

Agata Bogusz

**Molekulare und evolutionsgenetische
Untersuchungen am Gen des Uteroglobins**

D 82 (Diss. RWTH Aachen)

Shaker Verlag
Aachen 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.

Zugl.: Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2003

Copyright Shaker Verlag 2003

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-1920-X

ISSN 1436-8803

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	MATERIAL, GERÄTE UND CHEMIKALIEN	7
2.1.1	Gewebeprobe.....	7
2.1.2	Geräte	7
2.1.3	Verwendete Chemikalien	8
2.1.4	Kulturmedien für die E. coli-Stämme	8
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	8
2.2.1	Isolierung von Nucleinsäuren	8
2.2.2	DNA-Fällung.....	10
2.2.3	Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren	10
2.2.4	DNA-Verdau mit Restriktionsendonucleasen.....	11
2.2.5	Auftrennung der Nucleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese	12
2.2.6	Übertragung von Nucleinsäuren auf Nylonmembranen	13
2.2.7	c-DNA-Synthese	14
2.2.8	Erstellung eines Alignments und Ableiten der Oligoprimer für die PCR-Reaktionen.....	15
2.2.9	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.2.10	Aufreinigung des PCR-Produktes	23
2.2.11	Sequenzierung des reinen PCR-Produktes und Vergleich der neuen Sequenz mit den bekannten Uteroglobinsequenzen aus der Genbank	24
2.2.12	Erstellung eines Stammbaumes für Uteroglobin.....	25
2.2.13	Elution des PCR-Produktes aus dem Gel.....	25
2.2.14	Nicht radioaktive Markierung der PCR-Produkte mit Digoxigenin	25
2.2.15	Dot-Blot-Konzentrationsanalyse und Größentest der markierten Sonden.....	26
2.2.16	Sonden für die Northern- und Southern-Hybridisierungen.....	27
2.2.17	Hybridisierung von filtergebundenen Nucleinsäuren	28
2.2.18	Immunologische Detektion der Blotfolien mit chemilumineszentes Substrat.....	30
2.2.19	Strippen	30
2.2.20	Klonierung der Sonde.....	30

3	ERGEBNISSE	37
3.1	ERSTELLUNG EINES cDNA-ALIGNMENTS FÜR UTEROGLOBIN	37
3.2	ABLEITEN DER OLIGONUKLEOTIDPRIMER FÜR DIE PCR-REAKTIONEN	39
3.3	PCR-PRIMERTEST MIT DER BEKANNTEN SEQUENZ FÜR DAS UTEROGLOBIN DER MAUS.....	43
3.4	KONSTRUKTION EINER SONDE FÜR DAS MAUS-UTEROGLOBIN UND SOUTHERN HYBRIDISIERUNG MIT DER NEUEN SONDE.....	46
3.5	ISOLIERUNG DES UTEROGLOBIN-GENS DES PFERDES.....	49
3.5.1	PCR mit der RNA (RT-PCR) des Pferdes.....	49
3.5.2	Uteroglobin-cDNA-Sequenz des Pferdes.....	57
3.5.3	Konstruktion der für Pferde-Uteroglobin spezifischen Sonden	57
3.5.4	Northern-Hybridisierungen mit der RNA des Pferdes	58
3.6	NACHWEIS DER mRNA-EXPRESSION DES UTEROGLOBINS IN VERSCHIEDENEN ORGANEN DES PFERDES	59
3.6.1	Northern-Hybridisierungen	59
3.6.2	PCR-Reaktionen.....	62
3.7	ABLEITEN SPEZIFISCHER PRIMER FÜR DAS UTEROGLOBIN DES PFERDES	64
3.8	PCR MIT DER GENOMISCHEN DNA DES PFERDES	64
3.9	cDNA ALIGNMENT FÜR UTEROGLOBIN MIT DER NEUEN SEQUENZ FÜR DAS EQUINE UTEROGLOBIN.....	66
3.10	AMINOSÄURESEQUENZ DES PFERDE-UTEROGLOBINS.....	69
3.11	AMINOSÄUREALIGNMENT FÜR UTEROGLOBIN.....	70
3.12	STAMMBAUM FÜR UTEROGLOBIN – PHYLOGENETISCHER VERGLEICH DES UTEROGLOBINS DES PFERDES MIT DEM DER ANDEREN SPEZIES.....	71
3.13	ZOO BLOT-HYBRIDISIERUNG ZUR UNTERSUCHUNG DES VERWANDTSCHAFTSGRADES ZWISCHEN DEM UTEROGLOBIN DES PFERDES UND DEM DER ANDEREN SPEZIES.....	72
3.13.1	Konstruktion der Sonden für den Northern-Zooblot.....	73
3.13.2	Northern-Hybridisierungen mit den konstruierten Uteroglobin Sonden.....	75
3.14	ISOLIERUNG DES UTEROGLOBIN-GENS VOM HUHNER	79
3.14.1	Northern-Hybridisierungen	79
3.14.2	PCR-Reaktionen.....	81
3.14.3	Southern-Blot-Hybridisierung mit der Pferde-UG-Sonde	85

4	DISKUSSION.....	87
4.1	ENTWICKLUNG EINER STRATEGIE ZUR ISOLIERUNG NEUER UTEROGLOBIN-GENE VON PFERD UND HUHN.....	87
4.2	ETABLIERUNG DER METHODEN FÜR DIE HOMOLOGIEABHÄNGIGE KLONIERUNG NEUER UTEROGLOBIN-GENE	89
4.3	ISOLIERUNG DES UTEROGLOBIN-GENS VOM PFERD.....	89
4.4	NACHWEIS DER GEWEBESPEZIFISCHEN EXPRESSION DES EQUINEN UTEROGLOBINS	96
4.5	STAMMESGESCHICHTLICHE VERWANDTSCHAFT DES EQUINEN UTEROGLOBINS ZU DEM UTEROGLOBIN ANDERER SÄUGETIERE	101
4.6	VERSUCH DER ISOLIERUNG DES UTEROGLOBIN-GENS BEIM HUHN	102
4.7	BEDEUTUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT FÜR DIE UTEROGLOBINFORSCHUNG UND WEITERE FORSCHUNGSPERSPEKTIVE.....	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	107
6	LITERATUR.....	109
7	DANKSAGUNG.....	125