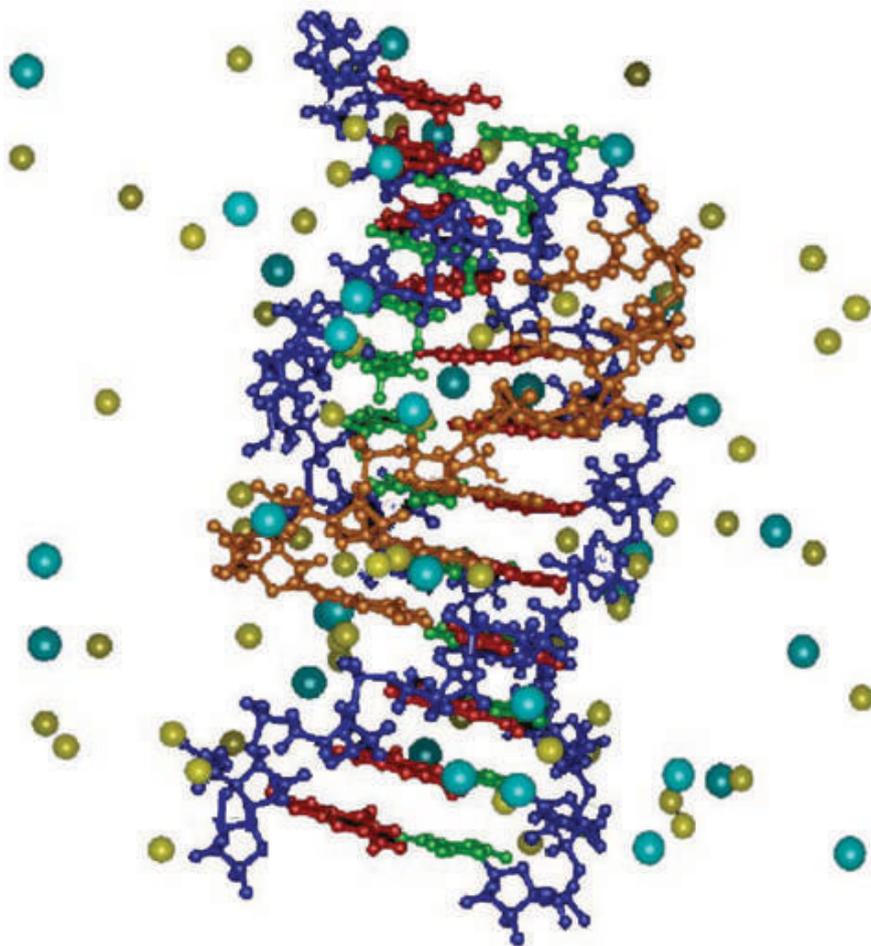


Reza Nezamzadeh

**Analyse der genomischen Struktur,
Mutationsuntersuchung und Expression des
Uroporphyrinogen-Decarboxylase Gens beim Schaf**



Cuvillier Verlag Göttingen

**Analyse der genomischen Struktur,
Mutationsuntersuchung und Expression des
Uroporphyrinogen-Decarboxylase Gens beim Schaf**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Reza Nezamzadeh
geboren in Schiraz/Iran

Göttingen, im Juli 2003

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2003
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2003
ISBN 3-89873-765-9

D 7

1. Referent: Prof. Dr. Dr. B. Brenig
 2. Korreferent: Prof. Dr. C.P. Czerny
- Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2003

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2003
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2003
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-765-9

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Historische Entwicklungskennnisse der Porphyrrie	2
2.2	Pathobiochemie in der Hämbiosynthese	4
2.3	Das Enzym Uroporphyrinogen Decarboxylase (Uro-D)	6
2.4	Klinische Symptome und Histologie der PCT	8
2.5	Molekulargenetische und strukturelle Eigenschaften der Uro-D	10
2.6	Mutationen im Uro-D Gen und ihre Auswirkungen	13
3	Material	16
3.1	Tiere	16
3.2	Genbanken, Bakterien und Plasmide	16
3.2.1	Genbanken	16
3.2.2	Bakterien	16
3.2.3	Plasmide	16
3.3	Enzyme, Oligonukleotide, Chemikalien und Kits	17
3.3.1	Enzyme	17
3.3.2	Oligonukleotide	17
3.3.3	Chemikalien	17
3.3.4	Kits	17
3.4	Verbrauchsmaterialien, Glaswaren und Laborgeräte	18
3.4.1	Verbrauchsmaterialien	18
3.4.2	Glaswaren	18
3.4.3	Laborgeräte	18
4	Methoden	19
4.1	Mikrobiologische Methoden	19
4.1.1	Bakterienkultur	19
4.1.1.1	Plattenkultur	19
4.1.1.2	Flüssigkultur	19
4.1.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	19
4.1.3	Transformation von Plasmiden in Bakterien	20
4.2	Isolierung von Plasmiden aus <i>E.coli</i>	21
4.2.1	Isolierung von Plasmiden mit Qiagen Plasmid Kits	21
4.2.2	Schnellaufschluß durch alkalische Lyse	22
4.3	Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut	22
4.4	Vermehrung und Isolierung von λ-Phagen-DNA	23
4.4.1	Präparation phagenkompetenter Bakterien	23
4.4.2	Titerbestimmung einer Phagenlösung	23
4.4.3	Durchmustern einer Phagen-Genbank	23
4.4.4	Vermehrung, Isolierung und Reinigung der Phagen-DNA	25

4.5	Enzymatische Behandlung und Analyse von DNA	26
4.5.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	26
4.5.2	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden	26
4.5.3	5'-Kinasierung von DNA	26
4.5.4	Ligation von Vektoren und DNA-Fragmenten	27
4.5.5	Polymerase-Kettenreaktion und Klonierung der Amplifikate	27
4.5.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
4.5.5.2	Klonierung der PCR-Amplifikate	27
4.5.5.2.1	Klonierung von Amplifikaten in <i>Sma</i> I - Vektor	27
4.5.5.2.2	Klonierung der PCR-Fragmente in den Vektor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	28
4.5.6	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	28
4.5.7	Automatische DNA-Sequenzierung	29
4.6	Auftrennung, Aufreinigung und Gewinnung von DNA	29
4.6.1	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	29
4.6.2	Elution von DNA aus Agarosegelen	30
4.6.2.1	Elution mit QIAEX II	30
4.6.2.2	Elution durch Zentrifugation	30
4.7	Transfer und Detektion von DNA auf Membranen	30
4.7.1	Alkalische Transfer von DNA auf Trägermembranen	30
4.7.2	Nichtradioaktive Hybridisierung mit dem ECL Direkt Labelling System	31
4.8	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	32
4.9	Isolierung und Analyse von RNA	32
4.9.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	32
4.9.2	Isolierung von mRNA	32
4.9.3	5'- und 3'- RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) mit dem Marathon cDNA Amplification Kit und dem Advantage [®] 2 PCR Enzyme System	33
4.10	Mutationsanalyse	34
4.11	Protein Analyse	35
4.11.1	Spaltung der cDNA Fragmente zum Einklonieren in den pRSET A Vektor	35
4.11.2	Herstellung der Mutation des cDNA-Fragments an Position 392	35
4.11.3	Expression der cDNA-Fragmente in <i>E. coli</i>	36
4.11.4	Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel	36
4.11.5	Isolierung und Aufreinigung des 54 kDa Fragments	37
5	Ergebnisse	39
5.1	Klinische Beurteilung, Labor- und Leberbiopsiefunde	39
5.1.1	Klinische Befunde	39
5.1.2	Laborchemische Befunde	39
5.1.3	Hepatologische Befunde	41
5.2	Isolierung und molekulare Charakterisierung des Uro-D Gens	41
5.2.1	Durchmusterung der ovinen λ -Phagen Bank	41
5.2.2	Übersicht über die Subklonierung der Phagen	42
5.2.2.1	Subklonierung des Phagen λ UD1	43
5.2.2.2	Analyse des Phagen λ UD2	44

5.2.2.3	Kartierung des Phagen λ UD3	44
5.2.3	Zusammenfassung der genomischen Struktur des Uro-D Gens	45
5.3	Mutationsanalyse des Uro-D Gens	47
5.4	Herstellung der ovinen Uro-D cDNA	51
5.4.1	Synthese der cDNA aus Leber vom gesunden Schaf	51
5.4.2	Herstellung der cDNA mit gezielter Mutagenese durch 'site directed mutagenesis'	52
5.5	Expression der cDNA-Fragmente	53
5.5.1	Auswahl des Expressionsvektors	53
5.5.2	Konstruktion des Plasmids pRSET A zu Expression der cDNA-Fragmente	54
5.5.3	Wahl des Expressionssystems	55
5.5.4	Nachweis der Expression von Uro-D Proteinen in <i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS	56
5.6	Chromosomale Lokalisation des ovinen Uro-D Gens	58
6	Diskussion	59
6.1	Symptomatische Aspekte der PCT	59
6.2	Untersuchung des ovinen Uro-D Gens	61
6.2.1	Genomische Struktur des Uro-D Gens	61
6.2.2	Polymorphismen im ovinen Uro-D Gen	63
6.2.3	Bakterielle Expression der cDNA vom ovinen Uro-D Gen	64
6.2.4	Chromosomale Lokalisation des ovinen Uro-D Gens	67
7	Zusammenfassung	68
7	Summary	70
8	Literaturverzeichnis	72
9	Anhang	82

II. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ALAT	Alanin-Aminotransferase	mM	Millimolar
AP	alkalische Phosphatase	mRNA	Messenger-RNA
APS	Ammoniumperoxidsulfat	NaOAc	Natriumacetat
ASAT	Asparat-Aminotransferase	ng	Nanogramm
BLAST	Basic local alignment search tool	OD	Optische Dichte
bP	Basenpaare	PAS	Periodic-Acid Schiff
BSA	Bovines Serumalbumin	PCR	Polymerase Kettenreaktion
cDNA	Complementäre DNA	PCT	Porphyria Cutanea tarda
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol	PFU	Plaque-forming Units
CP	Coproporphyrin	PP	Protoporphyrin
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PrP	Prionprotein
DMSO	Dimethylsulfat	RACE	rapid amplification of cDNA ends
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SH	Shorthornrasse
ExPASy	Expert Protein Analysis System	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
F-PCT	familiäre Porphyria cutanea tarda	U	Units
g	Gramm	Upm	Umdrehungen pro Minute
GLDH	Glutamatdehydrogenase	Uro-D	Uroporphyrinogen-Decarboxylase
h	Stunde	UTR	Untranslatierte Region
HEP	Hepatoerythropoetische Porphyrie	UV	Ultraviolett
HF	Holstein-Friesien	V	Volt
IgA	Immunglobulin-A	V/v	Volumen per Volumen
IgG	Immunglobulin-G	Vol	Volumen
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid	W/v	weight per volume
kb	Kilo-Basen	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galactosid
kDa	Kilo-Dalton	δ -GT	Gamma Glutamyl transpeptidase
KOAc	Kaliumacetat		
KP	Kongenitale Porphyrie		
KT	Kreuzungstiere		
LDH	Laktatdehydrogenase		
M	Molar		
MCHC	Mean Corpuscular haemoglobin Concentration		
μ g	Mikrogramm		
μ l	Mikroliter		
ml	Milliliter		
min	Minuten		
MOPS	3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure		

III. Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Hämbiosynthese und Porphyrinen	5
Abbildung 2:	Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von Uro-D	11
Abbildung 3:	Topologie der Sekundärstruktur von Uro-D	12
Abbildung 4:	Darstellung der Sekundärstruktur vom Uro-D Protein	13
Abbildung 5:	Der Urin vom erkrankten Tier unter UV-Licht mit der Rot-Fluoreszenz-Erscheinung	40
Abbildung 6:	Darstellung der Porphyrinauftrennung im Urin des an PCT erkrankten Tieres (A) und eines gesunden Schafes (B)	40
Abbildung 7:	Histologische Befunde an der Leber	41
Abbildung 8:	Isolation der Phagen-DNA mittels PCR auf den Plattenpools der genomischen Schaf-Genbank	42
Abbildung 9:	Gelelektrophorese der Restriktionsspaltung von λ UD1	43
Abbildung 10:	Agarosegelauftrag der <i>Bam</i> HI Spaltprodukte von verschiedenen Phagen und die Auswahl des Phagen λ UD3	45
Abbildung 11:	Darstellung der genomischen Struktur und der Sequenzierungsstrategie des ovinen Uro-D Gens	46
Abbildung 12:	Homologievergleich der Aminosäuren von Schaf, Mensch und Ratte	47
Abbildung 13:	Genomische Struktur des Uro-D Gens, sowie Lage und Orientierung der Sequenzprimer	48
Abbildung 14:	Gelauftrag der Primerkombinationen A, B, C, D, E und F	48
Abbildung 15:	Darstellung der Nukleotidaustausche im Uro-D Gen	50
Abbildung 16:	Darstellung der Ergebnisse der computergestützten Strukturanalyse des Uro-D Gens	51
Abbildung 17:	RACE-PCR auf isolierter RNA von Uro-D	52
Abbildung 18:	Schematische Darstellung der Primerpositionen zur Herstellung der mutagenischen cDNA	53
Abbildung 19:	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von cDNA-Fragmenten in den Expressionsvektor pRSET	54
Abbildung 20:	Gelelektrophorese der Restriktionsspaltung der klonierten cDNA-Fragmente mit den Restriktionsenzymen <i>Kpn</i> I und <i>Eco</i> RI nach der Minipräparation	56
Abbildung 21:	Darstellung der 54 kDa exprimierten Fragmente auf 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel	57
Abbildung 22:	54 kDa gereinigtes Fragment der normal exprimierten (A) und der mutierten cDNA (B) auf dem SDS-Polyacrylamidgel	58
Abbildung 23:	Chromosomale Lokalisation des ovinen Uro-D Gens durch FISH-Analyse	58
Abbildung 24:	Sequenz des 3645 bp langen genomischen ovinen Uro-D Gens	83
Abbildung 25:	cDNA-Sequenz mit 5'- und 3'- überhängenden Enden des ovinen Uro-D Gens und die korrespondierende Aminosäuresequenz	85

IV. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Auftreten der Porphyrie bei landwirtschaftlichen Nutztieren	3
Tabelle 2:	Klassifikation von Porphyrien und die ihnen zugrunde liegenden Enzymstörungen	6
Tabelle 3:	Mutationen im humanen Uro-D und deren strukturelle Auswirkungen	15
Tabelle 4:	Zusammensetzung des Elutionspuffers	38
Tabelle 5:	Blutparameterbefunde des kranken Schafes und Vergleich der Werte mit den Parametern von gesunden Tieren	39
Tabelle 6:	Vergleich der Urinporphyrinmenge zwischen einem gesunden und dem erkrankten Tier	40
Tabelle 7:	Exon/Intron-Grenzen des Uro-D Gens	46
Tabelle 8:	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	82

1 Einleitung

Die molekulargenetischen Untersuchungen wie Genomanalyse, Genkartierung und Mutationsanalyse, welche die Identifikation von Genen und Polymorphismen ermöglichen, haben sich in den letzten 10 bis 15 Jahren aufgrund neuerer und schnellerer Verfahren etabliert. Hierbei hat die Aufklärung z.B. des menschlichen Genoms und die Sequenzierung einer Vielzahl einfacherer Genome von Modellorganismen wie *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* bedeutende Fortschritte gemacht. Hingegen ist leider die Kenntnis der Genome landwirtschaftlicher Nutztiere vergleichsweise bescheiden. In den letzten Jahrhunderten bezogen sich die Selektionskriterien in der Tierzucht vornehmlich auf die quantitative Genetik. Heute profitiert die moderne Tierzucht von der Molekularbiologie und der Anwendung molekulargenetischer Verfahren, wie beispielsweise die Testverfahren auf Streßanfälligkeit beim Schwein (FUJII et al., 1991; BRENIG und BREM, 1992) und die PrP-Varianten beim Schaf (KUTZER et al., 2002) zeigen.

Obwohl man in diesem Bereich in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen hat, gibt es hier noch erheblichen Forschungsbedarf. Die Entdeckung genetischer Dispositionen für wesentliche Leistungsmerkmale und die Entwicklung genetischer Nachweisverfahren für die meisten wirtschaftlich bedeutenden Erbkrankheiten verstärken diese Notwendigkeit. Zum Erreichen dieser Ziele ist allerdings zuerst die genaue Kenntnis der Genome Voraussetzung. Die hier präsentierte Arbeit soll daher einen Beitrag zur molekulargenetische Analyse der Erbkrankheit Porphyrie in Form Porphyria cutanea tarda (PCT) beim Schaf liefern.

Porphyrie wird durch verschiedene Enzymdefekte in der Hämbiosynthese verursacht, wobei die PCT durch einen Defekt des fünften Enzyms Uroporphyrinogen-Decarboxylase (Uro-D) hervorgerufen wird. Die PCT als häufigste Porphyrie beim Mensch (KÖSTLER und DOSS, 1995; BULAJ et al., 2000; PHILLIPS et al., 2001b; EGGER et al., 2002) wird mit einer großen Inzidenzvariation von 0,003% bis 1% beim Mensch angegeben (FRITSCH et al., 1998; KRAJNC et al., 1998; HOEGL et al., 1996; GOERZ, 1979a; IPPEN, 1973; KÖSTLER et al., 1988; DOSS, 1990).

Wegen der geringen Bedeutung, die diese Erkrankung im Bewusstsein von Landwirten und Schlachthoftierärzten hat, wird ihr gar keine oder nur minimale Aufmerksamkeit geschenkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Überprüfung der klinischen, histologischen und laborchemischen Parameter eines an PCT erkrankten Schafes, zum anderen das Uro-D-Gen zu charakterisieren und darüber hinaus die krankheitsverursachenden Polymorphismen zu bestimmen. Weiterhin wurde das Uro-D Protein sowohl vom gesunden als auch vom kranken Tier exprimiert und anschließend die chromosomale Lokalisation des Gens bestimmt.

2 Literaturübersicht

2.1 Historische Entwicklungskennnisse der Porphyrie

Zum ersten Mal hat der Biochemiker THUDICHUM (1867) die rote Fluoreszenz des eisenfreien Hämatins beschrieben und dieses Cruentine genannt. Einige Jahre später wurde es im Rahmen weiterer Untersuchungen von HOPPE-SEYLER (1871) als „Hämatoporphyrin“ bezeichnet. Im Jahr 1874 wurden von BAUMSTARK die ausgeschiedenen Pigmente im Urin eines Patienten untersucht und als Urofuscohämin isoliert. Er interpretierte seine Befunde als „unklare Störung der Hämbiosynthese“ (BAUMSTARK, 1874).

Nach der Einführung von Sulfonal als Hypnotikum wurde bei den Patienten eine neue Erkrankung, die toxische Form der akuten Porphyrie, entdeckt und im Urin ein hämatoporphyrinähnlicher Farbstoff nachgewiesen. Dadurch konnte FRIEDENREICH (1892) drei klinische Symptome feststellen: dunkelbrauner Urin, abdominaler Schmerz und Paresen.

Die Porphyrinforschung hat sich um die Jahrhundertwende stärker weiterentwickelt, da es den Biochemikern gelungen war, das Hämatoporphyrin näher zu charakterisieren und Protoporphyrin sowie Koproporphyrin zu isolieren. Bei dem Patienten Mathias Petry, der im Jahre 1925 mit 32 Jahren an dieser Krankheit starb, hat GÜNTHER (1911) eine der bedeutendsten Porphyrinuntersuchungen durchgeführt und seinen Befund mit der Bezeichnung Hämatoporphyrin als Überbegriff einer ganzen Gruppe von Porphyrien beschrieben. Durch weitere Urinuntersuchungen von Petry hat der Nobelpreisträger FISCHER (1925) mit Einbezug der morphologischen Diagnosen von BORST eine weitere Differenzierung der Porphyrie dargestellt. 1929 haben BORST und KÖNIGSDÖRFER einen umfassenden Bericht über die Porphyrie herausgegeben und dabei die Krankheit Porphyrie genannt, dadurch wurde der Begriff „Hämatoporphyrin“ abgelöst und der Ausdruck Porphyrie setzte sich durch. (BORST und KÖNIGSDÖRFER, 1929).

Bei landwirtschaftlichen Nutztieren wurden die ersten pathologischen Befunde anhand zweier Fälle von BROUVIER (1883), sowie REMY und BROUVIER (1888) beschrieben. Sie hatten nach der Schlachtung der Tiere eine komplette schokoladenbraune Pigmentierung der Knochen beobachtet. MOSELMAN und HEBRANT (1898) untersuchten die Knochen einer Färse, die geschlachtet worden war, weil das Tier nicht fressen wollte, und fanden sämtliche Knochen rotbraun verfärbt. SCHENK (1901) und COLBERG (1902) berichteten außer der Pigmentierung der Knochen zusätzlich über die Verfärbung der Zähne bei einer Kuh und einem drei Tage alten Kalb. Bis 1913 wurde insgesamt 15 Fälle betroffener Rinder und Schweine in der Literatur beschrieben, wobei die Mehrzahl der Autoren ein Blutfarbstoffderivat im Pigment feststellen konnten (SCHMEY, 1913). MOSELMAN und HEBRANT (1898) interpretierten ihre Befunde nach chemischen und spektroskopischen Untersuchungen als Melanin. BALL (1900) sprach von einem Hämoglobinderivat und POULSEN (1910)