

Herstellung einer Deletion und interne Sequenzierung des Klons DA 10.2

Jakob Lindenmeyer
*Betreuung durch Dr. I. Hausmann und
Zusammenarbeit mit S. Bantle und D. Auerbach*

Institut für Zellbiologie, ETH Zürich

1. Zusammenfassung:

Um an die in der Mitte liegenden Sequenzen der Rattenherz-Myomesin-cDNA zu gelangen, wurde durch Kpn-Verdau und Religation eine Deletion des Klons DA 10.2 hergestellt. Diese Deletionen charakterisierte man dann durch zwei Sequenzierungen. Weiters lieferte eine nochmalige Sequenzierung des Klons DA 10.2 von den Vektorenden her einige zusätzliche Nukleotidsequenzen und für bestimmte Sequenzabschnitte existieren nun bis zu 6 Sequenzierungsergebnisse, sodass es nun möglich ist die korrekte Konsensussequenz und davon abgeleitet die Proteinsequenz von Ratten-Myomesin zu erhalten.

Aus dem Vergleich von Myomesinsequenzen aus Säugern mit der bereits bekannten Sequenz des Hühnchens (S.Bantle; 1995) werden Aufschlüsse über die strukturelle Konservierung dieses Proteins erwartet. cDNA Klone von Ratten-Myomesin wurden durch Hybridisierung aus einer Rattenherz cDNA Bank isoliert (E. Perriard und D. Auerbach). Einer dieser Klone (DA 4.6) wurde weiter charakterisiert und durch partielle Sequenzierung und Grössenbestimmung wurde nachgewiesen, dass der Klon DA 4.6 das gesuchte 5'-Ende der Ratten-Myomesin cDNA enthält.

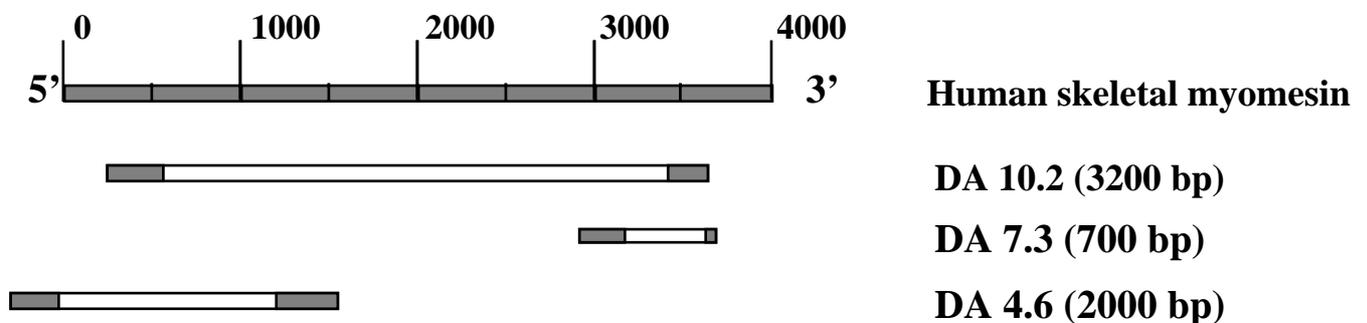
2. Einleitung:

Nach der Entdeckung des Titins, ist nun die Funktion eines weiteren Sarkomerproteins, des Myomesins, sehr interessant geworden. Myomesin ist ein myofibrilläres 190 Kd Protein, welches in der M-Bande von Sarkomeren lokalisiert ist. Die cDNA aus Mensch und Huhn sind bereits vollständig sequenziert (Vinkemeier et al. 1993; Bantle et al. 1995) und bilden die Grundlage dieses Projektteils. Die funktionelle Analyse in vivo lässt sich in Mauszellen am besten durchführen. Dazu brauchen wir embryonale Maus Stammzelllinien (ES-Zelllinien). Diese bilden unter besonderen Kulturbedingungen Embryonalkörper, die unter anderem auch Herzzellen bilden. Solche Herzzellen können aus Embryonalkörpern (EB) isoliert, auf Dichtegradienten gereinigt und in Zellkulturen auf ihren Differenzierungszustand geprüft werden. Diese Herzzellen enthalten Myofibrillen, kontrahieren auch in der Zellkultur spontan und sind deshalb zur Funktionsanalyse von myofibrillären Proteinen besonders gut geeignet. Die vorgesehenen Experimente werden auch die Herstellung von transgenen ES-Zellen mit veränderten Myomesinengen und schliesslich die Inaktivierung des endogenen Myomesingens umfassen; diese Experimente setzen die teilweise Charakterisierung des 5' Endes des Myomesingens der Maus voraus.

Die ersten Versuche mit einer Hühnchen cDNA Sonde die Mausgene auf einem genomischen Blot zu identifizieren, haben nur zweideutige Resultate geliefert. Die Verwendung einer möglichst homologen cDNA Sonde aus Säugermaterial ist der nächste Schritt, der zur Isolierung des Mausgens notwendig ist.

Es liegen einige Klone aus einer Ratten-Herz cDNA Bank vor, welche mit Hilfe eines Fragments der Hühner cDNA isoliert wurden (E. Perriard und D. Auerbach). Vergleiche von anderen Sequenzen kontraktile Proteine haben ergeben, dass Ratten und Maussequenzen sowohl auf Protein- als auch auf DNA-Ebene stark konserviert sind. Deshalb kann angenommen werden, dass auch die Nukleotidsequenzen dieser Rattenherz-Klone mit der Maus cDNA Sequenz weitgehend konserviert sind. Vorarbeiten von D. Auerbach haben ergeben, dass die Rattenherzklone Myomesinsequenzen enthalten. D. Auerbach hat nun mittels PCR aus den Lambda-Klonen verschiedene Fragmente erhalten, die er in einen pDIR-Vektor subkloniert hat. Zusätzliche Klone wurden isoliert, die in diesem Projekt näher untersucht wurden.

Nach den Sequenzierungen der Rattenherz-Myomesin-cDNA-Klonen von den Vektorenden her bestand zwischen den Positionen 1500 und 3000 noch eine circa 1500 Basenpaare Region von unbekannter Sequenz (siehe Figur 1). Da bekannt war, dass DA 10.2 zwei Kpn I-Schnittstellen besitzt, konnten durch einen entsprechenden Restriktionsverdau und anschließende Religation verschiedene Deletionen des Klons DA 10.2 hergestellt werden. Auch ist es nach mehreren Sequenzierungen nun möglich, von bestimmten Bereichen die korrekte Konsensussequenz und davon abgeleitet die Proteinsequenz von Ratten-Myomesin zu erhalten.



Figur 1: Positionierung der Klone in der Gesamtsequenz

Aus dem Vergleich der sequenzierten Fragmente mit der bereits publizierten Gesamtsequenz von humanem Myomesin cDNA (Vinkemeier et al. . 1993) ergibt sich die Lage der einzelnen Fragmente. Aus dieser Positionsinformation und dem Wissen über die Gesamtlänge des Inserts ist es möglich, die von den einzelnen Klonen abgedeckten Bereiche, sowie die Position und Länge der noch unsequenzierten Regionen der Ratten-Myomesin-cDNA abzuschätzen. Es bestand zwischen den Positionen 1500 und 3000 noch eine circa 1500 Basenpaare umfassende Region von unbekannter Sequenz .

3. Methoden:

A. Molekularbiologie-Methoden:

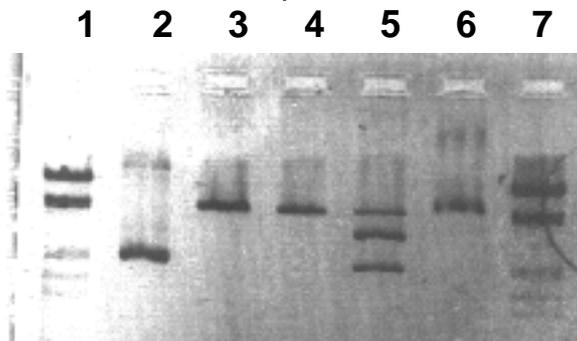
- CTAB-Plasmid-Mini-Präparation
- Exo III/Mung Bean Deletions
- Maxipräparation (Nucleobond columns AX 500)
- Plasmid Sequenzierung nach Sanger
- Restriktionsenzymverdauung von DNA
- Sequenzanalyse mit den Programmen aus DNA-Star: Align, Editseq und Seqman
- Transformation

Quelle aller Methoden sind die Methodensammlungen der Zellbiologie.

4. Resultate:

A. Größenbestimmung der subklonierten PCR-Produkte

Die subklonierten PCR-Produkte wurden in E.coli transformiert und die davon abgeleitete CTAB-Plasmid-Mini-Präparation mit Restriktionsverdauungen analysiert:



Figur 2: Elektrophoretische Auftrennung von Restriktionsfragmenten.

1% Agarose, TBE Puffer.

Bahn 1 : I-Marker(EcoRI)

Bahn 2 : pDIR.

Bahn 3 : DA 4.6-Kreuzverdau Xba I x SacI

Bahn 4 : DA 4.6-Kreuzverdau Xba I x Sac

Bahn 5 : DA 4.6 x EcoRI

Bahn 6 : DA 4.6

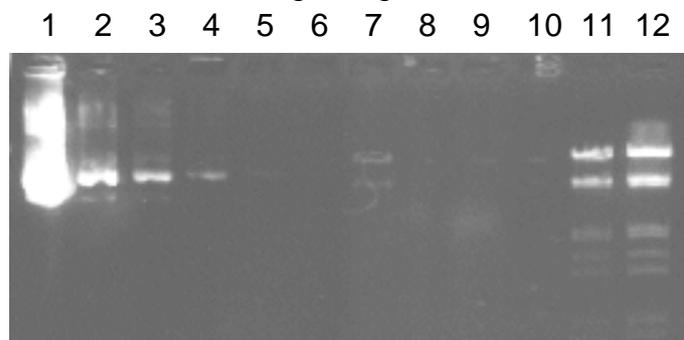
Bahn 7 : I-Marker(EcoRI)

Daraus resultierten 3 Klone mit verschiedenen Insertgrößen:

DA 10.2	3.2kb
DA 4.6	2.0kb
DA 7.3	0.7kb

B. Minipräparation, Maxipräparation und Konzentrationsbestimmung des Klons DA 4.6

Eine ausreichende Menge DNA war nötig, um die nachfolgenden Experimente durchzuführen (z.B. um den Klon sequenzieren zu können). Die 3 anschliessend ausgeführten DNA-Konzentrationsbestimmungen ergaben verschiedene Resultate, die aber alle im Bereich von 2 bis 6 ug/ul lagen.



Figur 3: DNA-Konzentrationsbestimmung mit der Agarosegelelektrophorese

1% Agarose, TBE Puffer.

Bahnen 1 - 6 : Abnehmende Konzentrationen von DA 4.6

Bahnen 7 - 12 : Steigende Konzentrationen von I-Marker(EcoRI)

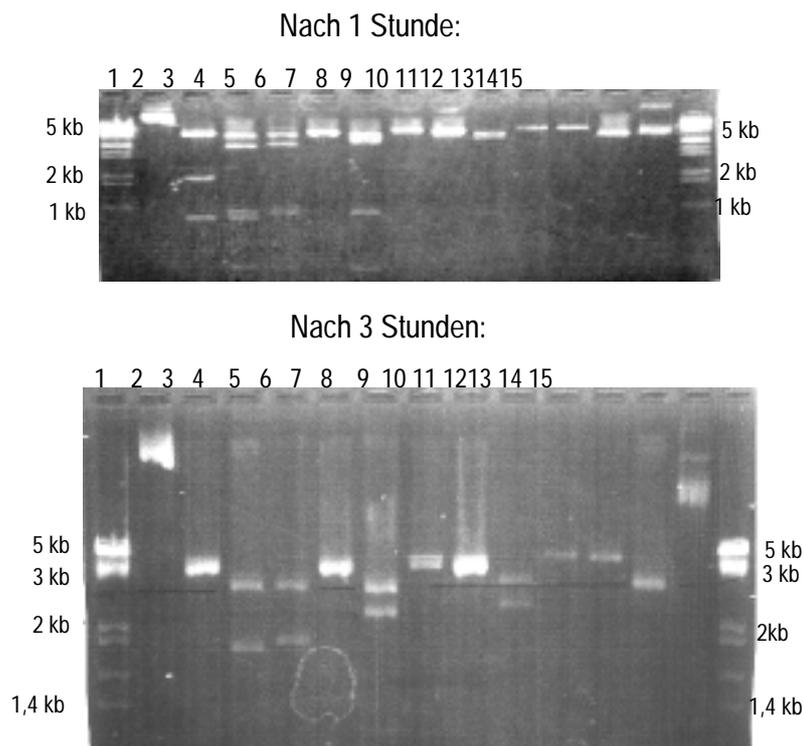
Method	DNA-Konzentration
Fotospektrometrie	6 ug/ul
Agarose-Gelelektrophorese	2.5-5 ug/ul
Dot-Methode	2 ug/ul

C. Sequenzierung (1.Versuch) : ExoIII/Mung Bean Zeitreihe-Verdau

Mit dem Zeitreihe-Verdau wurde versucht an die weiter 3' liegende DNA heranzukommen, um diese zu sequenzieren. Leider lieferte die Methode trotz dreimaliger wiederholter Transformation unter jeweils anderen Bedingungen (mehr Ligase) nur eine sehr geringe Transformationsausbeute (10-20 Kolonien). Die davon weiterbehandelten Minipräparationen lieferten keine eindeutigen Resultate.

D. Herstellung der Deletionen und Identifikation durch verschiedene Restriktionsverdaue:

Durch Kpn I-Verdau des Klons DA 10.2 erhielt ich den Vektor pDir (siehe Figur x) und mehrere Isertfragmente (siehe Figuren 2 und 3). Eine Religation dieses Verdaus lieferte verschiedene Deletionen des Klons DA 10.2 (siehe Figuren 2 und 3). Diese Deletionen wurden in E.coli transformiert. Aus den Transformanten konnte mittels Mini-Präparationen genügend DNA gewonnen werden, um einerseits die Deletionen mittels verschiedener Restriktionsverdaue auf Agarose-Gelelektrophorese zu charakterisieren und andererseits die DNA zu sequenzieren (Abschnitt E).



Figur 4: Elektrophoretische Auftrennung der Deletionen mit Eco RI verdaut.

1% Agarose, TBE Puffer.

Bahn 1 : I-Marker(EcoRI)

Bahn 13 : pDir X EcoRI

Bahn 2 : DA 10.2 ungeschnitten

Bahn 14 : pDir

Bahn 3 : DA 10.2 X Kpn I

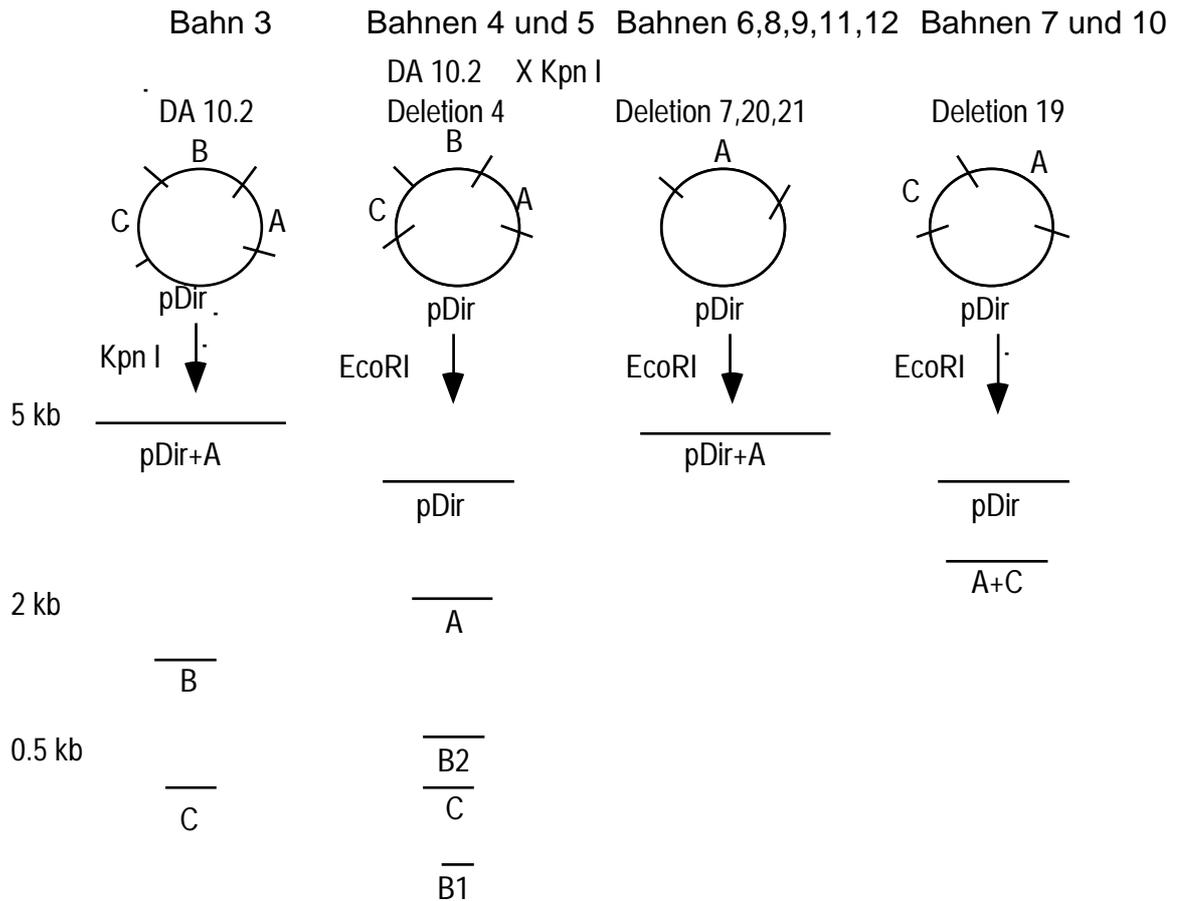
Bahn 15 : I-Marker(EcoRI)

Bahn 4 : DA 10.2 X Kpn I X EcoRI

Bahn 5 : Deletion 4 X EcoRI

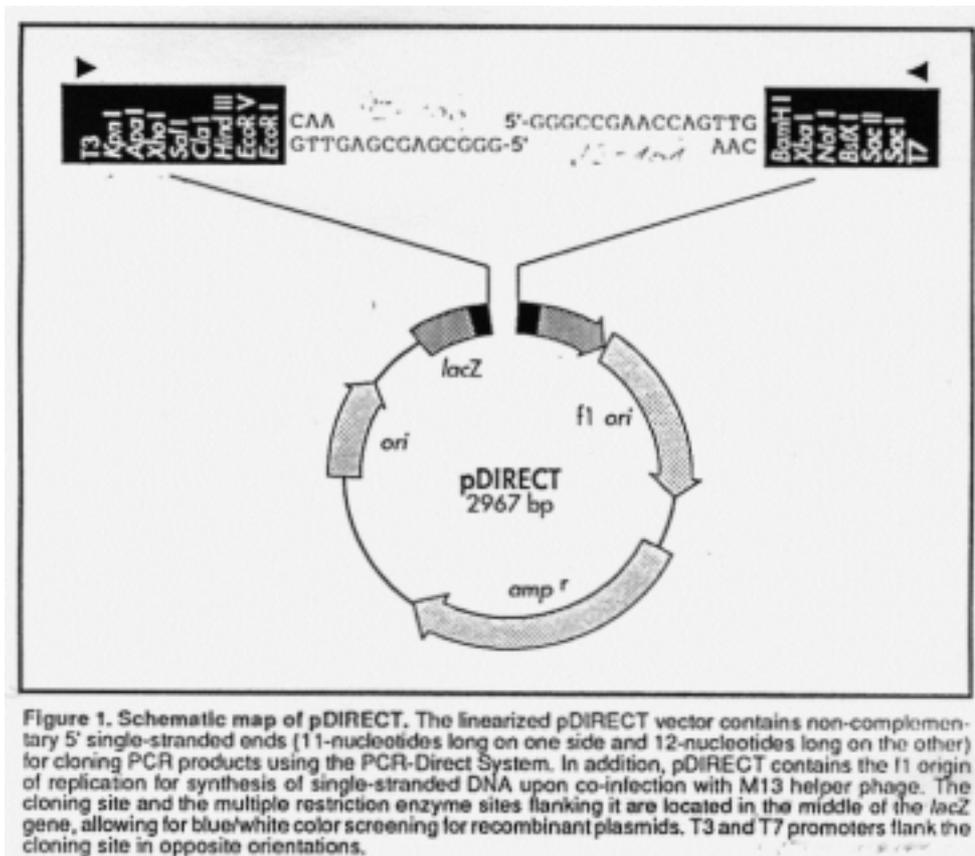
Bahn 6 : Deletion 7 X EcoRI

- Bahn 7 : Deletion 19 X EcoRI
- Bahn 8 : Deletion 20 X EcoRI
- Bahn 9 : Deletion 21 X EcoRI
- Bahn 10: Deletion 19 X EcoRI
- Bahn 11: Deletion 20 X EcoRI
- Bahn 12: Deletion 21 X EcoRI



Figur 5: Schema der Restriktionsverdauung der Deletionen

Schema zu Figur 2: Reihenfolge und Grösse der Banden des Gels in Figur 2 entsprechen den einzelnen Insertfragmenten A, B, B1, B2, C und dem leeren Vektor pDir (siehe Figur 4). Die Querbalken entsprechen den Kpn I-Schnittstellen des Klons DA 10.2. Man beachte, dass innerhalb des Fragments B eine interne Eco RI Schnittstelle liegt. Die Abstände und Gröszen sind nicht proportional.



Figur 6: Der Klonierungsvektor pDir

E. Sequenzierung der Deletionen:

Mit Hilfe von schon vorhandenen Primern aus dem Huhn-Myomesin-Sequenzierungsprojekt von S. Bantle, die mit DNA-Star auf ihre Homologie zu der bis jetzt vorhandenen Rattensequenz überprüft worden waren, wurden Fragmente aus DA 4.6 und DA 10.2 sequenziert.

DA 4.6 lieferte eine Sequenz von 289 Nukleotiden gegen das 5'-Ende der Myomesin cDNA und eine Überlappung von 64 Nukleotiden mit der Endsequenzierung von D. Auerbach (DA 4.6 x T7), welche um 100% übereinstimmte (siehe Figur 5) .

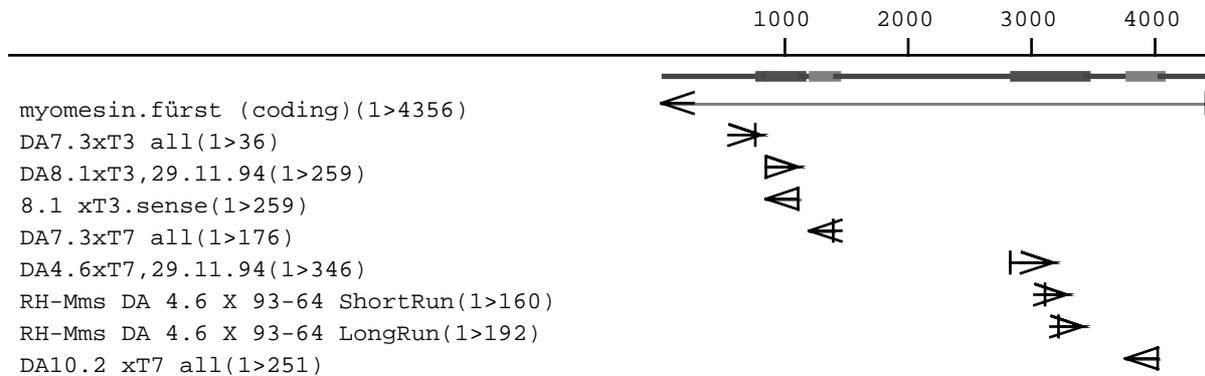
Das Funktionieren der Sequenzierung mit Huhn-Primern auf Ratten cDNA zeigte, dass zwischen Ratte und Huhn eine hohe Homologie in der Myomesinsequenz bestehen musste.

Donnerstag, 19. Januar 1995

10:24 Uhr

Page 0

Project: Contig 1



Figur 7: Positionierung des sequenzierten Fragments (RH-Mms DA 4.6 x 93-64) in der Gesamtsequenz von humaner Myomesin cDNA (fürst) (Vinkemeier et al. 1993) mit Seqman. Aus dem Vergleich der sequenzierten Fragmente mit der bereits publizierten Gesamtsequenz vom humanem Myomesin (Vinkemeier et al. 1993) ergibt sich die Position der einzelnen Fragmente. Man beachte, dass hier die Numerierung vom 3'-Ende her beginnt (im Gegensatz zu Figur 2); das gesuchte 5'-Ende befindet sich hier also rechts.

F. Sequenzanalyse:

Durch Sequenzverarbeitung mit den Computerprogrammen Seqman, Align und Editseq wurde das sequenzierte Fragment mit schon bekannten Sequenzen verglichen, z.B. der Myomesin cDNA-Sequenz des Menschen (*Homo sapiens*).

Ein Sequenzvergleich ergab für das sequenzierte Fragment eine Homologie von 87,2% zwischen den Sequenzen von Mensch und Ratte.

Wilbur-Lipman DNA Alignment

Ktuple: 3; Gap Penalty: 3; Window: 20

Seq1(1>4356)

Seq2(1>192)

	Similarity	Gap	Gap	Consensus
	Index	Index	Index	Number
	Length	Length	Length	Length
myomesin.fürst (coding) RH-Mms DA 4.6 X 93-64 LongRun	¶1180	¶1170	¶1160	¶1150
myomesin.fürst (coding)	CAGGAGATGATGATATAATCTTTGTTGGCCTCCAAGCACT			
H-Mms DA 4.6 X 93-64 LongRun`	CA GAGATGATGAT TAATCTTTGTT GC TCCA AC			
	°10	°20	°30	°40
myomesin.fürst (coding)	¶1140	¶1130	¶1120	¶1110
	TCACATCCAAGGGAGCAGCTGGGGCTCCTTCAATCTCTGC			
H-Mms DA 4.6 X 93-64 LongRun	CACATCCAAGGG GCAGC GGGGCTCCTTC ATC CTGC			
	°50	°60	°70	°80
myomesin.fürst (coding)	¶1100	¶1090	¶1080	¶1070
	ATCAGCATCTCGAACAAGACATAAGCACTATATTGTTCA			
H-Mms DA 4.6 X 93-64 LongRun`	ATCAGCATCTCGAACAAGAC TAAGCACT TA GTTCA			
	°90	°100	°110	°120
myomesin.fürst (coding)	¶1060	¶1050	¶1040	¶1030
	TAATATCTCCCATCCGTACACGGATTGTATAGAGGCCTT			
H-Mms DA 4.6 X 93-64 LongRun	TAATA TCTC CAT CG ACACGGATTGT TAGAG CTT			
	°130	°140	°150	

	¶1020	¶1010	¶1000
myomesin.fürst (coding)	CATCTTCTTTGTTGAGATGGGAAAATGT		
	CATCTTCTTTGTTGAG TG GA AATGT		
H-Mms DA 4.6 X 93-64 LongRun	CATCTTCTTTGTTGAGGTGAGAGAATGT		
	°160	°170	°180

Figur 8: Sequenzvergleich zwischen Mensch (fürst)(Vinkemeier et al. 1993) und Ratte (H-Mms DA4.6 x 93-64 LongRun): es besteht eine hohe Homologie.

5. Diskussion:

Aus dem Vergleich der sequenzierten Fragmente mit der bereits publizierten Gesamtsequenz von humanem Myomesin ergibt sich die Ausdehnung der einzelnen Fragmente (Figur 6). Aus dieser Positionsinformation und dem Wissen über die Gesamtlänge des Inserts (Figur 2) kann geschlossen werden, dass der Klon DA 4.6 das gesuchte 5'-Ende der Rattenherz-Myomesin cDNA enthält (siehe Figur 1). Da Ratten- und Menschensequenz eine hohe Homologie aufweisen (siehe Figur 8), darf davon ausgegangen werden, dass auch Ratte und Maus eine genügend hohe Homologie zeigen werden. Darum könnte DA 4.6 als Sonde eingesetzt werden, um das Exon 1 (5'-Ende) des genomischen Maus-Myomesingens zu fischen und sodann dieses in ES-Zellen zu inaktivieren, um so die Funktion des Myomesin-Proteins aufzuklären.

6. References:

- Bantle, S. (1995; not yet published) Charakterisierung von Myomesin cDNA aus Hühnchen-Herzmuskel .
- Vinkemeier, U. , Obermann, W. ,Weber, K. , Fürst, D.O.(1993). The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. J.Cell. Sci., 106:319-330.