

Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Isolierung und Charakterisierung des porcinen c-Fos
Protoonkogens im Hinblick auf Fleischfülle und
Merkmalantagonismus beim Schwein**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Jacqueline Heinricy
Gießen 2000

Aus dem Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. V. Dzapo

**Isolierung und Charakterisierung des porcinen c-Fos Protoonkogens im
Hinblick auf Fleischfülle und Merkmalantagonismus beim Schwein**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Jacqueline Heinrich
Tierärztin aus Luxemburg

Gießen 2000

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Dzapo
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Herzog

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2000

Fir meng Mamm

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Zellphysiologische Grundlagen	3
2.1.1 Muskelhypertrophie und Stressanfälligkeit beim Schwein	3
2.1.2 Muskelhypertrophie, Kalzium und Protoonkogene	5
2.1.2.1 Myogenese und Muskelwachstum	6
2.1.2.2 Muskelwachstum und Protoonkogene	7
2.2 Das c-fos Protoonkogen	12
2.2.1 Protoonkogene	12
2.2.2 c-fos	14
2.2.2.1 Das Gen	14
2.2.2.2 Regulation der Genexpression	16
Transkription	16
2.2.3 Das c-fos Protein	19
2.2.3.1 Struktureller und funktioneller Aufbau	19
2.2.3.1.1 Das bZIP-Motiv	20
2.2.3.1.2 Transaktivierungs- und Transrepressionsdomäne des Fos Proteins	22
2.2.3.2 Regulation der Aktivität des Proteins	23
3. MATERIAL UND METHODIK	25
3.1 Übersicht zur Versuchsanlage	25
3.2 Material	26
3.3 Methodik	27
3.3.1 Isolation von DNA aus Vollblut	27

3.3.1.1	Isolation von DNA aus Vollblut durch Aussalzen	27
3.3.1.2	Isolation von DNA aus Vollblut durch Phenol/Chloroform-Extraktion	28
3.3.2	Polymerasekettenreaktion.....	28
3.3.2.1	DNA	29
3.3.2.2	Primer	29
3.3.2.3	Polymerasen, Ionenmilieu und Nukleotide	30
3.3.2.4	Reaktion	30
3.3.2.5	Ergebniskontrolle	31
3.3.3	Isolation eines Genes aus einer genomischen Genbank vom Schwein	31
3.3.3.1	Herstellung einer spezifischen Sonde zum Screenen der Genbank	31
3.3.3.1.1	Amplifikation eines geeigneten Sequenzabschnittes des gesuchten Genes ...	31
3.3.3.1.2	Radioaktive Markierung des Amplifikats mittels der Oligo-Labeling-Methode	31
3.3.3.2	Screenen der Genbank.....	32
3.3.3.2.1	Vorbereitungen: Titrieren der Phagen, Bestimmung des Dichtewachstums..	32
3.3.3.2.2	Ausplattieren der Genbank; Übertragen des Phagenmaterials auf Nitrozellulosefilter.....	33
3.3.3.2.3	Plaque-Lift- Hybridisierung	34
3.3.3.2.4	Eingrenzen der positiven Plaques.....	35
3.3.3.2.5	Anlegen eines High-Titer-Stocks	36
3.3.3.2.6	Ergebniskontrolle.....	37
3.3.3.2.7	Isolierung des Genmaterials aus dem High-Titer Stock.....	37
3.3.4	Restriktionsverdau	38
3.3.5	Southern-Blot-Hybridisierung	38
3.2.5.1	Southern-Transfer.....	38
3.2.5.2	Markierung der Sonde	39
3.2.5.3	Vorhybridisierung, Hybridisierung, Exprimieren	39
3.3.6	Präparation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	40
3.3.6.1	Aufreinigung über präparative Gele.....	40

3.3.6.2	Aufreinigung aus flüssigen Ansätzen.....	40
3.3.7	Erstellen von Plasmidklonen	41
3.3.7.1	Ligation	41
3.3.7.2	Transformation	41
3.3.8	Präparation der Plasmid-DNA.....	42
3.3.8.1	Minipräparation.....	42
3.3.8.2	Plasmidmaxipräparation.....	43
3.3.9	Sequenzierung	43
3.3.10	Physikalische Kartierung.....	44
4.	ERGEBNISSE	46
4.1	Isolierung und Charakterisierung von c-fos.....	46
4.1.1	Isolierung von c-fos aus einer genomischen Genbank vom Schwein	46
4.1.1.1	Amplifikation eines spezifischen Genabschnittes des c-fos Genes	46
4.1.1.2	Isolierung des c-fos Genes aus der genomischen Genbank vom Schwein	47
4.1.2	Kartierung von c-fos	47
4.1.2.1	Kartierung des gesamten Klons.....	47
4.1.2.2	Erstellen von Sekundärklonen.....	48
4.1.2.3	Kartierung von c-fos.....	48
4.1.3	Komplette Nukleotidsequenz des porcinen c-fos Protoonkogens	49
4.1.3.1	Übersicht	49
4.1.3.2	Nukleotidsequenz	52
4.1.3.2.1	Das 5' Ende	56
4.1.3.2.2	Sekundärstrukturen.....	57
4.1.3.3	Homologievergleich mit dem Menschen	59
4.1.4	Das c-Fos Protein.....	60
4.1.4.1	Die Aminosäuresequenz von c-Fos.....	60
4.1.4.2	Räumliche Anordnung	62

4.1.4.3 Vergleich zu anderen Spezies	64
4.2 Chromosomale Lokalisation von c-fos	67
4.3 Sequenzunterschiede des c-fos Genes bei Schweinen unterschiedlicher Rasse und Konstitution.....	68
4.3.1 Sequenzinformationen bei Pietrain und Meishan	68
4.3.2 Homologievergleiche zwischen Pietrain (P) und Meishan (M)	70
4.3.2.1 Nukleotidsequenz	70
4.3.2.2 Aminosäuresequenz	72
4.3.3 Weitergehende Analyse der gefundenen Mutationen.....	74
4.3.3.1 Etablierung von PCR/Restriktionssystemen zur RFLP-Analyse	74
4.3.3.1.1 Kartierung der entsprechenden Sequenzabschnitte	75
4.3.3.1.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen.....	76
5 DISKUSSION	79
6 ZUSAMMENFASSUNG	87
7 SUMMARY	89
8. LITERATURVERZEICHNIS	91

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab.1:	Virale und zelluläre Onkogene und ihre Produkte	13
Tab.2:	Übersicht über die Herkunft der untersuchten Tiere	26
Tab.3:	Übersicht über die eingesetzten Primer zur Sequenzanalyse	51
Tab.4:	Regulatorische Elemente im SRE-Bereich des c-fos Genes	56
Tab.5:	Prozentualer Anteil der einzelnen Basen an der c-DNA von c-fos	60
Tab.6:	Anzahl der benutzten Kodons für die Translation von c-Fos	62
Tab.7:	Übereinstimmung und Differenz der Aminosäurezusammensetzung von Fos bei Schwein, Mensch, Maus und Huhn	64
Tab.8:	Häufigkeit der Austausche zwischen den einzelnen Aminosäuren	66
Tab.9:	Eckdaten des c-Fos Proteins von Schwein, Mensch, Maus und Huhn	67
Tab.10:	Wahrscheinlichkeiten und Korrelationen zur Lokalisation der chromosomalen Region vom c-fos Gen des Schweines	67
Tab.11:	Primerkombinationen zur Amplifikation verschiedener Bereiche des c-fos Protoonkogens aus genomischer DNA unterschiedlicher Schweinerassen	68
Tab.12:	Primersequenzen, Tm (Schmelzpunkt) und Annealingtemperatur	69
Tab.13:	Lokalisation und Ausprägung der Basenaustausche des c-fos Genes bei Pietrain (P) und Meishan (M) im Vergleich zur Genbank (G)	71
Tab.14:	Verschiedene Parameter des c-fos Proteins bei unterschiedlichen Rassen	74
Tab.15:	Synthese zwischen Chromosom 7 des Schweines und den entsprechenden Chromosomen beim Menschen	82

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb.1:	Zellphysiologische und molekularbiologische Zusammenhänge der c-fos-Beteiligung an der Entstehung von Muskelzellhypertrophie	11
Abb.2:	Schema von v-fos und c-fos	14
Abb.3:	Grundstruktur von c-fos	15
Abb.4:	Funktionelle Domäne von Fos	19
Abb.5:	Sekundärstruktur des Fos-Proteins	21
Abb.6:	Aufbau von AP 1	22
Abb.7:	Übersicht der Versuchsdurchführung	25
Abb.8:	PCR-Bedingungen	30
Abb.9:	Restsriktionskarte des isolierten Inserts	47
Abb.10	Lokalisation der markierten Bereiche im Insert	48
Abb.11	Restriktionskarte des porcinen c-fos Protoonkogens	49
Abb.12	Klonierungsstrategie für c-fos aus einem 11Kbp Lamda-FixII Fragment	49
Abb.13:	Nukleotidsequenz des porcinen c-fos protoonkogens	54
Abb.14:	Schema des porcinen c-fos Protoonkogens mit Exon- und Intronbereichen	54
Abb.15:	Serum Response Element von Schwein, Mensch und Maus	56
Abb.16:	Calcium Response Element von Schwein, Maus und Mensch	57
Abb.17:	Hairpin-Loops im Bereich Intron 1, 2 und Exon 4	58
Abb.18:	Homologie zwischen Schwein und Mensch	59
Abb.19:	Aminosäuresequenz vom porcinen und humanen c-Fos	61
Abb.20:	Räumliche Anordnung des Fos-Proteins	63
Abb.21:	Lokalisation der einzelnen Aminosäureaustausche bei Mensch (2.Zeile), Maus (3.Zeile) und Huhn (4.Zeile) im Vergleich zum Schwein(1.Zeile)	65
Abb.22:	PCR-Bedingungen für die Amplifikation definierter Sequenzabschnitte bei Pietrain und Meishan	69
Abb.23	Überblick über die Lokalisation der zur Sequenzierung gelangten Amplifikate	70
Abb.24:	Proteinsequenz von c-fos der Rassen Pietrain und Meishan im Vergleich zur aus der Genbank abgeleiteten Sequenz	73
Abb.25:	Restriktionsschnittstellen von AluI und TaqI in Poly 9 bei Pietrain und Meishan	75
Abb.26:	Restriktionsschnittstellen von TaiI bei Pietrain und Meishan	76
Abb.27:	Darstellung der gefundenen RFLP's	77

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

3'	3-prime (zur OH-Gruppe hin, strangabwärts)
5'	5-prime (zur Phosphatgruppe hin, strangaufwärts)
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
c-fos	c-fos Gen
c-Fos	c-Fos Protein
CRE	cAMP-response-element
DSE	dyad-symmetry-element
EGF	epidermal growth factor
FIRE	fos intragenic response element
kbp	1000 Basenpaare
LTR	long terminal repeat
M	Meishan
MHS	Malignes Hyperthermie-Syndrom
NGF	nerve growth factor
P	Pietrain
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	plateled derived growth factor
QTL	quantitative trait loci
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SRE	serum-response-element
SRF	serum-response-factor
UTR	untranslated region

1 Einleitung

Die Entwicklung der Schweinezucht in den letzten vierzig Jahren war vor allem durch ein Hauptziel gekennzeichnet, die Selektion auf Fleischfülle. Tierproduzenten wie auch Verbraucher wünschten Tiere mit guter Fleischleistung und niedrigem Fettgehalt.

Durch die gezielte Einkreuzung fleischbetonter Rassen wie vor allem Pietrain konnten große Fortschritte hinsichtlich der Muskelmasse erzielt, und die Fleischproduktion an den Markt angepasst werden. Der Wandel vom früheren fettreichen Mehrzweckschwein zum relativ mageren Fleischschwein erfolgte rasch. Das moderne Mastschwein liefert einen Schlachtkörper mit hohem Schinkenanteil und ausgeprägter Rückenmuskel- und Kotelettfläche sowie einem sehr geringen Fettanteil.

Die Nachteile dieser Entwicklung wurden nach und nach offensichtlich und äußern sich einerseits in einer Verschlechterung der Konstitution, was sich durch erhöhte Stressanfälligkeit und verminderte Fruchtbarkeit manifestiert, andererseits in einer Verminderung der Fleischbeschaffenheit, gekennzeichnet durch Myopathien. Das Porcine Stress Syndrom ist ein etablierter Begriff, man versteht darunter Auswirkungen einer erhöhten Stressanfälligkeit eines Teils der Fleischschweinepopulation, verbunden mit Problemen auf dem Gebiet der Fleischqualität (SMIDT et al., 1988). In den Zuchtpopulationen moderner Fleischschweine dominieren drei Antagonismen, die alle als Folge der dramatischen Zuchtfortschritte in Fleischanteil und Bemuskelung anzusehen sind: zum ersten die hohe Stressanfälligkeit und schlechte Fleischbeschaffenheit, dann sinkende Aufzuchtleistungen und schließlich vermehrte Beinschwächeprobleme (GLODEK, 1988).

Das Ziel der modernen Schweinezucht ist eine Verbesserung der Konstitution und der Fleischbeschaffenheit bei gleichzeitiger Erhaltung der Fleischfülle. Dieses kann nur durch eine Aufklärung der genetischen Zusammenhänge erreicht werden. Wie in anderen Bereichen der Tierzucht ist hier vor allem auch die Molekularbiologie gefordert.

Mit der Darstellung des Halothangens (BRENIG und BREHM, 1992) konnte ein Teil des Porcinen Stress Syndromes molekulargenetisch aufgeklärt, und ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Muskelstoffwechselentgleisung und Kalziumregulation festgestellt werden. Bei den betroffenen stressanfälligen Tieren kommt es durch eine Mutation am MHS-Gen zu einem Defekt am Ryanodinrezeptor der Kalziumkanäle und somit zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel in den betroffenen Muskelzellen.

Bisher fehlen jedoch Ansätze zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen Muskelstoffwechselentgleisung und der Hypertrophie der betroffenen Zellen.

Der Zusammenhang zwischen Muskelzellhypertrophie und Stressanfälligkeit einerseits, zwischen Stressanfälligkeit und Kalziumregulationsstörung andererseits, führten zu der Hypothese eines Zusammenhanges zwischen Kalziumregulationsstörung und Muskelzellhypertrophie (REINER, 1993).

Der Identifizierung von Einzelgenen mit Effekten auf die Regulation von muskelspezifischen Strukturgenen kommt eine große Bedeutung zu. Verschiedenen Untersuchungen zufolge spielen die Produkte einiger Protoonkogene in Form von Transkriptionsfaktoren bei dieser Regulation eine entscheidende Rolle. Als Kandidaten kommen hier die Protoonkogene c-fos und c-myc in Frage, die erwiesenermaßen in Zusammenhang mit Muskelhypertrophie stehen. Diese Gene sind in der Lage, extrazelluläre Reize in zellspezifische Antworten umzusetzen. Neuere Untersuchungen an Skelettmuskulatur (WHITELAW, HESKETH, 1992; OSBALDESTON, LEE, 1995; DAWES et al., 1996; PUNTSCHART et al., 1998) oder Herzmuskulatur (SADOSHIMA, IZUMO, 1993; KOLBECK, HORBAN, 1993; GREEN et al., 1997; HORBAN, KOLBECK, 1997; ZIMMER, 1997; MEGHJI et al., 1997) deuten auf eine entscheidende Rolle dieser Protoonkogene bei der Entstehung von Muskelzellhypertrophie hin. Das Vorhandensein von cAMP regulierten Elementen im Promotor dieser Gene (FISCH et al., 1989; HARTIG et al., 1991) lassen zudem eine Verbindung zu den erhöhten Kalziumspiegeln in den betroffenen Zellen vermuten. Untersuchungen am c-fos Promotor deuten auf eine direkte Rolle von Kalzium bei der Regulation dieses Protoonkogens hin (SHENG et al., 1988).

Das c-fos Protoonkogen könnte somit in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor ein wichtiges Zwischenglied bei der Aufklärung der aufgezeigten Zusammenhänge darstellen.

In dieser Arbeit soll, auch im Hinblick auf die Vervollständigung der Genomanalyse beim Schwein, das porcine c-fos Gen charakterisiert und sequenziert werden. Dabei wird auf Homologieunterschiede zu anderen Spezies geachtet.

In einem zweiten Schritt soll dann nach eventuell vorhandenen Sequenzunterschieden zwischen den in Konstitution und Bemuskelungsgrad sehr differierenden Rassen Pietrain und Meishan gesucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Zellphysiologische Grundlagen

2.1.1 Muskelhypertrophie und Stressanfälligkeit beim Schwein

Die gezielte Entwicklung der Schweinezucht hat in den letzten Jahrzehnten eine wesentliche Verbesserung der Wachstumsraten, Futtermittelverwertung, sowie des Fleisch-Fettverhältnisses der Mastschweine hervorgebracht. Die genetische Selektion von Schweinen mit größerem Muskelbildungsvermögen und geringerem Potential des Fettansatzes wurde über einen langen Zeitraum praktiziert. Durch diesen Selektionsdruck erfolgte der Wandel zum mageren, muskelbetonten Schwein (POWELL und ABERLE, 1975).

Jedoch hat die einseitige Selektion auf Fleischfülle auch Negativentwicklungen wie das Problem des Porcinen Stress Syndroms begünstigt, das vor allem bei Schweinen mit extremer Muskelhypertrophie auftritt. Schon in den sechziger Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von PSE-Fleisch (pale, soft, exsudative) und einer verminderten Hitzetoleranz der Tiere erkannt und als Stressanfälligkeit bezeichnet (JUDGE et al., 1966; FORREST et al., 1968). TOPEL et al.(1968) beobachteten plötzliche Todesfälle bei Stressfaktoren ausgesetzten Schweinen und bezeichneten das Phänomen als Porcines Stress Syndrom.

Dieses beim Menschen als Maligne Hyperthermie bekannte Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch eine Entgleisung des Muskelstoffwechsels infolge verschiedener Stressfaktoren. Die Folgen beim Schwein sind Myopathien mit einer deutlichen Reduzierung der Fleischqualität in Form von PSE-Fleisch, bis hin zu Tierverlusten infolge cardiogenem Schock.

Die Mechanismen die zu diesem Krankheitsbild führen sind inzwischen gut erforscht. Als Auslöser wird eine Störung der Kalziumregulation der betroffenen Zellen angesehen (MICKELSON et al., 1987; NELSON, 1988), ausgelöst durch einen Defekt des Skelettmuskel-Ryanodin-Rezeptors (CARRIER et al., 1991; FILL et al., 1991; GALLANT und LENZ, 1992, MC LENNAN und PHILLIPS, 1992). Es kommt zu einem erhöhten Kalzium-Ausstrom aus den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums in das Myoplasma. Defekte Ryanodin-Rezeptoren öffnen sich bei niedrigeren Konzentrationen von Aktivatoren und bleiben länger geöffnet als intakte Rezeptoren. Die Ca/Mg-ATPase ist nicht mehr in der Lage das Kalzium schnell genug in das sarkoplasmatische Retikulum zurückzupumpen, und so kommt es zu erhöhten Kalziumspiegeln in den betroffenen

Muskelzellen. Der erhöhte cytoplasmatische Kalziumspiegel greift regulierend in verschiedene Stoffwechselwege ein. Es kommt zu einer anhaltenden Muskelkontraktur mit gesteigerter Wärmeproduktion. In den Muskelfasern TypIIb, in denen Energie hauptsächlich durch anaerobe Glykolyse gewonnen wird, kommt es zu einer erhöhten Laktatproduktion die zur metabolischen Azidose mit allen bekannten Folgen führen kann (BRENIG, 1992). Die Schädigung der Muskelfasern führt zu einer erheblichen Verschlechterung der Fleischqualität bei den betroffenen Tieren und somit zu wirtschaftlichen Verlusten.

Die Aufklärung des molekularen Defektes am Ryanodinrezeptor des sarkoplasmatisch-retikulären Kalziumkanals (FUJII et al., 1991) stellt den aktuellen Stand der Erforschung des Merkmalantagonismus zwischen Muskelfülle und Stressresistenz beim Schwein dar.

Diese autosomal rezessiv vererbte Punktmutation im Skelettmuskel-Ryanodin-Rezeptor-Gen des Kalziumkanals wird beim Schwein bisher als alleiniger Auslöser des beschriebenen Krankheitsbildes angesehen (BRENIG und BREHM, 1992; OTSU et al., 1991). Auch beim Menschen wird die Mutation am Ryanodinrezeptor für das mit einer Kalziumregulationsstörung einhergehende Krankheitsbild der Malignen Hyperthermie verantwortlich gemacht (MC LENNAN et al., 1990).

Betroffen sind ausschließlich homozygote Träger des Defektes, wobei es sich ohne Ausnahme um Tiere mit ausgeprägter Muskelmasse handelt. Dem auch als Halothangen angesprochenen Gen wird daher eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Muskelhypertrophie zugeschrieben (OLLIVIER,1982; WITTMANN et al., 1993). Jedoch fehlen bis jetzt Ansätze zur genauen Klärung der Zusammenhänge zwischen Kalziumregulationsstörung und Stressanfälligkeit auf der einen, und Fleischfülle auf der anderen Seite. Eine wichtige Rolle wird hier dem Kalzium als second-messenger zugeschrieben, da es durch den besagten Defekt zu erhöhten Kalziumspiegeln in den Muskelzellen kommt (REINER, 1993).

2.1.2 Muskelhypertrophie, Kalzium und Protoonkogene

Wie das Muskelwachstum beim Schwein unter dem Einfluß des Halothangens und anderer Gene ausgelöst wird ist bislang ungeklärt. Aufgrund der hohen Bedeutung dieser Frage für die Schweinezucht gibt es vielfache Ansätze zur Aufklärung der zugrunde liegenden zellphysiologischen und genetischen Hintergründe.

Der Frage nach dem Verständnis der genetischen Grundlagen für die Entstehung der seit Jahrzehnten selektierten Muskelhypertrophie verschiedener Schweinerassen kommt eine tragende Bedeutung für die moderne Schweinezucht zu.

Die bisherigen Untersuchungen konzentrieren sich vor allem auf die Rolle des Halothangens und die Identifikation verschiedener QTL's für spezifische Merkmale wie Muskelwachstum und Fettansatz. Nach und nach werden auch andere Gene mit eventuellen Einflüssen auf die o.g. Merkmale charakterisiert.

Dem Halothangen wird verschiedenen Untersuchungen zufolge einen Einfluß auf Muskelwachstum und Fettansatz zugeschrieben. ZHANG et al. (1992) fanden signifikante Unterschiede zwischen Halothan-positiven (Genotyp nn) und Halothan-negativen (Genotyp Nn) Tieren hinsichtlich der intramuskulären Fettkonzentration, der Fleischbeschaffenheit und des Muskelwachstums. Dabei zeigten die Halothan-positiven Tiere bei besserem Muskelwachstum und geringerem Fettanteil vor allem Einbußen in der Fleischqualität.

Weitere Untersuchungen betreffend der Wachstumsleistung, Schlachtkörpercharakteristiken und der Fleischqualität zwischen Halothan-Trägern (Nn) und Halothan-negativen (NN) Tieren wurden von LEACH et al. (1996) durchgeführt. Hier zeigten sich Vorteile für die Trägartiere hinsichtlich der Futtermittelverwertung, des Magerfleischanteils und des gesamten Muskelanteils. Diese Tiere zeigten jedoch auch einen höheren Anteil an PSE-Fleisch.

Das ausgeprägte Muskelwachstum verschiedener Schweinerassen kann jedoch, obwohl eine direkte Korrelation zwischen den verschiedenen Genotypen und etlichen Leistungsmerkmalen besteht, nicht alleine durch das Halothangen erklärt werden. Der genetischen Aufklärung der Zusammenhänge in Form einer Identifikation weiterer beteiligter Gene und Genloci kommt somit eine wichtige Rolle zu. Hierbei spielt sowohl die Identifikation von relevanten QTL's als auch die Charakterisierung von Einzelgenen eine große Rolle.

ANDERSSON et al. (1994) konnten QTL's für Wachstum und Fettansatz auf dem Chromosom 4 von Wildschwein x Large-White Kreuzungstieren lokalisieren, welche auch bei Meishan x Large-White Kreuzungstieren identifiziert wurden (WALLING et al., 1998).

Diese Ergebnisse wurden 1999 von MARKLUND et al. unterstrichen, wobei auf Chromosom 4 hier auch signifikante QTL-Effekte für Fettansatz, Schlachtkörperlänge und Wachstum gefunden wurden. Auch Chromosom 7 wird mit QTL's für Wachstum und verschiedene Schlachtkörpermerkmale in Verbindung gebracht (WANG et al., 1998). ROHRER et al. (1998) untersuchten Meishan x White Kreuzungstiere und fanden verschiedene relevante Regionen für QTL's betreffend verschiedener Schlachtkörpermerkmale wie Muskelmasse und Fettansatz auf den Chromosomen 1, 5, 7, 8, 9, 10, 13 und 14.

Es handelt sich also bei den angesprochenen Merkmalen um multifaktorelle Geschehen, deren Aufklärung nicht allein durch die Lokalisierung von QTL's sondern auch durch die Identifikation und Charakterisierung von eventuell beteiligten Einzelgenen vorangetrieben werden kann. So untersuchten TE PAS et al. (1999) den Einfluß verschiedener homozygoter Myogenin-Genotypen auf Geburtsgewicht, Wachstumsrate und Muskelmasse und konnten signifikante Unterschiede feststellen.

2.1.2.1 Myogenese und Muskelwachstum

Die Neubildung von Muskelfasern, Myogenese, erfolgt ausschließlich während der Embryonalphase unter der Kontrolle der MyoD Genfamilie bestehend aus Myogenin, MyoD1, myf-5 und myf-6 (TE PAS et al., 1999).

Die Myogenese ist durch die Fusion undifferenzierter Myoblasten gekennzeichnet, die dann zum vielkernigen Myotubus differenzieren. Während dieser Periode erfolgt eine Umschaltung von den Zellzyklus regulierenden Genen auf muskelspezifische Gene (WHITELAW und HESKETH, 1992). Das Wachstum der Muskelzellen erfolgt durch proliferative Vorgänge in Form von Hyperplasie die mit der Geburt abgeschlossen sind (GOLDSPINK, 1972).

Eine spätere Zunahme der Muskelmasse in Form von Hypertrophie entspricht einer reinen Massenzunahme des einzelnen Myotubus ohne Kernteilung. Histologisch handelt es sich bei der Hypertrophie der Muskelzellen um eine Vermehrung der weißen TypIIB-Fasern gekennzeichnet durch die Expression embryonaler Isoenzyme des Myosins (BREUER, 1990), d.h. bestimmter Strukturproteine. Es kommt zu einem Wachstum der einzelnen Muskelzellen in Form einer vermehrten Expression dieser Strukturproteine. Ist ein bestimmter Zelldurchmesser erreicht kommt es unweigerlich zum Aufspalten der einzelnen Myotuben ohne Kernteilung. Welche Zusammenhänge und Signale im Einzelnen zu dieser Massenzunahme führen, ist noch weitestgehend ungeklärt. Es handelt sich um eine langfristige Anpassung der Muskulatur an bestimmte Reize.

2.1.2.2 Muskelwachstum und Protoonkogene

Generell gibt es in der Zelle bestimmte Signalübermittlungswege die, ausgelöst durch extrazelluläre Stimuli, spezielle Zellreaktionen auslösen. Durch die Bindung bestimmter Liganden an Zellrezeptoren werden second-messenger Systeme aktiviert, die einerseits gleich eine kurzfristige Zellantwort auslösen können oder aber im Zellkern zur Aktivierung von sogenannten Early Response Genen führen (CURRAN, 1985). Diese auch als Immediate Early Genes bezeichneten Gene stellen die erste Genantwort der Zelle auf den Reiz dar und exprimieren Transkriptionsfaktoren, die dann über die Aktivierung der Zielgene zur späten langfristigen Zellantwort führen (VOGT et al., 1990) (siehe Abb. 1).

Die einzelnen Muskelfasern reagieren auf unterschiedliche Aktivierungsmechanismen: Über an der motorischen Endplatte der Nervenendigungen ankommende Signale entstehen Aktionspotentiale die sich über die Plasmamembran als Depolarisierung der Zellmembran entlang der T-Tubuli ins Zellinnere fortsetzen. Diese Signalkaskade wird dann am retikulären sarkoplasmatischen Retikulum durch eine Freisetzung von Kalzium aus den Kalziumkanälen fortgeführt. Dadurch steigt der Kalziumspiegel im Sarkoplasma von 10^{-8} auf 10^{-3} , was eine Schwelle zur Kontraktion bestimmter Proteine sowie eine Aktivierung verschiedener Enzyme und second-messenger Systeme bewirkt. Die benötigte Energie wird durch Glykolyse bereitgestellt. Hier scheinen auch Adrenalin und andere β -Sympathomimetika eine Rolle zu spielen. Sie aktivieren an der Zelloberfläche befindliche β -Rezeptoren, was zu einem Anstieg von cAMP und schließlich zur Aktivierung verschiedener am Glykogenabbau und an der Lipolyse beteiligter Enzyme führt (CARAFOLI und PENNISTON, 1986). Die anabole Wirkung der β -Sympathomimetika scheint dabei sowohl über eine Steigerung der Proteinbiosynthese als auch über eine Hemmung des Proteinabbaus erreicht zu werden (MACRAE et al., 1988).

Kalzium und cyclo-AMP sind ubiquitäre Botenstoffe der Zellen die in verschiedenste Regelmechanismen eingreifen. Es gibt einige Hinweise auf eine bedeutende Rolle dieser second-messenger bei der Entstehung der Muskelzellhypertrophie durch langfristige Anpassung an bestimmte Reize. Dazu gehören die bereits erwähnten erhöhten Kalziumspiegel in den betroffenen hypertrophierten Zellen ebenso wie eine erhöhte Dichte von β -Rezeptoren an deren Zelloberfläche. β -Agonisten führen beim Schwein zu einem deutlichen Anstieg des Faserdurchmessers der TypIIb-Fasern (OKSBJERG et al., 1989).

Ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Aktivierung von β -Rezeptoren und der Stimulation von c-fos ist an corticotropen Zellen nachgewiesen, wo es über die Aktivierung

der Proteinkinase A und das CREB zur Induktion von c-fos kommt (BOUTILLIER et al., 1992). Auch die Proteinkinase C bewirkt eine Induktion von c-fos in ruhenden Fibroblasten (GAUTHIER-ROUVIERE et al., 1992).

Bei der weiteren Übermittlung der Signale an den Zellkern scheint dem cAMP-Response-Element-Bindungsprotein (CREB) eine Schlüsselrolle zuzukommen. Es gibt deutliche Hinweise auf eine Mittlerrolle von CREB zwischen second-messenger und Zellwachstum an exzitatorischen Zellen (SHENG et al., 1991). CREB ist ein Transkriptionsfaktor der durch verschiedene second-messenger wie Kalzium und Calmodulin (MORGAN und CURRAN, 1986; SCHONTHAL et al., 1991), cyclo-AMP und der membranständigen Proteinkinase C mit dem Phosphatidyl-Inositol-Triphosphat-Zyklus aktiviert wird. Es kommt dabei zu Synergien zwischen den einzelnen Systemen (MEHMET und ROZENGURT, 1991).

CREB wird so zu einer zentralen Sammelstelle bei der Übertragung von extrazellulären Reizen zum Zellkern. Im Herzmuskel konnte CREB als Bindeglied zwischen adrenergen Signalen und Muskelhypertrophie nachgewiesen werden (KNOELL et al., 1994). CREB ist ein universeller Transkriptionsfaktor der im Zellkern die Expression von c-fos und anderen Protoonkogenen veranlaßt (EVAN, 1991). Hierauf deutet auch die im Promotor von c-fos vorhandene Bindungsstelle für CREB, CRE (Calcium Response Element), hin. Die Induktion des c-fos Protoonkogens erfolgt somit durch erhöhte Spiegel von cAMP in der Zelle und leitet dann Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsmechanismen ein (SASSONE-CORSI et al., 1988).

Es deutet vieles darauf hin, daß die zur Hypertrophie führende Zielantwort im Zellkern ganz eng mit der Expression von Early Response Genen wie c-fos oder c-myc gekoppelt ist, wobei Kalzium und cAMP über CREB als second-messenger fungieren (REINER, 1993). Die Membrandepolarisation aktiviert die frühen Gene c-fos und jun-B (BARTEL et al., 1989).

Versuche an stimulierten Rattenherzen haben ergeben, daß die gesteigerte Expression von c-fos mit einem erhöhten cAMP- und Proteinkinase A-Spiegel, sowie mit einem erhöhten Proteinkinase C-Spiegel einhergeht (OSAKI et al., 1997). Dies spricht für eine hypothetische Kalzium-CREB-FOS/MYC-Hypertrophie-Achse (REINER, 1993) wie in Abbildung 1 dargestellt.

Die molekularbiologische Antwort von Muskelzellen auf verschiedene Stressfaktoren scheint eng mit der Expression von Immediate Early Genes verbunden zu sein. Dies zeigen auch Versuche an einer zeitweisen Ischämie ausgesetzten Schweineherzen, infolgedessen es zu

einer starken Steigerung der Expression von c-fos und anderen Protoonkogenen kommt (BRAND et al., 1992).

Die vermehrte Laktatproduktion sowie die Erhöhung der Kalziumionen in den betroffenen Zellen (HAMMOND et al., 1982) scheinen in einem kausalen Zusammenhang zur Transkription der Protoonkogene zu stehen (BRAND et al., 1992).

Etliche Forschungsergebnisse zeigen, daß die Hypertrophie von Skelett- und Herzmuskelzellen eng mit der Expression von c-fos und c-myc korreliert ist.

Untersuchungen an verschiedenen Hühnerrassen haben ergeben, daß c-fos und c-myc vor allem im Skelettmuskelgewebe von schnellwachsenden hypertrophen Broilerrassen exprimiert werden (KIM et al., 1992).

Bei der induzierten Skelettmuskelhypertrophie der Ratte wurden erhöhte m-RNA-Spiegel von c-fos und c-myc gefunden (WHITELOW und HESKETH, 1992).

Auch die mechanische Stimulation der latissimus dorsi-Muskulatur des Kaninchens ergibt einen deutlichen Anstieg der Early Response Gene c-fos und c-jun (DAWES et al., 1996).

Der temporäre Ablauf der c-fos Expression in mechanisch stimulierten Rückenmuskeln des Kaninchens zeigt einen deutlichen Peak 60 Minuten nach Stimulation. Es handelt sich also um eine erste Antwort der Zelle auf diesen Reiz und stellt wahrscheinlich einen wichtigen Teilschritt auf dem Weg zur Hypertrophie dar (OSBALDESTON et al., 1995).

Weitere Hinweise auf eine entscheidende Rolle von Protoonkogenen bei der Entstehung der Muskelhypertrophie gibt es vor allem im Bereich der Humanmedizin.

Es wird angenommen, daß die Induktion von c-fos und anderen Protoonkogenen eine wichtige Rolle bei der Regulation muskelspezifischer Gene spielt. Diese werden auch in der menschlichen Skelettmuskulatur nach Stimulation durch Training exprimiert (PUNTSCHART et al., 1998).

Des weiteren gibt es Versuche an transgenen Mäusen die den direkten Einfluß von dem Protoonkogen c-ski am Muskelwachstum zeigen. Die betroffenen Mäuse zeigen ein sehr viel stärkeres Muskelwachstum als die Vergleichsgruppen (SUTRAVE et al., 1990).

Auch auf dem Gebiet der Kardiologie gibt es deutliche Hinweise auf eine Rolle der Protoonkogene bei der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie.

Die Stimulation von isolierten Herzmuskelzellen mit Angiotensin II führt über die Expression von c-fos zur Hypertrophie, wobei die Phospholipase C und die Proteinkinase C eine

entscheidende Rolle spielen. Das Vorhandensein von Kalzium scheint dabei ein wichtiger Faktor zu sein

(SADOSHIMA, IZUMO, 1993). Bei Versuchen an in-situ Schweineherzen die einer chronischen Überbeanspruchung durch erhöhte Blutzufuhr ausgesetzt waren kam es zu einer gesteigerten Expression von c-fos und c-myc in den betroffenen hypertrophen Arealen

(MEGHJI et al., 1997).

Ein deutlicher Anstieg der c-fos Expression wurde auch bei der mit hypertrophem Muskelwachstum einhergehenden Reperaturphase des Myokards nach einem Infarkt gemessen (GIDH-JAIN et al., 1998).

Die Stimulation isolierter Rattenherzen durch Norepinephrin und Überdruck führt zu einer vermehrten Expression von c-fos und von c-myc (HORBAN et al., 1997) genau wie die alpha- und beta-adrenerge Stimulation alleine (ZIMMER,1997).

Durch adrenerge Stimulation wird in Herzmuskelzellen eine vermehrte Expression von alpha-actin Genen ausgelöst die mit der Hypertrophie der betroffenen Zellen einhergeht. Dabei scheinen Fos und Jun als Transkriptionsfaktor AP1 eine entscheidende Rolle zu spielen. Obwohl im Promotor des alpha-actin Gens keine AP1-Bindungsstelle vorhanden ist, kommt es zu einer Transaktivierung dieses Gens durch Fos und Jun in Herzmuskelzellen (BISOPHRIC et al., 1991). Diese beiden Protoonkogene werden als erste Antwort der Zelle auf den Stimulus gebildet und beeinflussen dann die zur Hypertrophie führende Expression bestimmter Proteine (BISOPHRIC et al., 1992).

Somit ist ein entscheidender Einfluß von c-fos und anderen Early Response Genen wie auch c-myc bei der Entstehung von Muskelzellhypertrophie, wie hier mehrfach beschrieben, sehr wahrscheinlich. Daß die Expression dieser Transkriptionsfaktoren eng mit den second-messengern Kalzium und verschiedenen Proteinkinasen gekoppelt ist gilt als gesichert. Die physiologischen Begebenheiten im Cytoplasma der hypertrophen Muskelzellen von frohwüchsigen Schweinen deuten auch hier auf eine wichtige Rolle dieser Protoonkogene hin. Einen ersten Schritt zur Aufklärung dieser Rolle ist von REINER (1999) durch die Charakterisierung des c-myc Gens bei Schweinen unterschiedlicher Konstitution mit anschließenden Assoziationsstudien zwischen unterschiedlichen c-myc Genotypen und verschiedenen Leistungsmerkmalen gemacht worden. Hier konnte eine modulierende Wirkung des c-myc-Genotyps auf das MHS-Gen in den Merkmalsbereichen Schlachtkörperverfettung und Fleischfülle gezeigt werden.

Die Sequenzierung des porcinen c-fos Protoonkogens und die anschließende Suche nach Polymorphismen zwischen den Extremrassen Pietrain und Meishan ist ein weiterer Schritt zur Aufklärung dieser Phänomene.

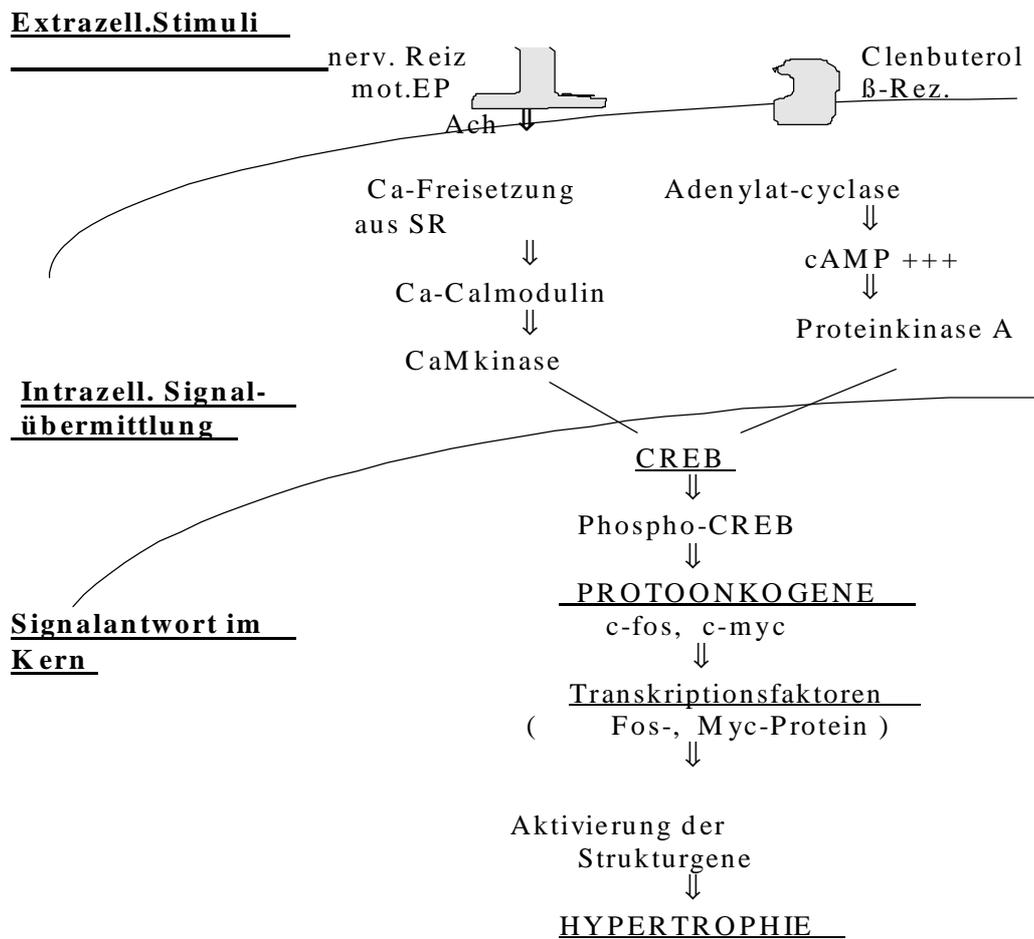


Abb. 1: Zellphysiologische und molekularbiologische Zusammenhänge der c-fos-Beteiligung an der Entstehung von Muskelzellhypertrophie (Schematische Zusammenfassung verschiedener Literaturangaben).

2.2 Das c-fos Protoonkogen

2.2.1 Protoonkogene

Die Entdeckung der Protoonkogene basiert auf der Erforschung der Retroviren, die schon um 1910 mit der Induktion von Tumoren infolge Übertragung zellfreier Extrakte aus Tumorgewebe auf Hühner durch ROUS, ELLERMANN und BANG ihren Anfang hatte.

Diese Viren haben zelltransformierende Eigenschaften (BISHOP, 1978, 1981; BISHOP und VARMUS, 1982), die auf bestimmten im Virusgenom integrierten Nucleotidsequenzen (v-onc) basieren. Es sind inzwischen eine Vielzahl von v-onc Sequenzen enthaltende Retroviren bei einer Reihe von Spezies entdeckt worden (BISHOP, 1982). Die Onkogenesequenzen sind von den RNA-Viren aus dem Säugetiergenom integriert worden und sind verantwortlich für deren zelltransformierende Eigenschaften.

Für jedes dieser viralen Onkogene (v-onc) existiert somit ein zelluläres Pendant (c-onc) mit leicht veränderter Sequenz am COOH-Ende, das als Protoonkogen bezeichnet wird und zahlreiche Aufgaben im Säugetierorganismus zu übernehmen scheint. Die genaue Rolle dieser zellulären Onkogene beginnt man erst ganz allmählich zu verstehen.

Diese Gensequenzen existieren in allen Säugetiergenomen und werden in einer Vielzahl von Gewebezellen exprimiert (CHEN, 1980 ; SHIBUYA et al., 1982). Die hohe Homologie dieser Gene zwischen verschiedenen Spezies, das heißt die hohe Konservierung der Sequenzen während der Evolution (BISHOP, 1983; SHILO und WEINBERG, 1981), deuten auf eine bedeutende Rolle im Säugetierorganismus hin (VAN STRAATEN et al., 1983).

Die zellulären Onkogene sind sowohl für normale Wachstums- und Differenzierungsprozesse als auch für Zellregenerationsprozesse verantwortlich. Die Produkte dieser Onkogene reichen von Proteinkinasen über Wachstumsfaktoren und verschiedene Rezeptoren bis hin zu DNA-bindenden Proteinen als transaktivierende Faktoren (BIELKA und BÖRNER, 1995). Ihre Lokalisation ist je nach Funktion unterschiedlich.

Die im Zellkern lokalisierten Protoonkogene wie c-fos oder c-myc bilden eine Gruppe von Immediate Early Genen, das heißt sehr früh exprimierten Genen, die bei vielen Signalkaskaden die erste Antwort der Zellen auf extra-oder intrazelluläre Reize darstellen und deren Produkte als Transkriptionsfaktoren die Aktivierung der späten Genantwort veranlassen.

Diese Early Response Gene werden durch eine Vielzahl von externen Wachstums- und Differenzierungssignalen aktiviert (CURRAN, 1985; GREENBERG, 1984) und sind dann zuständig für die Umschaltung dieser kurzlebigen externen Signale in langanhaltende zelluläre Antworten (VOGT et al., 1990). Die Protoonkogene werden sehr schnell nach dem Stimulus exprimiert, die RNA hat eine sehr kurze Halbwertszeit von maximal 30 Minuten (YOU et al., 1992), und ist daher nur über einen begrenzten Zeitraum nachweisbar.

Einige Beispiele für solche Onkogene und ihre zellulären Pendanten werden in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Virale und zelluläre Onkogene und ihre Produkte. (nach KNIPPERS)

<i>Onkogen</i>	<i>transd. Virus</i>	<i>Tumor</i>	<i>Proto- onkogen</i>	<i>Genprodukt</i>
v-jun	Avian Sarkoma Virus	Fibrosarkom Huhn	c-jun	Transkriptionsfaktor
v-fos	Murine Osteo- sarkom Virus	Osteosarkom Maus	c-fos	Transkriptionsfaktor
v-myc	Avian Myelo- cytomatosis Virus Huhn	Leukämie Sarkom Karzinom	c-myc	Transkriptionsfaktor

2.2.2 c-fos

2.2.2.1 Das Gen

Die Isolation eines FBJ-Virus-Komplexes aus einem spontanen Tumor der Maus (FINKEL et al., 1966) steht am Anfang der Entdeckung des c-fos Protoonkogens. Dieser Komplex besteht aus einem replikationsfähigen murinen Leukämievirus (FBJ-MuLV) und einem nicht replikationsfähigen murinen Sarkomavirus (FBJ-MuSV) (LEVY et al., 1973, 1978), wobei FBJ-MuSV durch eine homologe Rekombination zwischen FBJ-MuLV und dem zellulären c-fos der Maus entstanden ist (VAN BEEVEREN et al., 1983).

Das Onkogen v-fos ist das transformierende Gen des FBJ (Finkel-Biskis-Jinkins) Osteosarkomvirus der Maus und homologe Sequenzen wurden in mehreren Spezies nachgewiesen (CURRAN et al., 1982).

Das RNA-Genom des FBJ-MuSV-Virus besteht insgesamt aus 4026 Basenpaaren, wovon der mittlere Bereich die 1639 Basenpaare umfassende v-fos Sequenz darstellt. Durch Integration dieser v-fos Sequenz erlangt das Virus tumorbildende Eigenschaften.

Die Sequenz entspricht bis auf eine 104 Nucleotide umfassende Deletion im 3'-Bereich weitestgehend der c-fos m-RNA Sequenz. Diese Deletion ist wahrscheinlich bei der Genese des FBJ-MuSV Genes entstanden (VAN BEEVEREN, 1983). Im Gegensatz zur c-fos Sequenz enthält die virale Sequenz von fos keine Intronbereiche.

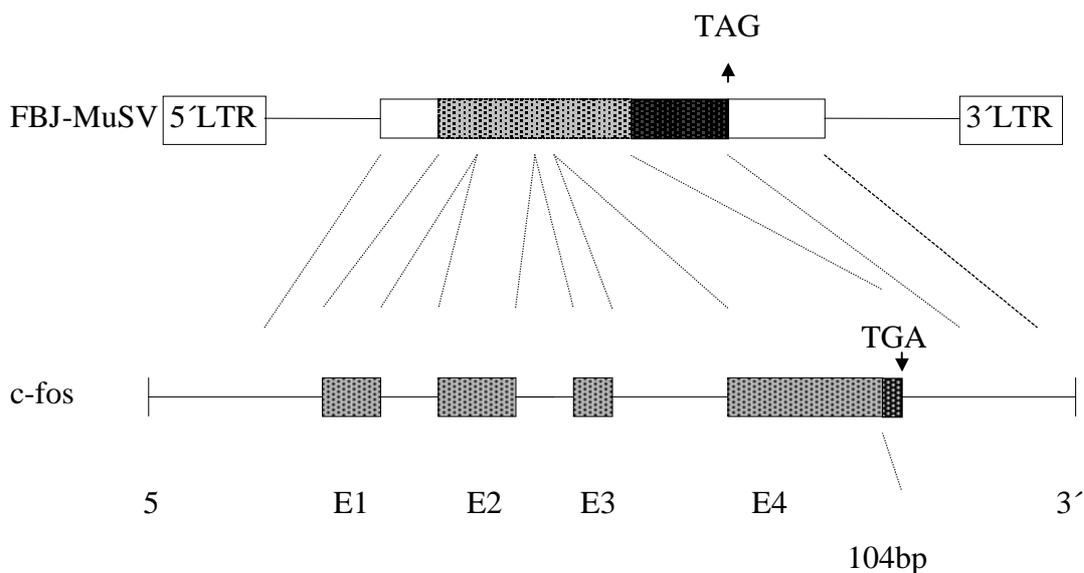


Abb. 2: Schema von v-fos und c-fos (nach RANSONE und VERMA, 1990)

Die Retrovirussequenz ist in Form der integrierten Provirus-DNA, eingerahmt von den beiden LTR-Elementen (long-terminal-repeats, dient als Promotor für die Transkription der integrierten DNA) dargestellt. Die 104bp-Deletion am 3'Ende bewirkt ein unterschiedliches Carboxy-Ende der Proteinsequenz. Das Stopkodon von v-fos ist TAG, das von c-fos TGA. Die vier Exonbereiche des c-fos Gens werden durch die dunkelgrauen Boxen dargestellt (Abb. 2).

Das zelluläre Protoonkogen c-fos ist seit 1983 bei verschiedenen Spezies isoliert worden und zählt als Hauptvertreter der Gruppe der Immediate Early Response Gene. Die komplette Gensequenz liegt vor für Mensch (VAN STRAATEN et al., 1983), Maus (VAN BEVEREN et al., 1983), Ratte (CURRAN et al., 1987), Huhn (FUJIWARA et al., 1987), Hamster (SARABIA und LIEHR, 1998) und den Pufferfisch (*Tetraodon fluviatilis*) (CHANG et al., 1996). Wie bei anderen Protoonkogenen. Sie beträgt für Mensch und Maus 90% (VAN STRAATEN et al., 1983), Mensch und Ratte 94%, für Huhn und Maus immerhin noch 79% (FUJIWARA, 1987).

Das c-fos Protoonkogen besteht bei allen bisher untersuchten Spezies aus ca 3500 Basenpaaren, die sich in vier Exon- und drei Intronbereiche aufteilen.

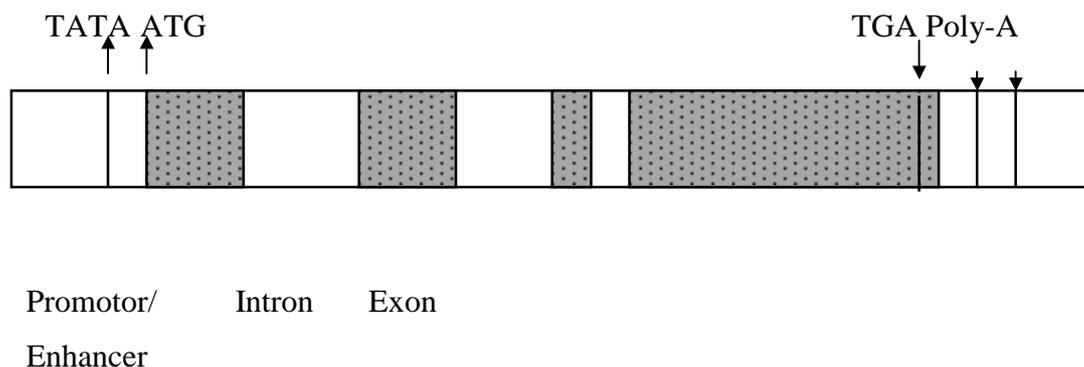


Abb. 3: Grundstruktur von c-fos (modifiziert nach KNIPPERS)

Das menschliche c-fos Gen erstreckt sich von der TATA-Box bis zum Poly-A-Signal über 3415 Nukleotide und kodiert für ein 380 Aminosäuren umfassendes Protein, welches hydrophil und sauer ist (VAN STRAATEN et al., 1983).

Die vier Exonbereiche sind 140, 251, 107 und 636 Basenpaare lang. Die dazwischen liegenden Introns umfassen 732, 432 und 115 Basenpaare.

Das ATG-Codon befindet sich an Position 289, das Terminationskodon TGA an Position 2729.

Die 5'-Region des Genes, die wichtig für die Regulation ist, zeigt einen hohen Anteil an Guanidin- und Cytosinresten von 63%. Des weiteren können hier zwei Repeats von 8 Basenpaaren im Abstand von 6 Nukleotiden an Position 35-42 und 49-56 lokalisiert werden, deren Bedeutung jedoch unklar ist. Die TATA-Box befindet sich an Position 100-108, die CAP-Site an Position 130.

Das 3' Ende ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von zwei Poly-A Signalen, wobei das zweite an Position 3510 für den Transkriptionsstop verantwortlich ist. Das erste Poly-A Signal befindet sich an Position 3233, und hätte ein um 270 Nucleotide kürzeres Transkript zur Folge.

2.2.2.2 Regulation der Genexpression

Die Regulation der Genexpression von c-fos kann auf mehreren Ebenen erfolgen. Neben Transkription, Elongation und Translation hat vor allem die RNA-Stabilität einen großen Einfluß.

Transkription

Die Transkription des c-fos Genes ist in verschiedenen Zelllinien untersucht worden, wobei vor allem Fibroblasten und Phäochromocytoma PC12-Zellen als Modell dienen. Die Expression des c-fos Genes wird sehr schnell durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren induziert. Dazu gehören Wachstumsfaktoren wie NGF (nerve growth factor), EGF (epidermal growth factor) oder PDGF (platelet derived growth factor), Insulin, Phorboläther und second-messenger wie Kalzium und cAMP (CURRAN und MORGAN, 1985,1986; GREENBERG et al., 1985, 1986 ; MÜLLER et al., 1984) sowie Membrandepolarisation (BARTEL et al., 1989). Diese Faktoren nehmen auf die eine oder andere Weise Einfluß auf die Expression des Genes, wobei für die meisten ein direkter Bezug zum Promotorbereich besteht.

Der Promotor des c-fos Genes beinhaltet neben der TATA-Box mehrere regulatorische Bereiche die eine hohe Konservierung zwischen den einzelnen Spezies aufweisen. Die Nukleotidsequenz der 5'-Region zeigt eine Homologie von 93 % zwischen Maus und Ratte,

von 73% immerhin noch zwischen Mensch und Ratte. Die cis-regulierenden Elemente wie das SIE, DSE, die AP-1-Bindestelle, das Ca/CRE und die TATA-Box sind bei Ratte, Mensch und Maus gleichermaßen vorhanden (WANG et al., 1994).

SHENG et al. (1988) haben zwei Hauptwege der Aktivierung des Gens definiert denen unabhängige regulatorischen Sequenzen im Promotorbereich zugeordnet werden können.

Die Untersuchung der in vitro Aktivität des Promotorbereiches hat gezeigt, daß vor allem der Bereich von -124 bis -58 für die primäre Aktivität verantwortlich ist. Zwei Elemente, die direct-repeats und die überlappenden MLTF/USF und CREB/ATF Bindungsstellen sind in diesem Bereich wichtig. Im weiteren 5'-Bereich kommt dann nur noch dem DSE eine Hauptrolle für die Grundaktivität des Promotors zu (HIPSKIND und NORDHEIM, 1991). Das Hauptelement für die Aktivierung des Gens ist das Serum-Response-Element (SRE), auch Dyad Symmetry Element (DSE) (-GGATGTCCATATTAGGACATCTGCGTCA-) (TREISMAN, 1985).

Dieses Element bindet eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und vor allem das Protein SRF (serum response factor). Es ist für die Serum-Induktion des c-fos Genes wichtig (SHENG et al., 1988).

Überlappend mit dem SRE stellen sich dar: eine CArG-Box (-CCATATTAGG-) die für die Bindung des serum response factors verantwortlich ist, eine E-Box (-ACATCTGC-) als Bindestelle für MyoD und schließlich eine AP1-Bindungsstelle (-CTGCGTCA-). Das Dimer AP1, bestehend aus Jun und Fos, bindet an diese Stelle und trägt so zur Autoregulation des Genes bei.

Das Serum Response Element interagiert mit der AP1-Bindestelle in der Transkriptionsregulation je nach Zellstatus. In ruhenden Zellen bewirkt diese Kooperation eine Repression, in wachsenden Zellen eine Aktivierung der Transkription (MORGAN und BIRNIE, 1992).

Um die Position -60 befindet sich ein cAMP-Response Element (CRE) (-TGACGTTT-), welches für die Induktion des Genes durch Kalzium oder cAMP verantwortlich ist und sich als unabhängig von dem DSE erweist (HÄRTIG et al., 1991). Diese Sequenz zeigt eine hohe Homologie zwischen Maus, Mensch und Huhn (SHENG et al., 1988).

Für eine maximale Expression des Genes nach Stimulation mit cAMP sind weitere Elemente im 3'-Bereich des Genes unentbehrlich. Beim Menschen findet sich so eine Sequenz an Position +18 bis +38 (HÄRTIG et al., 1991). Ein für die basale Transkription wichtiges GC-reiches direct repeat Element befindet sich beim Menschen an Position -90 und -76 (-GCGCCACC-----GCGCCACC-) (RUNKEL et al., 1991).

An Position -350 liegt eine Bindestelle SIE (-TTCCCGTCAA-) für das Protein SIF das durch den Wachstumsfaktor v-sis aktiviert wird.

Die Transkription des c-fos Genes hört einige Minuten nach der Aktivierung auf (GREENBERG et al., 1985,1986). Die m-RNA wird dann ins Zytoplasma transportiert, wo die Translation über einen kurzen Zeitraum stattfindet und die m-RNA sehr schnell degradiert wird (KRUIJER et al., 1984; MULLER et al., 1984).

RNA-Stabilität.

Ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Genexpression stellt die Kontrolle der m-RNA Spiegel im Zytoplasma dar. Eine wichtige Rolle spielt hier die Stabilität der m-RNA. Die Halbwertszeit des Transkriptes von c-fos liegt bei ca 15 Minuten. Der schnelle Abbau der m-RNA ist einerseits abhängig von AU-reichen Sequenzen am untranslatierten 3`Ende (VEYRUNE et al., 1995), andererseits von bestimmten Abschnitten der kodierenden Bereiche (SHYU et al., 1988).

Elongation.

Die Kontrolle der c-fos Transkription wird auch auf der Stufe der Elongation ausgeführt. Im Bereich des ersten Exon befindet sich ein Elongationsblock (FORT et al., 1987; BLANCHARD et al., 1988; BONNIEU et al. 1989). LAMB et al. (1990) konnten die fragliche Sequenz am Ende von Exon 1 identifizieren. Es handelt sich um eine perfekte Palindrom Sequenz (-TCCCCGGCCGGGA-), die als FIRE (fos intragenic regulatory element) betitelt wird. Dieses 14mer ist zwischen Maus, Huhn und Mensch stark konserviert.

2.2.3 Das c-fos Protein

Das Produkt des c-fos Protoonkogens ist ein instabiles nukleäres Phosphoprotein, Fos (SAMBUCETTI und CURRAN, 1986). Es besteht bei Mensch und Maus aus 380, beim Huhn aus 367 Aminosäuren. Dieses Protein wird in den meisten Zellen auf einem niedrigen basalen Level exprimiert (ABATE und CURRAN, 1990).

Mit dem Produkt anderer Protoonkogene aus der Jun-Familie bildet es je eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP1 und reguliert so die Transkription von vielen an Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsprozessen beteiligten Genen (RAUSCHER et al., 1988, SASSONE-CORSI et al., 1988, CURRAN und FRANZA, 1988; CHIU et al., 1988). Im Gegensatz zu seinem Dimerisationspartner Jun ist Fos nicht in der Lage Homodimere zu bilden, und kann somit nicht als alleiniger Faktor an die Ziel-DNA binden (KOUZARIDES und ZIFF, 1988).

Das Heterodimer AP1 bindet mit hoher Affinität an die symmetrischen Zielsequenzen -TGACTCA- (AP1-Site) oder -TGACGTCA- (CRE) verschiedener Gene (NAKABEPPU und NATHANS, 1989; RANSONE et al., 1990) und reguliert so deren Expression (HALAZONETIS et al., 1988; KOUZARIDES und ZIFF, 1988; NAKABEPPU et al., 1988; RAUSCHER et al., 1988.; SASSONE-CORSI et al., 1988). Die AP1 Bindestelle ist das TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) response element TRE welches in vielen Genen zu finden ist (ANGEL und KARIN, 1991).

2.2.3.1 Struktureller und funktioneller Aufbau

Das c-fos Protein gliedert sich in verschiedenen funktionelle Domäne die zwischen den Spezies eine hohe Homologie aufweisen.

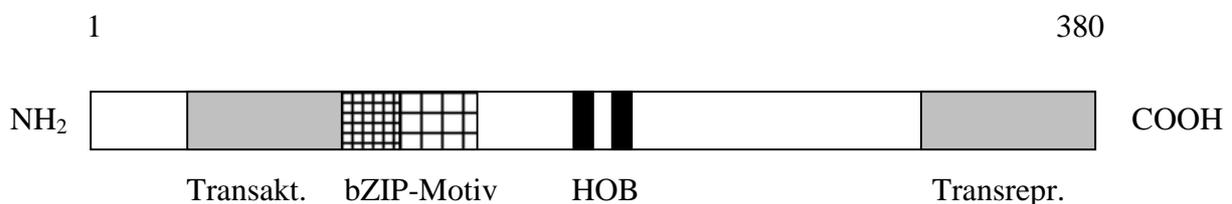


Abb. 4: Funktionelle Domäne von Fos

Das bZIP-Motiv im mittleren Bereich ist wichtig für die Dimerbildung mit Jun, sowie für die spezifische DNA- Bindung (RANSONE et al., 1990).

Des Weiteren stellen sich verschiedene für die Regulation der Transkription wichtige Regionen dar. Sie befinden sich sowohl am C-terminalen als auch am N-terminalen Ende.

2.2.3.1.1 Das bZIP-Motiv

Das bZIP-Motiv setzt sich zusammen aus einer basischen Region mit einem Hauptanteil an basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin, und einer Leucinreichen Domäne, die als Leucine Zipper bezeichnet wird. Die Funktion der basischen Region ist die spezifische DNA-Bindung (AGRE et al., 1989; NAKABEPPU und NATHANS, 1989), die des Leucin-Zippers die Dimerbildung mit Jun (KOUZARIDES und ZIFF, 1988; GENTZ et al., 1989; TURNER und TIJAN, 1989). Die Heterodimerbildung wird gegenüber der Homodimerbildung bevorzugt (GLOVER et al., 1995).

Über das bZIP-Motiv wird auch die direkte Assoziation mit dem TATA-Box-Binding Protein (TBP) und somit eine direkte Beeinflussung der Transkriptionsaktivierung vermittelt (RANSONE et al., 1993).

Der Leucin – Zipper

Das Leucin-Zipper Motiv besteht aus einem Abschnitt von ca. 30 Aminosäuren mit 5 Leucinen im Abstand von je 7 Aminosäuren. LANDSCHULZ et al. (1988) konnten dieses Motiv als Charakteristikum für einige Onkoproteine der Fos, der Jun und der Myc Familie beschreiben.

Die spezifische Anordnung der Aminosäuren in diesem Bereich führt zur Ausbildung einer Sekundärstruktur in Form einer α -Helix, wobei alle Leucinreste sich auf einer Seite der Helix anordnen. Auf der gegenüberliegenden Seite befinden sich Aminosäurenreste mit geladenen Seitengruppen.

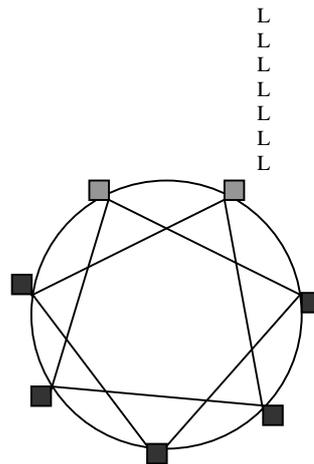


Abb. 5: Sekundärstruktur des Fos-Proteins (nach verschiedenen Autoren)

Die hellgrauen Rechtecke stellen die hydrophoben, die schwarzen die hydrophilen Aminosäuren dar. Die amphipatische Anordnung der Aminosäuren und die Salzbrückenbildung zwischen den geladenen Seitengruppen stabilisieren die Helixformation (SCHULZ und SCHIRMER, 1979; CHOTIA, 1984; SUNDERALINGAM et al., 1987; BAXEVANIS und VINSON, 1993).

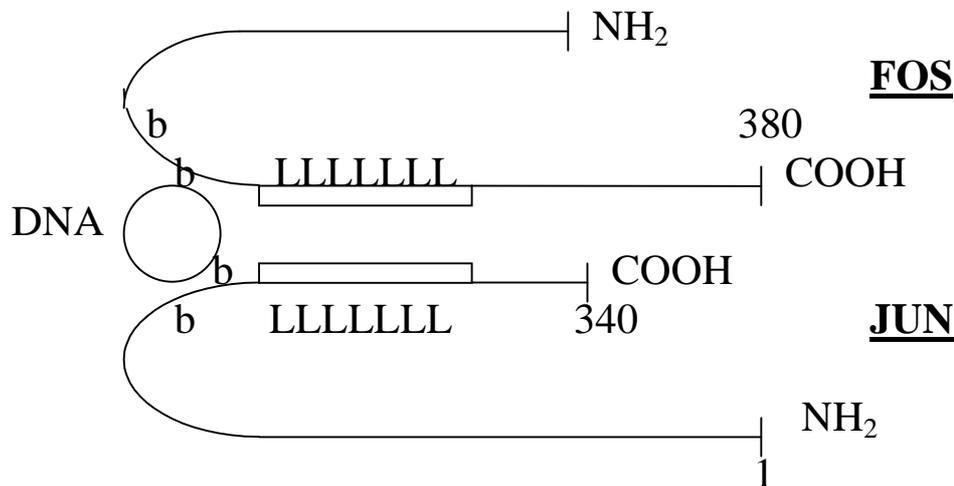
Der Leucin-Zipper bildet das Herz der Dimerbildung mit Jun indem er mit dem Leucin-Zipper des Jun- Proteins eine Konformation bildet die als Coiled-Coil bezeichnet wird (O'SHEA et al.,1989, 1992). Die Leucin-Reste bilden die nach innen gekehrte Oberfläche des Dimers. Coiled Coils haben eine gewisse Periodizität wodurch jede siebte Aminosäure in die gleiche strukturelle Umgebung gelangt.

Durch diese Anordnung kommt es zu einer Juxtaposition der basischen Domäne als Grundlage für die DNA- Bindung (ALBER, 1992), wie in Abbildung 6 gezeigt.

Die basische Region.

Die basische Region besteht aus einer 16^{er} Sequenz von vorwiegend basischen Aminosäuren, die genau 7 Aminosäuren vor dem ersten Leucin des Leucin-Zippers angeordnet sind (HURST, 1994; VINSON et al., 1989). Diese Anordnung ist charakteristische für alle bZIP Proteine und legt die Hypothese nahe, daß die DNA-Bindung von einer fixen dreidimensionalen Anordnung zwischen Leucin-Zipper und basischer Region abhängt (AGRE et al., 1989; NEUBERG et al., 1991).

Durch die Dimerbildung entsteht ein Y-förmiges Molekül (Abb. 6), wobei die basischen Regionen sich wie Fangarme um die zu bindende DNA anordnen und der Stamm durch die Coiled-Coil-Struktur der parallel angeordneten Leucin-Zipper gebildet wird (VINSON et al., 1989; O'NEIL et al., 1990).



L = Leucine Zipper
b = Basische Region

Abb. 6: Aufbau von AP 1 (nach KNIPPERS)

2.2.3.1.2 Transaktivierungs- und Transrepressionsdomäne des Fos Proteins

Die Untersuchung der transformierenden Eigenschaften des c-Fos Proteins hat wertvolle Erkenntnisse über die Aufgaben der verschiedenen Proteinabschnitte gebracht.

Das c-Fos Protein beinhaltet mehrere Domäne die für die Transaktivierung oder die Transrepression anderer Gene verantwortlich sind (ABATE et al., 1991b).

Für die Transaktivierung ist vor allem der C-terminale Bereich von Fos wichtig (HIRAI et al., 1990 ; WISDON et al., 1993). Hier sind bis jetzt drei wichtige Proteinabschnitte bekannt. Als HOB 1 –GLPEATTPESE- und HOB 2-EPFDDFLFPA- (homology boxes, AS 226-236, 267-276) werden zwei wichtige Regionen bezeichnet die sich auch am N-terminalen Ende von Jun als A1- Aktivierungsdomäne wiederfinden (SUTHERLAND et al., 1992). Die HOB-Motive kooperieren in der Aktivierung der Transkription.

Eine Serin-reiche Domäne befindet sich am 3'Ende (As 332-380), sie wird unter anderem durch die cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert (ABATE et al., 1991). Das 90-Aminosäuren C-Ende des c-Fos Proteins enthält somit mehrere autonome Regulationsdomäne die durch Phosphatgruppenübertragung aktiviert werden können (MCBRIDE und NEMER, 1998).

Die Phosphorylierung des C-terminalen Endes spielt neben der Transaktivierung anderer Gene eine Rolle bei der Transrepression des c-fos Promotors (OFIR et al., 1990), weswegen dieser Bereich auch als Transrepressionsdomäne bezeichnet wird. WILSON und TREISMAN haben bereits 1988 die Bedeutung dieser Region für die schnelle negative Regulierung der c-fos Transkription nach Serum-Stimulation festgestellt.

Die Transrepression von c-fos und anderen Immediate Early Response Genen scheint dabei über die CARG-Box im Promotorbereich vermittelt zu werden (GIUS et al., 1990).

Auch das N-terminale Ende des Proteins beinhaltet regulatorische Bereiche (AS 60-84) die für die Transaktivierung eine große Rolle spielen (JOOSS et al., 1994). Das HOB 1 Motiv ist auch hier vorhanden (BROWN et al., 1995).

2.2.3.2 Regulation der Aktivität des Proteins

Die Aktivität von Fos als Teil des Transkriptionsfaktors AP1 unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Hierzu zählen die Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie CREB oder Myc, die Beeinflussung der Topologie der DNA, sowie nicht zuletzt die posttranslationelle Phosphorylierung als spezifische Kontrolle der Aktivität (ABATE et al., 1993).

Die schnelle und spezifische Signalübermittlung von der Zelloberfläche zum Zellkern bedient sich der Phosphorylierung verschiedener Proteine als Zwischenglied. Einen bekannten Mechanismus stellt hier die Aktivierung von Proteinkinasen dar, die vom Zytoplasma in den Zellkern migrieren und dort spezifische Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (KARIN und HUNTER, 1995).

Die Regulation der Genexpression durch Fos und Jun resultiert aus einem Zusammenspiel mehrerer funktioneller Domänen in beiden Proteinen (ABATE et al., 1990). Dabei scheint die Phosphorylierung bestimmter Proteinbereiche ein wichtiges Signal zu sein. Durch Übertragung von Phosphatgruppen auf verschiedene Aminosäuren in den Transaktivierungs- oder Transrepressionsdomänen wird die Aktivität der Transkriptionsfaktoren Fos und Jun herauf- oder herabgesetzt.

Verschiedene Enzyme sind in diesen Ablauf eingebunden. Die Phosphorylierung durch die PKA (Proteinkinase A) betrifft vor allem die C-terminalen Serinreste von Fos und scheint ein wichtiger regulatorischer Schritt in der Aktivitätskontrolle in normalen Zellwachstums und -differenzierungsprozessen darzustellen (TRATNER et al., 1992). C-terminale Serinreste sind auch Substrat anderer Proteinkinasen wie der MAP-Kinase (mitogen-

activated protein kinase) und der RS-Kinase (90-kDa ribosomal S6 kinase), die als wachstumsregulierte Enzyme in die posttranslationelle Ummodellierung des Proteins eingreifen und die Stabilität wie auch die Transaktivierungsaktivität erhöhen (CHEN et al., 1993; 1996).

Wichtiger noch als die Rolle bei der Transaktivierung anderer Gene scheint die Rolle des C-terminalen Endes bei der Transrepression des c-fos Genes zu sein. OFIR et al. (1990) zeigen daß dieser Bereich des Proteins im phosphorylierten Zustand in der Lage ist, die Transkription am c-fos Promotor zu unterdrücken. Diese Autoregulation wird über das SRE (serum response element) vermittelt (RIVERA et al., 1990).

Auch die Hauptaktivierungsdomäne mit den beiden HOB Motiven wird über Phosphatgruppenübertragungen reguliert, wobei vor allem die Phosphorylierung des Threonins 232 im HOB 1 Motiv eine Rolle zu spielen scheint (BANNISTER et al., 1994).

3. Material und Methodik

3.1 Übersicht zur Versuchsanlage

Die Aufklärung der Rolle des c-fos Protoonkogens in der Regulation verschiedener Stoffwechselfparameter in Skelettmuskelzellen konstitutionell unterschiedlicher Schweinerassen erforderte zunächst eine Aufklärung der Primärstruktur des porcinen c-fos Protoonkogens. Dies als Grundlage für die Untersuchung eventueller Sequenzunterschiede des Genes bei konstitutionell differierenden Schweinen und als Beitrag zur Vervollständigung des Schweinegenoms. Die hierzu erforderlichen Einzelschritte sind in Abbildung 1 zusammengefaßt.

Synthese spezifischer **Primer** anhand von **Homologievergleichen** (Maus, Mensch, Ratte)



Amplifikation und Markierung einer **schweinespezifischen Sonde**



Screenen der Genbank



Isolation eines Lamda-Phagen-Klons aus der Genbank



Kartierung und Subklonierung des Inserts



Sequenzierung der Subklone



komplette Sequenz des porcinen c-fos Protoonkogens

⇓ → **Physikalische Kartierung**

Etablierung spezifischer **PCR-Systeme** zur **Amplifikation des Genes** bei verschiedenen Schweinerassen.



Sequenzvergleiche per Computeranalyse



Darstellung gefundener **Basenaustausche** und **RFLPs**

Abb. 7: Übersicht der Versuchsdurchführung

Am Anfang stand die Isolation des porcinen c-fos Genes aus einer genomischen Lamda-FixII-Genbank mittels einer schweinespezifischen Gensonde.

Zur Herstellung der Sonde wurden spezifische Primer anhand von Homologievergleichen der c-fos Sequenzen von Mensch, Maus und Ratte ausgewählt. Die Amplifikation der Sonde erfolgte aus genomischer DNA vom Schwein. Nach Isolation eines das c-fos Gen enthaltenden Genabschnitts mittels Plaque-Hybridisierung aus der genomischen Genbank, erfolgte die Kartierung und Subklonierung des Isolates.

Die einzelnen Subklone dienten nun als Ausgangsmaterial für die Sequenzierung des kompletten c-fos Genes, wobei beide DNA-Stränge überlappend mit Hilfe der vektorspezifischen Primer oder auch mittels neu synthetisierter schweinespezifischer Primer sequenziert wurden.

Die Suche nach eventuell vorhandenen Polymorphismen wurde vornehmlich bei den Extremrassen Piètrain und Meishan durch direkte Sequenzierung verschiedener Sequenzabschnitte durchgeführt. Als Primer für die Amplifikation der entsprechenden Teilstücke aus genomischer DNA dienten teils die für die Grundsequenzierung schon vorhandenen Primer, teils wurden spezifische Primerpaare neu synthetisiert.

Zur Untersuchung eventueller Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen in großem Maßstab im Hinblick auf Folgearbeiten auf diesem Gebiet wurden PCR/ Restriktionssysteme etabliert.

3.2 Material

Als Ausgangsmaterial für die komplette Sequenzierung des c-fos Protoonkogens diente ein Lamda-FixII-Klon genomischer Schweine-DNA der Firma Stratagene, wobei die Rasse des Schweines nicht bekannt war.

Die Polymorphismensuche wurde an genomischer DNA der Rassen Piètrain und Meishan durchgeführt. Die DNA wurde teils vom Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt, ein Teil der Tiere stammte von der Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof des Institutes für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Tabelle. 2: Übersicht über die Herkunft der untersuchten Tiere

Rasse	Hohenheim	Giessen
Meishan	5	2
Pietrain	3	4

3.3 Methodik

3.3.1 Isolation von DNA aus Vollblut

Die für die Versuche verwendete DNA wurde aus Vollblut isoliert. Die Blutentnahme erfolgte an betäubten Tieren vor der Schlachtung und im Rahmen von bestandsdiagnostischen Untersuchungen. Für die Entnahme wurden EDTA Röhrchen verwendet.

Die Isolation der DNA erfolgte nach unterschiedlichen Methoden, wobei sich die angewandte Technik nach dem weiteren Verwendungszweck richtete.

3.3.1.1 Isolation von DNA aus Vollblut durch Aussalzen

Die mit dieser Methode isolierte DNA weist eine durchschnittliche Länge von 80-100kbp auf, was mit einer recht geringen Viskosität einhergeht. Aufgrund dieser Begebenheit ist die gewonnene DNA sehr genau zu dosieren und eignet sich sowohl für PCR als auch für Southern-Hybridisierung. Nachteilig ist bei dieser Methode die Degradation der DNA.

Für die nun beschriebene Vorgehensweise wurden ausschließlich frische Blutproben verwendet. 8-10ml des Vollblutes wurden in einem ersten Schritt für 20 Minuten bei 2500rpm abzentrifugiert. Der Buffy Coat wurde dann mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze als weißer Layer über den Erythrozyten abgenommen und in ein 1,5ml Eppendorf-Cup überführt. Nun konnte die eigentliche Extraktion mit der Zugabe von 2,5ml eiskalten Lysispuffer (150mM NH₄Cl; 0,5mM KCl; 0,25mM Tris-HCl, pH7,4) beginnen. Nach Inkubation für 10 Minuten auf Eis zur Lyse der restlichen Erythrozyten erfolgte die Pelletierung der Leukozyten durch 10-minütige Zentrifugation bei 4200rpm und 4° C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal in eiskalter Waschlösung (140mM NaCl; 0,5 mM KCl; 0,25mM Tris-HCl, ph 7,4) aufgenommen, resuspendiert und bei 300rpm , 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nun erfolgte die Resuspension der Zellen in 9ml 1xTE-Puffer und die Zugabe von 0,5µg Proteinase K und 500µl 10% SDS unter vorsichtigem Mischen.

Nach anschließender Inkubation bei 50°C für mindestens 3 Stunden wurden 4,3ml einer gesättigten Salzlösung zugegeben und die Lösung für 20 Sekunden durch sehr starkes Schütteln schaumig geschlagen. Nach sofortiger Zentrifugation bei 4200rpm und Raumtemperatur für 10 Minuten, wurde der Überstand vorsichtig zu 40ml 99,6% Ethanol gegeben. Durch leichtes Schwenken wurde nun die DNA präzipitiert und das als weißer

Faden sichtbare Präzipitat mit einer Pipette in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol und anschließendem Trocknen des DNA-Pellets für 15 Minuten im Exsikkator erfolgte die Aufnahme der DNA in 500µl 1xTE. Nach Lösung der DNA für 24 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte schließlich die Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades bei 260, 280 und 320 nm im Photometer.

3.3.1.2 Isolation von DNA aus Vollblut durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Die mittels dieser Methode gewonnene DNA zeigt keine Degradationsanzeichen, ist aber aufgrund ihrer hohen Viskosität nur schwer zu dosieren. Dies kann zu Problemen vor allem bei der Verwendung in der PCR führen und aufgrund der Verwendung von Phenol/Chloroform ist diese Technik als umweltbelastender zu bezeichnen.

Für die Isolation wurden frische oder aufgetaute Proben verwendet. Das Vollblut wurde in einem Volumen von 5-10ml bei 5000rpm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Nach Aufnahme des Leukozyten-enthaltenden Pellets in 10ml 0,8% TritonX100 in 0,9% NaCl folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 25 Minuten bei 15000rpm und 4°C. Das Pellet wurde nun in 5ml Lysispuffer (0,2M Tris-HCl, pH 8; 0,05M EDTA; 1% SDS; 0,5µg Proteinase K) resuspendiert und bei 60°C für 60 Minuten inkubiert. Die DNA-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Phenol mit anschließendem leichtem Schütteln und Zentrifugation für 5 Minuten bei 6000 rpm. Nach Abnahme der wässrigen Phase wurde dieser Schritt jeweils mit ½ Volumen Phenol, ½ Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und mit 1 Volumen Chloroform (Chloroform + Isoamylalkohol, 24:1) wiederholt. Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von 2 ½ Volumen 99,6% Ethanol zur wässrigen Phase unter leichtem Schwenken. Die weitere Vorgehensweise entspricht der oben beschriebenen Methodik.

3.3.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktionen wurden je nach Ziel in einem Volumina von 20-100µl in speziellen dünnwandigen 0,5ml Cups durchgeführt. Zu diesem Zweck stand ein Gene Amp 2400 PCR System der Firma Perkin Elmer, Langen, zur Verfügung.

3.3.2.1 DNA

Als Template dienten je nach Ziel der Amplifikation genomische DNA oder Plasmid DNA. In einem Gesamtansatz von 100µl betrug die DNA-Menge 1µg genomische, bzw. 500ng Plasmid- DNA. Dies entspricht ca. $10E^6$ bis $10E^7$ Molekülen.

Die genomische DNA wurde zwecks genauerer Dosierung als Verdünnung aus den Isolaten eingesetzt.

3.3.2.2 Primer

Die Auswahl der spezifischen Primer für die unterschiedlichen Zielsetzungen wurde nach bestimmten Kriterien durchgeführt, wobei das Programm Primerselekt aus dem Gesamtpaket DNASTar zur Anwendung kam. Folgende Hauptkriterien wurden dabei beachtet, wobei oft Kompromisse hinsichtlich der einzelnen Anforderungen gemacht werden mußten, um bestimmte Genabschnitte abzudecken:

- durchschnittliche Länge von 16-24 Basenpaare
- mittlere Schmelztemperatur (T_m) von $(2 \times (A+T) + 4 \times (G + C)) = 60^\circ C$
- GC-Anteil von ca. 50-60%
- maximal drei gleiche Basen hintereinander
- keine Haarnadelstrukturen von mehr als vier Basen
- kein Annealing der beiden im Paar verwendeten Primer von mehr als 4 nebeneinander liegenden Basen
- kein Annealing der beiden primer im Bereich der letzten 4 Basen am 3'Ende

Die Basissequenz des Genes schränkte die Auswahl nach diesen Kriterien oftmals sehr ein, so daß Modifikationen vor allem hinsichtlich des GC-Anteils und der T_m nötig waren um alle gewollten Abschnitte zu erfassen.

Die Synthese der Primer wurde von der Firma Roth, Karlsruhe, durchgeführt.

3.3.2.3 Polymerasen, Ionenmilieu und Nukleotide

Verschiedene Polymerasen kamen in einer Konzentration von 2,5–5Units pro 100 μ l Gesamtansatz zum Einsatz. Es wurden vor allem die thermostabilen Taq- und Vent (exo)-Polymerasen der Firma MBI eingesetzt.

Die mitgelieferten Puffer mit 20mM Tris-HCL und 16mM (NH₄)₂SO₄ wurden zum Einstellen des Ionenmilieus benutzt. Die Magnesiumkonzentration wurde für die einzelnen Reaktion variiert, und sie betrug zwischen 1,5-4,5mM. Die Puffer wurden als 10x Puffer benutzt, das verwendete Wasser war doppelt destilliert und autoklaviert.

Die Nukleotide wurden in einer Konzentration von 10nm/100 μ l eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei –20°C als 10mmolarer Stock.

3.3.2.4 Reaktion

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit unterschiedlichen Temperaturen in verschiedenen Abschnitten durchgeführt. Der erste Schritt bestand in der vollständigen Denaturierung der DNA bei 92-96°C für 2-5 Minuten, die DNA Synthese erfolgte in 25-35 Zyklen bei unterschiedlichen Temperaturen.

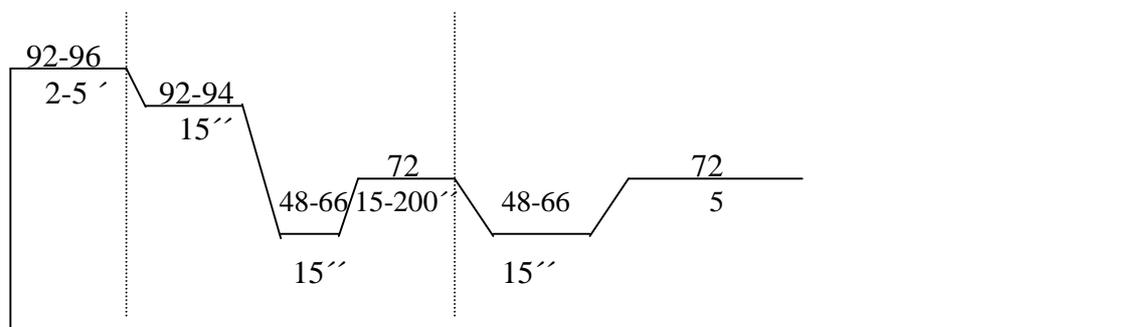


Abb. 8: PCR-Bedingungen

Die Annealing-Temperatur wurde anhand der verwendeten Primer (T_m) ausgewählt und auf 15 Sekunden eingestellt. Sie lag immer zwischen 48 und 66°C, wobei oft versuchsweise mit der niedrigsten Temperatur angefangen wurde um sich dann schrittweise den Idealbedingungen zu nähern.

Die Dauer der Extensionstemperatur von 72°C richtete sich nach der Länge des Amplifikats bei vorausgesetzter Syntheseleistung von 1000bp/Minute, und sie betrug zwischen 15 und 200 Sekunden.

Die entstandenen Amplifikate wurden zu Beginn jedes Zyklus jeweils bei 92-94°C erneut denaturiert um als Template dienen zu können.

Zum Abschluß der gesamten Reaktion wurde noch einmal für 15 Minuten die Annealing-Temperatur und für 5 Minuten die Extensionstemperatur eingestellt um die Synthese aller Stränge als Doppelstrang zu gewährleisten. Die Proben wurden dann bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert.

3.3.2.5 Ergebniskontrolle

Die Kontrolle der Amplifikate erfolgte in 0,7-3,5% Agarosegelen, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit und die Dichte mit einem geeigneten Marker kontrolliert wurden.

3.3.3 Isolation eines Genes aus einer genomischen Genbank vom Schwein

3.3.3.1 Herstellung einer spezifischen Sonde zum Screenen der Genbank

3.3.3.1.1 Amplifikation eines geeigneten Sequenzabschnittes des gesuchten Genes

Als Ausgangsmaterial für die Sonde diente ein mittels PCR amplifizierter Sequenzabschnitt aus einem Exon des Genes. Die dazu eingesetzten Primer wurden aus Homologievergleichen zwischen Maus und Mensch abgeleitet und synthetisiert um eine größtmögliche Übereinstimmung auch zum porcinen Gen zu gewährleisten. Als Template diente eine genomische, aus Vollblut isolierte DNA vom Schwein. Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Das entstandene Amplifikat wurde einer Sequenzanalyse unterzogen um die eindeutige Zuordnung zum gesuchten Gen zu gewährleisten. Dieses Amplifikat diente nun als Ausgangsmaterial für die radioaktive Markierung.

3.3.3.1.2 Radioaktive Markierung des Amplifikats mittels der Oligo-Labeling-Methode

Das amplifizierte Sondenmaterial wurde mit ^{32}P -dCTP (10Mbq, Hartmann Analytic) wie folgt markiert :

25ng der Sonden-DNA wurden denaturiert (95°C 10min.; Eis 2min.) und anschließend mit einer vorgefertigten Reaktionslösung (Oligonucleotid-Primer, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase, dNTP's mit dCTP ^{32}P) bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Nach erfolgter

Markierung wurde die markierte DNA von den nicht eingebauten Nukleotiden durch Aufreinigung über eine Säule getrennt und anschließend die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen sowie die spezifische Aktivität der Sonde und die Anzahl der eingebauten Isotope bestimmt.

3.3.3.2 Screenen der Genbank

Für die Isolation der Sequenzabschnitte des gesuchten Gens stand eine λ -Phagen Genbank der Firma Stratagene zur Verfügung.

Die Transfektion erfolgte mit Bakterien des Stammes MRA. Diese Bakterien wurden in LB-Medium mit MgSO_4 und 20% Maltose bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD} = 0,4$ angezüchtet, dann bei 3000rpm 10 Minuten abzentrifugiert und schließlich mit 10mM MgSO_4 auf eine OD von 0,5 eingestellt.

Zum Ausplattieren wurden 150mm Agarplatten verwendet, die mit NZY-Medium (NaCl, MgSO_4 , Select Yeast Extract, Casein Hydrolysate Peptone) vorbereitet waren.

3.3.3.2.1 Vorbereitungen: Titrieren der Phagen, Bestimmung des Dichtewachstums

Als Vorbereitung zum eigentlichen Ausplattieren der Genbank für das Screenen mußte als Erstes der aktuelle Titer der Phagen sowie deren Wachstumsbedingungen bestimmt werden.

Die Bestimmung dieser Parameter ist wichtig um zu gewährleisten, daß die Plaques auf den Agaroseplatten nicht zu dicht wachsen und gegeneinander abgrenzbar zu bleiben, aber der Einzelplaque trotzdem groß genug wird. Wenn die Phagendichte auf den Platten nicht zu hoch gewählt wird, kann man davon ausgehen, daß alle Phagen innerhalb eines Plaques vom gleichen Ausgangsphagen abstammen und damit alle das gleiche klonierte DNA-Fragment enthalten. Die hierfür angegebene Solldichte beträgt 5×10^4 /Platte.

Der Titer der Phagen wurde wie folgt bestimmt: Von dem Phagenmaterial der Genbank wurde eine Verdünnungsreihe ($10E^{-2}$ bis $10E^{-6}$) mit SM-Medium (NaCl, 1M MgSO_4 , Tris-Puffer) angelegt. Die Transfektion erfolgte in sterilen Falconröhrchen mit Bakterien des Stammes MRA, wobei je 10 μl der entsprechenden Verdünnung mit 200 μl der vorbereiteten Bakterien ($\text{OD} = 0,5$; aufgenommen in 10mM MgSO_4) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der Bakterien mit Top-Agar (55°C) auf 90mm Agarplatten (NZY-Medium). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die entstandenen Plaques ausgezählt und so der Titer bestimmt. Der

aktuelle Titer der Genbank betrug $0,9 \times 10^6/\mu\text{l}$. Anschließend wurde die optimale Wachstumszeit zum Erreichen der richtigen Plaquegröße durch nochmaliges Ausplattieren der Genbank auf zwei 150mm Agarplatten in einer Solldichte von $5 \times 10^4/\text{Platte}$ ermittelt. Hierzu wurden $1,4\mu\text{l}$ einer 1/10 Verdünnung der Genbank mit $1,2\text{ ml}$ ($600\mu\text{l}/\text{Platte}$) Bakterien wie bereits beschrieben ausplattiert. Nach ca. 5 Stunden wurde die Plaquegröße in regelmäßigen Abständen kontrolliert und so die optimale Wachstumszeit festgelegt.

3.3.3.2.2 Ausplattieren der Genbank; Übertragen des Phagenmaterials auf Nitrozellulosefilter

Um zu gewährleisten, daß ein möglichst repräsentativer Teil der Genbank gescreent werden konnte, mußte eine möglichst große Anzahl an Platten ausplattiert werden. Es wurden 25 150mm Agaroseplatten mit NZY-Medium zum ausplattieren vorbereitet

Das nötige Genbankmaterial wurde anhand der Solldichte ($5 \times 10^5/\text{Platte}$) und des in der Vorbereitung bestimmten Titers von $0,9 \times 10^6$ ausgerechnet. Für 25 Platten mußten $1,39\mu\text{l}$ Genbank und 15ml Bakterien (MRA; OD = 0.5; in MgSO_4) verwendet werden. Zur Transfektion wurden die Bakterien mit der Genbank vermischt und anschließend auf 25 sterile Falconröhrchen verteilt, die dann 15 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die Agaroseplatten wurden warmgestellt (37°C). Der zum Ausplattieren verwendete Top-Agar ist auf ca 55°C vorgewärmt worden. Beim Ausplattieren wurden dann mit einer sterilen Glaspipette 8ml Top-Agar zu jedem Falconröhrchen gegeben, durch vortexen vermischt, unter Vermeidung von Luftblasen auf die vorgewärmten Agaroseplatten gegossen und durch leichte Schwenkbewegungen verteilt. Die fertigen Platten wurden dann nach dem Trocknen bei 37°C für 7 Stunden inkubiert. Nach Vollenden der Inkubationszeit wurden die Platten in den Kühlschrank gestellt.

Der nächste Schritt bestand nun in der Übertragung des Phagenmaterials auf Nitrozellulose-Membranen, dem sogenannten Plaque-Lifting. Sind die Phagen auf diese Membranen übertragen, können nach Abwaschen der Proteinbestandteile die gesuchten DNA-Fragmente mittels radioaktiv markierter Sonden gekennzeichnet werden. Diese Methode wird als Plaque-Lift-Hybridisierung bezeichnet.

Verwendet wurden für das Plaque-Lifting Nitrozellulose-Filter der Firma Sartorius. Pro Platte wurden zwei Filter verwendet, um falsch-positive Signale beim späteren Hybridisieren auszuschließen. Diese Filter wurden nacheinander auf die Platten aufgelegt und markiert.

Nach ca. 3 Minuten wurden sie vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und zum Abwaschen der Proteinbestandteile und zum Denaturieren der DNA-Fragmente nacheinander in folgende Lösungen überführt :

Denaturierungslösung (1,5M NaCl , 0,5M NaOH); 7 Min.

Neutralisierungslösung (1,5M NaCl , 0,5M Tris , 0,001M NaEDTA); 10 Min.

2 x SSC (0,3M NaCl , 0,03M NaCitrat); 5 Min.

Nach dem Trocknen der Filter wurde die DNA durch Hitzeeinwirkung (2 Stunden, 80°C) irreversibel an die Nitrozellulose- Membranen gebunden.

3.3.3.2.3 Plaque-Lift- Hybridisierung

Nach dem Übertragen des Phagenmaterials auf Nitrozellulose-Filter folgte der Schritt der Hybridisierung dieser Filter mit einer spezifischen Sonde für die gesuchten Genabschnitte. Falls die Sonde aufgrund einer Sequenzkomplementarität an eines der klonierten DNA-Fragmente bindet, zeigte sich dies als deutliche schwarze Markierung nach Exprimieren der Filter auf Röntgenfilm, da jedes Fragment in einem der Plaques millionenfach vermehrt vorliegt. Die Synthese und Markierung der Sonde erfolgte wie bereits beschrieben kurz vor dem eigentlichen Hybridisierungsschritt. Die Hybridisierung erfolgte nach dem Prinzip einer Southern-Blot-Hybridisierung mit dem Unterschied, daß die Filter zum Abwaschen von etwaigen Agaroseresten erst in einer Prewash-Lösung (50mM Tris; 1M NaCl; 1mM EDTA; SDS 0,01%) vorgewaschen wurden (1 Stunde, 42°C). Anschließend wurden die Filter kurz in 6x SSC-Lösung zwischengelagert. Die Vorhybridisierung erfolgte, wie auch die Hybridisierung in einem Hybridisierungsofen mit drehbaren Zylindern bei 42°C.

Hierzu wurden die Filter luftblasenfrei auf die Hybridisierungszylinder verteilt, wobei die markierte Seite nach außen zeigte. In einem Zylinder fanden je 5 Filter Platz ohne sich gegenseitig zu überlappen. Die Vorhybridisierung wurde mit je 30ml Hybridisierungslösung (6x SSC ; 5 x Denhardt ; 50% Formamid ; 0,1% SDS ; H₂O) je Zylinder bei 42°C für 2-3 Stunden durchgeführt. Dann wurden 50ml Hybridisierungslösung mit der markierten und zuvor denaturierten (95°C 4min., Eis 2min.) Sonde vermischt und auf die Zylinder verteilt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C.

Zum Vermeiden von falsch positiven Signalen und zum Verhindern einer zu hohen Hintergrundmarkierung mußten die Filter nach dem Hybridisierungsschritt mehreren Waschschritten unterzogen werden um die nicht gebundene Radioaktivität zu entfernen. Dabei

entschied die Waschzeit sowie die Waschtemperatur über das Entfernen mehr oder weniger unspezifischer Bindungen der Sonde. Die Waschschriffe erfolgten in drei verschiedenen Lösungen mit unterschiedlichen Temperaturen. Als Erstes wurden die Filter in einer Schale mit Waschlösung 1 (2x SSC; 0,1% SDS) bei 45°C für 20 Minuten im Wasserbad leicht geschüttelt. Dieser Waschschriff wurde dreimal mit jeweils frischer Lösung wiederholt. Danach wurden die Filter in Waschlösung 2 (0.1 % SDS ; 0.1 x SSC) bei 68°C für 20 Minuten geschwenkt. Die Filter wurden anschließend mit einem Geigerzähler auf die verbleibende Radioaktivität untersucht um erforderlicher Weise den letzten Waschschriff wiederholen zu können. Nachdem nur noch vereinzelt Signale mit dem Geigerzähler feststellbar waren, wurden die Membranen in 2 x SSC bei Raumtemperatur gelagert.

Die Signale der Filter wurden anschließend in Röntgenkassetten exprimiert. Hierzu wurden die Filter in Plastikfolien wasserdicht eingeschweißt und für 1-3 Tage bei -70°C exprimiert. Nach dem Entwickeln der Filme konnten dann die einzelnen Signale begutachtet werden. Hier hat es sich als sehr hilfreich erwiesen, daß von jeder Agaroseplatte zwei identische Filter vorhanden waren, da so die spezifischen Signale durch Vergleich der beiden Filter besser lokalisiert werden konnten. Alle möglichen Positivsignale wurden als Punkte auf den Filmen markiert und nummeriert.

3.3.3.2.4 Eingrenzen der positiven Plaques

Durch direkten Vergleich der Agaroseplatten mit den exprimierten Filtern konnten die Plaques die ein positives Signal ergeben hatten genau identifiziert werden. Die entsprechenden Stellen wurden auf den Agaroseplatten markiert und das zum Hybridisierungssignal gehörige Areal wurde mit einer Kapillare aus dem Agar ausgestochen und in ein vorbereitetes Eppendorf-Cup mit 500µl SM-Medium und 70µl Chloroform überführt. Die Phagen diffundieren bei Raumtemperatur aus dem Agarosepellet in das SM-Medium und sind durch das beigefügte Chloroform in dieser Form monatelang haltbar.

Die weitere Vorgehensweise bestand nun darin, durch ein nochmaliges Ausplattieren der positiven Phagen und durch einen zweiten Hybridisierungsschriff die falsch-positiven Phagen zu eliminieren und aus den gepickten Arealen die Einzelplaques zu isolieren. Auch hier war der Phagentiter sehr wichtig um zu verhindern, daß die Plaques sich nach dem nochmaligen Ausplattieren überlappen und nicht mehr gegeneinander abgrenzbar sind. Der angenommene Titer betrug hier 1×10^5 bis 1×10^7 /ml SM-Medium. Die Plaquedichte sollte viel geringer

als beim Ausplattieren der Genbank sein, da Einzelplaques differenziert werden müssen. Versuchsweise wurden zwei Verdünnungsstufen ($10E^{-5}$ und $10E^{-6}$; $10\mu\text{l}$) des herausdiffundierten Phagenmaterials auf 90mm Agarplatten nach der beschriebenen Methode ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C . Die $10E^{-5}$ Verdünnungsstufe zeigte die erwünschte Plaquesdichte von mehr oder weniger 200/Platte.

Das Plaque-Lifting und der Hybridisierungsschritt wurden nach der beschriebenen Methode durchgeführt, wobei die beim ersten Hybridisierungsschritt eingefrorene Hybridisierungslösung nach vorherigem Denaturieren ($10\text{min. } 70^{\circ}\text{C}$) nochmals verwendet wurde. Nach Exprimieren der Filter in Röntgenkassetten konnten die positiven Signale auf zwei beschränkt werden. Die korrespondierenden Plaques wurden wie bereits beschrieben aus dem Agar ausgestochen und in SM-Medium überführt.

Dieses Phagenmaterial der Einzelplaques lieferte nun das Ausgangsmaterial für eine weitere Differenzierung der darin enthaltenen DNA-Fragmente.

3.3.3.2.5 Anlegen eines High-Titer-Stocks

Das Anlegen eines High-Titer Stocks von einem Plattenlysat bildet die Grundvoraussetzung für die weiteren Arbeiten.. Hierzu wurde das Phagenmaterial der positiven Klone auf 150mm Agaroseplatten nach bekannter Methode ausplattiert, wobei zur Transfektion $20\mu\text{l}$ des SM-Phagenmaterials verwendet wurden. Die gewählte Dichte war hier nicht mehr so wichtig, da es sich um Einzelplaques handelte und man eine möglichst große Anzahl an Plaques anstrebte. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Platten am nächsten Tag mit 5ml SM-Medium überschichtet und für 1-2 Stunden im Schüttelinkubator bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Dabei diffundierten die Phagen aus den Plaques in das SM-Medium. Das SM-Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein steriles Falconröhrchen mit $700\mu\text{l}$ Chloroform gegeben.

Es wurden nochmals 2ml SM-Medium auf die Platten gegeben und nach weiteren 30 Minuten abgenommen. Dieser High-Titer Stock bildete nun die Grundlage für die weitere Isolation und Differenzierung der darin enthaltenen DNA-Fragmente und war in dieser Form monatelang haltbar.

Zur weiteren Verwendung mußte der genaue Titer des Stocks bestimmt werden. Es wurden 20µl verschiedener Verdünnungsstufen auf 90mm Platten ausplattiert, die entstandenen Plaques ausgezählt, und so die Titer bestimmt.

3.3.3.2.6 Ergebniskontrolle

Um die eindeutige Zugehörigkeit der in den Phagen klonierten DNA zu dem gesuchten Gen zu

überprüfen, wurde die DNA vorerst in kleiner Menge aus den Phagen zu isoliert und mit den für die Sonde synthetisierten Primern in einer PCR eingesetzt. Die Isolation aus den Phagen erfolgte mit einem Isolierungskit der Firma Quiagen. Die isolierte DNA wurde dann mit den spezifischen Primern in eine PCR eingesetzt. Die Bedingungen entsprachen denen der Sondenamplifikation. Das Amplifikat wurde auf einem 1% Agarose-Gel mit einer 100bp-Leiter als Marker aufgetrennt.

3.3.3.2.7 Isolierung des Genmaterials aus dem High-Titer Stock

Um eine ausreichende Menge an DNA für die weiteren Arbeiten zu haben, mußte das Genmaterial aus den Lambda-Phagen isoliert werden. Dazu wurden aus dem High-Titer Stock 1×10^8 Phagen mit 2×10^9 Bakterien des Stammes MRA in LB-Medium (Maltose, Glukose) bei 37°C und 220rpm inkubiert. Nach einem Anstieg der optischen Dichte auf ca 1-1,2 (7-9 Stunden) kam es, bedingt durch die vermehrte Transfektion der Bakterien, zu einem Abfall der optischen Dichte auf 0,2-0,3. Bei Erreichen dieses Wertes konnte mit der eigentlichen Isolierung begonnen werden.

Zuerst wurden die Proben nach Zugabe von 2ml Chloroform 10 Minuten weitergeschüttelt, danach nach Zugabe von 6g NaCl eine Stunde auf Eis ruhen gelassen und schließlich die Bakterienwandbestandteile bei 9250rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Gefäß umgefüllt und mit 10g Polyethylenglykol eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 9000rpm für 10 Minuten wurde das Pellet in 8ml LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 150µl 3% Gelatine/0,1% Na-Azid-Lösung und DE 52 (Whatman) wurde die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt und schließlich bei 3000rpm abzentrifugiert bis der Überstand klar war. Es wurden nun 400µl EDTA sowie 50µl Proteinase K zugefügt und die Probe bei 45°C für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 200µl 5% CTAB/10% NaCl erfolgt ein weiterer Inkubationsschritt bei

68°C für 3 Minuten. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten bei 13000rpm wurde die DNA mit NaCl und Ethanol abs. gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70% ETHO und anschließendem Trocknen erfolgte die Lösung der DNA in 50µl 1x TE-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur. Durch die Messung der optischen Dichte am Photometer bei 260 bzw. 320 nm wurde die Konzentration der Probe bestimmt.

3.3.4 Restriktionsverdaus

Die Restriktionsenzyme zur enzymatischen Spaltung von DNA wurden in einer Konzentration von 1-2,5Units/µg DNA eingesetzt, wobei eine Überschreitung von 10% des Gesamtvolumens des Ansatzes vermieden wurde. Mit Hilfe der mitgelieferten 10x Puffer wurde das erforderliche Ionenmilieu eingestellt. Des weiteren wurde je nach Reaktion 0,1mg pro ml BSA, sowie zur Stabilisierung 10% Spermidin zugegeben.

3.3.5 Southern-Blot-Hybridisierung

Die genaue Lokalisierung der gesuchten DNA-Abschnitte in der recht umfangreichen Phagen-DNA erfolgte mittels Southern-Blot-Hybridisierung.

3.2.5.1 Southern-Transfer

Für den Transfer wurde die Phagen-DNA mit verschiedenen Enzymen gespalten, wobei jeweils 10µg DNA zum Einsatz kamen. Die verdaute DNA wurde dann elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt (30V, 20 Stunden), denaturiert und auf eine Nylonmembran transferiert.

Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel 30 Minuten in Denaturierungspuffer (1,5M NaCl; 0,5M NaOH) bei 50rpm geschüttelt. Nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Inkubation in Neutralisierungspuffer (1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl, PH7,2) für weitere 15 Minuten.

Die Transfervorrichtung wurde wie folgt aufgebaut: In eine Plastikschaale mit einer Glasplatte als Brücke wurde Transferpuffer (0,25M NaOH; 1,5M NaCl) gefüllt, auf die Glasplatte 3 Lagen Whatman 3MM Papier gelegt, die zu beiden Seiten in den Transferpuffer reichten. Das Gel wurde auf das Whatman-Papier aufgelegt, mit einer Pinzette die genau zurechtgeschnittene Nylonmebran (Hybond-N, Amersham) blasenfrei aufgelegt und mit 3 weiteren Lagen angefeuchtetem Whatman-Papier, einem 20cm hohen Stapel aus

Papierhandtüchern und einem 500g schweren Gewicht bedeckt. Der Transfer wurde für 10-16 Stunden durchgeführt. Nach Markierung der Ladeschächte und der Orientierung wurde die Membran vorsichtig entfernt und 2 Stunden bei 80°C inkubiert um die DNA irreversibel zu binden.

3.2.5.2 Markierung der Sonde

Die Hybridisierung wurde mit einer durch Nick-Translation radioaktiv (^{32}P dCTP, 50 μCurie) markierten humanen c-fos-Sonde durchgeführt. Dabei wurde ein Nick Translation Kit der Firma Boehringer Mannheim verwendet.

100ng der c-fos-Sonde wurden mit jeweils 1 μl dATP, dGTP, dTTP sowie 2 μl 10x Puffer und 2 μl Enzym-Mixtur zusammenpipettiert und mit H_2O dest. auf ein Volumen von 17,5 μl eingestellt. Nach Zugabe von 2,5 μl ^{32}P cdCTP wurde die Probe eine Stunde bei 15°C inkubiert.

Die freien, von der radioaktiv markierten Gensonde nicht eingebauten Nukleotide wurden dann durch Säubern der Probe über eine Nick-Säule (Nick Columns, Pharmacia) entfernt. Dabei entstand durch Zugabe von 1x TE-Puffer, pH7,6, ein Endvolumen von 450 μl radioaktiv markiertem Genmaterial. Durch Zugabe von 300 μl Salmon Testes Sperm zu der radioaktiv markierten Gensonde und anschließender 10minütiger Inkubation bei 100°C wurden die nicht markierten Sondenfragmente gebunden. Danach wurde die Probe bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

3.2.5.3 Vorhybridisierung, Hybridisierung, Exprimieren

Die Hybridisierungsreaktionen wurden in einem Folienschlauch mit 40ml Hybridisierungsmix (20ml Formamid, 8ml 50% Dextransulfat, 10ml H_2O dest., 2ml 20% SDS) durchgeführt. Nach Entfernen aller Luftblasen erfolgte die Vorhybridisierung der transferierten Filter bei 42°C für 1-2h im Wasserbad. Die Hybridisierung erfolgte nach Zugabe der frisch markierten Sonde für 12h bei 42°C.

Es folgten mehrere Waschstreps zur Entfernung der überschüssigen, unspezifisch gebundenen DNA. Dazu wurde die Membran in 200ml Waschlösung (1xSSC, 0,5% SDS) zweimal 30 Minuten bei 68°C leicht geschüttelt und anschließend kurz in 0,2x SSC geschwenkt. Das Exprimieren der Filter erfolgte für 30-60 Minuten im Phosphorimager.

Die dabei markierten DNA-Fragmente bilden die Grundlage für die folgende Umklonierung in Plasmidvektoren.

3.3.6 Präparation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente aus Restriktionsverdau oder PCR-Ansätzen mußten für die weitere Verarbeitung aufgereinigt werden. Dabei richteten die Anforderungen an die Reinheit der DNA sich nach dem Weiterverwendungszweck.

3.3.6.1 Aufreinigung über präparative Gele

Zum Einsatz in Ligationsreaktionen bestimmte DNA-Fragmente wurden über eine Low-Melting Agarose aufgetrennt, bei 320nm auf dem UV-Leuchttisch ausgeschnitten, für 10 Minuten bei 68°C geschmolzen, und schließlich nach Abkühlen auf 37°C direkt aus dem Gel eingesetzt.

Für alle weiteren Zwecke, insbesondere für die Sequenzierung, wurde die DNA über 0,7% Agarosegele aufgetrennt und die entsprechenden Gelstücke wie oben beschrieben ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAEXII Gel-Extraktions Kit der Firma Quiagen, Hilden.

Die extrahierte DNA wurde zusätzlich mit Butanolfällung oder Ethanol aufgereinigt, das Pellet wurde in 20µl 1x TE Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Verfahren.

3.3.6.2 Aufreinigung aus flüssigen Ansätzen

Die Aufreinigung aus flüssigen Ansätzen erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden, der Butanolfällung und der Phenol/Chloroform-Aufreinigung.

Bei der Butanolfällung wurden jeweils 100µl DNA in H₂O mit 1ml Butanol vermischt und präzipitiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 4 Minuten bei 13000rpm und schließlich die Lösung des DNA-Pellets in 20µl 1xTE.

Die zweite Methode bestand in der Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform mit Abnahme der wässrigen Phase nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 11000rpm. Die DNA wurde dann durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat und 2½ Volumina Ethanol abs. gefällt und durch zweimaliges Waschen in 70% Ethanol zusätzlich aufgereinigt.

Nach leichtem Trocknen wurde das DNA-Pellet in 20µl 1x TE Puffer aufgenommen.

3.3.7 Erstellen von Plasmidklonen

Für die weiteren Arbeiten eigneten sich Plasmidvektoren aufgrund ihrer Eigenschaften viel besser als Lambda-Phagen. So ermöglichen sie durch die Antibiotika-Resistenz und vor allem durch die Lac-Z-Inaktivierung eine direkte Selektion rekombinanter Plasmide. Die Sequenzierung der Insert-DNA kann sofort in den Plasmid-Vektoren durchgeführt werden. Der einzige Nachteil besteht in der geringen Länge von maximal 5 kbp der klonierbaren DNA, was jedoch in den meisten Fällen keine Rolle spielt. Als Ausgangsmaterial für die Klonierungen und Subklonierungen dienten verschiedene Genbankklone nach restriktiven Verdaus sowie PCR-Amplifikate die nicht direkt aus der PCR sequenziert werden konnten.

3.3.7.1 Ligation

Die Ligationen erfolgten in den zuvor linearisierten Plasmid-Vektoren pBlueskript KS+ oder pUC19. Die Selektion rekombinanter Plasmide erfolgt durch die Inaktivierung der Lac-Z-Region, was die Entstehung von weißen Kolonien auf Ampicillin-xGal-Platten zur Folge hat. Für die Ligationsreaktionen wurden Insert-DNA und Vektor-DNA in einem Verhältnis von 4:1 eingesetzt.

Der Vektor wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert und die Enzyme durch 10minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die Insert-DNA wurde direkt nach der Auftrennung aus einem 0,6% Low-Melting Gel verwendet. Die eigentliche Ligation wurde wie folgt durchgeführt. Erst wurden die verdauten DNA-Proben zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme bei 70°C, 10 Minuten inkubiert. In ein steriles Eppendorf-Cup wurden anschließend Vektor-DNA und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:4 pipetiert und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10µl eingestellt. Dieser Ansatz wurde dann zur besseren Durchmischung 10 Minuten, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4µl 5x Ligase-Puffer, 5µl H₂O und 1µl T4 DNA-Ligase (1 Unit) der Firma Gibco BRL dazugegeben. Nach gutem Durchmischen und kurzem Anzentrifugieren wurden die Ansätze bei 16°C für 12-16 Stunden inkubiert.

3.3.7.2 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente E.coli Zellen (subcloning efficiency DH5α , Gibco BRL) verwendet. Die Ligationsansätze wurden bei 68°C 10min. inkubiert und mit 1x

TE-Puffer 1:3 verdünnt um die für die Zellen störenden Inhaltsstoffe zu minimieren. Dann wurden 6µl des verdünnten Ligationsansatzes zu 50µl der kompetenten Zellen gegeben und gemischt. Nach 30 Minuten auf Eis folgte die Inkubation der Ansätze für 20 Sekunden bei 37°C und anschließend nochmal für 2 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 450µl LB-Medium wurden die Proben dann bei 37°C 1 Stunde geschüttelt und schließlich auf LB-Ampicillin-xGal-Agaroseplatten in verschiedenen Konzentrationen mit sterilen Glasspateln ausgestrichen.

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten dann die erfolgreich transformierten, rekombinanten Plasmide in Form von weißen Bakterienkolonien auf den Platten identifiziert werden.

3.3.8 Präparation der Plasmid-DNA

Zur Verwendung für alle weiteren Arbeiten (Restriktionsverdaus; Sequenzierungen), mußte die klonierte DNA in möglichst reiner Form aus den Bakterien isoliert werden.

Als Ausgangsmaterial für die Präparation von Plasmid-DNA diente die gesättigte Kultur einer isolierten weißen Kolonie in LB-Medium.

3.3.8.1 Minipräparation

Vor der eigentlichen Präparation in größeren Mengen erfolgte eine Vorabanalyse der klonierten DNA, bestehend aus der Isolation geringer Mengen Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Miniprep., BIRNBOIM und DOYLE, 1979) mit anschließender Überprüfung der Länge des klonierten Fragmentes.

Dazu wurde eine gewisse Anzahl weißer Kolonien einzeln mit einem sterilen Zahnstocher aus den Agaroseplatten gepickt und in Cups mit jeweils 2ml LB-Medium und 10µl Ampicillin (20mg/ml) überimpft. Diese Ansätze wurden über Nacht bei 37°C und 170rpm geschüttelt.

Für die eigentliche Isolation wurden die Bakterien aus 1,5ml gesättigter Kultur für 30 Sekunden bei 11000rpm abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 100µl Lösung I (50mM Glukose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA) resuspendiert. Nach vollständigem Lösen des Pellets durch Vortexen und 5minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 20µl Lösung II (0,2N NaOH, 1%SDS) mit anschließendem Mischen und 5minütiger Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 150ml Lösung III (60ml 5M Kac, 11,5ml Essigsre., 28,5ml H₂O) und weiteren 5 Minuten auf Eis wurden die Zellwandbestandteile und Fremdproteine durch zweimaliges Zentrifugieren für

5 Minuten bei 11000rpm entfernt. Die DNA wurde schließlich mit ETHO abs. präzipitiert und bei 14000rpm. abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit ETHO 70% und anschließendem Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur wurde die DNA in 20µl 1x TE-Puffer gelöst.

Die so isolierte DNA wurde dann mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut (37°C, 1 Stunde) und auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Dabei konnten die positiven und negativen Klone anhand der Länge der Inserts unterschieden werden.

Infolge dieser Resultate konnten die entsprechenden positiven Bakterienstämme für die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (Maxiprep.) in 10ml LB-Medium mit 10µl Ampicillin pro 100µl Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 170rpm inkubiert werden.

3.3.8.2 Plasmidmaxipräparation

Die infolge der Minipräparation angeimpfte Kultur bildete das Ausgangsmaterial für die Präparation großer Mengen der gewünschten DNA.

Die Präparation der DNA erfolgte mit einem Plasmid-Mini-Kit der Firma Qiagen. Dabei wurden 3-5ml der gesättigten Kultur eingesetzt, der Rest als Stock (je 850µl Kultur + 150µl Glycerin) bei -70°C eingefroren, um für neue Präparationen zur Verfügung zu stehen.

Die Ausbeute der Präparationen wurde photometrisch bestimmt. Die so isolierte DNA eignete sich aufgrund ihres höheren Reinheitsgrades gut für die weiteren Manipulationen.

3.3.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte teils sofort im Plasmid, teils direkt an den PCR-Produkten mit Hilfe spezifischer Primer, wobei jeweils vom 3`- und vom 5`- Ende her sequenziert wurde. Dabei konnten jeweils bis zu 450 Nukleotide erfaßt werden.

Für die Sequenzierung im Plasmid mußte die DNA durch verschiedene Restriktionsverdaus fragmentiert werden. Diese Fragmente wurden dann subkloniert und dienten als Ausgangsmaterial für die Sequenzierungsreaktionen. Als Primer dienten hier der M13

Universal Sequencing Primer mit der Sequenz 5'-GTAAAACGACGCCAGT-3' und der Reverse Sequencing Primer mit der Sequenz 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'. Die Sequenzinformationen wurden durch Computeranalyse und Homologievergleiche zu anderen Spezies analysiert.

Um verschiedenen Sequenzierungslücken zu schließen sowie als Kontrolle bereits vorhandener Sequenzinformationen, wurden etliche Sequenzierungen direkt an PCR-Amplifikaten mit sequenzspezifischen Primern durchgeführt. Die DNA wurde zu diesem Zwecke wie oben beschrieben aufgereinigt und die genaue Konzentration des Eluates photometrisch bestimmt.

Die Sequenzierung erfolgte nach der Chain-Termination-Methode (SANGER und COULSON, 1979), wobei die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff erfolgt.

Die einzelnen Ansätze wurden mit einem Sequenzierungskit der Firma Perkin-Elmer wie folgt vorbereitet: In ein PCR-Cup wurden 8µl Enzym-Mix (Polymerase, dNTP's, ddNTP's), 0,5µl M13-Primer (for., rev.), sowie die zu sequenzierende DNA in einer Konzentration von 7ng pro 100bp in einem Gesamtvolumen von 20µl pipettiert. Die anschließende PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung: 96°C
Annealing: 50°C 25 Zyklen
Extension: 60°C

Die amplifizierten Proben wurden dann nach Aufreinigung am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität über Nacht auf einem 4,2% Polyacrylamidgel aufgetrennt und in einem ALF-Sequencer ausgewertet.

3.3.10 Physikalische Kartierung

Die chromosomale Lokalisation von c-fos beim Schwein wurde mittels einer somatischen Zell-Hybrid-Analyse vom Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen durchgeführt. Das verwendete Hybridpanel bestand aus 27 Zellhybriden aus Schweine- und Hamsterzellen. Es war 1996 von YERLE et al. und ROBIC et al. entwickelt und mit PCR, FISH, Zytogenetischen Methoden und QFQ-Bänderung charakterisiert worden.

Die Amplifikation des porcinen c-fos Genes erfolgte dabei mit in der Promotorregion/Exon 1 lokalisierten Primern, FP5U und FP5L (siehe Tabelle 10) im PCR-Ansatz (Perkin Elmer Thermocycler 480). Dabei wurden 100ng Hybrid-DNA, sowie je eine Schweine- und eine Nager-DNA als Kontrolle eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 50µl mit einer Primerkonzentration von 20pMol und 40nMol dNTP's. Des weiteren waren im Reaktionsansatz enthalten: 1,5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 50mM KCl, 0,01% Gelatine und 1 Einheit Taq-Polymerase (Pharmacia). Die PCR wurde mit 32 Zyklen à 94°C, 54°C und 72°C jeweils für 1 Minute durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2% Agarosegel in 1x TBE-Puffer.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung und Charakterisierung von c-fos

4.1.1 Isolierung von c-fos aus einer genomischen Genbank vom Schwein

4.1.1.1 Amplifikation eines spezifischen Genabschnittes des c-fos Genes

Als Ausgangsmaterial für die Sonde diente ein mittels PCR amplifizierter Sequenzabschnitt aus dem Exon 4 des c-fos Genes. Die dazu eingesetzten Primer wurden aus Homologievergleichen zwischen Maus und Mensch abgeleitet um eine größtmögliche Übereinstimmung zum porcinen Gen zu gewährleisten. Diese Primer FU4 und FL4 sind 22 bzw. 26 Basenpaare lang und binden im Bereich des Exon 4 (Pos. 2840- 2862), bzw. des 3'Endes (Pos. 3381-3406) an die Template-DNA:

FU4: -TCTGAGGAGGCCTTCACCCTGC-

FL4: -TCACGCACAGATAAGGTCCTCCCTAG-

Die Bezeichnung der Primer beinhaltet das F als Abkürzung für fos und ein U (Sequenz entspricht Codon) bzw. L (Sequenz entspricht Anticodon) für die Syntheserichtung. Die Numerierung entspricht der Lokalisation im jeweiligen Exon.

FU4 zeigte eine Homologie von 100%, FL4 von 96% zum porcinen c-fos Gen.

Als Template diente eine genomische, aus Vollblut isolierte DNA vom Schwein. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt :

Denaturierung 92°C

Annealing 66°C X 25 Zyklen

Extension 72°C.

Das dabei entstandene Amplifikat ist 566 bp lang und konnte durch eine Sequenzanalyse eindeutig dem Exon 4 des porcinen c-fos Genes zugeordnet werden.

4.1.1.2 Isolierung des c-fos Genes aus der genomischen Genbank vom Schwein

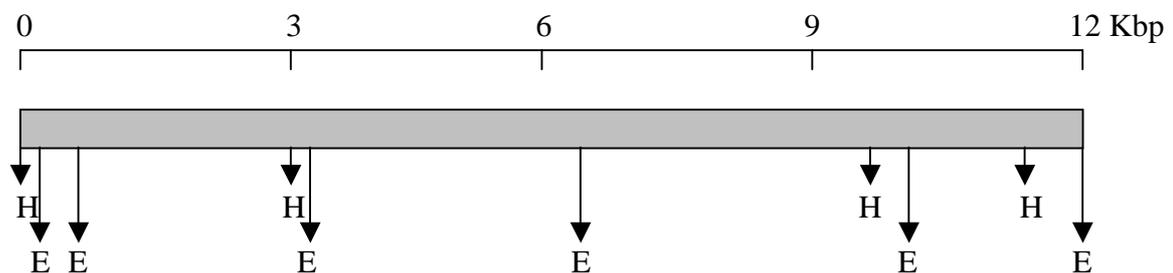
Mit Hilfe der spezifischen Sonden-DNA konnten zwei Klone aus der Genbank isoliert werden.

Um die eindeutige Zugehörigkeit der in den Phagen klonierten DNA zu dem gesuchten Gen zu überprüfen, wurde vorerst die DNA in kleiner Menge aus den Phagen isoliert und mit den für die Sonde synthetisierten Primern in einer PCR eingesetzt. Die Bedingungen entsprachen denen der Sondenamplifikation. Dabei zeigte sich einer der beiden Isolate als falsch positiv. Für die weiteren Untersuchungen stand also nur ein Klon λ FE mit einer Insertlänge von ca 11000 bp zur Verfügung.

4.1.2 Kartierung von c-fos

4.1.2.1 Kartierung des gesamten Klons

Der isolierte Klon wurde nun mehreren Restriktionsverdauungen zur Erstellung einer ersten Restriktionskarte unterzogen. Dabei wurden die Enzyme so ausgewählt daß sie eine Schnittstelle in der Multiple-Cloning-Site des Lambda-Phagen hatten. Die Verdauungen wurden zuerst mit den Enzymen EcoRI und HindIII durchgeführt. Anhand des entstandenen Bildes konnte folgende vorläufige Restriktionskarte des gesamten Inserts von ca. 12 Kbp erstellt werden:



E = EcoRI; H = HindIII

Abb. 9: Restriktionskarte des isolierten Insertes

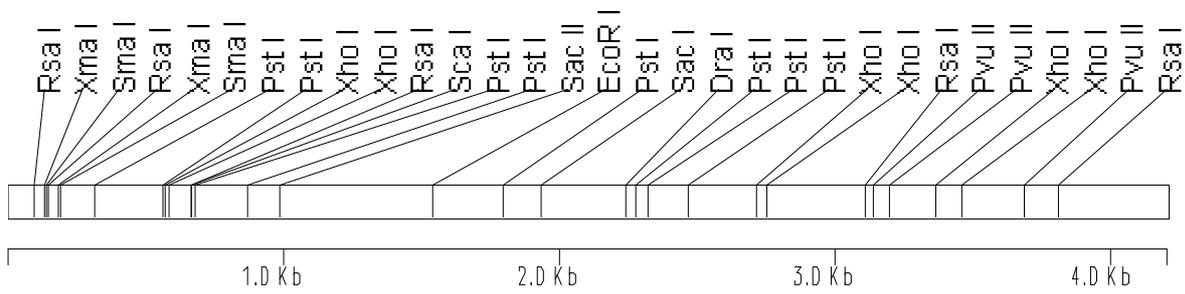


Abb. 11: Restriktionskarte des porcinen c-fos Protoonkogens

4.1.3 Komplette Nukleotidsequenz des porcinen c-fos Protoonkogens

4.1.3.1 Übersicht

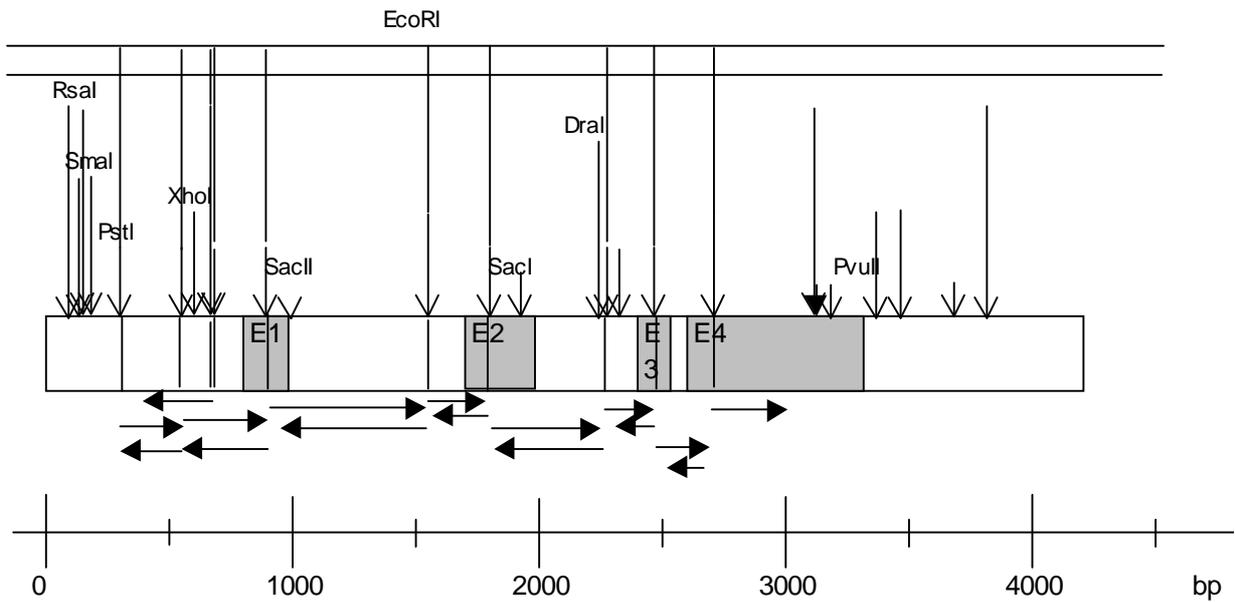


Abb.12 : Klonierungsstrategie für c-fos aus einem 11Kbp Lamda-FixII Fragment

Die Klonierungs- und Sequenzierungsstrategie ist in Abbildung 12 dargestellt. Als Ausgangsmaterial für die Erstellung von Subklonen wurden Einzel- und Doppelverdaus herangezogen.

Alle Klone und Subklone wurden mit den M13 Universal Sequencing- und M13 Reverse Sequencing Primern von den Enden her ansequenziert und die Sequenzdaten einem Homologievergleich zu Mensch, Maus und Ratte unterzogen um die Plausibilität der Daten zu überprüfen. Die Gesamtheit der dabei sequenzierten Abschnitte ergibt sich aus den Pfeilen im unteren Teil der Abb. 12.

Durch die Homologievergleiche konnten die ansequenzierten Klone den jeweiligen Bereichen des *c-fos* Genes genau zugeordnet werden und bildeten die Grundlage für die zweite Sequenzierungsstrategie mit sequenzspezifischen Primern.

Nicht alle Sequenzinformationen konnten mit den M13 Primern erarbeitet werden, die bestehenden Lücken wurden durch die direkte Sequenzierung mit sequenzspezifischen Primern geschlossen.

Anhand der zuerst vorliegenden Sequenzdaten wurden Primer nach den oben beschriebenen Kriterien ausgewählt und gezielt in Sequenzierungsreaktionen mit den betreffenden Klonen eingesetzt. Auf diese Weise konnten die Sequenzlücken zuverlässig geschlossen werden, ohne auf das Vorhandensein von akkuraten Restriktionschnittstellen zur weiteren Klonierung angewiesen zu sein.

Alle Sequenzabschnitte wurden mindestens zweimal, zumeist in beiden Strängen sequenziert. Eine Überlappung der Sequenzen ergab sich einerseits daraus daß bestimmte Sequenzabschnitte mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und dann kloniert wurden, andererseits durch den gezielten Einsatz der sequenzspezifischen Primer.

Sämtliche Sequenzinformationen liegen somit doppelt und überlappend vor.

Teilweise mußten die Sequenzierungsreaktionen mit mehreren verschiedenen Primern wiederholt werden. Dies einerseits um Unstimmigkeiten bei der DNA-Sequenz auszuschließen oder zu korrigieren, andererseits weil einzelne Sequenzierungsreaktionen mit bestimmten Primern nicht funktionierten.

Tabelle 3 zeigt die für die Sequenzierung synthetisierten Primer mit ihrer jeweiligen Lokalisation.

Tabelle 3: Übersicht über die eingesetzten Primer zur Sequenzanalyse

Primer	Sequenz	Lokalisation
FAI	gct gac gca gat gtc cta at	365-384
FBu	att ggg ctc att cat aaa atg ctg	618-641
FCI	gct gag ctg ggt aag agc gc	736-755
FDu	gct tca acg ccg act acg ag	830-850
FEu	gga gcc ccg gac ttg ttc	1102-1120
FFI	cgg ctc tag tta gcc agt c	1251-1270
FGu	cac tgg gca ctc cgc tca	1636-1656
FHI	gga gac ggc cag atc ggt g	1724-1742
FII	gat ggg gca acc gag gag	1820-1837
FJu	cct cgg gtg ggg ctt act cc	1876-1895
FKI	gga tac aga gga tac agc a	2618-2636
FLu	gag atc gcc aac ctg ctg a	2681-2699
FMu	tct gag gag gcc ttc acc ctg c	2840-2861
FNI	cat gct gct gac gtt ctt gac tgg	2900-2923
FOu	gca acg agc ctt cct ctg a	3228-3246
FPI	tca cgc cca gat aag gtc ct	3381-3406
FQu	cgc atg gag tgt gta ttg tc	3494-3513
FRI	atc agc tgc act aga tac aat t	3664-3685
FSu	gat cat gca ttg gtg agg tg	3850-3869

Die einzelnen Primer sind durchlaufend nach ihrer Lokalisation im c-fos Gen alphabetisch numeriert (A-S), wobei das F am Anfang für Fos, und die Kleinbuchstaben u oder l am Ende für die Amplifikationsrichtung (u: Sequenz entspricht Codon; l: Sequenz entspricht Anticodon) stehen.

TTCATTGATA AAAAGCGAGT TCATTCAGGA GACTCCGGAG CGGCGTCTGC GTCAGCGCAG 1440

ACGTCAGGGA TATTTATAAC AACCCCCCTT TCAAGCGAGT GATGCTGAAAG GGATAACGGG 1500

AACGCAGCAG CAGGATGGAG GAGAAAGGCA CTGCGCTGCG GAATTCTTGG GAAGGGAGAG 1560

ACCTTTCATC CAGGATGAAG GACATATAAA AATACATAAG CAGTCCATTT TTCACTCTCT 1620

CCCTGCTGCA TGCGGCACTG GGCCTCCGC TCACCCCACC TCGTCCAGA GCCTGGTCGC 1680

Exon 2

TCACGTCAGC TTTCCCCTTC TATATTTTCAT TCTAGGACTT CTGCACCGAT CTGGCCGTCT 1740

CCAGTGCCAA CTTTCATCCCA ACGGTGACTG CTATCTCGAC CAGCCCAGAC CTGCAGTGGC 1800

TAGTGCAACC CACCCTGGTC TCCTCGGTTG CCCCATCCCA GACCAGAGCC CCTCACCCCT 1860

ACGGAGTCCC CACTCCCTCG GCTGGGGCTT ACTCCAGGGC TGGAGTCGTG AAGACCATGC 1920

CAGGAGGCAG AGCTCAGAGC ATTGGCAGAA GGGGCAAGGT GGAACAAGGTG AGGTTTCTCA 1980

ACACCTTCTC TCTGGTGGTG GCTGGGGTTG GGGGGGTAAG GTCAGTCTTG ATGGAGATGG 2040

GGAGCATAGT GGACAGGGTG AAGCCATGGG TGGAACTGAT TACATATCCT GGACTGGGAA 2100

CCCCGGCTCC AAGCCCTATC CATCCCAAGT CAGACTCTAA TAGTCCACCC TAAGTAATAT 2160

Intron 2

CCAATGTGCA GTTTTCTTCC TAATAGTTTC TTATCTCACC CTTGTAGCTT CTCTTTGTTC 2220

TCCTGCTGAG GTTCTTATTT TAAATGCAAG TCACACCCAG CTTGCAACTG CAGGTTAGAA 2280

ATGGCTTCAC AGAAGAGGTG CCAGGAGGCG GGAAGCTGCA GCGCCAGTT TTCCTAGGGT 2340

GGGTGAACGG AGCTGATAGC AGGCACTGTT ACTGAATGTT GCCCTCTCTC TCTCTCCCCA 2400

Exon 3

CCTCCAGTTG TCCCCAGAAG AAGAAGAGAA AAGGAGAATC CGAAGGGAAA GGAATAAGAT 2460

GGCTGCAGCC AAATGCCGGA ACCGGAGGAG GGAGCTGACT GACACACTCC AAGCGGTAGG 2520

TAGAATCCAT GGATCACTTC TTTTCGAAAAC TTAAGGGCAA AGTTAGAGAC TGGGTAGAAG 2580

Intron 3

GGAACAGAGT CTTTGAGTAA GACCGTGTCT TATGCTTTGC TGTATCCTCT GTATCCAGCA 2640

Exon 4

GACAGACCAG CTAGAAGACG AGAAGTCTGC TTTGCAGACT GAGATCGCCA ACCTGCTGAA 2700

GGAGAAGGAA AACTCGAGT TCATCCTGGC AGCTCACCGA CCTGCCTGCA AGATCCCTGA 2760

TGACCTGGGC TTCCCTGAAG AGATGTCTGT GGCTTCCCTT GATCTGAGTG GGGGCCTGCC 2820

TGAGGCTGCC ACCCCCGAAT CTGAGGAGGC CTTACCCCTG CCCCTCCTCA ATGACCCGGA 2880

GCCCAAGCCC TCCGTGGAGC CAGTCAAGAA CGTCAGCAGC ATGGAGCTGA AGGCCGAGCC 2940

CTTTGATGAC TTCCTGTTCC CAGCATCGTC CAGGCCCGGC GGCTCTGAGA CAGCCCGCTC 3000

TGTGCCGGAC ATGGACCTGT CTGGTTCCCTT CTATGCAGCA GACTGGGAGC CCCTGCATGG 3060

TGGCTCCCTG GGGATGGGGC CCATGGCCAC AGAGCTGGAG CCCCTGTGTA CCCCAGTGGT 3120

```

CACCTGCACC CCCAGCTGCA CTACTTTACAC GTCTTCCTTC GTCTTTACCT ACCCCGAGGC 3180
TGACTCCTTC CCCAGCTGTG CGGCTGCCA CCGCAAGGGC AGCAGCAGCA ACGAGCCTTC 3240
CTCTGACTCG CTCAGCTCAC CCACGCTGCT GGCCCTGTGA GCGGGCAGAG AGGGGAGGCA 3300
GCAGGCAGGC ACGCGCCACT GCCCGAGTCG GTGCATTATG GAGAGGAGAA ACACGTCTTC 3360
CCTCGAGGGT TCCCCTAGAC CTAGGGAGGA CCTTATCTGG GCGTGAAACA CACCACCAGG 3420
CCGTGGGCCT CAAGGACTTG AAAGCATCCA CGTGTGGACT CGAGTCCTTA CCTCTTCTGG 3480
AGATGTAGCA AAACGCATGG AGTGTGTATT GTCCCCAGTG ACACATCTGA GAGCTGGTAG 3540
TTAGTAGCAT GTTGAGCCAG GCCTGGGTCT GTGTCTCTTT TTCTCTTGCT CTTTAGTCTT 3600
CTCATAGCAT TAACTAATCT ATTGGGTTCA TTATTGGAAT TAACCTGGTG CTGGATATTT 3660
TCAAATTGTA TCTAGTGCAG CTGATTTTAA CAATAACTAC TGTGTTCCCTG GCAATAGTGT 3720
GTTCTGATTA GCGATGACCA ATATTAAACT AAGCAAAGAT ATGACTTTAT TTCTAGTAG 3780
Poly A
ATAGAAATAA ATAGCTATAT CCATGACTG TAGTTTTCTT TCGGCATCAA TGTTCATTGT 3840
AATGTTACTG ATCATGCATT GGTGAGGTGG TCTGAATGTT CTGACATTAA CAGTTTTCCA 3900
TGAAAACGTT TTATTGTGTT TTTAATTTAT TTATTAAGAT GGATTCTCAG ATATTTATAT 3960
TTTTATTTTA TTTTTTTCTA CCTTGAGGTC TTTTGACATG TGGAAAGTGA ATTTGAATGA 4020
Poly A
AAAATTTAAG CATTGTTTGC TTATTGTTCA AAGACATTGT CAATAAAAGC ATTTACGTTG 4080
AATGCGACCA ACCTTGAGCC CTTTTCATTC TGGAAGTTCG GTAAGCGTCT GAGAGGTATT 4140
ATCGGAGACC AGTTTGTCGA GAAGGGCAGC TCCTGGAGGG GACACACCCC TCTGTTAGAT 4200

```

Abb. 13: Nukleotidsequenz des porcinen *c-fos* Protoonkogens

Die Exonbereiche sind eingerahmt. Die wichtigsten Abschnitte des Promotorbereiches sind mit Grautönen hinterlegt.

Die Sequenz ist in Folgen von 10 Basen eingeteilt mit je 60 Basen/Zeile. Die Position der letzten Base einer Zeile ergibt sich aus der Zahlenangabe hinter der Zeile.

Die Lokalisation der wichtigsten Sequenzbereiche ist der besseren Übersicht wegen in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

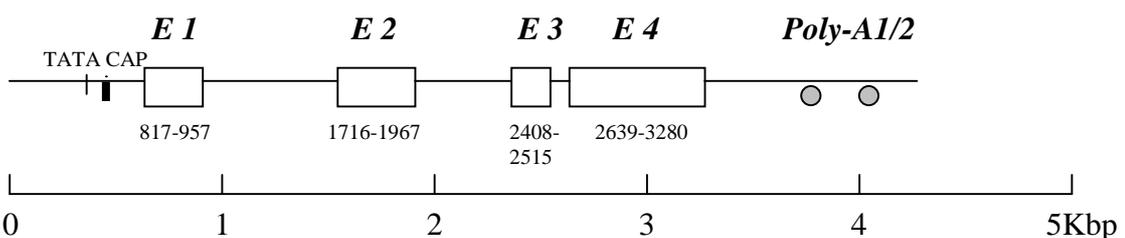


Abb. 14: Schema des porcinen *c-fos* Protoonkogens mit Exon- und Intronbereichen

Das gesamte Gen erstreckt sich von der TATA-Box an Position 653 bis 659 bis zum Poly-A2 Signal über 3425 Basenpaare. Die genaue Analyse der Basenzusammensetzung der Sequenz ergibt folgenden prozentualen Anteil der einzelnen Basen (mit der absoluten Anzahl in Klammern):

$$\% \text{ A} = 22,38 (944)$$

$$\% \text{ G} = 26,83 (1127)$$

$$\% \text{ T} = 22,95 (964)$$

$$\% \text{ C} = 27,74 (2292)$$

$$\% \text{ A+T} = 45,43 (1908)$$

$$\% \text{ C+G} = 54,57 (2292)$$

Das 5'Ende hat im Gegensatz zum 3'Ende einen sehr hohen G + C-Anteil von 59,56%. Dahingegen überwiegen im 3'Ende die Basen A und T mit einem prozentualen Anteil von 58,19%.

Im Gegensatz zu anderen Spezies enthält das porcine c-fos Gen analog zum humanen Gen zwei Poly-A Signale (Position 3785-3793 und Position 4062-4068) am 3'-UTR, wobei das zweite als das für die Transkription ausschlaggebende anzusehen ist.

Von der CAP-Site bis zum zweiten Poly-A-Signal ergibt sich ein primäres Transkript von 3403 bp. Der Vergleich der Konsensussequenzen für RNA splice acceptor- und donor-Bereiche ermöglicht analog zu allen bisher untersuchten Spezies eine Unterteilung in drei Intron- und vier Exonbereiche.

Die kodierende Region beginnt mit einem Startkodon ATG an Position 817 der EMBL-Sequenz und endet mit dem Terminierungskodon TGA an Position 3280.

Das Exon 1 beginnt mit Nukleotid 817 und endet mit Nukleotid 957. Exon 2 erstreckt sich von Position 1716 bis 1967 . Exon 3 ist mit 107 Basenpaaren von Position 2408 bis 2515 das kürzeste. Exon 4 befindet sich zwischen Position 2639 und 3280.

4.1.3.2.1 Das 5' Ende

Der regulatorische Bereich des porcinen c-fos Genes am 5'-Ende weist verschiedene charakteristische Sequenzen auf die für die Beeinflussung der Genexpression durch verschiedene Faktoren wichtig sind. Sie sind in Abbildung 15 eingerahmt.

Das Dyad Symmetry Element (DSE) oder Serum Response Element (SRE) erstreckt sich als wichtigstes Element für die Grundregulation über 27 Basenpaare (56-82) und ist unentbehrlich für die Induktion des Genes durch Serum, PDGF, TPA oder EGF und andere.

Tabelle 4 zeigt die mit dem SRE überlappenden regulatorischen Elemente mit ihrer jeweiligen Funktion und Lokalisation.

Tabelle 4: Regulatorische Elemente im SRE-Bereich des c-fos Genes

Element	Bindestelle für	Lokalisation
CarG	Serum Response Element	362-370
E-Box	MyoD	370-375
AP1	AP1	376-382

Das gesamte SRE stellt sich bei Schwein, Mensch und Maus als 100% homologe Sequenz dar, was die wichtige Funktion hervorhebt (Abbildung 15) .

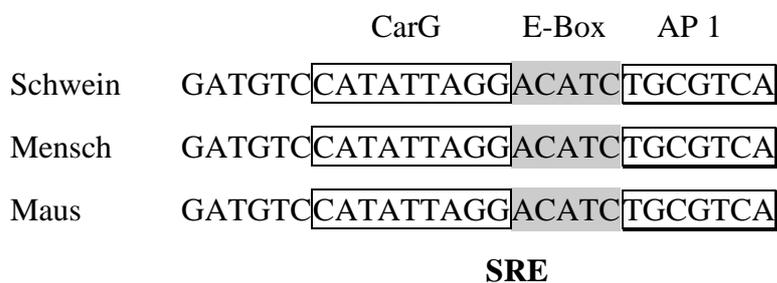


Abb. 15 : Serum Response Element von Schwein, Mensch und Maus

Als weitere wichtige Sequenz im regulatorischen Bereich kann das CRE (Calcium Response Element) gedeutet werden, das sich beim Schwein von Position 411-420 über 9 Basenpaare erstreckt und für die direkte Beeinflussung der Expression des Genes durch Calcium und cAMP verantwortlich ist. Dieses Element stellt sich beim Menschen durch die Deletion eines Nukleotids leicht unterschiedlich zu Schwein und Maus dar (Abbildung 7).

CRE	
Schwein	TGACGTATT
Mensch	TGACGT –TT
Maus	TGACGTATT

Abb. 16: Calcium Response Element von Schwein, Maus und Mensch

Der Vergleich des 5´Endes von Schwein, Mensch und Maus zeigt folgende Homologiewerte: Schwein-Mensch 78,4%, Schwein-Maus 67,1%.

4.1.3.2.2 Sekundärstrukturen

Die Untersuchung der Sequenz auf spezifische Nukleotidanordnungen in Form von Palindromen, Repeats oder Hairpin-Loops wurde mit dem DNAsys-Computerprogramm durchgeführt.

An Position 982 befindet sich das mit 18 Basenpaaren längste Palindrom mit der Sequenz 5´-GGGGCTCGGGGCTCGGGG-3´.

Ein 17 Nukleotide zählendes Palindrom 5´-CCCTCTCTCTCTCCCC-3´ ist an Position 2382 lokalisiert.

Die Nukleotidpositionen 3834 und 3966 zeigen zwei 16 Basenpaare lange Palindrome mit den Sequenzen 5´-TCATTGTAATGTTACT-3´ bzw. 5´-TTTTTATTTTATTTT-3´.

Der längste Repeat von 12 Nukleotiden befindet sich an den Positionen 1332 und 1346, die Sequenz lautet 5´-GGAGGAGGGTGA-3´.

Des Weiteren konnten vier von der Länge her bedeutende Hairpin-Loops lokalisiert werden. Zwei davon sind in Intronbereichen lokalisiert, der erste befindet sich im Bereich des Intron 1 (Basen 1424-1444), ein weiterer stellt sich im Bereich des Intron 2 (Basen 2244-2266) dar.

Zwei weitere befinden sich auf Höhe von Exon 4 (Basen 3045-3068, Basen 3202-3223).

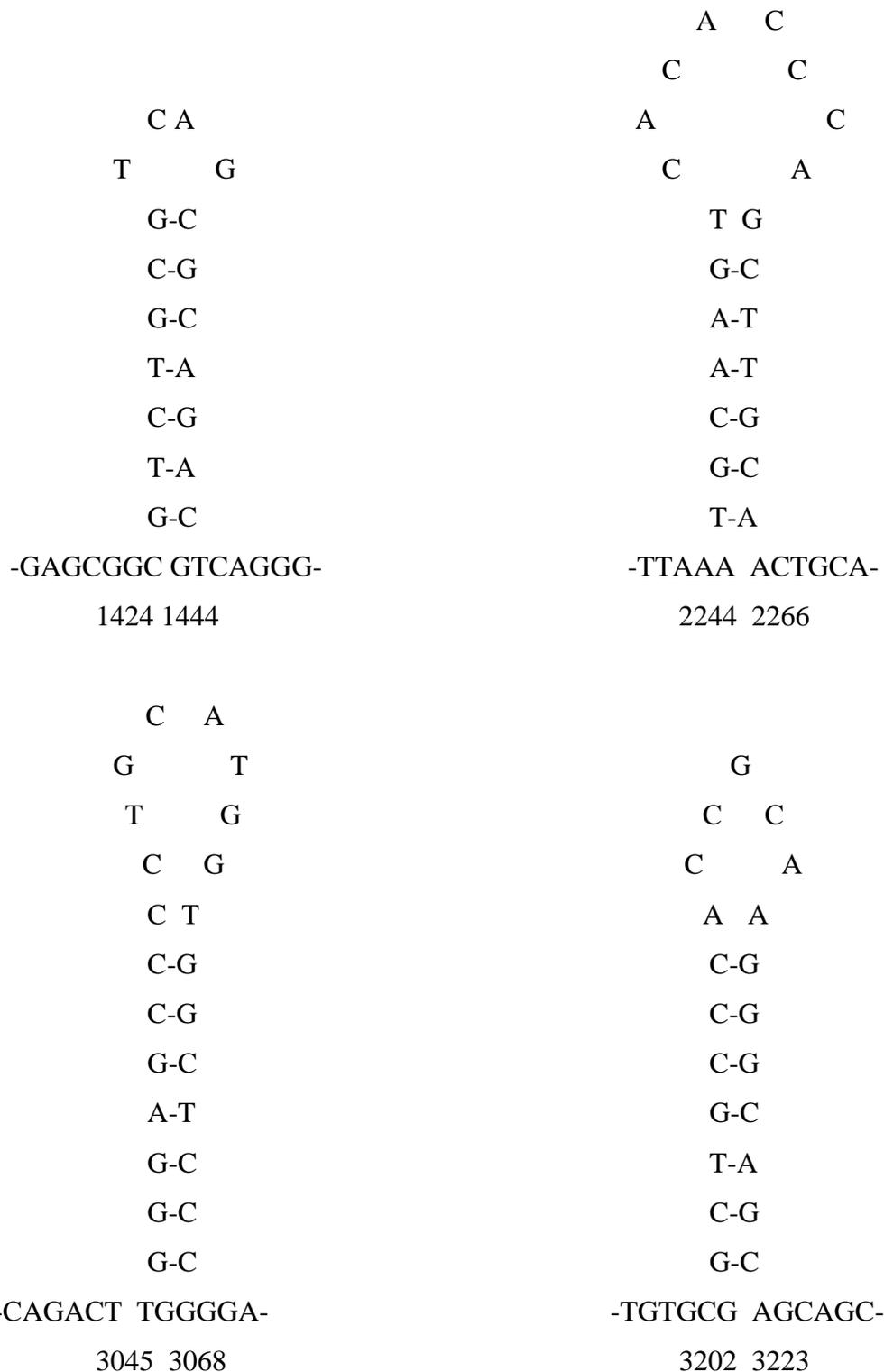


Abb. 17: Hairpin-Loops im Bereich Intron 1, 2 und Exon 4

4.1.3.3 Homologievergleich mit dem Menschen

Die Homologie zwischen Schwein und Mensch beträgt für das gesamte Gen 84,8%. Aufgeteilt auf die einzelnen Bereiche lassen sich bedeutende Unterschiede feststellen, wobei erwartungsgemäß die Exonbereiche die höchsten Homologien aufweisen. Sie betragen für die Exons 1-4 90,6%; 89,7%; 96,3% und 94,2%. Auch das 3'-Ende weist mit 93,2% einen sehr hohen Homologiegrad auf.

Die Homologiewerte der Intronbereiche 1-3 liegen mit 78,8%; 71% und 71,8% deutlich unter den oben beschriebenen Homologien, sind jedoch immer noch beachtlich hoch für zwei unterschiedliche Spezies. Das 5'-Ende mit dem Promotorbereich weist einen Homologiewert von 78,7% auf.

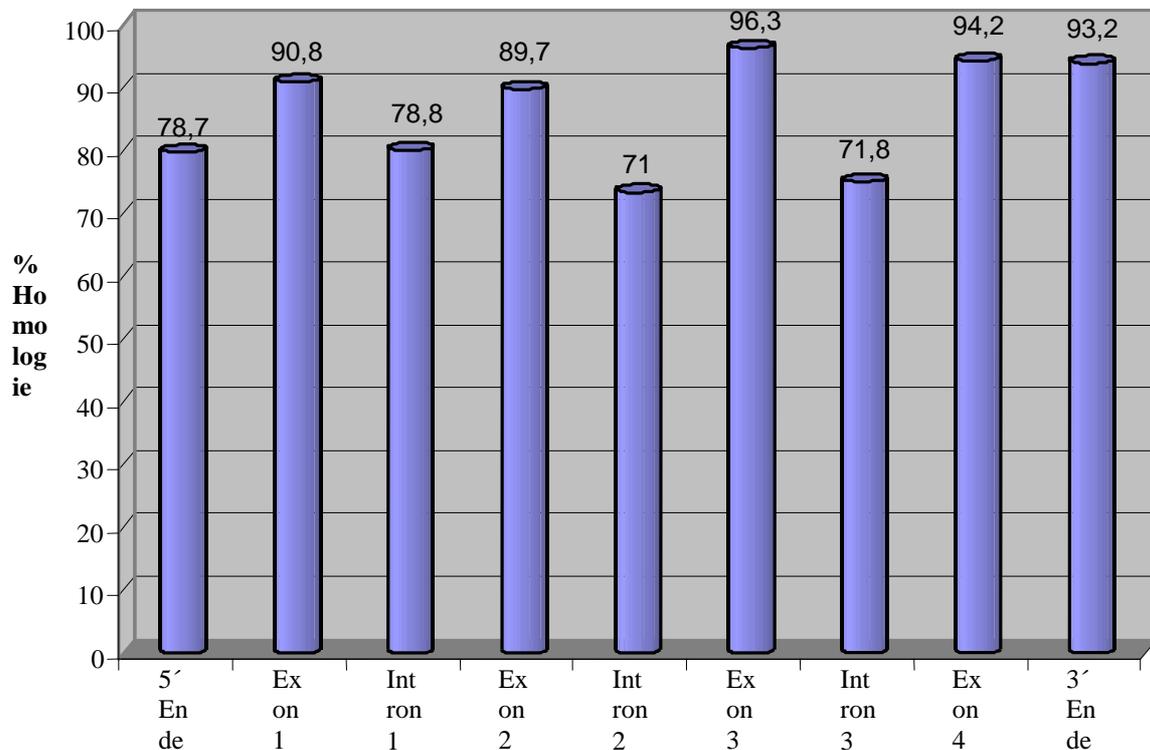


Abb. 18: Homologie zwischen Schwein und Mensch

Die genaue Analyse der Sequenzabschnitte beider Spezies zeigt daß die Bereiche mit den geringsten Homologiewerten Basendeletionen oder -Insertionen von 5 bis 8 Basenpaaren enthalten.

So befinden sich im Bereich des 5'Endes zwei Deletionen von 6 bzw. 8 Basenpaaren an Position 100 bzw. 658 beim Schwein. Eine weitere von 5 Basenpaaren ist im Intron 1 an Position 1554 lokalisiert.

Auch im Bereich des Intron 2 mit dem niedrigsten Homologiegrad befindet sich eine 6 Basenpaare-Deletion an Position 2207 im Vergleich zur humanen Sequenz.

Schließlich ist im Bereich des Intron 3 an Position 2582 beim Schwein eine 7 bp Insertion vorhanden.

4.1.4 Das c-Fos Protein

4.1.4.1 Die Aminosäuresequenz von c-Fos

Das c-fos Gen kodiert für ein Protein von 380 Aminosäuren. Die entsprechende c-DNA erstreckt sich über 1143 Nukleotide von Exon 1 bis Exon 4 und enthält folgende Basenanteile in Prozent:

Tabelle 5: Prozentualer Anteil der einzelnen Basen an der c-DNA von c-fos

A	T	G	C
20,47%	18,37%	27,12%	34,03%

Die Abbildung 19 zeigt die Aminosäuresequenz vom Schwein (1. Zeile) im Vergleich zum Menschen (2. Zeile).

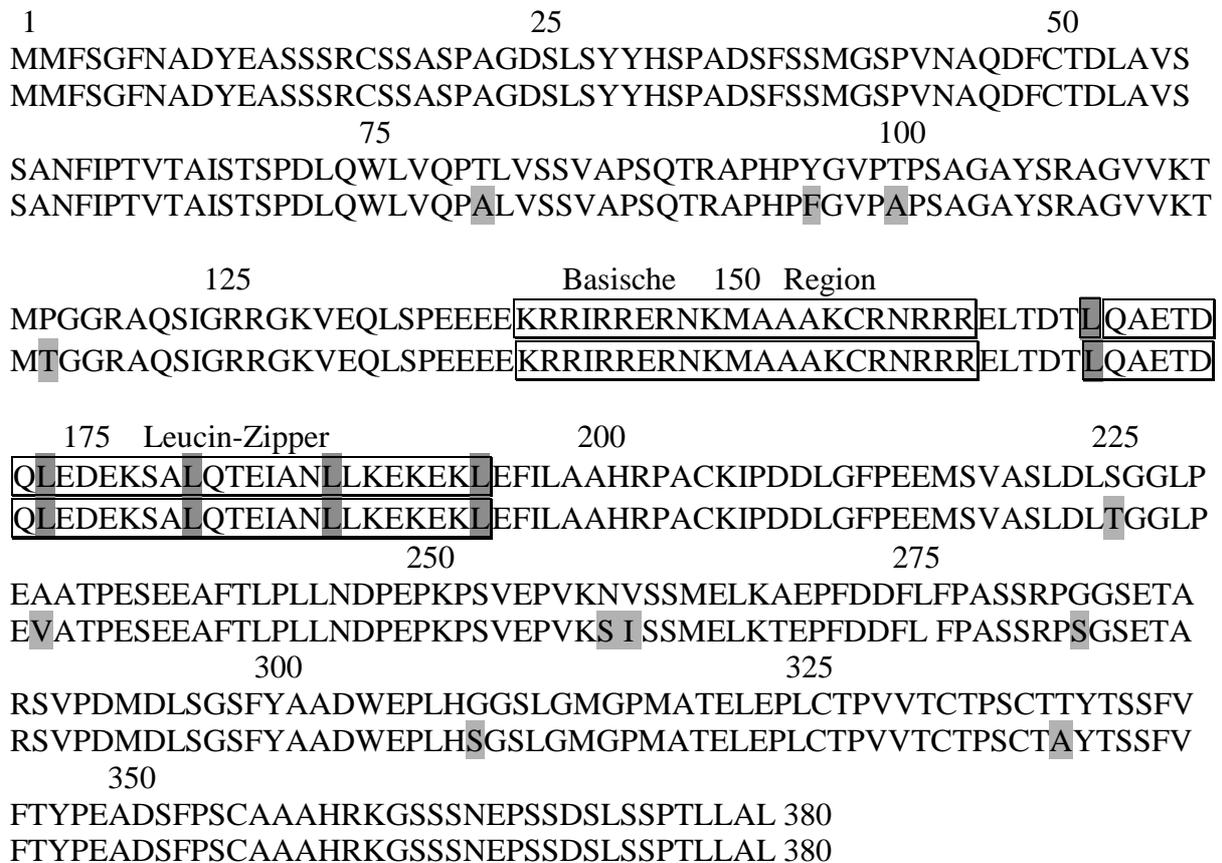


Abb. 19: Aminosäuresequenz vom porcinen und humanen c-Fos

Die Aminosäureaustausche im Vergleich zum Schwein sind bei der humanen Sequenz grau hinterlegt. Die Homologie zwischen Mensch und Schwein beträgt insgesamt 96,8 %.

Das porcine Protein enthält 33 basische (K, R) und 51 saure (D, E) Aminosäuren. Davon sind 113 hydrophob (A, I, L, F, W, V) und 111 polar (N, C, Q, S, T, Y). Der Isoelektrische Punkt liegt bei 4,675 und die Ladung bei pH 7,0 entspricht $-17,435$.

Die genaue Ausprägung und Anzahl der der Translation zugrunde liegenden Kodons wird aus der Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 6: Anzahl der benutzten Kodons für die Translation von c-Fos

gca	Ala(A)	5	cag	Gln(Q)	7	uug	Leu(L)	2	uaa	Ter(.)	0
gcc	Ala(A)	18	---	Gln(Q)	9	---	Leu(L)	32	uag	Ter(.)	0
gcg	Ala(A)	4	gaa	Glu(E)	9	aaa	Lys(K)	3	uga	Ter(.)	1
gcu	Ala(A)	12	gag	Glu(E)	22	aag	Lys(K)	11	---	Ter(.)	1
---	Ala(A)	39	---	Glu(E)	31	---	Lys(K)	14	aca	Thr(T)	4
aga	Arg(R)	4	gga	Gly(G)	3	aug	Met(M)	10	acc	Thr(T)	11
agg	Arg(R)	8	ggc	Gly(G)	11	---	Met(M)	10	acg	Thr(T)	3
cga	Arg(R)	2	ggg	Gly(G)	5	uuc	Phe(F)	13	acu	Thr(T)	6
cgc	Arg(R)	3	ggu	Gly(G)	2	uuu	Phe(F)	2	---	Thr(T)	24
cgg	Arg(R)	2	---	Gly(G)	21	---	Phe(F)	15	ugg	Trp(W)	2
cgu	Arg(R)	0	cac	His(H)	4	cca	Pro(P)	7	---	Trp(W)	2
---	Arg(R)	19	cau	His(H)	1	ccc	Pro(P)	18	uac	Tyr(Y)	7
aac	Asn(N)	6	---	His(H)	5	ccg	Pro(P)	4	uau	Tyr(Y)	1
aau	Asn(N)	3	aua	Ile(I)	0	ccu	Pro(P)	7	---	Tyr(Y)	8
---	Asn(N)	9	auc	Ile(I)	6	---	Pro(P)	36	gua	Val(V)	0
gac	Asp(D)	16	auu	Ile(I)	1	agc	Ser(S)	13	guc	Val(V)	9
gau	Asp(D)	4	---	Ile(I)	7	agu	Ser(S)	3	gug	Val(V)	8
---	Asp(D)	20	cua	Leu(L)	2	uca	Ser(S)	4	guu	Val(V)	1
ugc	Cys(C)	6	cuc	Leu(L)	6	ucc	Ser(S)	19	---	Val(V)	18
ugu	Cys(C)	2	cug	Leu(L)	21	ucg	Ser(S)	5			
---	Cys(C)	8	cuu	Leu(L)	1	ucu	Ser(S)	9			
caa	Gln(Q)	2	uua	Leu(L)	0	---	Ser(S)	53			

4.1.4.2 Räumliche Anordnung

Das c-Fos Protein zeigt ein charakteristisches bZIP-Motiv (AS 82- 135), bestehend aus dem Leucin-Zipper (107-135) mit insgesamt 7 Leucinen im Abstand von je 4-5 Aminosäuren und der davor liegenden basischen Region (82-101) mit auffallend vielen basischen Aminosäuren.

Die Formation von aktiven DNA-bindenden AP1 Komplexen durch Dimerisation mit c-Jun erfolgt auf Höhe des Leucin-repeats in Form einer coiled-coil-Struktur. Die Darstellung des betreffenden Sequenzabschnittes in Form einer α -Helix (Abbildung 20) verdeutlicht diese Rolle.

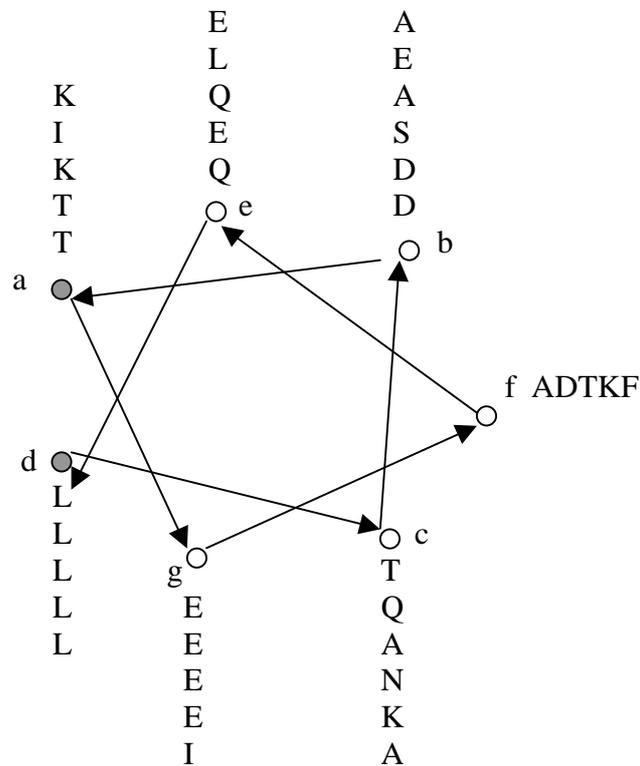


Abb. 20: Räumliche Anordnung des Fos-Proteins

Das Protein ordnet sich in diesem Bereich in Form einer α -Helix an, wobei jede siebte Aminosäure an eine bestimmte Position zu liegen kommt (a bis g). Die Positionen a und d werden dabei von hydrophoben Aminosäuren eingenommen und bilden die Berührungsfläche zur Bildung der coiled-coil Struktur mit dem Dimerisationspartner c-Jun. Dabei wird die Position d von den Leucinresten des Leucin-Zippers gebildet. Auf der gegenüberliegenden Seite der Helix befinden sich hydrophile Aminosäurereste mit geladenen Seitengruppen.

Es entsteht somit eine amphipatische Helix.

Die basische Region befindet sich exakt sieben Aminosäuren N-terminal des ersten Leucins und besteht aus 16 Aminosäuren. Dies führt zu einer spezifischen dreidimensionalen Struktur zwischen Leucin-Zipper und der DNA-Kontaktfläche innerhalb der basischen Region und spezifiziert somit die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors.

4.1.4.3 Vergleich zu anderen Spezies

Der direkte Vergleich der Proteinsequenzen von Schwein, Mensch, Maus und Huhn ergibt folgende Homologiewerte (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übereinstimmung und Differenz der Aminosäurezusammensetzung von Fos bei Schwein, Mensch, Maus und Huhn.

	Schwein	Mensch	Maus	Huhn
Schwein		96,8	94,7	72,5
Mensch	3,2		94,5	71,4
Maus	5,5	5,7		70,3
Huhn	21,7	23,2	25,5	

Die Zahlen oben rechts geben die prozentuale Übereinstimmung, die Zahlen unten links die prozentuale Differenz wieder.

Die Homologien in der Aminosäuresequenz liegen mit 96,8% bei Schwein und Mensch und mit 94,7% bei Schwein und Maus in einem recht hohen Bereich. Beim Huhn liegt dieser Wert mit 72,5% zum Schwein, respektiv 71,4% bzw. 70,3% zu Mensch und Maus deutlich niedriger.

Diese Werte beziehen sich auf das gesamte Protein, ohne Unterschiede bezüglich der einzelnen funktionellen Domänen. Betrachtet man die Sequenzen in Bezug auf die verschiedenen funktionellen Bereiche, so kann man feststellen, daß erwartungsgemäß diese Bereiche weniger von Austausch betroffen sind (Abbildung 21). Dies verdeutlicht die wichtige Funktion dieser Sequenzabschnitte. Nur beim Huhn gibt es in dieser Region zwei ausgetauschte Aminosäuren im Vergleich zu den anderen Spezies.

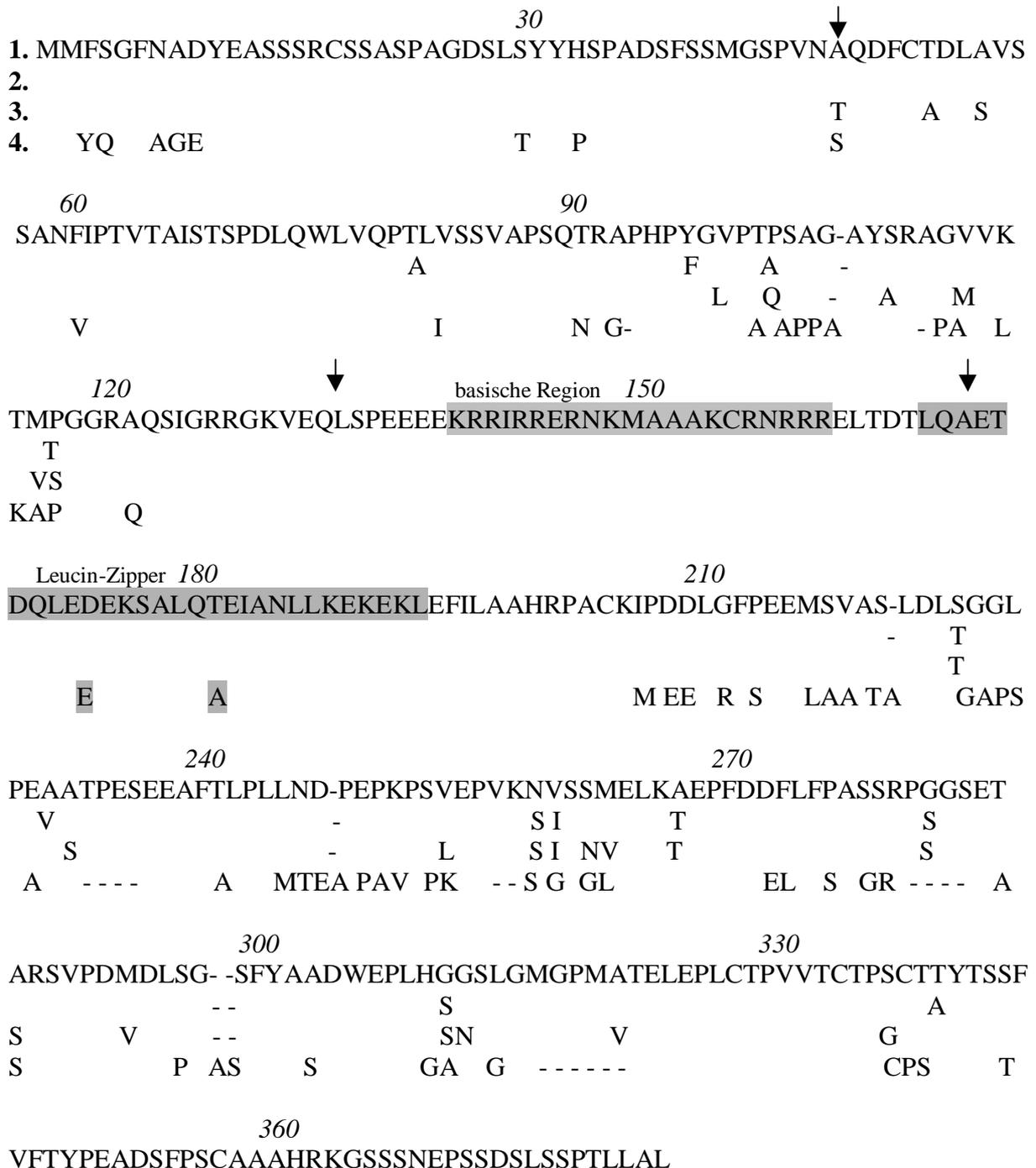


Abb. 21: Lokalisation der einzelnen Aminosäureaustausche bei Mensch (2. Zeile), Maus (3. Zeile) und Huhn (4. Zeile) im Vergleich zum Schwein (1. Zeile)

Die jeweiligen Positionen ergeben sich aus der Numerierung oberhalb der Sequenz. Die ausgetauschten Aminosäuren im Vergleich zum Schwein sind in den jeweiligen Zeilen angegeben.

Grau hinterlegt sind die funktionellen Regionen mit den respektiven Austauschen. Die Pfeile oberhalb der Sequenz geben die Position der Introns auf dem Nukleotidlevel an.

Die Beteiligung der einzelnen Aminosäuren an den Austauschen kann aus der Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Häufigkeit der Austausche zwischen den einzelnen Aminosäuren

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y
C		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S	0		6	7	9	6	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
T	0	0		0	14	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P	0	1	0		3	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	1	5	0		6	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	1	0	0	0		0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
N	0	1	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	1		6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A= Ala; C= Cys; D= Asp; E= Glu; F= Phe; G= Gly; H= His; I= Ile; K= Lys; L0 Leu; H= Met; N= Asp; P= Pro; Q= Gln; R= Arg; S= Ser; T0 Thr; V= Val; W= Trp; Y= Tyr

Die proteinspezifischen Daten lassen sich für die angesprochenen Spezies aus der Tabelle 9 entnehmen. Sie wurden aus den jeweiligen Sequenzen abgeleitet.

Tabelle 9: Eckdaten des c-Fos Proteins von Schwein, Mensch, Maus und Huhn

	<i>Schwein</i>	<i>Mensch</i>	<i>Maus</i>	<i>Huhn</i>
AS-Anzahl	380	380	380	367
basische AS	33	33	33	33
saure AS	51	51	50	48
hydrophobe AS	113	116	112	117
polare AS	111	111	118	98
Isoel. Punkt	4,675	4,675	4,418	4,742
Ladung ph 7	-17,435	-17,434	-16,435	-14,763

Bei allen oben aufgeführten Spezies handelt es sich bei dem Genprodukt von c-fos um ein saures hydrophobes Protein mit einer sehr ähnlichen Zusammensetzung.

4.2 Chromosomale Lokalisation von c-fos

Physikalische Kartierung

Die chromosomale Lokalisation von c-fos wurde vom Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen durchgeführt. Sie erfolgte mit Hilfe der Primer P5U und P5L (Tabelle 10) mittels Screening eines Schweine-Nager-Zellhybrid-Panels.

Das Gen konnte auf dem Chromosom SSC 7 q (P = 1,0) des Schweines lokalisiert werden. Innerhalb von Chromosom 7 zeigten die Regionen q12-q23 und die Region q26 mit P = 0,4494 und einer Korrelation $\phi = 0,92$ die höchsten Wahrscheinlichkeiten.

Tabelle 10: Wahrscheinlichkeiten und Korrelationen zur Lokalisation der chromosomalen Region vom c-fos Gen des Schweines.

Region	P	Korrelation
<i>q12-23</i>	0,4494	0,92
<i>q26</i>	0,4494	0,92

4.3 Sequenzunterschiede des c-fos Genes bei Schweinen unterschiedlicher Rasse und Konstitution

Als Grundlage für weitergehende Sequenzanalysen mit Hilfe von eventuell vorhandenen RFLP's sollten in einem ersten Schritt die konstitutionell sehr unterschiedlichen Rassen Pietrain und Meishan auf Sequenzunterschiede untersucht werden.

4.3.1 Sequenzinformationen bei Pietrain und Meishan

Aufgrund der sehr hohen Homologie zwischen den einzelnen Spezies wurde die Suche nach Sequenzunterschieden zwischen den Rassen mit Hilfe von spezifischen PCR-Systemen zur Amplifikation definierter Sequenzabschnitte durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht die Darstellung auch einzelner Basenaustausche, ohne auf das Vorhandensein von Schnittstellen definierter Restriktionsenzyme angewiesen zu sein.

Um die möglichst vollständige Darstellung der Sequenz für beide Rassen zu gewährleisten wurden 7 verschiedene PCR-Systeme entwickelt, deren Amplifikate einen Großteil des Genes abdecken. Als Grundlage für die einzelnen Amplifikationen wurden in einem ersten Schritt kompatible Primerpaare aufgrund der vorhandenen kompletten Sequenz vom Schwein ausgesucht. Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über die eingesetzten Primer und ihre Lokalisation.

Tabelle 11: Primerkombinationen zur Amplifizierung verschiedener Bereiche des c-fos Protoonkogens aus genomischer DNA unterschiedlicher Schweinerassen

Upper Primer	Lokalisation	Lower Primer	Lokalisation	Produkt (bp)
FP2U	1102-1119	FP2L	1724-1742	Poly 2 (640)
FP1U	1724-1742	FP1L	2491-2515	Poly 1 (791)
FP4U	3387-3406	FP4L	3850-3870	Poly 4 (483)
FP6U	2840-2861	FP6L	3381-3406	Poly 6 (566)
FP5U	532-552	FP5L	1014-1033	Poly 5 (481)
FP9U	2491-2515	FP9L	2900-2923	Poly 9 (432)
FPendU	3850-3870	FPendL	4180-4200	Polyend (350)

Die Bezeichnung der einzelnen Primer enthält den Buchstaben F für c-fos, den Buchstaben P für Polymorphismensuche und die Buchstaben U bzw. L für upper oder lower. Die Numerierung entspricht der Reihenfolge der durchgeführten Reaktionen, wobei die Numerierungslücken sich aus nicht erfolgreichen Amplifikationsversuchen erklären.

Die PCR-Bedingungen mußten für jede einzelne Primerkombination optimiert werden, wobei die Anzahl und Dauer der Grundzyklen für alle Reaktionen beibehalten wurde (Abb. 22):

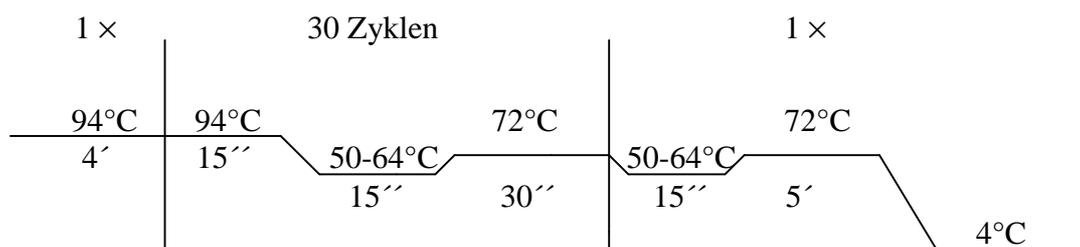


Abbildung 22: PCR-Bedingungen für die Amplifikation definierter Sequenzabschnitte bei Pietrain und Meishan

Die Denaturierungs- und Extensionstemperaturen waren für alle Polymerasereaktionen gleich. Die Annealingtemperatur variierte je nach Primerkombination und wurde aufgrund der errechneten T_m empirisch ermittelt. Tabelle 12 zeigt die Sequenz der benutzten Primer sowie die T_m und die tatsächliche Annealingtemperatur.

Tabelle 12: Primersequenzen, T_m (Schmelzpunkt) und Annealingtemperatur

	Primer 1 (U)	Primer 2 (L)	T_m	Annealing
Poly 2	gga gcc ccg gac ttg ttc	gga gac ggc cag atc ggt g	60	60
Poly 1	cac cga tctg gcc gtc tc	gag tgt gtc agt cag ctc c	60	60
Poly 4	agg acc tta tct ggg cgt ga	cac ctc acc aat gca tga tc	62	60
Poly 6	tct gag gag gcc ttc acc ctg c	tca cgc cca gat aag gtc ct	72	62
Poly 5	ggc gga aga ggc agc aaa gag	tga gcg tcc cgt ccc agt gt	68	52
Poly 9	gga gct gac tga cac act c	cat gct gct gac gtt ctt gac	60	52
Poly end	gat cat gca ttg gtg agg tg	cgt cag cgc tag agt ttc tt	60	53
			60	60

Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung angegeben; die obere T_m entspricht dem Primer 1, die untere dem Primer 2. T_m und Annealingtemperatur sind in °C angegeben.

Insgesamt konnten die sieben in der Tabelle 9 aufgeführten Produkte von 430 bis 800 bp für die beiden Rassen aus genomischer DNA amplifiziert werden. Die Amplifikate wurden teilweise nach Aufreinigung, teilweise nach Auftrennung über präparative Gele in Sequenzierungsreaktionen eingesetzt, wobei jeweils von beiden Seiten mit den entsprechenden Primern sequenziert wurde. Bis auf die Sequenzierung von Poly 5, die nur mit dem lower Primer gelungen ist, konnten sämtliche Amplifikate vollständigen Sequenzanalysen unterzogen werden.

Auf diese Weise konnten Sequenzinformationen über insgesamt 3579 bp für die Rassen Pietrain (Pi) und Meishan (M) gewonnen werden. Die Abbildung 23 zeigt einen Überblick über die Lokalisation der sequenzierten Amplifikate bei beiden Rassen.

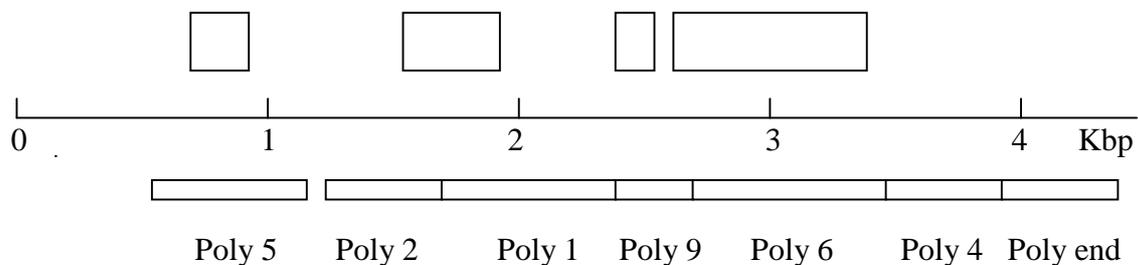


Abb. 23: Überblick über die Lokalisation der zur Sequenzierung gelangten Amplifikate (Poly1-end)

Die Kästen oberhalb der Skala stellen die Exons 1-4 dar, die unteren Vierecke die jeweiligen Amplifikate.

4.3.2 Homologievergleiche zwischen Pietrain (P) und Meishan (M)

4.3.2.1 Nukleotidsequenz

Nach Fertigstellen der einzelnen Sequenzierungsreaktionen erfolgte die genaue Analyse der Nukleotidsequenzen mittels des DNAsys Computerprogramms, wobei die Sequenzinformationen von Pietrain und Meishan jeweils untereinander und mit der Grundsequenz aus Abbildung 13 verglichen wurden.

Hierbei konnten die im folgenden aufgeführten Basenaustausche dokumentiert werden.

Tabelle 13: Lokalisation und Ausprägung der Basenaustausche des c-fos Genes bei Pietrain (P) und Meishan (M) im Vergleich zur Genbanksequenz (G)

Amplifikat	Lokalisation des Basenaustausches	Ausprägung bei G PI M	Bezeichnung
Poly 5	991 (Intron 1)	G G T	P.5.1
Poly 2	1256 (Intron 1)	G G C	P.2.1
Poly 9	2544 (Intron 3)	C C A	P.9.1
	2650 (Exon 4)	G G A	P.9.2
Poly 6	2884 (Exon 4)	C C T	P.6.1
	2902 (Exon 4)	A A G	P.6.2
	<u>2910 (Exon 4)</u>	<u>A A G</u>	<u>P.6.3</u>
	<u>2997 (Exon 4)</u>	<u>G A G</u>	<u>P.6.4</u>
	3339 (3'Ende)	T T C	P.6.5
Poly 4	3493 (3'Ende)	A A C	P.4.1

Die Basendifferenzen im Vergleich zur Genbank sind fettgedruckt. Die unterstrichenen Basenaustausche entsprechen einem Aminosäureaustausch auf Proteinebene.

G = Genbank; Pi = Pietrain; M = Meishan.

Insgesamt konnten für die sequenzierten Abschnitte 10 Basenaustausche lokalisiert werden.

Auffallend ist, daß sich 5 von diesen Austauschen im Bereich des Exon 4 des c-fos Genes befinden, von denen zwei (Poly 6.3 und Poly 6.4) mit einem Aminosäureaustausch auf der Proteinebene einhergehen. Poly 6.3 wiederholt sich auch im Vergleich zwischen verschiedenen Spezies. Der Mensch und der Hamster zeigen sich an dieser Position identisch mit der Sequenz des Meishan, während Maus und Ratte die gleiche Basenfolge wie der Pietrain aufzeigen.

Die restlichen 5 Mutationen befinden sich im untranslatierten Bereich des Genes, zwei auf Höhe des Intron 1, einer im Intron 3-Bereich und schließlich zwei im Bereich des vorderen 3'Endes.

Der mittlere Bereich des Genes von Position 1257 bis Position 2443 mit Teilen des Intron 1 sowie der gesamten Introns 2 und 3 und der Exons 2 und 3 weist keine Unterschiede in der Nukleotidfolge zwischen den aufgeführten Tieren auf. Auch das Exon 1 zeigt keine Sequenzunterschiede.

Es ergeben sich für die aufgeführten Sequenzabschnitte folgende Homologiewerte in Prozent zwischen Pietrain und Meishan:

Poly 2: 99,8 %

Poly 4: 99,7 %

Poly 5: 99,7 %

Poly 6: 99,0 %

Poly 9: 99,2 %

4.3.2.2 Aminosäuresequenz

Wie bereits oben erwähnt, führen nicht alle aufgeführten Sequenzunterschiede auf der Nukleinsäureebene auch zu einem Aminosäureaustausch auf der Proteinebene.

Nur zwei der zehn Basenaustausche haben eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung des c-fos Proteins bei beiden Rassen zur Folge. Es sind dies Poly 6.3. und Poly 6.4. (siehe Tabelle 13) die sich im Bereich des Exon 4 des Genes befinden. In allen anderen Exonbereichen sind die Basenaustausche nicht von einer Veränderung der Proteinzusammensetzung begleitet, der genetische Code wird nicht verändert.

Durch die zwei betreffenden Basenaustausche kommt es beim Pietrain (Poly 6.4) und beim Meishan (Poly 6.3) im Vergleich zur Genbanksequenz zu einer Veränderung des genetischen Codes und somit zu einem Austausch der Aminosäuren auf der Proteinebene.

In der Abbildung 24 sind die c-fos Proteinsequenzen von Pietrain (PPRO.PRO) und Meishan (MPRO:PRO) unter der Genbanksequenz (FIG.PRO) aufgelistet.

Beim Meishan führt die als Poly 6.3 bezeichnete Mutation auf der DNA-Ebene zur Einfügung eines Serins anstelle eines Asparagins. Beim Pietrain wird infolge des als Poly 6.4 bezeichneten Basenaustausches ein Arginin durch ein Histidin ersetzt.

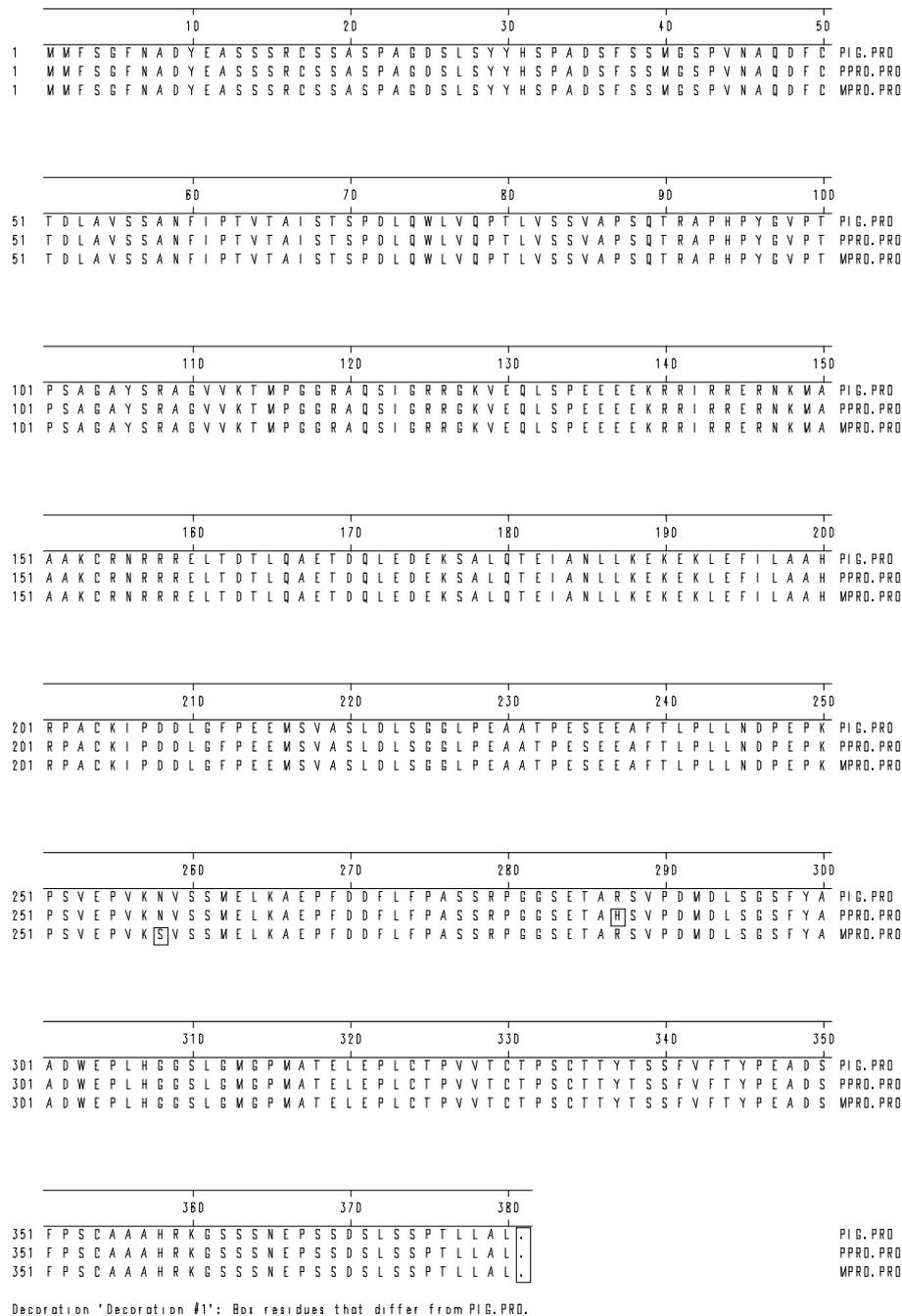


Abb. 24: Proteinsequenz von c-fos der Rassen Pietrain und Meishan im Vergleich zur aus der Genbank abgeleiteten Sequenz

Die Sequenzunterschiede von Pietrain (PPRO) und Meishan (MPRO) sind eingerahmt. Die Skala oberhalb der Sequenzen entspricht der jeweiligen Position der einzelnen Aminosäuren. Die aufgeführten Sequenzunterschiede befinden sich außerhalb der wichtigsten funktionellen Domänen Basische Region und Leucin-Zipper und haben somit keinen direkten Einfluß auf deren Funktion. Es kommt jedoch infolge der Austausche zu einer Veränderung verschiedener Parameter wie Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt und Ladung des Proteins. Diese Unterschiede sind in Tabelle 14 zusammengefaßt.

Tabelle 14: Verschiedene Parameter des c-fos Proteins bei unterschiedlichen Rassen

	<i>Grundsequenz</i>	<i>Pietrain</i>	<i>Meishan</i>
Molekulargewicht	40682.00	40663.00	40655.00
Isoelektr. Punkt	4,68	4,67	4,68
Ladung bei pH7	-17,43	-18,27	-17,43

Die Anzahl der geladenen Aminosäuren ist bei allen drei Rassen gleich.

Durch das Vorhandensein eines Histidins anstelle eines Arginins an Position 287 des Proteins geht die Anzahl der basischen Aminosäuren von 33 bei den Vergleichstieren auf 32 beim Pietrain zurück.

Beim untersuchten Meishan wird ein Asparagin mit einer Amid-Seitengruppe durch ein Serin mit einer Hydroxygruppe ersetzt. Beide Seitengruppen nehmen an Wasserstoff-Brückenbindungen teil, und ziehen somit keine Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins nach sich.

4.3.3 Weitergehende Analyse der gefundenen Mutationen

Die durch die direkte Sequenzinformation einzelner Tiere der Rassen Pietrain und Meishan offensichtlich gewordenen Mutationen in der Basenabfolge der DNA-Sequenz des c-fos Genes dienten als Grundlage für eine weiterführende Analyse der betreffenden Sequenzabschnitte bei mehreren Tieren der gleichen Rassen und bei Schweinen anderer interessanter Rassen.

4.3.3.1 Etablierung von PCR/Restriktionssystemen zur RFLP-Analyse

Die genaue Analyse der entsprechenden Sequenzabschnitte bei größeren Tierzahlen ist aus Zeit- und Kostengründen nicht mittels direkter Sequenzierung durchführbar. Hier bietet sich die RFLP-Analyse mit charakteristischen Restriktionsenzymen an.

4.3.3.1.1 Kartierung der entsprechenden Sequenzabschnitte

Alle Mutationen enthaltende Sequenzabschnitte wurden per Computeranalyse (Map Draw; DnaStar) auf Restriktionsschnittstellen untersucht, die den jeweiligen Basenaustausch einbeziehen. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf die Sequenzabschnitte gelegt, die Mutationen im Exonbereich aufweisen (Poly 6 und Poly 9).

In dem Sequenzabschnitt Poly 9 (432 bp) konnten für beide Mutationen P9.1 und P9.2 charakteristische Restriktionsschnittstellen gefunden werden, die eine RFLP-Analyse ermöglichen. Das Restriktionsenzym TaqI weist je nach Vorhandensein der P9.1 Mutation verschiedene Schnittstellen auf. Die Mutation P9.2 neutralisiert eine AluI-Erkennungssequenz im Poly 9 Amplifikat. Die Anzahl und Lokalisierung der betreffenden Schnittstellen dieser beiden Enzyme in Poly 9 sind in der Abbildung 13 dargestellt.

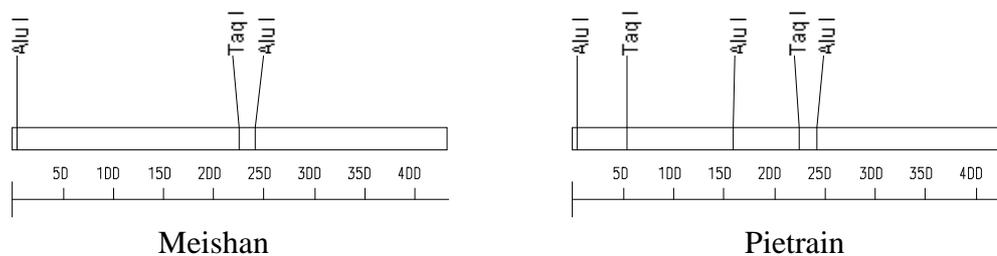


Abb. 25: Restriktionsschnittstellen von AluI und TaqI in Poly 9 bei Pietrain und Meishan

Durch die Mutation P9.1 zeigt das Enzym TaqI beim Meishan nur eine Schnittstelle an Position 225. Beim Pietrain befindet sich durch die unterschiedliche Basenfolge eine zweite Schnittstelle an Position 53. Ähnlich verhält es sich beim Enzym AluI, wo durch die P9.2 Mutation beim Meishan nur zwei Schnittstellen an Position 4 und 242 vorhanden sind. Beim Pietrain befindet sich eine dritte Erkennungssequenz an Position 160.

Das c-fos Teilamplifikat Poly 6 (566 bp) weist, wie bereits oben beschrieben, eine sehr interessante Mutation P6.3 an Position 71 auf. Die Sequenz ACGT entspricht der Erkennungssequenz von TaiI, und wird durch den Austausch des Arginins in ein Guanin neutralisiert.

In Abbildung 26 sind die entsprechenden Schnittstellen des Enzyms bei den beiden Genotypen dargestellt.

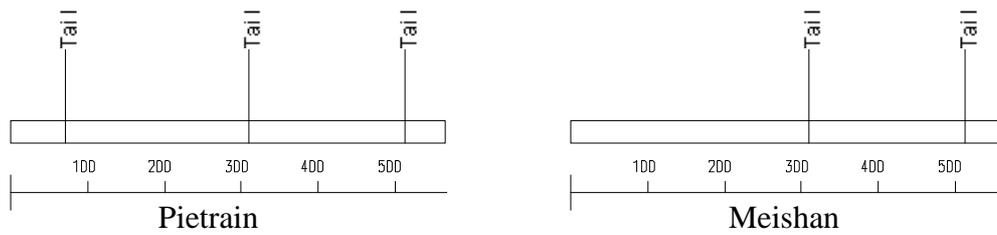
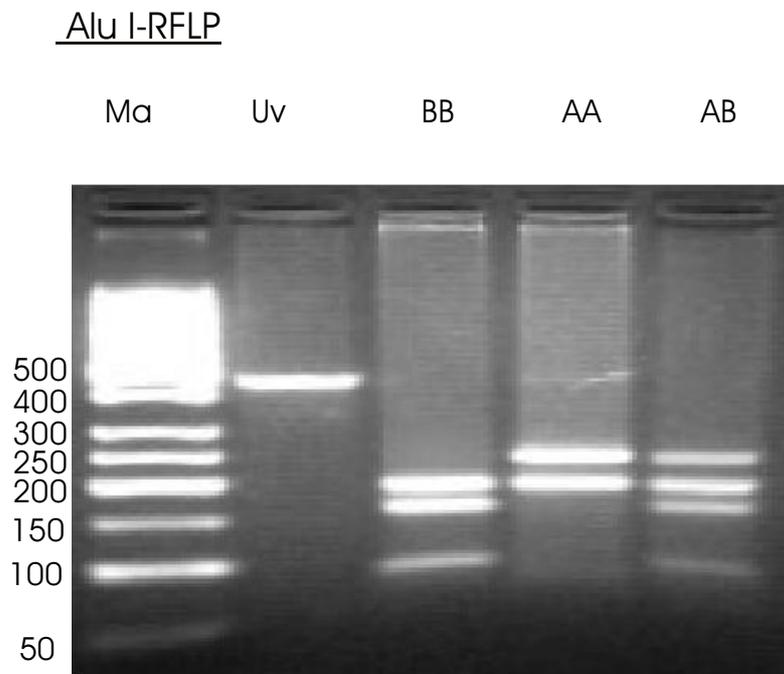


Abb. 26: Restriktionsschnittstellen von TaiI bei Pietrain und Meishan

Die beiden Schnittstellen an Position 309 und 513 des 566 Basenpaare zählenden Amplifikats sind bei beiden Genotypen vorhanden. Beim untersuchten Pietrain findet sich eine zusätzliche Erkennungssequenz des Enzyms an Position 71.

4.3.3.1.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen

Mit Hilfe der hier beschriebenen Restriktionsschnittstellen können die betreffenden Sequenzabschnitte nach der PCR-Amplifikation bei verschiedenen Tieren einer RFLP-Analyse unterzogen, und so den einzelnen Genotypen zugeordnet werden.



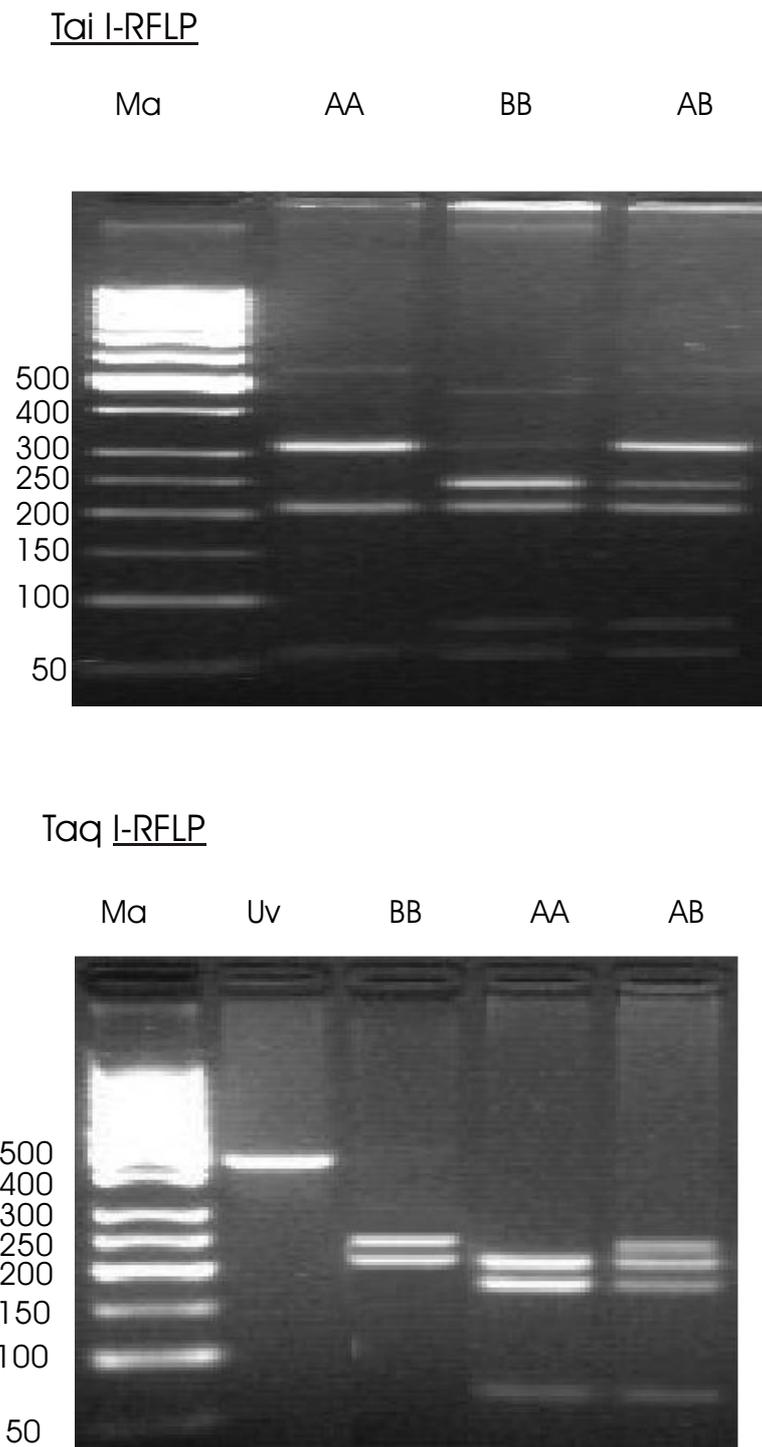


Abb. 27: Darstellung der gefundenen RFLPs

Ma=Marker 50bp; Uv= Unverdaute Probe; AA=Genotyp A; BB= Genotyp B; AB=Genotyp AB

Ein TaqI-Restriktionspolymorphismus entsteht durch den Basenaustausch an Position 2544 des Gesamtgenes. Er besteht aus einer 225bp (A) Bande und zwei 172bp bzw. 53bp (B) Banden.

Der erste Austausch im Exon 4 an Position 2650 bewirkt einen AluI-Restriktionspolymorphismus mit einer 238bp (A) Bande und zwei Banden von 156bp bzw. 82bp (B).

Der mit einem Aminosäureaustausch einhergehende Polymorphismus an Position 2910 läßt sich durch einen TaiI-Restriktionspolymorphismus nachweisen.

Die Variante A zeigt eine 309bp Bande, während die Variante B aus einer 238bp und einer 71bp Bande besteht.

Untersucht wurden je 6 Tiere der Rassen Pietrain und Meishan. Dabei konnten für den TaqI-RFLP bei der Rasse Meishan alle drei Genotypen gefunden werden, wohingegen alle Tiere der Rasse Pietrain den Genotyp BB aufwiesen.

AluI zeigte bei den Tieren der Rasse Meishan die Genotypen AA und AB, bei den Tieren der Rasse Pietrain nur den Genotyp BB.

Bei dem TaiI-RFLP zeigten alle Meishans den Genotyp AA, während die Pietrains sich einheitlich als BB darstellten.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, in einem ersten Schritt die komplette Nukleotid- und Proteinsequenz des porcinen c-fos Protoonkogens darzustellen. Hierauf aufbauend erfolgte dann die chromosomale Lokalisation des Genes beim Schwein, sowie die vergleichende Betrachtung der Sequenz bei Tieren unterschiedlicher Konstitution und Bemuskelung und die Dokumentation vorhandener Sequenzunterschiede.

Der Aufklärung der molekularbiologischen Zusammenhänge des Antagonismus zwischen Muskelhypertrophie und konstitutionellen Aberrationen beim Schwein kommt eine, im Hinblick auf Wirtschaftlichkeit und Tierschutz in der Schweinezucht, bedeutende Rolle zu. Dabei bildet die Identifikation von Einzelgenen mit eventueller direkter Beteiligung an den zellphysiologischen Vorgängen neben der QTL-Analyse eine wichtige Herangehensweise.

JANSS et al. (1997) unterstreichen die Wichtigkeit der Erforschung von Einzelgenen mit Effekten auf Fleischqualitätsmerkmale in der Schweinezucht. Die Bedeutung eines solchen methodischen Ansatzes wird durch die Entdeckung der mit dem Porcinen Stress Syndrom in Verbindung stehenden Punktmutation im MHS-Gen (BRENIG und BREHM, 1992) untermauert. Die molekularbiologische Aufklärung der Kalziumregulationsstörung als auslösender Faktor für das wirtschaftlich sehr relevante Krankheitsbild der Malignen Hyperthermie beim Schwein ermöglichte in der Folge ein direktes Eingreifen auf züchterischer Ebene. Die Identifikation der Merkmalsträger durch den in der Folge etablierten MHS-Gentest ist ein Paradebeispiel für die züchterische Nutzung molekularbiologischer Grundlagenforschung in der Tierzucht.

Der Ansatz der vorliegenden Untersuchungen ist in diesem Sinne als Grundlagenforschung zur Aufklärung der molekularbiologischen Zusammenhänge der mit dem Krankheitsbild des Porcinen Stress Syndroms einhergehenden extremen Skelettmuskelhypertrophie zu verstehen, und stellt außerdem einen wichtigen Beitrag zur weiteren Aufklärung des Schweinengenoms dar. Der Charakterisierung von Einzelgenen und der Untersuchung der Einflüsse verschiedener Genotypen dieser Einzelgene auf Merkmale wie Muskelwachstum oder Fettansatz kommt für das Verständnis der Zusammenhänge eine zunehmende Bedeutung zu. Dies zeigen auch die Untersuchungen von TE PAS et al. (1999) zur Beteiligung verschiedener Myogenin-Genotypen bei der Entstehung phänotypischer Merkmale wie Muskelmasse und Wachstumsrate verschiedener Schweinerassen.

Die Wahl des c-fos Genes als Untersuchungsobjekt ergibt sich vor allem aus dessen ausreichend dokumentierter Rolle als Transkriptionsfaktor bei verschiedenen Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsprozessen (SASSONE-CORSI et al., 1988), wobei in erster Linie dessen Beteiligung am Geschehen der Muskelzellhypertrophie (KIM et al., 1992; WHITELAW und HESKETH, 1992; DAWES et al., 1996; OSBALDESTON et al., 1995) interessant erscheint. Der vermutete direkte Zusammenhang zwischen Kalziumregulationsstörung und der Hypertrophie von Skelettmuskelzellen über die Expression der Protoonkogene c-fos und c-myc als Zwischenglieder (REINER, 1993), läßt diese Gene als Kandidaten für die weitere Aufklärung der oben genannten Zusammenhänge erscheinen. REINER (1999) hat durch die Charakterisierung des porcinen c-myc-Locus mit der folgenden Evaluierung von Assoziationen zwischen Genvarianten und konstitutionellen Merkmalen beim Schwein einen Grundstein zum Verständnis einer eventuellen Rolle verschiedener Protoonkogen-Genotypen bei der Ausprägung unterschiedlicher phänotypischer Merkmale gelegt. Obwohl die direkten Auswirkungen der untersuchten Effekte von c-myc auf die Schlachtkörperqualität nur relativ gering ausgeprägt sind, zeigt sich eine deutliche Interaktion mit dem MHS-Locus. Die Effekte des MHS-Genes auf die Merkmale der Schlachtkörperqualität sind innerhalb des einen c-myc Genotyps deutlicher als im anderen. Diese Resultate deuten eine mehr oder weniger große Rolle dieses Protoonkogens bei der angesprochenen Thematik an.

Das in zellregulatorischen Prozessen direkt mit c-myc in Verbindung stehende Protoonkogen c-fos stellt ein weiteres wichtiges Forschungsobjekt dar, umso mehr, als eine direkte Interaktion der Protoonkogene c-fos und c-myc bei der Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung dokumentiert ist (BAUTERS et al., 1988).

Sequenzierung von c-fos

Die in dieser Arbeit durchgeführte Aufklärung der kompletten Sequenz des porcinen c-fos Protoonkogens bildete eine wichtige Grundlage für die in der Folge durchgeführten Sequenzvergleiche definierter Genabschnitte bei Tieren unterschiedlicher Konstitution und Bemuskelung.

Das porcine c-fos Protoonkogen zeigt analog zu allen bisher untersuchten Spezies (VAN STRAATEN ET AL., 1983; VAN BEVEREN et al., 1983; CURRAN et al., 1987; FUJIWARA et al., 1987; CHANG et al., 1996, SARABIA und LIEHR, 1998) eine Aufteilung in drei Intron- und vier Exonbereiche. Auch die funktionell wichtigen Domäne wie

Promotorbereich und PolyA-Signal zeigen grundsätzlich den gleichen Aufbau wie bei anderen untersuchten Spezies. Jedoch muß bemerkt werden, daß vor allem das 5'Ende eine recht niedrige Homologie zu anderen Spezies aufweist, wobei allerdings die funktionellen Bereiche wie SRE oder AP1, wie bereits angedeutet, 100% homolog sind. Nur das Calcium Response Element (CRE) zeigt zwischen Mensch und Schwein einen leicht unterschiedlichen Aufbau. Die Bedeutung dieser einzelnen Deletion ist jedoch bis jetzt nicht klar.

Erwartungsgemäß sind die Homologien am höchsten für die Exonbereiche, wobei auch die Intronbereiche immer noch beachtliche Werte aufweisen.

Das Vorhandensein von zwei PolyA-Signalen am 3'Ende des porcinen c-fos Genes ist im Gegensatz zu den anderen Spezies bisher nur beim Menschen (VAN STRAATEN et al., 1983) dokumentiert worden. Insgesamt sind die Homologiewerte zwischen Schwein und Mensch, verglichen mit anderen Spezies, am höchsten.

Der grundsätzliche Aufbau des Proteins mit dem typischen bZIP-Motiv ist bei allen bisher untersuchten Spezies identisch und in diesem Bereich des Proteins befinden sich keine Aminosäurenaustausche zwischen Schwein, Mensch und Maus. Dies deutet auf die elementare Rolle des Proteins in vielen zellphysiologischen Regulationsprozessen hin. Die Aminosäuresequenz zeigt sehr hohe Homologiewerte zwischen den Spezies Schwein, Mensch, Maus und Huhn, wobei die Werte zwischen Schwein und Mensch mit knapp 97% am höchsten liegen. Mit ca. 72% Homologie zum Schwein liegt die Sequenz des Huhnes auch noch in einem recht hohen Bereich. Beim Huhn finden sich im Gegensatz zu den o.g. Spezies auch Aminosäurenaustausche im funktionell wichtigen Bereich des bZIP-Motivs. Die Bedeutung dieser Begebenheit ist jedoch noch unklar.

Die aufgezeigten hohen Sequenzhomologiewerte zwischen den Spezies sind gleichbedeutend mit einer hohen Konservierung des Genes während der Evolution und stehen in Einklang mit der beschriebenen elementaren Rolle als Transkriptionsfaktor im Organismus.

Die vorgestellte komplette Sequenz des porcinen c-fos Genes und Proteins bildet die Grundlage für die Suche nach Sequenzunterschieden bei den Rassen Pietrain und Meishan. Diese beiden Rassen wurden einerseits als typische Vertreter der europäischen Nutzrassen mit fleischbetontem Exterieur und konstitutionellen Defiziten, andererseits als Vertreter der

konstitutionell sehr stabilen chinesischen Rassen mit überdurchschnittlichem Fettansatz bei gleichsam geringer Muskelmassenbildung für diese Untersuchungen ausgesucht.

Chromosomale Lokalisation von c-fos

Das porcine c-fos Protoonkogen wurde mittels PCR-Screenings eines Schweine-Nager-Zellhybridpanels auf Chromosom 7 lokalisiert. Als genaue Banden innerhalb des Chromosoms kommen aufgrund der identischen Wahrscheinlichkeitswerte q12-23 und q26 in Frage.

Der Vergleich bestimmter Chromosomenabschnitte zwischen verschiedenen Spezies kann Aufschluß über die mögliche Lokalisation von Genen geben.

Durch Analyse der Synthenie zwischen Chromosom 7 des Schweines und den entsprechenden Chromosomen beim Menschen können die in Frage kommenden Lokalisierungsbanden von c-fos auf dem Chromosom 7 des Schweines weiter eingegrenzt werden.

Tabelle 15: Synthenie zwischen Chromosom 7 des Schweines und den entsprechenden Chromosomen beim Menschen (aus <http://www.toulouse/INRA>)

Schwein	Mensch
7p-q14	6p
7q13-q22	15q24-qter
7q21-q25	14q11-q13 14q22-qter

Aus der Tabelle 15 können die mit dem Chromosom 7 des Schweines homologen Chromosomenabschnitte beim Menschen entnommen werden.

7q12 entspricht dem Chromosom 6 des Menschen, 7q13-q22 dem Chromosom 15. Mit Chromosom 14, dem Lokalisationsort des c-fos Genes beim Menschen (Hspa14q24.3-q31) ist allein der Bereich 7q21-q25 des Schweines synthenisch. Der Bandenbereich 7q26 des Schweines ist noch nicht typisiert worden.

SSC7q23 bietet sich somit als genauer chromosomaler Lokalisationsort des c-fos Genes beim Schwein an, zumal hier auch eine Synthenie zur entsprechenden Lokalisation 14q24.3-q31 des c-fos Genes beim Menschen besteht.

Die Aufklärung der chromosomalen Lokalisation des c-fos Genes bei der Spezies Schwein eröffnet die Möglichkeit der weiterführenden Analyse seiner möglichen Bedeutung durch verschiedene Kopplungsanalysen mit ausgewählten Markern und Genen in diesem Bereich.

Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Lokalisation des RYR3 Genes im Bereich 7q22-23 (Leeb et al., 1998), dessen eventuelle Bedeutung jedoch erst im Verlauf der angesprochenen Folgearbeiten abgeschätzt werden kann.

Im Bereich des Chromosom 7 des Schweines werden auch für Wachstum und Schlachtkörperzusammensetzung relevante QTL´s beschrieben (WANG et al., 1998).

Sequenzunterschiede innerhalb der Spezies Schwein

Die Polymorphismensuche wurde mittels direkter Sequenzierung geeigneter Sequenzabschnitte durchgeführt. Auf diese Weise war es, im Gegensatz zur RFLP-Analyse mittels Southern-Hybridisierung möglich, auch einzelne, keine spezifische Restriktionschnittstellen betreffende, Basenaustausche zu lokalisieren. Aufgrund der zwischen den Spezies schon sehr hohen Homologiewerte schien uns diese Herangehensweise zur Erstlokalisierung eventueller Mutationen innerhalb der Spezies Schwein am erfolgversprechendsten.

Die gewählte Methode erforderte die Synthese geeigneter Primerpaare zur Amplifikation von Sequenzabschnitten, die den gesamten Genbereich abdecken. Auf Basis der hier vorgestellten Genbanksequenz vom Schwein wurden passende Primersequenzen nach den beschriebenen Kriterien ausgesucht und getestet. Die PCR-Bedingungen wurden jeweils an die einzelnen Abschnitte angepaßt, wobei vor allem hinsichtlich der Annealing-Temperatur große Abweichungen von den Richtwerten festgestellt wurden.

Für einzelne Sequenzabschnitte stellte sich die Amplifikation bei beiden Rassen als sehr schwierig dar. Jedoch konnte durch die Kombination verschiedener Primerpaare, sowie durch die Modifikation der einzelnen Reaktionsbedingungen, fast der gesamte Genbereich bei beiden Rassen amplifiziert und sequenziert werden.

Im vorderen 5´Bereich des Genes ist eine komplette Amplifikation und Sequenzierung bei den zwei beschriebenen Rassen trotz des Einsatzes verschiedener Primer, Primerkombinationen und PCR-Bedingungen nicht gelungen. Die Sequenzunterschiede scheinen hier, wie schon im Vergleich zwischen verschiedenen Spezies festgestellt, auch innerhalb der Spezies Schwein sehr groß zu sein, welches ein Grund für suboptimales Annealing sein kann. Dies umso mehr, da es sich bei der Template-DNA um genomische

DNA handelt, und die Möglichkeit eines falsch positiven Annealing der Primer bei nicht 100% Homologie mit der Zielsequenz groß ist.

Über den Großteil des Promotorbereiches liegen somit keine differenzierten Sequenzinformationen vor, womit die vergleichende Darstellung der in diesem Bereich lokalisierten wichtigen regulatorischen Elemente wie SRE und CRE nicht möglich ist. Aufgrund der diese Elemente betreffenden 100% Homologie zwischen verschiedenen untersuchten Spezies, ist jedoch hier auch nicht mit dem Auftreten relevanter Polymorphismen zu rechnen.

Die fast lückenlose Analyse der gesamten Intron- und Exonbereiche und des 3'Endes bei beiden Rassen ist eine wichtige Grundlage für weitergehende Untersuchungen.

Vor dem Hintergrund der sehr hohen Konservierung der Sequenz bei unterschiedlichen Spezies war mit einer sehr hohen Sequenzhomologie innerhalb der Spezies Schwein zu rechnen.

Die hier aufgezeigten 10 Basenaustausche zwischen einzelnen Vertretern der Rassen Pietrain und Meishan stellen somit in ihrer Gesamtheit eine interessante Begebenheit dar.

Die Lokalisation von 5 dieser Mutationen im Bereich der translatierten Region des Exon 4 ist beachtlich, zumal zwei davon mit einem Aminosäureaustausch auf Proteinebene einhergehen. Obwohl diese ausgetauschten Aminosäuren an Position 258 (Serin durch Asparagin, Poly 6.3) und Position 287 (Arginin durch Histidin, Poly 6.4) nicht im Bereich der funktionell wichtigen Domäne des bZIP-Motivs lokalisiert sind, ist eine direkte Auswirkung auf die physiologische Funktion des Transkriptionsfaktors nicht auszuschließen. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren können verschiedene Bindungs- und Dimerisationseigenschaften von Proteinen beeinflusst werden.

Serin und Asparagin sind zwei neutrale Aminosäuren mit polaren Seitenketten, wobei Asparagin im Gegensatz zu Serin zwei Amino-Gruppen enthält, die an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Bei physiologischem pH sind die Seitengruppen negativ geladen. Die Hydroxygruppe in der Seitenkette von Serin ist auch an Wasserstoff-Brücken beteiligt und kann durch Phosphorylierung modifiziert werden.

Arginin und Histidin gehören beide zu den basischen Aminosäuren. Arginin enthält zwei ionisierte Amino-Gruppen die für die positive Ladung verantwortlich sind. Der Imidazolring des Histidins kann je nach Umgebung ungeladen oder positiv geladen sein. Histidin befindet sich häufig im reaktiven Zentrum verschiedener Proteine, in dem es wechselnde Bindungen eingeht.

Infolge dieser unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung kommt es zu Abweichungen der verschiedenen Proteinparameter wie Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt und Ladung bei pH7, was auch Auswirkungen auf das Verhalten des Proteins unter bestimmten reaktiven Bedingungen hat.

Ob und inwiefern die beschriebenen Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung direkte oder indirekte Auswirkungen auf die Funktionalität des Fos-Proteins haben, wird sich erst im Laufe von Folgeuntersuchungen darstellen lassen.

Unabhängig von eventuellen direkten Auswirkungen auf die Aminosäurezusammensetzung des Fos-Proteins, sind alle gefundenen Mutationen potentielle Markerkandidaten in Bezug auf die mit Muskelhypertrophie, Fleischqualität und verschiedenen konstitutionellen Parametern wie Fruchtbarkeit in Verbindung stehenden Merkmale.

Die Aufklärung einer entsprechenden Bedeutung der dokumentierten Sequenzunterschiede erfordert die Genotypisierung einer größeren Anzahl unterschiedlicher Tiere mit sich anschließenden Segregations- und Assoziationsstudien.

Entwicklung von PCR/Restriktionssystemen zur Genotyp-Analyse

Voraussetzung für die gezielte Untersuchung der gefundenen Sequenzunterschiede in Form von Segregations- und Assoziationsstudien an geeignetem Familienmaterial ist die Möglichkeit der einfach durchführbaren Genotypisierung großer Tierzahlen.

Eine im Gegensatz zur aufwendigen Southern-Blot Hybridisierung kostengünstig und verhältnismäßig einfach durchführbare Methode der Typisierung stellt die PCR/RFLP-Analyse dar. Nach Amplifikation der entsprechenden Sequenzabschnitte erfolgt die restriktionsenzymatische Spaltung der Amplifikate mit, für den einzelnen Basenaustausch spezifischen, Restriktionsenzymen und die Visualisierung der entstandenen DNA-Fragmente per Gelelektrophorese. Dies erfordert jedoch das Einfügen oder Entfernen entsprechender spezifischer Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen durch die einzelnen Mutationen. Für drei der gefundenen Polymorphismen im Intron 3 (Poly 9.1) und Exon 4-Bereich (Poly 9.2 und Poly 6.3) konnten auf Anhiob entsprechende Restriktionsschnittstellen in den Amplifikaten lokalisiert werden, die eine RFLP-Analyse ermöglichen (siehe Abbildung 27). Die bisher durchgeführten Vorversuche an je 6 Tieren der Rassen Pietrain und Meishan deuten vor allem bei Poly 6.3 auf eine interessante Verteilung der Genotypen hin, da sich hier bisher alle untersuchten Tiere als homozygot erwiesen haben. Dies verspricht interessante

Untersuchungsergebnisse bei im Anschluß durchführbaren Folgearbeiten in Form von Typisierungen geeigneten Familienmaterials der beiden Rassen, umso mehr als dieser Polymorphismus sich, wie oben beschrieben, auch zwischen verschiedenen Spezies wiederholt.

Poly 9.1 und Poly 9.2 zeigen sich bisher bei den Angehörigen der Rasse Pietrain als ausschließlich homozygot, wohingegen bei den Meishan-Tieren auch heterozygote Tiere typisiert wurden. Eine detaillierte Typisierung größerer Tierzahlen wird Aufschluß über die genaue Allelverteilung geben.

Schlußfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die komplette Gen- und Proteinsequenz eines in zellregulatorischen Fragen sehr wichtigen Protoonkogens, c-fos, für die Spezies Schwein darzustellen und im Vergleich zu anderen Spezies zu analysieren. Dies ist ein wichtiger Beitrag zur weiteren Vervollständigung der Analyse des Schweinegenoms, da bis zu diesem Zeitpunkt die komplette Nukleotidsequenz dieses Genes, sowie seine chromosomale Lokalisation nicht bekannt war.

Zusätzlich wurden mit der vorliegenden Arbeit die Voraussetzungen für eine weitergehende Untersuchung der Rolle dieses Genes im Rahmen konstitutioneller und wachstumsassoziiertes Merkmale geschaffen. Durch Studien der gefundenen Polymorphismen an geeignetem Familienmaterial mit anschließenden Assoziations- und Segregationsanalysen können Aussagen über eine mögliche Zuordnung der verschiedenen c-fos-Allele zu den mit Wachstum und Konstitution direkt oder indirekt verbundenen Merkmalsbereichen getroffen werden. Dank der hier etablierten RFLP/PCR-Systeme können drei interessante Polymorphismen ohne weitere Voruntersuchungen sofort einer gezielten Typisierung an größerem Tiermaterial unterzogen werden.

Des Weiteren bietet die Aufklärung der chromosomalen Lokalisation die Möglichkeit, verschiedene interessante, in diesem Genabschnitt lokalisierte Gene und Genmarker sowie relevante QTL's in diese Untersuchungen einzubeziehen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das porcine c-fos Protoonkogen vor dem Hintergrund seiner ausreichend dokumentierten Rolle als Transkriptionsfaktor bei Zellwachstums- und Zelldifferenzierungsprozessen, vor allem auch im Rahmen von Muskelzellhypertrophie, isoliert und in Form der kompletten Sequenzierung und chromosomalen Lokalisierung charakterisiert. Weiterhin wurde die genetische Variabilität des Genes bei konstitutionell sehr unterschiedlichen Schweinerassen auf Sequenzebene untersucht. Für einzelne manifest gewordene Sequenzpolymorphismen wurden PCR/Restriktionsysteme zur Typisierung größeren Tiermaterials entwickelt.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Das c-fos Protoonkogen wurde mittels einer schweinespezifischen Sonde aus einer Lambda-FixII-Genbank vom Schwein isoliert, in Plasmidvektoren subkloniert, und in einer Ausdehnung von insgesamt 4200 bp sequenziert (EMBL Acc.No.AJ132510). Auf der Basis von Homologievergleichen zu anderen Spezies konnte der charakteristische Aufbau des Genes mit den 4 Exon- und 3 Intronbereichen sowie den funktionell wichtigen Domänen und Promotorelementen dokumentiert werden.

Das c-fos Gen kodiert für ein 380 Aminosäuren zählendes Protein mit dem charakteristischen bZIP-Motiv als funktionell wichtigster Bereich.

Die Homologie zum Menschen beträgt für das gesamte Gen 84,8%, im Bereich der funktionell wichtigen Domäne der basischen Region und des Leucin-Zippers befinden sich keine Basenaustausche.

Mit Hilfe eines Schweine-Nager-Zellhybridpanels konnte c-fos auf dem Chromosom SSC 7q12-23 oder q26 lokalisiert werden. Durch Synthenievergleiche mit dem Menschen konnte der wahrscheinliche Lokalisationsort auf SSC 7q23 begrenzt werden.

Die Suche nach Sequenzunterschieden zwischen konstitutionell unterschiedlichen Rassen erfolgte mittels spezifisch entwickelter PCR-Systeme zur Amplifikation definierter Sequenzabschnitte mit anschließender Sequenzierung. So konnten für die Rassen Pietrain und

Meishan detaillierte Sequenzinformationen über insgesamt 3579 bp des Genes erhalten werden.

Insgesamt zeigten sich im Vergleich zur Genbanksequenz zehn Basenaustausche. Davon befinden sich interessanterweise fünf im Bereich des Exon 4, zwei davon gehen mit einem Aminosäureaustausch auf der Proteinebene einher. An Position 2910 befindet sich beim Meishan im Gegensatz zum Pietrain ein Guanin anstelle eines Adenins, was auf Proteinebene den Austausch eines Asparagins durch ein Serin bedeutet. Dieser Polymorphismus zeigt sich auch zwischen den Spezies, wo Mensch und Hamster die gleiche Sequenz wie das Meishan zeigen. Maus und Ratte sind hier identisch mit Pietrain und der Genbanksequenz. Des Weiteren ist an Position 2997 beim Pietrain ein Guanin durch ein Adenin ersetzt wodurch es zum Austausch eines Arginins durch ein Histidin auf Proteinebene kommt. Dieser Austausch wiederholt sich nicht bei anderen untersuchten Spezies.

Bei den restlichen handelt es sich um stille Mutationen ohne direkte Auswirkung auf die Proteinzusammensetzung von c-Fos.

Alle weiteren Austausche befinden sich im untranslatierten Bereich des Genes, zwei auf Höhe des Intron 1, einer im Intron 3-Bereich und schließlich zwei im Bereich des vorderen 3' Endes. Der mittlere Bereich des Genes von Position 1257 bis Position 2443 mit Teilen des Intron 1 sowie der gesamten Intron 2 und 3 und der Exons 2 und 3 weist keine Unterschiede in der Nukleotidfolge zwischen den untersuchten Tieren auf. Auch das Exon 1 zeigt keine Sequenzunterschiede.

Die gefundenen Basen- und Aminosäureaustausche bedürfen der Verifizierung an größeren Tierzahlen. Zu diesem Zwecke wurden für einzelne Austausche PCR/Restsriktionssysteme entwickelt, die eine Typisierung größeren Probenmaterials ermöglichen.

Ein TaqI-Restsriktionspolymorphismus entsteht durch den Basenaustausch an Position 2544.

Der erste Austausch im Exon 4 an Position 2650 bewirkt einen AluI-Restsriktionpolymorphismus

Der mit einem Aminosäureaustausch einhergehende Polymorphismus an Position 2910 läßt sich durch einen TaiI-Restsriktionspolymorphismus nachweisen.

Alle hier aufgezeigten RFLP's müssen anhand von größeren Tierzahlen überprüft werden. Durch das Screenen geeigneten Familienmaterials können dann Assoziations- und Segregationsstudien erfolgen.

7 Summary

The objective of the present work was the isolation and characterization of the porcine c-fos protooncogene. The product of this gene plays an important role as a transcription factor in several cell growth and differentiation processes, especially concerning muscle cell hypertrophy.

Complete sequencing and chromosomal localization of the gene was realized. Additionally its genetic variability concerning constitutionally very different pig breeds was examined. PCR/Restriction-systems were developed for some of the sequence polymorphisms found, in order to realize further investigations in a large number of animals from different breeds.

Following results were obtained:

The c-fos protooncogene was isolated from a lambda fixII genomic bank by hybridization to a pig-specific probe, subcloned in plasmid-vectors and sequenced in a range of 4200bp (EMBL Acc.No.AJ132510). The characteristic structure of the gene with its 4 exons and 3 introns and the functionally important domains and promotor elements were documented based on the homology to other species.

The c-fos gene represents the code for a protein of 380 amino acids with a characteristic functionally very important bZIP domain.

Homology between pig and human is 84,8%, while there are no base exchanges in the functionally very important domains like the basic domain or the leucine zipper.

Screening a pig/rodent cell hybrid panel, c-fos was localized on SSC 7q12-23 or q26. By comparing genetic mapping data the localization could be precised to SSC7q23.

The search for sequence differences between constitutionally different pig breeds was carried out by developing specific PCR systems for the amplification of defined sequence regions and the following sequencing of these regions. Detailed sequence information over 3579bp was achieved for meishan and pietrain breeds. Ten base exchanges could be documented in comparison to the sequence of the genebank. Five mutations are located in the region of the exon 4, two of them also present an exchange in the protein sequence. First the presence of a guanin in the meishan breed instead of an adenin in pietrains at position 2910 means the

exchange of serin to asparagin in the protein. This polymorphism also figures between different species. Human and hamster sequences fit with the meishan while mouse and rat are identical to the pietrain and genebank sequence.

There is also an exchange of a guanin to an adenin at position 2997 in pietrains which means the exchange of an arginin to a histidin in the protein. This polymorphism does not appear between other species.

All the others are quiet mutations without effect on the protein sequence of c-Fos.

The other five base exchanges are located in the untranslated parts of the gene, two in intron 1, one in intron 3 and finally two in the 3'end of the gene. The mid part of the gene from position 1257 to position 2443 including parts of intron 1 as well as the whole intron 2 and 3 and the exons 2 and 3 doesn't show any sequence differences between the examined animals. The exon 1 is also identical between the two breeds.

The base- and amino acid exchanges found must be verified on a larger number of animals. Thats why we established PCR/Restrictionsystems for defined mutations allowing the screening of a large number of probes.

A TaqI-RFLP corresponds to the base exchange at position 2544.

The first mutation in the fourth exon at position 2910 which corresponds to a TaiI-polymorphism.

All described RFLP's have to be verified on larger animal numbers. The screening of defined families then allows association and segregation studies.

8. Literaturverzeichnis

- Abate C. and Curran T. (1990) Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1. *Semin. Cancer Biol.* 1:19-26.
- Abate C., Luk D., Gagne E., Roeder R.G., Curran T. (1990) Fos and jun cooperate in transcriptional regulation via heterologous activator domains. *Mol Cell Biol* 10 (10): 5532-5.
- Abate C., Marshak, D.R., Curran T. (1991) Fos is phosphorylated by p34cdc2, cAMP-dependant protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* 6 (12): 2179-85.
- Abate C., Luk D., Curran T. (1991b) Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol Cell Biol* 11 (7): 3624-32.
- Abate C., Baker S.J., Lees-Miller S.P., Anderson, C.W., Marshak D.R., Curran T (1993) Dimerization and DNA binding alter phosphorylation of Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci* 90 (15): 6766-70.
- Andersson L., Haley C.S., Ellegreen H., Knott S.A., Johansson M., Andersson K., Andersson-Eklund L., Edfors-Lilja I., Fredholm M., Hansson I. (1994) Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263 (5154): 1771-4.
- Angel P., Imagawa M., Chiu R., Stein B., Imbra R.J., Rahmsdorf H.J., Jonat C., Herrlich P., Karin M. (1987) Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49: 729-739.
- Angel P., Allegretto E.A., Okino S., Hattori K., Boyle W.J., Hunter T., Karin M. (1988) Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332: 875-885.
- Angel P. and Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and AP-1 in cell-proliferation and transformation. *Biochem.Biophys.Acta* 1072:129-157.
- Agre P., Johnson P.F., Mcknight S.L. (1989) Cognate DNA binding specificity retained after leucine zipper exchange between GCN4 and C/EBP. *Science* 246,1157-1161.
- Bannister A.J., Brown H.J., Sutherland J.A., Kouzarides T. (1994) Phosphorylation of the c-Fos and c-Jun HOB1 motif stimulates its activation capacity. *Nucleic Acids Res* 22 (24): 5173-6.
- Bartel D.P., Sheng M., Lau L., Greenberg M. (1989) Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* 3:304-313.
- Bauters C., Moalic J.M., Bercovici J., Mouas C., Emanoil-Ravier R., Schiaffino S., Swynghedauw B. (1988) *C R Acad Sci III* 306 (20): 597-600.
- Baxevanis A.D. and Vinson C.R. (1993) Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr.Opin.Genet.Dev.* 3,278-285.
- Bilka H., Börner T. (1995) *Molekulare Biologie der Zelle* : 243-245. Fischer Verlag
- Bishop J.M. (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu.Rev.Biochem.* 52:301-354.
- Bisophric N.H., Jayasena V., Webster K.A. Positive regulation of the skeletal alpha-actin gene by FOS and JUN in cardiac myocytes. *J.Biol.Chem.* 267 (35): 25535-40.
- Bisophric N.H., Webster K.A. (1991) Fos and Jun regulate preferential induction of skeletal α -actin gene in neonatal rat heart cells. *Circulation* 84 (suppl.II): II-87.
- Blanchard J.M., Piechaczyk M., Fort P., Bonniou A., Mechti, N., Rech, J., Cuny M., Lebleu B., Jeanteur P. (1988) The regulatory strategies of c-myc and c-fos proto-oncogenes share some common mechanisms. *Biochimie* 70 (7): 877-84.

- Bohmann D., Bos T., Admon A., Nishimura T., Vogt P., Tjian R. (1987) Human protooncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 238: 1386-1392.
- Bonnieu A., Rech J., Jeanteur P., Fort P. (1989) Requirements for c-fos mRNA down regulation in growth-stimulated murine cells. *Oncogene* 4, 881-888.
- Boutillier A.-L., Barthel F., Roberts J.L., Loeffler J.-P. (1992) β -adrenergic stimulation of c-fos via protein kinase A is mediated by cAMP regulatory element binding protein (CREB)-dependant and tissue-specific CREB-independant mechanisms in corticotrope cells. *J.Biol.Chem.* 267 (33):23520-26.
- Brand T., Sharma H.S., Fleischmann K.E., Duncker D.J., Mc Falls E.O., Verdouw P. D., Schaper W. (1992) Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ.Res.* 71 (6): 1351-1360.
- Brenig B., Brehm G. (1992) Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (ryr1). *FEBS Lett.*: 277-279.
- Breuer E.M. (1990) Zur Eignung der Histometrie und des immunhistochemischen Nachweises von fetalem Myosin als Diagnostikverfahren für die Belastungsmiopathie des Schweines. *Journal of Veterinary Medicine A* 37, 356-371.
- Brown H.J., Sutherland J.A., Cook A., Bannister A.J., Kouzarides T. (1995) An inhibitor domain in c-fos regulates activation domains containing the HOB 1 motif. *EMBO J* 14 (1):124-31.
- Boxer L.M., Prywes R., Roeder R.G., Kedes L. (1989) The sarcomeric actin CARG- binding factor is indistinguishable from the c-fos serum response factor. *Mol.Cell.biol.* 9:515-22
- Carafoli E., Penniston T. (1986) Das Kalziumsignal. in: *Moleküle des Lebens , Spektrum der Wissenschaft.*
- Chen J.H. (1980) Expression of endogenous avian myeloblastosis virus information in different chicken cell. *J.Virol.* 36,162-170.
- Chen R.H., Abate C., Blenis J. (1993) Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90k-Da ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci* 90 (23): 10952-6.
- Chen R.H., Juo P.C., Curran T., Blenis J. (1996) Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12 (7): 1493-502.
- Chiu R, Boyle W.J., Meek J., Smeal T, Hunter T., Karin M. (1988) The c-Fos protein interacts with c-Jun/ AP1 to stimulate transcription of AP1 responsive genes. *Cell* 54:541-552.
- Chotia C. (1984) Principles that determine the structure of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53,537-572.
- Cochran B.H., Zullo, J., Verma I.M., Stiles C.D (1984) Expression of the c-fos gene and a fos-related gene is stimulated by platelet derived growth factor. *Science* 226:1080-1082.
- Curran T., Peters G, Van Beveren C, Teich N.M., Verma I.M. (1982) FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J.Virol.* 44 (2):674-82.
- Curran T. and Franza B.R. (1988) Fos and Jun : The AP1 connection. *Cell* 55: 395-397.
- Curran T. and Morgan J.I. (1985) Super-induction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science Wash.DC*229:1265-1268
- Dawes N.J., Cox V.M., Park K.S., Nga H., Goldspink D.F. (1996) The induction of c-fos and c-jun in the stretched latissimus dorsi muscle of the rabbit : responses to duration, degree and re-application of the stretch stimulus. *Exp. Physiol.* 81 (3):329-339.

- Edmondson D.G. and Olson E.N. (1993) Helix-Loop-Helix Proteins as Regulators of Muscle-specific Transcription. *J.Biol.Chem.* 268 (2): 755-758.
- Finkel M.P., Biskis B.O., Jinkins P.B. (1966) Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* 151:698-701.
- Fujii, J.; Otsu, K.; Zorzato, F.; de Leon, S.; Khanna, V.K.; Weiler, J.E.; O'Brien, P.J.; Mc Lennan, D.H. (1991) Identification of a mutation in porcine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253, 448-451.
- Fort P., Rech, J., Piechaczyk M, Bonniou A., Jeanteur P., Blanchard J.M. (1987) Regulation of c-fos gene expression in hamster fibroblasts: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation. *Nucl. Acids Res.*15: 5657-5667.
- Gidh-Jain M., Huang B., Jain P., Gick G., El-Sherif N.(1998) Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarctation. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 30 (3):627-637.
- Gius D., Cao X.M., Rauscher F.J., Cohen D.R., Curran T., Sukhatme V.P. (1990) Transcriptional activation and repression by Fos are independant functions: the C-terminus represses immediate-early gene expression via CArG elements. *Mol Cell Biol* 10 (8): 4243-55.
- Glodek, P. (1988) Züchterische Bearbeitung von Antagonismen zwischen Leistung und Gesundheit beim Schwein. *Tierärztl. Prax. Suppl.*3, 11-15.
- Glover J.N., Harrison S.C. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-C-Jun bound to DNA. *Nature* 373 (6511): 257-61.
- Goldspink, G (1972) Postembryonic growth and differentiation of striated muscle. Structure and function of muscle, Vol.I, New York, USA; Academic Press, pp. 179-235
- Greenberg M.E., Greene L.A., Ziff E.B. (1985) Nervegrowth factor and epidermal growth factor induce transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *Biol.Chem.* 260: 14101-14110.
- Greenberg M.E. and Ziff E.B. (1984) Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature Lon.*311: 433-438.
- Greenberg M.E., Ziff E.B., Greene L.A. (1986) Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234: 80-83
- Greenberg M.E., Siegfried Z., Ziff E.B. (1987) Mutation of the c-fos gene dyad symmetry element inhibits serum inducibility of transcription in vivo and the nuclear regulation factor binding in vitro. *Mol.Cell.biol.* 7 :1217-25
- Gouthier-Rouvière C., Basset M., Lamb N.J., Fernandez A. (1992) Role of fos-AP-1 binding sequence (FAP) in the induction of c-fos expression by purified C-kinase and in c-fos down-regulation following serum induction. *Oncogene* /(2):363-9.
- Halazonetis T.D., Georgopoulos K., Greenberg M.E., Leder P. (1988) c-jun dimerizes with itself and with c-fos forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55: 917-924.
- Hammond G.L., Lai Y-K., Markert C.L. (1982) Diverse forms of stress lead to new patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79:3485-3488.
- Härtig E., Loncarevic I.F., Büscher M., Herrlich P., Rahnsdorf J.(1991) A new cAMP response element in the transcribed region of the human c-fos gene. *Nucleic Acids Research*, 19 (15):4153-59.
- Hipskind R.A., Nordheim A. (1991) Functional dissection in vitrp of the human c-fos promotor. *J.Biol.Chem.*266 (29):19583-92.

- Hirai S., Bourachot B., Yaniv M. (1990) Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene* 5 (1): 39-46.
- Hurst H. (1994) Transcription factors 1; bZIP proteins. *Protein Profile I*, 123-152.
- Janss L.L., van Arendonk J.A., Braskamp E.W. (1997) Bayesian statistical analyses for presence of single genes affecting meat quality traits in a crossed pig population. *Genetics* 145 (2): 395-408.
- Jooss K.U., Funk M., Muller R. (1994) An autonomous N-terminal transactivation domain in Fos protein plays a crucial role in transformation. *EMBO J* 13 (6): 1467-74.
- Judge M.D., Briskey E.J., Meyer K. (1966) Endocrine related post-mortem changes in porcine muscle. *Nature* 212: 287.
- Karin M., Hunter T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation : signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 5 (7): 747-57.
- Kim et al. (1992) Effect of genetic background on the developmental expression of c-fos and c-myc in chicken; *Mol.Biol.Rep.*1992 May; 16 (2): 85-90.
- Knippers *Molekulare Genetik* xxxxxxxxxxxx
- Knoell et al. (1994) Changes in gene expression following short coronary occlusions studied in porcine hearts with run-on assays. *Res.*, 28,1062.
- Konig H., Ponta H., Rahmsdorf U., Buscher M., Schonthal A., Rahmsdorf H.J., Herrlich P (1989) Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J* 8 (9): 2559-66.
- Kouzarides T. and Ziff E. (1988) The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336: 646-651.
- Kruijer W., Cooper J.A., Hunter T., Verma I.M. (1984) Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of c-fos and protein. *Nature* 312:711-716.
- Kruijer W., Schubert D., Verma I.M. (1985) Induction of the proto-oncogene fos by nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 82: 7330-7334.
- Lamb N.J., Fernandez A., Tourkine N., Jeanteur P., Blanchard J.M. (1990) Demonstration in living cells of an intragenic negative regulatory element within the rodent c-fos gene. *Cell* 61 (3): 485-96.
- Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240,1759-1764.
- Leach L.M., Ellis M., Sutton D.S., MCKEITH F.K., Wilson E.R. (1996) *J.Anim.Sci.* 74 (5): 934-43.
- Lee W., Mitchell P., Tjian R. (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49: 741-752.
- Levy J.A., Hartley J.W., Rowe W.P., Huebner R.J. (1972) Studies of FBJ osteosarcoma virus in tissue culture.I.Biologic characteristics of the c-type viruses. *J.Nat.Cancer Inst.*51:525-39.
- Levy J.A., Kazan P.L., Reilly C.A., Finkel M.P. (1978) Studies of FBJ osteosarcoma virus in tissue culture.III. Isolation and characterisation of non-virus-producing FBJ-transformed cells. *J.Virol.* 26 (1): 11-5
- Macara I.G. (1989) Oncogenes and cellular Transduction *Physiological Reviews* 69 (3): 797-815.
- Mac Lennan D.H.; Duff C.; Zorzato F.; Fujii J.; Phillips M.; Korneluk R.G.; Frodis W.; Britt B.A.; Worton R.G. (1990) Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*, 343 (6258): 559-61
- Mac Ray J.C., Skene P.A., Connell A., Buchan V., Lobley G.E. (1988) The action of the β -agonist clenbuterol on protein and energy metabolism in fattening wether lambs. *Brit.J.Nutr.* 59, 457-65.

- Marklund L., Nystrom P.E., Stern S., Andersson-Eklund L., Andersson L. (1999) Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity* 82 (Pt 2):134-4.
- Marx J.L., (1987) The fos gene as master switch. *Science* 237,854-856.
- McBride K. and Nemer M. (1998) The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Mol.Cell.Biol.* 18 (9):5073-81.
- Meghji, P.; Nazir, S.A.; Dick, D.J.; Bailey, M.E.; Johnson, K.J.; Lab, M.J. (1997) Regional workload induced changes in electrophysiology and immediate early gene expression in intact in situ porcine heart. *J.Mol.Cell.Cardiol.*, 29 (11):3147-3155
- Mehmet, H.; Rozengurt, E. (1991) Regulation of c-fos expression in Swiss 3T3 cells: an interplay of multiple signal transduction pathways. *British Medical Bulletin* 47, 76
- Mickelson, J.R.; Ross, J.A.; Hyslop, R.J.; Gallant, E.M.; Louis, C.F. Skeletal muscle sarcolemma in malignant hyperthermia: evidence for a defect in calcium regulation. *Biochem.Biophys.Acta*, 897 (3): 364-76
- Morgan I.M., Birnie G.D. (1992) The serum response element and an AP-1/ATF sequence immediately downstream co-operate in the regulation of c-fos transcription. *Cell.Prolif.* 25 (3):205-15.
- Morgan, J.I.; Curran, T. (1986) Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* 322, 552
- Müller R., Slamon D.J., Trembley J.M., Cline M.J., Verma I.M. (1982) Differential expression of cellular oncogenes during pre and postnatal development of the mouse. *Nature* 299:640-44.
- Muller R., Bravo R., Burckhardt J., Curran T., (1984) Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312: 716-720.
- Nakabeppu Y., Ryder K., Nathans D. (1988) DNA binding activities of three murine jun proteins: stimulation by fos. *Cell* 55: 907-915.
- Nakabeppu Y., Nathans D. (1989) The basic region of Fos mediates specific DNA binding. *EMBO J.* 8 (12): 3833-41.
- Nelson, T.E. (1988) SR function in malignant hyperthermia. *Cell Calcium*, 9 (5-6): 257-65.
- Neuberg M., Schuermann M., Muller R. (1991) Mutagenesis of the DNA contact site in Fos protein: compatibility with the scissors grip model and requirement for transformation. *Oncogene* 6, 1325-1333.
- Ofir R., Dwarki V.J., Rashid D., Verma I.M. (1990) Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature* 1; 348 (6296): 80-2.
- Oksbjerg N., Blackshaw A., Fernandez J. (1989) Salbutamol (β -Agonist) and muscle fibre type in pigs. In: *Manipulating pig production, II* (J.L. Barnett und D:P: Hennessy, eds), Australas.Pig Sci.Ass.Werreby. p68.
- Ollivier, L. (1982) Genetic determination of muscular hypertrophy in the pig. In: *Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production*. The Hague, Netherlands; Martinus Nijhoff Publishers for the Commission of the European Communities, pp. 429-434.
- O'Neil K.T., Hoess R.H., DeGrado W.F. (1990) Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif. *Science* 249, 774-778.
- Osaki J., Haneda T., Sakai H., Kikuchi K. (1997) cAMP- mediated expression in pressure-overloaded acceleration of protein synthesis in adult rat heart. *Cardiovasc.Res.* 33 (3): 631-640
- Osbaldeston N.J., Lee D.M., Cox V.M., Hesketh J.E., Morrison J.F., Blair G.E., Goldspink D.F. (1995) The temporal and cellular expression of c-fos and c-jun in mechanically stimulated rabbit latissimus dorsi muscle. *Biochem. J.* 308 (Pt2): 465-471.

- O'Shea E.K., Rutkowski R., Kim P.S. (1992) Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* 68, 699-708.
- O'Shea E.K., Rutkowski R., Stafford W.F., Kim P.S. (1989) Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science* 245, 646-648.
- Piette J., Yaniv M. (1987) Two different factors bind to the α -domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos-enhancers. *EMBO J.* 6: 1331-1337.
- Powell S.E., Aberle E.D. (1975) Cellular growth of skeletal muscle in swine differing in muscularity. *J.An.Sci.* vol.40 no.3, 476-485.
- Puntschart A., Wey E., Jostarndt K., Vogt M., Wittwer M., Widmer H.R., Hoppeler H., Billeter R. (1998) Expression of fos and jun genes in human skeletal muscle after exercise. *Am.J.Physiol.* 247 (1Pt1): C129-C137.
- Ransone L.J., Verma I.M. (1990) Nuclear proto-oncogenes FOS and JUN. *Ann.Rev. Cell. Biol.* 6:539-557.
- Ransone L.J., Wamsley P., Morley K.L., Verma I.M. (1990) Domain swapping reveals the modular nature of Fos, Jun, and CREB proteins. *Mol.Cell.Biol.* 10 (9): 4565-73.
- Ransone L.J., Kerr L.D., Schmitt M.J., Wamsley P., Verma I.M. (1993) The bZIP domains of Fos and Jun mediate a physical association with the TATA box-binding protein. *Gene Expr* 3 (1): 37-48.
- Rauscher F.J., Cohen D.R., Curran T., Bos T.J., Vogt P.K., Bohmann D., Tjian R., Franza B.R. (1988) Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* 240: 1010-1016
- Rauscher F.J., Voulalas P.J., Franza Jr., Curran T. (1988) Fos and Jun bind cooperatively to the AP1 site : Reconstruction in vitro. *Genes Devel.* 2:1687-1699.
- Reiner, G. (1989) Untersuchungen zur Ätiologie und Diagnose von Stresstoleranz und Maligner Hyperthermie bei Schweinen unterschiedlicher Halothansensitivität. Giessener Schriftenreihe Tierzucht und Haustiergenetik No.55, Hamburg, Berlin, Paul Parey.
- Reiner G.; Hartmann, J.; Dzapo, V. (1993) Sarkoplasmatische Kalziumregulation, Muskelfülle und SDS beim Huhn. DVG-Tagungsband Geflügelkrankheiten.
- Reiner G. (1993) A new physiological pathway controlling muscle growth and its potential relevance for pig production. *Pig News and Information*, Vol.14 No.3, 123N-125N.
- Reiner G. (1999) Molekulargenetische Studien am porcinen c-myc-Locus zur Phylogenie und Assoziation mit konstitutionellen Merkmalen. Habilitationsschrift. Fachverlag Köhler, Giessen.
- Rivera V.M., Sheng M., Greenberg M.E. (1990) The inner core of the serum response element mediates both the rapid induction and subsequent repression of c-fos transcription following serum stimulation. *Genes Dev.* 4 (2): 255-68.
- Rohrer G.A., Keele J.W. (1998) Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I Fat deposition traits. *J.Anim.Sci.* 76 (9):2247-54.
- Rohrer G.A., Keele J.W. (1998) Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II Muscling and wholesale product yield traits. *J.Anim.Sci.* 76 (9):2255-62.
- Runkel L., Shaw P.E., Herrera R.A., Hipskind R.A., Nordheim A. (1991) Multiple basal promoter elements determine the level of human c-fos transcription. *Mol.Cell.Biol.* 11 (3):1270-80
- Sadoshima J., Izumo S. (1993) Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers-. *Circ.Res.* 73 (3): 424-38.

- Sambucetti L.C. and Curran T. (1986) The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science* 234 (4782):1417-9.
- Sassone-Corsi P., Ransone L.J., Lamph W.W., Kamps M., Verma I.M. (1988) Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: Role of the leucine zipper domain. *Nature* 336:692-695.
- Sassone-Corsi P., Visvader J., Ferland L., Mellon P.L., Verma I.M. (1988) Induction of proto-oncogene fos transcription through adenylate cyclase pathway : characterization of a cAMP- response element. *Genes Dev.* 2 (12A):1529-38
- Schonthal, A.; Sugarman, J.; Brown, J.H.; Hanley, M.R.; Feramisco, J.R. (1991) Regulation of c-fos and c-jun protooncogene expression by the Ca-ATPase inhibitor Thapsagargin. *Proc.Nat.Ac.Sci.*88,7096.
- Schulz G.E. and Schirmer R.H. (1979) Principles of Protein Structure. New York: Springer-Verlag.
- Sheng M., Dougan S.T., McFadden G., Greenberg M.E. (1988) Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol.Cell.Biol.*,8 (7):2787-96.
- Sheng M., McFadden G., Greenberg M.E. (1990) Membrane depolarization and Calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4 (4): 571-82.
- Sheng, M.; Thompson, M.A.; Greenberg, M.E. (1991) CREB: a Ca-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependant kinases. *Science*, 252, 1427.
- Shibuya M., Hanafusa H., Balduzzi P.C. (1982) Cellular sequences related to three new onc genes of avian sarcoma viruses (fps, yes and ros) and their expression in normal transformed cells. *J.Virol.* 42,143-152.
- Shilo B.J. and Weinberg R.A. (1981) DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 78: 6789-6792.
- Shyu A.-B., Greenberg M.E., Belasco J. G. (1989) The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev.* 3:60-72.
- Smidt D., Kallweit E., Ladewig J. (1988) Streß, Gesundheit und Leistung beim Schwein. *Tierärztl.Prax.Suppl.*3, 1-10.
- Sundaralingam M., Sckharudu Y.C., Yathindra N., Ravichandran V. (1987) Ion pairs in alpha helices. *Proteins.* 2, 64-71.
- Sutherland J.A., Cook A., Bannister A.J., Kouzarides T. (1992) Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev.* 6 (9): 1810-19.
- Sutrave P., Kelly A.M., Hughes S.H. (1990) ski can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. *Genes dev.* 4 (9): 1462-72.
- Te Pas M.F., Soumillon A., Harders F.L., Verburg F.J., van den Bosch, T.J., Galesloot P., Meuwissen T.H. (1999) Influences of myogenin genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. *J.Anim.Sci.* 77 (9): 2352-6.
- Tratner I., Ofir R., Verma I.M. (1992) Alteration of a cyclic AMP- dependent protein kinase phosphorylation site in the c-Fos protein augments its transforming potential. *Mol Cell Biol* 12 (3): 998-1006.
- Topel D.G., Bicknell E.J., Preston K.S., Christian L.L., Matsushima L.Y. (1968) Porcine Stress Syndrome. *Mod.Vet.Pract.*49:40.
- Treisman R. (1985) Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell*, 42 (3):889-902.
- Turner R. and Tjian R. (1989) Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. *Science* 243, 1689-1694.

-
- Van Sraaten F., Müller R., Curran T., Van Beveren C., Verma I.M. (1983) Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: Deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* Vol.50, 3183-3187.
- Veyrune J.L., Carillo S., Vié A., Blanchard J.M. (1995) c-fos mRNA instability determinants present within both the coding and the 3' non coding region link the degradation of this mRNA to its translation. *Oncogene* 11, 2127-2134.
- Vinson C.R., Sigler P.B., McKnight S.L. (1989) Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* 246, 911-916.
- Vogt P. K., Bos T.J., Mitsunobu F., Nishimura T., Monteclaro F., Su H. (1990) The oncogenicity of jun. In: *Genetic Basis for Carcinogenesis: Tumour Suppressor Genes and Oncogenes*, ed by Knudson Jr., A.G.e.a. London: Taylor and Francis Ltd.
- Walling G.A., nArchibald A.L., Cattermole J.A., Downing J.A., Finlayson H.A., Nicholson D., Visscher P.M., Walker C.A., Haley C.S. (1998) Mapping of quantitative trait loci on porcine chromosome 4. *Anim.Genet.*29 (6):415-24.
- Wang L., Yu T.P., Tuggle C.K., Liu H.C., Rothschild M.F. (1998) A directed search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs. *J.Anim.Sci.* 76 (10):2560-7.
- Wang W.W., Howells R.D. (1994) Sequence of the 5'- flanking region if the rat c-fos proto-oncogene. *Gene* 143 (2):261-4.
- Whitelaw, F.; Hesketh, E. (1992) Expression of c-myc and c-fos in rat skeletal muscle. Evidence for increased levels of c-myc m-RNA during hypertrophy. *Biochem.J.* 281, 143.
- Wilson T., Treisman R. (1988) Fos C-terminal mutations block down-regulation of c-fos transcription following serum-stimulation. *EMBO J* 7 (13): 4193-202.
- Wisdon R, Verma I.M. (1993) Transformation by Fos proteins requires a C-terminal transactivation domain. *Mol Cell Biol* 13 (12): 7429-38.
- Wittmann, W.; Peschke, W.; Forster, M. (1993) Mast-und Schlachtleistung von DL-Kastraten in Abhängigkeit vom MHS-Genotyp. *Züchtungskunde*, 65, 197-205.
- Zhang W., Kuhlert D.L., Rempel W.E. (1992) Halothane Gene and swine performance. *J.Anim.Sci.* 70 (5): 1307-13.

Danksagung

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn Professor V. Dzapo für die zur Verfügungstellung des Themas und die außerordentlich wertvolle fachliche Unterstützung während der Durchführung der gesamten Arbeit. Besonders möchte ich ihm für das stets faire und verständnisvolle Entgegenkommen in schwierigen Situationen danken.

Herrn Dr. G. Reiner danke ich für die Hilfe bei der genauen Ausarbeitung des Dissertationsthemas und die Unterstützung bei der Einarbeitung in die molekulargenetischen Methoden. Er war jederzeit ein wertvoller Ansprechpartner für theoretische und praktische Fragen während der Durchführung der gesamten Arbeit.

Frau Heidi Schomber danke ich herzlich für die tolle Hilfe bei der Durchführung der Laborarbeiten und für das sehr freundschaftliche Arbeitsklima. Sie hat es verstanden, mich in Zeiten des Zweifels stets wieder neu zu motivieren, und so einen wesentlichen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Desweiteren möchte ich sämtlichen Mitarbeitern des Institutes Für Tierzucht und Haustiergenetik, besonders am Oberen Hardthof, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Katja Hoffmann, Frau Susanne Portmann und Herrn Holger Matthiak für die tatkräftige Unterstützung meines Durchhaltevermögens.

Herrn H. Willems und Frau C. Jäger vom Institut für Infektionskrankheiten der Tiere danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Sequenzierungen.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die Zurverfügungstellung von Forschungsmitteln.

Beim Ministère de l'éducation nationale in Luxemburg möchte ich mich herzlich für das mir gewährte Stipendium bedanken.

Familie und Freunden und Haustieren danke ich an dieser Stelle für die geduldige und motivierende Anteilnahme in Krisenzeiten. Herrn Dr. Andreas Steinbeck danke ich speziell für die Unterstützung bei computerbezogenen Problemen. Ein besonderer Dank gilt hier meiner Schwester für die zahllosen nervenaufreibenden Telefongespräche und Diskussionen in denen sie es immer wieder verstand mich neu aufzubauen.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an meine Mutter, die meine Ausbildung ermöglicht, und mich während meiner gesamten Studienzzeit in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert hat.