzinger

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. med. Stephan Brand

Priv. Doz. Dr. med. Tim M. Strom

Dekan:

Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

24.04.2008

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Enteropeptidase.....	1
1.1.1	Die Pawlowsche Enterokinase.....	1
1.1.2	Aktueller Forschungsüberblick.....	2
1.1.3	Malabsorption und Maldigestion.....	5
1.1.4	Pankreas und Duodenum.....	6
1.2	Der angeborene Enteropeptidasemangel (McKusick 226 200).....	7
1.2.1	Symptomatik	7
1.2.2	Diagnostik.....	8
1.2.3	Therapie.....	10
1.3	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Rekombinierte DNA.....	14
2.1.1	Genbank-Screening.....	14
2.1.2	Klonale Vermehrung der PAC-Klone.....	15
2.1.3	Qiagen Midi-Prep.....	15
2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
2.2.1	PCR-Zyklusprogramme.....	17
2.2.2	PCR-Ansatz.....	18
2.2.3	Ableitung von Oligonukleotidprimern.....	18
2.2.4	Prinzipiell zu erwartende PCR-Produkte.....	21
2.2.5	DNA-Elektrophorese.....	22
2.3	Sequenzierung.....	24
2.3.1	Das Prinzip einer Nukleotidsequenzierung.....	24
2.3.2	Reinigung des PCR-Produktes.....	25
2.3.3	Der Sequenzierprozess.....	25
2.3.4	Reinigung des Sequenzierproduktes.....	26
2.3.5	Elektropherogramme.....	26
2.4	Genome walk®	27

3	Ergebnisse.....	28
3.1	Charakterisierung der PAC-Klone.....	28
3.2	Stromaufwärts von Exon 1 (Promotorregion).....	29
3.3	PCR-amplifizierte Introns.....	31
3.4	Die Sequenz der Exon-Intron-Übergänge.....	34
3.5	Die Genstruktur.....	45
3.6	Methode zur Mutationsanalyse.....	47
4	Diskussion.....	48
4.1	Eigene Daten.....	48
4.1.1	Zielsetzung der Arbeit.....	48
4.1.2	Promotorregion.....	48
4.1.3	Die genomische Struktur.....	49
4.1.4	Exonmodule.....	50
4.1.5	Vorbereitung zur Mutationsanalyse.....	52
4.1.6	Das Humangenomprojekt.....	52
4.2	Mutationsanalyse.....	53
5	Zusammenfassung.....	56
6	Literaturverzeichnis.....	57
7	Anhang.....	60
8	Abkürzungsverzeichnis.....	61
9	Danksagung.....	62
10	Publikationen.....	63
11	Lebenslauf.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Sequenzerkennung und Peptidspaltung der Enteropeptidase.....	3
Abbildung 1.2 Vorgänge zur Aktivierung von Verdauungsenzymen im Duodenum.....	4
Abbildung 1.3 Fehlen von Enteropeptidase-Aktivität als Ursache für Verdauungsstörungen...	9
Abbildung 1.4 Verlauf des Körpergewichts eines Patienten mit Enteropeptidasemangel in Relation zu einem Vergleichskollektiv.....	11
Abbildung 1.5 Verlauf des Körpergewichts eines Patienten mit Enteropeptidasemangel unter der Therapie mit Nutramigen (Proteinhydrolysat).....	12
Abbildung 1.6 Von der mRNA zur Exonsequenzanalyse.....	13
Abbildung 2.1 Rekombinierte Plasmid-DNA.....	14
Abbildung 2.2 Ionenaustausch-Chromatographie (Qiagen).....	16
Abbildung 2.3 Ein Primerpaar liegt innerhalb eines Exons.....	21
Abbildung 2.4 Ein Primerpaar überspannt genau ein Intron.....	21
Abbildung 2.5 Ein Primerpaar überspannt zwei Introns.....	22
Abbildung 2.6 Eine Primerbindungsstelle liegt am Exon-Intron-Übergang.....	22
Abbildung 2.7 Nach der Sequenzierreaktion werden die abgebrochenen Nukleotidketten gemäß ihre Länge elektrophoretisch aufgetrennt und die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide abgelesen.....	24
Abbildung 3.1 Die beiden identifizierten PAC-Klone repräsentieren das gesamte Proenteropeptidase-Gen.....	28
Abbildung 3.2 Genome walk®	29
Abbildung 3.3 Nested PCR.....	30
Abbildung 3.4 PCR-amplifizierte Introns größer als 3,8 kb Länge.....	32
Abbildung 3.5 PCR-amplifizierte Introns kleiner als 3,1 kb Länge.....	33
Abbildung 3.6 Exon 1 mit unmittelbar flankierender Promotor- und Intronsequenz.....	35
Abbildung 3.7 Exon 2 und 3 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	36
Abbildung 3.8 Exon 4 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	36
Abbildung 3.9 Exon 5 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	37
Abbildung 3.10 Exon 6 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	37
Abbildung 3.11 Exon 7 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	38
Abbildung 3.12 Exon 8 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	38

Abbildung 3.13	Exon 9 und 10 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	39
Abbildung 3.14	Exon 11 und 12 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	39
Abbildung 3.15	Exon 13 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	40
Abbildung 3.16	Exon 14 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	40
Abbildung 3.17	Exon 15 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	41
Abbildung 3.18	Exon 16 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	41
Abbildung 3.19	Exon 17 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	42
Abbildung 3.20	Exon 18 und 19 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	42
Abbildung 3.21	Exon 20 und 21 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	43
Abbildung 3.22	Exon 22 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	43
Abbildung 3.23	Exon 23 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	44
Abbildung 3.24	Exon 24 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	44
Abbildung 3.25	Exon 25 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz.....	45
Abbildung 3.26	Die genomische Struktur des Proenteropeptidase-Gens.....	46
Abbildung 4.1	Exonmodule des Proenteropeptidase-Gens stehen in enger Beziehung zu Proteindomänen der Enteropeptidase.....	51
Abbildung 4.2	Mutationen im Proenteropeptidase-Gen bei Patient 1.....	54
Abbildung 4.3	Mutationen im Proenteropeptidase-Gen bei Patient 2.....	55
Abbildung 7.1	cDNA-Sequenz des Proenteropeptidase-Gens.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 PCR-Programms zur Amplifikation kurzer DNA-Stücke.....	18
Tabelle 2.2 PCR-Programms zur Amplifikation mittlerer DNA-Stücke.....	18
Tabelle 2.3 PCR-Programms zur Amplifikation langer DNA-Stücke.....	19
Tabelle 2.4 Von der cDNA des Proenteropeptidase-Gens abgeleitete Exonprimer.....	20
Tabelle 2.5 Zusammensetzung des zehnfach TBE-Puffers.....	23
Tabelle 2.6 Das Sequenzierprogramm.....	26
Tabelle 2.7 Primer für Genome walk®	27
Tabelle 3.1 PCR-Produkte, die im Rahmen der Genstrukturaufklärung des Proenteropeptidase-Gens geriert wurden.....	34
Tabelle 3.2 Intronprimer zur Amplifikation der gesamten kodierenden DNA des Proenteropeptidase-Gens.....	47

1 Einleitung

1.1 Die Enteropeptidase

1.1.1 Die Pawlowsche Enterokinase

Im Labor des russischen Physiologen und Verhaltensforschers Iwan Petrowitsch Pawlow (1849-1936), der vor allem wegen seiner Experimente zur klassischen Konditionierung an Hunden bekannt wurde, arbeitete 1899 sein Mitarbeiter N. P. Schepowalnikow, ein Student der Ingenieurwissenschaften, an der Fragestellung, ob der Darmsaft des Duodenums sui generis als ein Aktivator des Pankreassaftes wirke. Er führte an Hunden entsprechende Beweisexperimente durch. Kernstück seiner Arbeit war eine einfache Versuchsreihe, wodurch die physiologische Wirkweise zweier verschiedener Darmsäfte einzeln und im Zusammenspiel miteinander charakterisiert werden konnte. Reiner Pankreassaft war in Gefäß I, reiner Darmsaft des Duodenums und des oberen Jejunums in Gefäß II, und ein Gemisch aus Darmsaft und Pankreassaft in einem dritten Gefäß enthalten. Anschließend wurden allen Säften gleiche Mengen an Fibrinstücken beigegeben. Nach kurzer Zeit war zu erkennen, dass in den Gefäßen I und II keine Verdauung der Fibrinstücke eingesetzt hatte, jedoch in Gefäß III sich ein eindeutiger Abbau des Fibrins vollzog. Schepowalnikow fasste das Resultat seines Experimentes in drei prägnanten Aussagen zusammen (Schepowalnikow, 1900):

- a. Reiner Pankreas-Saft besitzt keine Verdauungsaktivität.
- b. Reiner Duodenal-Saft besitzt ebenfalls keine Verdauungsaktivität.
- c. Findet jedoch ein Kontakt der beiden Säfte statt, so entsteht Verdauungsaktivität; der Darmsaft aktiviert den Pankreas-Saft.

Pawlow selbst leitete daraus ab, dass im Sekret des Duodenums eben nicht Enzyme zur Verdauung eines bestimmten Nahrungsbestandteils vorhanden sind, wie z.B. die Amylase, die spezifisch Stärke spaltet, sondern Duodenalsekret ein „Ferment der Fermente“ enthält, das ausschließlich Pankreasenzyme aktiviert, die ihrerseits wiederum die Fähigkeit besitzen, Nahrungsbestandteile zu verdauen. Aufgrund der exponierten Stellung im Verdauungsprozess, gleichsam als initiales Agens der Verdauungskaskade, nannte er dieses Ferment „Enterokinase“, das er aus den altgriechischen Begriffen κινέω (kineo = ich bringe in Bewegung,

rege an) und τό έντερον (to enteron = der Darm) ableitete (I. P. Pawlow, 1956). Unter Kina-
se wird allerdings heutzutage ein Enzym verstanden, das Proteine phosphoryliert. Wie sich je-
doch im Rahmen weiterer biochemischer Untersuchungen ergab, phosphoryliert Pawlows
„Enterokinase“ nicht, sondern spaltet eine Peptidbindung. Deswegen wurde das Pawlowsche
Enzym in „Enteropeptidase“ (EC-Nummer: 3.4.21.9) umbenannt.

1.2.2 Aktueller Forschungsüberblick

Entgegen der Pawlowschen Annahme, dass Enteropeptidase das erste Glied der Verdauungs-
kaskade sei, zeigten jüngste Forschungsergebnisse aus Moskau, dass die Enteropeptidase aus
einer Vorstufe (Proenteropeptidase) entsteht und durch das Enzym Duodenase aktiviert wird.
Duodenase selbst wird in den Brunnerschen Drüsen des Duodenums gebildet und gemeinsam
mit Drüsensekret ins Lumen abgegeben (Zamolodchikova et al, 2000). Erst im aktivierten Zu-
stand kann die membranständige Enteropeptidase, die aus einer leichten und einer schweren
Kette besteht (beide über Disulfidbrücken miteinander verbunden) und ausschließlich im obe-
ren Dünndarm exprimiert wird, die Aktivierung der Pankreasenzyme bewirken. Die in den
Azinuszellen des exokrinen Pankreas synthetisierten Pankreasenzyme gelangen als Zymogene
(inaktive Vorstufen) via Exozytose in die Ausführungsgänge der Drüse. Über den Ductus
pancreaticus werden sie, gefördert durch die parazelluläre H₂O-Sekretion des Duktus-
Epithels, ins Duodenum geschwemmt, wo sie mit Enteropeptidase in Kontakt treten. Ein
Trypsininhibitor hemmt zusätzlich die vorzeitige Aktivierung der Pankreasenzyme während
der Passage durch den Ausführungsgang. Prinzipiell erkennt Enteropeptidase sterisch eine
spezifische Aminosäureformation eines beliebigen Proteins und besitzt darüber hinaus die
Fähigkeit, dieses Protein zwischen zwei definierten Aminosäuren zu spalten. Unter physiolo-
gischen Bedingungen erfasst Enteropeptidase anhand räumlicher Strukturen ein aus insgesamt
fünf Aminosäuren bestehendes Sequenzmotiv (Val-(Asp)₄) des inaktiven pankreatischen Pro-
teins Trypsinogen. Grundsätzlich ist dieser Anlagerungsprozess nicht ausschließlich an das
Zielprotein Trypsinogen gebunden, denn Enteropeptidase ist in der Lage, universell in jedem
Protein die obige Signalsequenz zu erkennen. In der experimentellen Proteinforschung ist
daher aus diesem Grund die Enteropeptidase ein wertvolles Hilfsmittel. Der wichtigste und
physiologisch bedeutendste Schritt nach der spezifischen Sequenzerkennung ist die Spaltung
einer Peptidbindung im Inneren des Trypsinogen-Proteins. Sie vollzieht sich wohldefiniert N-
terminal der Aminosäure Isoleuzin, indem die benachbarte Aminosäure Lysin kovalent an das

Enteropeptidase-Enzym gebunden wird. Da diese Spaltung im Inneren und nicht an den Enden des Substratproteins stattfindet, wird Enteropeptidase auch der Gruppe der Endopeptidasen zugerechnet (Abbildung 1.1).

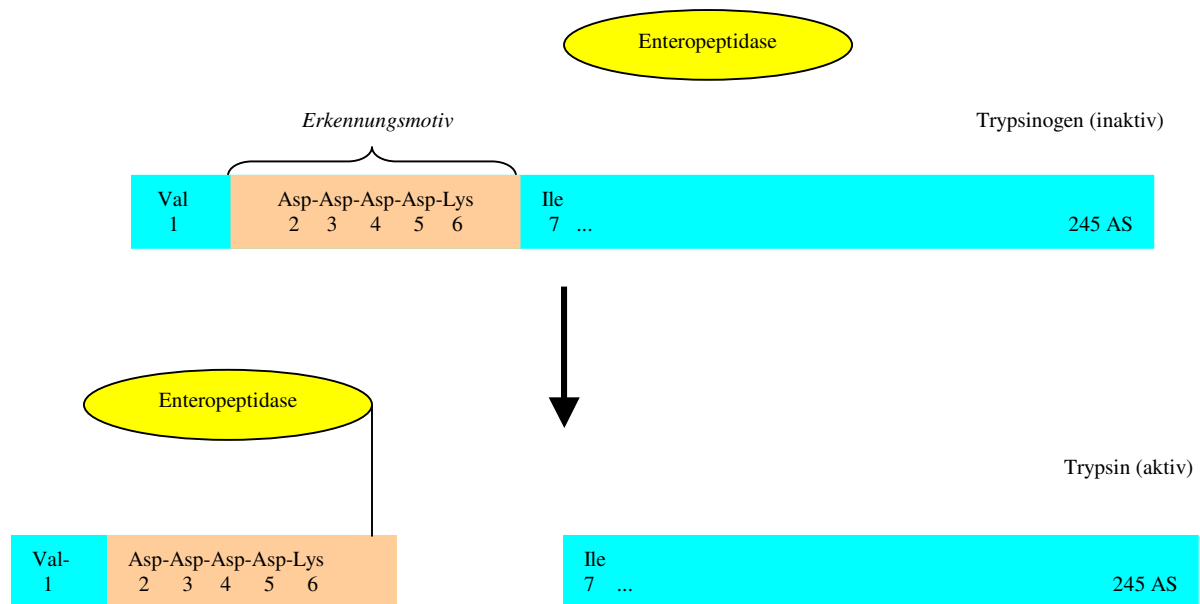


Abbildung 1.1 Sequenzerkennung und Peptidspaltung durch Enteropeptidase. Enteropeptidase erkennt sterisch eine aus fünf Aminosäuren bestehende Sequenz (vier Asparaginsäurereste und ein Lysinrest) des Trypsinogenproteins und spaltet diese proteolytisch am N-terminalen Ende ab. Durch Protein-Neufaltung entsteht nach Abspaltung der Aminosäuren das aktive Verdauungsenzym Trypsin.

Funktionell gesehen ist Enteropeptidase eine Serinprotease. Die Serinproteasedomäne wird von der kurzen Kette des Proteins formiert. Definitionsgemäß befindet sich bei Serinproteasen im räumlich gefalteten, proteolytischen Aktivitätszentrum die Aminosäure Serin. Die Familie der Serinproteasen umfasst z.B. die beiden Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin, Enzyme der Blutgerinnungskaskade, wie z.B. Thrombin und Enzyme der neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer Immunantwort (z. B. Cathepsin G, neutrophile Elastase, Proteinase 3), die einerseits direkt Bakterien, Viren und Pilze abbauen und andererseits Chemokine, Zytokine und einzelne Zellrezeptoren in ihrer Funktion aktivieren bzw. hemmen. Eine Schlüsselstellung in der Verdauungskaskade fällt dem aktiven Trypsin zu, indem es nicht nur die (inaktiven) pankreatischen Proenzyme wie Chymotrypsinogen, Pro-Elastase, Pro-Karboxypeptidase, Pro-Phospholipase und seine eigene Vorstufe Trypsinogen aktivieren kann, sondern auch (im Sinne einer positiven Rückkopplung) Proenteropeptidase zu Enteropeptidase spaltet, und zwar weit effizienter als Duodenase (Abbildung 1.2).

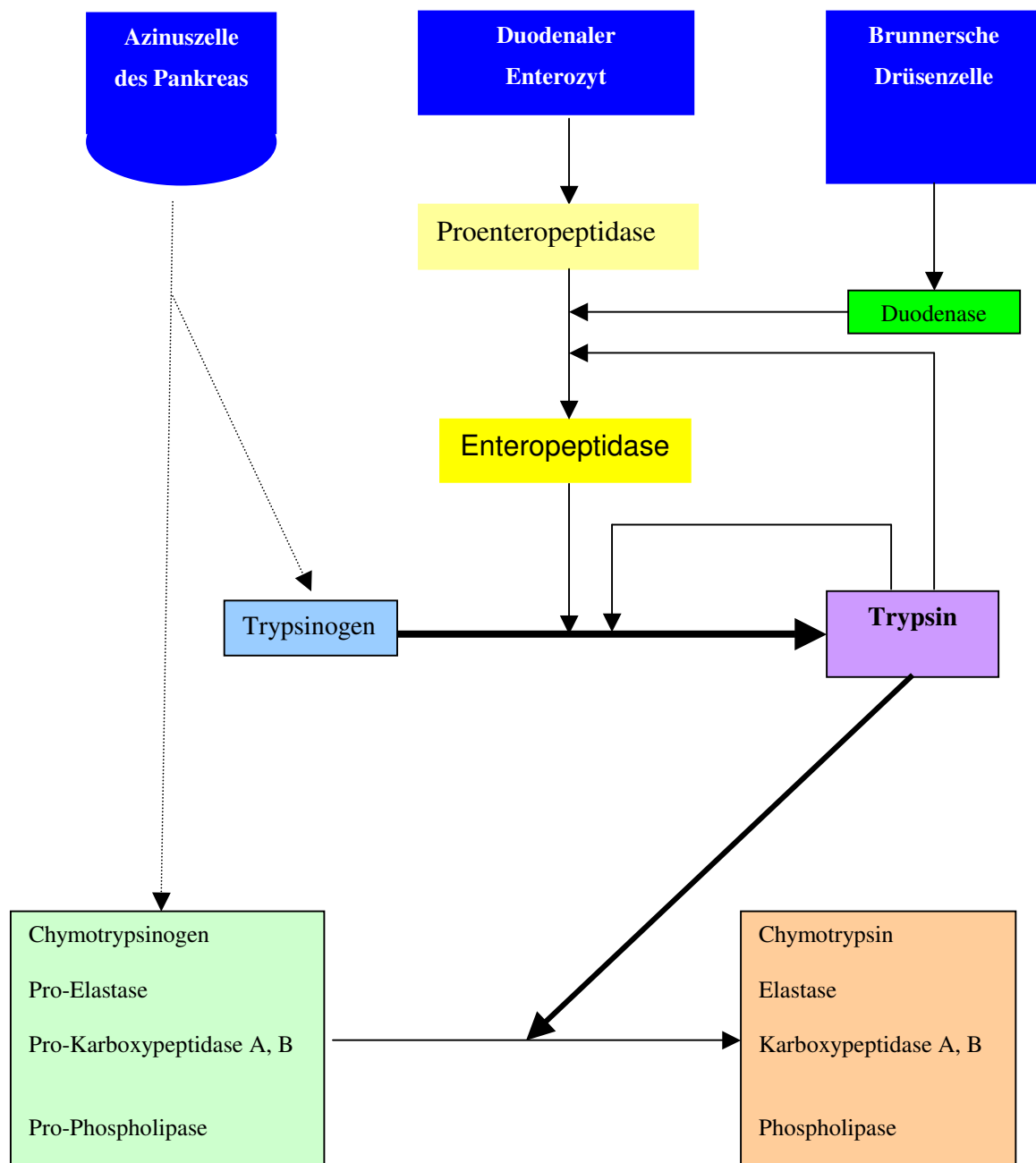


Abbildung 1.2 Vorgänge zur Aktivierung von Verdauungsenzymen im Duodenum. Das initiale Ereignis der Verdauungskaskade ist die Aktivierung der membranständigen Proenteropeptidase zu Enteropeptidase durch das Enzym Duodenase aus den Brunnerschen Drüsen. Enteropeptidase aktiviert in der Folge Trypsinogen zu Trypsin. Dem Trypsin kommt eine Schlüsselrolle in der Verdauung zu, da es sowohl seine eigene Vorstufe Trypsinogen, als auch die übrigen inaktiven Pankreasenzyme wie Chymotrypsinogen, Pro-Elastase, Pro-Karboxypeptidase und Pro-Phospholipase sowie die Proenteropeptidase aktivieren kann.

Anfang der 90er Jahre begannen die ersten molekularbiologischen Arbeiten zur Enteropeptidase. 1993 erschien die erste Veröffentlichung zum Gen für Proenteropeptidase: es wurde die Rinder-cDNA-Sequenz der leichten Kette beschrieben (LaVallie et al, 1993). Im darauffolgenden Jahr veröffentlichte die Arbeitsgruppe um J. E. Sadler die vollständige cDNA-Sequenz der Rinder-Enteropeptidase (Kitamoto et al, 1994). Sie isolierten zunächst das Protein und führten anschließend eine Aminosäuresequenzanalyse mit Hilfe der Edmann-Methode durch, indem die Polypeptidkette der Rinder-Enteropeptidase zu Teilen sequenziert wurde. Ausgehend vom N-terminalen Ende des Proteins wird dabei immer genau eine einzelne Aminosäure entfernt und chromatographisch analysiert, ohne dass die übrigen Aminosäuren der Proteinkette dabei gespalten würden. Als Teilbereiche der Aminosäuresequenz vorlagen, konnten diese in eine Basentripletsequenz auf DNA-Ebene übersetzt werden. Entscheidend für die endgültige Sequenzbestimmung war dann der darauffolgende Schritt, nämlich mit Hilfe von Oligonukleotidprimern aus der abgeleiteter DNA-Sequenz zunächst Stücke und dann die vollständige Proenteropeptidase cDNA des Rindes zu gewinnen.

Die menschliche cDNA-Sequenz der Enteropeptidase wurde schließlich im Jahr 1995 wieder in der Arbeitsgruppe um J. E. Sadler kloniert. Mit dem Wissen, dass Rinder-Enteropeptidase homolog zu menschlicher Enteropeptidase ist, konnte mit einer Rinder-cDNA-Sonde eine menschliche cDNA-Bibliothek gescreent werden. Die dabei isolierten Plasmide wurden sequenziert, wobei der kodierende Teil der menschlichen cDNA-Sequenz eine Länge von 3057 Basenpaaren hat, was einem Protein mit 1019 Aminosäuren entspricht. Zusätzlich wurde cytogenetisch die Lokalisation des Proenteropeptidase-Gens auf dem langen Arm von Chromosom 21 (21q21) bestimmt (Kitamoto et al, 1995).

1.1.3 Malabsorption und Maldigestion

Der Ausdruck Malabsorption bedeutet die mangelhafte Aufnahme von Nahrungsbestandteilen durch die Mukosazellen des Darmes. Maldigestion hingegen bezeichnet die unzureichende Spaltung (Verdauung) der zugeführten Nahrung. Nach heutiger Sicht macht es keinen Sinn mehr, im klinischen Alltag beide Begriffe zu trennen, denn jede Maldigestion führt letztlich zu einer Malabsorption (Sleisinger & Fortran, 1998). Deswegen werden die verschiedenen Ebenen der Malabsorption diskutiert, die sich in eine luminale Phase, eine Mukosa-Phase und eine Transport-Phase aufgliedern:

- a. Luminale Phase: Ankommende Nahrung, die aus Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen besteht, wird im Darmlumen durch Pankreasenzyme gespalten. Die zu freien Fettsäuren gespaltene Triglyzeride gelangen mit Hilfe von Gallensäuren über Mizellenbildung in die Enterozyten. Störungen sind hierbei:
 - i. *Mangelnde Hydrolyse*: z. B. Pankreasinsuffizienz, angeborener Enteropeptidasemangel, angeborener Trypsinogenmangel
 - ii. *Insuffiziente Solubilisation*: z. B. Störung des Galleflusses
- b. Mukosa-Phase: Die enzymatisch gespaltenen Kohlenhydrate und Aminosäuren werden über einen Na^+ -Glukose-Symport in die Enterozyten aufgenommen. Dieser Transport kann gestört sein (Glukose-Galaktose-Malabsorption). Außerdem besitzen die Mukosa-Zellen im Bürstensaum selbst verschiedene Verdauungsenzyme, die genetisch defekt sein können, wie z. B. Laktase, die Laktose in Glukose und Galaktose spaltet. Mögliche Störungen sind hierbei:
 - i. *Verminderte Mukosazellzahl*: z. B. Zöliakie (Zottenabflachung), Kurzdarmsyndrom
 - ii. *Enterozyten-Defekte*: z. B. Laktase-Mangel, Glukose-Galaktose-Malabsorption
- c. Transport-Phase: Die aufgenommenen Fettsäuren, Aminosäuren und Zucker gelangen aus den Enterozyten in die basolateral lokalisierten Lymphgefäße und von dort über den Ductus thoracicus in den venösen Schenkel des großen Kreislaufs. Absorptionsstörungen können in zwei Bereiche gegliedert werden:
 - i. *Lymphatische Obstruktion*: z. B. Morbus Whipple
 - ii. *Vaskuläre Insuffizienz*: z. B. Morbus Orthner (Angina abdominalis)

1.1.4 Pankreas und Duodenum

Die während der luminalen Phase des Verdauungsvorgangs stattfindenden Aktivierungsprozesse bedürfen im Hinblick auf den angeborenen Enteropeptidasemangel einer genaueren Einsichtnahme. Deswegen soll im folgenden der pathologische Vorgang der mangelhaften Hydrolyse bzw. Maldigestion in Bezug auf Pankreas- und Duodenalzelle näher dargestellt werden:

Zum einen tritt Maldigestion bei insuffizienter Bildung von Pankreasenzymen (Pankreasinsuffizienz) auf. Pankreasproenzyme gelangen nicht ins Duodenum. Unter diesem Krankheitskomplex sind beispielsweise die Zystische Fibrose, der Z. n. Whipple-OP, der Z. n. chronischer Pankreatitis und der Z. n. Pankreasresektion einzuordnen.

Ferner kann die Ursache der Maldigestion ein angeborener Trypsinogenmangel sein. Diesem Leiden liegt ursächlich eine genetische Fehlbildung des pankreatischen Trypsinogens zu Grunde. Sei es, dass es entweder überhaupt nicht gebildet oder aber in falscher Proteinzusammensetzung synthetisiert wird, so dass es von Enteropeptidase nicht mehr aktiviert werden kann.

Schließlich kann Maldigestion durch einen angeborenen Enteropeptidasemangel (McKusick 226 200) hervorgerufen werden. Als primäre Ursache besteht bei dieser Erkrankung eine mangelhafte Aktivität des Enteropeptidase-Enzyms, pankreatisches Trypsinogen zu Trypsin spalten zu können. Klinisch zeigt sich dasselbe Bild wie beim angeborenen Trypsinogenmangel. Hadorn und Kollegen gelang es 1969 erstmals, diesen pathophysiologischen Unterschied durch gezielte Diagnostik herauszustellen (Hadorn et al, 1969). Wahrscheinlich wurden zuvor einige Fälle von Proteinmaldigestion, die durch einen Enteropeptidasemangel verursacht wurden, fälschlicherweise als Trypsinogendefekt diagnostiziert.

1.2 Der angeborene Enteropeptidasemangel (McKusick 226 200)

1.2.1 Symptomatik

In der Regel werden Säuglinge mit angeborenem Enteropeptidasemangel schon kurz nach der Geburt durch intestinale Symptome wie Gedeihstörung, Vomitus, Diarrhoe und Fettstühle auffällig. Es findet sich eine ausgeprägte Hypoproteinämie, die ursächlich auf die Proteinmaldigestion zurückzuführen ist und maßgeblich die Entstehung peripherer Ödeme determiniert. Gleichzeitig ist als ein weiteres wichtiges Merkmal eine Anämie zu beobachten. Insgesamt wurden weltweit 15 Fälle von angeborenem Enteropeptidasemangel in den Jahren 1969-1989 beschrieben: Hadorn et al, 1969; Polonovski et al, 1970; Tarlow et al (2 Fälle), 1970;

Haworth et al, 1971; Pardou et al, 1975; Haworth et al (2 Fälle), 1975; Follet et al, 1976; Lebenthal et al (2 Fälle), 1976; Amat et al, 1978; Ghishan et al, 1983; Green et al, 1984; Marshall et al, 1989.

1.2.2 Diagnostik

Hans-Beat Hadorn und Kollegen gelang es 1969 erstmals einen angeborenen Enteropeptidase-mangel klinisch und biochemisch zu diagnostizieren. Für das Experiment sammelten sie Duodenalsaft ihrer Patientin, welcher distal der Papilla vateri entnommen wurde. Darin enthalten waren die vermeintlich defekte Enteropeptidase und alle Pankreasenzyme. In einem Versuch konnten sie zeigen, dass vor Zugabe von isolierter Rinder-Enteropeptidase keine enzymatische Funktion der drei pankreatischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Karboxypeptidase vorlag, jedoch danach deutlich deren Aktivität zu messen war (Abbildung 1.3). Daraus konnte geschlossen werden, dass die pathophysiologische Ätiologie der vorliegenden Erkrankung entweder auf der Ebene der Enteropetidase oder auf einer ihr übergeordneten Stufe liegen muss (Hadorn et al, 1969). Eine weitere Besonderheit des angeborenen Enteropeptidase-mangels ist, dass er während der Stillphase klinisch maskiert ist, jedoch beim Abstillen unter Gabe von Kuhmilch akut auftritt (Abbildung 1.5). Aus diesem Grund ist die Kuhmilchunverträglichkeit neben Zystischer Fibrose und Zöliakie auch eine Differentialdiagnose. Allerdings ist bis heute noch nicht geklärt, über welchen Mechanismus Muttermilch die Pankreasenzyme im Darm des Säuglings aktivieren kann. Grundsätzlich muss betont werden, dass die Diagnose des angeborenen Enteropeptidasemangels sehr selten gestellt wird. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass das Krankheitsbild deutlich unterdiagnostiziert ist. Denn im klinischen Alltag wird einer „Gedeihstörung“ oft empirisch mit oraler Substitution von Pankreasenzymen oder hydrolysierten Säuglingsnahrung erfolgreich begegnet, ohne dass eine definierte pathophysiologische Ursache für das Leiden gefunden wäre.

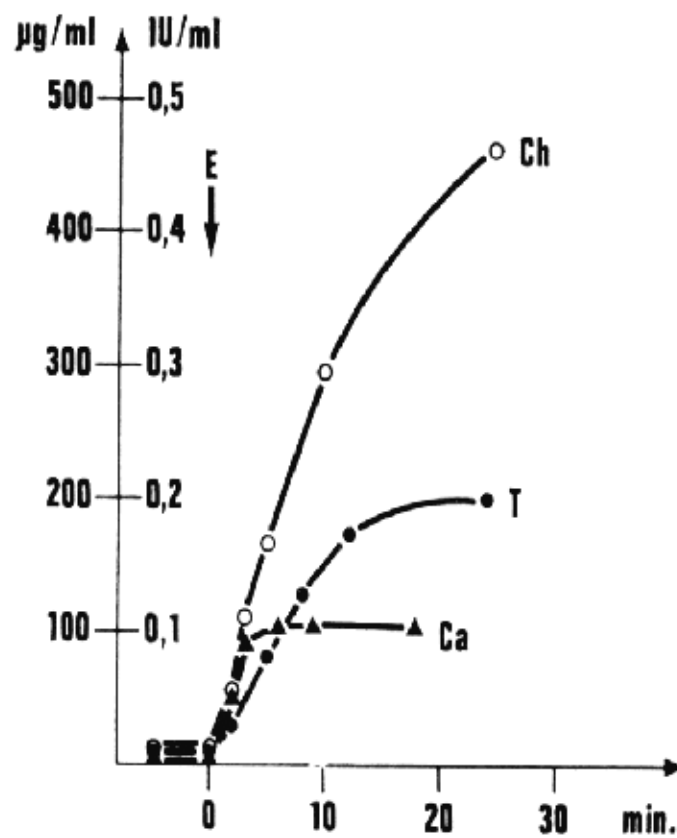


Abbildung 1.3 Fehlen von Enteropeptidase-Aktivität als die Ursache für Verdauungsstörungen. In diesem Beweisexperiment wurde Darmsaft distal der Papilla vateri entnommen und isolierte Rinder-Enteropeptidase beigegeben. Vor der Zugabe konnte keine Aktivität der drei pankreatischen Enzyme bestimmt werden, danach war sie jedoch deutlich zu messen. Damit war bewiesen, dass der vorliegenden Gedeihstörung ursächlich ein angeborener Enteropeptidasemangel zugrunde liegt. E = Enteropeptidase, Ch = Chymotrypsin, T = Trypsin, Ca = Karboxypeptidase (Hadorn et al, 1969).

1.2.3 Therapie

Unbehandelt führt die Erkrankung zu einer ausgeprägten Gedeihstörung. Die kausale Therapie wäre die Substitution durch orale Gabe eines Enteropeptidase-Präparates. Da genügende Mengen von aktiver Enteropeptidase schwer zugänglich sind, erfolgt die Behandlung entweder durch orale Substitution von aktiven Pankreasenzymen (Abbildung 1.4) oder durch Fütterung mit Eiweißhydrolysaten, welche vom Darm direkt aufgenommen werden, selbst wenn das proteolytische Enzymsystem inaktiv bleibt, z.B. Nutramigen (Abbildung 1.5). Auch die Kombination beider Methoden ist möglich.

Wie die Graphiken in Abbildung 1.4 und 1.5 demonstrieren, stellt sich nach der Therapie ein eindrucksvolles Aufholen der Gewichtsentwicklung ein. Die Beobachtungen an diesen Patienten zeigen, dass Störungen der Proteinverdauung sich besonders dramatisch in den ersten Lebenswochen manifestieren, da die Anforderungen an ein funktionierendes proteolytisches System zu dieser Zeit besonders hoch sind. Die Wachstumsgeschwindigkeit unmittelbar nach der Geburt beträgt 17 cm pro Jahr. Werden im späteren Verlauf die Wachstumsgeschwindigkeit und der Proteinbedarf geringer, kann die Substitutionstherapie sogar beendet werden.

Zusammenfassend kann man bemerken, dass die klinische Manifestation des Enteropeptidase-mangels eine hohe Altersabhängigkeit aufweist (Hadorn et al, 1975). Auf welche Weise sich nach den ersten Lebensjahren doch noch eine suffiziente Verdauung einstellt, ist bisher eine offene Frage. Allgemein wird angenommen, dass sich das Trypsinogen teilweise selbst aktiviert und dessen Aktivierung bei niedriger werdendem relativem Bedarf an Proteinverdauung ausreicht. In einer Phase besonderen Wachstums und Mehrbedarfs an Proteinen, wie in der Pubertät, kann es sein, dass bei den betroffenen Patienten wieder Proteinmangelsymptome auftreten, so dass eine neuerliche Therapie eingeleitet werden muss (Haworth et al, 1975).

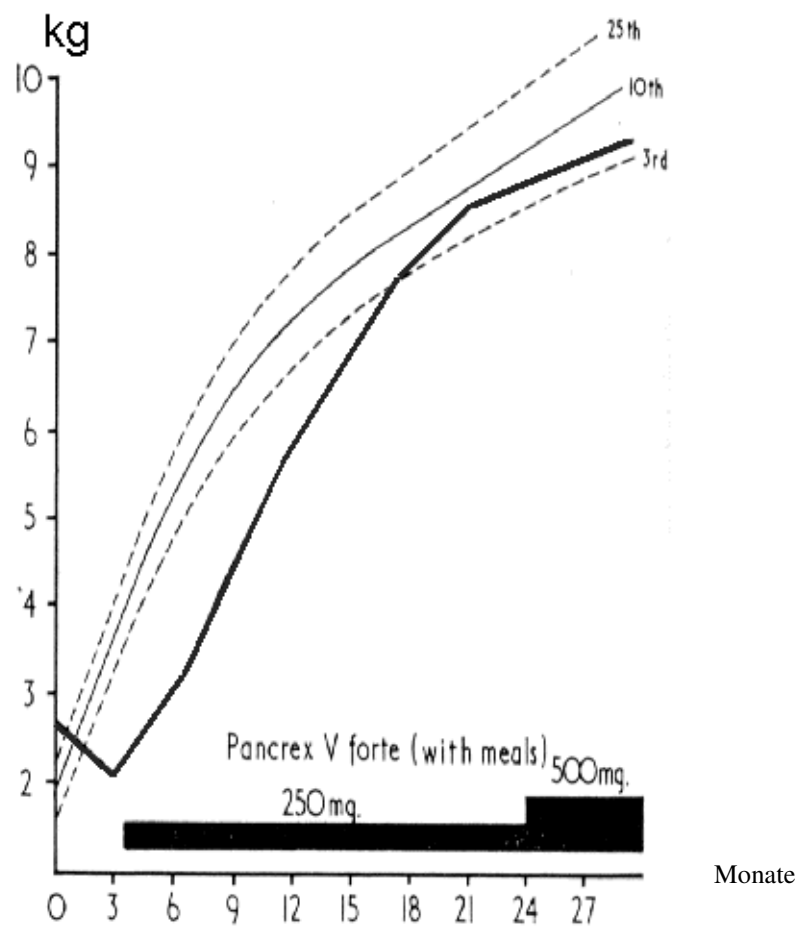


Abbildung 1.4 Verlauf des Körpergewichts eines Patienten mit Enteropeptidasemangel in Relation zu einem Vergleichskollektiv. Unter der Gabe von oralen Pankreasenzymen (Pankrex V forte) konnte der Säugling wieder Anschluss an eine altersgemäße Entwicklung finden. Die Werte für Serumproteine lagen ab dem 17. Monat wieder im Normalbereich. Der Hämoglobinwert stabilisierte sich bei 11,2 mg/100 ml (Tarlow et al, 1970).

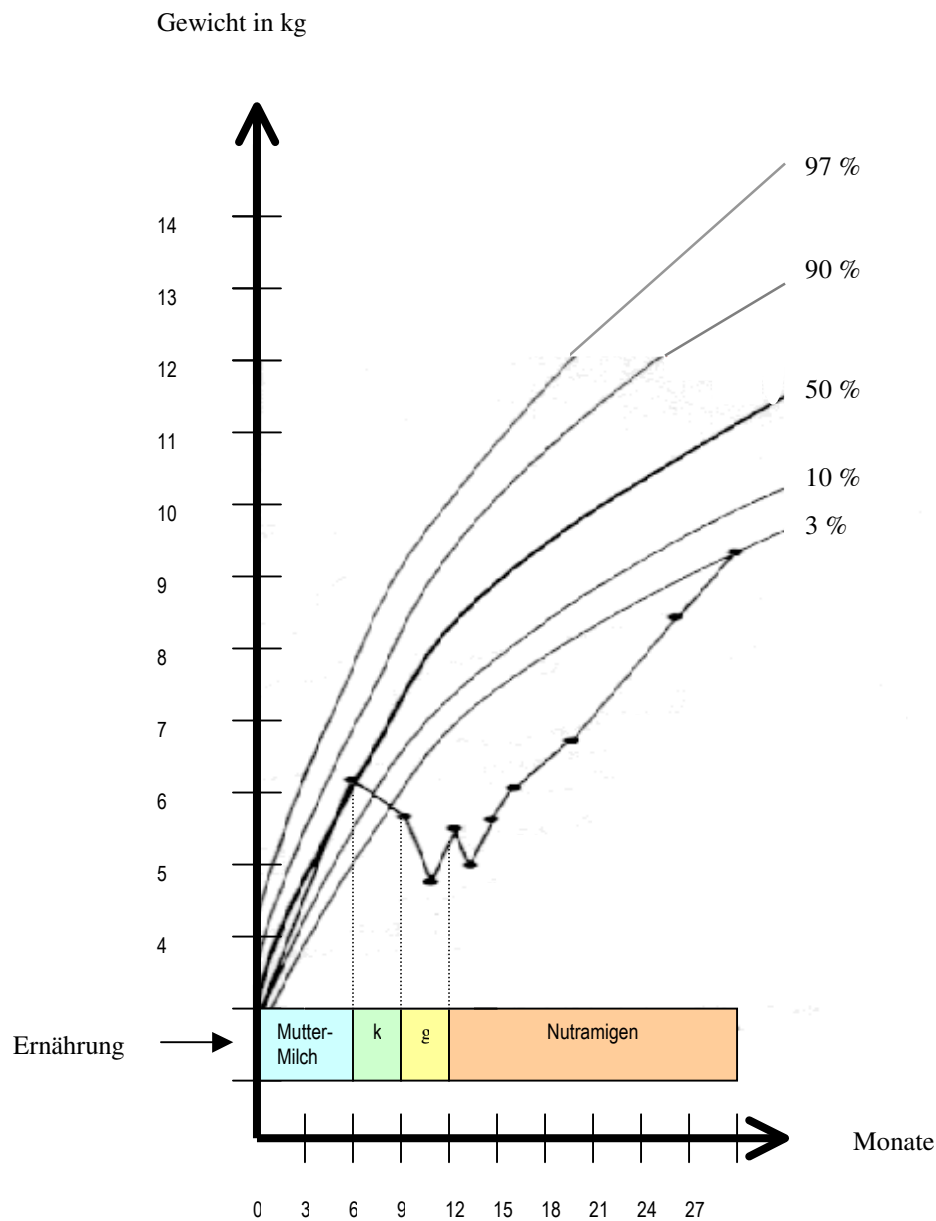


Abbildung 1.5 Verlauf des Körpergewichts eines Patienten mit Enteropeptidasemangel unter der Therapie mit Nutramigen (Proteinhydrolysat). Nach der Stillzeit von 6 Monaten wurde der Säugling mit k= Kuhmilch für 3 Monate ernährt. Anschließend fand eine g = glutenfreie Diät statt, weil der Verdacht auf Zöliakie vorlag. Bei Ausschluss der Zöliakie wurde ein angeborener Enteropeptidasemangel festgestellt, der mit Nutramigen (Proteinhydrolysat) therapiert wurde. Es kommt zum Aufholwachstum (Haworth et al. 1971).

1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Durch die vorliegende Arbeit wird die Basis geschaffen, bei klinischem Verdacht auf angeborenen Enteropeptidase-mangel Mutationsanalysen aus Blut durchführen zu können. Die *conditio sine qua non* hierfür ist die Kenntnis der Struktur (Abfolge der Exons und Introns) des Proenteropeptidase-Gens. Bei vollständigem Vorliegen der Genstruktur des Proenteropeptidase-Gens können Exon-Amplikons zur Mutationsanalyse gewonnen werden, die mittels Intronprimern synthetisiert werden (Abbildung 1.6). Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die menschliche cDNA-Sequenz der Enteropeptidase, die seit 1995 bekannt ist (Kitamoto et al, 1995). Damit besteht die prinzipielle Möglichkeit, die Genstruktur des Proenteropeptidase-Gens mittels Exonprimern gleichsam retrograd zu bestimmen.

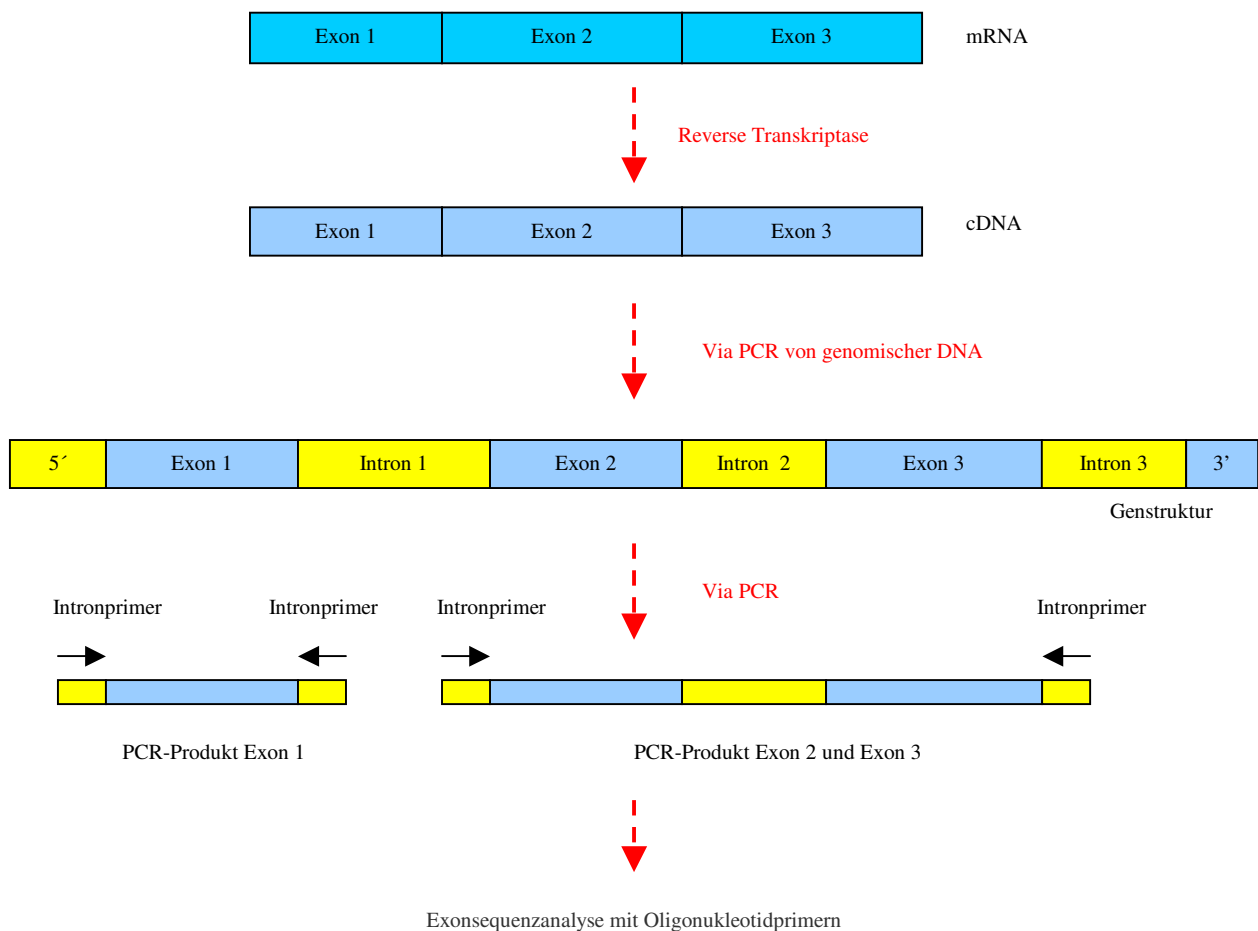


Abbildung 1.6 Von der mRNA zur Exonsequenzanalyse. Mit Kenntnis der cDNA-Sequenz, die mittels Reverse Transkriptase aus mRNA erzeugt werden kann, lässt sich über Exonprimer durch PCR-Amplifikation von Stücken genomischer DNA die Genstruktur des Proenteropeptidase-Gens bestimmen. Liegt die vollständige Genstruktur vor, so kann mit Hilfe von Intronprimern jedes einzelne Exon vollständig zur Mutationsanalyse amplifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Rekombinierte DNA

2.1.1 Genbank-Screening

Im Rahmen des Humangenomprojekts sind Genbanken bzw. Genbibliotheken zur Klonierung menschlicher DNA entstanden. Darunter ist eine Sammlung verschiedener Bakterienstämme zu verstehen, die Träger des menschlichen Genoms sind. Menschliche DNA kann durch Plasmide in Bakterien gebracht werden. Ein Plasmid ist ein autonomer, selbstreplizierender und extrachromsomal DNA-Ring. Mittels Restriktionsendonukleasen kann sowohl die Ringstruktur der bakteriellen Plasmid-DNA als auch menschliche DNA gespalten werden. Auf diese Weise ist es möglich, dass gespaltene menschliche DNA sich mit einem geöffneten ringförmigen Plasmid zu einer neuen ringförmigen Hybrid-DNA verbindet (Rekombinierte DNA). Da ein Plasmid fremde DNA in Bakterien einbringen kann, wird es auch als Vektor bezeichnet. In unserem Fall wurden pCYPAC1-Vektoren (in denen besonders große Abschnitte menschlicher DNA verpackt werden können) mit gespaltener menschlicher DNA verbunden und in *Escherichia coli*-Bakterien eingesetzt. Diese genetisch veränderten *Escherichia coli*-Stämme werden im Folgenden als PAC-Klone (*P1-derived artificial chromosome*) bezeichnet (Abbildung 2.1).

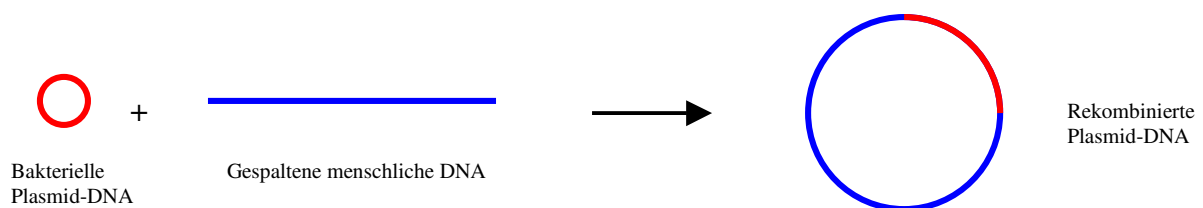


Abbildung 2.1 Rekombinierte Plasmid-DNA. Menschliche DNA wird in eine ringförmige Plasmid-DNA eingesetzt. Dadurch kann ein menschliches DNA-Stück extrachromosomal in Bakterien eingefügt und von diesen vermehrt werden.

Für die Genstrukturaufklärung des Proenteropeptidase-Gens wurde aus einer menschlichen Duodenalbiopsie eine Enteropeptidase-cDNA-Sonde hergestellt. Mit dieser Sonde konnte eine menschliche DNA-Bibliothek mittels Hybridisierung nach spezifischen PAC-Klonen ge-

screened werden. Insgesamt wurden vier positive PAC-Klone identifiziert. Zwei davon enthielten überlappend das gesamte Proenteropeptidase-Gen. Die DNA der beiden PAC-Klone hybridisierte in einer FISH-Analyse menschlicher Zellen eindeutig auf Chromosom 21q21.

2.1.2 Klonale Vermehrung der PAC-Klone

Die beiden positiven PAC-Klone Nr. 3 und Nr. 4 dienten für die Strukturaufklärung des Proenteropeptidase-Gens als Substrat für alle Untersuchungen. Um auf die DNA des Proenteropeptidase-Gens in großen Mengen zurückgreifen zu können, werden jeweils 200 ml LB-Medium mit einem der beiden PAC-Klone beimpft, sowie das Antibiotikum Kanamycin in Verdünnung 1:1000 zugegeben, um einen Selektionsdruck gegen diejenigen Bakterien zu erzeugen, die unerwartet die mit Kanamycinresistenz verbundenen PAC-Vektoren verlieren sollten. Über Nacht wird eine Kultur auf einem Rüttler bei 37°C angesetzt. Am Morgen empfiehlt es sich, zuerst einen Glyzerinstock aus 1000 µl gesättigter Bakterienkultur und 250 µl Glyzerin bei -80°C tiefzufrieren. Anschließend wird der große Rest der Kultur 15 min bei $\omega=10\,000$ U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und aus sedimentierten Bakterien wird PAC-DNA durch Ionenaustausch-Chromatographie (Qiagen Midi-Prep) gewonnen.

2.1.3 Qiagen Midi-Prep

Um aus dem abzentrifugierten Sediment reine DNA zu gewinnen, bedarf es einleitend dreier Schritte:

- a. *RNAase*: Das Sediment wird in 10 ml P 1 Qiagen-Puffer aufgenommen, bis keine Klumpen mehr sichtbar sind. Alle vorhandene RNA wird enzymatisch abgebaut.
- b. *Lyse*: Mittels 10 ml Qiagen-Puffer P 2, der NaOH enthält, löst sich die Struktur der Bakterienwände auf. Dabei geht die DNA in Lösung. Insgesamt wird der Lysevorgang auf 5 min angesetzt.
- c. *Präzipitation von Proteinen*: Um eine grobe Trennung von DNA und anderen Bakterienbestandteilen zu erreichen, werden bei einer Inkubationszeit von 10 min 10 ml Qiagen-Puffer P3 zur Neutralisation zugegeben. Typischerweise fallen bakterielle Proteine aus und setzen sich, als Sediment sichtbar, am Boden ab.

Die im Überstand lösliche DNA wird durch Filterung von den bakteriellen Zellwandbestandteilen geschieden. Um reine DNA gewinnen zu können, muss sie mit dem 0,7-fachen des vorhandenen Lösungsvolumens an Isopropanol präzipitiert werden. Anschließend wird das Gemisch bei $\omega=15\,000$ U/min 15 min zentrifugiert. Ist an der Wand des Röhrchens eine Ablagerung zu erkennen, kann der Überstand dekantiert werden. Entscheidend für die Präparation von DNA ist die möglichst vollständige Entfernung bakterieller Proteine aus der suspendierten Lösung. Es kann nun mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie die elektrisch negativ geladene DNA von elektrisch positiv geladenen Ionen in Form einer Ionenbindung abgefangen werden, während die übrigen Mikropartikel der Bakterien, die mehrheitlich neutral bzw. positiv geladen sind, nicht mit den positiven Ionen in anziehende Wechselwirkung treten und den Ionenfilter daher ungehindert passieren (Abbildung 2.2).

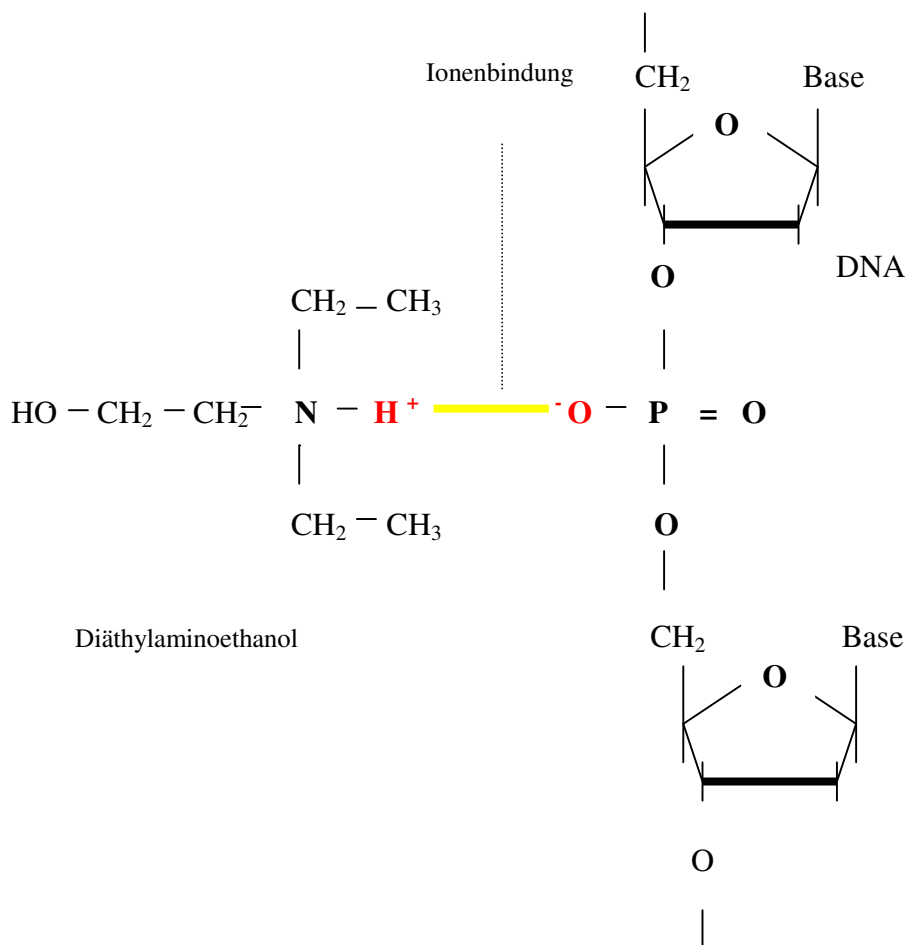


Abbildung 2.2 Ionenaustausch-Chromatographie (Qiagen). Das positiv geladene Diäthylaminoäthanol-Ion bindet über eine Ionenbindung an den negativ geladenen Teil der Phosphodiesterbindung der DNA.

Zur Vorbereitung dieses Prozesses wird der Ionenaustauscher mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Daran anschließend wird das DNA-Sediment in 1 ml TE-Puffer resuspendiert, um in wässriger Phase mit 7 ml QBT-Puffer gemischt zu werden. Maßgeblich unter Mitwirkung der Ionen-Austausch-Säule wird die Scheidung von DNA und verbliebenen Restproteinen erreicht. Daran schließen sich vier Waschgänge mit je 8 µl QC-Waschpuffer an. Zum Eluieren der DNA aus der Ionenaustauschmatrix werden 8 ml des auf 70 °C erwärmten Qiagen QF-Puffers (Salzlösung) verwendet. Im Rahmen dieses Vorgangs verdrängt der Puffer die über positiv geladene Ionen bindende DNA und löst sie auf diese Art aus dem Ionenaustauscher heraus. Dies hat zur Folge, dass DNA wieder in flüssige Lösung übergeht und mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert werden kann, indem 30 min bei $\omega=15\,000$ U/min zentrifugiert wird. Das meist mit bloßem Auge nicht erkennbare Mikrosediment wird in 0,5 ml Äthanol (70 %) aufgenommen, um dann 5 min bei $\omega=100$ U/min nochmals zentrifugiert zu werden. Der Überstand wird abgekippt, das Mikrosediment kurz angetrocknet und dann in Aqua bidest aufgelöst.

2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.1 PCR-Zyklusprogramme

Da die PCR Zyklen mit großen Temperaturunterschieden erfordert, bedarf es dazu einer äußerst hitzestabilen DNA-Polymerase (Watson et al, 1993). In Bakterien der Gattung *Thermus aquaticus* konnte eine Polymerase gefunden werden, die diese Bedingungen erfüllt. Diese Bakterien leben physiologischerweise in 75 °C warmem Quellwasser. Bei 72 °C liegen beste Voraussetzungen für die Aktivität der Polymerase vor, und auch bei Temperaturen von 94 °C, die zur Trennung des DNA-Doppelstrangs benötigt werden, nimmt sie keinen Schaden. Deswegen wird diese bakterielle Polymerase für den Gebrauch zur PCR hergestellt und unter dem Akronym Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) industriell vermarktet. Für das vorliegende Projekt wurden zwei Arten von Polymerasen benötigt: zum einen die klassische Taq-Polymerase und zum anderen die „Expand long template“ aus Pwo- und Taq-Polymerase. Zur Amplifikation kleiner DNA-Abschnitte von bis zu ca. 2000 Basenpaaren wird die klassische Taq-Polymerase verwendet. Ihre Arbeitstemperatur liegt wie oben beschrieben bei 72 °C. Nachteil ist, dass sie keine Fähigkeit des Korrekturlesens besitzt. Die Expand-Long-Template-Po-

lymerase ist ein Produkt der Firma Böhrringer/Mannheim. Benötigt wird sie v.a. zur Amplifikation großer DNA-Abschnitte von bis zu 10.000 Basenpaaren. Gegenüber der klassischen Taq-Polymerase besitzt sie zusätzlich den Vorteil des Korrekturlesens eigener synthetisierter Sequenzen. Ihre Arbeitstemperatur liegt bei 68 °C. Durch Zugabe von Puffer Nr. 3 von Boehringer/Mannheim werden die Bedingungen zur Amplifikation optimiert. Im Folgenden werden drei PCR-Zyklusprogramme aufgeführt, die während des Projektes die Synthese aller Introns des Proenteropeptidase-Gens gewährleisten (Tabelle 2.1, 2.2 und 2.3). Alle PCRs wurden im „Mastercycler gradient“ der Firma Eppendorf durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Doppelstrangtrennung	94 °C	1:00 min	1 mal
Primerbindung	55 °C	0:30 min	
Extension	72 °C	1:00 min	
Doppelstrangtrennung	94 °C	0:30 min	34 mal
Primerbindung	55 °C	0:30 min	
Extension	72 °C	1:00 min	
Auffüllreaktion (Extension)	72 °C	5:00 min	1 mal

Tabelle 2.1 PCR-Programm zur Amplifikation kurzer DNA-Stücke. Mit Hilfe dieses Programms konnten kleine PCR-Fragmente amplifiziert werden. Die Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase betrug 72 °C. Als Enzym wurde die Taq-Polymerase der Firma Boehringer/Mannheim verwendet sowie der dazu passende Puffer Nr.1 von Boehringer/Mannheim.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Doppelstrangtrennung	94 °C	4:00 min	1 mal
Primerbindung	Gradient: 50-60 °C	0:45 min	
Extension	68 °C	4:00 min	
Doppelstrangtrennung	94 °C	0:45 min	34 mal
Primerbindung	Gradient: 50-60 °C	0:45 min	
Extension	68 °C	4:00 min	
Auffüllreaktion (Extension)	68 °C	7:00 min	1 mal
Kühlung	4 °C	Ad libitum	----

Tabelle 2.2 PCR-Programm zur Amplifikation mittlerer DNA-Stücke. Für die Primerbindungstemperatur wurde oft ein Gradienten-Ansatz gewählt: bei niedrigen Temperaturen sind meist mehrere PCR-Produkte zu erkennen. Je höher die Temperatur gewählt ist, desto spezifischer wird das PCR-Produkt. So besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass das Amplikon spezifisch sein muss. Als Enzym wurde Expand Long Template zusammen mit dem dazugehörigen Puffer Nr. 3 von Boehringer/Mannheim eingesetzt.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Doppelstrangtrennung	94 °C	4:00 min	1 mal
Doppelstrangtrennung Primerbindung Extension	94 °C Gradient: 50-60°C 68 °C	0:55 min 0:55 min 4:00 min	10 mal
Doppelstrangtrennung Primerbindung Extension	94 °C Gradient: 50-60°C 68 °C	0:55 min 0:55 min 4 min +20 sek pro Zyklus	14 mal
Auffüllreaktion (Extension)	68 °C	10:00 min	1 mal
Kühlung	4 °C	Ad libitum	-----

Tabelle 2.3 PCR-Programm zur Amplifikation langer DNA-Stücke. Dieses Programm wurde für besonders lange Amplikons entwickelt. Die ersten zehn Zyklen haben eine Extensionszeit von 4:00 min. Ab dem elften Zyklus wird die Extensionszeit um 0:20 min pro Zyklus verlängert, so dass am Ende des letzten Zyklus eine Extensionszeit von knapp 9:00 min erreicht wird. Auf diese Art können sehr lange Genabschnitte problemlos amplifiziert werden. Zudem konnte ein Gradient für die Primerbindungstemperatur eingesetzt werden, um die Spezifität der Amplikons steigern zu können. Als Enzym wurde Expand Long Template zusammen mit dem dazugehörigen Puffer Nr. 3 von Boehringer/Mannheim eingesetzt.

2.2.2 PCR-Ansatz

Für den PCR-Ansatz werden eine DNA-Vorlage, Polymerase, Nukleotide, Primer und ein Puffer für das entsprechende Milieu benötigt. Der Ansatz für eine PCR-Probe beträgt 50 µl.

40,5 µl H ₂ O 5,0 µl Puffer 1,0 µl Vorwärts gerichteter Primer (10 µM Stammlösung) 1,0 µl Rückwärts gerichteter Primer (10 µM Stammlösung) 1,0 µl dNTP (Nukleotide, 20 µM) 1,0 µl DNA (10 ng/50 µl) 0,5 µl Polymerase
50,0 µl PCR-Ansatz

2.2.3 Ableitung von Oligonukleotidprimern

Um die für eine Mutationsanalyse essentiell nötigen exonflankierenden Sequenzen der Introns bestimmen zu können, muss die vorliegende cDNA mit Oligonukleotid-Primerpaaren überlappend abgedeckt werden. Die folgende Tabelle enthält alle verwendeten Oligonukleotid-Primerpaare (Tabelle 2.4), deren Produkte die cDNA überlappend abdecken und gemäß der bekannten Regeln abgeleitet wurden (Watson et al, 1993):

Primer	5` Sequenz 3`	Richtung	5`-Bindung (nt)	[T]= °C
Entero 4	ACCAGACAGTTCCTTAAATTAGCAAGCC	+	+0	61,9
Entero 9	TGATTGTCAGGCAGGATACTGC	-	+149	58,4
Entero 10	TCTGGCTTCATGACTCTGTCC	-	+197	59,8
Entero 44	CTTGGACAGAGTCATGAAGCC	+	+194	59,8
Entero 59	TTCAAATCAATATGGAAAGTGACC	-	+496	55,9
Entero 60	TGGCAGCATTATAGTCGTATTTC	+	+388	57,1
Entero 69	ATGACTGGTGGTTGTAGCTTG	-	+538	58,4
Entero 72	AAGCTAACAACCACCAGTCATC	+	+538	58,4
Entero 55	GGCACACATTTTATTGTCTTCG	-	+685	56,5
Entero 13	CTTGTACTGATGCTCTAACGTG	+	+609	58,4
Entero 16	ATGATCCACTGGCAGACAAC	-	+791	57,3
Entero 63	TGATGGAAGATTTTGTAACTGG	+	+715	55,9
Entero 32	ACCTTCATAAATATCTAATATTATCTG	-	+870	53,8
Entero 31	ACTTTCATTAAACTGAGCTTCG	+	+826	57,1
Entero 50	TAAGCTCACTGCTGTTAAATGC	-	+1037	56,5
Entero 40	CTGATGAAAGTGATTATGTTGGC	+	+997	57,1
Entero 25	GCTTCCCTGAATCCTTTCCCATTTC	-	+1133	62,7
Entero 71	TTCTGGGTCCAGGATCTAAATG	+	+1103	58,4
Entero 7	CAGAAACTAAGGCAAGCTGGCTCC	-	+1294	64,4
Entero 27	GGAGCCAGCTTGCCTTAGTTTCTG	+	+1294	64,4
Entero 54	TTTCATTTAGGGTTACTTGTC	-	+1433	54,7
Entero 43	GGAGAAGACAGTTTTCCAAAAGG	+	+1381	58,9
Entero 18	CATCCAACGCAATATCACTCAG	-	+1498	58,4
Entero 17	CTGAGTGATATTGCGTTGGATG	+	+1498	58,4
Entero 56	AGAAAGCCAGATTAGGGTAGC	-	+1674	57,9
Entero 37	CCAAATACAACATTCACTTCTACG	+	+1637	57,6
Entero 20	CTAAGAGCAAGGAATCAGCTTC	-	+1799	58,4
Entero 19	GAAGCTGATTCCCTTGCTCTTAG	+	+1799	58,4
Entero 67	CATCGTTAGTGATGAGAAGCAC	-	+1879	58,4
Entero 66	TAAAGGATGTGTTCTCTACCACC	+	+1845	58,9
Entero 73	ATTCACCAGTGGAAACACACTC	-	+2000	57,9
Entero 36	CCATGCAAGGCAGACCATTTTC	+	+1964	60,3
Entero 26	CCAGCAGTTGACAAACATC	-	+2180	54,5
Entero 70	ATACAGCTTGTGCTGAGAACTG	+	+2139	58,4
Entero 64	TGGGTGTTAGTATTAAGTGGC	-	+2279	58,4
Entero 29	GGACCATTTGTCAAATTAACCAC	+	+2246	57,6
Entero 49	TTACTACTGTAACCGAATCAAGG	-	+2322	56,5
Entero 22	GTCACGTGCTGACGAGAGATGCGC	-	+2472	66,0
Entero 21	GCGCATCTCTCGTCAGCAGTGAC	+	+2472	66,0
Entero 61	CTTGGATGGCTCTAAGTTTCTC	-	+2527	58,4
Entero 62	GAGAACTTAGAGCCATCCAAG	+	+2527	57,6
Entero 24	GATGCATCATGGCAATGTCTG	-	+2665	58,4
Entero 23	CGACATTGCCATGATGCATC	+	+2665	57,3
Entero 65	CCAGCAATAGAACAATTTCTTCC	-	+2759	57,1
Entero 52	CAACCTATTTGTTTACCGGAAG	+	+2717	56,5
Entero 33	TGCAATATGTTTGCAGTAGTACC	-	+2804	57,1
Entero 34	AGGTACTACTGCAAACATATTGC	+	+2803	57,1
Entero 28	CACATTAATGGTCCTCCTGAATC	+	+2948	58,9
Entero 8	ATTCAGGAGGACCAATTAATGTG	+	+2949	56,5
Entero 3	CCATGCTTTCTAGAGTAGAATGG	-	+3139	58,9

Tabelle 2.4 Von der cDNA des Pro-Enteropeptidasegens abgeleitete Exonprimer. In der ersten Spalte ist die Bezeichnung der verwendeten Primer zu finden, gefolgt von seiner DNA-Sequenz. Plus (+) bedeutet, dass der Primer vorwärts gerichtet ist, minus (-), dass er rückwärts gerichtet ist. Die 5`-Bindung gibt den Anfang bei vorwärts gerichteten bzw. das Ende bei rückwärts gerichteten Primern in Bezug auf die cDNA-Sequenz wieder. In der letzten Spalte ist die errechnete Schmelztemperatur der Primer aufgeführt.

2.2.4 Prinzipiell zu erwartende PCR-Produkte

Mit den abgeleiteten cDNA-Primerpaaren können prinzipiell vier Arten von PCR-Produkten bei der Amplifikation von genomischer DNA erzielt werden: Zum einen ist es möglich, dass zwischen dem Primerpaar kein Intron liegt und die Länge des PCR-Produkts identisch ist mit dem Abstand der beiden gegensätzlich orientierten Primer auf cDNA -Ebene (Abbildung 2.3):

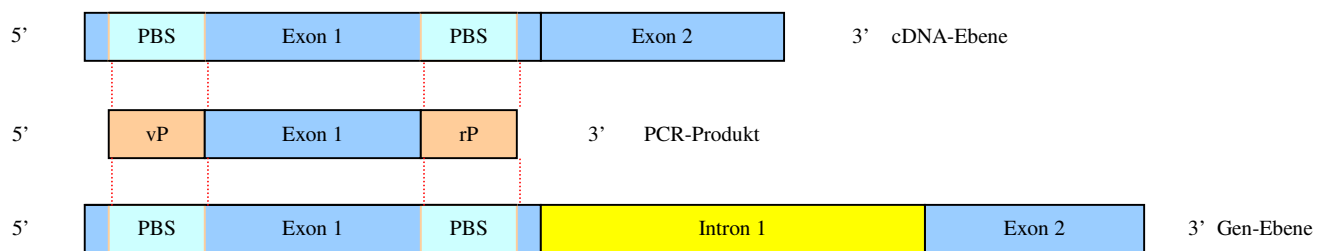


Abbildung 2.3 Ein Primerpaar liegt innerhalb eines Exons. Unter **vP** ist ein vorwärts gerichteter Primer zu verstehen, unter **rP** ein rückwärtsgerichteter. **PBS** steht für Primer-Bindungs-Stelle.

Ferner kann es sein, dass sich genau ein Intron zwischen den beiden Primern befindet, und das gewonnene PCR-Produkt die zugehörige Intronlänge inklusive flankierende Exonsequenz repräsentiert (Abbildung 2.4):

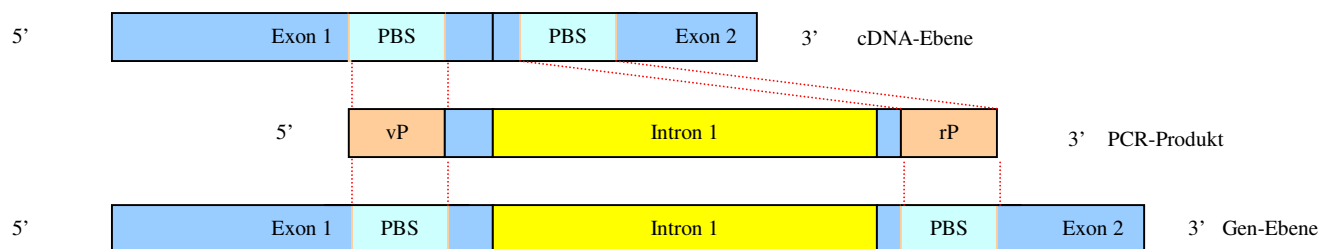


Abbildung 2.4 Ein Primerpaar überspannt genau ein Intron. Das amplifizierte DNA-Stück ist deutlich größer, als auf cDNA-Ebene zu erwarten. **vP**: vorwärts gerichteter Primer; **rP**: rückwärtsgerichteter Primer; **PBS**: Primer-Bindungs-Stelle.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass zwei oder mehr Introns den Bereich zwischen den beiden ausgewählten Primern auf Gensequenzebene füllen (Abbildung 2.5):

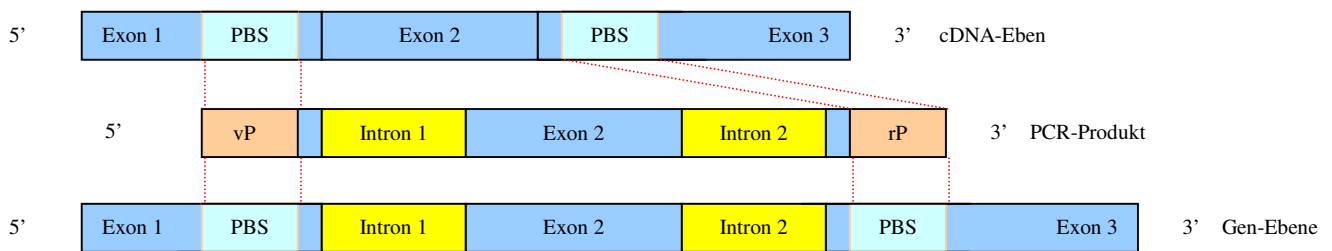


Abbildung 2.5 Ein Primerpaar überspannt zwei Introns. **vP**: vorwärts gerichteter Primer; **rP**: rückwärtsgerichteter Primer; **PBS**: Primer-Bindungs-Stelle.

Schließlich kann noch der Fall eintreten, dass gar kein PCR-Produkt gebildet wird, weil ein Primer zufällig auf einem Exon-Intron-Übergang gesetzt wurde, was sich freilich im Voraus bei alleiniger Kenntnis der cDNA-Sequenz nicht ausschließen lässt (Abbildung 2.6):

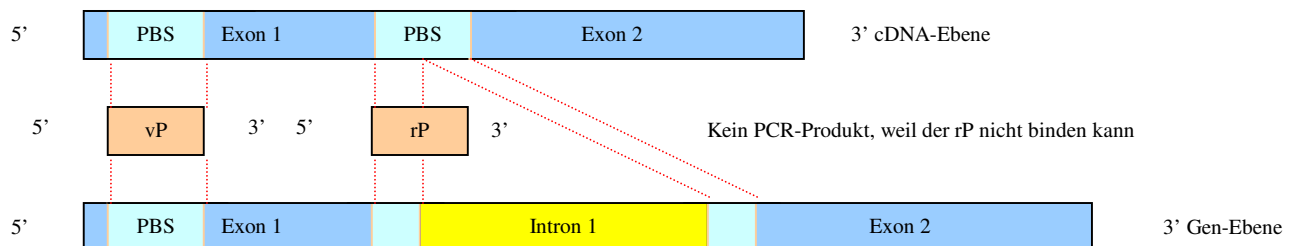


Abbildung 2.6 Eine Primerbindungsstelle liegt am Exon-Intron-Übergang. Kann ein Primer nicht vollständig binden, weil er über einen Exon-Intron-Übergang gesetzt wurde, so hat die Polymerase aufgrund der mangelhaften Bindehaftigkeit keine Möglichkeit, einen Nukleotidanbau (Extension) zu vollziehen. **vP**: vorwärts gerichteter Primer; **rP**: rückwärtsgerichteter Primer; **PBS**: Primer-Bindungs-Stelle.

2.2.5 DNA-Elektrophorese

Um die nach der PCR-Reaktion erhaltenen Produkte in ihrer Länge bestimmen zu können, werden sie mittels Elektrophorese auf einem Agarose-Gel dargestellt. Grundlage des Agarose-Gels ist der TBE-Puffer (Tabelle 2.5). Er bezieht seinen Namen aus *Tris*base, *Bromid* und *EDTA*.

Material	Menge
Tris-Base	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	14,8 g
H ₂ O-Bidest	Ad 2000 ml

Tabelle 2.5 Zusammensetzung des zehnfach TBE-Puffers. Alle drei Substanzen werden gemäß der Mengenangaben in 2000 ml H₂O-Bidest miteinander vermischt, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Danach wird sie autoklaviert.

Für eine Gel-Herstellung wird 1xTBE-Puffer mit Ethidiumbromid benötigt.

200 ml BE-Puffer 1800 ml Aqua dest. 60 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
2000 ml 1xTBE-Puffer inklusive Ethidiumbromid

Je nach zu erwartenden Produkten könne Gele zwischen 0,7% und 1,5% gegossen werden, was bei einem 100 ml Ansatz H₂O Aqua dest 0,7 g bzw. 1,5 g Agarosepulver (Biozym) entspricht. In einem Mikrowellenherd wird die Lösung 3 min bei 350 W gekocht, bis sie keine Schlieren mehr zieht. Danach wird sie in vorbereitete Schälchen gegossen, in denen jeweils zwei Kämme stecken, die je 20 Vertiefungen in das Gel einprägen. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 min ist das Gel einsatzfähig und kann samt Gießschale in eine Elektrophoresekammer eingesetzt werden, welche selbst mit 1xTBE-Puffer mit Ethidiumbromid gefüllt ist. Wenn das Gel vollständig mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt ist, werden die Kämme gezogen. In die erste Tasche des Gels werden 10 µl eines Längenstandards (Boehringer) pipettiert, in die folgenden die PCR-Produkte. Es hat sich bewährt, 3 µl Loading-Buffer in ein Eppendorf-Röhrchen vorzulegen, 10 µl des PCR-Produktes darauf zu pipettieren, beides kurz zu mischen, und schließlich alles in die Geltasche zu geben. Während der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA, durch ein elektrisches Feld in Bewegung gesetzt, gemäß ihrer Trägheit (Größe des PCR-Produktes) zum positiv gerichteten Pol der Elektrophoresekammer. Dazu wird eine Spannung von 110 Volt angelegt. Nach ca. 1 Stunde oder mehr (je nach Größe der Produkte und Stärke des Gels) können die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Denn das sowohl im Gel als auch in der Elektrophoresekammer befindliche Ethidiumbromid, das unter UV-Licht fluoresziert, ist chemisch in der Lage, sich zwischen DNA-Doppelstränge einzulagern (Interkalation). Im Vergleich zum Molekulargewichtsmarker kann dann auf die Größe der einzelnen PCR-Produkte geschlossen werden. Zur

Dokumentation wird mit einer speziellen Kamera das Gel unter UV-Licht photographiert (siehe Kapitel 4).

2.3 DNA-Sequenzierung

2.3.1 Das Prinzip einer Nukleotidsequenzierung

Für eine Sequenzierreaktion werden Polymerase, Desoxynukleotide (dNTP), fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP), das gereinigte PCR-Produkt sowie ein dazugehöriger Primer benötigt. Nach Bindung des Primers an den Einzelstrang des PCR-Produktes erfolgt durch eine Polymerase die Synthese des komplementären Stranges der unbekannten Sequenz. Als Substrat werden im Gegensatz zur PCR dNTPs *und* ddNTPs angeboten. Wird ein ddNTP eingebaut, findet ein Kettenabbruch statt. Statistisch betrachtet finden an jeder Base mehrere Abbrüche statt, so dass nach Ablauf der Sequenzierreaktion mehrere Nukleotidkettenfragmente der Länge von 1 bis maximal 700 Basen vorliegen, die jeweils an ihrem Ende ein bestimmtes fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid (ddNTP) tragen (Abbildung 2.7).

TTGACGCCTAGATT a) Zu sequenzierendes DNA-Stück



b) Sequenzierreaktion

c) Elektrophorese

Abbildung 2.7 Nach der Sequenzierreaktion werden die abgebrochenen Nukleotidketten gemäß ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt und die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide abgelesen. **a)** Hier ist die zu sequenzierende DNA-Sequenz dargestellt. **b)** Bei der Sequenzierreaktion entstehen unterschiedlich lange Nukleotidketten, die jeweils am Ende ein bestimmtes fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid tragen. **c)** Die verschiedenen Nukleotidketten werden elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und gemäß ihrer Fluoreszenzeigenschaften einer der vier Basen zugeordnet. Die Didesoxynukleotide sind durch folgende Farben dargestellt: T ist rot, C ist blau, A ist grün und G ist braun.

2.3.2 Reinigung des PCR-Produktes

Wenn das PCR-Produkt auf dem Agarose-Gel eine einzelne und starke Bande als Ergebnis erbracht hat, kann auf die restlichen 40 µl des PCR-Produktes zurückgegriffen werden, die zur Vorbereitung des Sequenzierens gereinigt werden müssen. Die Reinigung wird gemäß des „QIAquick PCR Purification Kit Protocol“ der Firma Qiagen durchgeführt: Zu den 40 µl PCR-Produkt werden 200 µl PB-Puffer zugegeben und in einem Silica-Säulchen bei $\omega=100$ U/min 60 sek lang zentrifugiert, um die DNA an die Matrix binden zu können. Entscheidend für eine effektive Sequenzierung ist, möglichst alle Verunreinigungen (PCR-Puffer, Primer) herausgewaschen zu haben. Dazu wird nochmals 60 sek mit 0,75 ml PE-Puffer bei $\omega=100$ U/min zentrifugiert. Es schließt sich eine weitere, trockene Zentrifugation des Silicasäulchens an. Um schließlich die DNA wieder aus der Matrix lösen zu können, werden 50 µl Aqua bi-dist auf die Matrixplatte pipettiert. Nach 5 min Einwirkzeit folgt die Abzentrifugation in ein Eppendorf-Röhrchen. Damit liegt gereinigte DNA zur Sequenzierung vor. Um einen eventuellen Verlust an DNA ausschließen zu können, empfiehlt es sich, die gereinigte DNA noch einmal auf ein Gel aufzutragen, um die tatsächliche DNA-Ausbeute nach der Reinigung prüfen zu können.

2.3.3 Der Sequenzierprozess

Für die Sequenzierreaktion wird eine Mischung angesetzt, die sich aus gereinigter DNA des PCR-Produktes, einem dazugehörigen Primer und Sequenziermix zusammensetzt. Der Sequenziermix enthält vier dNTP, vier verschiedene ddNTP sowie eine Polymerase.

1 µl Primer (10 µM Stammlösung) 2 µl gereinigtes PCR-Produkt 2 µl Sequenziermix
5 µl Ansatz

Die Sequenzierreaktionen wurden im „Mastercycler gradient“ der Firma Eppendorf durchgeführt. Dazu wurde der Cycler in folgender Weise programmiert (Tabelle 2.6):

Sequenzierschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Doppelstrangtrennung	96 °C	0:15 min	27 mal
Primerbindung	53 °C	0:15 min	
Nukleotidanlagerung mit Kettenabbruch	60 °C	4:00 min	
Kühlung	4 °C	Ad libitum	Kein Zyklus

Tabelle 2.6 Das Sequenzierprogramm. Die DNA wird bei 96 °C in Einzelstränge getrennt, so dass sich der Primer anlagern kann. Danach bewirkt eine Polymerase ähnlich wie bei der PCR eine Nukleotidverlängerung, allerdings mit dem Unterschied, dass Produkte nicht exponentiell vermehrt werden und bei Einbau eines der vier markierten Nukleotide ein Kettenabbruch erfolgt. Als Sequenziermix wurde Rhodamin oder BigDye verwendet.

2.3.4 Reinigung des Sequenzierproduktes

Nachdem der Sequenzieransatz das Cycler-Programm durchlaufen hat, muss das fertige Sequenzierprodukt ausgefällt werden, um die nicht eingebauten Terminatoren (ddNTP) aus dem Sequenziermix zu entfernen. Der Ansatz zur Reinigung durch Fällung setzt sich zusammen aus:

5,0 µl Sequenzierprodukt 12,5 µl Ethanol (100%) 0,5 µl 3 molares Na ⁺ -Azetat
18,0 µl Ansatz

Dieser Ansatz wird für jedes einzelne Sequenzierprodukt 30 min bei $\omega=12000$ U/min in einem Eppendorf-Röhrchen zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit einer Pipette abgesaugt, ohne dass allerdings ein Sediment zu sehen wäre. Nach Zugabe von 90 µl 70%igem Ethanol in das Eppendorf-Röhrchen wird bei $\omega=12000$ U/min weitere 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen, und die noch feuchten Röhrchen werden zum Trocknen für 30 min in den Heizschrank gestellt. Nun kann das Sequenzierprodukt in Lösung aufgenommen und auf einem speziellen Polyacrylamid-Sequenzier-Gel aufgetragen werden.

2.3.5 Elektropherogramme

Das Sequenziergerät, mit dem die einzelnen Sequenzier-Proben analysiert werden konnten, ist ein ABI 377 von Perkin & Elmer. Dabei vollzieht sich die Sequenzerkennung derart, dass jedes gereinigte Sequenzierprodukt in einer Spur auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in die verschiedenen Teilprodukte gemäß ihrer Länge aufgetrennt wird. Die dabei auftretende optische Intensität der fluoreszierenden Terminatoren (ddNTP) wird von einer Laser-

Kamera erkannt, wobei die jeweils detektierten Wellenlängen des Lichts in A, T, C oder G übersetzt werden. Diese Arbeiten wurden in einem gemeinsamen Sequenzierlabor des Physiologischen Instituts der LMU München durchgeführt. Die dort gewonnenen Rohdaten wurden elektronisch als Elektropherogramme in unser Labor übermittelt. Somit war es möglich, die Sequenzdaten mit Hilfe der ABI Sequence-Navigator-Software genau auszuwerten und die Exon-Intron-Übergänge zu bestimmen.

2.4 Genome walk[®]

Die Klonierung der Promotorregion wurde mittels PCR und einer DNA-Bibliothek der Firma Clontech (Genome walk[®]) durchgeführt. Clontech bietet DNA-Teilsequenzen an, die nach Restriktionsverdau alle mit einer gleichlautenden Ankersequenz ligiert sind. So ist es möglich, mittels Ankerprimern und selbst abgeleiteten Primern von bekannten in unbekannte Sequenzregionen vorzustößen (Tabelle 2.7).

Primer	5' Sequenz 3'	Richtung	5'-Bindung (nt)	T [°C]
Exon1 R	TCATAGGAGCTGAGAGAATGATG	-	1291	58,9
Prom1 R	ATTCATGACAGACAAATTAGTCAC	-	881	55,9
2 Prom Rev neu	GTCACTAGGCACATGCATCTG	-	865	59,8
Prom3 R	ATGAAAGAAGAGAATTGCCTGTTG	-	70	57,6
Prom4 R	CCCAAACCTCAAGAATTTTGCTG	-	45	57,1

Tabelle 2.7 Primer für Genome Walk[®]. Mit den in der Tabelle beschriebenen Primern wurden 2 Zyklen des Genome Walk[®] durchlaufen. Die 5'-Bindungsstelle der Primer bezieht sich auf die Sequenzen des 5'-Endes des Proenteropeptidase-Gens (Abbildung 3.6). Alle Primer sind bezogen auf das Proenteropeptidase-Gen rückwärts (-) gerichtet. Die berechnete Schmelztemperatur ist in der letzten Spalte aufgelistet.

Der Ansatz für die PCR zu Genome Walk[®] ist ähnlich wie der für die Genstrukturaufklärung:

41,0 µl H ₂ O
5,0 µl Puffer Nr. 3
1,0 µl Adaptorprimer (10 µM)
1,0 µl Primer der bekannten Sequenz (10 µM Stammlösung)
1,0 µl dNTP (Nukleotide, 20 µM)
0,5 µl DNA (1:1000 verdünnt bei 2. PCR)
0,5 µl Polymerase
50,0 µl Ansatz

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der PAC-Klone

Die vollständige Genstrukturaufklärung des Proenteropeptidase-Genes gelang in dieser Arbeit mittels zweier PAC-Klone, die beide zusammen genommen das gesuchte Gen in sich tragen. Über PCR konnte nachgewiesen werden, dass PAC-Klon 3 das 3'-Ende und PAC-Klon 4 das 5'-Ende des Proenteropeptidase-Genes repräsentieren. Mit Hilfe der Primerkombination Entero 3 und Entero 9, die vom 5'-Ende der cDNA abgeleitet wurden, wird bei PAC-Klon 4 ein positives PCR-Produkt gewonnen, das insgesamt eine Länge von 170 bp aufweist (Tabelle 2.4). Die Sequenzierung zeigt, dass das erhaltene PCR-Produkt mit der vorliegenden cDNA-Sequenz identisch ist. Somit muss PAC-Klon 4 Teile von Exon 1 besitzen und den Anfang des Proenteropeptidase-Genes in sich tragen. Mit PAC-Klon 3 als Template kann via PCR ein Amplikon über die Primerkombination Entero 8 und Entero 3 (abgeleitet vom 3'-Ende der cDNA) synthetisiert werden (Tabelle 2.4). Es ergibt eine Länge von 215 bp, und das Ergebnis der Sequenzierungsreaktion beweist, dass die Amplikonsequenz identisch mit dem 3'-Ende der cDNA-Sequenz ist. Damit ist gesichert, dass Klon 4 das letzte Exon des Proenteropeptidase-Genes enthält. Weitere Amplifikationen im Inneren des Proenteropeptidase-Genes beweisen, dass beide PAC-Klone einander überlappen, denn die Primerkombination Entero 37 und Entero 20 ergeben identische Amplikons, wenn PAC-DNA als Template eingesetzt wird (Tabelle 2.4). Somit repräsentieren PAC-Klon 3 und 4 zusammen das gesamte menschliche Proenteropeptidase-Gen, wobei Klon 4 von Exon 1 bis einschließlich Intron 14 eine Länge von über 60 kb enthält, und Klon 3 von einschließlich Intron 14 bis zum Ende des Proenteropeptidase-Genes eine Distanz von über 28 kb umspannt (Abbildung 3.1).

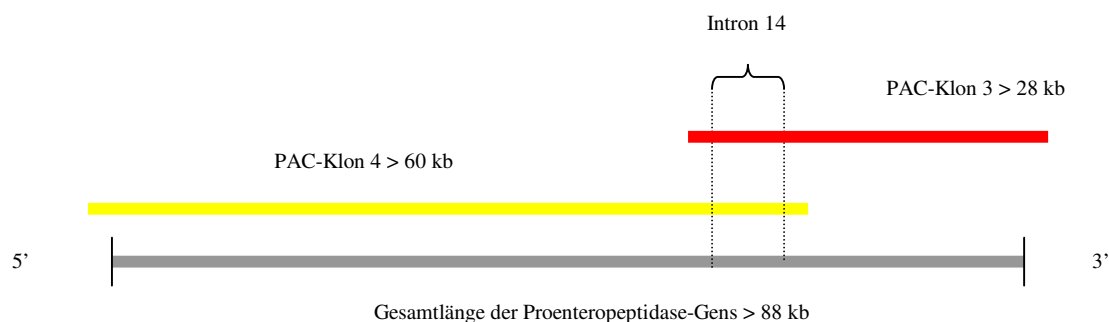


Abbildung 3.1 Die beiden identifizierten PAC-Klone repräsentieren das gesamte Proenteropeptidase-Gen. PAC-Klon 4 reicht von Exon 1 bis Intron 14. PAC-Klon 3 umfasst Intron 14 bis Exon 25 des Proenteropeptidase-Genes.

3.2 Stromaufwärts von Exon 1 (Promotorregion)

Damit es überhaupt zu einer Genexpression kommt, muss sich die RNA-Polymerase an die DNA stromaufwärts des ersten Exons anlagern können. Diese aus 2-3 Bp bestehende DNA-RNA Hybridregion ist sehr instabil und muss durch Transkriptionsfaktoren gestützt werden. Transkriptionsfaktoren sind intranukleäre Proteine, die direkt an eine definierte DNA-Sequenz binden können. Diese DNA-Sequenz zur Bindung der Transkriptionsfaktoren heißt Promotorsequenz. Typischerweise besteht sie aus einem TATA-Motiv bei differentiell ausgeprägten Genen wie das der Enteropeptidase. Da nun die Sequenz des ersten Exons des Proenteropeptidase-Gens bekannt war, stromaufwärts am 5'-Ende dagegen nur unbekannte Sequenz lag, stellte sich die Frage, auf welche Weise die Promotorsequenz zu entschlüsseln ist. Eine Amplifikation von DNA mittels PCR und anschließender Sequenzierung gelingt nur, wenn gegenseitig orientierte Primer abgeleitet werden können, wozu allerdings die Sequenz bekannt sein muss. Als Lösung dieses Problems bot sich an, auf Genome walk[®], ein Produkt der Firma Clontech, zurückzugreifen. Dabei handelt es sich um eine spezielle DNA-Bibliothek. Mittels bakterieller Nukleasen (Enzyme, die DNA an definierten Stellen schneiden) wurde das gesamte Genom eines Menschen in viele tausend DNA-Teilstücke unterschiedlicher Länge geschnitten, die mit immer gleich lautenden DNA-Stücken bekannter Sequenz, die als Anker dienen, ligiert wurden (Abbildung 3.2).

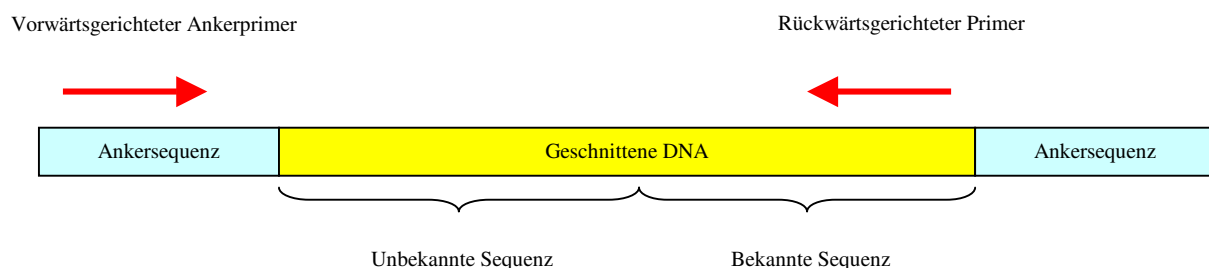


Abbildung 3.2 Genome walk[®]. Die gesamte DNA eines Menschen ist in fünf verschiedenen Ansätzen mittels Restriktionsendonukleasen in Teilstücke geschnitten worden. Jedes geschnittene DNA-Stück wurde mit einer bekannten Ankersequenz (50 bp) an beiden Schnittstellen ligiert.

Insgesamt stehen fünf DNA-Bibliotheken zur Verfügung, die jeweils durch die Restriktionsendonukleasen EcoR V, Sca I, Dra I, Pvu II und Ssp I entstehen. Auf diese Weise ist die Möglichkeit gegeben, von einer bekannten Sequenz aus in unbekannte Sequenzregionen vorzustoßen, indem eine PCR mit dem Ankerprimer und dem Primer des bekannten DNA-Stückes angesetzt werden kann. Zwischen den beiden Primern befindet sich dann die gesuchte Sequenzregion. Sie kann durch Sequenzierung des erhaltenen PCR-Produktes bestimmt werden. Von der auf diese Weise erhaltenen Sequenz kann in einer neuerlichen Anwendung weiter in unbekannte DNA-Sequenzen vorgestoßen werden. Solche Zyklen sind beliebig wiederholbar. Typischerweise werden pro Durchgang 200-2000 bp an neuer Sequenz gewonnen (Abbildung 3.3).

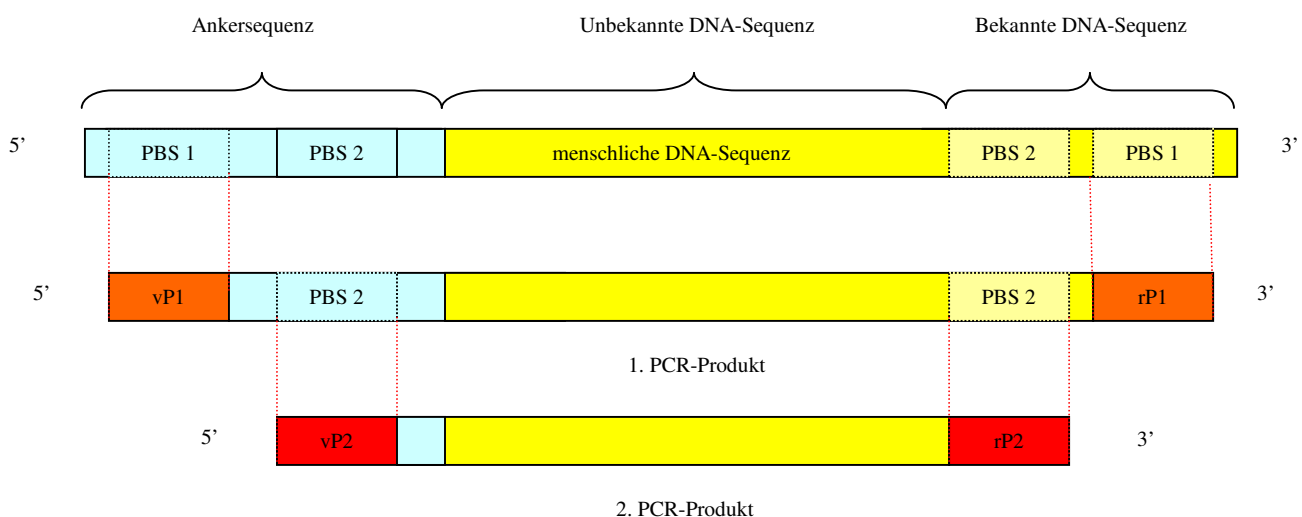


Abbildung 3.3 Nested PCR. Es werden zwei PCR hintereinander ausgeführt, wobei das Produkt der ersten als Substrat der zweiten dient. Auf diese Weise entsteht ein reines Amplikon, das sequenziert werden kann. **PBS** steht für Primer-Bindungs-Stelle, **rP** für rückwärtsgerichteter Primer und **vP** für vorwärtsgerichteter Primer.

Um ein möglichst reines PCR-Produkt zu erhalten, empfiehlt es sich, die erste PCR mit einem zweiten Satz an Primern zu wiederholen, wobei die beiden neuen Primer direkt neben den Ausgangsprimern lokalisiert sein müssen. In diesem zweiten PCR-Ansatz wird das erste PCR-Produkt als Substrat in Verdünnung 1:1000 eingesetzt. Mittels PCR können insgesamt 1260 Basenpaaren vor dem Translationssignal (ATG), d. h. 1220 bp vor dem publizierten Ende der

cDNA gewonnen werden. Dabei werden im ersten Durchgang die beiden Primern Entero 9 und Exon 1R zusammen mit der EcoR1-Bibliothek verwendet (Tabelle 2.7). Für den zweiten Durchgang werden die beiden Primer 2 Prom 1R und 2 Prom Rev auf der gewonnen Sequenz abgeleitet. Mit der Ssp1-Bibliothek als Template kann daraus ein Amplikon erhalten werden (Tabelle 2.7).

3.3 PCR-amplifizierte Introns

Seit dem Jahr 1977 ist bekannt, dass die Größe eines eukaryotischen Gens wie das der Entero-peptidase vor allem durch die Introns bestimmt wird. Um nicht nur die Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge zu kennen, sondern auch die gesamte Länge des Proenteropeptidase-Gens zu bestimmen, wurden alle Intronamplikons in Abhängigkeit eines Längenstandardmarkers auf einem Agarose-Gel aufgetragen. Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen alle Introns, die mit Hilfe der cDNA abgeleiteten Exonprimer gewonnen werden konnten.

Bis heute ist die genaue Bedeutung der Introns noch ungeklärt. Die früheren Annahme, dass es sich bei den Introns um DNA handle, die im Laufe der Evolution nicht mehr benötigt wurde und jetzt quasi sich als Relikt zwischen den Exons angesammelt hätte, wird heute kaum noch vertreten. Hingegen zeigt sich immer mehr, dass Introns wohl für die Genexpression einen wichtigen Beitrag leisten. Es sind beispielsweise in diesen Regionen Abschnitte von Enhancer- bzw. Silencer-DNA zu finden sind. Darunter sind DNA-Bindungsstellen für intrazelluläre Signalproteine zu verstehen, die für die Genaktivität von entscheidender Bedeutung sind, d. h. also *wann* und *in welchen Mengen* ein bestimmtes Protein exprimiert wird.

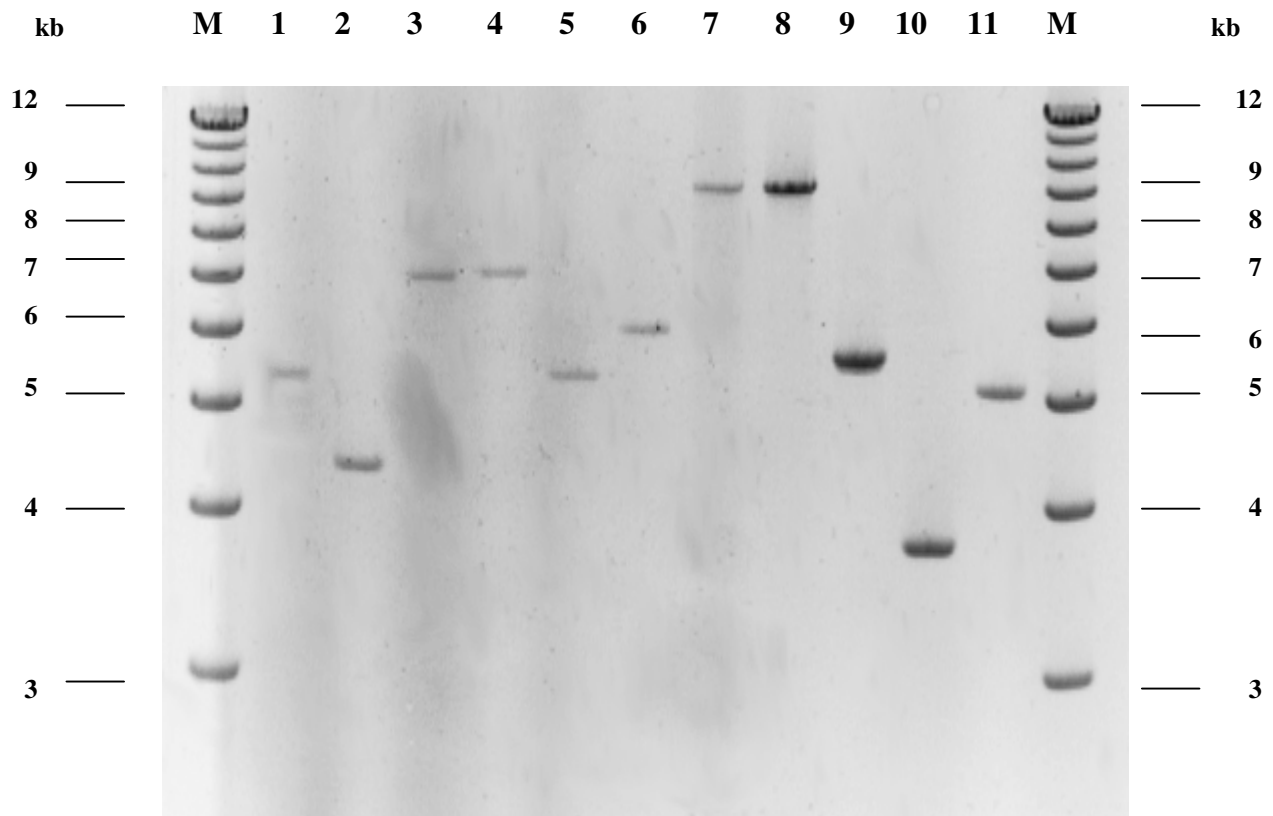


Abbildung 3.4 PCR-amplifizierte Introns größer als 3,8 kb Länge. Es sind elf verschiedene Intron-PCR-Produkte abgebildet, die links und rechts durch einen Längenstandard-Marker (M) eingerahmt werden. Für diese Aufnahme wurde ein 0,7%-iges Agarose-Gel gewählt. Im Einzelnen handelt es sich um folgende PCR-Produkte: Amplikon 1 enthält Intron 1 mit 5,4 kb, Amplikon 2 enthält Intron 4 mit 4,3 kb, Amplikon 3 enthält Intron 5 mit 7 kb, Amplikon 4 enthält Intron 6 mit 7 kb, Amplikon 5 enthält Intron 7 mit 5,3 kb, Amplikon 6 enthält Intron 8 mit 6 kb, Amplikon 7 enthält Intron 10 und 11 mit 9 kb, Amplikon 8 enthält Intron 13 mit 9 kb, Amplikon 9 enthält Intron 21 mit 5,5 kb, Amplikon 10 enthält Intron 23 mit 3,8 kb und Amplikon 11 enthält Intron 24 mit 5,1 kb.

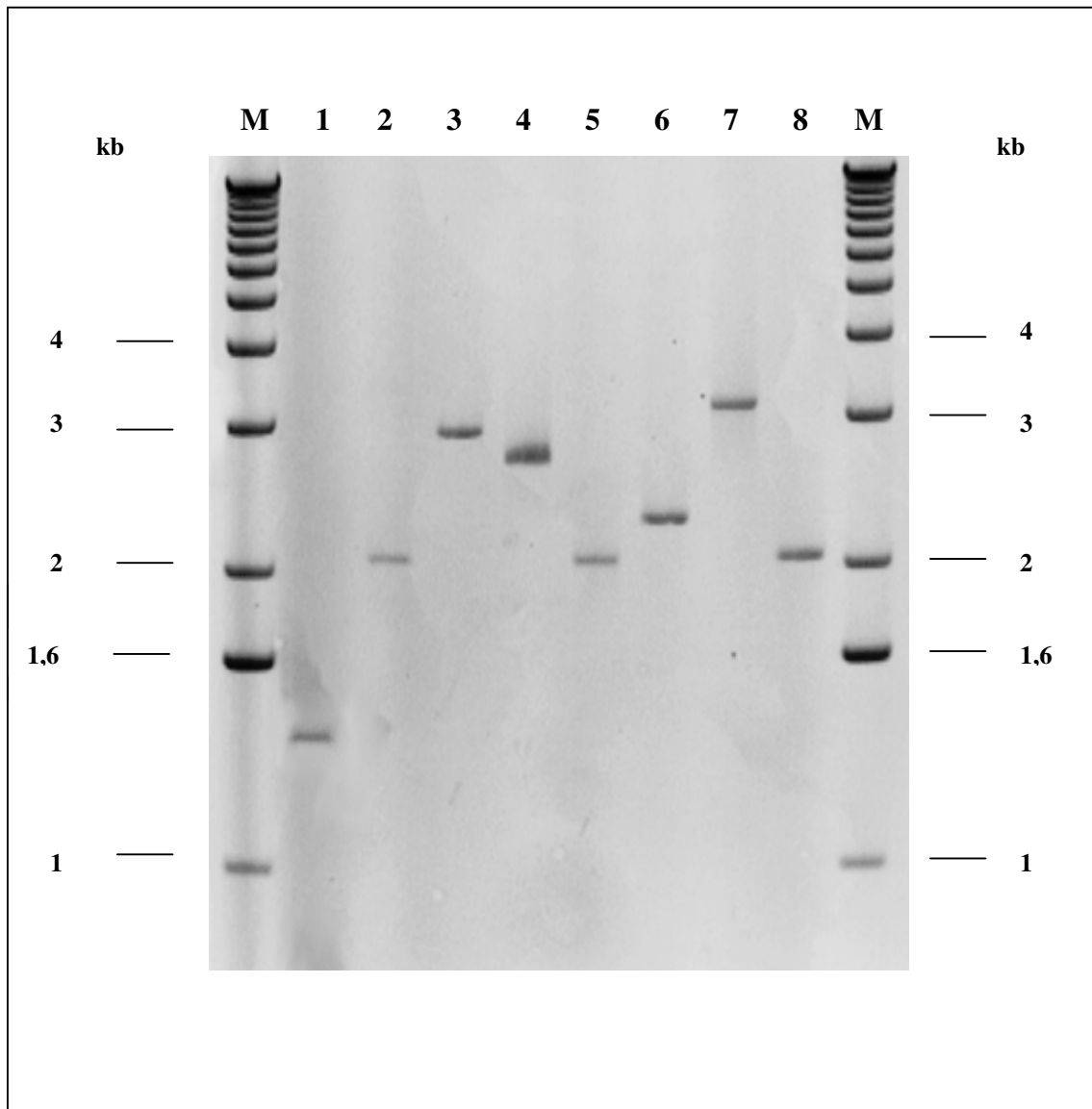


Abbildung 3.5 PCR-amplifizierte Introns kleiner als 3,1 kb Länge. Es sind acht verschiedene PCR-Produkte abgebildet, die rechts und links von einem Längenstandard-Marker (M) eingerahmt werden. Für die Aufnahme wurde ein 0,8%-iges Agarose-Gel gewählt. Im Einzelnen handelt es sich um folgende PCR-Produkte: Amplikon 1 enthält Intron 2 und 3 mit 1,5 kb, Amplikon 2 enthält Intron 12 mit 2,1 kb, Amplikon 3 enthält Intron 14 mit 3 kb, Amplikon 4 enthält Intron 15 mit 2,9 kb, Amplikon 5 enthält Intron 16 mit 2 kb, Amplikon 6 enthält Intron 17 mit 2,3 kb und Amplikon 7 enthält Intron 19 und 20 mit 3,1 kb.

Die Tabelle 3.1 enthält die genaue Charakterisierung aller intronenthaltenden PCR-Produkte, mit denen die cDNA-Sequenz des Proenteropeptidase-Gens überlappend abgedeckt ist. Es wird die gewählte Primerkombination gezeigt, das verwendete PCR-Programm, die dazu nötige Primerbindungstemperatur sowie des Nummer des verwendeten PAC-Klons. Ebenso wird auf die Größe und die Reihenfolge der Introns Bezug genommen.

Primerkombination	PCR-Programm	Primer-bindungs-temperatur	Amplikon-Länge	Nummer des PAC-Klons	Amplikon-Charakterisierung
Entero (4/10)	3	55 ° C	5,3 kb	4	Intron 1
Entero (44/57)	3	58 ° C	1,5 kb	4	Intron 2 und 3
Entero (60/69)	3	60 ° C	4,3 kb	4	Intron 4
Entero (72/55)	3	60 ° C	7 kb	4	Intron 5
Entero (13/16)	3	60 ° C	7 kb	4	Intron 6
Entero (63/32)	3	55 ° C	5,3 kb	4	Intron 7
Entero (31/50)	3	60 ° C	6 kb	4	Intron 8
Entero (40/25)	2	57 ° C	670 bp	4	Intron 9
Entero (71/54)	3	55 ° C	9 kb	4	Intron 10 und 11
Entero (43/18)	3	58 ° C	2,1 kb	4	Intron 12
Entero (17/56)	3	60 ° C	9 kb	4	Intron 13
Entero (37/20)	2	55 ° C	3 kb	3 und 4	Intron 14
Entero (19/67)	3	60 ° C	2,9 kb	3	Intron 15
Exon (16f/Entero73) und Exon (16f/17r)	3	58 ° C	2 kb	3	Intron 16
Entero (36/26)	2	60 ° C	2,3 kb	3	Intron 17
Entero (70/64) und Exon (18f/19r)	2	60 ° C	432 bp	3	Intron 18
Entero (29/22)	2	57 ° C	3,1 kb	3	Intron 19 und 20
Entero (21/61)	3	55 ° C	5,5 kb	3	Intron 21
Entero (62/24)	1	55 ° C	158 bp	3	Exon 22 (cDNA)
Entero (23/65)	3	60 ° C	2,1 kb	3	Intron 22
Entero (52/53)	2	57 ° C	3,8 kb	3	Intron 23
Entero (34/28)	3	60 ° C	5,1 kb	3	Intron 24
Entero (8/3)	1	55 ° C	215 bp	3	Exon 25 (cDNA)

Tabelle 3.1 PCR-Produkte, die im Rahmen der Genstrukturaufklärung des Proenteropeptidase-Gens ge-riert wurden. Die in dieser Tabelle aufgeführten intronenthaltenden PCR-Produkte decken die cDNA-Sequenz des Proenteropeptidase-Gens vollständig ab. Die aufgeführten PCR-Programm-Nummern entsprechen den detaillierten Angaben in Tabelle 2.1, 2.2 und 2.3.

3.4 Die Sequenz der Exon-Intron-Übergänge

Das Proenteropeptidase-Gen umspannt insgesamt eine Länge von über 88 kb. Es enthält 24 Introns und 25 Exons. Verglichen mit anderen Genen des Menschen gehört es zu den größeren. Das Amplikon des ersten Introns wird über die beiden Primer Entero 4 und Entero 10 erzeugt und ergibt auf dem Agarose-Gel eine Länge von 5,3 kb (Abbildung 3.4). Die Sequenzergebnisse des ersten PCR-Amplikons mit Primer Entero 4 und Entero 10 (Tabelle 2.4) werden direkt mit der cDNA-Sequenz verglichen, wobei die unmittelbar dem Primer folgende

Sequenz des Amplikons immer noch auf cDNA-Ebene liegt. Ein Intron beginnt dann, wenn die gewonnene Sequenz beim Vergleich nicht mehr mit der cDNA-Sequenz übereinstimmt, wobei (fast) jede Intronsequenz als Anfang die Basenkombination **GT** zeigt. Das Ende eines Introns kann gleichsam retrograd bestimmt werden, indem vom abgeleiteten Exonprimer die Sequenz rückwärtsgerichtet mit der cDNA-Sequenz verglichen wird. Bei Sequenzdifferenz ist der Ort gefunden, wo das Intron endet. Hierbei gilt ebenfalls die Gesetzmäßigkeit, dass (fast) jedes Intron mit der Basenkombination **AG** schließt (GT/AG-Regel). Für den Übergang zwischen Exon 1 und Intron 1 ergibt sich die folgende Sequenz **CGAGGTAAGT** (Abbildung 3.4). Das Ende von Intron 1 und der Übergang zu Exon 2 stellt sich wie folgt dar: **ATCTAGGTGC** (Abbildung 3.7). Die Intronsequenz wird schwarz dargestellt, wobei der Beginn bzw. das Ende des Introns (**GT/AT**) fett dargestellt ist. Die bekannte Exonsequenz ist rot hervorgehoben. Mit diesem Vorgehen kann die gesamte Genstruktur des Proenteropeptidase-Gens gewonnen werden.

```

1  attttcaatg aaatacattt gtttactcat aattctatTT ttatcagcaa aaattcttga
61  gtttgggggc aacaggcaat tctcttcttt catgggtaaa gaagaagaaa agcagctacn
121 gttcatctta gccattata atatgccaca atttcagtgt gttagggggt toccaatctaa
181 aactttctta cctcctgcc gttttattta ccagaataaa agtcacattg gtttacttca
241 gaatagattc ggttttatTT agttttaatt tttgtgtttt aaagttcctg aactcatcat
301 tattcatggt gtgaataatc ccaatgctaa accgtaattt aattatcaga aaatgacttt
361 gattttttcca taaagcatat atctacaact ataactatga ttatcttaac ctgttctctt
421 gttctaattg gcatatttaa agagataaag tccaggggcaa gtgagcaatg tcttccccac
481 ccagactatt ttcttagaat agaaacacat attttattcc tcttatgaca ggtactacca
541 ttcattaata actgcacaag gccataaaga gtagccatag aacgccttgt ttaagtgtac
601 tttcccttat gtaataactgc cttacattgc ataactcac ctgggtgaca taacaaagtt
661 tgcaacactt ttgattgttt ccataaggaa tacatgtata tgtatatgta cacagagaga
721 gtatatatat gttaggcttt atatacatct gcacctaaaa gttattttta gaaggtctat
781 atcaacatat aagagaagtg tcttaagaat catctgagtc agagggtaga aggttgatct
841 gttaggaaact ctctctatga atatcagatg catgtgccta gtgactaatt tgtctgtct
901 gaatttcaca tttttcttaa tagtttctcaa aatgataaaa tgtcttttgt ttacaacatg
961 aatttaattt gattcacctt ggcaaatggc ctgttcaggt agttaacatt tacaactcta
1021 ggcatcttta ctcatTTata tcttctttaa gattaactac ccttttaatg atacttaatg
1081 tatagagaca taattttgcc aaagagacat acacaactca cttacactga ctggtatgca
1141 tgtagacagg tggttgttgc tttacacatc tttaaaaaatt tgagagattt ttctcttcag
1201 ttggtagaat tatttatatt ctctttcagt tcttaaatta gcaagccttc aaaaccaaaa
1261 atgggggtcga aaagaggcat atcttctagg catcattctc tcagctccta tgaaatcatg
1321 tttgcagctc tctttgccat attggtagtg ctctgtgctg gattaattgc agtatcctgc
1381 ctgacaatca aggaatccca acgaggtaag tcacatggag ttggctcgtg aagggtgctct
1441 cagctgaatg tacacacttt agtgtcagtt attctgtaag tctattttat tcattgccaa
1501 ctaaatgcat tattttgggc tttcaatcta atatttcaaa ttaatcttca tgacaaaata
1561 tttatgttgc cttcatgtac ttctctgtag ttcccttcag agaataattag gaaaattaat
1621 tggatatgtaa tttgaaactt aatgcagaat ttaagcatga gactgagtag tttttaaaaat
1681 aaataatgtt aaataagtat ctgggtttca acatataatc aagtagattt catggccctt
1741 gattt

```

Abbildung 3.6 Exon 1 mit unmittelbar flankierender Promotor- und Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19124 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist das 5'-Ende und die mögliche Promotorregion (1-1260), Exon 1 ab ATG-Translationsstart (1261-1405) und Intron 1 (1406-1745).

Die beiden Introns 2 und 3 können in einem einzigen Amplifikationsvorgang gewonnen werden. Dazu werden die Primer Entero 44 und Entero 57 benötigt (Tabelle 2.4). Mit Primer 44 kann das Intron 2 komplett durchsequenziert werden. Es weist eine Länge von 252 bp auf

(Abbildung 3.7). Die Größe von Intron 3 wird abgeschätzt, indem von der gemessenen Amplikongröße (1,5 kb) die Länge des Introns 2 sowie die Distanz zwischen dem verwendeten Exonprimer und dem Intronübergang subtrahiert werden (Abbildung 3.5). Der Übergang zwischen Exon 1 und Intron 2 stellt sich wie folgt dar: **AATGGTAGGA** (Abbildung 3.7). Das Ende von Intron 2 und der Beginn von Exon 3 zeigt folgendes Sequenzmuster: **TTCTAGATAG** (Abbildung 3.7). Intron 3 beginnt mit **TTGA**GTGAGT (Abbildung 3.7) und endet mit TTGCAG**AAAT** (Abbildung 3.8).

```

1  aaaactttta atggttcact tctcaccatg tttccctgag tcacttccca tgattggtgg
61  gagttcatca gtcggtgtat cttccaacag gaatctcaat aacaataata atgaaaattt
121 ggaagcttgg agtgtgggtt agacttcaaa gaaaagaaaa aaaatattga aagaatggag
181 aaaagggttta gtttccaatc ttttaaaaca atcagacagc tgggtgaaaga aagcagctga
241 ttttgaaaca tgagactaca aagaaaaagc aagaactaca gagctaacac atcaggcgag
301 agctttactt ctatgtctta acagaatgtg catattttct cctactcata atccaaaatc
361 ttagtggtgt ttccttatta attatctagg tcgagcactt ggacagagtc atgaagccag
421 agcgacattt aaaataacat ccggagttac atataatcct aatttgcaag acaactctc
481 agtggatttc aaagtctctg cttttgacct tcagcaaatg gtaggagact gacagctggt
541 ttcaaatttt ataacacagt ttaactactt gctgaaaaca ccattttctc actgtgaaac
601 aactagagaa taaatgtaat atgcccaaga tactcaaatg tatgagcccc attactatgg
661 agaaaattgc cccaactcta agcagaacat aaagattgct ttgtataaat ttttcaacaa
721 aagttaaaat cctaaattta gtatactcat tcaatctttt atatttttct agatagatga
781 gatctttcta tcaagcaatc tgaagaatga atataagaac tcaagagttt tacaatttga
841 gtgagtatag ctcaaaaatt ttctactgat ggaaaattag tgattttttt gctaataattt
901 gtaaaatagc atcactatat ataggaaaag aggaatatatt aaatttttca acattttttg
961 aggattaagc aaagtggcac agcataaact ttcatthttag tagcgaataa taataacttt
1021 tgataattga tcttatgtta atatgtttct ctctactgac aataaaaatct tgcagagaca
1081 catggagagg gtacagatgc agatatagta tttgacttgc tacgaacatt tgggaaaaag
1141 cttgcttgtc attt

```

Abbildung 3.7 Exon 2 und 3 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19125 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 1 (1-389), Exon 2 (390-520), Intron 2 (521-772), Exon 3 (773-840) und Intron 3 (841-1154).

Durch das Primerpaar Entero 60 und Entero 69 wird Intron 4 amplifiziert (Tabelle 2.4). Auf dem Agarose-Gel stellt sich eine Länge von 4,3 kb dar (Abbildung 3.5). **CTAGGTATGT** (Abbildung 3.8) ist die Übergangssequenz von Exon 3 zu Intron 4, **TTTCAGACAA** (Abbildung 3.9) der Übergang von Intron 4 zu Exon 5.

```

1  agcaagatga taactatgga gaatttcaac gacatttaac atgaattgaa cacaatatcag
61  tggaagatgg ctgacttttt cctcttatat cctcttttgc tttgcagaaa tggcagcatt
121 atagtcgtat ttgacctttt ctttgccag tgggtgtcag atcaaatgt aaaagaagaa
181 ctgattcaag gccttgaagc aaataaatcc agccaactgg tcactttcca tattgattg
241 aacagcgttg atatcctagg tatgtgtgaa cattatttga tttctttgaa tcattaagct
301 atgaaattaa aattctagca atataaccagg gaggaagtgg aatcatgctt gaccttagga
361 acatgtctta ttgcctgagg tgacacattt acatgagaaa agtgaaatct gaagaaaccg
421 catttgaaga aacttatcaa tgagaaaaag tttataaaat accaa

```

Abbildung 3.8 Exon 4 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19126 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 3 (1-107), Exon 4 (108-259) und Intron 4 (260-465).

Intron 5 wird durch das Primerpaar Entero 72 und Entero 55 synthetisiert (Tabelle 2.4). Sein PCR-Produkt beträgt 7 kb (Abbildung 3.5). Der Anfang des Intron 5 zeigt **CTAGGTATGT** (Abbildung 3.9) als Sequenz, das Ende **TTAAAGGAAA** (Abbildung 3.10).

```

1  agcaagatga taactatgga gaatttcaac gacatttaac atgaattgaa cacaaatcag
61  tggaagatgg ctgacttttt cctottatat cctcttttgc tttgcagaaa tggcagcatt
121 atagtcgtat ttgacctttt ctttgcccag tgggtgtcag atcaaaatgt aaaagaagaa
181 ctgattcaag gccttgaagc aaataaatcc agccaactgg tcactttcca tattgatttg
241 aacagcggtg atatcctag tatgtgtgaa cattatttga tttctttgaa tcattaagct
301 atgaaattaa aattctagca atataccagg gaggaagtgg aatcatgctt gaccttagga
361 acatgtctta ttgcctgagg tgacacattt acatgagaaa agtgaaatct gaagaaaccg
421 catttgaaga aacttatcaa tgagaaaaag tttataaaat accaa

```

Abbildung 3.9 Exon 5 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19127 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 4 (1-263), Exon 4 (264-299) und Intron 5 (300-774).

Ebenfalls eine Länge von 7 kb auf dem Agarose-Gel zeigt das Intron 6 (Abbildung 3.4). Es ist durch die Primerkombination Entero 13 und Entero 16 zu gewinnen (Tabelle 2.4). **TGTGTAAGT** (Abbildung 3.10) stellt den Übergang zwischen Exon 6 und Intron 6 dar, **TTGCAGCCAC** (Abbildung 3.11) den Übergang zwischen Intron 6 und Exon 7.

```

1  cattgttcaa tgtcacaatg cactgggaat ttttaagtgt tatcttactt taaaatgact
61  ttggttggtg aatgtactct acagaatgga aaccttgact taagccacta tattttcaaa
121 taataagctt atgagtaaat gaagtggctg ctatgatgtt cagatgatgt gataagcttt
181 ccaaaattgc ccacatgaa atttcaaaat ttaaaatgct ctaattttac aaatgattga
241 tttgcaaatg aaataaatat tcctatggca gttgaagaac atacttataa gtaagaaccc
301 cagtggcaaa aaggcctatt aaatatatta acattgtaca tatctcatca attggaatt
361 aatttcagtt atttttttaa gaaatgtct caatagagtg cctgcctggt tcaagtcctt
421 gtactgatgc tctaactgtt ataaaagctg atttatattg tgatggagaa gtaaaactgc
481 cagatgggtc tgacgaagac aataaaatgt gtggtaagtt ccccccccta ctctctcccc
541 ttctgtttta tcctccctca ctgtagacac acacacacac acacacacac acacacacac
601 acacacacac acatttcta ctcaaatacc tgaaactact gaagaatgag ctattttaaat
661 agctattttt aaaatataat acaaaatctt aaaataaatt tattaatatt ttcctaaact
721 ttataaataa tattaaagat attaatattt taaacagaat tccattt

```

Abbildung 3.10 Exon 6 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19128 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 5 (1-381), Exon 6 (382-513) und Intron 6 (514-767).

Intron 7 wird durch das Primerpaar Entero 63 und Entero 32 sowie gewonnen (Tabelle 2.4). Die Länge entspricht 5,3 kb auf dem Agarose-Gel (Abbildung 3.4). Intron 7 hat als Anfangssequenz **ATACGTAATA** (Abbildung 3.11), und als Ende **ATTTAGTGTA** (Abbildung 3.12).

```

1 gaaagaagga aggaaggaaa aagagagaga gaaagagaga gaaagaaaga gagaaaagga
61 aggaagaag gaagggaggg agggagggaa ggaaggaagg aagcaaggga aaaggaagga
121 gaaagaaaga gagaaagaga gagagagaaa gaaagaatth ttccaaaata ttccacgata
181 ggatgtgtat gattatttga acatggctaa taggtttcaa acatgaaatc ttactatcat
241 ttcatgtttca taaaataaacc ttgtacaggt ttgtccatga atattctgtg aaatgttttg
301 cagccaattt gaatcccaag attgtttttg tctaacatta attggcatcg ttttgcagcc
361 acagttttgt atggaagatt tttgttaact ggatcatctg ggtctttcca ggctactcat
421 tatccaaaac cttctgaaac aagtgttgtc tgccagtggg tcatacgtaa tacaagatct
481 tataattttct gttcttaagt cataaagcgt ttttctgatg caacgtctta ttgctttcag
541 tagtttttta aagaatcatt gttttcatta actatgaagc aaaaacctcc caactgaaaa
601 actgtacaaa aaactatact atcattttta acotttttaa aagctattct gtgctatgaa
661 caatactgtc taataagtgg ggtcatctca ttgggttctg aagcaagttt atttttctgt
721 ggtggacatt attcatgtgc ggccaggcaa acaacatata tgtatgtctg tgtatcgtga
781 gaagtagaat ttgcgcatct ctgcatttgc ctataaaata ttttctttct cattttgctg
841 cttaccatgt ggaatctct aaagggtgtg ttcagttaca gcagattaag agcagggaac
901 agcctctata catgtctttc ttactatata ttgaaagaca tttgggatca gtcaatat

```

Abbildung 3.11 Exon 7 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19129 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 6 (1-358), Exon 7 (359-467) und Intron 7 (468-958).

Intron 8 ist über die Primerkombination Entero 31 und Entero 50 synthetisierbar (Tabelle 2.4). Es weist eine Größe von 6 kb auf dem Agarose-Gel auf (Abbildung 3.4). Intron 8 beginnt mit **AGAGGTAAGT** (Abbildung 3.12) als Anfangssequenz und schließt mit **ACCAAGTTAC** (Abbildung 3.13).

```

1 tgagaacatt atgctaagt aaataagcaa gtcacagaga gataaatact gcatgaattc
61 atttacatga agcatagaaa gtagttaaac tcatggaaat gaaaggagaa tgggtgattgc
121 caggggctgg gaggactaag caatgggaag ttgtcattca gtgatacaga gtttcagtcc
181 tgaaagagtt ctgagatct gctgtacatc attgtgttca taaccggcaa tactgcactg
241 tacacttaaa aatttaagag agtagatatc atattatgtg gtgttcacca caagaaaaca
301 catacaaat ctagaatgca ttaagaaata tgacaactgt taaaaatttg gtaatctatt
361 ttttgccttt aatttagtgt aaaccaagga ctttccatta aactgagctt cgatgatttt
421 aatacatatt atacagatat attagatatt tatgaagggt taggatcaag caagatttta
481 agaggttaagt tgaacaaaat atacaattac ttatgaaaat gaaaatatgt gggtaatttt
541 ttggagtggt atgttttccc ttgtatttgg aagtgaatat ggacttgaaa cttataaaac
601 taaaaaaaaa acaattgctt cacattataa aaattagaaa attagtgtct tatgtggtct
661 tcataataaa gcagttacgt ttaacagtc ct

```

Abbildung 3.12 Exon 8 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar unter der Accession No Y19130 bei „GenBank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 7 (1-377), Exon 8 (378-484) und Intron 8 (485-692).

Intron 9 zeichnet sich dadurch aus, dass es genau eine Länge von 670 bp hat und in toto durchsequenziert werden kann (Tabelle 3.2). Ihm liegt die Primerkombination Entero 40 und Entero 25 zugrunde (Tabelle 2.4). Es beginnt mit der Sequenz **AATAGTAAGT** (Abbildung 3.13) und endet mit **TCACAGATTA** (Abbildung 3.13).

```

1  actgcttaac taatgtttct tagatgaact ttgccagtaa atgaatgcat cttttctatg
61  tatatatagt gcatagagct aacaattaaa aattaaaaat acctttttta tcaaaccata
121 aatatgtata ataatttgag gcttttcta gtttgagaga agagatattt taattaaaaac
181 aaatgtaaga ctaatgcttt tagttaacta agtggatca gatagatatt tgtatagatc
241 aactgacaaa ctgatatgtc agtagatgga ctgatggatg gatagagaga tgaacagata
301 gatatacata tataacagtt gtttatttta tttttagct tctatttggg aaactaatcc
361 tggcacaata agaatttttt ccaaccaagt tactgccacc tttcttatag aatctgatga
421 aagtgattat gttggcttta atgcaacata tactgcattt aacagcagtg agcttaatag
481 taagtattat ttattttttg gctttttaat ttttagatgc tttaatgtta tgatggaatt
541 ttaaaggtag cagaatctaa aattttcatg atgtaatttt ataagtagta tcttgtatgt
601 gcatctttct cttcttagaa cttaaaaaga aatgagaaat tggacaatgg tttacatttt
661 tcaaaggaat caaataacca atttgagaaa acttataaat cactataaaa tcaaattaaa
721 attttatttg ctgcaagcat tgcaagttag aaaatactag cataaaacta attcagagaa
781 aattctacat aaacttaatt tggatcaagg tattaaattt agtaacagga gagagaaaaa
841 tatggaacaa agtttctgtg ggtgaaccaa tggaaacaag atgtaaaact taaaaaatga
901 gaaacttata tttgctaata ccctgacaga gtataggaaa tgtattaatt taacacagtt
961 ggcaacaaaa agctgcttta aaaaaataaa atagaatgca acagagttaa gtcacaataa
1021 aaataatgat tttgtacata ccactgaagt ataagctgta taaggttaga ttattttcaa
1081 tacaatctaa tataactact cacattatgg actaaatttt ttttattcct tctttttttt
1141 cattcacaga ttatgagaaa attaattgta actttgagga tggcttttgt ttctgggtcc
1201 aggatctaaa tgatgataat gaatgggaaa ggattcaggg aagcaccttt tctcctttta
1261 ctggacccaa ttttgaccac acttttgcca atgcttcagg tataattcat ttaattcaga
1321 agtcaaaagg attttaatct ataaatcaaa aggaaagagg tatgtgtgt actgcagtg
1381 aaagtgagca gcattaaatg caaaagtc

```

Abbildung 3.13 Exon 9 und 10 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar unter der Accession No Y19131 bei „GenBank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 8 (1-338), Exon 9 (399-479), Intron 9 (480-1149), Exon 10 (1150-1299) und Intron 10 (1300-1402).

Gemeinsam in einem PCR-Amplikon werden Intron 10 und Intron 11 mit Hilfe der Primer Entero 71 und Entero 54 gewonnen (Tabelle 2.4). Es zeigt sich, dass das zehnte Intron eine Größe von 9 kb aufweist, wo hingegen das elfte nur aus 298 bp besteht und vollständig durchsequenziert werden kann (Abbildung 3.4). Intron 10 hat als Anfangssequenz **TCAGGTATAA** (Abbildung 3.13) und endet mit **TTACAGGATT** (Abbildung 3.14). Mit **TCTGGTATGT** (Abbildung 3.14) beginnt Intron 11 und findet sein Ende mit **AACTAGGTAT** (Abbildung 3.14).

```

1  atgtgaatta atcaaaatat ctagtaaact agaattaagt caggaattgg actggataat
61  ttagtgactc ataataagtc agaattttat atatccttgg tggtaactcca cttcaagact
121 cttgtttaat aaagtgggag gccagtggt aagctatttt tgtcaataac aatctgttat
181 ggcaaaaata ctgctttctg agctcgagtc tagtgtcttg tccactatat taaaatatat
241 ttctttaacc ttctcttcta aagtttttct ttctgtgcta caaagtctac ttgtcacaca
301 atgaaatgca aatatttaag tgaaataaat tttttttagt atttttacag gattttacat
361 ttctacccca actggaccag gagggagaca agaacgagtg gggcttttaa gcctcccttt
421 ggacccact ttggagccag ctgacctag tttctggtat gttgtacaca cctgtttaaa
481 cgctgtcttt tttaatgggt aacattgcct tgctcaggcc accaggtcca tatttcacta
541 agatgttggc taaagtttta atgcatacac tattactttt cccaactgat aagcaataaa
601 acattgatac acacctctcc ccattcccag caactccaaa acccagaagg aaaaaagat
661 tatttcaaag aaagtaaaaa atgtagaaaa gctctgaaaa ggacttattc taatgttgta
721 ggaatccaaa catttttgct tctttccaaa ctagtatca tatgtatggt gaaaatgtcc
781 ataaattaag catatatc agcaatgacc aaaatatgga gaagacagtt ttccaaaagg
841 aaggaaatta tggagacaat tggattatg gacaagtacc cctaaatgaa acagttaaat
901 ttaaggtttg caaaatactt tattatttat atttgtatcc tttttgtggt ggaacaatta
961 tattttagaat gatcacgtga aaaaattaat gtattttctg aagataatca agtcactttc
1021 tctacttgcc caatctacct cacattttac cttggagatg tttattttta tttattcaat
1081 agcctattaa aaacctatct tgaggaaaca tgtactaatg aaaatacagc ttataatggt
1141 ccataaaata catcgaagtc ttttagaata tttcagcttc cttcagcaac tttctagcat
1201 a

```

Abbildung 3.14 Exon 11 und 12 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19132 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 10 (1-350), Exon 11 (351-456), Intron 11 (457-754), Exon 12 (755-905) und Intron 12 (906-1021).

Über die Kombination der Primer Entero 43 und Entero 18 kann das Intron 12 synthetisiert werden (Tabelle 2.4). Es zeigt auf dem Agarose-Gel eine Länge von 2,1 kb und gehört zu den kleineren Introns des Proenteropeptidase-Gens (Abbildung 3.5). Seine Anfangssequenz ist **TAAGGTTTGC** (Abbildung 3.14), sein Ende **TTGCAGGTTG** (Abbildung 3.15).

```

1  ttttacactc atactctctc tcgtccctt cccccccagt gtgttttctc ttcaggcttt
61 gtatgctcta agaaggaaga aaactacctg aatgtttaat attgctgaaa gaagaaat
121 gggagaaaat tgctttctcc tgccagatga tatatatgca tgacagagta caatggaata
181 tgacaatatc ataagagaga cacagacaga gatatagaaa ctgtaacaat attgactaat
241 tcagaaggaa gacatcattg gaaatttagc cagtgtgaac acataataag ggggttgggt
301 tcagcagaag aatttaaaaa gcatgatctg tcaagatttc actatgtagt aacggtcacc
361 atatagttca aggtgacaat attgaatctc tagacaatat tgaatctctt gggctcacia
421 gaagaatcaa gtcagagaag attagaatgg aatcaaatcg ttccatatgc ctctctgaat
481 tgcaggttgc ttttaatgct tttaaaaaca agatcctgag tgatattgcg ttggatgaca
541 ttagcctaac atatgggatt tgcaatggga gtctttatcc agaaccaact ttgggtgcaa
601 ctctccacc agaacttcct agtaagtaac ctccatgtgt attttgtctt attaaatcat
661 taacgtcagg tgtggaggct cacagctata attccagcac ttcgggaggc tgaagcagga
721 ggattgcttg aagccaggag tttgagacca gcctgaggat tacagcgaga ctctgtctct
781 acaaaacaaa acaaaacaac acaaatagc tgggcac

```

Abbildung 3.15 Exon 13 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19133 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 12 (1-485), Exon 13 (486-621) und Intron 13 (622-795).

Mit 9 kb stellt Intron 13 eines der größten Introns des Proenteropeptidase-Gens dar (Abbildung 3.4). Ihm liegt das Primerpaar Entero 17 und Entero 56 zugrunde (Tabelle 2.4). Es beginnt mit der Sequenz **CCTAGTAAGT** (Abbildung 3.15) und endet mit **TTTCAGCGGA** (Abbildung 3.16).

```

1  atcgggcaa caatcacatg aaaaaaagct caacatcact gatcattaga gctcttatgt
61 acttaactgt gtttttctct tacttaaaact gcagcattta ccctaacatg actctaaaaat
121 ttacttgcca aaatttgat tctaagaaat gtaattgaaa attcgtctggc atatggtatt
181 atctctctga aataaacatt gtattactga tgatttccca ttgctttcct tttcagcgga
241 ctgtggagga ccttttgagc tgtgggagcc aaatacaaca ttcagttcta cgaactttcc
301 aaacagctac cctaactctg ctttctgtga gtcatttctt ttccagggtca tcagaacaaa
361 atgtccatat gaaatgtaga tctcccttg acgcagcaaa gtagattata aatttgtcaa
421 acatgggtac gcctatcatg tctacctata agattgctta atataacaac aaaaataaca
481 ataattgcta aatatatata gcatttgttt catgccaggc actgtgttaa tgcccaatat
541 acattatttc attcatttcc cacaagaact tcttgaagca ggtgtcatta t

```

Abbildung 3.16 Exon 14 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19134 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 13 (1-236), Exon 14 (237-326) und Intron 14 (327-591).

Intron 14 liegt mit 3 kb im Mittelfeld der Introngrößen (Abbildung 3.5). Es wird über die Primer Entero 37 und Entero 20 amplifiziert (Tabelle 2.4). Seine Anfangssequenz lautet **TTCTGTGAGT** (Abbildung 3.16), und es schließt mit **TTTTAGGTGT** (Abbildung 3.17).

```

1  aaaaaaaaaa taatgaaaag aaaaaagaaa caccttgaaa cactgatttt catgaagtgg
61  aaaaaaaatt gatttttttt taagttattt gaaattctca agagagttaa gcttttaaga
121 gaaatcacca agtgtgttcc aaattaaatg ttacttctta ctttttaggt gtttggattt
181 taaatgcaca aaaaggaaa aatatacaac ttcattttca agaatttgac ttagaaaata
241 ttaacgatgt agttgaaata agagatggtg aagaagctga ttccttgctc ttaggtaagt
301 ctgcaatctg aatattgtaa aggttgtaaa gctcaagatg ttgtgctgat ggaaagagcg
361 tttcttaatt aatgtaatca ctcttttaca acttgcaaaa tgaaaataca atagtaaagt
421 gacatgagtt tatgtggaac ttacaatata gggatatatt aaaatagtga caacggaata
481 tttttcttga acgttcttca caaagcagga ctaattattt ttacttttta aatttgttct
541 taattttcat gggtagatag taggtgtgtg tatttatggg atacatgaga tattttgata
601 caggcctaca atgcataata atcacatcag tgtgaatact gtatccatca cctcaagcat
661 ttttctgtc tttg

```

Abbildung 3.17 Exon 15 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19135 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 14 (1-168), Exon 15 (169-294) und Intron 15 (295-674).

Intron 15 wird mittels der beiden Primer Entero 19 und Entero 67 gewonnen (Tabelle 2.4). In der Agarose-Gel-Darstellung hat es eine Länge von 2,9 kb (Abbildung 3.5). Seine Anfangssequenz lautet **TTAGGTAAGT** (Abbildung 3.17), seine Schluss-Sequenz **GAACAGCTGT** (Abbildung 3.18).

```

1  gtcagatata ttataagtaa ttcattcatta cattatagag ttgcacaaac ctcaagaaat
61  atcaaaattt aaagagaagt ttgctttggt gagaagtgtt caaaatgtaa gagaatgtgt
121 gtgttcattt acttggtgct gctctatgag cgagccatgt aacatgtagc cctacgtctg
181 gcagagggaa ctgagatgtg gggtagatct ccttctagat ccaaaggatc atctcactga
241 ttatctcggt ttccttttga acagctgtgt acacagggcc tggcccagta aaggatgtgt
301 tctctaccac caacagaatg actgtgttcc tcactactaa cgatgtgttg gcaagaggag
361 ggtttaaaagc aaactttact actggctatc acttggggat tccaggtagg agccataaa
421 tcacacattg catcataact tttggagcaa aacagcaaag gtgtacagaa tttcaaggcc
481 aaaatcatga ttttaatgct ttccttctgt gacacttatt cttcctcatc ttaatgaaga
541 tgatttttcc tcctttacat ctgtagtacc gttacctgag ttcgttcaaa gtaggcagcc
601 acaaaagttt ttaagcagac ctacttggat ttctctgatg tgtaaggagt gttgaatttt
661 gttca

```

Abbildung 3.18 Exon 16 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19136 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 15 (1-264), Exon 16 (265-405) und Intron 16 (406-665).

Für das Intron 16 sind zwei hintereinander ausgeführte PCR (nested PCR) erforderlich. Der erste Ansatz wird mit dem Intronprimer Exon 16f und dem Exonprimer Entero 73 durchgeführt, der zweite mit den beiden Intronprimern Exon 16f und Exon 17r (Tabelle 2.4, Tabelle 3.2). Dabei ergibt sich ein Amplikon von 2 kb Länge (Abbildung 3.5). Die Intronsequenz beginnt mit **CCAGGTAGGA** (Abbildung 3.18) und endet mit **CCATAGAGCC** (Abbildung 3.19).

```

1  ataatgtgtg tgttcattta cttgtggctg ctctatgagc gagccatgta acatgtagcc
61  ctacgtctgg ctttgtactc cagaatcatc catttggtgt ttctttatcc tatacaataa
121 acattctttc cccatagagc catgcaaggc agaccatttt caatgtaaaa atggagagtg
181 tgttccactg gtgaatctct gtgacggta tctgcaactgt gaggatggct cagatgaagc
241 agatttggt atgtcttatt tttaggaaaa tacttttatg acttttagcct ctgcatttgg
301 actctacagt gtcaaagaaa gattataact gtgtctatta ggacctgttt tgatgctttg
361 ggacgagAAC atctcatctc tgagatgatt ttagcacctc tgtccccatc tggataga

```

Abbildung 3.19 Exon 17 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19137 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 16 (1-137), Exon 17 (138-248) und Intron 17 (249-418).

Mit 2,3 kb Länge liegt das Intron 17 eher im unteren Bereich (Abbildung 3.5). Ihm liegt die Primerkombination Entero 36 und Entero 26 zugrunde (Tabelle 2.4). Der Übergang zwischen Exon 17 und Intron 17 lautet **TGTGGTATGT** (Abbildung 3.19), der Übergang von Intron 17 zu Exon 18 **CTTTAGTGCG** (Abbildung 3.20). Für Intron 18 wird ebenfalls eine wiederholte PCR (nested PCR) benötigt. In einem ersten Ansatz wird ein Amplikon mit den beiden Intronprimern Exon 18f und Exon 19r erzeugt (Tabelle 3.2). Dieses PCR-Produkt wird in einen zweiten Durchgang eingesetzt, wobei aber die Primer Entero 70 und Entero 64 zugegeben werden (Tabelle 2.4). Insgesamt kann das dadurch gewonnene Amplikon komplett durchsequenziert werden und ergibt eine Länge von 432 bp (Tabelle 3.1). Es beginnt mit **TAGGGTAAGT** (Abbildung 3.20) und endet mit **CTCTAGGAGT** (Abbildung 3.20).

```

1  aattatgcta atcaacttat ccatcacctt aaataccata tttcatgatg agaaaatttg
61  aaattttgca aaattttgaa atatacaata cattattatt aactatagtc acagtgtctgt
121 gcaagagatc tcatgaactt attcctcctg tctaaatgaa gctctgtact ctttgaacga
181 tgtcttccca tactccgcac ccttcagctc ctggtaacta ccattatgct ctctgtgtct
241 ttagtgcggt ttttcaatgg cacaacgaac aacaatggtt tagtgcggtt cagaatccag
301 agcatatggc atacagcttg tgctgagaac tggaccaccc agatttcaaa tgatgtttgt
361 caactgctgg gactagggtta agtaattcta ctgagttcct ttttaagaga tttgcaaacc
421 tttttattac tatcaaatta ggtttaataa gagcttttaa atttataaag ttatgaattt
481 agaaaataca cattagcaaa agggagaaaa taaaaatcct gattaacccc attttcaagt
541 aataaaccact gttaataaacc tttgtatgaa tactgtataa attacattaa agttaaaatg
601 acatttcatg ggattatggg taattctact catttgcatc atcctttaga taggaaaaca
661 catgaagttt tatattaaaa cgttcatttt tttggctggg atcccataat ttgttttaat
721 gtccatagca ttaagggaact gaaagtctaa cttatggtct tttctttatg cttttgtttt
781 gtcgtgatgc ttttttcttt tttctctagc agtggaact catcaaagcc aatcttctct
841 acctgatgtg gaccattttt caaattaaac acagcacctg atggccactt aataactaaca
901 cccagggtggg tccctaaatc tgttcttaga ctagttgtac atagacatgg cagaagatag
961 attggtgaac ccaactcagat ttgaatgcta ttacatactg gtcataatag cttgaaagtt
1021 atttgactta tattattatt taagtactct caaacagtat ctatttaata tctga

```

Abbildung 3.20 Exon 18 und 19 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19138 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 17 (1-244), Exon 18 (245-377), Intron 18 (378-809), Exon 19 (810-905) und Intron 19 (906-1075).

Intron 19 und 20 werden gemeinsam in einer PCR mit Hilfe der des Primerpaares Entero 29 und Entero 22 gewonnen (Tabelle 2.4), wobei Intron 19 eine Länge von 3,1 kb aufweist und Intron 20 vollständig durchsequenziert ist und eine Länge von 252 bp aufweist (Abbildung

3.5, Tabelle 3.1). Es das zweitkleinste Intron des Proenteropeptidase-Gens. Intron 19 weist als Anfangsequenz **CCAGGTGGGT** (Abbildung 3.20), und als Schluss-Sequenz **TTACAGTCAA** (Abbildung 3.21) auf. Intron 20 startet mit der Anfangssequenz **AAATGTAAGT** (Abbildung 3.21) und endet mit der Schluss-Sequenz **TAATAGCTTG** (Abbildung 3.21).

```

1 gtaatagttt tattgcaaat attgcttttt attctcacia cactccaata aagtattatt
61 acccccattt tatggaagaa gaaactgggt ctcagggata ttgagtaact tccctgaagt
121 cacatagaaa tggtagaata aggatgcaaa ctcacctcta ttgacatta aactggggct
181 tcttcggctt acaattcagt ctccctacat ttcataatag agacattaag atgtccattt
241 tactaaagca aaagtaggat aacctatatg atgtttgact tgaaaaatatt aaatgcataa
301 ttttaaaaaa atgattgttc ttctattaca gtcaacagtg tttacaggat tccttgattc
361 ggttacagtg taaccataaa tgtaagtaa tatgttgtca tatcccactt caagcattct
421 gtttaaaatt ctgaatagag ttttatgtca cctgaagtta ttttgttacc actcaatttt
481 caccatcaga agaaatgcc aaaaatgaaat agatgctctt tctccaatta ttttaatatg
541 ttgtggaaaa aaactggcag ctcaagacat caccccaaag attgttggag gaagtaatgc
601 caaagaaggg gcctggccct gggtgtggg tctgtattat ggcgccgcac tgcctcgcgg
661 cgcatctctc gtcagcagtg actggctggt gtccgccgca cactgcgtgt atgggtgagt
721 gtgatgtcaa gtgtcccttc ccaaactagg tcaccacagc agacactgcc aagcatccca
781 tttcatgcag aatcacaaaa ccatcccacc agggaaatcc tgctgtttat gacattataa
841 acattccaaa tattttccca ttaatgtcat gtatgaaaat agagatacat tttaaaaaa

```

Abbildung 3.21 Exon 20 und 21 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19139 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 19 (1-331), Exon 20 (332-381), Intron 20 (382-539), Exon 21 (540-714) und Intron 21 (715-899).

Mit 5,5 kb liegt Intron 21 im oberen Feld der Enteropeptidase-Introns (Abbildung 3.4). Es wird erzeugt über die Primerkombination Entero 21 und Entero 61 (Tabelle 2.4). Es beginnt mit **ATGGGTGAGT** (Abbildung 3.21) und endet mit **TTTCAGGAGA** (Abbildung 3.22).

```

1 tgaaatgtga cctaaggcag aggttctcca acctagccat atattatata tagtagcaca
61 aatttggaga ttttaattta gaagtatttt ttaaattgtc tgggtggacta ttccagaccc
121 agtacattag aatcggggga ggaggggaag taggtgtcag cattatttta aagcacctca
181 cgagattgca atgtacaacc acagttgaga accacaatct agaactagag ctcagcatat
241 aacttaagag gagtgaacaa gagagattag cactaattag ggttttcttt atgttgtgat
301 cagaaaaata aagatttgag aatatattta aaggatgatt cttcagagaa attaaagaac
361 atttcaggat agaaacatat tctgaaatgt catgatgaag atcttctaga aaggaactgc
421 tttggatgga gagtgtctca tatttcttca ttacaatttt caggagaaac ttagagccat
481 ccaagtggac agcaatccta ggcctgcata tgaaatcaaa tctgacctct cctcaaacag
541 tcctctgatt aatagatgaa attgtcataa accctcatta caataggcga agaaaggaca
601 acgacattgc catgatgcat ctggaattta aagtgaatta cacaggtaaa aaaaaaaaaa
661 cactcttagt catcttatct gccaaaatta attcaaaact agatttcaaa tattatcaat
721 gtcaatgcat taattcataa aagctagata atttgttaca taaatcattg gaacttaaat
781 gggattaggg agtagagaga aatatattaa atttctttca tcaggatgtt taaattcaac
841 tttccagaaa gaaccagtag aataaaaactc nctgagccct gta

```

Abbildung 3.22 Exon 22 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19140 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 21 (1-463), Exon 22 (464-645) und Intron 22 (646-883).

Intron 22, das über die beiden Primer Entero 23 und Entero 65 amplifiziert wird, zeigt auf dem Agarose-Gel eine Größe von 2,1 kb (Tabelle 2.4, Abbildung 3.5). Die Anfangssequenz lautet **ACAGGTAAAA** (Abbildung 3.22), und das Ende stellt sich als **TTCCAGATTA** (Abbildung 3.23) dar.

```

1 gccgatctat tgcacaaaag tgctgctctg aaatgcctat tccccctaag accgatgtct
61 aaaattttta caggtagggt taaaaaaaaa aatacatggt ttttagatta actgttattg
121 atttttaaaa cttgtagtaa atgcttgtaa atctgttctt tctttttctt cgtttgctcg
181 ttttgctgtt tgcttgcttt tccagattac atacaaccta tttgtttacc ggaagaaaat
241 caagtttttc ctccaggaag aaattgttct attgctgggt gggggacggt tgtatatcaa
301 ggtaaattat cagactcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa

```

Abbildung 3.23 Exon 23 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19141 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 22 (1-205), Exon 23 (206-301) und Intron 23 (302-337).

Intron 23 wird über die Primerpaare Entero 52 und Entero 53 gewonnen (Tabelle 2.4). Es zeigt auf dem Agarose-Gel eine Größe von 3,8 kb (Abbildung 3.4). Für Intron 23 ergibt sich als Anfangssequenz **CAAGGTGTAA** (Abbildung 3.23), und als Schluss-Sequenz **GAGCAGGTAC** (Abbildung 3.24).

```

1 taatttccat gaatgaaaca ctttgtgttg gggagcgttt tcccccatga gcaatcctgt
61 aactgtttta aatcacagaa gatgcccaaa gaccatctag tctaataccat cgctcctact
121 agcccttcg taaaaagaa gagctttcct gttatccatt tggcacaaac cacagatggg
181 ctttattatg tgcttttagt tgcaagggtt agtatttagt tccattatat atacacagta
241 cttgataatg agagtgaat gttggaataa ataggactga ttgtagttca ttcaaggatg
301 catgttgatc acttctgact ggctggctgc attctccatt ttgagcaggt actactgcaa
361 acatattgca agaagctgat gtctctcttc tatcaaatga gagatgcaa cagcagatgc
421 cagaatataa cattactgaa aatatgatat gtgcaggcta tgaagaagga ggaatagatt
481 cttgtcaggt aaagatgtaa aactgctcac tgtacctttt cagaaagcac tgggtgttata
541 gttatttcat tgcttaacaa taattaggga gtaagaaat aagcttcttt catttctctt
601 ttacaaaact gttac

```

Abbildung 3.24 Exon 24 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19142 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 23 (1-348), Exon 24 (349-488) und Intron 24 (489-615).

Über das Primerpaar Entero 28 und Entero 34 wird Intron 24 als letztes Intron des Proenteropeptidase-Gens synthetisiert (Tabelle 2.4). Auf dem Agarose-Gel zeigt sich eine Größe von 5,1 kb (Abbildung 3.4). Intron 24 beginnt mit **TCAGGTAAAG** (Abbildung 3.24) und endet mit **CTTTAGGGG** (Abbildung 3.25).

1	tggagaaact	tttactaaaa	aggtgcactg	taaaaattat	aatgatgtc	ttagttgtta
61	tagtttctct	gtctccttac	tgaggttctc	attcctgact	tagagtgaac	gtgagaatat
121	atacagatga	cttgcaatta	aatcatattt	tttaattaat	ttttattttt	taatttattt
181	gatacaata	attttatatg	tttcgatcaa	ttgaccacat	atctacaatt	ttgttttgca
241	attcactctt	tagggggatt	caggaggacc	attaatgtgc	caagaaaaca	acagggtggt
301	ccttgctggt	gtgacctcat	ttggatacaa	gtgtgccctg	cctaactgcc	cgggagtgtg
361	tgccagggtc	tcaaggttta	ccgaatggat	acaaagtttt	ctacattagc	gcatttctta
421	aactaaacag	gaaagtcgca	ttattttccc	attctactct	agaaagcatg	gaaattaagt
481	gtttcgtaca	aaaattttta	aaagttacca	aagggtttta	ttcttaccta	tgtcaatgaa
541	atgctagggg	gccagggaaa	caaaatttta	aaaataataa	aattcaccat	agcaatacag
601	aataacttta	aaataccatt	aaatacattt	gtatttcatt	gtgaacaggt	atttcttcac
661	agatctcatt	tttaaaattc	ttaatgatta	tttttattac	ttactgttgt	ttaaagggat
721	gttattttaa	agcatatacc	atacacttaa	gaaatttgag	cagaatttaa	aaaagaaaga
781	aaataaattg	tttttcccaa	agtatgtcac	tgttggaat	aaactgccat	aaattttcta
841	gttccagttt	agtttgctgc	tattagcaga	aactcaattg	tttctctgtc	ttttctatca
901	aaattttcaa	catatgcata	acottagtat	tttcccaacc	aatagaaact	atttattgta
961	agcttatgtc	acaggcctgg	actaaattga	ttttacgttc	ctctt	

Abbildung 3.25 Exon 25 mit unmittelbar flankierender Intronsequenz. Abrufbar bei „GenBank“ unter der Accession No Y19143 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dargestellt ist Intron 24 (1-253) und Exon 25 (254-1005).

3.5 Die Genstruktur

Im Vergleich zu den meisten Prokaryonten besitzen Eukaryonten fast alle Introns in ihren Genen, die durch den Vorgang des Splicings im Zellkern entfernt werden müssen, damit es zur entsprechenden Proteinsynthese an den Ribosomen kommt. Mit Hilfe der beiden PAC-Klone kann das Proenteropeptidase-Gen in seiner kompletten Struktur dargestellt werden. Es besitzt 24 Introns und 25 Exons und hat eine Länge von über 88 kb. Mit einer Länge von nur 158 bp ist Intron 20 das kleinste des Proenteropeptidase-Gens und ist komplett durchsequenziert. Insgesamt konnten 5 Introns in Gänze durchsequenziert werden. Es handelt sich hierbei um Intron 2 (252 bp), Intron 9 (670 bp), Intron 11 (298 bp), Intron 18 (432 bp) und Intron 20 (158 bp). Intron 10 und 13 werden auf jeweils 9 kb gemessen und repräsentieren die größten Introns des Proenteropeptidase-Gens. Alle Exon-Intron-Übergänge entsprechen der GT/AG-Regel. Jedes Intron beginnt mit dem Basenpaar GT und endet mit AG. Mit einer Länge von gerade 36 bp ist Exon 5 das kleinste des Proenteropeptidase-Gens. Es wird von Intron 4 mit 4,4 kb und Intron 5 mit 7 kb eingerahmt. Exon 22 ist das längste und weist eine Größe von 182 bp auf. Es wird von Intron 21 mit 5,5 kb und Intron 22 mit 2,1 kb umschlossen. Aus jedem Intron wurde durchschnittlich ca. 200 bp exonflankierende Sequenz gewonnen, so dass die Voraussetzungen für eine vollständige Mutationsanalyse geschaffen sind. Insgesamt sind alle gewonnenen Introns und dazugehörigen Exons gemäß ihrer Reihenfolge und Größe in Abbildung 3.26 zusammengefasst:

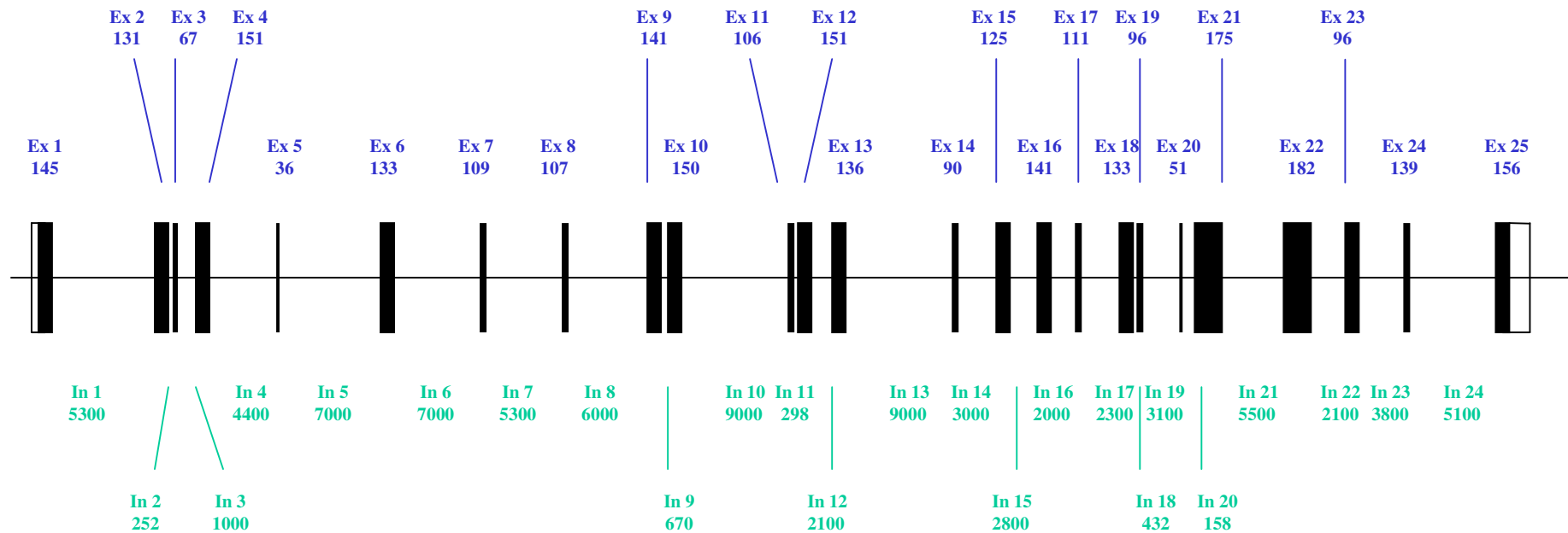


Abbildung 3.26 Die genomische Struktur des Proenteropeptidase-Gens. Diese Abbildung zeigt die Struktur des Proenteropeptidase-Gens. Die 25 Exons sind als schwarze Balken zu sehen. Unter der jeweiligen Exon-Nummer ist die Länge des Exons in Basenpaaren angegeben. Die 24 Introns sind zwischen den Exonbalken dargestellt. Ihre Größe in Basenpaaren ist ebenfalls unter der jeweiligen Intron-Nummer abzulesen.

3.6 Methode zur Mutationsanalyse

Um eine vollständige Mutationsanalyse eines Gens von genomischer DNA durchführen zu können, muss jedes einzelne seiner Exons amplifizierbar sein. Dies war erreicht, nachdem die Genstruktur des Proenteropeptidase-Gens vollständig bekannt war. Jetzt bot sich zum ersten Mal die Gelegenheit, jedes einzelne Exon des Proenteropeptidase-Gens zu synthetisieren. Dazu wurden auf allen exonflankierenden Intronsequenzen Primer abgeleitet (Tabelle 3.2). Es konnten von einer menschlichen DNA eines gesunden Spenders alle 25 Exons synthetisiert und sequenziert werden. Damit war eine Methode geschaffen, um bei Patienten mit angeborenem Enteropeptidasemangel Mutationsanalysen vornehmen zu können, wie sie in unserer Arbeitsgruppe ausgeführt wurde (Holzinger et al, 2002). In der folgenden Tabelle sind alle Primer aufgelistet, mit denen die Mutationsanalyse erfolgreich durchgeführt werden kann:

Nummer des Exons	Vorwärtsgerichtete Intronprimer	Rückwärtsgerichtete Intronprimer
Exon 1	CAGTTCCTTAAATTA GCAAGCC	CTGACACTAAAGTGTGTACATTC
Exon 2	CAGAGCTAACACATCAGGC	TCACAGTGAGAAAATGGTG
Exon 3	ACTCTAAGCAGAACATAAAGATTG	GCCACTTTGCTTAATCCTC
Exon 4	GAATTGAACACAAATCAGTGG	GTAAATGTGTCACCTCAGG
Exon 5	AATGACATACTTCTAAATGGACAC	TAGCCCTAAATATGTTGTTTACTG
Exon 6	TAAATATTCCCTATGGCAGTTGAAG	AGTGAGGGAGGATAAAACAGAAG
Exon 7	AATGTTTTGCAGCCAATTTGAATC	AAAGCAATAAGACGTTGCATCAG
Exon 8	GATATCATATTATGTGGTGTTTAC	AAAATCAAAGGGAAAACATACCAC
Exon 9	ATAGATCAACTGACAACTGATAG	TAAGTTCTAAGAAGAGAAAAGATGC
Exon 10	GAAGTATAAGCTGTATAAGGTTAG	GACTTTTGCATTTAATGCTGCTC
Exons 11-13	TCCTTCCTGCTTACAAAGTCTAC	GTGCCCAGCTAATTTGTGTTTG
Exon 14	AGCATTTACCCCTAACATGACTC	ATTTATAATCTACTTTGCTGCGTC
Exon 15	TGAAATTCTCAAGAGAGTGAAGC	CGTTTACAACCTTTACAATATTCAG
Exon 16	GAGATGTGGGGTACATTTT	ATTCTGTACACCTTTGCTG
Exon 17	GTAATCCAGAATCATCCATTG	TCTTCTTTGACACTGTAGAGTC
Exon 18	TATAGTCACAGTGCTGTGC	GTAATAAAAAGGTTTGCAAATCTC
Exon 19	CTCCATAGCATTAAAGGAAC	CAAATCTGAGTGGGTTCAAC
Exons 20 und 21	CATATATGAGACATTAAGATGTCG	AATGTATCTCTATTTTCATACATGAC
Exon 22	TTCTGAAATGTCATGATGAAGATC	GCTTTTATGAATTAATGC
Exon 23	CTAAAGGGCCACCAGTGGTAGC	CATTACAGGATATTATGACAG
Exon 24	AGTTCATTCAAGGATGCATGTTG	ATGAAATAACTATAACACCAGTGC
Exon 12 vorwärts	CTCTGAAAAGGACTTATTCTAATG	-
Exon 13 vorwärts	CAAGAAGAAATCAAGTCAGAG	-
Exon 21 vorwärts	GAGTTTTATGTCACCTGAAG	-

Tabelle 3.2 Intronprimer zur Amplifikation der gesamten kodierenden DNA des Proenteropeptidase-Gens. Abgebildet sind die Sequenzen der Intronprimer, mit denen alle Exons des Proenteropeptidase-Gens amplifiziert werden konnten (Holzinger et al, 2002).

4 Diskussion

4.1 Eigenen Daten

4.1.1 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Struktur des Proenteropeptidase-Gens zu entschlüsseln und eine Methode zu etablieren, die als Basis für zukünftige Mutationsanalysen dienen kann. Es gelang, alle Introns des Proenteropeptidase-Gens mittels PCR zu amplifizieren. Im Anschluss daran konnten in einem Test alle 25 Exons des Proenteropeptidase-Gens von genomischer DNA eines gesunden synthetisiert werden. So war es nun möglich, erstmals Mutationsanalysen an Leukozyten-DNA von Patienten mit angeborenem Enteropeptidasemangel durchzuführen. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass dem angeborenen Enteropeptidasemangel Defekte im Proenteropeptidase-Gen zugrunde liegen (Holzinger et al, 2002). In Zukunft können alle Patienten, bei denen die Diagnose Enteropeptidasemangel biochemisch gestellt wurde oder vermutet wird mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgelegten Methode auf Defekte im Proenteropeptidase-Gen untersucht werden. Dazu erforderlich ist einzig eine Blutprobe.

4.1.2 Promotorregion

Jedes Gen besitzt vor seinem ersten Exon eine Sequenzregion (Promotor), ohne die es nicht zu seiner Expression kommen würde. Die Region stromaufwärts von Exon 1 kann mittels Genome Walk[®] entschlüsselt werden. In zwei Ansätzen wird eine Sequenz von 1260 bp gewonnen. Diese Sequenz repräsentiert das Ende der zum Proenteropeptidase-Gen gehörenden Promotorregion. Wenn die Differenz der Transkript-Länge im Northern-Blot (4,4 kb) und der publizierten cDNA (3,7 kb) einzig auf Unvollständigkeit am 5'-Ende zurückzuführen ist, bedeutet dies, dass der Transkriptstart ca. 700 Basenpaare vom ATG (Translationssignal) entfernt liegen muss. Weiter in 5'-Richtung liegende Sequenzen (500 Basenpaare) entsprechen dann dem Promotor. Tatsächlich findet sich 697 Basenpaaren vom ATG entfernt eine sog. TATA-Box (ein Promotorelement zur Bindung von RNA-Polymerase), die typisch wäre für ein differentiell (in bestimmten Geweben) exprimiertes Gen wie das der Enteropeptidase. Eine genauere Untersuchung des Promotors war allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit. Sie müsste in polar differenzierten Enterozyten durch ein Reportergen wie z.B. Luziferase er-

folgen. Auch Mutationen am Promotor des Proenteropeptidase-Gens könnten zu einer Blockade der Proteinsynthese führen und zum Bild des angeboren Enteropeptidasemangels führen. Ebenso könnten weitere Fehler auf zellulärer Ebene zur Maldigestion führen, wie z.B. eine intrazelluläre Fehlsteuerungen der Proenteropeptidase, so dass das Enzym nicht in die apikale Membran eingebaut wird. Natürlich ist in diesem Zusammenhang auch an einen Defekt der Duodenase zu denken bzw. an Prozesse, die zu einer Funktionseinschränkung dieses Enzyms führen.

4.1.3 Die genomische Struktur

Das Chromosom 21, auf welchem auch das Proenteropeptidase-Gen liegt, besitzt eine Gesamtlänge von 33,65 Mb und ist Träger von insgesamt 225 Genen. Darunter befinden sich Gene für Ionenkanäle, Interferonrezeptoren und verschiedene Transkriptionsfaktoren sowie das APP-Gen, dessen Mutation verantwortlich ist für die frühe Form der Alzheimer-Krankheit. Das größte Gen auf Chromosom 21 (DSCAM) weist eine Länge von 840 kb auf. Generell liegt die Durchschnittsgröße für menschlicher Gene bei ca. 50 kb. Da durch Summation der erhaltenen Intron- und Exonlängen sich für das Proenteropeptidase-Gen insgesamt eine Länge von über 88 kb errechnet, gehört es im Vergleich zu anderen menschlichen Genen zu den größeren.

Mit PAC-Klon 4 können insgesamt die ersten 14 Introns flankierend dargestellt werden, mit PAC-Klon 3 die letzten 10 (Abbildung 3.1). Der kodierende Teil des Exon 1 des Proenteropeptidase-Gens zählt 145 bp. Daran schließt sich Intron 1 mit 5,3 kb an. Eine Sequenzlänge von 131 bp weist Exon 2 auf, dem Intron 2 mit 252 bp folgt und vollständig durchsequenziert ist. Es ist das zweitkleinste Intron des Proenteropeptidase-Gens. Im Anschluss daran folgen Exon 3 mit 67 bp und Intron 3 mit 1 kb. Das zu den größeren zählende Exon 4 ist 151 bp lang. Ihm schließt sich Intron 4 an. Dieses ist 4,4 kb lang. Darauf folgt Exon 5, das mit nur 35 bp das kleinste Exon des Proenteropeptidase-Gens ist. Exon 6, 133 bp lang, wird eingerahmt von Intron 5 und Intron 6, die beide eine Größe von 7 kb auf dem Agarose-Gel zeigen. Zwischen Exon 7 mit 109 bp und Exon 8 mit 109 bp befindet sich Intron 7, das eine Länge von 5,3 bp aufweist. Dem Exon 9 mit 141 bp geht Intron 8 voran, das 6 kb lang ist. Intron 9 kann vollständig durchsequenziert werden und hat eine Länge von exakt 670 bp. Mit 150 bp schließt sich das Exon 10 an, das zu den größeren des Proenteropeptidase-Gens gehört. Das folgende Intron 10 ist mit 9 kb das größte des

Proenteropeptidase-Gens. Ihm schließt sich Exon 11 mit 106 bp an. Exon 12 mit 151 bp geht das vollständig durchsequenzierte Intron 11 voran, das 298 bp Länge aufweist. Exon 13 mit 136 bp Länge wird eingerahmt von Intron 12 und Intron 13, die jeweils in Bezug zum Längenstandardmarker auf dem Agarose-Gel eine Größe von 2,1 kb und 9 kb zeigen. Eher zu den kleineren Exons zählt mit 90 bp Exon 14, gefolgt von Intron 14 mit 3 kb Länge. Exon 15 weist eine Länge von 125 bp auf. Intron 15 mit 2,8 kb und Intron 16 mit 2 kb rahmen das 141 bp lange Exon 16 ein. Exon 17 folgt mit einer Größe von 111 bp. Anschließend findet sich Intron 17 mit 2,3 kb. Dem vollständig durchsequenzierten Intron 18 mit 432 bp folgt Exon 19 mit 96 bp. Mit 3,1 kb schließt sich Intron 19 an, gefolgt vom zweitkleinsten Exon 20 des Proenteropeptidase-Gens mit nur 51 bp. Es folgt mit einer Sequenzlänge von genau 158 bp Intron 20, das kürzeste Intron des Proenteropeptidase-Gens ist. Exon 21 ist 175 bp lang und wird von Intron 21 mit 5,5 kb gefolgt. Das größte Exon des Proenteropeptidase-Gens ist Exon 22, das sich mit 182 bp Länge anschließt. Exon 23 mit 96 bp wird von den beiden Introns 22 und Intron 23 mit je 2,1 kb und 3,8 kb eingerahmt. Intron 24 mit 5,1 kb und Exon 25 mit 156 bp beschließen das Proenteropeptidase-Gen. Alle Exon-Intron-Übergänge entsprechen der GT/AG-Regel. Insgesamt sind alle exonflankierenden Intronsequenzen im Durchschnitt ca. 200 bp weit dargestellt.

4.1.4 Exonmodule

Nach Vorliegen der kompletten Genstruktur des Proenteropeptidase-Gens ist es möglich geworden, einzelnen Exons bestimmte Proteindomänen des Enteropeptidase-Enzyms zuzuordnen. Die kodierenden Teile eines Gens, die Exons, stellen gleichsam einzelne entwicklungsgeschichtliche Module dar. Ähnlich wie in der Elektrotechnik, wo gleiche Module als geschlossene Funktionseinheit in unterschiedlichen Geräten eingesetzt werden können, so werden in der Natur quer durch alle Spezies immer wieder ähnliche Exons in verschiedenen Genen verschiedener Lebewesen gefunden. In Bezug auf die Entwicklungsgeschichte lässt sich daher folgern, dass nicht jedes einzelne Gen singulär entstanden ist, sondern Gene sich durch Zusammenbau aus schon bestehenden Genen entwickelt haben. Das gilt auch für das Proenteropeptidase-Gen, wo einzelne Exonmodulähnlichkeiten (Homologien) zu anderen Genen bestehen. Der Arbeitsgruppe um J. E. Sadler gelang es erstmals, für das Enteropeptidase-Enzym verschiedene Proteindomänen zu beschreiben (Kitamoto et al, 1995). Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass diese Domänen präzise Exons oder Gruppen von Exons entsprechen. Die Enteropeptidase wird auf Grund der ihr eigenen

Serinproteasedomäne der Familie der Serinproteasen zugeordnet. Interessanterweise bestehen aber noch weitere Homologien innerhalb der Serinproteasefamilie, die sich nicht auf die Serinprotease-Einheit, sondern andere Elemente beziehen. Dies ist der Fall bei Enzym C1r, das in der Komplementkaskade mitwirkt. Darüber hinaus lassen sich Domänen definieren, die in Proteinen zu finden sind, die keine offensichtliche funktionelle Verwandtschaft zum Enteropeptidase-Enzym aufweisen.

Das Exon 1 kodiert für eine als universelle Signalerkennungssequenz zuordbare Domäne (Signal-anchoring). Exon 6 und Exon 17 determinieren duplizierte Proteindomänen, die im LDL-Rezeptor zu finden sind. Die Exonblöcke 7-9 und 14-16 bilden den Ausgangspunkt für eine 120 AS lange Proteinsequenz, die in der Komplement-Serinprotease C1r und auch in Tolloid, einem Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, zu finden ist. Die Exons 10-13 kodieren für eine Meprin-domäne. Meprin A und B sind Metalloproteasen in der Niere. Exons 18-20 bilden eine zysteinreiche Domäne, die im Scavenger-Rezeptor von Makrophagen vorkommt. In der folgenden Abbildung sind die Exons sowie ihre Proteindomänen in Beziehung zueinander dargestellt (Abbildung 4.1):

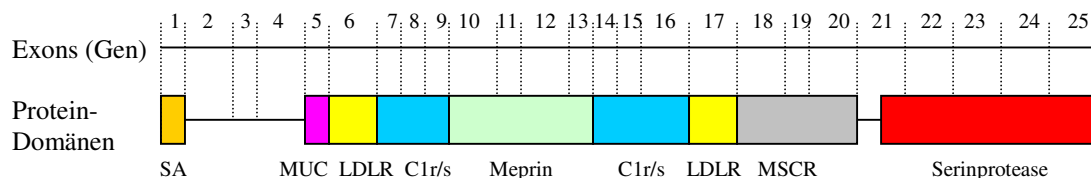


Abbildung 4.1 Exonmodule des Proenteropeptidase-Gens stehen in enger Beziehung zu Proteindomänen der Enteropeptidase. Die von der Arbeitsgruppe um J. E. Sadler veröffentlichten Proteindomänen des Enteropeptidase-Enzyms, definiert durch Sequenzvergleiche, können nach Kenntnis der mit einzelnen Exons oder einzelnen Exonblöcken präzise in Beziehung gebracht werden (Holzinger, 2002). SA = signal-anchor sequence; LDLR = LDL receptor-like domain; Muc = mucin-domain; Meprin = meprin-like domain; C1r/s = complement component C1r-like domain; MSCR = macrophage scavenger receptor-like domain.

4.1.5 Vorbereitung zur Mutationsanalyse

Seit der Erstbeschreibung des angeborenen Enteropeptidasemangels im Jahre 1969 durch Hans-Beat Hadorn und Kollegen waren zur Frage der molekularen Pathophysiologie dieser Erkrankung nur Spekulationen möglich. Das klinische Bild hingegen ist eindeutig beschrieben worden und durch intestinale Symptome wie Erbrechen und Diarrhoe, Fettstühle und Ge-deihstörung charakterisiert. Auf Grund der insuffizienten Proteinverdauung tritt eine ausge-

prägte Hypoproteinämie auf, und als Folge davon entwickeln sich periphere Ödeme. Ebenso prägt sich eine Anämie aus. Auch auf biochemischer Ebene konnte bisher ein Mangel an Enteropeptidase-Aktivität bei einzelnen Patienten nachgewiesen werden. Dazu wurde dem Patienten Darmsaft distal der Papilla vateri entnommen. Vor Zugabe isolierter Rinder-Enteropeptidase wurde keine Aktivität der Pankreasenzyme festgestellt. Danach war sie aber deutlich zu messen. Weiter konnte bisher in der Ursachenforschung nicht vorgestoßen werden. Seit Ende der 70er Jahre war es möglich, dass Mutationsanalysen von Krankheitsgenen vorgenommen werden konnten. Die erste Veröffentlichung zum menschlichen Proenteropeptidase-Gen erschien 1995 (cDNA-Sequenz). Prinzipiell können Mutationsanalysen des Proenteropeptidase-Gens auf zweierlei Weisen durchgeführt werden: entweder über eine Biopsie des Duodenums mit sehr aufwendiger experimenteller Aufbereitung der mRNA, oder über Genuntersuchungen aus Leukozyten-DNA, die über eine einfache Blutabnahme der betroffenen Patienten gewonnen wird. Der erste Weg ist für die Patienten mit größeren Unannehmlichkeiten verbunden und experimentell anfällig. Für den zweiten Weg wird die Genstruktur, d. h. die Abfolge aller Exons und Introns des Proenteropeptidase-Gens benötigt. In einem Test konnten alle 25 Exons des Proenteropeptidase-Gens amplifiziert werden. Damit war die Voraussetzung für routinemäßige Mutationsanalysen geschaffen.

4.1.5 Das Humangenomprojekt

Im Rahmen des Humangenomprojekts wurde Chromosom 21 als erstes menschliches Chromosom überhaupt vollständig durchsequenziert. Die Daten wurden Anfang 2001 der Öffentlichkeit vorgestellt. Da das Proenteropeptidase-Gen auf Chromosom 21 lokalisiert ist, konnte ein Sequenzvergleich vorgenommen werden. Tatsächlich wurden die in dieser Arbeit vorgestellten und in der Genbank niedergelegten Sequenzen bestätigt. Das Humangenomprojekt war sicherlich ein wichtiger Schritt in die richtige Richtung. Aber die zukünftigen Fragestellungen der Molekularbiologie werden sich vor allem mit der Genexpression beschäftigen: *wann* und *in welchen Mengen* wird ein bestimmtes Protein gebildet? Dazu würden dann epigenetische Fragestellungen gehören, in welcher Art die DNA im Zellkern verpackt ist und für die RNA-Polymerase zugänglich ist. Oder inwiefern die Translation eines Proteins durch micro RNA beeinflusst wird. All dies wird weiter zum Verständnis beitragen, wie die einzelnen Abläufe in einer Zelle organisiert sind.

4.2 Mutationsanalyse

Als Anwendung meiner Arbeit, der Aufklärung der Genstruktur des Proenteropeptidase-Gens, konnten in unserer Arbeitsgruppe bei zwei Patienten, die klinisch an angeborenem Enteropeptidasemangel leiden, jeweils Mutationen bzw. Deletionen im kodierenden Bereich des Proenteropeptidase-Gens festgestellt werden, die zur unvollständigen Synthese der Enteropeptidase führen.

Bei Patient 1 waren auf beiden Allelen Mutationen zu finden. Zum einem in Exon 8 (Position 821 in Bezug auf die cDNA-Sequenz), wo die Base C gegen T ausgetauscht ist. Dies hat zur Folge, dass sich der Informationsgehalt der alten Tripleteinheit verändert. Wird bei der herkömmlichen Basenkonstellation die Aminosäure Asparagin (Asn) kodiert, so ist bei der pathologischen Konstellation ein Stoppcodon entstanden. Deswegen wird bei diesem Patienten das Enteropeptidaseprotein nur bis Exon 8 gebildet. Da die Translation vor der aktiven Domäne abbricht, ist das Enzym funktionsunfähig. Auf dem anderen Allel liegt ein Defekt in Exon 23 vor. Die beiden Basen G und T an Position 2747 und 2748 in Bezug zur Wildtyp cDNA-Sequenz fehlen. Da Exon 23 die Serinprotease kodiert, geht dieser Basenverlust mit einem eindeutigen Funktionsverlust der Enteropeptidase einher (Abbildung 4.2).

Bei Patient 2 sind ebenfalls auf beiden Allelen Mutationen zu finden. Auf dem einen Allel liegt in Exon 18 eine Punktmutation vor (Position 2175 in Bezug zur cDNA-Sequenz). Die Base C wird gegen G ausgetauscht ist und es entsteht die Tripletsequenz von TGA. Dadurch verändert sich der Informationsgehalt der DNA dahingehend, dass nicht mehr die Aminosäure Serin kodiert wird, sondern der Befehl zum Proteinabbruch gegeben wird im Sinne eines Stoppcodons vor dem aktiven Zentrum der Serinproteasedomäne. Auf dem anderen Allel ist das Exon 22 betroffen, wo ebenfalls eine Punktmutation zu entdecken ist. Hier ist an Position 2609 in bezug auf die cDNA-Sequenz die Base C gegen T ausgetauscht. Dies hat eine Tripletveränderung dahingehend zur Folge, dass ein Stoppcodon entsteht. Damit liegt ebenfalls eine unvollständige Expression des Enteropeptidase-Enzyms vor, so dass die Verdauungsschwäche eindeutig dadurch determiniert ist (Abbildung 4.3).

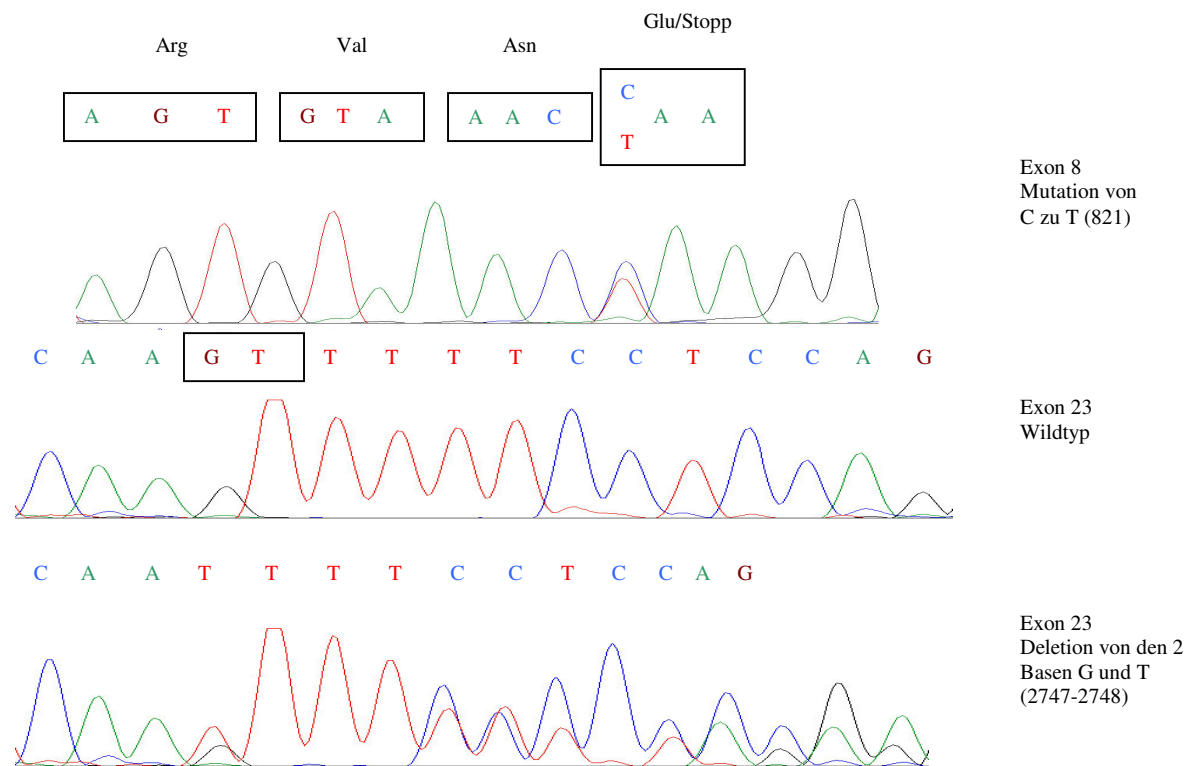


Abbildung 4.2 Mutationen im Proenteropeptidase-Gen bei Patient 1. Es können genetische Veränderungen auf beiden Allelen gefunden werden. Einmal in Exon 8 (Position 821 in bezug auf die cDNA-Sequenz), wo die Base C gegen T ausgetauscht ist. Diese Punktmutation bewirkt ein Stoppcodon. Auf dem anderen Allel sind die beiden Basen G und T in Exon 23 weggefallen (Positionen 2747 und 2748 in Bezug auf die cDNA-Sequenz).

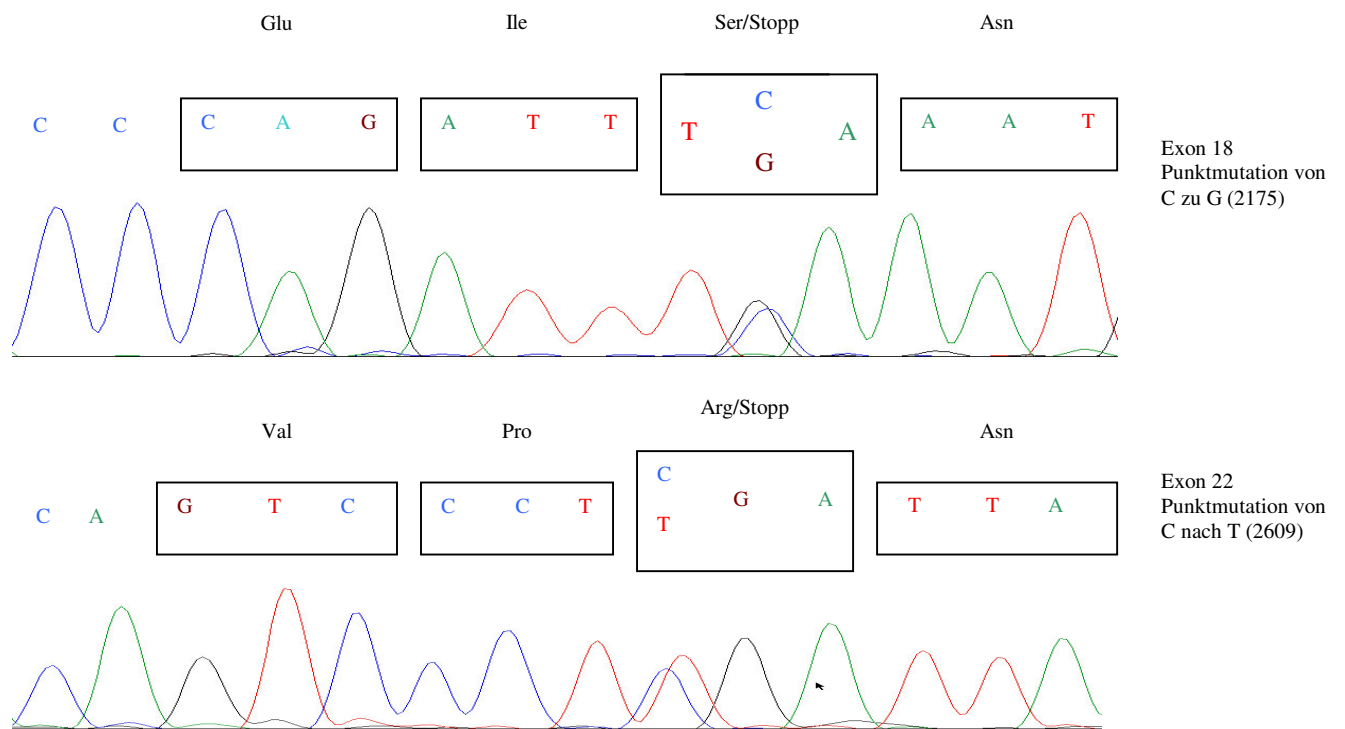


Abbildung 4.3 Mutationen im Proenteropeptidase-Gen bei Patient 2. In Exon 18 liegt eine Punktmutation von C zu G vor (Position 2175 auf der cDNA-Sequenz). Dies hat ein Stoppcodon zur Folge. In Exon 22 liegt gleichfalls eine Punktmutation von C zu T vor, was ebenfalls ein Stoppcodon erzeugt (Position 2609 auf der cDNA-Sequenz).

5 Zusammenfassung

Es war im Jahr 1969, als erstmals der angeborenen Enteropeptidasemangel bei Neugeborenen und Säuglingen als neues und eigenständiges Krankheitsbild entdeckt wurde, dessen klinische Symptomatik hauptsächlich durch eine ausgeprägte Hypoproteinämie charakterisiert ist und dessen Verlauf unbehandelt tödlich enden kann. Schon damals wurde vermutet, dass dieses Krankheitsbild ursächlich durch einen genetischen Defekt bedingt sei. Bislang allerdings war noch nicht die Voraussetzung geschaffen, um diesbezüglich routinemäßig genetische Untersuchungen durchführen zu können. Denn die wesentliche Voraussetzung dafür, nämlich die Struktur des Krankheits-Gens (Abfolge von Exons und Introns des Proenteropeptidase-Gens), war bisher nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die cDNA-Sequenz der Enteropeptidase mit sich überlappenden Oligonukleotid-Primerpaaren besetzt, die jeweiligen PCR-Produkte mit Didesoxyterminatoren sequenziert und mittels PC-Software Sequence-Navigator ausgewertet, so dass auf diese Weise die Struktur des Proenteropeptidase-Gens vollständig bestimmt werden konnte. Zusätzlich gelang es den zum Proenteropeptidase-Gen gehörenden Promotorbereich (inklusive möglicher TATA-Box) durch nested PCR mit Hilfe eines speziellen Kits (Genome walk[®]) 1,26 kb weit zu entschlüsseln. Insgesamt besteht das Proenteropeptidase-Gen aus 24 Introns und 25 Exons, die zusammen mehr als 88 kb umfassen. Die Größen der einzelnen Exons liegen im Bereich zwischen 36 bp und 182 bp, die der Introns zwischen 158 bp und 9000 bp. Für eine spätere Mutationsanalyse wurden alle exon-flankierenden Sequenzen durchschnittlich 200 bp weit dargestellt, so dass Intronprimer für die Amplifikation aller Exons abgeleitet werden konnten. In einem Testdurchgang ließ sich diese Methode anhand einer aus Leukozyten präparierten DNA etablieren. Als Fortsetzung dieser Arbeit war es nun meinen Kollegen möglich, Mutationen in Leukozyten-DNA zweier Patienten mit angeborenem Enteropeptidasemangel zu entdecken. Betroffen sind dabei jeweils beide Allele. In Zukunft können mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Methode alle verdächtigen Patienten auf einen angeborenen Enteropeptidasemangel genetisch untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Eggermont E, Molla A M, Tygat G, Rutgeerts L (1971) Distribution of enterokinase activity in the human intestine. *Acta Gastroenterol Belg* 34:655-662
- 2) Follet G F, Macdonald T H (1976) Intestinal enterokinase deficiency. *Acta Paediatr Scand* 65:653-655
- 3) Ghishan F K, Lee P C, Lebenthal E, Johnson P, Bradley C, Greene H (1983) Isolated congenital enterokinase deficiency. Recent findings and review of literature. *Gastroenterology* 85:727-731
- 4) Goddon R (1977) Revue critique. Le déficit congénital en entérokinase. *Pédiatrie* 32:297-301
- 5) Green J R, Bender S W, Posselt H G, Lentze M (1984) Primary intestinal enteropeptidase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 3:630-633
- 6) Hadorn H-B, Tarlow M, Lloyd J, Wolff O (1969) Intestinal Enterokinase Deficiency. *Lancet* 1: 812-813
- 7) Hadorn H-B (1998) Universitäre Pädiatrie im Wandel. Was wird morgen anders sein? Emeritierungsvorlesung vom 9. Juli 1998. Unveröffentlicht
- 8) Haworth J, Gourley B, Hadorn H-B, Sumida C (1971) Malabsorption and growth failure due to intestinal enterokinase deficiency. *J Pediatr* 78:481-490
- 9) Haworth J, Hadorn H-B, Gourley B, Prasad A, Troesch V (1975) Intestinal enterokinase deficiency. *Arch Dis Child* 50:277-282
- 10) Holzinger A, Maier E M, Bück C, Mayerhofer P U, Kappler M, Haworth J C, Moroz S P, Hadorn H-B, Sadler J E, Roscher A A (2002) Mutations in the proenteropeptidase gene are the molecular cause of congenital enteropeptidase-deficiency. *Am J Hum Genet* 70:20-25
- 11) 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* 6:84-89
- 12) Kitamoto Y, Veile R, Donis-Keller H, Sadler J E (1995) cDNA sequence and chromosomal localisation of human enterokinase, the proteolytic activator of trypsinogen. *Biochemistry* 34:4562-4568
- 13) Kitamoto Y, Yuan X, Wu Q, McCourt D, Sadler J E (1994) Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinct assortment of domains. *Proc. Natl. Acad. Sci* 91: 7588-7592

- 14) LaVallie E R, Rehemtulla A, Racie L A, DiBlasio E, Ferenz C, Grant K L, Light A, McCoy J M (1993) Cloning and functional expressing of cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J Biol Chem* 268:23311-23317
- 15) Lebenthal E, Antonowicz I, Schwachmann H (1976) Enterokinase and Trypsin activities in pancreatic insufficiency and disease of small intestine. *Gastroenterology* 70:508-512
- 16) Lentze M, Green J, Strechi E, Nüssle D, Hermier M (1982) Intestinal enteropeptidase deficiency associated with exocrine pancreatic insufficiency. *The Lancet* 1: 504
- 17) Lewin, B (1997) *Genes VI*. Oxford University Press
- 18) Mann, N S, Mann S K (1994) Enterokinase. *Proc Biol Med* 206:114-118
- 19) Marshall G, Mitchel J D, Tobias V, Messina I M (1989) Arrhythmogenic right ventricular dysplasia in a child with congenital enteropeptidase deficiency and hypogammaglobulinaemia. *Aust Paediatr J* 25:106-108
- 20) Pardou S, Cardranel S, Rodesch P, Eggermont E, Loeb H (1975) Déficience en entérokinase. *Pédiatrie* 30:544
- 21) Pawlow I P (1956) Die gegenwärtige Vereinigung der Hauptseiten der Medizin im Experiment; gezeigt am Beispiel der Verdauung. *Akademie-Verlag Berlin* II/2:432-450
- 22) Pawlow I P (1956) 24. Vorlesung: Die Galle als Aktivator des Steapsins – Die Bildung der Galle – Erreger des Gallenaustritts in den Verdauungskanal – Der Darmsaft und die Methodik seiner Gewinnung – Der Brunnersche Abschnitt des Zwölffingerdarms. *Akademie-Verlag Berlin* V:149-156
- 23) Pawlow I P (1956) 25. Vorlesung: Die Erreger der Darmsaftabsonderung – Die chemische Zusammensetzung des Darmsaftes – Die Erreger der Kinasereaktion. *Akademie-Verlag Berlin* V:157-162
- 24) Pawlow I P (1956) 26. Vorlesung: Die Absonderung des festen Anteils des Darmsaftes – Die Absonderung der Kinase – Die Innervation der Kinasereaktion. *Akademie-Verlag Berlin* V:162-167
- 25) Polonovski C, Laplane, R, Alison F, Navarro J (1970) Pseudo-Déficit en Trypsinogène par déficit congénital en Entérokinase. *Arch Fr Pédiatri* 27:677-688
- 26) Schepowalnikow N P (1900) Die Physiologie des Darmsaftes. Jahresbericht über die Fortschritte der Thier-Chemie oder der physiologischen und pathologischen Chemie 29:378-380
- 27) Sleisinger F, Fortran H (1998) *Gastrointestinal and Liver Disease*.
- 28) Tarlow M, Hadorn H-B, Arthurton M, Lloyd J (1970) Intestinal Enterokinase Deficiency. *Arch Dis Child* 45:651-655

- 29) Watson J D et al (1993) Rekombinierte DNA. Spektrum Akademischer Verlag.
- 30) Yuan X, Zheng X, Lu D, Rubin D, Pung C, Sadler J E (1998) Structure of murine enterokinase (enteropeptidase) and expression in small intestine during development. *Am J Physiol* 274:G342-G349
- 31) Zamolodchikova T, Sokolova E, Lu D, Sadler J E (2000) Activation of recombinant proenteropeptidase by duodenase. *FEBS Lett* 466: 295-299

```

1  ACCAGACAGT TCTTAAATTA GCAAGCCTTC AAAACCAAAA ATGGGGTCGA AAAGAGGCAT ATCTTCTAGG CATCATTCTC TCAGCTCCTA TGAAATCATG
101 TTTGCAGCTC TCTTTGCCAT ATTGGTAGTG CTCTGTGCTG GATTAATTGC AGTATCCTGC CTGACAATCA AGGAATCCCA ACGAGGTGCA GCACTTGGAC
201 AGAGTCATGA AGCCAGAGCG ACATTTAAAA TAACATCCGG AGTTACATAT AATCCTAATT TGCAAGACAA ACTCTCAGTG GATTTCAAAG TTCTTGCTTT
301 TGACCTTCAG CAAATGATAG ATGAGATCTT TCTATCAAGC AATCTGAAGA ATGAATATAA GAACTCAAGA GTTTTACAAT TTGAAAATGG CAGCATTATA
401 GTCGTATTTG ACCTTTTCTT TGCCCAGTGG GTGTCAGATC AAAATGTAAA AGAAGAAGT ATTCAAGGCC TTGAAGCAAA TAAATCCAGC CAACTGGTCA
501 CTTTCCATAT TGATTTGAAC AGCGTTGATA TCCTAGACAA GCTAACAACC ACCAGTCATC TGGCAACTCC AGGAAATGTC TCAATAGAGT GCCTGCCTGG
601 TTCAAGTCCT TGTACTGATG CTCTAACGTG TATAAAAGCT GATTTATTTT GTGATGGAGA AGTAAACTGT CCAGATGGTT CTGACGAAGA CAATAAAATG
701 TGTGCCACAG TTTGTGATGG AAGATTTTTG TTAAGTGGAT CATCTGGGTC TTTCCAGGCT ACTCATTATC CAAAACCTTC TGAAACAAGT GTTGTCTGCC
801 AGTGGATCAT ACGTGTA AAC CAAGGACTTT CCATTAACT GAGCTTCGAT GATTTTAATA CATATTATAC AGATATATTA GATATTTATG AAGGTGTAGG
901 ATCAAGCAAG ATTTTAAGAG CTTCTATTTG GGAACTAAT CCTGGCACA TAAGAATTTT TTCCAACCA GTTACTGCCA CCTTTCTTAT AGAATCTGAT
1001 GAAAGTGATT ATGTTGGCTT TAATGCAACA TATACTGCAT TTAACAGCAG TGAGCTTAAT AATTATGAGA AAATTAATTG TAACTTTGAG GATGGCTTTT
1101 GTTTCTGGGT CCAGGATCTA AATGATGATA ATGAATGGGA AAGGATTCTG GGAAGCACCT TTTCTCCTTT TACTGGACCC AATTTTGACC ACACTTTGG
1201 CAATGCTTCA GGATTTTACA TTTCTACCCC AACTGGACCA GGAGGGAGAC AAGAACGAGT GGGGCTTTTA AGCCTCCCTT TGGACCCAC TTTGGAGCCA
1301 CATTGCCTTA GTTTCTGGTA TCATATGTAT GGTGAAAATG TCCATAAAT AAGCATTAA ATCAGCAATG ACCAAAATAT GGAGAAGACA GTTTTCCAAA
1401 AGGAAGGAAA TTATGGAGAC AATTGGAATT ATGGACAAGT AACCTTAAAT GAAACAGTTA AATTTAAGGT TGCTTTTAAT GCTTTTAAAA ACAAGATCCT
1501 GAGTGATATT GCGTTGGATG ACATTAGCCT AACATATGGG ATTTGCAATG GGAGTCTTTA TCCAGAACCA ACTTTGGTGC CAACTCCTCC ACCAGAACTT
1601 CCTACGGACT GTGGAGGACC TTTTGAGCTG TGGGAGCCAA ATACAACATT CAGTTCTACG AACTTTCCAA ACAGCTACCC TAATCTGGCT TTCTGTGTTT
1701 GGATTTTAAA TGCACAAAAA GGAAAGAATA TACAACCTCA TTTTCAAGAA TTTGACTTAG AAAATATTAA CGATGTAGTT GAAATAAGAG ATGGTGAAGA
1801 AGCTGATTCC TTGCTCTTAG CTGTGTACAC AGGGCCTGGC CCAGTAAAGG ATGTGTTCTC TACCACCAAC AGAATGACTG TGCTTCTCAT CACTAACGAT
1901 GTGTTGGCAA GAGGAGGGTT TAAAGCAAAC TTTACTACTG GCTATCACTT GGGGATTCCA GAGCCATGCA AGGCAGACCA TTTTCAATGT AAAAATGGAG
2001 AGTGTGTTCC ACTGGTGAAT CTCTGTGACG GTCATCTGCA CTGTGAGGAT GGCTCAGATG AAGCAGATTG TGTGCGTTTT TTCAATGGCA CAACGAACAA
2101 CAATGGTTTA GTGCGGTTCA GAATCCAGAG CATATGGCAT ACAGCTTGTTG CTGAGAACTG GACCACCCAG ATTTCAAATG ATGTTTGTC ACTGCTGGGA
2201 CTAGGGAGTG GAAACTCATC AAAGCCAATC TTCTCTACCG ATGGTGGACC ATTTGTCAAA TTAAACACAG CACCTGATGG CCACTTAATA CTAACACCCA
2301 GTCAACAGTG TTTACAGGAT TCCTTGATTG GGTTACAGTG TAACCATAAA TCTTGTGGAA AAAAAGTGGC AGCTCAAGAC ATCACCCTAA AGATTGTTGG
2401 AGGAAGTAAT GCCAAAGAAG GGGCCTGGCC CTGGGTTGTG GGTCTGTATT ATGGCGGCCG ACTGCTCTGC GGCATCTC TCCTCAGCAG TGAAGTGGCTG
2501 GTGTCCGCCG CACACTGCGT GTATGGGAGA AACTTAGAGC CATCCAAGTG GACAGCAATC CTAGGCCTGC ATATGAAATC AAATCTGACC TCTCCTCAAA
2601 CAGTCCCTCG ATTAATAGAT GAAATTGTCA TAAACCTCA TTACAATAGG CGAAGAAAGG ACAACGACAT TGCCATGATG CATCTGGAAT TTAAAGTGAA
2701 TTACACAGAT TACATACAAC CTATTTGTTT ACCGGAAGAA AATCAAGTTT TTCCTCCAGG AAGAAATTGT TCTATTGCTG GTTGGGGGAC GGTGTATAT
2801 CAAGGTACTA CTGCAAACAT ATTGCAAGAA GCTGATGTTT CTCTTCTATC AAATGAGAGA TGCCAACAGC AGATGCCAGA ATATAACATT ACTGAAAATA
2901 TGATATGTGC AGGCTATGAA GAAGGAGGAA TAGATTCTTG TCAGGGGGAT TCAGGAGGAC CATTAATGTG CCAAGAAAAC AACAGGTGGT TCCTTGCTGG
3001 TGTGACCTCA TTTGGATACA AGTGTGCCCT GCCTAATCGC CCCGGAGTGT ATGCCAGGGT CTCAAGGTTT ACCGAATGGA TACAAAGTTT TCTACATTAG
3101 CGCATTCTT AAATAACA GGAAAGTCGC ATTATTTTCC CATTCTACTC TAGAAAGCAT GGAAATTAAG TGTTTCGTAC AAAAATTTTA AAAAGTTACC
3201 AAAGGTTTTT ATTCTTACCT ATGTCAATGA AATGCTAGGG GGCCAGGGAA AAAAAATTTT AAAAATAATA AAATTCACCA TAGCAATACA GAATAACTTT
3301 AAAATACCAT TAAATACATT TGTATTTTCA TGTGAACAGG TATTTCTTCA CAGATCTCAT TTTTAAATTT CTTAATGATT ATTTTATTA CTTACTGTTG
3401 TTTAAAGGGA TGTTATTTTA AAGCATATAC CATACACTTA AGAAATTTGA GCAGAATTTA AAAAAGAAAG AAAAATAAAT GTTTTCCCA AAGTATGTCA
3501 CTGTTGGAAA TAAACTGCCA TAAATTTTCT AGTTCCAGTT TAGTTTGCTG CTATTAGCAG AAACCTCAAT GTTTCTCTGT CTTTCTATC AAAATTTTCA
3601 ACATATGCAT AACCTTAGTA TTTTCCCAAC CAATAGAAAC TATTTATTGT AAGCTTATGT CACAGGCCTG GACTAAATTG ATTTTACGTT CCTCTT

```

Abbildung 7.1 cDNA-Sequenz des Proenteropeptidase-Gens. Die vorliegende cDNA-Sequenz des Proenteropeptidase-Gens wurde 1995 von der Arbeitsgruppe um J. E. Sadler publiziert (Kitamoto et al, 1995). Der ATG-Translationsstart (41) und das Stoppcodon TAG (3098) sind hervorgehoben.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Einbuchstabencode für Adenosin
Arg	Dreibuchstabencode für Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Dreibuchstabencode für Asparagin
Bp	Basenpaare
C	Einbuchstabencode für Cytosin
C-terminal	Carboxyterminal
cDNA	copy bzw. komplementäre DNA
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSCAM	Down-Syndrome cell adhesion molecule
G	Einbuchstabencode für Guanin
Glu	Dreibuchstabencode für Glutamin
Ile	Dreibuchstabencode für Isoleucin
kb	Kilobasen
mRNA	Boten-RNA
Mb	Megabasen
N-terminal	Aminoterminal
PAC	P1 artificial chromosome
PCR	Polymerase chain reaction
Pro	Dreibuchstabencode für Prolin
Pwo	Akronym für <i>Pyrococcus woesei</i>
Ser	Dreibuchstabencode für Serin
T	Einbuchstabencode für Thymin
Val	Dreibuchstabencode für Valin
W	Watt

9 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. med. Andreas Holzinger für sein großes Engagement, seine Betreuung und seine stets hilfreiche Beratung danken. Er weckte bei mir das Interesse für die Genetik und führte mich an die molekularbiologischen Techniken heran. Ebenso möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Stefan Kammerer danken, der mich stets mit seinem experimentellen Wissen und Können unterstützte. Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. Peter Mayerhofer für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Herrn Prof. Dr. med. Adelbert A. Roscher danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit. Weiter gilt mein Dank Frau Prof. Dr. med. Ania Muntau-Heger sowie meinen Kollegen Frau Dr. med. Esther Maier, Herrn Dr. med. Nils Krone und Herrn Dr. med. Pablo Landgraf für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Darüber hinaus danke ich auch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Beat Hadorn, dem Entdecker des angeborenen Enteropeptidasemangels, für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Klinik weiterzuführen. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans Förstl, Herrn Ltd. OA Dr. med. Werner Kissling sowie Herrn Prof. Dr. med. Alexander Kurz, dass ich unter ihnen an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der TU München die Möglichkeit habe, dort zu arbeiten und zu lernen. Zuletzt gilt meine Dankbarkeit meiner Familie, im Besonderen meinen Eltern sowie Frau Dr. med. Ingrid Maria Fackler.

10 Publikationen

- 1) Holzinger A, Maier E M, **Bück C**, Mayerhofer P U, Kappler M, Haworth J C, Moroz S P, Hadorn H-B, Sadler J E, Roscher A A (2002) Mutations in the proenteropeptidase gene are the molecular cause of congenital enteropeptidase deficiency. *Am J Hum Genet* 70:20-25
- 2) Holzinger A, Maier E M, **Bück C**, Mayerhofer P U, Haworth J C, Moroz S, Sadler J E, Roscher A A, Hadorn H-B (2000) Mutations in the Proenteropeptidase Gene are the Primary Cause of Congenital Enteropeptidase Deficiency. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Abstr. 498; Vol. 31; Supplement 2
- 3) Holzinger A, Maier E M, **Bück C**, Mayerhofer P U, Haworth J C, Moroz S, Sadler J E, Roscher A A, Hadorn H-B (2001) Mutations in the Proenteropeptidase Gene are the Primary Cause of Congenital Enteropeptidase Deficiency (Abstract). *Eur. J. Pediatr.* 160:3; p R24
- 4) Holzinger A, Maier E M, **Bück C**, Mayerhofer P U, Haworth J C, Moroz S, Sadler J E, Roscher A A, Hadorn H-B (2000) Erstmalige Identifizierung von Mutationen im Enteropetidase-Gen bei angeborenem Enteropeptidasemangel (Vortrag). Jahrestagung der Süddeutschen Gesellschaft Für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in München
- 5) Holzinger A, Maier E M, **Bück C**, Mayerhofer P U, Haworth J C, Moroz S, Sadler J E, Roscher A A, Hadorn H-B (2000) Mutations in the Proenteropeptidase Gene are the Primary Cause of Congenital Enteropeptidase Deficiency (Abstract). 1st World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition in Boston
- 6) Holzinger A, **Bück C**, Maier E M, Mayerhofer P U, Roscher A A, Sadler J E, Hadorn H-B (1999) Genbankeintrag vom 23. Juni 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accession Nos Y19124- Y19143.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Cornelius Alexander Bück
Geburtsdatum: 28.09.1972
Geburtsort: Esslingen
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch

Ausbildung

1979-1983	Grundschule Winkelwiese in Tübingen
1983-1992	Geschwister-Scholl-Gymnasium in Tübingen
1992-1993	Zivildienst in Freiburg/Breisgau, Krankenpflege
1993	Studium der Physik in Tübingen
1995	Studium der Humanmedizin an der LMU München
1997	Physikum
1997	Beginn mit der Doktorarbeit am Dr. von Haunerschen Kinderspital
1998	1. Staatsexamen
1999	Studium am AKH Wien
1999	Genbankeintrag im Rahmen des Humangenomprojekts
2001	2. Staatsexamen
2002	Praktisches Jahr zu 1/3 in São Paulo, 2/3 in München
2003	3. Staatsexamen
2003	Beginn als „Arzt im Praktikum“ in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie rechts der Isar der Technischen Universität München
2004	Approbation als Arzt und seitdem Assistenzarzt in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der TU München