

**Charakterisierung von zwei Na<sup>+</sup>/Phosphat Kotransportern  
des Typs NaPi-IIb aus dem Zebrafisch (*Brachydanio rerio*)  
und die Regulation durch Antisense-Transkripte**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**des Fachbereichs Chemie  
der Universität Dortmund**

**angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund**

**vorgelegt von Dipl. Chem. Perihan Nalbant  
aus Dortmund**

**Dortmund, im Juli 2000**

*meinem Vater, Celal Nalbant-  
dem herzlichsten Menschen, den ich je gekannt habe*

*meiner Mutter, Sultan Nalbant-  
für ihre Liebe*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis April 2000 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von PD Dr. Andreas Werner in der Abteilung Epithelphysiologie von Herrn Prof. Dr. Rolf K. H. Kinne durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. A. Werner

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kreiser

Tag der Einreichung: 06.07.2000

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2000

Mit freundlichem Dank an die Friedrich-Ebert-Stiftung für die Förderung dieser Arbeit seit Januar 2000.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den 06.07. 2000

Perihan Nalbant

## **Anmerkung**

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter:

**Nalbant P.**, Boehmer C., Dehmelt L., Wehner F., and Werner A. Functional characterization of a  $\text{Na}^+$ -phosphate cotransporter (NaPi-II) from zebrafish and identification of related transcripts. *J. Physiol.* **520**(1), 79-89 (1999).

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Das Na <sup>+</sup> /Phosphat-Kotransportsystem NaPi-II	13
1.2	Regulation von NaPi-II	15
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>18</b>
2.1	<b>Chemikalien</b>	<b>18</b>
2.1.1	Enzyme	18
2.1.2	Plasmide und Bakterienstämme	19
2.1.3	Oligonukleotide	19
2.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	19
2.2	Tiere	19
2.3	Laborgeräte	20
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	<b>Molekulargenetische Techniken</b>	<b>21</b>
3.1.1	Isolierung totaler RNA	21
3.1.2	Screening einer genomischen DNA-Bank	21
3.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	23
3.1.4	Klonierungstechniken	23
3.1.5	Polymerase Kettenreaktion	24
3.1.6	Amplifikation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	25
3.1.7	Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion	25
3.1.8	RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)	26
3.1.9	Sequenzierung	28
3.1.10	Einführung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen	29
3.1.11	Southern-Blot-Analysen	29
3.2	<b>Expressionssystem <i>Xenopus laevis</i> Oozyten</b>	<b>31</b>
3.2.1	Behandlung und Injektion von Oozyten	31
3.2.2	Funktionelle Untersuchungen in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	32
3.2.3	Northern-Blot Analysen	33
3.3	<b>Immunologische Techniken</b>	<b>35</b>
3.3.1	Herstellung der Antikörper	36
3.3.2	Immunhistochemie an Oozytenschnitten	36
3.3.3	Fluoreszenzmikroskopie an Zebrafisch-Schnitten	37

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Molekulare Charakterisierung der NaPi-IIb Isoform aus der Niere</b>	<b>39</b>
4.1.1	3'-RACE	39
4.1.2	5'-RACE	40
4.1.3	Sequenzvergleiche der NaPi-IIb Transkripte aus dem Zebrafisch	42
<b>4.2</b>	<b>Genomische Charakterisierung der Zebrafisch NaPi-IIb Transkripte</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>Gewebeverteilung und Expression der NaPi-IIb Transkripte im Zebrafisch</b>	<b>48</b>
4.3.1	Analyse der mRNA-Expression durch RT-PCR	48
4.3.2	Analyse der Protein-Expression durch Immunhistochemie	50
<b>4.4</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung von NaPi-IIb1</b>	<b>57</b>
4.4.1	Bestimmung der Substrataffinitäten	58
4.4.2	Strom-Spannungs Abhängigkeit des Einwärtsstroms ( $I_p$ )	60
4.4.3	Bestimmung der pH-Abhängigkeit	61
<b>4.5</b>	<b>Antisense-Transkripte des NaPi-IIb1</b>	<b>62</b>
4.5.1	Charakterisierung des kurzen NaPi-IIb1 Fragments	62
4.5.2	Strangspezifische RT-PCR zur Feststellung der Herkunft des verkürzten Fragments	63
4.5.3	Sequenzierung der vollständigen Sequenz des Antisense-Transkripts durch RACE	66
4.5.4	Funktionelle Charakterisierung der Antisense-Transkripte von NaPi-IIb1	73
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
<b>5.1</b>	<b>Molekulare Charakterisierung der Zebrafisch NaPi-IIb Transkripte</b>	<b>78</b>
<b>5.2</b>	<b>Expressions-Muster der NaPi-IIb Isoformen im Zebrafisch</b>	<b>79</b>
<b>5.3</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung des NaPi-IIb1</b>	<b>81</b>
<b>5.4</b>	<b>Regulation des Zebrafisch NaPi-IIb1</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>96</b>
<b>8.1</b>	<b>cDNA-Sequenzen</b>	<b>96</b>
8.1.1	NaPi-IIb1	96
8.1.2	NaPi-IIb2	98
8.1.3	Antisense I (AS-I)	100

8.1.4	Antisense II (AS-II)	100
<b>8.2</b>	<b>Genomische-Sequenzen</b>	<b>101</b>
8.2.1	NaPi-IIb1 mit Antisense-Sequenzen	101
8.2.2	NaPi-IIb2	107
<b>8.3</b>	<b>Primer</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>121</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AMV	avian myeloblastosis virus
AP	alkalische Phosphatase
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
CSPD	3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5' chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl) Phenylphosphat, Dinatriumsalz
Cy3	Indodicarbocyanin Farbstoff 3
cRNA	komplementäre RNA
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DIG	Diogxygenin
dNTP	Deoxyribonukleotide, dATP, dGTP, dCTP, dTTP
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gel	Gelatine
GSP	genspezifischer Primer
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	<u>K</u> eyhole <u>L</u> impet <u>H</u> emocyanin
LB	Bakterien-Vollmedium (Luria-Bouillon)
LCA	Lens cullinaris agglutinin
mRNA	messenger RNA
M	Molar
o.d.	optische Dichte
OK	Opossum Kidney
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
pfu	Plaque bildende Einheiten

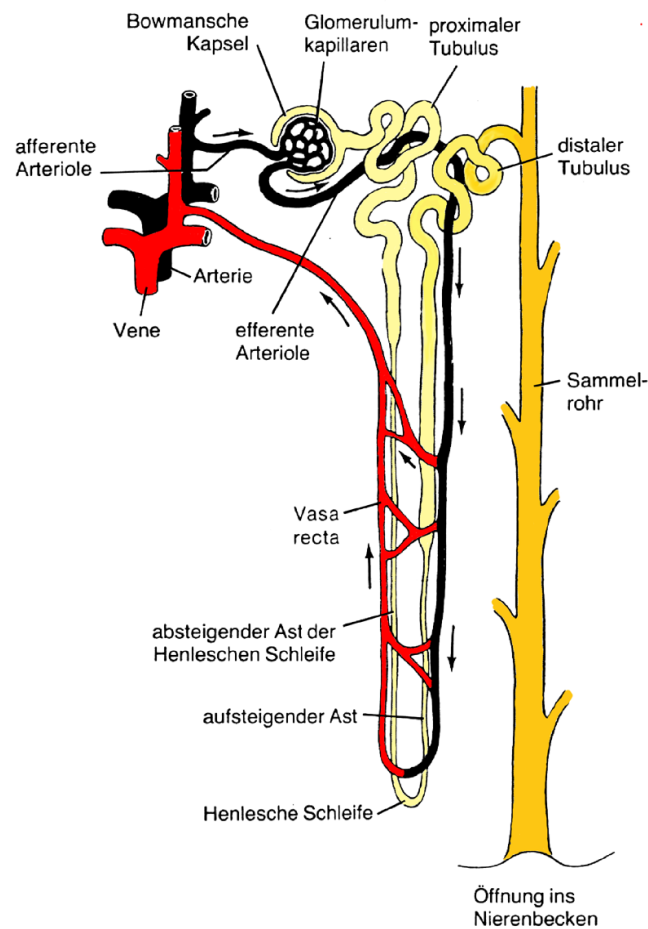


PTH	Parathormon
RACE	schnelle Amplifizierung von cDNA Enden
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkription mit nachgeschalteter Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natrium dodecylsulfat
TE	Tris-EDTA-Puffer
TM	Transmembranregion
ü. N.	über Nacht
ZF	Zebrafisch



## 1 Einleitung

Anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) erfüllt als Bestandteil von Biomolekülen wie z.B. Nukleinsäuren, Phosphoproteinen oder ATP in jedem Organismus lebensnotwendige Funktionen. Für einen ausgeglichenen Phosphathaushalt in Vertebraten ist ein gut abgestimmtes Zusammenspiel von Niere und Dünndarm erforderlich. Diese Organe sind die wichtigsten Orte des Phosphattransports. Im Darm wird anorganisches Phosphat ( $P_i$ ) durch transzellulären Transport in epithelialen Mucosa-Zellen aus der Nahrung ins Blut absorbiert. Die Niere reguliert durch genau gesteuerte Ausscheidung die Plasmakonzentration von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ). Die Balance zwischen diesen beiden Systemen ist unentbehrlich zur Aufrechterhaltung der Phosphat-homöostase. Die Phosphatkonzentration im Blut unterliegt einem Tag/Nacht-Rhythmus und wird von hormonellen und metabolischen Faktoren beeinflusst. Zusammen mit Calcium liegt es in gespeicherter Form als Hydroxylapatit vor und bildet die Grundsubstanz von Zähnen und Knochengewebe. Die Regulation des  $P_i$ -Haushalts ist daher eng mit der  $Ca^{2+}$ -Homöostase verknüpft. Als Kontrollorgan spielt die Niere in der Phosphathomöostase eine zentrale Rolle. Sie besteht aus Blutgefäßen (Glomeruli) und aus einem Röhrenchensystem (Nieren-Tubuli), welche zusammen die funktionelle Einheit der Niere, das Nephron, bilden (Abb. 1).



**Abb. 1: Die funktionelle Einheit der Niere: Das Nephron**

Das Glomerulum ist ein arterielles Gefäßknäuel, das in eine Kapsel (Bowman'sche Kapsel) hineingestülpt ist und als Ultrasieb wirkt. Das durch das Glomerulum fließende Blut wird gefiltert, wobei Proteine ( $>10$  kDa) und Zellen aufgrund ihrer Größe zurückgehalten werden. Das Wasser und die darin gelösten Stoffe gelangen in den Kapselraum und bilden den Primärharn. Während der Passage des Harns durch den proximalen Tubulus wird der größte Teil des Filtrats durch spezifische Resorptionsmechanismen durch das Tubulusepithel in die Blutgefäße transportiert (Abb. 2.). Aufgrund der großen Permeabilität in diesem Abschnitt wird Wasser passiv nachgezogen. Auf diese Weise nimmt bereits hier das Volumen des Harns bis zu 85% ab. Bei der Resorption auf der Seite des Tubuluslumens (apikale Seite) spielen membranständige  $\text{Na}^+$ -Kotransportsysteme eine zentrale Rolle. Diese sekundär aktiven Transporter werden indirekt durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase angetrieben, welche unter ATP-Verbrauch  $\text{Na}^+$ -Ionen aus und  $\text{K}^+$ -Ionen

in die Zellen transportiert. Durch den so aufgebauten  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgradienten wird der Einstrom von Substanzen, wie Aminosäuren, Glucose, Sulfat und Phosphat mit dem  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle gekoppelt. So werden 60-70% des filtrierten Phosphats aus dem Primärharn aktiv wieder in die peritubulären Blutkapillaren transportiert (Stickler, 1964). Unter Energieaufwand verläuft der  $\text{Na}^+$ -gekoppelte Phosphattransport gegen den elektrochemischen Gradienten in die Epithelzelle. Über den Phosphattransport an der kontraluminalen (basal) Zellmembran sind die Kenntnisse lückenhaft. Dort konnten auf molekularer Ebene bisher keine Phosphattransportsysteme charakterisiert werden. In der folgenden Henle'schen Schleife wird der Harn durch Resorption von  $\text{H}_2\text{O}$  aufkonzentriert. Zusätzlich wird hier  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und Harnstoff resorbiert. Im folgenden distalen Tubulusabschnitt findet eine fakultative Reabsorption statt, welche über Hormone auf die spezifischen Bedürfnisse des Gesamtorganismus abgestimmt wird. Im Sammelrohr letztlich wird durch Resorption von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{NaCl}$  der Urin konzentriert.

## 1.1 Das Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransportsystem NaPi-II

Für die regulierte Resorption auf molekularer Ebene sind hauptsächlich Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransporter der Proteinfamilie NaPi-II verantwortlich (Werner *et al.* 1998), welche apikal in der Bürstensaummembran des Tubulusepithels lokalisiert sind.

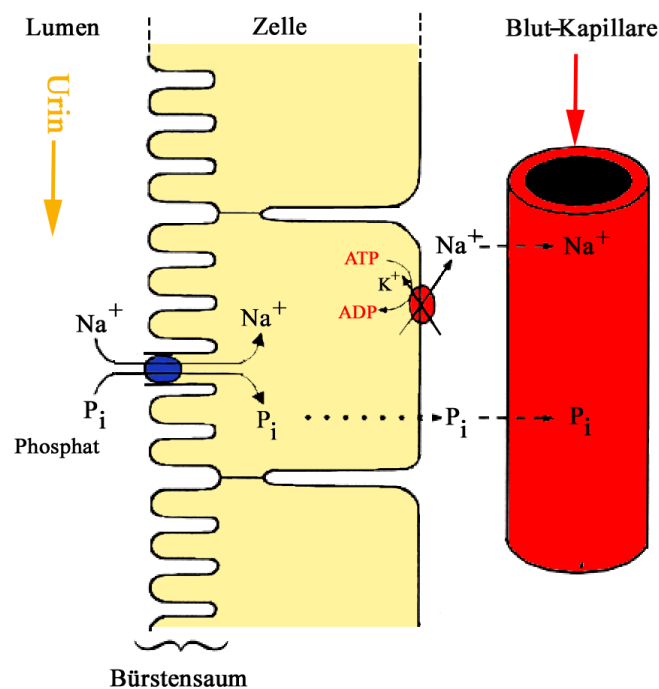
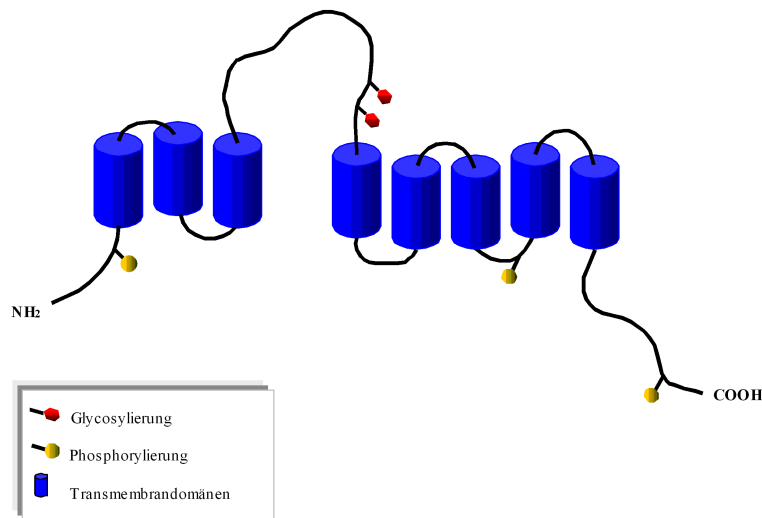


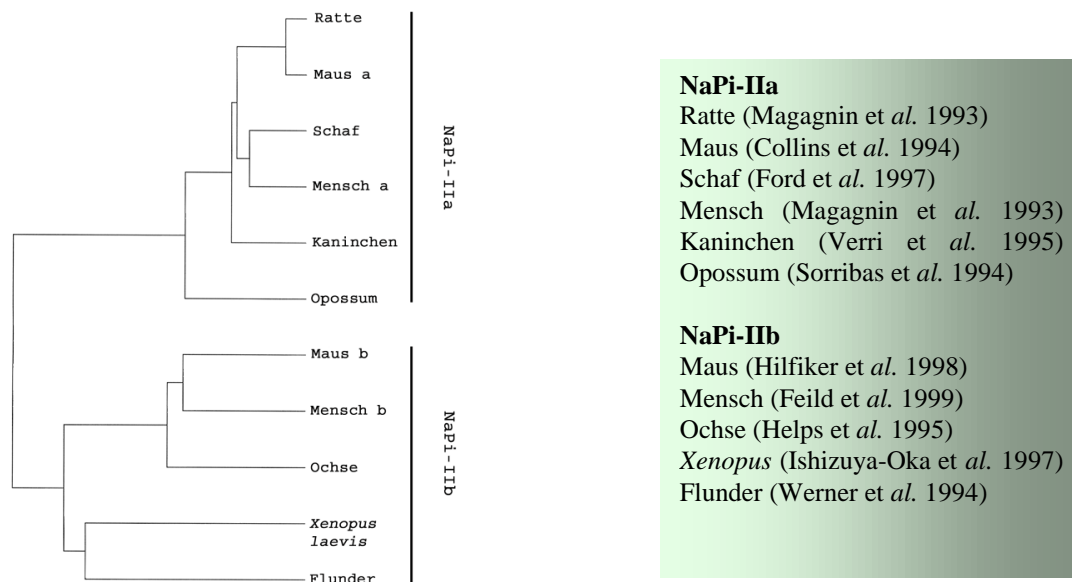
Abb. 2. Das Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransportsystem im proximalen Tubulusepithel

Es konnten bisher mehrere NaPi-II Transporter aus Wirbeltieren charakterisiert werden (Abb. 3). Obwohl die Proteinsequenzen dieser membranständigen Proteine bekannt sind, konnte ihre dreidimensionale Struktur bisher nicht geklärt werden. Experimentell wurden der N- und C-Terminus dem Intrazellulärraum zugeordnet (Kohl *et al.* 1998). Zudem besitzen die Transporter eine große extrazelluläre Schleife, die mehrere Glycosylierungsstellen aufweist (Lambert *et al.* 1999). Berechnungen auf der Grundlage von Hydrophobizitäten von Peptidsegmenten lassen acht bis zehn Transmembrandomänen vorhersagen, jedoch fehlen exakte Befunde über die genaue Anzahl dieser Einheiten.



**Abb. 3: Strukturmodell der NaPi-II Transporter.** rot: extrazelluläre N-Glycosylierungsmotive (Ratte), gelb: intrazelluläre Motive für Protein Kinase C (Ratte).

Basierend auf Proteinsequenzunterschieden kristallisierten sich zwei Untergruppen heraus, welche sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. Die renale Isoform NaPi-IIa wird ausschließlich in Säugern exprimiert, wobei sie hauptsächlich in den Zellen des proximalen Tubulus (Custer *et al.* 1994) nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 4: Stammbaum der NaPi-II Transporter.**

Die zweite Untergruppe NaPi-IIb zeigt ein wesentlich breiteres Expressionsmuster. Diese Isoform wurde als erstes aus der Winterflunder, einem überwiegend im Salzwasser lebenden Fisch, kloniert (Werner et al. 1994) und wird ebenfalls in Säugern und Amphibien exprimiert. Kürzlich wurde NaPi-IIb auch aus der Maus und dem Menschen kloniert. Dieses Protein ist hauptsächlich in den Mucosa-Zellen des Darm lokalisiert, konnte aber je nach Spezies auch in Niere, Leber, Gonaden und Lunge (bzw. Kiemen) nachgewiesen werden (Kohl et al. 1997, Hilfiker et al. 1998, Feild et al. 1999). Die funktionellen Eigenschaften (z.B. pH-Abhängigkeit) des NaPi-IIb aus der Maus entsprechen dem bereits 1976 in Vesikelstudien beschriebenen intestinalen Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransportsystem der Säuger (Berner et al. 1976, Hilfiker et al. 1998). Aufgrund der breiten Gewebeverteilung von NaPi-IIb in den betroffenen Spezies und der ausschließlichen Expression der NaPi-IIa Isoform in Säugern, scheint NaPi-IIb die evolutionär ältere Form des Natrium gekoppelten Phosphattransporters darzustellen.

## 1.2 Regulation von NaPi-II

Der Phosphattransport durch NaPi-II wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dabei sind die zellulären Mechanismen, die der Regulation durch Parathyroidhormon (PTH) und der P<sub>i</sub>-Adaptation zugrunde liegen, sehr gut untersucht. Auf zellulärer Ebene sind die Mechanismen der NaPi-II Regulation durch PTH vergleichbar mit den Prozessen, welche durch die Variation der P<sub>i</sub>-Plasmakonzentration hervorgerufen werden. Sowohl durch Erniedrigung der P<sub>i</sub>-Blutkonzentration als auch Abwesenheit von PTH wird die Phosphataufnahme durch NaPi-II stimuliert. Dabei wird der Transporter, welcher in subapikalen Vesikeln gespeichert vorliegt, durch Exocytose vermehrt in die Bürstensaummembran eingebaut. Dies konnte mit immunhistochemischen Untersuchungen an Rattennierenschnitten und OK-Zellen gezeigt werden (Pfister et al. 1997, Pfister et. 1998). Durch Ausschüttung von PTH oder bei einer erhöhten Phosphatkonzentration im Plasma wird der Transporter inaktiviert, indem er endocytiert und in Lysosomen abgebaut wird. Diese Mechanismen, bei denen die Zahl der aktiven Transporter in der Membran erhöht oder verringert wird, verlaufen kurzfristig, innerhalb von wenigen Stunden ab. Bei längerfristiger Hochregulation von NaPi-II wird dagegen die Anzahl der NaPi-II exprimierenden Zellen erhöht, was ebenfalls eine größere Gesamt-Transportaktivität zur Folge hat.

Im Gegensatz zu der NaPi-II Regulation auf der Protein-Ebene, konnte bisher kein Mechanismus gezeigt werden, welcher auf der Ebene der mRNA eingreift. Die oben erwähnten Regulationsmechanismen durch die PTH bzw.  $P_i$ -Menge wirken sich vor allem auf die NaPi-II Proteinmenge aus. Seit der Entdeckung einer natürlichen Antisense-mRNA von NaPi-IIb aus der Flunder wird jedoch die Regulation auf der mRNA-Ebene im Zusammenhang mit diesem Transkript diskutiert (Huelseweh et al. 1998). Die biologische Bedeutung dieser mRNA ist noch nicht geklärt. Sie stammt vom Gegenstrang der NaPi-IIb genomischen DNA und besitzt daher komplementäre mRNA Abschnitte zu NaPi-IIb. Diese strukturelle Besonderheit ermöglicht eine Wechselwirkung der NaPi-IIb-mRNA mit dem Antisense-Transkript, welche die NaPi-IIb Transkription oder Translation beeinflussen kann.

Aufgrund physiologischer Unterschiede zwischen Säugern und Fischen im tubulären Phosphattransport war die Klonierung von NaPi-IIb aus der Winterflunder von besonderer Bedeutung (Werner et al. 1994). Während Säuger Phosphat in der Niere ausschließlich resorbieren, kann bei Fischen neben der Resorption auch Sekretion stattfinden. Interessanterweise scheint NaPi-IIb aus der Flunder an beiden Schritten beteiligt zu sein. In Abhängigkeit vom Zelltyp wird NaPi-IIb auf unterschiedliche Seiten der polarisierten Epithelzelle sortiert. Während der Transporter im Darm ausschließlich luminal lokalisiert ist und entsprechend Phosphat absorbiert, konnte das Protein in der Niere je nach Tubulusabschnitt basolateral oder luminal nachgewiesen werden (Kohl et al. 1998). Demnach wird Phosphat im sekretorischen Teil des Tubulus durch den basolateral sortierten Transporter sezerniert, während durch das gleiche Protein in der apikalen Membran des Sammelrohrs die Feinabstimmung des Urins vorgenommen wird.

Die mit der Flunder erhaltenen Befunde zur intrazellulären Proteinsortierung eröffnen neue Wege zum Verständnis des Phosphattransports auf zellulärer und molekularer Ebene. Jedoch ist die Flunder aufgrund ihrer schwierigen Zucht und Haltung als Modellfisch für weiterführende Untersuchungen ungeeignet. Der Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) bietet gegenüber der Flunder wesentliche Vorteile. Neben einer kurzen Generationsdauer besitzen Zebrafische eine hohe Reproduktionsrate, sodaß die Zucht dieser Süßwasserfische sehr viel unproblematischer ist als bei der Flunder. Sie lassen sich ohne Probleme an veränderte Lebensbedingungen anpassen. Zudem



werden immer vielfältigere Informationen bezüglich des Genoms und der Relevanz bestimmter Gene zugänglich, da dieser Süßwasserfisch bei Entwicklungsbiologen und Genetiker als Modellorganismus etabliert ist.

Aus diesem Grund war der Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransporter NaPi-II des Zebrafisches von großem Interesse. In meiner Diplomarbeit konnte dieses Protein mit Hilfe einer RT-PCR-Strategie aus dem Darm des Zebrafisches kloniert werden. Die Nukleotidsequenz dieses Proteins zeigt große Homologien zu den Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransportern der Gruppe NaPi-IIb. In ersten Transportexperimenten mit Oozyten des *Xenopus laevis* wurde gezeigt, daß dieses Protein tatsächlich natriumabhängig Phosphat transportiert. Interessanterweise konnte in einer weiteren RT-PCR Suche eine zweite NaPi-II Isoform in der Niere des Zebrafisches detektiert werden. Von diesem Transkript konnte der mRNA-Bereich zwischen den Transmembranregionen 3 und 7 (ca. 1 kb) ermittelt werden. Bei einem Vergleich der Nukleotidsequenzen zeigt die zweite Isoform eine 70%ige Homologie zum ersten Transkript und kodiert somit möglicherweise auch für ein NaPi-IIb Protein. Für eine genauere Charakterisierung der zweiten Isoform ist jedoch die vollständige Sequenzinformation notwendig. Die große Ähnlichkeit des Teilfragments aus der Niere zur ersten Isoform aus dem Darm bringt die Frage nach der physiologischen Bedeutung und einer möglichen biologischen Verknüpfung zwischen den beiden Proteinen in den Vordergrund. Die in meiner Diplomarbeit erhaltenen Befunde bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen an den beiden NaPi-IIb Isoformen im Zebrafisch.

Ziel dieser Arbeit war es, die in meiner Diplomarbeit entdeckten Zebrafisch NaPi-IIb Isoformen funktionell und auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Die Klonierung einer ersten Isoform, welche aus dem Zebrafisch-Darm isoliert wurde, ermöglichte im Folgenden die Bestimmung der Transporteigenschaften mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Für entsprechende Untersuchungen an der zweiten Isoform (aus der Niere) sollte hierfür möglichst viel zusätzliche Sequenzinformation ermittelt werden. Weiterhin sollte die Gewebeverteilung der beiden mRNA-Transkripte und der entsprechenden Proteine im Zebrafisch untersucht werden. Der Vergleich der Gewebelokalisation von mRNA und Protein sollte zusammen mit den Funktionsdaten zur Beurteilung der physiologischen Bedeutung beider Proteine beitragen.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Es wurden ausschließlich Chemikalien von p. A. Qualität der Firmen Baker (Groß-Gerau), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim) verwendet. Die Kits für die Aufreinigung von PCR-Produkten, die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, sowie für die Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden von Qiagen (Hilden) bezogen. Als DNA-Standard wurde der 1 kb DNA-Leiter sowie der 100 bp DNA-Leiter von den Firmen Gibco BRL (Karlsruhe) und NEB (Schwalbach) eingesetzt. Als RNA-Leiter wurde die 0.24-9.5 kb RNA-Leiter von NEB (Schwalbach) verwendet. Als Molekulargewichtsstandard für SDS-Polyacrylamidgele wurden die 10 kDa Leiter und der vorgefärbte Marker für niedriges Molekulargewicht von NEB (Schwalbach) eingesetzt. Die nichtradioaktive Markierung und Detektion von DNA erfolgte mit Digoxigenin (DIG)-gekoppelten Nukleotiden sowie einem DIG-Detektions-Kit der Firma Roche Diagnostics (ehemals: Boehringer Mannheim) (Mannheim). Die radioaktiven Transportmessungen wurden mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat von der Firma Amersham (Braunschweig) durchgeführt.

#### 2.1.1 Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen stammten von den Firmen Pharmacia (Freiburg) und NEB (Schwalbach). Die T4 DNA-Ligase wurde von Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen. Die *in vitro* Transkription erfolgte mit der T7 und SP6 RNA-Polymerase von Promega (Mannheim). Die PCR-Reaktionen wurden mit *Taq* DNA-Polymerase von Sigma (Steinheim), *rTth* Polymerase XL von Perkin-Elmer (Weiterstadt) und *Pfx* Polymerase von Gibco BRL (Karlsruhe) durchgeführt. Für die reverse Transkription wurde Superscript RT von Gibco BRL (Karlsruhe) oder AMV RT von Promega (Mannheim) eingesetzt.

### 2.1.2 Plasmide und Bakterienstämme

Das Plasmid pSport1 der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) wurde als Klonierungsvektor eingesetzt. *Escherichia coli* (*E. coli*) DH 10B™ wurde ebenfalls von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen und für Klonierungen verwendet.

DH 10B:                    F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*dlacZ*ΔM15 Δ*lacX74*  
*deoR recR recA1 endA1 araD139* Δ(*ara,leu*)7697 *gal/U galK*  
*λ<sup>-</sup> rpsL nupG*

### 2.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für Sequenzierungen und PCR-Versuche wurden auf einem Beckman Oligo 1000 M im 0.03 μmol-Maßstab synthetisiert und nach einer NAP-10 Gelfiltration (Pharmacia) direkt eingesetzt. Alle für diese Arbeit hergestellten Oligonukleotide sind mit ihrer Bezeichnung und Sequenz im Anhang aufgeführt.

### 2.1.4 Puffer, Lösungen und Medien

Standardlösungen, -medien und -puffer wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Lösungen und Puffer für spezielle Anwendungen sind nach jeweiligen Methodenbeschreibungen aufgeführt.

## 2.2 Tiere

Südafrikanische Krallenfrösche der Art *Xenopus laevis* wurden von H. Kähler, Institut für Entwicklungsbiologie, Bedarf für Forschung und Lehre (Hamburg), bezogen. Die Zebrafische der Art *Brachydanio rerio* stammten aus der hauseigenen Zucht.

### 2.3 Laborgeräte

Die reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktionen wurden in einem OmniGene Temperatur Cycler mit Deckelheizung und “intube”-Temperaturkontrolle der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt. Die Bestimmung von DNA/RNA-Konzentrationen erfolgte mit dem Gene-Quant Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg). Messungen von Extinktionen mit sichtbarem Licht wurden mit einem Spektralphotometer (Spectronic 601, Milton Roy, Rochester) vorgenommen. Die Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte durch Elektroporation mit dem Gene Pulser der Firma Biorad (München). Zur Sequenzierung von DNA wurden die entsprechenden DNA-Fragmente mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden vervielfältigt und auf einem Perkin Elmer (Weiterstadt) DNA-Sequenzierungsgerät analysiert. Die Aufnahmen zur Analyse der immunhistochemischen Experimente mit Zebrafisch-Paraffinschnitten und Oozyten-Gefrierschnitten wurden mit dem Zeiss Axiophot (Oberkochen) oder dem Mikroskop TE-200 von Nikon (Japan) aufgenommen.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekulargenetische Techniken

Es wurden, sofern nicht anders erwähnt, molekulargenetische Methoden nach Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1987) angewandt.

#### 3.1.1 Isolierung totaler RNA

Gesamt RNA aus einzelnen Zebrafisch Organen oder Gesamtfisch wurde mit dem RNeasy Mini-Kit von Qiagen isoliert.

Die Fische wurden auf Eis betäubt und durch Dekapitation getötet. Je nach Gewebe wurden zwischen 10 und 30 mg entnommen und zur RNA-Extraktion eingesetzt. Hierzu wurde das Gewebe mit einem Homogenisator der Firma Kinematica AG im Lysepuffer homogenisiert und die totale RNA nach Herstellerangaben extrahiert.

#### 3.1.2 Screening einer genomischen DNA-Bank

Eine gekaufte  $\lambda$ -Phagen genomische DNA Bank von adulten Zebrafischen wurde nach den entsprechenden genomischen Klonen der beiden Zebrafisch NaPi-IIb Transkripte durchsucht.

Nach Herstellerangaben wurde der Titer der Bank als  $1 \times 10^{10}$  pfu/ml bestimmt. Für das Screening wurden jeweils  $1.8 \times 10^5$  Phagen untersucht.

Für jedes Transkript wurde jeweils ein sogenannter Grobscreen und mindestens ein Feinscreen durchgeführt. Als Wirts Bakterium diente K802 in Übernachtkultur. Bei der ersten Suche wurden die infizierten Bakterien auf sechs Agar-Platten ( $\varnothing$ : 150 mm + 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ) mit Hilfe von 8 ml Top-Agarose (+10 mM  $\text{MgSO}_4$ ) ausplattiert. Nach der siebenstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten ü.N. bei 4°C gelagert. Es wurden pro Platte zwei Replikafilter

(Nylonmembran: Roche Diagnostics (ehemals: Boehringer Mannheim), 1699083) angefertigt, um falschpositive Signale auszuschließen. Diese wurden 30" auf ein mit Denaturierungspuffer durchtränktes Filterpapier gelegt. Anschließend wurden die Filter jeweils 5' in Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer und einige Sekunden in 2×SSC inkubiert und die DNA 1 h bei 100°C auf der Membran fixiert.

Nach einer zweistündigen Prähybridisierung bei 42°C wurden die Filter über Nacht bei der selben Temperatur mit 10 ng/ml Sonde in der Hybridisierungslösung inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Sonde wurden die Filter 2×5' in 2×Waschpuffer bei RT gewaschen. Unspezifisch gebundene Digoxigenin-Sonde wurde in den folgenden Waschschrritten mit 0.4× und 0.2×Waschpuffer (jeweils 1×15' bei 42°C) entfernt. Die Detektion positiver Klone erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Anti-Digoxigenin-AP von Roche Diagnostics (Mannheim) und CSPD als Substrat für die alkalische Phosphatase. Die Exposition erfolgte 4-8 h auf einem photographischen Film (Kodak) (siehe auch Southern-Blot: Abschn. 3.1.11).

Die Filter-Bereiche, die bei diesem ersten Screen auf beiden Replikafiltern positive Signale ergaben, wurden aus den entsprechenden Agar-Platten ausgestochen und bei einem zweiten (Fein-)Screen eingesetzt. Hierzu wurden die ausgestochenen Bereiche in 400 µl 1×Phagenpuffer und einem Tropfen Chloroform über Nacht bei 4°C inkubiert, sodaß die Phagen in den Puffer diffundieren konnten, um anschließend in verschiedenen Verdünnungen (Ø: 90 mm) ausplattiert zu werden. Die weiteren Schritte wurden entsprechend dem ersten Screen durchgeführt. Konnte ein Plaque nicht eindeutig vereinzelt werden, wurde ein weiterer (Fein-)Screen angefügt.

Zur Sequenzierung der positiven Klone wurde die Lambda DNA aus den Phagen isoliert. Hierzu wurde eine Agarose Platte (Ø: 150 mm), auf der der Bakterienrasen komplett lysiert war, mit 12 ml 1×Phagenpuffer versetzt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Daraus wurden 10 ml Lösung entnommen, in welche 10 µl Chloroform hinzugefügt wurde. Die Lösung wurde gevortext und anschließend 10 min mit 2800 rpm zentrifugiert (Technospin R, Sorvall Instruments).

Die DNA der Phagen wurde mit Hilfe des Qiagen Lambda DNA-Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach der Behandlung mit 30 µl L1 Puffer (45', 37°C) wurde die Lösung mit 2 ml L2 Puffer vorsichtig gemischt und nach 60' auf Eis 10' mit 10000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml Puffer L3 resuspendiert und mit Proteinase K behandelt (0.2 mg/ml Proteinase K, 30' bei 55°C). Die weiteren Schritte wurden nach Vorschrift

des Herstellers durchgeführt. Die Lambda DNA wurde in TE-Puffer (pH 8) aufgenommen und in der Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

### 3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Hochaufgereinigte Plasmid-DNA für Sequenzierungsreaktionen mit DyeDeoxy Nukleotiden und für weitere präparative Zwecke wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert.

### 3.1.4 Klonierungstechniken

Plasmid-DNA und PCR-Fragmente, die kloniert werden sollten, wurden mit der entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben geschnitten. Die Fragmente wurden über Agarosegele elektrophoretisch getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits eluiert. Der Ligationsansatz enthielt 30 fmol Vektor-DNA und einen dreifach molaren Überschuß an Insert-DNA bei ca. 100 ng gesamter DNA-Menge. Nach zweistündiger Ligation bei RT wurde die DNA mit 100% Ethanol präzipitiert, mit 8 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und zur Transformation der elektrokompententen *E. coli* DH 10B Zellen eingesetzt. Die Herstellung dieser Zellen und deren Transformation mit rekombinanter DNA durch Elektroporation wurde nach der Methode von Dower et al. (1988) durchgeführt. Für die Transformation wurde die Hälfte des Ligationsansatzes mit 80 µl Zellsuspension vermischt. Die Elektroporation wurde in einer Elektroporationsküvette mit 0.1 cm Elektrodenabstand bei den Einstellungen 1,8 kV, 800 Ω und 25 µF durchgeführt. Nach dem Suspendieren in 1 ml LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37°C regeneriert. Anschließend wurden Aliquots des Transformationsansatzes auf LB-Amp Agar-Platten ausplattiert.

### 3.1.5 Polymerase Kettenreaktion

Die Synthese von PCR-Fragmenten erfolgte nach den von Innis et al. (1990) beschriebenen Grundlagen. Hierzu wurde die AmpliTaq DNA Polymerase aus dem PCR-Kit von Perkin Elmer eingesetzt. Die Menge des DNA-Templates variierte je nach gegebener Fragestellung. Die Anlagerungstemperatur für die Primer ( $T_{\text{Annealing}}$ ) wurde grundsätzlich 2-5°C unter den entsprechenden Schmelztemperaturen gewählt.

#### Reaktionsansatz (AmpliTaq):

5 µl 10 x PCR-Puffer	
1 µl Primer I (10 µM)	
1 µl Primer II (10 µM)	
4 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	
0,5 µl Ampli Taq (5 U/µl)	

#### Bedingungen:

2 min	95°C
30 sek	95°C
30 sek	$T_{\text{Annealing}}$   35×
1,5 min	72°C
5 min	75°C

Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die Zyklusbedingungen wurden je nach Schmelztemperatur der Primer und der Länge des zu erwarteten Fragmentes verändert.

Zur Amplifizierung von Fragmenten >1000 bp wurde die PCR mit dem XL-Polymerase-Kit der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die XL-Polymerase gewährleistet aufgrund der 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine höhere Genauigkeit beim Einbau der Nukleotide.

Um mehr Spezifität zu gewährleisten, wurde in vielen Fällen der PCR eine verschachtelte („nested“) PCR nachgeschaltet. Dabei dienten 5 µl des bereits amplifizierten PCR Produkts in dieser zweiten PCR als Vorlage. Das Primerpaar in diesem Ansatz wird so gewählt, daß es innerhalb der ersten Sequenz liegt. Unspezifische Vorlagen bieten nicht genügend komplementäre Sequenzen für die inneren („nested“) Primer, sodaß bevorzugt die spezifische Matrize amplifiziert wird.



### 3.1.6 Amplifikation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Zur Überprüfung von transformierten *E. coli* Zellen wurde ebenfalls die PCR angewendet. Die Zellen wurden hierfür auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Einige Zellen der Bakterienkolonien wurden in ein PCR-Gefäß überführt und in einen Mikrowellen-Gerät (1', 600 Watt) aufgeschlossen. Die Amplifizierung der subklonierten DNA erfolgte mit sequenzspezifischen Primern nach einer modifizierten PCR-Vorschrift. Die aufgeschlossenen Bakterien wurden hierzu mit dem PCR-Reaktionsansatz vereinigt und bei der entsprechenden Primer-Schmelztemperatur amplifiziert.

#### PCR-Ansatz:

Bakterienzellen	+	1,25 µl 10 × PCR-Puffer	(Sigma)
		0,25 µl antisense-Primer	(10 µM)
		0,25 µl sense-Primer	(10 µM)
		1,00 µl dNTP-Mix	(je 2,5 mM)
		0,10 µl <i>Taq</i> Polymerase	(5U/µl)
		9,65 µl Wasser	

### 3.1.7 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion

Bei einer reversen Transkription wird der natürliche Poly A-Schwanz der mRNA als Anker-Region für einen Oligo dT-Primer genutzt. Der Primer hybridisiert mit dieser Region, wodurch die cDNA-Synthese möglich wird. Die reverse Transkription wurde mit dem RT-PCR Kit der Firma Promega (Mannheim) durchgeführt. Es wurden 0,3 µg totale RNA der entsprechenden Gewebeart eingesetzt. Diese wurde zunächst 10' bei 70°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und anschließend mit dem RT-Ansatz vereinigt.

Die reverse Transkription erfolgte für 30-45' bei 42°C. Die cDNA des RT-Ansatzes wurde für die anschließende PCR als Ausgangsmaterial verwendet. Hierzu wurde der RT-Ansatz auf Eis mit 40 µl eines PCR-Mix vereinigt. Die PCR wurde wie beschrieben durchgeführt.

<u>PCR-Ansatz:</u>	30 µl H <sub>2</sub> O	<u>RT-Ansatz:</u>	0,5 µl RNasin	(40 U/µl)
	5 µl 10 x PCR-Puffer		2 µl MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)
	1 µl Primer I (10 µM)		1 µl dNTP-Mix	(10 mM je)
	1 µl Primer II (10 µM)		1 µl 10 x RT-Puffer	
	3 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)		0,3 µl Oligo dT-Primer	(500 µg/ml)
	0,5 µl Ampli Taq (5 U/µl)		1 µl AMV-RT	(U/µl)
	(DNA Polymerase)			

### 3.1.8 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die allgemeine Polymerasekettenreaktion kann nur zur Amplifizierung von einem DNA-Abschnitt angewendet werden, wenn die flankierenden Bereiche bekannt sind. Jedoch ist es von großem Interesse, die Sequenz der cDNA, welche für ein Protein kodiert, vollständig zu kennen. Zur Amplifizierung von 5'- bzw. 3'-Enden macht man sich daher die RACE Methode zunutze.

#### a) 3'-RACE

Bei dieser Variante wird wie bei einer reversen Transkription der natürlich Poly A-Schwanz der mRNA als Ankerregion für einen Oligo dT-Primer benutzt. Dieser Primer besitzt eine konstruierte Ankerregion mit einer bekannten Sequenz. Nach der Herstellung der cDNA mit dem Oligo dT-Primer kann also in einer folgenden PCR ein konstruierter Primer an dieser Ankerregion hybridisieren und mit dem genspezifischen Primer (GSP) das 3'-Ende amplifizieren. Für die reverse Transkription nach Abschn. 3.1.7 mit dem Oligo dT-Primer (NotI-[dT]<sub>18</sub>) wurden jeweils 0.5 µg totale RNA eingesetzt. Die cDNA wurde direkt in der folgenden PCR weiterverarbeitet. In der PCR nach Abschn. 3.1.5 wurde neben einem genspezifischen Primer der pNot Primer eingesetzt, welcher an die Adapter-Region des NotI-[dT]<sub>18</sub> hybridisieren konnte.

Die Stringenz der Reaktion wurde durch eine verschachtelte PCR weiter erhöht. Hierzu wurde wieder der pNot Primer mit einem zweiten genspezifischen Primer, welcher innerhalb der ersten Sequenz lokalisiert war, eingesetzt.

#### b) 5'-RACE

Da am 5'-Ende der mRNA kein Bereich existiert, welcher mit dem Poly A-Schwanz vergleichbar ist und somit für eine Ankerfunktion (siehe 3'-RACE) geeignet ist, muß hier zuerst solch eine Region durch "homopolymeres Tailing" künstlich geschaffen werden. Mit Hilfe einer terminalen Transferase wird nach der reversen Transkription ein Poly C-Schwanz am 5'-Ende der mRNA geschaffen. An diese Position kann anschließend der RACE Primer hybridisieren und mit einem genspezifischen Primer eine PCR ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde der 5'-RACE-Kit der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) verwendet und die Reaktion nach den Vorgaben des Hersteller-Handbuchs durchgeführt. Nach Isolierung von totaler RNA aus dem jeweiligen Gewebe des Zebrafisches wurde jeweils 1 µg dieser RNA mit Hilfe der Superscript II RT und einem genspezifischen Primer (GSP1) revers transkribiert (cDNA). Überschüssige RNA wurde mit 1 µl RNase H (30', 37°C) abgebaut. Die cDNA wurde mit einer GlassMAX DNA-Säule aufgereinigt. Ein Fünftel der Reaktion (10 µl) wurde in der folgenden homopolymer Tailing Reaktion eingesetzt, in welcher durch eine terminale Transferase ein Poly-Deoxycytosin-Schwanz an das 5'-Ende der aufgereinigten cDNA angehängt wurde (10', 37°C). Anschließend wurde das gesuchte 5'-Fragment in einer PCR mit einem verschachtelten genspezifischen Primer (GSP2) und dem Deoxycytosin-Adapter-Primer (AAP) bei Standardbedingungen amplifiziert. In solchen Fällen, in denen bei dieser ersten PCR kein eindeutiges Produkt amplifiziert werden konnte, wurde erneut eine verschachtelte PCR mit einem weiteren genspezifischen Primer (GSP 3) und dem verschachtelten Adapterprimer (AUAP) durchgeführt.

### 3.1.9 Sequenzierung

Bei der Sequenzierungsreaktion werden die entsprechenden DNA-Fragmente mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden vervielfältigt, um anschließend auf einem DNA-Sequenzierungsgerät analysiert zu werden. Es handelt sich bei dieser Reaktion nicht um eine exponentielle “Amplifizierung” wie bei der PCR, der Anstieg der Produktkonzentration ist vielmehr linear zu der Anzahl der Zyklen. Die Sequenzierungsreaktion wird jeweils mit einem Primer durchgeführt, sodaß beide Stränge der DNA einzeln sequenziert werden. Die Sequenzierungen in dieser Arbeit wurden mit dem AmpliTaq<sup>®</sup>FS Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit nach den Angaben der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Der Sequenzierungszyklus wurde entsprechend der Primer-Anlagerungstemperatur variiert.

#### PCR-Produkte und Plasmid-DNA

10 sek 95°C -|  
 5 sek T<sub>Annealing</sub> | 25×  
 4 min 60°C -|

#### Lambda-DNA

1 min 93°C  
 30 sek 93°C -|  
 20 sek T<sub>Annealing</sub> | 25×  
 4 min 60°C -|

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mit 2.5 Vol Ethanol und 0.3 M Natriumacetat (pH 4.6) und Dextran-Blau gefällt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme des GCG Sequence Analysis Software Package (Genetics Computer Group, Madison, USA) Version 8.0 analysiert.

### 3.1.10 Einführung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen

Die Einführung von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen erfolgte mit Hilfe von Primern, deren sequenzhomologer Bereich um einen flankierenden Abschnitt ergänzt war, der die Erkennungssequenz für die entsprechende Restriktionsendonuklease enthielt. Die ersten 5 Zyklen der PCR erfolgten bei einer Anlagerungstemperatur von 10°C unterhalb der Schmelztemperatur des Primers. Anschließend wurden weitere 30 Zyklen entsprechend Abschn. 3.1.5 (PCR) durchgeführt.

### 3.1.11 Southern-Blot-Analysen

Die Southern-Blot-Analysen (Southern, 1975) dienen zur gezielten Untersuchung von PCR-Produkten nach bestimmten Zielfragmenten. Zur Detektion der gesuchten Fragmente wurden Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden eingesetzt. Diese DNA-Sonden wurden zuvor mit Hilfe einer PCR aus NaPi-IIb DNA-Fragmenten amplifiziert. In jedem PCR-Zyklus werden dabei Digoxigenin-markierte dNTPs in die DNA-Stränge eingebaut. Bei dem folgenden Southern-Experiment können diese markierten DNA-Stränge aufgrund der gleichen Sequenz mit entsprechenden NaPi-IIb Fragmenten hybridisieren und mit einem sekundären Antikörper detektiert werden. Die Southern-Methode eignet sich besonders gut, da hier im Gegensatz zum Agarose-Gel neben der Längenanalyse auch die Spezifität von PCR-Fragmenten untersucht wird. Desweiteren liegt die Empfindlichkeit bei der Southern-Blot-Methode weit über der Detektionsgrenze mit Ethidiumbromid im Agarose-Gel.

#### a) Transfer ("Blotting")

Die in einem Agarosegel durch Elektrophorese längenfraktionierten PCR-Produkte wurden jeweils 15' im Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer geschwenkt und über Nacht bei RT auf eine Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) geblottet. Die DNA auf der Membran wurde nach dem Blotten jeweils 30' zuerst in 0.4 M NaOH denaturiert und anschließend in 0.2 M

Tris/HCl (pH 7.5)/2×SSC neutralisiert. Die Fixierung der DNA fand durch Erhitzen des Blots bei 80°C (30') statt.

#### b) Hybridisierung und Detektion

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 1 h in der Prähybridisierungslösung (20 ml/100 cm<sup>2</sup>) vorbehandelt und anschließend über Nacht in der Hybridisierungslösung inkubiert. Prähybridisierung und Hybridisierung wurden jeweils bei 42°C durchgeführt. Die Membran wurde anschließend jeweils 2× 5' mit 2×SSC + 0.1%SDS (bei RT), und jeweils 15' bei 42°C mit 0.4×SSC + 0.1%SDS, 0.2×SSC + 0.1%SDS und 0.1×SSC + 0.1%SDS gewaschen.

#### c) Detektion

Die Detektion der markierten Sondenmoleküle, welche an spezifische Fragmente gebunden waren, erfolgte mit Hilfe des Anti-Digoxigenin-AP Antikörpers von Roche Diagnostics (Mannheim) und CSPD als Substrat für die alkalische Phosphatase nach Herstellerangaben.

Bei diesem Schritt werden die in der DNA-Sonde eingebauten Digoxigenin-Moleküle durch den sekundären Antikörper Anti-Digoxigenin-AP gebunden. Die alkalische Phosphatase, welche an diesen Antikörper gebunden ist, dephosphoryliert das Substrat CSPD. Dabei entsteht ein metastabiles Phenolat-Anion, welches zerfällt und Licht mit einem Maximum bei 477 nm emittiert. Mit einem Photofilm kann dieses Chemilumineszenz-Signal erfaßt werden.

Nach dem Hybridisierungs- und den Wasch-Schritten wurde die Membran zur Detektion zuerst 5' im Waschpuffer vorbehandelt und 30' in 25 ml Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde der Blot 30' mit 25 ml Blockierungspuffer + 2.5 µl Anti-DIG-AP Konjugat behandelt. Nach zwei Waschschrinen (jeweils 30') mit dem Waschpuffer wurde die Membran 5' in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert und 5' mit 10 ml Detektionspuffer + 100 µl CSPD behandelt. Der Filter wurde in Folie eingeschweißt und zur Aktivierung der Chemilumineszenz-Reaktion 5' bei 37°C inkubiert. Die Exposition erfolgte 5-15' auf einem photographischen Film (Kodak).

## Puffer

Denaturierungspuffer:	0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl
Äquilibriumspuffer:	1.5 M NaCl, 0.5 M Tris/HCl (pH 7.4), (+20°C)
Prähybridisierungslösung:	“DIG Easy Hyb” Hybridisierungslösung der Firma Roche Diagnostics Mannheim
Hybridisierungslösung:	“DIG Easy Hyb” + 10 ng/ml DNA-Sonde
Maleinsäurepuffer (P1)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl; (pH 7.5), (+20°C);
Blockierungspuffer:	Maleinsäurepuffer + 1% Blockierungsreagenz
Waschpuffer:	P1 + 0.3% Tween <sup>®</sup> 20
Detektionspuffer:	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH 9.5) (+20°C)

### **3.2 Expressionssystem *Xenopus laevis* Oozyten**

Für eukaryontische RNA eignen sich die Oozyten des Südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) hervorragend als Expressionssystem. Die exogene RNA wird dabei translatiert, posttranslational modifiziert und im Falle eines Membranproteins wird dieses in die Membran eingebaut. Durch funktionelle Untersuchungen kann das Protein nachgewiesen und charakterisiert werden.

#### **3.2.1 Behandlung und Injektion von Oozyten**

Die Frösche wurden in eiskalter MS 222-Lösung (3-Aminobenzoesäureethylestermethansulfat, 1 g/l in H<sub>2</sub>O) betäubt. Durch einen Bauchschnitt wurden den Tieren 1 bis 3 Ovarlappen entnommen. Die Oozyten wurden zweimal 90' mit Kollagenase Typ II (2 mg/ml in OR II-Medium, 331 U/mg) behandelt, um die Follikelschicht zu entfernen. Anschließend wurden sie jeweils fünfmal mit OR II und Barths'-Medium gewaschen. Nach ihren Reifestadien wurden sie unter dem Stereomikroskop (Wild M3Z; Heerbrugg) selektiert und in Barths'-Medium aufbewahrt. Über eine Kapillare aus Borosilikatglas wurden unter Verwendung eines Mikromanipulators 50 nl cRNA (0.2 µg/µl) (als Kontrolle 50 nl H<sub>2</sub>O) injiziert. Nach drei Tagen Inkubation in Barths'-Medium wurden die Oozyten funktionell untersucht.

### 3.2.2 Funktionelle Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oozyten

Die injizierten Oozyten können nach 3 Tagen Inkubationszeit auf zwei unterschiedliche Arten untersucht werden. Zum einen kann der Phosphattransport in die Oozyte direkt mit  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat durch Messung der Radioaktivität in den Oozyten ermittelt werden. Durch elektrophysiologische Analysen kann der Netto-Ladungstransport in die Zelle gemessen werden. Durch Kombination beider Methoden sind Aussagen über die Elektrogenität des Transporters möglich.

#### a) Radioaktive Transport-Messungen

Durch die Bestimmung der von den Oozyten aufgenommenen radioaktiv-markierten  $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat Menge wurde die Transportaktivität des  $\text{Na}^+$ /Phosphat-Kotransporters ermittelt. Die zu untersuchenden Oozyten wurden hierzu für 15' in 80  $\mu\text{l}$  Transportlösung inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung vollständig entfernt und die Zellen dreimal mit eiskalter Stop-Lösung gewaschen. Abschließend wurden die Oozyten vereinzelt mit 100  $\mu\text{l}$  10%igem SDS lysiert. Die aufgenommene  $^{32}\text{P}$ -Menge wurde im Szintillationszähler bestimmt.

#### Puffer

OR II-Medium:	82.5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES/Tris, (pH 7.5), (+20°C)
Barths' -Medium:	88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.4 mM $\text{NaHCO}_3$ , 0.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.41 mM $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES/Tris (pH 7.5), 40 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin
Transport-Lösung:	100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $\text{CaCl}_2$ , 1 mM $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES/Tris (pH 7.5), 0.5 mM KCl, 10 $\mu\text{Ci}$ $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat/ml
Stop-Lösung:	100 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $\text{CaCl}_2$ , 2 mM $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES/Tris (pH 7.5), 1 mM KCl,



## b) Elektrophysiologische Untersuchungen

Das Transportverhalten des Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransporters wurde mit Hilfe der zwei Elektroden Voltage-Clamp Technik charakterisiert.

Die cRNA des Transporters wurde in die Oozyten des *Xenopus laevis* injiziert und die entsprechenden Messungen nach 3-4 Tagen Inkubationszeit durchgeführt.

Je nach Fragestellung wurden entweder die Substratkonzentrationen oder das Haltepotential variiert. Die Mikroelektroden wurden aus Borosilikatglaskapillaren (Ø 1.5 mm) der Firma Clark Electromedical Instruments (Pangbourne, UK) mit einem "Kopf"-vertikal puller (Modell 700 C) der Firma David Kopf Instruments (Tujunga, CA, USA) gezogen und mit 3 M KCl gefüllt. Die Widerstände der Potential- und Stromelektrode lagen in einem Bereich von 1.5 bis 2.5 MΩ und zwischen 0.5 und 1.5 MΩ in der Kontroll-Lösung. Die Membranspannungen bewegten sich in einem Bereich von -40 bis -60 mV und die Zelleingangswiderstände variierten zwischen 0.8 und 1.5 mM.

Die Oozyten wurden in Frosch-Ringer's Lösung (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES) analysiert. Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7.5 eingestellt. Der Strom wurde mit 1 mM P<sub>i</sub> induziert. Bei niedrigen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen wurde die Osmolarität durch Hinzufügen von Cholin-Chlorid kompensiert.

### 3.2.3 Northern-Blot Analysen

Die Northern-Blot Analysen in dieser Arbeit wurden zur Detektion von NaPi-IIb1 cRNA in Oozyten des *Xenopus laevis* eingesetzt. Hierzu wurde nach der Inkubationszeit zunächst die mRNA der injizierten Oozyten mit Hilfe von Dynabeads der Firma Dynal (Hamburg) isoliert. Die so erhaltene mRNA enthielt ebenfalls die injizierte NaPi-IIb1 cRNA.

#### a) Präparation der mRNA aus Oozyten

Die Oozyten wurden mit jeweils NaPi-IIb1 cRNA alleine oder mit Antisense-cRNAs koinjiziert und nach drei Tagen die mRNA dieser Oozyten mit Hilfe von Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> (Dyna, Hamburg) isoliert. An diese Kügelchen, welche einen Durchmesser von 2.8 µM besitzen, ist eine Deoxythymidin-Kette aus 25 Nukleotiden gekoppelt. Dadurch ist eine Hybridisierung des Poly A-Schwanzes der mRNA möglich. Durch die paramagnetischen Eigenschaften der Dynabeads können diese mit einem Magnetständer in der jeweiligen Lösung gesammelt werden, wodurch eine sehr effektive Aufreinigung der mRNA möglich ist. Das vom Hersteller bereitgestellte Protokoll wurde in einigen Punkten modifiziert. Aus jeder Charge wurden jeweils 10 Oozyten in 300 µl "Lysis/Binding" Puffer mit einer Injektionsnadel (24G) lysiert. Das Lysat wurde 1' bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverarbeitung abpipettiert. Für jede Charge wurden 10 µl Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> konditioniert und mit dem Zell-Lysat vereinigt. Zur Hybridisierung der Oligo (dT)<sub>25</sub>-Einheiten der Dynabeads mit der mRNA wurde die Suspension aus Zell-Lysat und Dynabeads 10' in einem Ständer geschüttelt. Zum Sammeln der Dynabeads an der Gefäßwand wurden die Reaktionsgefäße 3' in einen Magnetständer gestellt und der Überstand verworfen. Nach dem Waschen mit jeweils 400 µl Wasch-Puffer (mit LiDs) (2x) und mit dem Wasch-Puffer (1x) wurde die mRNA im 1x RNA-Probenpuffer (10 µl) bei 70°C eluiert.

#### b) Transfer (Blotting) der mRNA

Die isolierte gesamte mRNA der Oozyten wurde mit einem denaturierenden Agarosegel (+Formaldehyd) längenfraktioniert. Das Gel wurde zur Entfernung des Formaldehyds zweimal 15' in 10×SSC geschwenkt und über Nacht bei RT in 10×SSC auf eine Nylonmembran (Roche Diagnostics) geblottet. Zur Fixierung der RNA auf die Membran wurde diese 30' bei 120°C inkubiert.

### c) Hybridisierung und Detektion

Die Detektion der cRNA auf dem Northern-Blot erfolgte mit Hilfe einer einzelsträngigen Digoxigenin-markierten RNA-Sonde, welche mit dem mMessage mMachine SP6-Kit der Firma Ambion (Wiesbaden) nach Herstellerangaben hergestellt wurde. Diese Sonde stammt von dem NaPi-IIb1-Klon in pSport und erkennt daher spezifisch die entsprechende cRNA von NaPi-IIb1.

Der Blot wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h mit 20 ml/100 cm<sup>2</sup> Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb Lösung der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) bei 56°C inkubiert. Diese Lösung wurde entfernt und durch die Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb Lösung Firma Roche Diagnostics, Mannheim) ersetzt, welche die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde (100 ng/ml) enthielt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 56°C. Während dieser Zeit hybridisierte die Sonde spezifisch mit der NaPi-IIb1 cRNA. Die Membran wurde anschließend jeweils 2× 15' mit 2×SSC + 0.1%SDS (bei RT) und 2× 15' mit 0.5×SSC + 0.1%SDS (56°C) gewaschen.

Für die Detektion der gesuchten cRNA wurde entsprechend wie bei einem Southern-Blot (Abschn. 3.1.11) der DIG-Detektions-Kit mit CSPD als Chemilumineszenzreagenz nach Herstellerangaben verwendet.

## 3.3 Immunologische Techniken

Zur Untersuchung der NaPi-IIb Proteinexpression im Zebrafisch wurden Antikörper gegen beide Isoformen hergestellt. Die Antikörper wurden im Oozyten Expressionssystem und in immunhistochemischen Untersuchungen von Zebrafisch-Gewebeschnitten eingesetzt.

### 3.3.1 Herstellung der Antikörper

Für jede Isoform wurde durch die Firma Eurogentec (Köln) ein Peptid aus dem entsprechenden C-terminalen Bereich des Proteins hergestellt und anschließend an KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) gekoppelt.

- |                                                       |                |          |
|-------------------------------------------------------|----------------|----------|
| a) NaPi-IIb1: (NH <sub>2</sub> -YDNPALGIEDEAKVT-COOH) | Peptid-Nummer: | EP980378 |
| b) NaPi-IIb2: (NH <sub>2</sub> -IIEPKKTVDSCILK-COOH)  | Peptid-Nummer: | EP980379 |

Durch Injektion dieser Peptide wurden jeweils zwei Kaninchen immunisiert, um Antikörper gegen das entsprechende Protein zu bilden. Die Kaninchen wurden nach folgendem Schema behandelt:

Tag 0	Präimmunserum-Entnahme 2 ml
Tag 7	1. Peptid-Injektion
Tag 14	2. Peptid-Injektion
Tag 28	3. Peptid-Injektion
Tag 35	1. Blutentnahme 20 ml
Tag 56	4. Peptid-Injektion
Tag 63	2. Blutentnahme 20 ml
Tag 98	Entbluten 50 ml

### 3.3.2 Immunhistochemie an Oozytenschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die Oozyten nach der von Terada et *al.* (1996) beschriebenen Methode präpariert. Anschließend erfolgte die Antikörperbehandlung nach einem modifizierten Protokoll von Custer et *al.* (1994).

Die Oozyten wurden mit entsprechender cRNA injiziert und nach 3 Tagen Expressionszeit 1 h in 3%iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS fixiert. Sie wurden mit 1×PBS gewaschen und anschließend mindestens 16 h bei 4°C in eine 30%ige Saccharose-Lösung in PBS gegeben. Bei -20°C wurde auf ein Korkplättchen schichtweise Tissue Tec<sup>®</sup> der Firma Science Services

(München) aufgetragen, die Oozyten in das erhärtende Material eingebettet und mit weiteren Schichten Tissue Tec<sup>®</sup> überschichtet. Es wurden von diesen Oozyten Gefrierschnitte von 8 µm angefertigt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10' mit Ziege-Normalserum inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen der Schnitte mit PBS wurden die Schnitte 1 h mit dem Erstantikörper, verdünnt in PBS mit 3%ig Bovine Serum Albumin und 1% Saponin, inkubiert.

Danach wurden die Schnitte für 1 h mit dem Cy3-markierten Zweitantikörper der Firma Dianova behandelt. Die Entfernung von überschüssigem, nicht gebundenen Antikörper erfolgte durch Waschen mit PBS. Um ein Abklingen der Fluoreszenz zu verhindern, wurden die Schnitte mit Anti-Bleichmittel behandelt und mit Deckgläsern fixiert.

Anti-Bleichmittel: 90% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) PBS, 1 mg p-Phenylendiamin/ml Glycerin/PBS-Gemisch

### 3.3.3 Fluoreszenzmikroskopie an Zebrafisch-Schnitten

Adulte (junge) weibliche Zebrafische wurden durch Dekapitation getötet. Nach 10 bis 15 minütiger Fixierung in der Fixierungslösung wurden die Fische 10' in 0.1 M Cacodylatpuffer (pH 7.5) gewaschen und sofort dehydriert. Hierzu wurden die Proben in je 25 ml der folgenden Lösungen wie folgt gewaschen:

2 × 30 min	50%	Ethanol
2 × 30 min	70%	Ethanol
2 × 30 min	90%	Ethanol
3 × 1 h	100%	Ethanol
1 × 30 min	Chloroform / Ethanol (1:1)	
3 × 30 min	Chloroform	
1 × 1h-ü.N.	Chloroform / Paraffin (1:1)	

Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet. An einem Rotationsmikrotom wurden Schnitte von 4 bis 10 µm Dicke angefertigt, welche zuerst entparaffiniert (2× Rotihistol 15') und anschließend rehydriert wurden (je 10 min: 100% (3×), 90%, 70%, 50% Ethanol und abschließend kurz in H<sub>2</sub>O). Die Schnitte wurden 5' in PBS, 10' in NH<sub>4</sub>Cl (0.5%) vorinkubiert. Zur

Blockierung wurde 45' Fisch Gelatine Mix (2% fetales Kälberserum, 2% BSA und 0.2% Fisch Gelatine 45% von Sigma in PBS) eingesetzt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte 1 h in Fisch Gelatine Mix (1:2000). Es wurde je 5' 1× mit High salt PBS (+1.8% NaCl.) und 2× mit PBS gewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte analog 1 h mit dem Cy3 gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) (1/200 in Fisch Gelatine Mix). Abschließend wurde erneut mit High Salt PBS und PBS gewaschen.

Zur Lokalisation bestimmter Tubulusabschnitte in der Niere wurden die Schnitte mit dem FITC gekoppelten Lektin Lens cullinaris agglutinin (Vector Laboratories Fluorescein-Lectin Kit II), welches 1/400 in PBS (+3% BSA) verdünnt war, 45' inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde zur Kernfärbung in einem letzten Inkubationsschritt 1 mg/ml DAPI (Sigma) zugesetzt. Die Präparate wurden mit dem Biomedica Gel mount (science services) eingedeckelt.

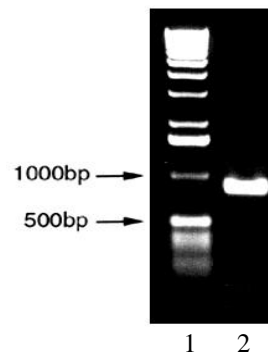
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Molekulare Charakterisierung der NaPi-IIb Isoform aus der Niere

Erst die vollständige Sequenzierung einer mRNA-Sequenz ermöglicht eine genauere Charakterisierung des entsprechenden Genprodukts. Mit Hilfe der PCR-Methode können jedoch die beiden Enden einer mRNA nicht sequenziert werden. Zur vollständigen Sequenzierung der in der Niere detektierten NaPi-IIb Isoform wurden daher 5'- und 3'-RACE Experimente durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden ausgehend von der bereits aus meiner Diplomarbeit bekannten mRNA-Sequenz spezifische Primer konstruiert.

#### 4.1.1 3'-RACE

Nach der reversen Transkription mit dem Oligo dT-Primer wurde die erste PCR mit dem genspezifischen Primer Kb3 und dem Anker-Primer pNot durchgeführt. Das Produkt dieser Reaktion wurde mit einem Agarosegel längenfractioniert. Das Ergebnis war nicht eindeutig, da in der erwarteten Größenordnung von etwa 1 kb (ausgehend von NaPi-IIb1) keine eindeutige Bande zu sehen war. Dennoch wurde dieser Gelabschnitt ausgeschnitten, die DNA aufgereinigt und in einer verschachtelten PCR eingesetzt. Diese zweite PCR wurde mit den Primern Kb4/pNot durchgeführt und führte zu einem eindeutigen Produkt von ca. 900 bp.

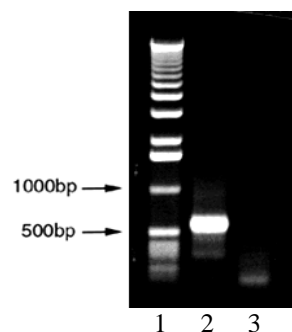


**Abb.5: 3'-Ende der NaPi-IIb2 Isoform nach verschachtelter PCR.** 1) 1 kb DNA-Standard, 2) PCR-Fragment Kb4/pNot.

Die DNA wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Primer Kb4 sequenziert. Die Sequenz zeigte eine große Homologie zu NaPi-IIb und überlappte mit dem ursprünglich bekannten Fragment. Ebenfalls konnten das Stop-Kodon und der Poly A-Schwanz lokalisiert werden.

#### 4.1.2 5'-RACE

Die 5'-RACE Experimente wurden mit Hilfe der Homopolymermethode durchgeführt (Abschn. 3.1.8b). Dabei wurde für die reverse Transkription der spezifische Primer KI-R verwendet. Die anschließende PCR nach der Homopolymerreaktion erfolgte mit jeweils dem RACE-Primer (AAP) und dem Primer KI-4. Bereits bei dieser PCR konnte ein Fragment amplifiziert werden, welches aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert wurde.

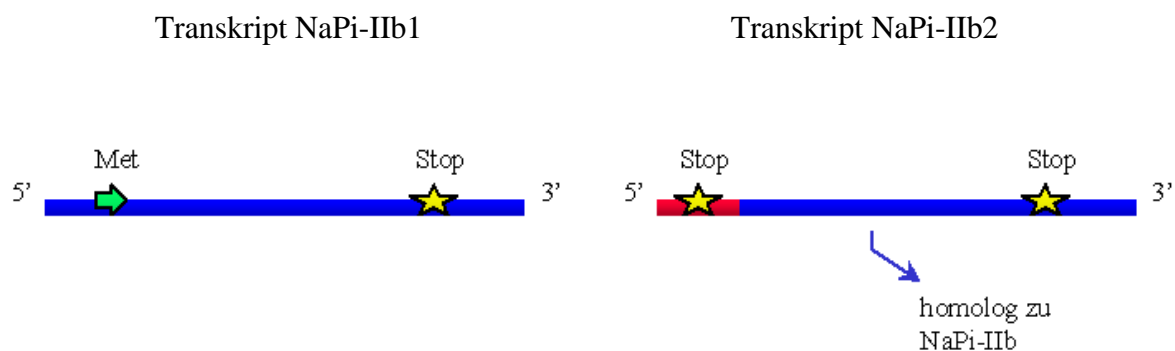


**Abb. 6: Das 5'-Ende der NaPi-IIb2 Isoform nach 5'-RACE.** 1) 1 kb DNA-Standard, 2) PCR-Fragment AAP/KI-4, 3) Kontrolle: ohne Enzym in der reversen Transkription



Ein Teil dieses Fragments ist homolog zu der anderen Isoform. Jedoch bricht diese Homologie abrupt ab. In dem NaPi-II Leserahmen enthält das Fragment kein Start-Kodon, jedoch taucht am 5'-Ende ein Stop-Kodon auf. Aufgrund dieses Befundes wurden weitere RACE Ansätze mit anderen Primern durchgeführt. Neben kürzeren Fragmenten und einem Amplikon mit einer kurzen Intron-Einheit wurde jedoch vorwiegend das erste RACE Fragment mit dem "Stop"-Kodon erhalten.

Das Zusammenfügen der 5'- und 3'-RACE Sequenzen mit dem bereits bekannten 1 kb Fragment ergab eine Gesamtsequenz der Länge 2053 bp (s. Anhang). Die folgende Abbildung zeigt schematisch diese Sequenz im Vergleich mit der Sequenz der bereits klonierten NaPi-IIb1 Isoform.



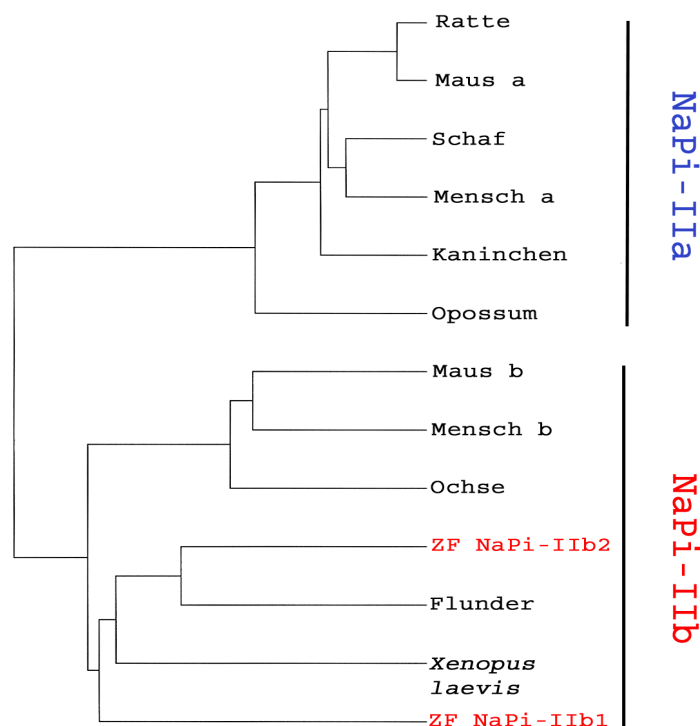
**Abb. 7: Molekulare Struktur der NaPi-IIb Isoformen im Zebrafisch.**

Die NaPi-IIb1 cDNA-Sequenz ist 2607 bp lang und kodiert beginnend an der Position 157 für ein Protein mit 631 Aminosäuren. Im Falle von NaPi-IIb2 wurden 2053 bp ermittelt, welche nach dem "Stop"-Kodon zu Beginn auf der Position 43 bp für 633 Aminosäuren kodieren. Aufgrund des Stop-Kodons am 5'-Ende wurden bei diesem Transkript keine weiteren RACE-Ansätze durchgeführt.

### 4.1.3 Sequenzvergleiche der NaPi-IIb Transkripte aus dem Zebrafisch

Im Folgenden werden die Sequenzen beider Zebrafisch-Isoformen mit den anderen NaPi-II Proteinen verglichen. Die Aminosäuresequenzen beider Transkripte aus dem Zebrafisch zeigen insgesamt große Ähnlichkeiten zu den anderen NaPi-II Transportern.

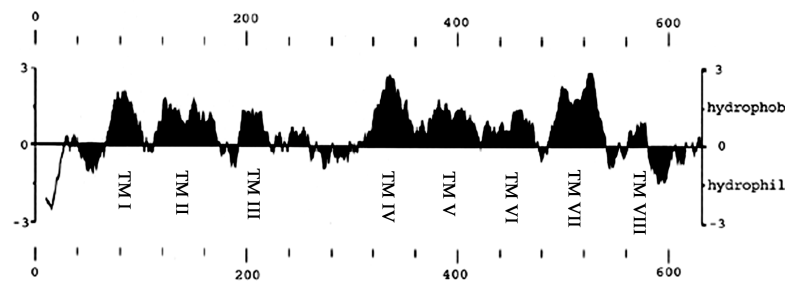
Auf der Grundlage von Ähnlichkeiten aller NaPi-II Proteine untereinander wurde mit Hilfe des Programms GCG Sequence Analysis Software Package (Madison, USA) eine Stammbaumanalyse durchgeführt. Die Berechnungen zeigen, daß die beiden Isoformen im Zebrafisch basierend auf der Homologie ihrer Sequenz in die Gruppe der NaPiIIb Transporter einzuordnen sind.



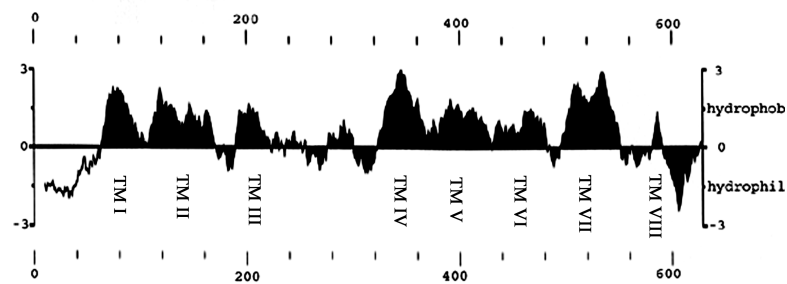
**Abb. 8: Stammbaumanalyse der NaPi-II Transporter.** Die Zebrafisch-Isoformen sind rot eingezeichnet und befinden sich mit den Typ IIb Transportern in einer Gruppe.

Auf der Grundlage der Hydrophobizitäten ihrer Peptidkette wurden mit Hilfe des Programms GCG Strukturvorhersagen der Zebrafisch Transkripte berechnet. Aus den daraus resultierenden Hydrophobizitätsplots können die Transmembrandomänen vorhergesagt werden.

### NaPi-IIb1



### NaPi-IIb2



**Abb. 9: Hydrophobizitätsplots der Zebrafisch NaPi-IIb Isoformen.** Die Transmembrandomänen sind eingezeichnet (TM). Bei NaPi-IIb2 wurde die Nukleotidsequenz im NaPi-IIb Leserahmen translatiert und zur Analyse herangezogen.

Wie bei den anderen elf in dieser Arbeit erwähnten NaPi-II Transportern werden bei beiden Hydrophobizitätsuntersuchungen acht Transmembrandomänen vorhergesagt und die N- und C-Termini der Proteinsequenzen als intrazellulär definiert.

Die Ergebnisse der Homologie- und Topologie-Analysen lassen somit den Schluß zu, daß die aus Zebrafisch-RNA isolierten Transkripte der NaPi-II Proteinfamilie zuzuordnen sind. Die bisherige Nomenklatur für die beiden Zebrafisch-Transkripte wird daher beibehalten und die aus dem Darm isolierte Isoform NaPi-IIb1 und die aus der Niere isolierte Isoform NaPi-IIb2 genannt.

## 4.2 Genomische Charakterisierung der Zebrafisch NaPi-IIb Transkripte

Die Sequenz eines Gens auf genomischer Ebene gibt ein detaillierteres Bild über die Struktur des mRNA-Transkripts. Im Kern wird die Primär RNA, die Kopie eines Gens, erstellt und in einem weiteren Schritt gespleißt. Dabei werden sogenannte Intron-Bereiche herausgeschnitten, sodaß die verbleibenden Exons in Form von mRNA im Cytosol die Matrize für das spätere Genprodukt darstellen.

Die genomische Organisation der bekannten NaPi-II Transkripte zeigt große strukturelle Ähnlichkeiten bezüglich Anzahl und Verteilung der Introns und Exons. So befindet sich bei allen untersuchten Spezies das Start-Kodon im zweiten und das Stop-Kodon im letzten Exon. Die genomischen Strukturen der beiden NaPi-IIb Isoformen des Zebrafisches waren ebenfalls von großem Interesse, weil ihre Nukleotidsequenzen auf cDNA-Ebene große Ähnlichkeiten besitzen. Durch einen Vergleich der beiden genomischen Strukturen im 5'-Bereich erhofften wir uns für die NaPi-IIb2 Isoform ein alternatives, funktionelles 5'-Ende zu finden, welches kein Stop-Kodon aufweist.

Hierzu wurden für jeden Suchdurchgang jeweils  $1.8 \times 10^5$  Klone einer  $\lambda$  EMBL 3 genomischen Bank (Clontech) aus Zebrafisch DNA mit Digoxigenin-markierten cDNA-Sonden der entsprechenden Isoform durchsucht. Bei der Suche nach genomischen NaPi-IIb1 Klonen wurden Digoxigenin-markierte Sonden mit den Primerpaaren ZFSacI/PNI-1, PNII-1/ZFNsiI und PNII-3/ZFendrück hergestellt. Die Lage der Sonden ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

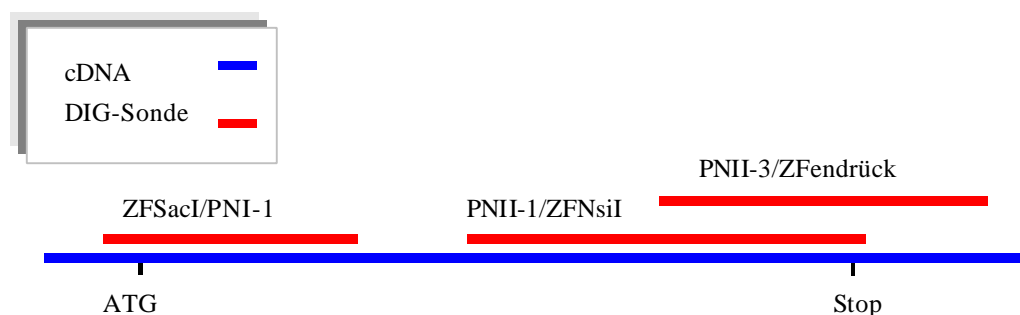
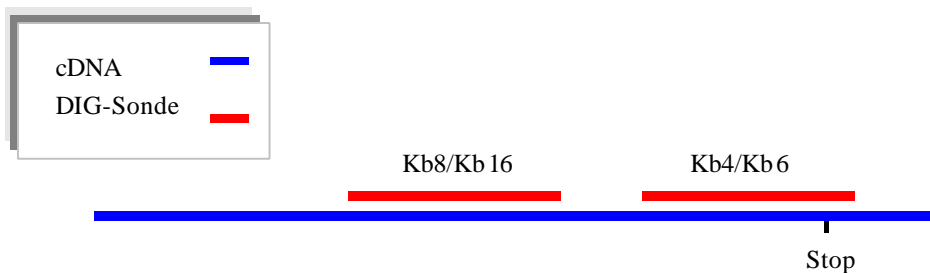


Abb. 10: Schematische Darstellung der NaPi-IIb1 Sonden auf der cDNA.

Die Sonden decken insgesamt 2347 bp auf der cDNA-Sequenz des NaPi-IIb1 Transkripts ab. Bei zwei unterschiedlichen Ansätzen wurden die  $\lambda$ -Klone 1A<sub>2</sub> und 2a<sub>2</sub> isoliert.

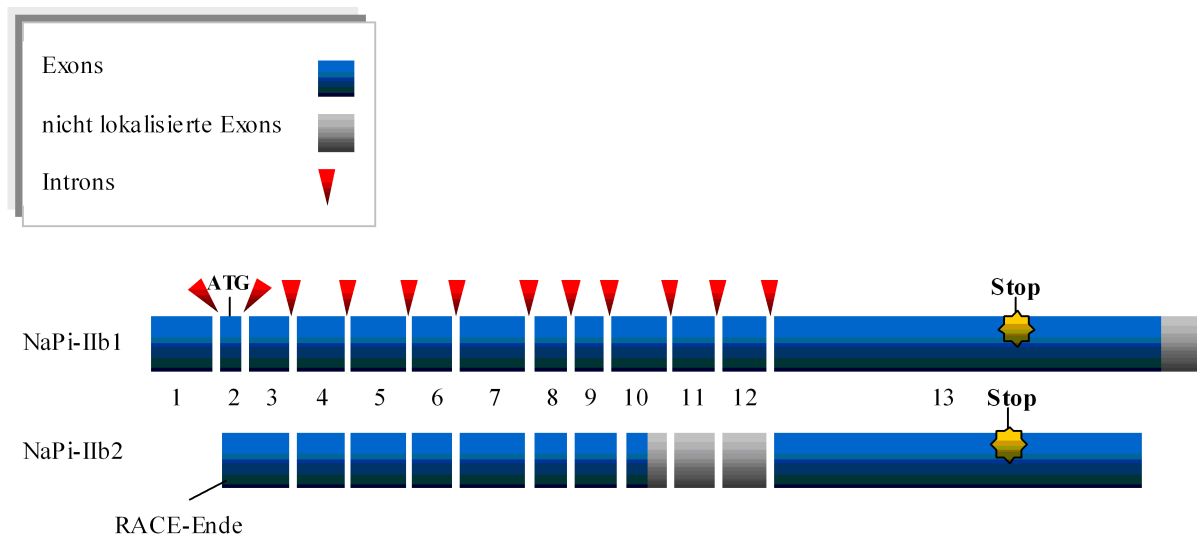
Für die Suche nach genomischen Klonen von NaPi-IIb2 wurden die Primerpaare Kb8/Kb16 und Kb4/Kb6 zur Herstellung von Sonden verwendet. Auf der NaPi-IIb2 cDNA decken beide Sonden insgesamt 1138 bp ab.



**Abb. 11: Schematische Darstellung der NaPi-IIb2 Sonden auf der cDNA.**

Mit Hilfe dieser Sonden wurden bei NaPi-IIb2 wurden die Klone E1.3 und B1.1 isoliert und sequenziert.

Die Sequenzierung der isolierten Klone wurde mit Hilfe der Primer-Walking-Methode ausgehend von bereits bekannten cDNA-Bereichen sequenziert. Als Matrize für die Sequenzierungsreaktionen diente der jeweilige Klon oder aus den Klonen amplifizierte PCR-Fragmente. Die Primer, welche für die Sequenzierung der vier isolierten Klone herangezogen wurden, sind im Anhang aufgelistet. Die Sequenzierung der Klone ermöglichte es durch Vergleich mit der cDNA-Sequenz, Exon-Bereiche auf der entsprechenden genomischen DNA festzulegen. Abbildung 12 gibt zusammenfassend die Exonverteilung für beide Transkripte wieder.

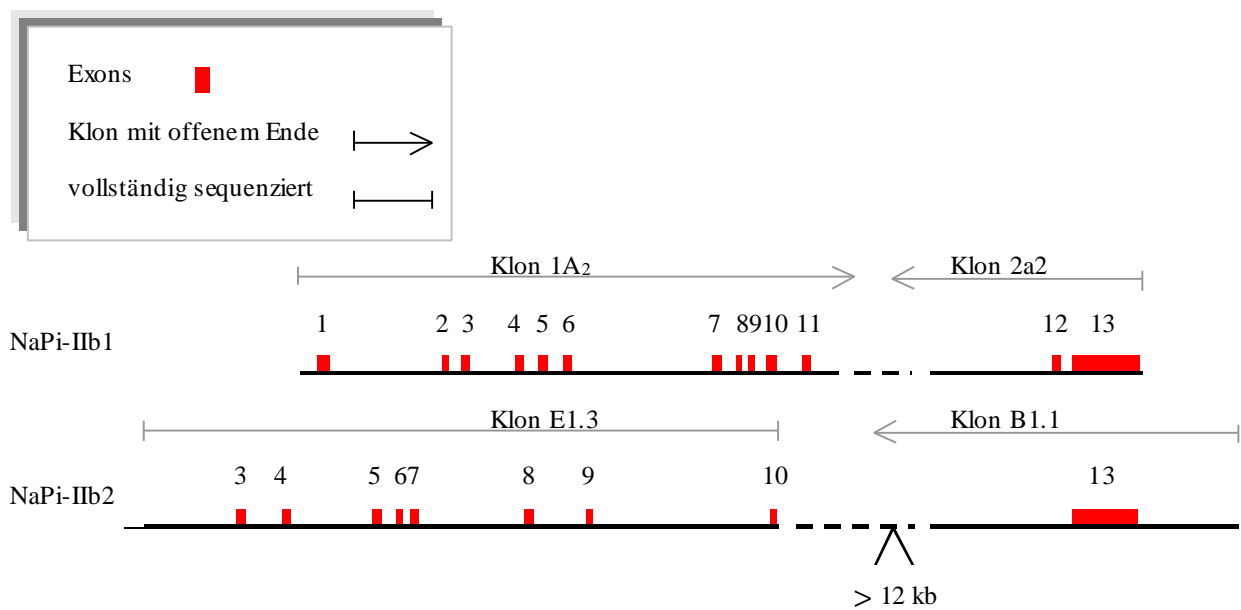


**Abb. 12: Schematische Darstellung der Exongrenzen auf cDNA-Ebene.** Die graue Markierung zeigt die cDNA-Abschnitte, welche auf den vorliegenden genomischen Klonen nicht vorhanden waren.

Bei NaPi-IIb1 konnten, bis auf einen Teil des letzten (Exon 13, grau), alle Exons auf der cDNA lokalisiert werden. Die mRNA ist aus 13 Exons aufgebaut, wobei das ATG im Exon 2 und das Stop-Kodon im Exon 13 zu finden sind. Diese Befunde entsprechen der mRNA-Struktur der anderen auf genomischer Ebene untersuchten NaPi-II Proteine.

Im Falle von NaPi-IIb2 zeigt die Analyse der  $\lambda$ -Klone die große Ähnlichkeit der Zebrafisch NaPi-IIb Transkripte in ihrem mRNA-Aufbau. Die Exons 4-13 der NaPi-IIb2 Isoform zeigen die gleiche Größe und Organisation wie bei NaPi-IIb1. Auffällig ist, daß sich das Stop-Kodon auch hier im Exon 13 befindet.

Zur Veranschaulichung der genomischen Organisation wurden in der folgenden Abbildung die Intron/Exon-Sequenzen im gleichen Maßstab eingezeichnet. Obwohl auf mRNA-Ebene offensichtlich eine ähnliche Organisation vorhanden ist, zeigt der Vergleich der genomischen Loci einen Unterschied zwischen den beiden Isoformen.



**Abb. 13: Die genomische Organisation der Zebrafisch NaPi-IIb Isoformen.**

Aufgrund der Homologie, wurde die Numerierung der Exons bei NaPi-IIb1 für NaPi-IIb2 übernommen. Der Klon 1A<sub>2</sub> (NaPi-IIb1) enthält die Exons 1 bis 11, während Klon 2a<sub>2</sub> (NaPi-IIb1) die Exons 12 und 13 enthielt. Exon 11 wird von Exon 12 durch ein Intron getrennt, welches mindestens >5 kb lang ist. Die NaPi-IIb2 Klone enthalten die Exons 3 bis 10 (E1.3) bzw. 13 (B1.1). Obwohl der Klon B.1.1 insgesamt >16 kb groß ist, wurde hierbei trotz mehrerer PCR-Ansätze außer Exon 13 kein weiterer cDNA Abschnitt amplifiziert. Das bedeutet, daß sich die Exons 11 und 12 nicht auf dem Klon B1.1 befinden. Unter Berücksichtigung dieses Befundes ist insgesamt auffällig, daß NaPi-IIb2 eine Tendenz zu größeren Introns besitzt, während die Exons von NaPi-IIb1 wesentlich komprimierter lokalisiert sind.

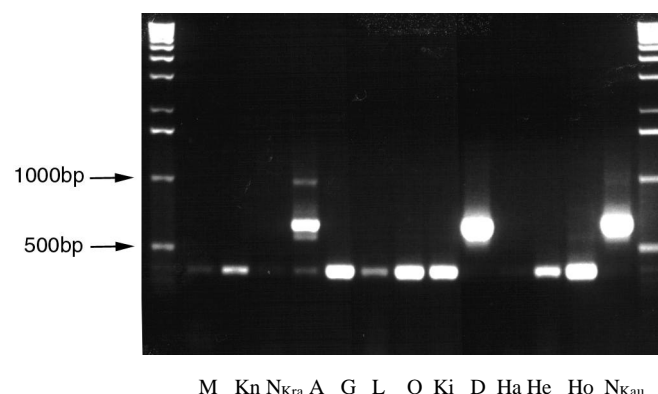
### 4.3 Gewebeverteilung und Expression der NaPi-IIb Transkripte im Zebrafisch

In diesem Abschnitt wird die Verteilung der beiden Zebrafisch NaPi-IIb Isoformen sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene vorgestellt. Ausgehend von den Nukleotidsequenzen konnten für eine RT-PCR Analyse für jede Isoform Primer konstruiert werden, mit deren Hilfe die Expression der mRNA in verschiedenen Geweben untersucht wurde. Die Proteinexpression wurde immunhistochemisch mit Hilfe von Zebrafisch-Gewebeschnitten analysiert.

#### 4.3.1 Analyse der mRNA-Expression durch RT-PCR

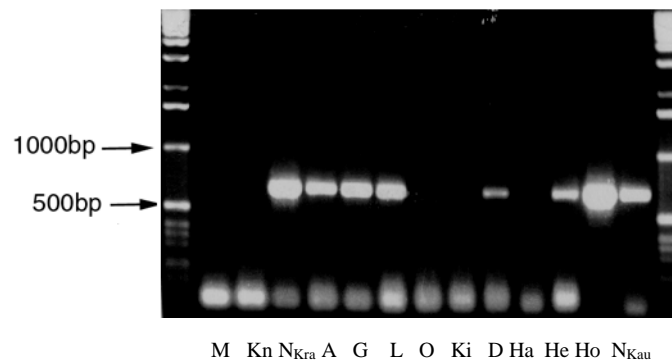
Zur Untersuchung der Gewebeverteilung der mRNA wurden RT-PCR Versuche mit totaler RNA aus verschiedenen Zebrafisch-Geweben durchgeführt. Hierzu wurden spezifische Primer für NaPi-IIb1 (PNII-5/PNII-6) oder NaPi-IIb2 (Kb12/Kb13) eingesetzt, mit denen nur das entsprechende Transkript amplifiziert wurde (Abb. 14a, 14b). Mit totaler RNA aus den unten aufgeführten Geweben wurde zuerst eine reverse Transkription mit einem Oligo dT-Primer durchgeführt. Anschließend wurde die PCR mit der jeweiligen Primerkombination nachgeschaltet.

##### a) Gewebeverteilung NaPi-IIb1





## b) Gewebeverteilung NaPi-IIb2

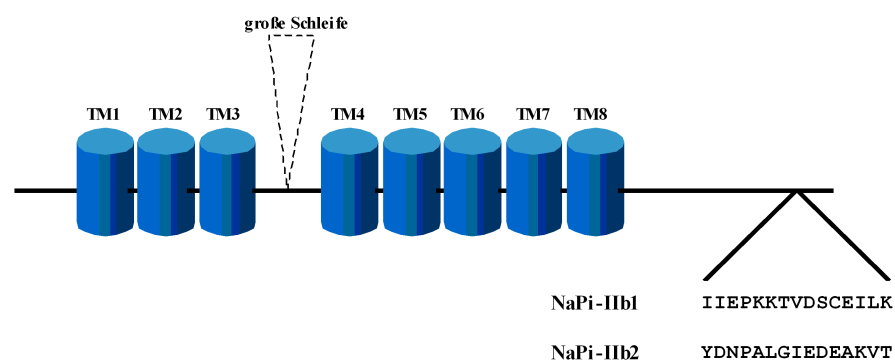


**Abb. 14: RT-PCR Untersuchungen zum Nachweis der zwei NaPi-IIb Isoformen im Zebrafisch.** a) NaPi-IIb1  
 b) aPi-IIb2. Für die reverse Transkription wurden jeweils 0.5 µg totale RNA verwendet und die Hälfte in der folgenden PCR mit jeweils spezifischen Primern für NaPi-IIb1 und NaPi-IIb2 eingesetzt. Die Spezifität der Banden wurde mit Hilfe eines Southern-Blots bestätigt (nicht gezeigt). M = Muskel, Kn = Knochen, N<sub>Kra</sub> = Niere-Kranial, A = Augen, G = Gehirn, L = Leber, O = Ovar, Ki = Kiemen, D = Darm, Ha = Haut, He = Herz, Ho = Hoden, N<sub>Kau</sub> = Niere-Kaudal.

Die Abbildungen geben für die beiden Isoformen ein unterschiedliches Bild. Im Falle von NaPi-IIb1 wird im Darm, in der Niere und in Augen ein deutliches Signal auf der erwarteten Höhe von 600 bp detektiert. Im Gegensatz zu NaPi-IIb1 zeigt die mRNA von NaPi-IIb2 eine sehr viel breitere Expression. Das untersuchte NaPi-IIb2 Fragment aus dem 3'-Bereich wurde in Niere, Augen, Gehirn, Leber, Darm, Herz, Hoden und schwächer in Ovar und Kiemen amplifiziert. Bei NaPi-IIb1 fällt ein kürzeres Fragment auf, welches fast ausschließlich in den Organen detektiert wird, in denen das erwartete (600 bp-Fragment) des NaPi-IIb1 nicht oder nur in sehr geringer Menge amplifiziert wird. Auf dieses Fragment wird in einem späteren Abschnitt näher eingegangen (Abschn. 4.5).

### 4.3.2 Analyse der Protein-Expression durch Immunhistochemie

Mit Hilfe der immunhistochemischen Untersuchungen von Zebrafisch-Gewebeschnitten sollte die Expression der beiden Zebrafisch NaPi-IIb Proteine in den einzelnen Zebrafisch-Organen untersucht werden. Für immunhistochemische Untersuchungen sind Antikörper erforderlich, welche die Epitope der untersuchten Proteine erkennen. Zur Herstellung der Peptid-Antikörper gegen beide NaPi-IIb Proteine wurden Sequenzabschnitte im jeweiligen C-terminalen Bereich ausgesucht. Durch Sequenzvergleiche untereinander und mit anderen NaPi-II Transportern wurden homologe Abschnitte ausgeschlossen, um Kreuzreaktivitäten zu verhindern. Die Peptid-Sequenzen, welche als geeignete Epitope ausgesucht wurden, sind in der folgenden Skizze dargestellt.

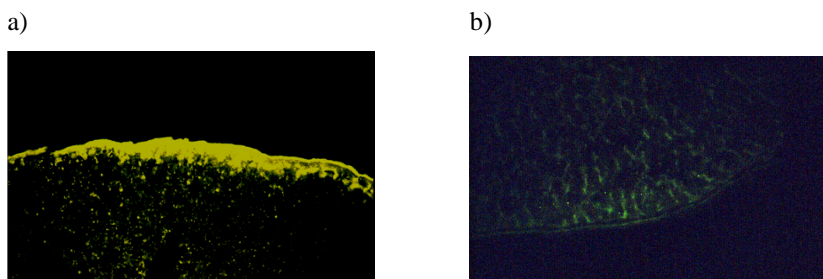


**Abb. 15: Position der Antigene für die Zebrafisch Isoformen.** Die Epitope beider Proteine sind in derselben Region lokalisiert, zeigen jedoch keine Homologie zueinander.

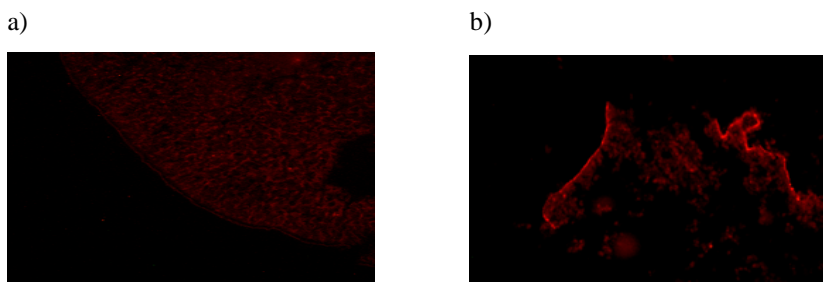
Diese Peptide enthalten zahlreiche geladene Aminosäuren, welche günstige Voraussetzungen für eine hochaffine Bindung des Antikörpers schaffen. Ein C-terminales Cystein wurde zur Kopplung an das Trägerprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) angefügt. Für die Antikörperbildung wurden je Peptid zwei Kaninchen mit dem entsprechenden Antigen immunisiert.

### a) Charakterisierung der Antikörper

Vor den immunhistochemischen Analysen wurden die Antiseren mit Hilfe des Oozyten Expressionssystems auf Kreuzreaktivität getestet. Das jeweilige Epitop wurde hierzu in Oozyten exprimiert und die entsprechenden Gefrierschnitte wurden mit dem Antiserum für NaPi-IIb1 oder NaPi-IIb2 inkubiert. Da NaPi-IIb1 bereits kloniert war, mußte bei diesem Transkript lediglich die entsprechende cRNA in die Oozyten injiziert werden. Die Expression des zweiten Epitops wurde durch Fusion des C-terminalen Abschnitts von NaPi-IIb2 an den Flunder NaPi-IIb möglich.



**Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis der Spezifität des Antiserums gegen NaPi-IIb1 in Oozyten.** NaPi-IIb1 wurde in Oozyten exprimiert. a) Antiserum gegen NaPi-IIb1 (1/2000 verdünnt), b) Antiserum gegen NaPi-IIb2 (1/2000 verdünnt). Sekundärer Antikörper: Cy3 (rot, 1/400 verdünnt), Vergrößerung: 400×.



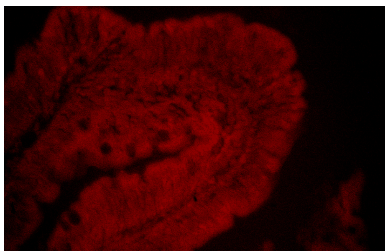
**Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis der Spezifität des Antiserums gegen NaPi-IIb2 in Oozyten.** Das entsprechende Epitop aus NaPi-IIb2 wurde mit Flunder NaPi-IIb fusioniert und in Oozyten exprimiert. a) Antiserum gegen NaPi-IIb1 (1/2000 verdünnt) b) Antiserum gegen NaPi-IIb2 (1/2000 verdünnt). Sekundärer Antikörper Cy3 (rot, 1/400 verdünnt). Vergrößerung: 400×

Die Antiseren gegen die beiden NaPi-IIb Isoformen zeigen auf Oozyten Gefrierschnitten keine Kreuzreaktivität. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, zeigt das Antiserum gegen NaPi-IIb1 ausschließlich gegen das entsprechende Epitop eine positive Reaktion. Das zweite Antiserum reagiert ebenfalls nur mit dem zugehörigen Epitop der Isoform NaPi-IIb2 (Abb. 17). Die Präimmunseren sind jeweils negativ (nicht gezeigt).

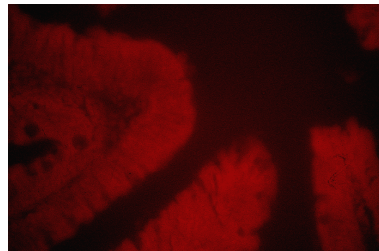
### **b) Immunhistochemie an Gewebeschnitten**

Zur Lokalisierung der beiden NaPi-IIb Proteine im Zebrafisch wurden Zebrafisch-Gewebeschnitte mit dem entsprechenden Antiserum untersucht. Aus den folgenden Abbildungen wird die Expression der beiden Proteine in Darm, Niere und Leber gezeigt. Beide Präimmunseren zeigten auf parallelen Gewebeschnitten jeweils keine unspezifischen Signale.

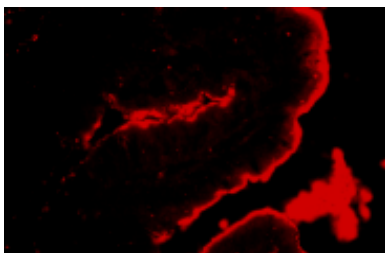
**Darm** a) Präimmunserum/NaPi-IIb1



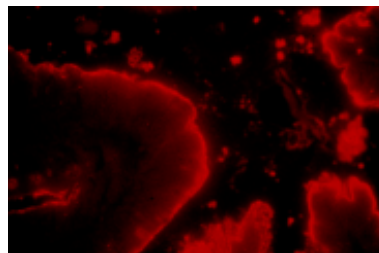
b) Präimmunserum/NaPi-IIb2



c) Antiserum gegen NaPi-IIb1



d) Antiserum gegen NaPi-IIb2



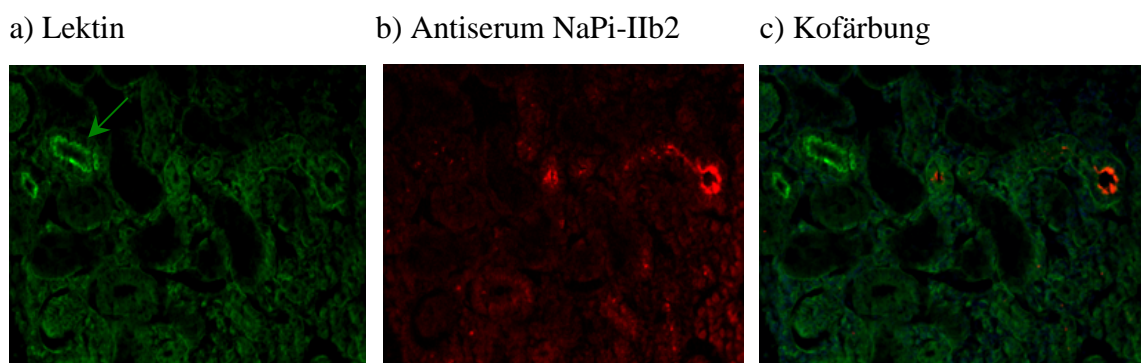
**Abb. 18: Immunhistochemische Schnitte vom Zebrafisch, Darm-Region (Paraffinschnitte).** Inkubation mit den a) Präimmunserum NaPi-IIb1, b) Präimmunserum NaPi-IIb2, c) Antiserum gegen NaPi-IIb1 (1/2000 verdünnt) und d) Antiserum gegen NaPi-IIb2 (1/2000 verdünnt). Die Detektion erfolgte mit einem anti-Kaninchen Cy3, 1/2000 verdünnt-532 nm), Vergrößerung: 400×.

In Abbildung 18 sind Darm-Zotten des Zebrafisches dargestellt, welche mit den spezifischen Antiseren gegen die NaPi-IIb Isoformen behandelt wurden. In beiden Fällen befindet sich das positive Signal auf der apikalen, also dem Lumen zugewandten, Seite der Epithelzellen.

## Niere

Die Nieren-Tubuli sind aus unterschiedlichen Segmenten aufgebaut, in denen die Proteinexpression variieren kann. Durch die Färbung mit Lektinen, können einige dieser Bereiche identifiziert werden. Dadurch ist die bessere Lokalisierung der untersuchten Proteine möglich. Histologische Untersuchungen zeigten, daß das Lektin LCA beim Zebrafisch im proximalen Tubulus der Niere die Zellen des P1 Abschnitts apikal anfärbt. Die hier untersuchten Gewebeschnitte wurden daher zusätzlich mit dem Lektin LCA angefärbt, um die Lokalisation der beiden NaPi-IIb Isoformen in der Niere enger einzugrenzen.

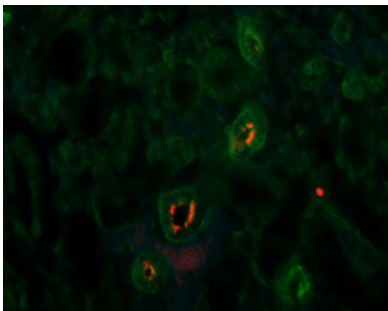
Abbildung 19 zeigt die Färbung eines Nierenschnitts sowohl mit dem Lektin LCA als auch mit dem Antiserum gegen NaPi-IIb2.



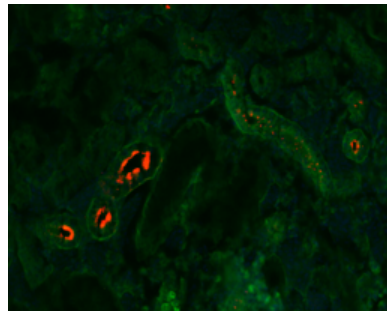
**Abb. 19: Färbung von Zebrafisch-Nierenschnitten.** Durch die Lektinfärbung der Schnitte wurden die P1 Regionen des proximalen Tubulus ermittelt. Für diese Färbung wurde LCA verwendet. a) Lektinfärbung (grün) b) Färbung mit dem Antiserum gegen NaPi-IIb2 (rot). c) Kofärbung mit Lektin und Antiserum. Vergrößerung: 400×.

Die apikal gefärbten Abschnitte (Pfeil) in 19a) stellen P1 Segmente des proximalen Tubulus dar. Durch die Kofärbung mit dem entsprechenden spezifischen Antiserum (hier: gegen NaPi-IIb2) kann untersucht werden, ob der entsprechende Transporter im P1 Segment exprimiert wird. Es ist deutlich zu erkennen, daß das positive Signal des Antiserums nicht mit dem P1 Signal des Lektin kolokalisiert ist.

a) Antiserum gegen NaPi-IIb1



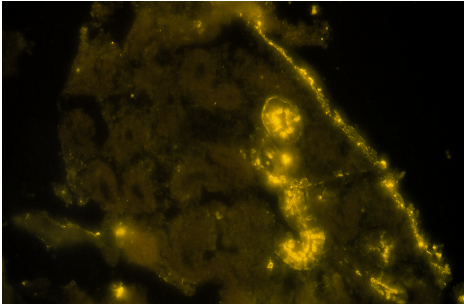
b) Antiserum gegen NaPi-IIb2



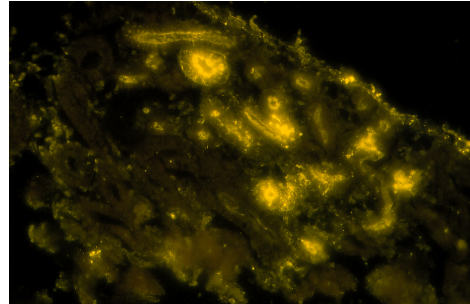
**Abb. 20: Immunhistochemische Schnitte von Zebrafisch-Nieren (Paraffinschnitte).** Inkubation mit einem Antikörper gegen a) NaPi-IIb1 (1/2000 verdünnt) und b) NaPi-IIb2 (1/2000 verdünnt). Die Detektion erfolgte mit einem anti-Kaninchen Cy3 (rot, 1/400 verdünnt, 532 nm), Vergrößerung: 400×, Kofärbung mit Lektin LCA (grün).

Die Abbildungen 20a und 20b zeigen, daß beide Antikörper Tubulusbereiche anfärben, welche nicht P1 Segmente darstellen. Das bedeutet, daß weder NaPi-IIb1 noch NaPi-IIb2 in diesen Abschnitten lokalisiert ist. Vielmehr ist zu erkennen, daß beide Proteine in distalen Tubulusabschnitten in apikalen Zellbereichen angereichert sind. Darüber hinaus zeigen Übersichtsaufnahmen dieser Bereiche (Abb. 21a, 21b), daß der Antikörper gegen NaPi-IIb2 mehr Tubulusabschnitte anfärbt als der Antikörper gegen NaPi-IIb1.

a) Antiserum gegen NaPi-IIb1



b) Antiserum gegen NaPi-IIb2

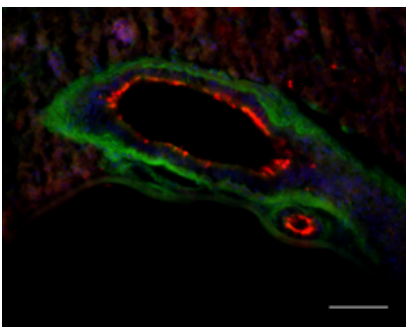


**Abb. 21: Übersichtsaufnahme der Zebrafisch Niere.** Inkubation mit einem Antikörper gegen a) NaPi-IIb1 (1/2000 verdünnt) und b) NaPi-IIb2 (1/2000 verdünnt). Die Detektion erfolgte mit einem anti-Kaninchen Cy3 (gelb), 1/400 verdünnt, Vergrößerung: 100×.

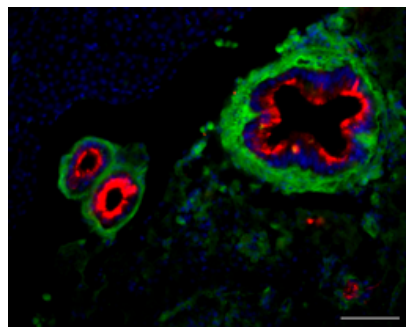
## Leber

Beide Antikörper zeigten neben der Darm- und Nieren-Färbung eine positive Reaktion in bestimmten Regionen der Leber. Abbildung 22 zeigt die Expression der NaPi-IIb Isoformen in den Gallengängen der Leber.

a) Antiserum gegen NaPi-IIb1



b) Antiserum gegen NaPi-IIb2



**Abb. 22: Immunhistochemische Schnitte der Zebrafisch-Leber (Paraffinschnitte).** Inkubation mit einem Antikörper gegen a) NaPi-IIb1 (1/2000 verdünnt) und b) NaPi-IIb2 (1/2000 verdünnt). Die Detektion erfolgte mit einem anti-Kaninchen Cy3, 1/400 verdünnt-532 nm, Vergrößerung: 400×, Kofärbung von NaPi-II, mit DAPI (Zellkerne, blau) und mit Lektin LCA (grün).

Die Befunde der Immunhistochemie zeigen zusammenfassend, daß beide Antikörper im Darm, in der Niere und in den Gallengängen der Leber exprimiert werden und dort jeweils apikal lokalisiert sind. Das Antiserum gegen NaPi-IIb2 zeigt in der Niere eine breitere Expression als NaPi-IIb1.



#### 4.4 Funktionelle Charakterisierung von NaPi-IIb1

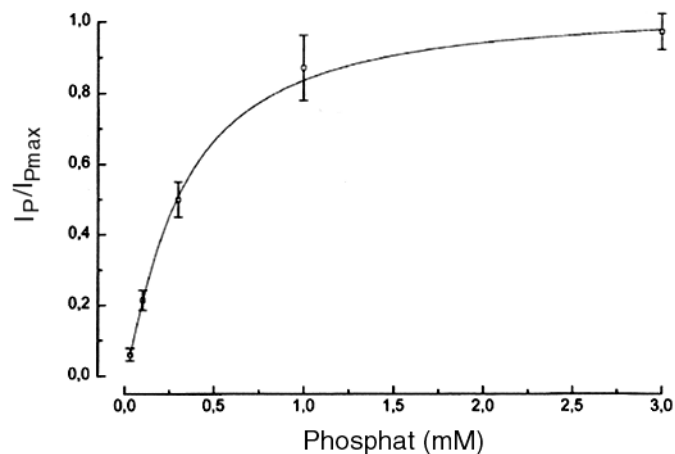
Zur Charakterisierung eines Transporters sind definierte Transportcharakteristika von Interesse. So definieren die Affinitäten zu Phosphat und Natrium NaPi-II eindeutig als einen Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransporter. Desweiteren sind die Stöchiometrie des Transports und die Elektrogenität des Transporters signifikante Charakteristika.

Die funktionelle Charakterisierung des in meiner Diplomarbeit klonierten NaPi-IIb1 erfolgte im *Xenopus laevis* Oozyten-Expressionssystem mit Hilfe der zwei Elektroden Voltage-Clamp Technik.

Die cRNA dieses Transkripts wurde *in vitro* transkribiert und in die Oozyten des *Xenopus laevis* injiziert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Oozyten bei -60 mV in Frosch Ringer Lösung mit 96 mM Na<sup>+</sup> geklemmt. Der Strom ( $I_p$ ) wurde durch 1 mM P<sub>i</sub> in der Superfusionslösung induziert. Bei diesen Bedingungen wurden in Abhängigkeit von der injizierten cRNA-Menge und der Inkubationszeit Einwärtsströme zwischen 0.1 bis 0.5 µA beobachtet. Die Standardbedingungen wurden in Abhängigkeit von der gegebenen Fragestellung verändert.

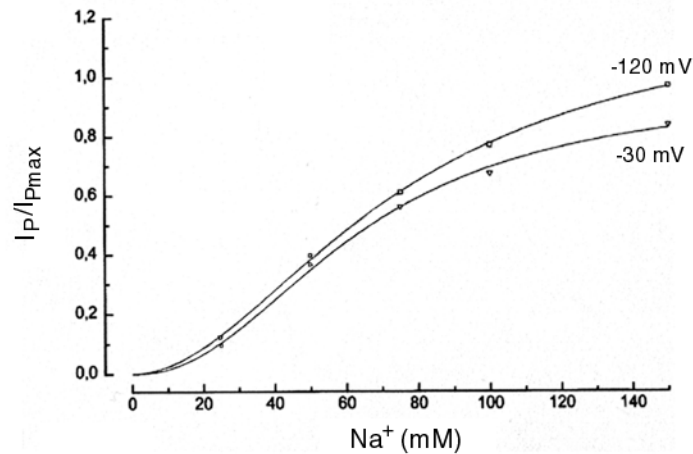
#### 4.4.1 Bestimmung der Substrataffinitäten

Die Substrataffinitäten wurden bei einem Haltepotential von  $-60$  mV durch Variation der  $\text{Na}^+$  oder  $\text{P}_i$ -Konzentration im Superfusat (pH 7.5) bestimmt. Für Phosphat konnte ein  $K_m$ -Wert von  $250 \mu\text{M}$  ermittelt werden.



**Abb. 23: Die Abhängigkeit des Einwärtsstroms ( $I_P$ ) von der Phosphat-Konzentration.** Es wurden  $\text{P}_i$ -Konzentrationen bis 3 mM eingesetzt und die einzelnen Werte mit dem Maximalstrom bei 3 mM  $\text{P}_i$  normalisiert. Die Kurve wurde mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung gefittet. Es resultierte ein  $K_m$ -Wert von  $250 \mu\text{M}$ .  $n = 9$  Oozyten.

Die Abhängigkeit des Einwärtsstroms von der Natrium-Konzentration in der Superfusionslösung wird in der folgenden Abbildung gezeigt. Aufgrund der Tatsache, daß der Transport bei den anderen  $\text{NaPi-II}$  Proteinen eine ausgeprägte Abhängigkeit von der angelegten Membranspannung zeigt, wurden die Messungen bei unterschiedlichen Haltepotentialen durchgeführt. Es wurde bei den Potentialen  $-30$ ,  $-60$ ,  $-90$  und  $-120$  mV gemessen, wobei hier nur die Werte bei  $-30$  mV und  $-120$  mV im Diagramm aufgetragen sind.



**Abb. 24: Der Einwärtsstrom ( $I_p$ ) in Abhängigkeit von der extrazellulären Natrium-Konzentration.** Der jeweilige Einwärtsstrom bei den Haltepotentialen  $-120$  mV und  $-30$  mV wurde gemessen und die entsprechenden  $K_m$ -Werte und Hill-Koeffizienten berechnet. Die Normierung der Werte wurde mit dem bei  $-120$  mV und  $150$  mM  $\text{Na}^+$  gemessenen Strom durchgeführt.  $n = 14$  Oozyten.

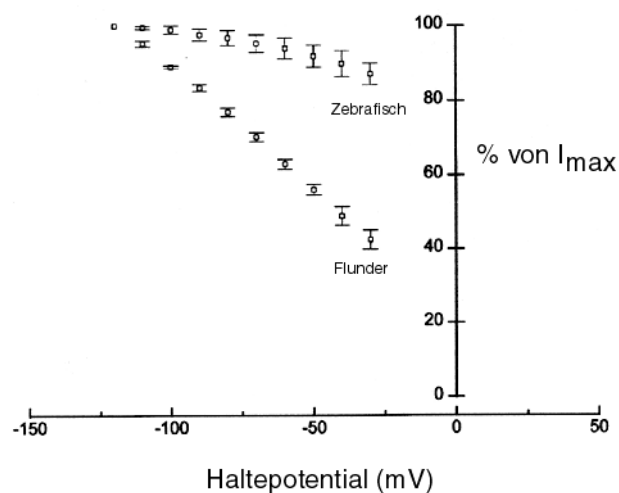
**Tabelle 1:  $K_m$ -Werte und Hill-Koeffizienten für Natrium in Abhängigkeit von dem Haltepotential.**

Haltepotential	$K_m$	Hill-Koeffizient
$-120$ mV	$74.3 \pm 4.0$ mM	$2.0 \pm 0.1$
$-90$ mV	$69.8 \pm 4.4$ mM	$2.1 \pm 0.2$
$-60$ mV	$67.1 \pm 5.3$ mM	$2.1 \pm 0.2$
$-30$ mV	$63.8 \pm 5.5$ mM	$2.2 \pm 0.3$

Auffällig bei diesem Experiment ist, daß die gemessenen Ströme und die Affinität für Natrium im Gegensatz zu bisher untersuchten NaPi-II Isoformen eine sehr schwache Spannungsabhängigkeit zeigen. Um eventuelle experimentelle Artefakte bei diesen Messungen mit Zebrafisch NaPi-IIb1 auszuschließen, wurde die Spannungsabhängigkeit der Ströme beim Zebrafisch NaPi-IIb1 und beim NaPi-IIb aus der Flunder unter identischen Versuchsbedingungen ermittelt.

#### 4.4.2 Strom-Spannungs Abhängigkeit des Einwärtsstroms ( $I_P$ )

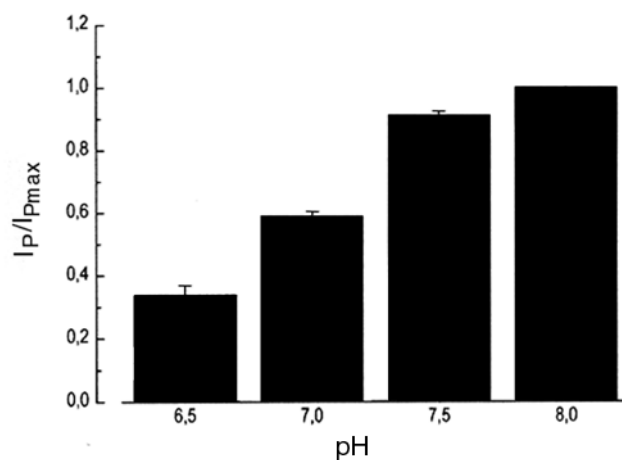
Bei diesem Versuchsansatz wurden die Haltepotentiale in einem Bereich von -120 mV bis -30 mV variiert und die dabei resultierenden Einwärtsströme gemessen. In einem Parallelansatz wurde der NaPi-IIb Transporter aus der Flunder untersucht. Bei dem Flunder NaPi-IIb ist eine deutliche Spannungsabhängigkeit des Einwärtsstroms zu beobachten. Je kleiner die Membranspannung ist, um so geringer ist der Einwärtsstrom. Im Gegensatz dazu zeigt NaPi-IIb1 diesen Effekt lediglich in einer vernachlässigbaren Größenordnung. Der Transport und der entsprechende resultierende Einwärtsstrom ist nahezu unabhängig von der angelegten Membranspannung.



**Abb. 25: Strom-Spannungsabhängigkeit des Einwärtsstroms ( $I_P$ ) im Vergleich zu Flunder NaPi-II.** Das Haltepotential wurde in einem Bereich von -120 mV bis -30 mV verändert und die Ströme registriert. Die Werte wurden auf den Maximalstrom bei -120 mV normalisiert.

#### 4.4.3 Bestimmung der pH-Abhängigkeit

Die pH-Abhängigkeit des  $P_i$ -Transports durch NaPi-IIb1 wurde durch Variation des pH-Wertes im Superfusat ermittelt. Wie in Abbildung 26 gezeigt, ist mit steigendem pH-Wert ebenfalls ein erhöhter  $P_i$  induzierter Strom festzustellen.



**Abb. 26: pH-Abhängigkeit des Transports durch NaPi-IIb1.** Nach der Einstellung des Gleichgewichtes wurde von der Standardinkubationslösung auf die jeweiligen Lösungen mit dem entsprechenden pH-Wert umgeschaltet. Die resultierenden Einwärtsströme wurden auf den Maximalstrom bei pH 8 normalisiert. n=3 Oozytenchargen für jeden pH-Wert.

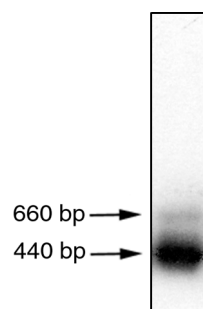
## 4.5 Antisense-Transkripte des NaPi-IIb1

Bei der Analyse der Gewebeverteilung von NaPi-IIb1 (Abschn. 4.3.1a) wurde in derselben RT-PCR ein verkürztes Fragment amplifiziert. Ein PCR-Artefakt war in Anbetracht dieser Regelmäßigkeit unwahrscheinlich. Daher war die Identität und die Herkunft dieses Fragments von großem Interesse. Um die Relevanz dieses PCR-Produktes genauer zu untersuchen, wurde ein Southern-Blot durchgeführt und das Fragment sequenziert.

### 4.5.1 Charakterisierung des kurzen NaPi-IIb1 Fragments

#### a) Southern-Blot

Mit Hilfe eines Southern-Blots wurde untersucht, ob das 400 bp Amplikon ein NaPi-IIb spezifisches Fragment war. Hierzu wurde beispielhaft das PCR-Produkt der totalen RNA aus der Leber mit einer Digoxigenin-markierten Sonde inkubiert, welche spezifisch das PNII-5/PNII-6 Fragment des NaPi-IIb1 erkannte.

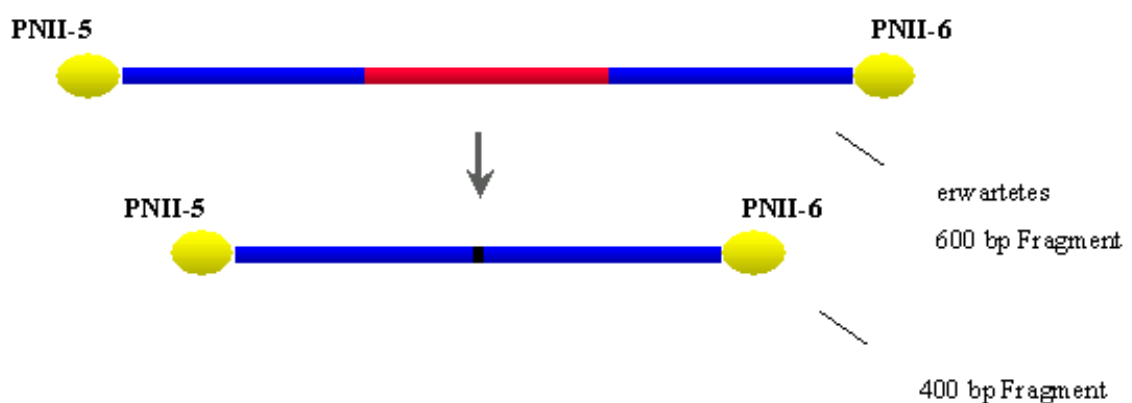


**Abb. 27:** Southern-Blot zur Charakterisierung des in der RT-PCR amplifizierten 400 bp Fragments. Es wurde eine Digoxigenin-markierte Probe des PNII-5/PNII-6 Fragments als Sonde verwendet.

In Abbildung 27 ist zu erkennen, daß das 400 bp Fragment ein sehr starkes Signal hervorruft. Es handelt sich daher bei diesem Fragment tatsächlich um ein spezifisches Produkt von NaPi-IIb1. Weiterhin ist in dieser Abbildung eine geringe Menge des ursprünglich erwarteten 600 bp-Fragments erkennbar. Durch die in der RT-PCR verwendeten Primer können demnach zwei NaPi-IIb1 spezifische Fragmente amplifiziert werden, die sich in ihrer Größe unterscheiden.

### b) Sequenzierung

Zur weiteren Charakterisierung wurde das 400 bp Fragment sequenziert und die erhaltene Sequenz mit der cDNA-Sequenz der Isoform 1 verglichen. Es stellte sich heraus, daß die Sequenz identisch zum 600 bp Fragment war, jedoch ein 200 bp langer Abschnitt aus der Mitte fehlte.



**Abb. 28:** Schematische Darstellung der Sequenz des 400 bp-Fragments.

Eine alternative Spleiß-Variante von NaPi-IIb1 kam als Erklärung für dieses Amplikon nicht in Frage, da die Translation in allen drei Leserahmen jeweils sehr kurze Peptide ergab. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen war ein natürliches Antisense-Transkript. Beim Flunder NaPi-IIb war schon ein natürliches Antisense-Transkript entdeckt worden, dessen Aufbau sich ebenso wie bei der Zebrafisch Isoform von dem Sense-Transkript unterschied.

#### 4.5.2 Strangspezifische RT-PCR zur Feststellung der Herkunft des verkürzten Fragments

Mit Hilfe dieser Methode wurde der Frage nachgegangen, ob das 400 bp-Fragment (Abschn. 4.1.3a) von einer mRNA stammt, welche aus dem Gegenstrang der genomischen DNA des NaPi-IIb1 transkribiert wird und somit dessen natürlich vorkommendes Antisense-Transkript darstellt.

Durch eine strangspezifische RT-PCR ist es möglich, zu bestimmen, von welchem Strang der genomischen DNA die mRNA transkribiert worden ist, aus der schließlich bei einer RT-PCR die Ziel-Fragmente amplifiziert werden. Anstatt mit einem Oligo dT-Primer wird die reverse

Transkription (RT) hierbei mit einem der spezifischen PCR-Primer durchgeführt, welcher ausschließlich mit einem Strang des gesuchten Transkripts hybridisieren kann.

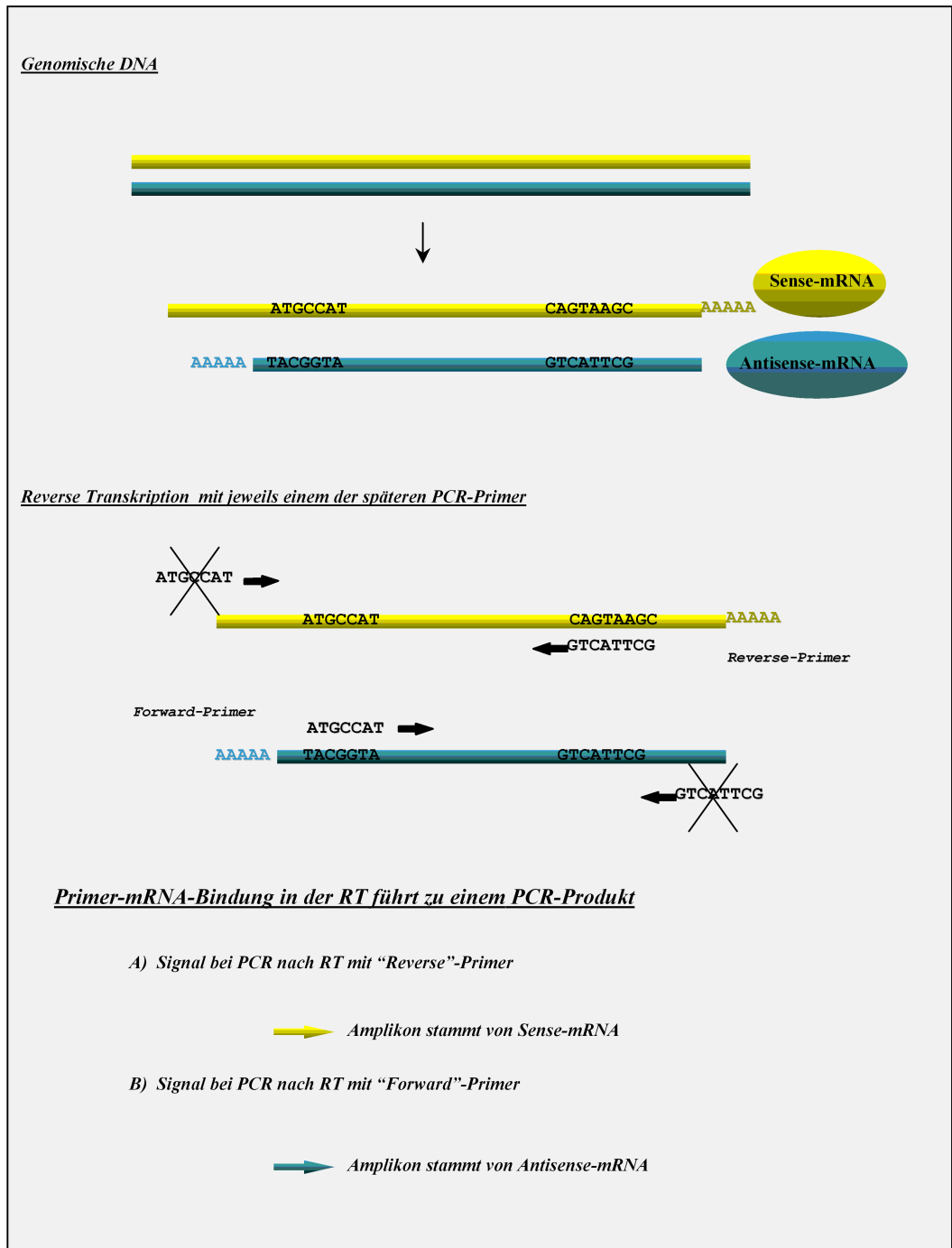
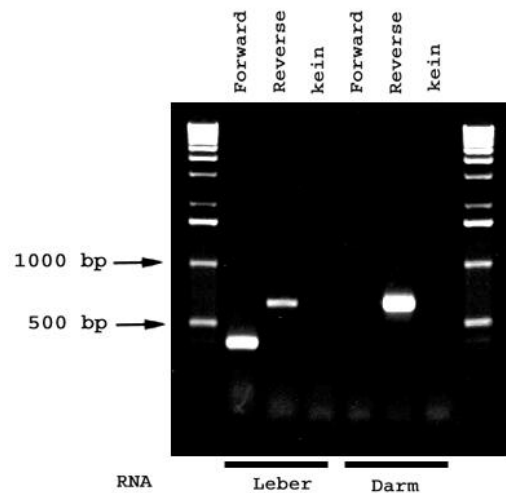


Abb. 29: Prinzip der strangspezifischen RT-PCR.



Wie aus der Skizze ersichtlich kann nur der “Reverse”-Primer mit der mRNA von NaPi-II hybridisieren und so zu einem Fragment bei der folgenden PCR führen. Im Gegensatz dazu kann der “Forward”-Primer nur mit der Antisense-mRNA hybridisieren, die auf genomischer Ebene vom Gegenstrang des NaPi-IIb1 stammt.

Die strangspezifische RT-PCR wurde mit der totalen RNA aus der Leber und dem Darm durchgeführt, da in den ersten RT-PCR Versuchen in Abschn. 4.1.3 in der Leber hauptsächlich das kürzere Amplikon und nur in sehr geringem Maße das längere, erwartete Produkt erhalten wurde. Im Darm hingegen wurde nur das längere Fragment amplifiziert (Abb. 14a).



**Abb. 30: Strangspezifische PCR mit NaPi-II spezifischen Primern.** Bei der reversen Transkription wurden jeweils 0.3 µg totale RNA und 1 pmol an spezifischem Primer eingesetzt. Die RNA und der Primer wurden zusammen 10' bei 70°C denaturiert und anschließend auf RT heruntergekühlt.

Bei dem Ansatz mit Leber RNA ergibt die RT mit dem “Forward”-Primer bei der folgenden PCR das verkürzte Fragment. Dieses Ergebnis zeigt, daß dieses Fragment von einer zur NaPi-IIb1 gegensträngigen mRNA, also einem natürlichen Antisense-Transkript herrührt. Der Versuch mit Darm-RNA zeigt eindeutig, daß in diesem Organ kein entsprechendes Antisense-Transkript vorhanden ist.

Die Ergebnisse aus dem Southern-Blot (Abb. 27) und der strangspezifischen RT-PCR (Abb. 30) zeigen eindeutig, daß NaPi-IIb1 ein natürliches Antisense-Transkript (AS) besitzt.

Auffallend bei der Gewebeverteilungsuntersuchung (Abb. 14a) ist, daß die Expression von Sense- und Antisense-Transkripts sich gegenseitig auszuschließen scheinen. In Gewebearten, in welchen

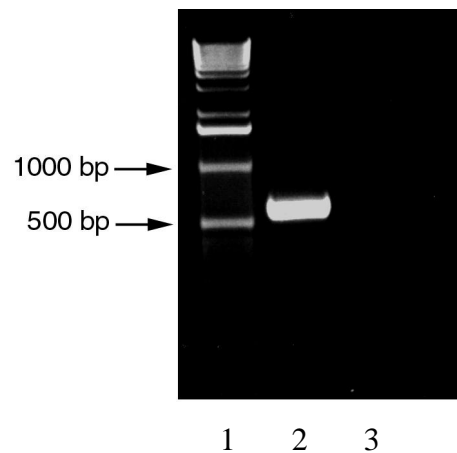
NaPi-IIb1 zu beobachten ist, wird das Antisense-Transkript entweder gar nicht, oder in sehr geringen Mengen detektiert. Dieser Befund veranlaßte zu der Annahme, daß dem Antisense-Transkript eine regulatorische Funktion auf mRNA-Ebene zukommen könnte.

#### **4.5.3 Sequenzierung der vollständigen Sequenz des Antisense-Transkripts durch RACE**

Die Sequenz des Antisense (AS)-Transkripts war für weitere Untersuchungen von Interesse, sodaß ausgehend von dem vorhandenen 400 bp-Fragment 5'- bzw. 3'-RACE durchgeführt wurde, um die Sequenz der mRNA vollständig zu ermitteln. Aufgrund der Tatsache, daß in den vorangegangenen Experimenten das Antisense-Transkript in der Leber nachgewiesen werden konnte, wurden die RACE Experimente ebenfalls mit totaler RNA aus der Leber durchgeführt.

##### **4.5.3.1 5'-RACE**

Zur Analyse des 5'-Bereichs des AS-Transkripts wurden drei genspezifische Primer ausgehend von dem zuvor identifizierten 400 bp Fragment konzipiert. In der reversen Transkription wurde der erste genspezifische Primer PNII-9 zur Bildung der cDNA eingesetzt. Diese wurde in einer folgenden Reaktion mit einem homopolymeren Cytosinschwanz versehen. Hierdurch wurde eine PCR mit dem Adapterprimer (AAP) und dem genspezifischen Primer PNII-10 ermöglicht, bei der jedoch nur ein schwaches Signal bei etwa 600-700 bp zu beobachten war. Bei der darauf folgenden verschachtelten PCR mit dem genspezifischen Primer PNII-11 wurde schließlich ein einzelnes ca. 600 bp langes Fragment amplifiziert.

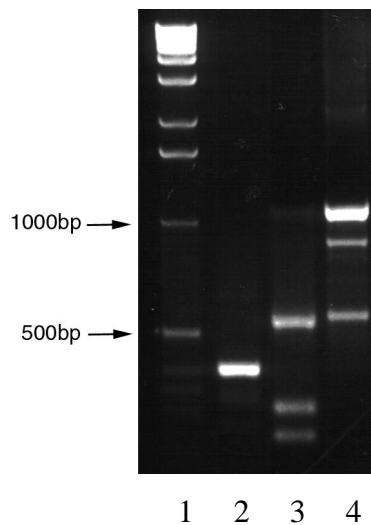


**Abb. 31: RACE-Experiment zur Charakterisierung des 5'-Endes des Antisense-Transkripts.** Für die reverse Transkription wurden 1 µg totale RNA eingesetzt. 1: 1 kb DNA-Standard, 2: 5'-RACE-Fragment, 3: Kontrolle: RT ohne reverse Transkriptase (AMV-RT).

Das Fragment aus dem 5'-RACE Experiment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Sequenzierung zeigte, daß die Sequenz mit dem 400 bp Fragment überlappt, von welchem bei diesem Ansatz ausgegangen worden war.

#### 4.5.3.2 3'-RACE

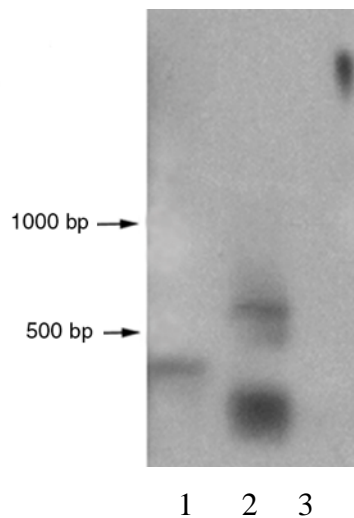
Bei dieser Reaktion erfolgte die cDNA-Synthese durch reverse Transkription mit einem Oligo dT-Primer, welcher zusätzlich eine Adaptersequenz besitzt (NotI-[dT]<sub>18</sub>). Die folgende PCR erfolgte mit Hilfe des Adapter-Primers pNot und dem genspezifischen Primer PNII-7, welcher ebenfalls aus dem ersten 400 bp Fragment konzipiert worden war. Diese PCR lieferte allerdings kein eindeutiges Signal, da die beiden einzelnen Primer auch alleine mit der cDNA reagierten. In der folgenden verschachtelten PCR wurde neben dem Adapter Primer der zweite genspezifische Primer PNII-8 eingesetzt, um ein spezifisches Produkt zu ermitteln. Auch bei dieser PCR wurden die Primer einzeln zur Kontrolle eingesetzt.



**Abb. 32: 3'-RACE nested-PCR.** Die Ansätze aus dem ersten 3'-RACE PCR-Ansatz (je 5  $\mu$ l) wurden in einer verschachtelten PCR mit einem weiteren genspezifischen Primer und dem RACE Primer eingesetzt. 1.: 1 kb DNA-Standard, 2: Kontrolle: genspezifischer Primer PNII-8, 3: beide Primer (PNII-8/pNot-Primer), 4: Kontrolle: pNot-Primer.

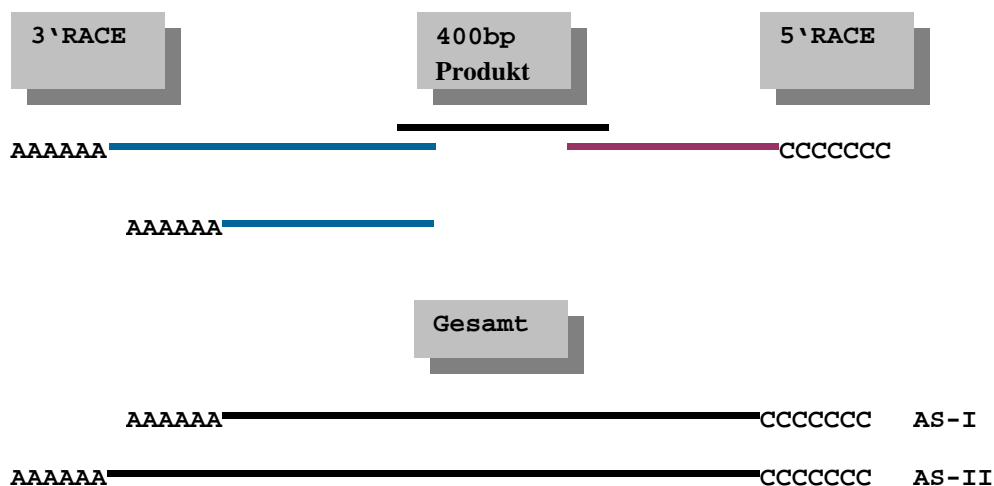
Abbildung 32 zeigt deutlich, daß in der PCR-Probe mit beiden Primern drei Fragmente amplifiziert wurden, welche bei den anderen nicht zu sehen sind.

Um herauszubekommen, welches der drei Fragmente tatsächlich das richtige 3'-Ende das AS-Transkripts darstellt, wurde ein Southern-Blot durchgeführt. Hierzu wurde eine Digoxigenin-markierte Probe des NaPi-IIb1 Transkripts eingesetzt, die zum Teil mit der 3'-Region des Antisense (AS)-Transkripts überlappt und somit zur Detektion geeignet war. Mit dieser Sonde konnten alle drei Fragmente als positiv detektiert werden, was an dieser Stelle den Schluß nahelegte, daß in der Leber des Zebrafisches mehrere AS-Transkripte des NaPi-IIb1 mit unterschiedlichen oder unterschiedlich langen 3'-Enden existieren.



**Abb. 33: Southern-Experiment zur 3'-RACE.** 1. Kontrolle: genspezifischer Primer PNII-8, 2: beide Primer (PNII-8/pNot-Primer), 3: Kontrolle: pNot-Primer.

Zwei der drei positiven Banden konnten aufgereinigt und sequenziert werden. Beide Sequenzen überlappen mit dem 400 bp-Fragment, von der die RACE Experimente starteten. Aufgrund der Überlappungen der Sequenzen mit dem Mittelstück, kann davon ausgegangen werden, daß die amplifizierten Fragmente vollständige Transkripte darstellen. Die Ergebnisse der RACE-Untersuchungen werden in der Abbildung 34 skizziert.



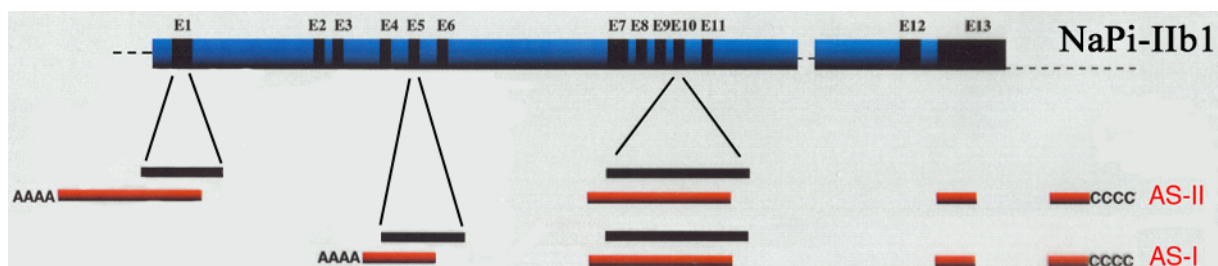
**Abb. 34: Schematische Darstellung der RACE-Experimente.**

Die Befunde aus den RACE-Experimenten ergeben zusammenfassend, daß in der Zebrafisch-Leber mindestens zwei Antisense-Transkripte von NaPi-IIb1 existieren. Aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Strukturen wurden die beiden Transkripte als AS-I und AS-II bezeichnet.

#### 4.5.3.3 Genomische Organisation der zwei Antisense-Transkripte des NaPi-IIb1

Die genomische DNA-Sequenz des NaPi-IIb1 konnte bis auf den Bereich zwischen den Exons 11 und 12 und dem DNA-Abschnitt nach dem Exon 13 sequenziert werden (Abschn. 4.2). Dadurch wurde die Analyse der Intron/Exon-Verteilung von NaPi-IIb1 und seinen beiden Antisense-Transkripten möglich.

Im Folgenden wird die genomische Organisation dieser drei Transkripte schematisch aufgeführt. Die genaue Positionen der Intron/Exon-Grenzen sind im Anhang aufgelistet.



**Abb. 35: Genomische Organisation der beiden Antisense-Transkripte.** Die Exons der Antisense-Transkripte sind in rot, die NaPi-IIb1 Exons sind schwarz dargestellt.

Wie aus der Abbildung 35 ersichtlich, weisen beide Antisense-Transkripte unterschiedliche Intron/Exon-Grenzen auf. Die ersten 3 Exons sind auf genomischer Ebene identisch. Beide Antisense-Transkripte besitzen ein viertes Exon, welches auf der genomischen DNA jeweils unterschiedlich lokalisiert ist. Die unterschiedliche Spleiß-Strategie hat auf mRNA-Ebene Antisense-Transkripte zur Folge, welche zum großen Teil homologe Bereiche besitzen, aber sich in ihrem 3'-Ende unterscheiden.

#### 4.5.3.4 Klonierung der AS-Transkripte in den Vektor pSport1

Zur funktionellen Charakterisierung der natürlich vorkommenden Antisense-Transkripte des NaPi-IIb1 sollten diese in den Vektor pSport1 kloniert werden. Es existierten keinerlei Hinweise auf die Funktion der beiden Antisense-Transkripte, sodaß ihre Klonierung alle Bereiche der mRNA vollständig erfassen mußte.

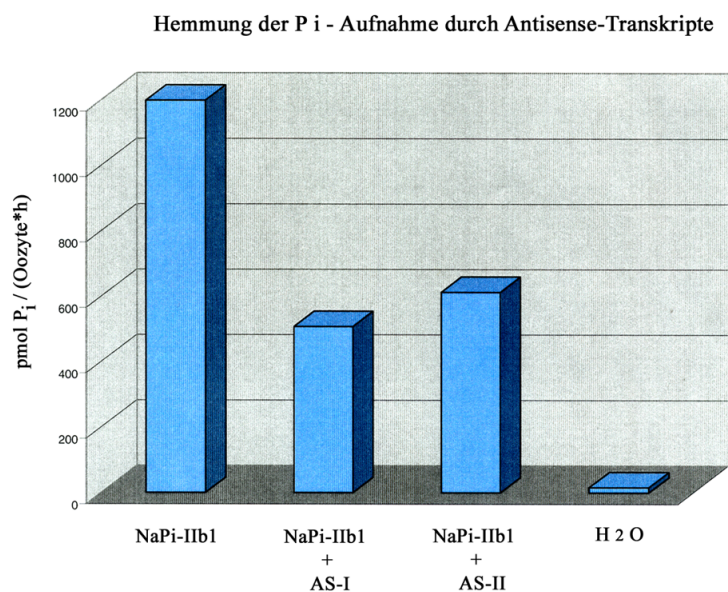
Die Klonierungs-Strategie (Abb. 36) basierte auf der Kombination der schon durchgeführten RACE Experimente mit jeweils einem neuen RT-PCR Produkt. Hierfür wurden Primer konstruiert, mit denen es möglich war, jeweils ein Fragment zu amplifizieren, welches sich ausgehend von dem 5'- bis zu dem jeweiligen 3'-RACE Bereich erstreckten. Mit Hilfe der RT-PCR wurden die Transkripte ZFAnti1/ZFAnti2 (für AS I) bzw. ZFAnti1/ZFAnti3 (für AS II) amplifiziert. Da diese Fragmente jeweils mit dem 3'-RACE Fragment überlappende Bereiche besaßen, konnte anschließend mit einer überlappenden PCR der gesamte Bereich vom 3'-Ende bis zum Primer ZFAnti1 amplifiziert werden. Bei dieser PCR wird in den ersten 10 Zyklen eine niedrige Schmelztemperatur (50°C) gewählt, um das 5'-Ende des 3'-RACE Fragments mit dem jeweiligen 3'-Ende des RT-PCR Produkts (s.o.) zu verknüpfen. Mit Hilfe der äußeren Primer pNot und ZFAnti1 wird anschließend der gesamte Bereich (3'-Ende bis ZFAnti1) amplifiziert. Durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *Not I* und *Nco I* und Ligation wurde das entsprechende Fragment in pSport kloniert. Das 5'-RACE Fragment wurde anschließend zwischen die Restriktionsschnittstellen *Nco I* und *Sal I* in den ersten Klon eingefügt. Durch die hier gezeigte Strategie wurden die Antisense-Transkripte vollständig mit ihren jeweiligen 5'- und 3'-Enden kloniert. Ihre Klonierung ermöglichte die *in vitro* Transkription zur Injektion und Analyse in den Oozyten des *Xenopus laevis*.





#### 4.5.4 Funktionelle Charakterisierung der Antisense-Transkripte von NaPi-IIb1

Beide Antisense-Transkripte besitzen große Bereiche in ihrer cDNA Sequenz, welche revers-komplementär zu NaPi-IIb1 cDNA sind. Das wies auf eine mögliche Wechselwirkung der AS-Transkripte auf mRNA Ebene mit NaPi-IIb1 hin. Daher sollte in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht werden, ob die klonierten Antisense-Transkripte die Expression von NaPi-IIb1 beeinflussen können. Hierfür wurden die Antisense-Klone *in vitro* transkribiert und die jeweils resultierende cRNA mit NaPi-IIb1 cRNA in Oozyten koinjiziert. Die Expression von NaPi-IIb1 wurde nach drei Tagen durch Transportmessungen mit radioaktivem Phosphat ( $^{32}\text{P}$ -Orthophosphat) ermittelt. Als Kontrolle wurde zum einen NaPi-IIb1 und zum anderen das entsprechende Antisense-Transkript alleine (nicht gezeigt, da nicht signifikant) injiziert.



**Abb. 37: Hemmung der Phosphataufnahme durch Antisense-Transkripte.** Dargestellt ist die Phosphataufnahme in Oozyten, welche mit NaPi-IIb1, NaPi-IIb1+AS-I, NaPi-IIb1+AS-II und H<sub>2</sub>O koinjiziert wurden. Es wurden jeweils 4 ng cRNA von jedem Transkript injiziert. Aus den gemessenen Zerfallsraten von mindestens acht lysierten Oozyten wurde der Mittelwert berechnet. n = 4 Oozytenchargen.

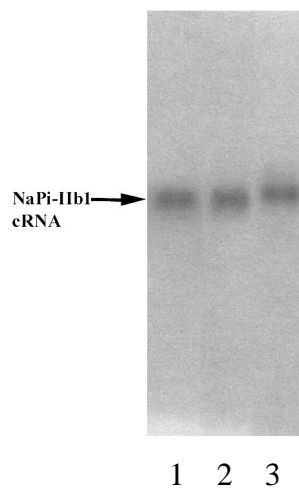
Die NaPi-IIb1 injizierten Oozyten zeigen gegenüber den Kontroll-Oozyten (H<sub>2</sub>O) eine sehr stark erhöhte Transportrate für Phosphat auf. Die Transportraten der Oozyten, in welche NaPi-IIb1 mit

jeweils einem Antisense-Transkript koinjiziert wurde, sind gegenüber der Kontrolle mit NaPi-IIb1 cRNA alleine deutlich verringert. Bei einer Koinjektion mit AS-I sinkt die Transportrate auf etwa die Hälfte des Kontrollwertes. Die Koinjektion von NaPi-IIb1 mit AS-II bewirkt einen ähnlichen Effekt auf den Transport. Neben den mit Wasser injizierten Oozyten dienten ebenfalls solche als Kontrolle, welche jeweils mit einem der beide Antisense-cRNAs injiziert worden waren. Diese Oozyten zeigten im Vergleich zu den Wasser injizierten Oozyten keinen erhöhten, sondern im Gegenteil sogar einen etwas verringerten Transport.

Aufgrund der Phosphattransport-Ergebnisse (Abb. 37) rückte die Frage in den Vordergrund, in welcher Art die Antisense-Transkripte bei einer Koinjektion den Phosphattransport von NaPi-IIb1 beeinflussen. Hierzu wurden die koinjizierten Oozyten auf zwei unterschiedlichen Ebenen analysiert. Zum einen wurde die injizierte NaPi-IIb1 cRNA mit Hilfe von Northern-Blots untersucht. Weiterhin wurde die Expression des Transportproteins mit Hilfe von Immunhistochemie an Oozyten-Schnitten untersucht. Sowohl der Abbau der injizierten cRNA im Falle einer Koinjektion mit einem der Antisense-Transkripte, als auch eine Störung auf der Translationsebene können zu einem verringerten Transport führen.

#### **4.5.4.1 Untersuchung der NaPi-IIb1 cRNA-Stabilität in koinjizierten Oozyten**

Mit Hilfe dieses Ansatzes sollte ermittelt werden, ob der geringe Phosphattransport bei der Koinjektion von NaPi-IIb1 mit einem der Antisense-Transkripte auf den Abbau von NaPi-IIb1 cRNA zurückzuführen ist. Die NaPi-IIb1 cRNA-Menge nach drei Tagen Inkubationszeit wurde dabei mit Hilfe von Northern-Blots analysiert.

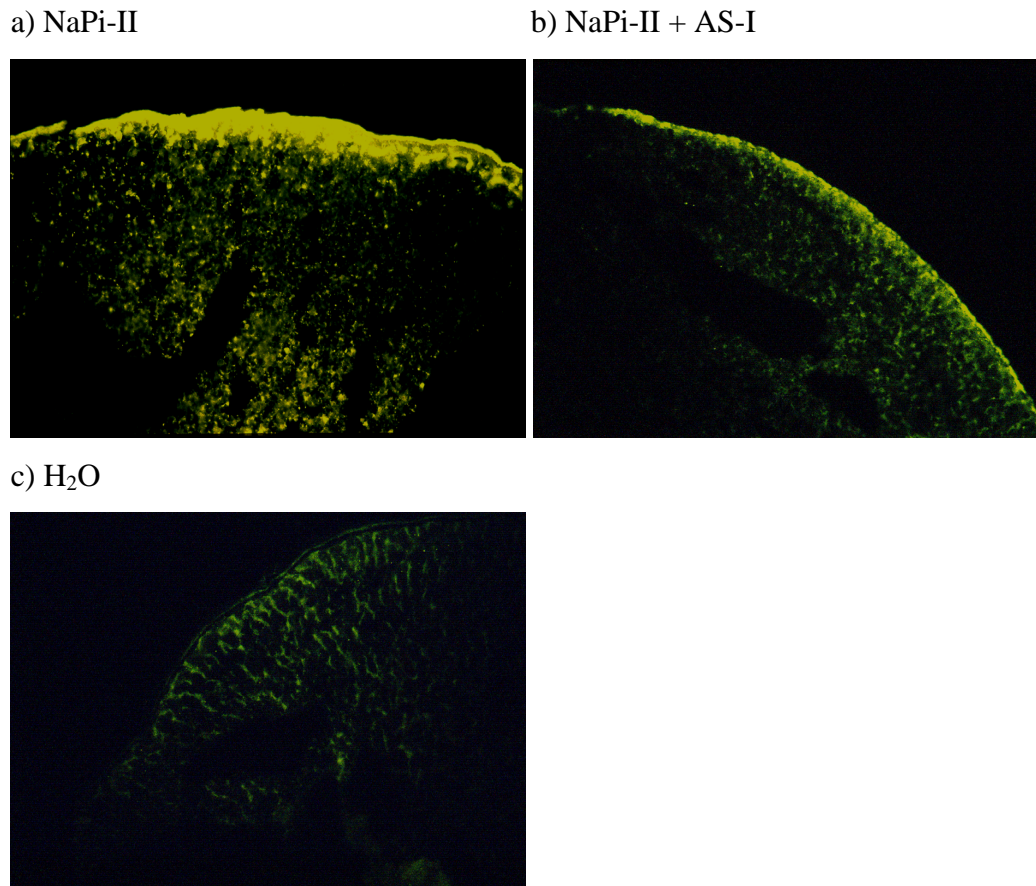


**Abb. 38: Northern-Blot Analyse der aus Oozyten isolierten cRNA.** Es wurden jeweils zehn Oozyten kurz nach der Injektion und nach drei Tagen Inkubationszeit lysiert. Die mRNA der Oozyten wurde mit Hilfe von Dynabeads isoliert und in 10  $\mu$ l 1 $\times$ Probenpuffer eluiert. Die NaPi-IIb1 cRNA wurde mit einer NaPi-IIb1 spezifischen Digoxigenin-markierten RNA-Sonde untersucht. Probenkonzentration: 100 ng/ml Hybridisierungslösung (Expositionszeit: 5 min). 1) NaPi-IIb cRNA, 2) NaPi-IIb + ASI, 3) NaPi-IIb + ASII.

Nach drei Tagen Inkubationszeit wurde in Oozyten, welche mit NaPi-IIb1 und einem Antisense-Transkript koinjiziert wurden, genau soviel cRNA detektiert, wie bei den Oozyten, welche mit NaPi-IIb1 cRNA alleine injiziert wurden. Die mit Antisense-cRNA koinjizierte NaPi-IIb1 cRNA wird demnach in dem Oozyten Expressionssystem nicht in detektierbaren Mengen abgebaut. Das weist darauf hin, daß der Grund für einen derartig geringeren Transport bei koinjizierten Oozyten nicht an dem Abbau der NaPi-IIb1 cRNA liegt.

#### 4.5.4.2 Einfluß von AS-I auf die NaPi-IIb1 Protein-Expression

Durch die immunhistochemische Analyse der Expression von NaPi-IIb1 in koinjizierten Oozyten sollte den Einfluß der Antisense-Transkripte auf der Translationsebene untersucht werden. Die Phosphattransport-Messungen zeigten einen verringerten Transport durch NaPi-IIb1 bei Oozyten, welche mit einem Antisense-Transkript koinjiziert worden waren. Die immunhistochemischen Experimente wurden exemplarisch mit AS-I durchgeführt. Die Oozyten-Schnitte wurden mit dem Antiserum gegen NaPi-IIb1 untersucht, um die gebildete Proteinmenge zu untersuchen.



**Abb. 39: Oozyten-Kryostatschnitte mit Immunreaktion gegen NaPi-IIb1.** Die Schnitte wurden mit einer 1/2000 Verdünnung des Antikörpers gegen NaPi-IIb1 inkubiert. a) NaPi-IIb1 injiziert b) NaPi-IIb1 mit Antisense I koinjiziert c) Wasser injizierte Oozyten (Vergrößerung: 400×).

Nach drei Tagen Inkubationszeit zeigen die Wasser-injizierten Oozyten keine Färbung im Membranbereich, während die mit NaPi-IIb1 injizierten Oozyten eine starke Immunfluoreszenz zeigen. Im Vergleich dazu wird bei den mit AS-I koinjizierten Oozyten eine deutlich verringerte Anfärbung der Membran beobachtet. Das Signal beträgt etwa nur ein Drittel im Vergleich zu NaPi-IIb1 injizierten Oozyten ohne AS-I.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Proteinexpression von NaPi-IIb1 durch die Präsenz der Antisense-cRNA gestört wird. Durch die Störung der Proteinbiosynthese wird entsprechend wenig NaPi-IIb1 Transporter hergestellt, welcher in die Membran gelangen und Phosphat transportieren kann.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei Isoformen des NaPi-IIb von Zebrafisch (*Brachydanio rerio*), welche in meiner Diplomarbeit erstmals identifiziert wurden, funktionell und auf molekularer Ebene untersucht. Hierzu wurden molekularbiologische, immunhistochemische und elektrophysiologische Methoden angewandt.

Für die Isoform aus dem Darm waren die Voraussetzungen zur weiteren molekularen und funktionellen Charakterisierung erfüllt, da dieses Transkript bereits in meiner Diplomarbeit kloniert worden war und die vollständige mRNA-Sequenz zur Verfügung stand. Im Falle der Isoform aus der Niere war lediglich eine Teilsequenz bekannt. Hierbei wurden 5'- und 3'-RACE-Experimente durchgeführt, um die vollständige Sequenz zu erhalten. Die Sequenz konnte in dieser Arbeit bis auf das 5'-Ende charakterisiert werden, sodaß Analysen der Aminosäuresequenz möglich waren. Auch diese Isoform kodiert für ein Protein, welches eine hohe Homologie zu den NaPi-IIb Transportern besitzt. Die beiden entdeckten Zebrafisch-Proteine wurden daher NaPi-IIb1 und NaPi-IIb2 genannt. Die Gewebeverteilung beider mRNAs wurde mit RT-PCR untersucht. Danach kommt NaPi-IIb1 im Darm, in Augen und in der Niere vor. Die NaPi-IIb2 mRNA dagegen wird sehr viel breiter exprimiert. Immunhistochemische Untersuchungen mit Zebrafisch-Gewebeschnitten zeigten, daß die Transkripte translatiert werden und beide Proteine im Darm, in den Tubuli der Niere und in den Gallengängen der Leber apikal lokalisiert sind.

Im Falle der NaPi-IIb1 Isoform wurden zwei natürliche Antisense-mRNAs entdeckt und kloniert. Durch Koinjektionsexperimente im Oozyten-Expressionssystem konnte gezeigt werden, daß beide Antisense-Transkripte den NaPi-IIb induzierten Phosphattransport hemmen. Northern-Blots und Untersuchung der Proteinexpression an Oozyten-Schnitten deuten darauf hin, daß diese Hemmung nicht durch den Abbau der injizierten NaPi-IIb cRNA, sondern durch Blockierung der Proteinsynthese hervorgerufen wird.

## 5.1 Molekulare Charakterisierung der Zebrafisch NaPi-IIb Transkripte

Die Daten der RACE-Untersuchungen ergaben im Falle der beiden Isoformen ein unterschiedliches Bild. Bei NaPi-IIb1 lieferte die 5'-RACE im ersten Ansatz eindeutig ein Fragment mit einem Start-Methionin im NaPi-IIb Leserahmen (siehe Diplomarbeit). Bei der NaPi-IIb2 Isoform dagegen wurden in verschiedenen 5'-RACE Versuchen zahlreiche alternativ gespleißte Varianten und Artefakte isoliert. Neben zu kurzen Amplikons ohne sinnvollem Start-Methionin im NaPi-IIb Leserahmen, wurde vorwiegend eine Variante amplifiziert, die ein Stop-Kodon im 5'-Bereich besitzt. Ein Teil dieses Amplikons ist homolog zu NaPi-IIb Transkripten aus anderen Fisch- und Säugetierspezies. Die Homologie bricht jedoch vor dem 5'-Ende ab. Es ist auffällig, daß die Sequenzen der verschiedenen Spezies in diesem Bereich untereinander sehr voneinander abweichen. Wahrscheinlich ist diese Tatsache die Folge von unterschiedlichen Spleißstrategien, die bei den verschiedenen Spezies angewendet werden. Der Schluß liegt daher nahe, daß es sich bei den unterschiedlichen 5'-RACE Amplikons der zweiten Isoform um verschiedene Spleißvarianten handelt und möglicherweise noch eine weitere Form existiert, die einen funktionellen offenen Leserahmen aufweist.

Das Phänomen von alternativ gespleißten mRNAs wurde schon häufig in der Literatur beschrieben. Masure et al. konnten fünf verschiedene Spleißvarianten der mRNA von Enovin, einem neuen Vertreter der GDNF-Familie (glial cell-line derived neurotrophic factor) mit RT-PCR nachweisen, welche eine differenzierte Gewebeverteilung zeigten (Masure et al. 1999). Interessanterweise kodieren lediglich zwei dieser Transkripte für das funktionelle Protein. Die nichtfunktionellen Transkripte enthalten, wie bei Zebrafisch NaPi-IIb2, ein Stop-Kodon am 5'-Ende im Leserahmen, ohne daß ein Start-ATG folgt. Die Autoren sehen in ihrer Veröffentlichung einen Zusammenhang zwischen der gewebespezifischen Expression der unterschiedlichen Spleißformen und einer Regulation der Proteinexpression auf transkriptioneller Ebene. Auch beim Transportsystem NaPi-II wurden alternative Spleißprodukte nachgewiesen. Tatsumi et al. konnten aus einer cDNA Bank der Rattenniere drei alternativ gespleißte Transkripte von NaPi-IIa isolieren. Diese drei Isoformen besitzen einen offenen Leserahmen und die Expression der entsprechenden Proteine von 36, 39 und 29 kDa wurde durch Western Blots nachgewiesen (Tatsumi et al. 1998).

Aufgrund dieser Befunde kann auch für NaPi-IIb2 eine bislang unentdeckte Spleißvariante vermutet werden, welche zu einem funktionellen Protein translatiert wird. Diese Isoform wurde daher zur besseren Eingrenzung der physiologischen Bedeutung beider Transkripte in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen.

## 5.2 Expressions-Muster der NaPi-IIb Isoformen im Zebrafisch

Zur Analyse der Gewebeverteilung der mRNA wurde mit RT-PCR jeweils ein Fragment aus dem 3'-Bereich der beiden Isoformen amplifiziert, da alternative Spleißformen nur im 5'-Bereich beobachtet wurden. Die Experimente zeigten eine unterschiedliche Verteilung der beiden Zebrafisch NaPi-IIb Isoformen.

Die mRNA von NaPi-IIb1 wurde im Darm, in der Niere und im Auge detektiert. Die Expression in Darm und Niere, den Organen, in welchen die Phosphathomöostase kontrolliert wird, ließ sich mit der potentiellen biologischen Funktion als Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransportsystem gut vereinbaren. Das deutliche Signal im Auge war überraschend, da NaPi-II im Auge bislang nicht nachgewiesen wurde. Eine physiologische Bedeutung des Transporters im Auge läßt sich nicht ohne weiteres herleiten, jedoch ist eine Beteiligung an Sekretionsprozessen denkbar.

Im Unterschied zum ersten Transkript zeigte NaPi-IIb2 ein wesentlich breiteres Expressionsmuster. Einerseits wurde die mRNA in Darm und Niere detektiert, andererseits zeigten nahezu alle untersuchten Gewebe ebenfalls ein starkes Signal. Die Bestimmung der Gewebeverteilung mit RT-PCR läßt nur Rückschlüsse auf das 3'-Ende des Transkripts zu. Zur Deutung der erhaltenen Befunde müssen die 5'-RACE Untersuchungen berücksichtigt werden. Möglicherweise existieren mehrere Spleißvarianten von NaPi-IIb2, welche ein gemeinsames 3'-, jedoch unterschiedliche 5'-Enden besitzen. Das identische 3'-Fragment wird demnach fast in jedem Gewebe beobachtet. Es ist jedoch durchaus denkbar, daß neben nicht funktionellen Transkripten auch funktionelle Spleißvarianten existieren, welche einen offenen Leserahmen besitzen, mit den angewandten RACE-Kombinationen aber nicht erfaßt werden konnten. Um dieses ungewöhnliche Expressionsmuster genauer zu klären, wurde die Gewebeverteilung auf Proteinebene mittels Immunhistochemie untersucht.

Die Expression eines Proteins spiegelt seine physiologische Relevanz in den entsprechenden Organen (Zellen) wieder. Für die Untersuchung der Zebrafisch NaPi-IIb Transkripte wurden Antikörper gegen den jeweiligen C-terminalen Bereich eingesetzt. Um mögliche Kreuzreaktivität der beiden Antiseren auszuschließen, wurden die Epitope (die jeweiligen C-Termini der Proteine) in Oozyten exprimiert. Da NaPi-IIb1 bereits kloniert worden war, mußte hierbei lediglich die cRNA in die Oozyten injiziert werden. Der C-Terminus der NaPi-IIb2 Isoform wurde an den Flunder NaPi-IIb Transporter fusioniert, um eine Expression zu erreichen. Gefrierschnitte dieser Oozyten wurden mit jeweils dem spezifischen und dem unspezifischen Antikörper inkubiert. Die Befunde ergaben eindeutig, daß die Antiseren jeweils ausschließlich mit dem entsprechenden Epitop reagieren.

Mit den getesteten Antiseren konnten beide Zebrafisch NaPi-IIb Isoformen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Auf Zebrafisch-Gewebeschnitten konnten beide NaPi-IIb Isoformen in Darm-Epithelzellen, Nieren-Tubuli und den Gallengängen immunhistochemisch lokalisiert werden. Die beobachteten Signale geben grundsätzlich eine luminal Lokalisation wieder. Dabei werden im Darm die Enterocyten, in der Niere die Zellen der distalen Tubuli (Sammelrohr) und in der Leber die Gallengänge apikal angefärbt. Die Lokalisierung eines Proteins allein reicht nicht aus, um seine biologische Funktion zu definieren. Allerdings weist die luminal Lokalisation von beiden NaPi-IIb Isoformen auf eine Rolle in der Resorption von Phosphat hin.

Im Vergleich zu den Befunden auf mRNA-Ebene zeigte die Proteinexpression des NaPi-IIb2 ein deutlich differenzierteres Expressionsmuster. Während die NaPi-IIb2 mRNA sehr breit exprimiert wurde, konnte das entsprechende Protein lediglich in einigen wenigen Geweben nachgewiesen werden. Aufgrund der mRNA Untersuchungen alleine läge der Schluß nahe, NaPi-IIb2 eine gewisse „housekeeping“ Rolle zuzuweisen. Auf Proteinebene deuten hingegen die Befunde auf eine besondere Expressionsstrategie hin. Möglicherweise existieren auf mRNA-Ebene mehrere Spleißvarianten, welche nicht alle in sinnvolle Proteine übersetzt werden können. Die mit Hilfe der RACE Methode erhaltenen mRNA-Spezies besitzen statt eines Start-Methionins ein Stop-Kodon im 5'-Bereich und repräsentieren demnach eine funktionell inaktive Variante, welche nicht mit der immunhistochemisch gezeigten Spezies identisch ist.



Die Koexpression zweier NaPi-IIb Isoformen im selben Organ stellt eine Besonderheit unter den NaPi-IIb Transportern dar. Im Darm und in den Gallengängen wurde ein identisches Expressionsmuster der beiden Proteine festgestellt. In den Nieren-Tubuli färbt der Antikörper gegen die zweite Isoform zusätzliche Abschnitte an. Das Expressionsmuster von NaPi-IIb war bereits Gegenstand von Untersuchungen bei anderen Spezies. Im Menschen wird NaPi-IIb in Lunge, Darm, Niere, Pankreas und Prostata exprimiert (Feild et al. 1999). Die Maus zeigt ein vergleichbares Expressionsmuster (Hilfiker et al. 1998). Eine unterschiedliche Situation findet sich in der Winterflunder. Interessanterweise wird NaPi-IIb dort im Darm und in der Niere zu unterschiedlichen Membrankompartimenten sortiert. Während das Protein im Darm apikal exprimiert wird, erfolgt in der Niere eine basolaterale Sortierung im proximalen Tubulussegment II (PII) (Elger et al. 1998). Neben diesen zellbiologischen Befunden eröffnen die Resultate mit dem Zebrafisch neue Betrachtungswege des Phosphattransports auf molekularer Ebene. Durch ihre Koexpression ergeben sich für die zwei Zebrafisch NaPi-IIb Isoformen unterschiedliche Organisationsmöglichkeiten. Zum einen könnten sie den Phosphattransport in derselben Zelle unabhängig voneinander mit spezifischen funktionellen Eigenschaften bewältigen. Ein heteromerer Komplex mit den zwei Transportern als Untereinheiten erscheint jedoch ebenfalls als eine sinnvolle Variante, zwei Isoformen eines Proteins in derselben Zelle zu organisieren.

In einigen Tubulusabschnitten zeigte nur der Antikörper gegen NaPi-IIb2 positive Signale. Das bedeutet, daß das entsprechende Protein in diesen Bereichen alleine exprimiert wird. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob eine Isoform allein ebenfalls funktionell aktiv ist. Im Falle der Isoform NaPi-IIb1 wurde dies in Oozyten von *Xenopus laevis* gezeigt. Diese Isoform transportiert Phosphat  $\text{Na}^+$ -abhängig und in der erwarteten Größenordnung. Möglicherweise ist auch NaPi-IIb2 in den Tubulusabschnitten, in welchen es alleine exprimiert ist, funktionell aktiv.

### 5.3 Funktionelle Charakterisierung des NaPi-IIb1

Das Transportverhalten der NaPi-II Transporter war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Busch et al. 1994, Forster et al. 1997). Die analysierten Transporter aus den verschiedenen Spezies zeigen entsprechend den postulierten, untereinander ähnlichen

Sekundärstrukturen tendenziell auch ein vergleichbares Transportverhalten. Die hier untersuchte Zebrafisch NaPi-IIb Isoform bestätigt diese Befunde, weist aber signifikante Abweichungen auf. Die funktionellen Charakteristika sind vergleichbar mit denen der anderen Transporter. Während die Affinität für Natrium die gleiche Größenordnung besitzt wie bei den anderen Spezies, ist die Affinität für Phosphat deutlich geringer ( $K_m = 250 \mu\text{M}$ ).

Die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des Transports durch NaPi-IIb ergab eine Besonderheit der Zebrafisch Isoform. Eine Veränderung der angelegten Membranspannung hatte nahezu keinen Einfluß auf den  $\text{Na}^+$ /Phosphat-Kotransport. Im Gegensatz dazu zeigen elektrophysiologische Messungen anderer NaPi-II Transporter, einschließlich des kürzlich klonierten intestinalen NaPi-IIb aus der Maus, eine stark ausgeprägte Abhängigkeit des Transportverhaltens von der angelegten Membranspannung. Zur Bestätigung dieses grundlegenden Unterschiedes wurden Parallelexperimente mit Flunder und Zebrafisch-NaPi-IIb2 durchgeführt. Im Gegensatz zur Flunder sprechen die Befunde beim Zebrafisch NaPi-IIb zugunsten eines elektroneutralen Transportes. Aus Flux-Experimenten mit Vesikeln aus der Bürstensaummembran der Ratte wurde bereits 1976 ein elektroneutraler intestinaler  $\text{Na}^+$ /Phosphat-Kotransporter postuliert (Berner et al. 1976). Später zeigten Danisi et al. mit Bürstensaum-Membranvesikeln aus dem Kaninchen-Darm einen potentialabhängigen Transport (Danisi et al. 1984). Durch die Klonierung verschiedener NaPi-II Transporter wurde die Bestimmung ihrer Transport-Charakteristika mit Hilfe elektrophysiologischer Messungen möglich. Die elektrophysiologischen Daten aus Säugern und der Flunder sprechen eher für einen spannungsabhängigen Transport. Ein direkter Vergleich der Vesikel-Studien mit den Befunden aus den elektrophysiologischen Analysen ist jedoch nur begrenzt möglich. Im ersteren Falle wird der Transport von  $\text{P}_i$  direkt gemessen, während in die elektrophysiologischen Messungen sowohl die Ladung von  $\text{P}_i$  als auch von  $\text{Na}^+$  eingeht. Unabhängig von der Methode wird jedoch deutlich, daß die Potentialabhängigkeit des Phosphattransports je nach Spezies unterschiedlich ist.

Der oben diskutierte nahezu spannungsunabhängige Gesamttransport bei der Zebrafisch Isoform hat möglicherweise Auswirkungen auf die Spannungsabhängigkeit der Natrium-Affinität. Mit höherer Spannung wird die Affinität der Zebrafisch Isoform für  $\text{Na}^+$  kleiner, während bei den anderen untersuchten Spezies grundsätzlich eine umgekehrte Tendenz zu beobachten ist (Busch et al. 1994, Forster et al. 1997). Dieser Unterschied spiegelt möglicherweise Unterschiede in der

molekularen Umgebung der Natriumbindungsstelle wieder. Durch Chimären zwischen NaPi-IIa und NaPi-IIb der Maus konnte die Natriumbindungsstelle auf wenige Aminosäuren eingegrenzt werden (pers. Komm. J.Biber, H.Murer). Dieser Befund macht deutlich, wie geringe Unterschiede in der Sequenz für einen deutlichen Effekt auf funktioneller Ebene ausreichen können.

Die pH-Abhängigkeit des NaPi-IIb Transportes im Zebrafisch war aufgrund der Befunde bei anderen NaPi-II Proteinen von großem Interesse. Für Zebrafisch NaPi-IIb1 ergaben die elektrophysiologischen Messungen tendenziell eine für renale NaPi-IIa Transporter charakteristische pH-Abhängigkeit. Diese zeigen höhere Transportraten bei basischen pH-Werten. Im Gegensatz dazu zeichnete sich das kürzlich aus dem Darm der Maus klonierte NaPi-IIb durch einen erhöhten Phosphattransport im sauren pH-Bereich aus (Hilfiker et al. 1998)). Diese funktionellen Unterschiede bestätigen frühe Untersuchungen, die mit Bürstensaummembranvesikeln von verschiedenen Säugern durchgeführt wurden (Berner et al. 1976). Die Flunder NaPi-IIb Isoform, der erste NaPi-II Transporter aus einem Fisch, zeigt in seiner pH-Abhängigkeit nicht intestinale Charakteristika, obwohl es neben der Niere auch im Darm-Epithel exprimiert wird (Werner et al. 1994, Kohl et al. 1996). Die Befunde bei der Flunder und beim Zebrafisch deuten darauf hin, daß der intestinale NaPi-IIb Transport bei Fischen durch eine andere pH-Abhängigkeit charakterisiert ist als bei den Säugern. Die bei den Säugern in Bezug auf die pH-Abhängigkeit beobachtete klare Einteilung in renalen (NaPi-IIa) und intestinalen (NaPi-IIb) Transport ist demnach beim Zebrafisch wie auch bei der Flunder nicht vorhanden. Innerhalb der NaPi-II Proteinfamilie ist also ein Rückschluß von der gesamten Aminosäuresequenz auf die Transportcharakteristika nicht zulässig. Statt dessen müssen einzelne Aminosäuren charakterisiert werden, welche bei dem jeweiligen System bestimmte Charakteristika, wie pH-Abhängigkeit, Na- oder Phosphat-Bindung beeinflussen.

Dieser Ansatz wurde für die pH-Abhängigkeit des Phosphattransports von de la Horra et al. bestätigt. Durch Chimären aus den beiden Isoformen (NaPi-IIa und NaPi-IIb) der Maus wurde eine Domäne aus lediglich drei geladenen Aminosäuren (REK/GNT) identifiziert, welche die pH-Abhängigkeit des Transports bestimmt. In dieser Region ist auffällig, daß in allen bisher charakterisierten Transportern mit der renalen pH-Abhängigkeit das Glutamat (E) in der Mitte dieses Motivs konserviert ist (De la Horra et al. 2000). Obwohl der Zebrafisch-Transporter (NaPi-IIb1) aufgrund der Gesamt-Aminosäuresequenz den NaPi-IIb Transportern zugeordnet

wird, befindet sich an dieser Position ebenfalls ein Glutamat. Dieser Befund könnte eine Erklärung für die NaPi-IIa Gruppe typische pH-Abhängigkeit sein, welche die Zebrafisch Isoform (NaPi-IIb1) aufweist.

Zusammenfassend zeigt der Zebrafisch NaPi-IIb1 in einigen funktionellen Charakteristika deutliche Unterschiede zu den NaPi-II Transportern aus anderen Spezies. Die pH-Abhängigkeit der Zebrafisch-Isoform zeigt, daß eine auf der Gesamthomologie basierende Einteilung in IIa und IIb Transporter nicht gleichzeitig auch eine funktionelle Unterteilung wiedergibt.

#### 5.4 Regulation des Zebrafisch NaPi-IIb1

Mit Hilfe einer PCR-Strategie wurden zwei Transkripte kloniert, welche eine entgegengesetzte Orientierung zu NaPi-IIb besitzen. Ein Vergleich mit der genomischen Sequenz des NaPi-IIb1 identifizierte diese mRNAs als natürliche Antisense-Transkripte von NaPi-IIb, welche vom Gegenstrang dieses Gens stammten. Eine unterschiedliche Spleißstrategie der beiden Primärtranskripte führte demnach zu Sense- und Antisense-mRNA, die zum Teil komplementäre Abschnitte besitzen.

Das Phänomen der natürlich vorkommenden Antisense-Transkripte ist ursprünglich bei prokaryotischen Organismen beschrieben worden. Ihre Rolle in der negativen Regulation der Genexpression ihrer Sense-Transkripte ist seit längerem bekannt und gut charakterisiert (Wagner & Simons, 1994). Mittlerweile existieren auch bei Eukaryoten experimentelle Hinweise auf den regulatorischen Eingriff von Antisense Transkripten in die Genexpression ihrer Sense-Gegenspieler. Die Antisense-Regulation kann sowohl im Kern als auch im Cytosol stattfinden. Dabei ist die Komplementarität von Sense- und Antisense-mRNA Abschnitten der entscheidende Faktor in der Regulation.

Die Entdeckung einer zu NaPi-IIb komplementären mRNA aus der Flunder, einem eurhalinen Knochenfisch, brachte zum ersten Mal Antisense-Transkripte als mögliche Interaktionspartner für NaPi-II Transkripte in den Vordergrund (Hülseweh et al. 1998). Die Klonierung der Antisense-Transkripte des Zebrafisch NaPi-IIb verstärkt die Möglichkeit einer physiologischen Relevanz der

Antisense-Transkripte in Bezug auf die Regulation von NaPi-II. Im Zebrafisch zeigten RT-PCR Untersuchungen, daß sich die NaPi-IIb1 mRNA und die korrespondierenden Antisense-Transkripte gegenseitig ausschließen. In keinem der untersuchten Gewebe scheint Sense und Antisense-Transkript ähnlich stark exprimiert zu sein. Es wurde immer eine Akkumulation entweder der einen oder der anderen mRNA festgestellt. Im Zusammenhang mit Antisense-Transkripten ist solch eine reziproke Verteilung der entsprechenden Sense- und Antisense-Transkripte ein verbreitetes Phänomen. So zeigten Spencer et al., daß das Sense-Transkript der Dopa Decarboxylase, einem Enzym des Dopaminstoffwechsels, nie mit der entsprechenden Antisense-mRNA im selben Gewebe von *Drosophila* nachgewiesen werden konnte (Spencer et al. 1986). Die erwähnten und weitere Daten bezüglich der Gewebeexpression von Sense- und Antisense-mRNA deuten auf eine signifikante Verknüpfung zwischen Sense- und Antisense-Expression hin. Der Ausschluß des Sense-Transkripts in Geweben, in welchen das Antisense akkumuliert ist, ist möglicherweise die Folge eines posttranskriptionalen Mechanismus, welcher durch die Anwesenheit von doppelsträngiger RNA (dsRNA) eingeleitet wird und zum Abbau der mRNA führt. Diejenige mRNA, welche in einem Zelltyp im Überschuß vorhanden ist (Sense oder Antisense), wird letztlich durch RT-PCR detektiert.

Um einen möglichen funktionellen Einfluß der Antisense-Transkripte auf die Expression von NaPi-IIb nachzuweisen, waren diese Klone daher Gegenstand von Koinjektions-Experimenten im Oozyten Expressionssystem von *Xenopus laevis*. Tatsächlich zeigten Oozyten, welche mit NaPi-IIb und einem der Antisense-Transkripte koinjiziert wurden, einen deutlich geringeren Phosphattransport als nur mit NaPi-IIb injizierte Oozyten. Northern-Blot-Analysen belegten, daß die NaPi-IIb kodierende RNA während der Expressionsversuche in den Zellen nicht abgebaut wurde. Jedoch zeigten immunhistochemische Experimente eine sehr viel geringere NaPi-II Proteinmenge in koinjizierten Oozyten. Die Hemmung der Proteinexpression ist auf der Basis dieser Experimente nicht die Folge des Abbaus der NaPi-IIb cRNA, sondern wird durch die Inhibition der Translation von NaPi-IIb in Protein hervorgerufen. Diese Art der Regulation auf Translationsebene wurde bei dem *lin-14* Transkript von *C. elegans* in einer bestimmten Stufe der Entwicklung gezeigt. Während die mRNA-Menge des *lin-14* konstant bleibt, wird ab einem bestimmten Entwicklungsstadium (L2) ein rapider Rückgang des Proteins registriert (Wightman et al. 1993). Für die Hemmung der Translation sind zwei kurze Antisense-Transkripte zu *lin-14*

verantwortlich, welche an die komplementären Bereiche in der 3'- untranslatierten Region des Sense-Transkripts hybridisieren können (Lee et al. 1993).

Die Bildung solcher *in vivo* Hybride zwischen Sense- und Antisense-Transkripten kann nach Vanhée-Brossollet und Catherine Vaquero zweierlei zur Folge haben (Vanhée-Brossollet et al. 1998). Zum einen stellen sie eine sterische Hinderung der Sense-mRNA dar, welche bei zellulären Mechanismen, wie etwa der Translation, die Bindung ihrer entsprechenden Interaktionspartner verhindert. Zum anderen können die Hybride als Substrate für Proteine dienen, welche spezifisch doppelsträngige RNA binden und diese auf unterschiedliche Art und Weise modifizieren oder sogar abbauen. Seit einigen Jahren sind verschiedene Desaminasen bekannt, welche in der Lage sind, bei doppelsträngigen RNA Molekülen die Adenosin-Basen in überlappenden Regionen zu desaminieren (Maas et al. 1997). Dadurch werden die Adenosin-Basen (A) zu Inosin-Basen (I) modifiziert, was unterschiedliche Auswirkungen auf das Protein haben kann. So können die A-I-Modifikationen als Punktmutationen in dem entsprechenden Protein den Austausch von Aminosäuren bewirken und dadurch zu Veränderungen in der Funktionalität führen. Es wurde gezeigt, daß die entsprechende Desaminase-Isoform in *Xenopus laevis* Oozyten (dsRAD) die mRNA der Untereinheiten des Glutamat gesteuerten Ionenkanals auf diese Art post-transkriptional verändert. Die Modifikation von A zu I im primären mRNA Transkript hatte den Austausch von Glutamin (CAG) zu Arginin (CGG) zur Folge, da Inosin als Guanin gelesen wird. Die Kanaleigenschaften dieses Proteins wurden dadurch in einem signifikanten Maße verändert (Sommer et al. 1991, Higuchi et al. 1993, Melcher et al. 1995). Die A-I-Modifikation in primären mRNA-Transkripten kann jedoch auch neue Spleißstellen mit sich bringen, welche zu nichtfunktionellen mRNA-Transkripten führen kann. Vor dem Hintergrund dieser verschiedenen Effekte werfen die Befunde aus den Koinjektions-Experimenten mit Zebrafisch NaPi-IIb1 und ihren Antisense-Transkripten die Frage auf, welchen Mechanismen die NaPi-IIb1 mRNA in den Oozyten unterworfen ist.

Die NaPi-IIb cRNA wird nachweislich nicht abgebaut, jedoch wird durch das Antisense-Transkript die Proteinbildung reduziert, was sich auch in der Reduktion der Transportrate zeigt. Eine A-I-Modifizierung wird jedoch kaum der Grund für die geringe NaPi-IIb Proteinmenge sein, da zwischen cDNA- und genomischer Sequenz keine Sequenzunterschiede gefunden wurden. Aufgrund dieser Befunde muß ein Antisense-Einfluß in Oozyten auf der Translations-Ebene angenommen werden. Dabei hat wahrscheinlich die Bildung eines RNA-RNA-Duplexes in den

Oozyten eine sterische Blockierung des Translationsapparates zu Folge. Somit wird NaPi-IIb cRNA durch die Antisense-cRNA dem Translationsprozeß entzogen und die Gesamtproteinmenge ist wesentlich geringer als ohne Antisense-Transkript.

Die aufgeführten Koinjektions-Experimente und die ermittelte Gewebeverteilung mit dem Zebrafisch-Sense-Antisense-System zeigen, daß die erhaltenen Befunde aufgrund verschiedener Expressionssysteme nicht ohne weiteres auf die *in vivo* Situation übertragen werden können. Die Gewebeverteilung der komplementären Transkripte im Zebrafisch spricht für einen Abbau der NaPi-IIb mRNA durch den Einfluß des Antisense-Transkripts. Doch im Oozyten-Expressionssystem bleibt die Sense-mRNA trotz Antisense Transkript intakt. In Oozyten fehlen vermutlich die nötigen Komponenten, welche die Degradation von NaPi-IIb cRNA ermöglichen. Der Einfluß der Antisense-cRNA auf NaPi-IIb bleibt aufgrund dieser Tatsache auf die Ebene der Proteintranslation beschränkt.

Ein stark favorisierter Mechanismus, wodurch die *in vivo* Situation der Sense-Antisense-Wechselwirkung beschrieben werden kann, ist die RNA Interferenz. Der Begriff der RNA Interferenz wurde von Fire et al. geprägt und umschreibt die Blockierung der Expression eines Zielgens durch doppelsträngige RNA (Fire et al., 1998). Durch Injektion doppelsträngiger RNA konnte gezeigt werden, daß dieser Prozeß in vielen Organismen, einschließlich dem Zebrafisch, eingreift. Die RNA Interferenz wird zum einen als Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen und zum anderen als eine mögliche zelluläre Strategie zur Genregulation diskutiert (Zamore et al. 2000). Der Mechanismus dieses Vorgangs verläuft initial über doppelsträngige RNA, welche durch eine RNA-abhängige RNA-Polymerase amplifiziert und in 21 bis 23 Nukleotid große Einheiten geschnitten wird. Diese Fragmente können mit den entsprechenden einzelsträngigen mRNA Transkripten hybridisieren und leiten damit die Degradation dieser Moleküle ein (Gura et al. 2000). In Zebrafisch Embryos konnten Wargelius et al. die Blockierung von drei bekannten Genen in Abhängigkeit der injizierten Menge an doppelsträngiger RNA nachweisen (Wargelius et al. 1999). Die bestehenden zellulären Voraussetzungen für die RNA Interferenz im Zebrafisch erlauben eine Verknüpfung dieses Phänomens mit dem Expressionsmuster von NaPi-IIb Sense- und Antisense-Transkripten im Zebrafisch. Die exklusive Expression von Sense- oder Antisense-

mRNA in dem jeweiligen Gewebe spiegelt wahrscheinlich den Abbau der Sense mRNA in Korrelation mit der Antisense-mRNA wieder.

Die gewebespezifische Regulierung der NaPi-IIb Expression muß möglicherweise auch auf die anderen Mitglieder der NaPi-II Proteinfamilie ausgeweitet werden. Die Entdeckung der NaPi-IIb Antisense-Transkripte bei der Flunder und dem Zebrafisch (AS I, AS II) lassen vermuten, daß auch im Falle der anderen NaPi-II Isoformen mRNA Transkripte mit einer Antisense-Orientierung existieren, die noch nicht kloniert werden konnten. Wie beim Zebrafisch deutlich wurde, folgen solche Antisense-Transkripte einer zur Sense-mRNA unterschiedlichen Spleiß-Strategie, sodaß ihre mRNA Sequenz schlecht vorhersagbar und dadurch ihre Klonierung sehr schwierig wird.

Die Befunde in der vorliegenden Arbeit tragen wesentliche Aspekte zum molekularen Verständnis des NaPi-IIb Transportsystems in Fischen bei. Entsprechend physiologischer Differenzen beim Phosphattransport zwischen Säugern und Fischen zeigt die Funktionalität von NaPi-II im Zebrafisch deutliche Unterschiede zu Säuger-Systemen. *In vitro* konnte zum ersten Mal in Oozyten die Regulation eines NaPi-II Transporters durch Antisense-Transkripte gezeigt werden. Möglicherweise existiert *in vivo* ebenfalls eine Korrelation auf mRNA-Ebene zur Regulation der gewebespezifischen NaPi-IIb Expression. Zur Untermauerung dieser spekulativen Annahmen sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.



## 6 Zusammenfassung

Die Proteinfamilie NaPi-II ist in Vertebraten für den natriumabhängigen Phosphattransport der Epithelzellen in Niere und Darm verantwortlich. Durch Regulation dieses Proteins wird der Phosphattransport kontrolliert und dadurch die Phosphathomöostase aufrechterhalten. Physiologische Unterschiede zwischen Säugern und Fischen fokussierten das Interesse in meiner Diplomarbeit auf den Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransporter des Zebrafisches (*Brachydanio rerio*). Interessanterweise wurden aus Darm und Niere dieses Süßwasserfisches zwei Transkripte isoliert, die für zwei unterschiedliche Na<sup>+</sup>/Phosphat-Kotransporter der Proteinfamilie NaPi-II kodieren. Die Isoform aus dem Darm wurde vollständig kloniert und kodiert für ein Protein mit 634 Aminosäuren. Die Analyse der Aminosäuresequenz von diesem Klon zeigte, daß sich das Protein in die NaPi-IIb Untergruppe der Transporterfamilie einordnen läßt. Die Nieren-Isoform konnte nur teilweise isoliert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, beide NaPi-II Isoformen des Zebrafisches auf molekularer Ebene und funktionell zu charakterisieren und so die physiologische Relevanz dieser Transkripte einzugrenzen.

Die 5'-RACE Untersuchungen im Falle der Nieren-Isoform erbrachten lediglich Produkte ohne ein sinnvolles Start-Methionin im NaPi-II Leserahmen. Der homologe Abschnitt des gesamten Transkripts umfaßt 2010 bp und kodiert im NaPi-II Leserahmen für ein Protein mit 633 Aminosäuren. Die erhaltenen Sequenzdaten erlaubten weitere Untersuchungen auf Nukleotid und Proteinebene. Auch die Nieren-Isoform wird demnach der Untergruppe NaPi-IIb zugeordnet. Die Isoformen wurden im Folgenden NaPi-IIb1 (ursprünglich: Darm) und NaPi-IIb2 (ursprünglich: Niere) genannt.

Die Gewebeverteilung der mRNA beider Isoformen wurde mit RT-PCR untersucht. Die Darm-Isoform wurde wie erwartet im Darm, in den Augen und in der Niere nachgewiesen. Dagegen konnte die Nieren-Isoform in nahezu allen untersuchten Organen detektiert werden. Mit Antikörpern aus dem 3'-Bereich beider NaPi-IIb Proteine wurden immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten durchgeführt. Beide Proteine werden exprimiert und sind in Epithelzellen des Darms, in Nieren-Tubuli und in Gallengängen (Leber) apikal lokalisiert. Der

Nachweis der Expression trotz der RACE-Ergebnisse bei NaPi-IIb2 zeigt, daß möglicherweise eine alternative Spleißvariante des isolierten Transkripts mit einem offenen Leserahmen existiert. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte die klonierte Isoform NaPi-IIb1 ähnliche Transporteigenschaften wie andere NaPi-II Proteine. Während bei Säugern ein deutlicher Unterschied zwischen typischen NaPi-IIa und NaPi-IIb Transportcharakteristika existiert, zeigt der Transport durch Zebrafisch-NaPi-IIb überlappende funktionellen Eigenschaften mit den Typ IIa Transportern.

Es wurden zwei natürliche Antisense-mRNAs des NaPi-IIb1 Transkripts entdeckt und kloniert. Aufgrund des gemeinsamen genomischen Locus besitzen beide Transkripte komplementäre Bereiche zu NaPi-IIb1 mRNA. Die Koinjektion von NaPi-IIb1 mit jeweils einem der Antisense-Transkripte hemmte den Phosphattransport erheblich. Durch Northern-Analysen und Immunhistochemie an Oozyten konnte gezeigt werden, daß diese Beobachtung nicht auf den Abbau der injizierten NaPi-IIb1 cRNA zurückzuführen ist, sondern durch die Hemmung der Proteintranslation hervorgerufen wird. *In vivo* ergaben RT-PCR Untersuchungen, daß die Gewebeexpression von NaPi-IIb1 mRNA mit dem Vorhandensein seiner Antisense-Transkripte verknüpft ist. In Organen, in welchen Antisense-mRNA detektiert werden konnte, konnte keine NaPi-IIb1 mRNA nachgewiesen werden. Dieser Befund weist auf eine mögliche regulatorische Rolle der Antisense-Transkripte im Zebrafisch hin.

## 7 Literatur

**Ausubel F. M.**, Brent R., Kingston R. R., Moore O. D., Smith J. A., Seidman J. G. und Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, 1987.

**Berner W.**, Kinne R., Murer H. Phosphate transport into brush-border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biochem. J.* **160**, 467-474 (1976).

**Busch A.**, Waldegger S., Herzer T., Biber J., Markovich D., Hayes G., Murer H., Lang F. Electrophysiological analysis of Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> cotransport mediated by a transporter cloned from rat kidney and expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 8205-8208 (1994).

**Collins J. F.**, Ghishan F. K. Molecular cloning, functional expression, tissue distribution, and in situ hybridization of the renal sodium phosphate (Na<sup>+</sup>/P(i)) transporter in the control and hypophosphatemic mouse. *FASEB J.* **8**(11), 862-81994 (1994).

**Custer M.**, Lötscher M., Biber J., Murer H., and Kaissling B. Expression of Na-P<sub>i</sub> cotransport in rat kidney: Localisation by RT-PCR and immunohistochemistry. *Am. J. Physiol.* **266**, F767-F774 (1994).

**De la Horra C.**, Hernando N., Lambert G., Forster I., Biber J., Murer H. Molecular determinants of pH-sensitivity of the type IIa Na/P<sub>i</sub> cotransporter. *J. Biol. Chem.* **275**(9), 6284-6287 (2000).

**Dover W. J.**, Miller J. F., and Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* **16**(13), 6127-6145 (1988).

**Elger M.**, Werner A., Herter P., Kohl B., Kinne R. K. H., Hentschel H. Na-P<sub>i</sub> cotransport sites in proximal tubule and collecting tubule of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Am. J. Physiol.* **274**, F374-F383 (1998).

**Feild** J. A., Zhang L., Brun K. A., Brooks D. P., Edwards R. M. Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **258**(3), 578-582 (1999).

**Fire** A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811 (1998).

**Ford** L. T., Wood I. S., Scott D., Rees W. D., Shirazi-Beechey S. P. Towards molecular characterisation of ovine renal Na<sup>+</sup>/phosphate co-transporter; a progress report. *Biochem. Soc. Trans.* **25**(3), 491S (1997).

**Gura** T. A silence that speaks volumes. *Nature* **404**, 804-808 (2000).

**Helps** C., Murer H., McGivan J. Cloning, sequence analysis and expression of the cDNA encoding a sodium-dependent phosphate transporter from the bovine renal epithelial cell line NBL-1. *Eur. J. Biochem.* **228**, 927-930 (1995).

**Hilfiker** H., Hattenhauer O., Traebert M., Forster I., Murer H., Biber J. Charakterisation of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 14564-14569 (1998).

**Hurst** S. R., Hough R. F., Aruscavage P. J., Bass B. L. Deamination of mammalian glutamate receptor RNA by *Xenopus* dsRNA adenosine deaminase: similarities to *in vivo* RNA editing. *RNA* **1**(10), 1051-1060 (1995).

**Innis** M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. and White T. J. PCR protocols: A guide to methods and applications. *Academic Press Inc.* (1990).

**Ishizuya-Oka A.**, Stolow M. A., Ueda S., Shi Y. B. Temporal and spatial expression of an intestinal Na<sup>+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> cotransporter correlates with epithelial transformation during thyroid hormone-dependent frog metamorphosis. *Dev. Genet.* **20**(1), 53-66 (1997)

**Kohl B.**, Herter P., Hülseweh B., Elger M., Hentschel H., Kinne R. K. H., Werner A. Na-P<sub>i</sub> cotransport in flounder: same transport system in kidney and intestine. *Am. J. Physiol.* **270**, F937-F944 (1996).

**Kohl B.**, Wagner C. A., Huelseweh B., Busch A. E., Werner A. The Na<sup>+</sup>-phosphate cotransport system (NaPi-II) with a cleaved protein backbone: implications on function and membrane insertion. *J. Physiol.* **508**, 341-350 (1998).

**Knee R.**, Murphy P. R. Regulation of gene expression by natural antisense RNA transcripts. *Neurochem. Int.* **31**(3), 379-392 (1997).

**Lee R. C.**, Feinbaum R. L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854 (1993).

**Maas S.**, Melcher T., Seeburg P. H. Mammalian RNA-dependent deaminases and edited mRNAs. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**(3), 343-349 (1997).

**Magagnin S.**, Werner A., Markovich D., Sorribas V., Stange G., Biber J., Murer H. Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**(13), 5979-5983 (1993).

**Masure S.**, Geerts H., Cik M., Hoefnagel E., Van Den Kieboom G., Tuytelaars A., Harris S., Lesage A. S. J., Lysen J. E., van der Helm L., Verhasselt P., Yon J., Gordon, R. D. Enovin, a member of the glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) family with growth promoting activity on neuronal cells. *Eur. J. Biochem.* **266**, 892-902 (1999).

**Murer H.**, Forster I., Hernando N., Lambert G., Traebert M., Biber J. Posttranscriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary P<sub>i</sub>. *Am. J. Physiol.* **277**, F676-F684 (1999).

**Pfister M. F.**, Lederer E., Forgo J., Ziegler U., Lotscher M., Quabius E. S., Biber J., Murer H. Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> cotransporters. *J. Biol. Chem.* **272**(32), 20125-20130 (1997).

**Pfister M. F.**, Ruf I., Stange G., Ziegler U., Lederer E., Biber J., Murer H. Parathyroidhormon leads to the lysosomal degradation of the renal type II Na/Pi cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**(4), 1909-1914 (1998).

**Sambrook J.**, Fritsch E. F. und Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

**Sorribas V.**, Markovich D., Hayes G., Stange G., Forgo J., Biber J., Murer H. Cloning of a Na/Pi cotransporter from opossum kidney cells. *J. Biol. Chem.* **269**(9), 6615-6621 (1994).

**Southern E. M.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517 (1975).

**Spencer C. A.**, Gietz R. D., Hodges R. B. Overlapping transcription units in the dopa decarboxylase region of *Drosophila*. *Nature* **322**, 279-281 (1986).

**Tatsumi S.**, Miyamoto K., Kouda T., Motonaga K., Katai K., Ohkido I., Morita K., Segawa H., Tani Y., Yamamoto H., Taketani Y., Takeda E. Identification of three isoforms for the Na<sup>+</sup>-dependent phosphate cotransporter (NaPi-2) in rat kidney. *J. Biol. Chem.* **273**(44), 28568-28575 (1998).

**Terada T.**, Saito H., Mukai M., and Inui K. Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter PEP1. *FEBS Letters* **394**, 196-200 (1996).

**Vanhée-Brossollet C.**, Vaquero C. Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes?. *Gene* **211**, 1-9 (1998).

**Verri T.**, Markovich D., Perego C., Norbis. F., Stange G., Sorribas V., Biber J., Murer H. Cloning of a rabbit renal Na-Pi cotransporter, which is regulated by dietary phosphate. *Am. J. Physiol.* **268**, F626-F633 (1995).

**Werner A.**, Murer H., Kinne R. K. Cloning of a renal Na-Pi cotransport system from flounder. *Am. J. Physiol.* **267**, F311-F317 (1994).

**Werner A.**, Dehmelt L., Nalbant P. Na<sup>+</sup>-dependent phosphate cotransporters: The NaPi Protein families. *J. Exp. Biol.* **201**, 3135-3142 (1998).

**Wightman B.**, Ha I., Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855-862 (1993).

**Zamore P. D.**, Tuschl T., Sharp P. A., Bartel D. P. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33 (2000).

## 8 Anhang

### 8.1 cDNA-Sequenzen

#### 8.1.1 NaPi-IIb1

```

1  agccactctgaagaacagcacagctgagtctggatctgaacgtggtctccatcagcacca
61  gtgcttctgctcaggccaggactgaaggaaacagaagtgcataagagttcaggaaagactg
121  ttggaggagagatacgttccagactgtagataaagtcactgagctcaaaagcaggtgaaac
181  gtagagtgaacagaagtgttcacgtgaaattcagaagggcagaagcaacttgattacat
241  ctccggacaATGGCACCACGTCCAAAGCATGAGCATGAATCTGACGAAAAACAACCAGAAA
      M A P R P K H E H E S D E K Q P E T
301  CACTTGACGGTGCCAGAAAGAAGTCTCTGTCTATGGCTCCGGCTGTTTCTACAGCGGCTC
      L D G A R K K S L S M A P A V S T A A L
361  TGATTGAGGATGATCCCTGGGAAATGATGGAGCTGCAGGACACCGGGGTGAAATGGGCAG
      I E D D P W E M M E L Q D T G V K W A D
421  ATCTGGACACTAAAAAGAAGGTCCTGAGAGTTTTTACTACAGCAGAAAACTGATCATGC
      L D T K K K V L R V F T T A A K L I M L
481  TGCTTGGTTTGTCTACATGTTTGTCTCTGGACGTCCTAAGCTCAGCTTTCCAGC
      L G L L Y M F V C S L D V L S S A F Q L
541  TTGTTGGAGGAAAAGCAGCAGGGGACATTTCCAGGAGAATAAGGTGCTCTCAAATCCTT
      V G G K A A G D I F Q E N K V L S N P L
601  TGGCAGGCCTGGTTATCGGGATGCTGGTCACTCTGTTAGTCCAGAGTTCAGCACATCCT
      A G L V I G M L V T L L V Q S S S T S S
661  CATCTATTGTGGTCAGCATGGTCTCTCTGGAATGCTGGAGGTCGCAACTGCTGTTCCCA
      S I V V S M V S S G M L E V A T A V P I
721  TCATTATGGGCACAAACATCGGCACATCCGTCACCAACACTCTTGTAGCCATTGCACAAG
      I M G T N I G T S V T N T L V A I A Q V
781  TTGGGGACAGGAACAAGTTCGGTAGGGCATTTCAGGAGCCACTGTGCATGATTTCTTTA
      G D R N K F R R A F A G A T V H D F F N
841  ACTGGCTCTCAGTCCTAGTGTACTGCCTCTGGAAGTGGCCTCGGGTTACCTGGAGAAGG
      W L S V L V L L P L E V A S G Y L E K V
901  TTACGAGCCTCATCGTGAGATCGTTTAAACATCGAGAGTGGAGAAAAAGCACCAGCTCTCC
      T S L I V R S F N I E S G E K A P A L L

```



961 TAAATGTTATCACCGATCCGCTTACCCACTCAATCATTCAGCTGGACGAGTCTGTGATGA  
 N V I T D P L T H S I I Q L D E S V M S

1021 GCGGCATTGCGGTTGGCGATCCCGAAGCCAGAAATAAATCTTATCAAGGTTTGGTGCC  
 G I A V G D P E A R N K S L I K V W C H

1081 ACACAGCCTCGAACACGACTGTCCAGAATGTGACCACAACAACTGCACAGATCTTTGTT  
 T A S N T T V Q N V T T T N C T D L C W

1141 GGGAATTGAAGAATGTTACAGAAATTATAAATATTAATAAATGTCAGTCACATCTTCGTGA  
 E L K N V T E I I N I K K C S H I F V N

1201 ACACGAGCCTTTCCGACCTGGCGGTGGGTCTGATTCTGCTGGCGGGTTCTCTGCTCATT  
 T S L S D L A V G L I L L A G S L L I L

1261 TGTGCACTTGCCTCATTTGTATTGTGAAGCTGCTGAATTCGATGCTCAAGGGACAGGTTG  
 C T C L I C I V K L L N S M L K G Q V A

1321 CTGTTGTGATCAAGAAGATAGTGAACACAGATTTCCCTTTTCCATTGCTTGGCTGACTG  
 V V I K K I V N T D F P F P F A W L T G

1381 GATATATTGCAATTCTGGTTGGTGCGGGAATGACTTTTATTGTCCAGAGCAGTTCCGTCT  
 Y I A I L V G A G M T F I V Q S S S V F

1441 TCACATCGGCTATAACTCCTCTTGTGGTATCGGTGTTATAAGTATTGAAAGGCATATC  
 T S A I T P L V G I G V I S I E R A Y P

1501 CTCTATCCCTGGGATCCAATATTGGAACAACACTACTACTGCAATATTAGCCGCCATGGCTA  
 L S L G S N I G T T T T A I L A A M A S

1561 GTCCTGGTGAAACACTTGGAAACTCATTACAGATTGCATTGGTTCACTTCTTCTCAACT  
 P G E T L G N S L Q I A L V H F F F N L

1621 TATCCGGGATATTGTTGTTGGTACCCAATCCCATCACACGTATCCCATCCGACTGGCAA  
 S G I L L W Y P I P I T R I P I R L A K

1681 AGGGTCTTGGTGAAACAACAGCCCAGTACCGTTGGTTGCAGCCTTTTACATCATCCTTT  
 G L G E T T A Q Y R W F A A F Y I I L C

1741 GCTTCTTCGGTTTGCCTCTACTGGTCTTTGGTCTCTCTATGGCCGGCTGGCAGGTACTCA  
 F F G L P L L V F G L S M A G W Q V L M

1800 TGGGAGTCTTGTCCCCATAGCGGTTATTCTGATCTTCGCCATCATTGTCAACATTCTGC  
 G V L V P I A V I L I F A I I V N I L Q

1861 AGAAGCACAAACCTCAATGGCTTCCTTCTGCTCTCCGGTCTTGGGATTTCCCTCCTCTAT  
 K H K P Q W L P S A L R S W D F L P L W

1921 GGGCTCACTCTCTTGATCCATGGGACAGAGTAGTCACTGTCATTGCCGCCGCTGTTGCT  
 A H S L D P W D R V V T V I A A R C C C

1981 GTTGCTGCAAGTCTGCAATTCTAATGAAGAAGATGAGAAGGCGAACTTGAAAATTGG  
 C C K C C N S N E E D E K A K L E N L A

2041 CCAATGGAATCGAGATAAATGATAATACGATGACGACCGTTGAAATCATAGAGCCCAAGA  
 N G I E I N D N T M T T V E I I E P K K

2101 AAACAGTGGACAGTTGCGAAATCCTGAAGGCAACATCTTTA**TAG**atgcatacaaagcatt

T V D S C E I L K A T S L \*

2161 . ataggttattattaaacatatctaaatcaaaactggctttgatTTTTGGTaccagagttg  
 2221 . acagtatgcaaatatcagtggaactttaagagtttatgtcactctgtatTTTcttaaattaa  
 2281 . tttttttatacagcaatgctatTTTtataggacattgtaaatgTTgcaatatatttaa  
 2341 . tatacaatcttatgtttacacactgtgagatctggTgattgTgtcgtacttTgtccagtg  
 2401 . tgaaaaggataactTgtttatTTtaataaccattcggaggatataaaagcCaaagacaaat  
 2461 . atatattcagatttaaataagacgtcaaccctgatctgtgcattgTtctttattcatgat  
 2521 . aatgttcttTgtatTTtatgtcaaatatTTtaacatgtgctttctatactgtaaaatatta  
 2581 . ttatgatattaaacaataatttctctgc

### 8.1.2 NaPi-IIb2

1 . ccttccgctgtgCGcttctgttgagctgCGTgtcagtcTgaATCTCTGGTTCTCTCCA  
 \* I S G S P P

61 . GGAGCGGACGGGACAAACATGAGCCCCAAACCCGACGCGCACCCCTCAGTCCCTGGCCC  
 G A D A D K H E P Q T P T R T L S P W P

121 . GCGCAGCAGTGGGAGCCGGAGCAGGAGGAAGGTTGACCCGTGGGAGCTGCCGGAGCTC  
 A Q Q W E P E Q E E E V D P W E L P E L

181 . CTGGACACCGGGGTGAAGTGGTCAGAGTTGGACCGGCGGAAAGTCTCTGCGGGTCTGC  
 L D T G V K W S E L D R R G K V L R V C

241 . ACCTCTGCTCCTGAAGTGTGCTGCTGCTCGGCCCTGCTCTACATGTTCTGCTGCTCCCTG  
 T S V L K L L L L L G L L Y M F V C S L

301 . GACATCTCAGCTCTGCTTTCCAGCTGGTCCGAGGGAAGGCAGCGGGGACATCTTTAAA  
 D I L S S A F Q L V G G K A A G D I F K

361 . GATAATGCGGTGCTGTCCAACCCTGTGGCCGGGCTGGTGATCGGGGTGCTGGTCACGGTT  
 D N A V L S N P V A G L V I G V L V T V

421 . CTAGTCCAGAGCTCCAGCACCTCCTCCTCCATCGTGGTCAGCATGGTATCGTCTGGATTG  
 L V Q S S S T S S S I V V S M V S S G L

481 . CTGGAGGTGAAGTCAGCAGTGCCTATCATCATGGGTGCAAATATCGGCACTTCAGTAACA  
 L E V K S A V P I I M G A N I G T S V T

541 . AACACTATTGTGGCCGTGATGCAAGCTGGAGACCGCAATGAGTTTCGCAGGGCTTTTGGC  
 N T I V A V M Q A G D R N E F R R A F A

601 . GGGGCGACGGTGCATGACTTCTTCAACTGGCTGTCGGTGTGCTGGTCTCTGCCTCTGGAA  
 G A T V H D F F N W L S V L V L L P L E

661 . GTGGCCTCAGGGATGCTCTACAGACTCACCAAACCTGTGATCGATTCTTCAACATCCAG

V A S G M L Y R L T K L V I D S F N I Q

721 .  
ACGGGCGCAGACGCTCCAGACCTGCTGAAAGTCATCACAGAGCCGCTCACCAAGAACATC  
T G A D A P D L L K V I T E P L T K N I

781 .  
ATTGAGCTGGACACCTCTGTGATTTCGTGACATCGCCACTGGAGACCCTGCTGCCCGGAAC  
I E L D T S V I R D I A T G D P A A R N

841 .  
AAAAGTTTGATCAAGATCTGGTGTAACCGGAAAAAATTACGAACCTGGTGAACGTGACC  
K S L I K I W C K T E K I T N L V N V T

901 .  
GTCCCGGGAATCGCAAACCTGCACTCCGGACGCCCTGTGCTGGGTGGATGGAGACTTGATC  
V P G I A N C T P D A L C W V D G D L I

961 .  
TGGACCCAAAAGAACCAAACCGATAACCATCTACTTGAAGAAATGTACGCACATGTTTCGTG  
W T Q K N Q T D T I Y L K K C T H M F V

1021 .  
TTTTCGGATCTGCCTGATCTGGCGGTGGGTTTGATCCTGCTGGCTCTGTCTCTGCTGGCT  
F A D L P D L A V G L I L L A L S L L A

1081 .  
CTCTGCACATGCCTGATCCTCATAGTTAAACTCCTGAACTCCATGCTGAAGGTCAGGTG  
L C T C L I L I V K L L N S M L K G Q V

1141 .  
GCCGTGCTCATCAAAAAAGTCTCAACACAGATTTCCCTTCCCCTTCGCCTGGGTTACA  
A V V I K K V L N T D F P F P F A W V T

1201 .  
GGATACCTGGCCATCCTCGTGGGAGCCGGAATGACCTTCATTGTTTCAGAGCAGCTCCGTC  
G Y L A I L V G A G M T F I V Q S S S V

1261 .  
TTCACCTCCGCCATCACTCCTTAGTCGGTATTGGTGTGATCAGTTTGGAGAGACATAT  
F T S A I T P L V G I G V I S L E R A Y

1321 .  
CCACTCACACTGGGCTCCAACATCGGCACAACCACCACTGCTATACTGGCGGCCATGGCC  
P L T L G S N I G T T T T A I L A A M A

1381 .  
AGTCCTGGAGAAACTGGCCAACCTCGCTACAGATTTCTCTGTGTCACCTTCTTTTCAAC  
S P G E T L A N S L Q I S L C H F F F N

1441 .  
ATCGCTGGTATCCTGTGTGGTACCCCATCCCTTCACACGTGTGCCATCCGACTGGCC  
I A G I L L W Y P I P F T R V P I R L A

1501 .  
AAAGCGCTGGGCAACCGTACAGCTAAATACCGCTGGTTCGCGGGCCTGTATCTCATTCTC  
K A L G N R T A K Y R W F A G L Y L I L

1561 .  
TGCTTTCTGCTGTTTCCGTTGACCGTCTGGGACTCTCCATTGCAGGATGGCAGGTCCTG  
C F L L F P L T V L G L S I A G W Q V L

1621 .  
GTGGGCATCGGGGTGCCAGTGTGGTGTGCTCGCCATCTTTGTGATTGTGGTGAACGTCATG  
V G I G V P V L V L A I F V I V V N V M

1681 .  
CAGAAACGATGCCCTCGCTTTCTGCGCTCGTTCATCCGCAGTTGGGAGTTTCTGCCCAAA  
Q K R C P R F L P S F I R S W E F L P K

1741 .  
CCGCTGCACTCTCTGAAGCCCTGGGACCGAGTGGTGACTGCGGGAATGAGCTTCTGCAGG  
P L H S L K P W D R V V T A G M S F C R

1801 .  
ACTCGCTGCTGCTGCTGTAAATGCTGCAGAAATGAAGAGAAAAACCACATGGAGAAC  
T R C C C C K C C R N E E K N H M E N

1861 AACGACAGGAGCCTGGAGATGTACGACAATCCAGCACTCGGTATAGAGGACGAGGCTAAA  
 N D R S L E M Y D N P A L G I E D E A K

1921 GTGACTGCCACACATTTA**TAA**tgctacatggactccatttttaatttatgcaagtcgtggt  
 V T A T H L \*

1981 ttgatgatcgcagggtgaagcaccatgactttttaagctgctattggttttagtttggt

2041 tataatgctgcat

### 8.1.3 Antisense I (AS-I)

1 GGGGGGGGGG GGGCCGTGAG AAAACATTT CTGGAAGGAA GGAAACCCGA

51 GCACTGAGGA CCGACACCAG GAAATGGAGA TCTGACGTGG AGCAGATCAA

101 AAGGTAGGGA GAGTGGGGAC GGACGGTTGC AACAAAGACTC CTCATTTCAG

151 GAATGAGCTA GAGTGATGAT ATTACTACAT ATTCTTATAT AGACCCTCCT

201 TCAATCTCAG AGAAATCATC CATATGCGAC CATTCCCTTCA GTATAAAGCC

251 TGTTTTAAGA TGGCAGTGTT GCTTCACTGA GGAAATATTT ATTCTGCAGT

301 GTGCTGGGAC TCCTGGGAGG ACCAAGAAGA TGGTTAAGAA TTGCAGCACT

351 TGCAGCAACA GCAACAGCGG GCGGCAATGA CAGTGACTAC TCTGTCCCAT

401 GGATCAAGAG AGTGAGCCCA TAGAGGAAGG AAATCCCAAG ACCGGAGAGC

451 AGAAGGAAGC CATTGAGGTT TGTGCTTCTG CAGAATGTTG ACAATGATGG

501 CGAAGATCAG AATAACCGCT ATGGGGACAA GAACTCCCAC GAGTACCTTC

551 CAGCCGGCCA TAGAGACCAA AGACCAGTAG AGGCAAACCG AAGAAGCAAA

601 CGATGATGTA AAAGCTGCA AACCAACGGT ACTGGGCTGT TGTTTCACCA

651 AGACCCTTTG CCAGTCGGAT GGGGATTCTT GTGATGGGGA TTGGGTACCA

701 CAACAATATC CCAGATAAGT TGAAGAAGAG GTGAACCAAT GCAATCTATA

751 GCAACCTGTC CCTTGAGCAT CGAATTCAGC AGCTTCACAA TACAAATGAG

801 GCAAGTGAC AGAATGAGCA GAGAACCCGC CAGCAGAATC AGACCCACCG

851 CCAGGTCCGA AAGGCTCGTG TTCACGAAGA TGTGACTGCC TGTGTGAAAA

901 GAGAACAACG TAAAAGAAAG AGACCATGCT GACCACAATA GATGAGGATG

951 TGCCGGAGCT CTGGACTAGC AGAGTGACCA GCATCCCGAT TACCAGGCCT

1001 GCCAACGGAT TTGAGAGCAC CTTATCTTCC TGGAAAATGT CCCTGCTGC

1051 TTTTCCTGAA AAAAAAAAAA AAAA

### 8.1.4 Antisense II (AS-II)

1 GGGGGGGGGG GGCCGTGAGA AAAACATTTT TGGAAGGAAG GAGACCCGAG

51 CACTGAGGAC CGACACCAGG AAATGGAGAT CTGACGTGGA GCAGATCAAA

101 AGGTAGGGAG AGTGGGGACG GACGGTTGCA ACAAGACTCC TCCATTTCAGG

151 AATGAGCTAG AGTGATGATA TTAATACATA TTCTTATATA GACCCTCCTT

201 CAATCTCAGA GAAATCATCC ATATGCGACC ATTCCTTCAG TATAAAGCCT  
 251 GTTTTAAAGAT GGCAGTGTG CTTCACTGAG GAAATATTTA TTCTGCAGTG  
 301 TGCTGGGACT CCTGGGAGGA CCAAGAAGAT GGTAAAGAAT TGCAGCACTT  
 351 GCAGCAACAG CAACAGCGGG CGGCAATGAC AGTGACTACT CTGTCCCATG  
 401 GATCAAGAGA GTGAGCCCAT AGAGGAAGGA AATCCCAAGA CCGGAGAGCA  
 451 GAAGGAAGCC ATTGAGGTTT GTGCTTCTGC AGAATGTTGA CAATGATGGC  
 501 GAAGATCAGA ATAACCCTA TGGGGACAAG AACTCCCATG AGTACCTGCC  
 551 AGCCCGCCAT AGAGAGACCA AAGACCAGTA GAGGCAAACC GAAGAAGCAA  
 601 AGGATGATGT AAAAGGCTGC AAACCAACGG TACTGGGCTG TTGTTTCACC  
 651 AAGACCCTTT GCCAGTCGGA TGGGGATACG TGTGATGGGG ATTGGGTACC  
 701 ACAACAATAT CCCGGATAAG TTGAAGAAGA GGTGAACCAA TGCAATCTAT  
 751 AGCAACCTGT CCCTTGAGCA TCGAATTCAG CAGCTTCACA ATACAAATGA  
 801 GGCAAGTGCA CAGAATGAGC AGAGAACCCG CCAGCAGAAT CAGACCCACC  
 851 GCCAGGTCCG AAAGGCTCGT GTTCACGAAG ATGTGACTGC CTGTGTGAAT  
 901 AGAGAACAAC ATAAAAGATC CTGGCCTGAG CAGAAGCACT GGTGCTGATG  
 951 GAGACCACGT TCAGATCCAG ACTCAGCTGT GCTGTTCTTC AGAGTGGCTC  
 1001 AGTTCGGCCT CTGTTGGGTC ACAGGCATTT ATAGCCCTCC GCAGATCATC  
 1051 CAGGATTCCT CTGTTCCAAG GTTTACCACG GACTGATAA CTCTCTGCGA  
 1101 CAGGAAGTTT GTCTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTCTGC GTGTGTGCAT  
 1151 GTGTGTGTGT GTGCTGTGCA TGGTCAAAG TGTCCGCTGT GGCATCAGAT  
 1201 AAAGTGGATT TAAAAGGTA AAAAAATATAT ATAAAAGTCC TTATTAGTAG  
 1251 TTATGATGGT AATACACAGT ACGGCCTTTA TTAATGTAAAG TTACATATAT  
 1301 ACTGTATTTT TGTTTTAGAT CAAATACTGT TTAATGTGGC TTTATTAATA  
 1351 TGTGTGTGTA TGTAATAAAA AAAAAAAAAA AAAA

## 8.2 Genomische-Sequenzen

### 8.2.1 NaPi-IIb1 mit Antisense-Sequenzen

#### a) Klon 1A<sub>2</sub>

		<i>TGT ATGTGTGTGT</i>	<i>Exon 4</i>
	<i>AAAATATTTT CGGTGAATT TGTCATAAAC TAGATTTTGT CTTATGTCA</i>		<i>AS-II</i>
	<i>TATATACATT GAATGTCATT ATTTCCGGCA TGACACATAA TGGTAGTATT</i>		
	<i>GATGATTATT CCTGAAAATA TATATAAAAA ATGGAAAATT TTAGGTGAAA</i>		
	<i>TTTTAGGTGA AATAGACTAC GGTGTCGCCT GTGAAACTTG GTACGTGTTCG</i>		
1	AAAATCCACT TTATCTGATG CCACAGCGGA CACTTTGAAC CATGCACAGC		genomisch NaPi-IIb1
	<i>TGTGTGTGTG TGTACGTGTG TGCCTCTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG</i>		
51	ACACACACAC ACATGCACAC ACGCAGACAC ACACACACAC ACACACACAG		
	<i>TGTTTGAAGG ACAGCGTCTC TCAATAGTCA GGGCACCATT TGGAACCTTG</i>		
101	ACAAACTTCC TGTCGCAGAG AGTTATCAGT CCCGTGGTAA ACCTTGGAAC		

151 *TCCCCTTAGG ACCTACTAGA CGCCTCCCGA TATTACGGA CACTGGGTG*  
 AGGGGAATCC TGGATGATCT GCGGAGGGCT ATAAATGCCT GTGACCCAAC  
 201 *TCTCCGGCTT GACTCGGTGA GACTTCTTGT CGTGTCACTC AGACCTAGAC*  
 AGAGGCCGAA CTGAGC**CACT** **GTGAAGGACA GCACAGGGAG TTTGGATCTG**  
 251 *TTGCACCAGA GGTAGTCGTG GTCACGAAGA CGAGTCCGGT CCTGA*  
**AACGTGGTCT CCATCAGCAC CAGTGCTTCT GCTCAGGCCA GGACTGAAGG**  
 301 **AAACAGAAGT GCATAGAGTT CAGGAAAGAC TGTGGAGGA GAGATACGCT**  
 351 **TCAGACTGTA GATAAGTCAC TGAAGTAAA AGCAGGTGAA ACGTAGAGTG**  
 401 **AACAGAAGTG TTGCACGTGA AATCAGAAG GGCAGAAGCA ACTTGACTAC**  
 451 **ATCTCAGTA** ATTACATAAA TCCTAATAAA AAAATAAAGT TCTGTTTCTG  
 501 TGTTAGGCTT TATTTAAATA CATATAACA CACAGATACA GCTAAAATGC  
 551 TATTTTAGAA ATCTTGATTT ATCCAAAGGT ATAATTTATT AATTCAGTGT  
 601 TAATAAATA TCAATTTTGT CTTGTTCTGC AACTATGGC TGACAGTTTA  
 651 ACCGCATTTT TATCATTTCT TTTNGTATAA AATAGCCCAA AACCGACACN  
 701 TTTAAATAT ATTCTTTTTT TTTTAAAT ATTTGGCCA TTCCAGGTA  
 751 ATAAAACTA TTACAATACG TTTATTTAAA AAATGAGAA ATGTTATCAA  
 801 ACCTNCATAA AAATANAGCA AATATTAAGA TTTCTACTAA AATTTATCAG  
 851 CATTGCTTAC TTTAATCTT CCTGGCCATT TTTTATCCTC CTTTAAAGCC  
 901 AAAACATCCA AAATATGAAA TTCCTTTGTA CTATTTACAG ATTTTTTAGT  
 951 CATCAGATTA AAAAAAAAAA GTGAACACAT AACCGCATA CAGTAAGATGA  
 1001 ACCATGGAGT AATTCACATT TTGTCACCG AACCACTGTG GAAATTATTT  
 1051 GGCACAGAGC AGAAATCAAT ACACCAACAA ACCATGCGAG TTTAATCCAA  
 1101 AGAGGAAACT CTGACTGTTG TGAAGCTCTC CCTGTTGTGT TCATTCATGT  
 1151 ACTACAAAT CGAAATACGA CAATATGTGA AAGTTCAAGT TTATAATTTA  
 1201 ATTATTTGTC TTATTATGTA TTTAACTGAA ATACAGAAAT TCTTTACCTA  
 1251 CATCTGAATA AACAGTATAT ATATACACTT TAACAGAGCA AGGAAATTTT  
 1301 CACTGTATGT CGGATAATAT TTATTGCTT ATTTCTTTT TTCAGCTAGA  
 1351 ACAAAGCAG TTTTAAATTT TTTAAAACT ATTTTAAAA ACTATTTTAA  
 1401 GGTATTTTAA GGTTTTTCGA TAGTCTACAG AACAAACCAT CATTAAACAA  
 1451 TAACTTGCC T AATTACCTA ACCTGCCTAG TTAAGTTAAT TAACCTAGTT  
 1501 AGGTCCTTAA ATGTCACTTT AAGCTGTATA AAAGTGTCTT GAAAAATATC  
 1551 TAGTCAAATA AAAATAAATA AGTTATTAGA AACGAGTTAT TAAACTATT  
 1601 ATATTCTAGA AATGTGTTGT AATTTTCCC TCTCCGTAA ACAGAAATG  
 1651 GGTGAAAAA CTAACAGGA GGCTAATAAT TCAGGGGGG TAATATTGT  
 1701 GATATCTACT GTCACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA  
 1751 CACACACACA CACACACACA CACACACACA TATATATATA TATATATATA  
 1801 TATATATATA TATATATATA TATATAGTTA TATCATGTTA TTTCTTCAC  
 1851 ACCAATAAAA CAATTTTAAA ATAGTAAAAC ACCTTTTTTT ATCTTTATAC  
 1901 CTGACTGCAG TATCGCGTG AACATCAGGA AATGATAACA TTTTAGTAC  
 1951 ATTTGTTAAG ATGCCGCAAG CAATTCACA TCGTCTGCC CATAAACTG

Exon 1  
NaPi-IIb1

2001 AAAAGACCTC AATATAACTG ACAAACCTGAA AAATTTGTCT TTCAC**AGACA** Exon 2

2051 **ATGGCACCAC GTCCAAAGCA GGAGCATGAA TCTGACGAAA AACCAACCAGA**

2101 **AACACTTGAC GGT**ATGTATG AATATGTGAA TATATGGTTC CCCACCACA

2151 TAAGCAACTT TGAAAATACC TACTAGTCTT AATATTCTAC TAATAATATA

2201 TGAAGAGTCT AAGACAGAAT TTAACCTGCA AATCACTAAT AGTCAAAAAGA

2251 ATATCNNANA GGCACCATTA AAATAAAAGT GCAAGCACTG TCCGTGTCTA

2301 GACTGCTTTA AAATCTAAAT GAAAGCCGTT CTCTC**ATGTG** **CCAGAAAGAA** Exon 3

2351 **GTCTCTGTCT ATGGCTCCGG GCTGTTTCTA CAGCGGCTCT GATTGATGAT**

2401 **GATCCCTGGG AAATGATGGA GCTGCAGGAC ACCGGGGTGA AATGGGCCGG**

2451 **TAGGGTGAAC** ATTTGTTTAT AAGGGTGGCA GTGATCATTC TTTCAGTCGA

2501 CCTTAATGAT TAGTAGCTTT TACAGCCATA TACAGAAGTG TATTTATNNT

2551 ATTATGTANT GTGTCNGCCT CTAAATGATT AACATGATCA AAACCTGGTT

2601 GGTAAAAAAA ACTNNTNGTGC TCATTGATAA GAAAATTAAC ATTTATATAT

2651 TTTTACATGC ATTTAGCCTT CTGTTTGTTC TTGATAAAGC AAATTCACCA

2701 AATAAAGTC CCCATTTTAG TACACACTGA TGACTTTTTT TTTTCTATAT

2751 TTAATAAAG TTGTTTTTGG CCTTAAAATA ACAAACAAA GTTTTTCAGG

2801 CATGTTTCTA ATAATTAATC TACAGTGCTC TGCATAATG AGTACACCCC

2851 ATTTTGAAAA TGATTTTTTT TTCAATGTTT CAGTGAATAT AGGCAATGTA

2901 TTTTGGTGCA TTTAAACAGA ACAGAACTAA ACACAGCAAC ACAGTACTAC

2951 TATACATTTT AGAAGTGTGA AGAAATCAAC ATTCAGTGGA ATAACCATGA

3001 TTTTTATCGT ATTTGTTTTA TTTTCTGTGC TGATATTTGT **TTAGATCTGG** Exon 4

3051 **ACACTAAAA GAAGTCTCTG AGAGTTTTTA CTACAGCAGC AAAACTGATC**

3101 **ATGCTGCTTG GTTTGCTCTA CATGTTTGTT TGCTCTCTGG ACGTCCTAAG**

3151 **CTCAGCTTTC CAGCTTGTCTG GAGT**ATACA TTAAAATTAC AAATATAGTT

3201 ATAGTTACCA AGGTTTTTAG GTTGAGTAAA ACATGCTCTT CACTGCAAGA

3251 TCCATACTGG TGATATCTTT TAGAGTACAT TAGATCAATA CATGTTTTTG

3301 TGGTTCTTCA AATTAGTGTA CAAAATGTAC AAATATGTTG TAATCATGTA

3351 TTTTTATAAT TTGTAAGA TTTGCTGTAC AACTTTCCT TAAAATATGC

3401 CTAACAATTG GGTGTTTTTC TTTTTTTTTT TCTTC**AGGAA** **AAGCAGCAGG** Exon 4(AS-I)  
Exon 5

3451 **CCTGTAAAAG GTCCTTCTAT TCCACGAGAG TTTAGGCAA CCGTCCGGAC**  
**GGACATTTTC CAAGGAAAAT AAGGTGCTCT CAAATCCGTT GGCAGGCCTG**

3501 **CATTAGCCCT ACGACCAGTG AGACGATCAG GTCTCGAGGC CGTGTAGGAG**  
**GTAATCGGGA TGCTGGTCAC TCTGCTAGTC CAGAGCTCCA GCACATCTTC**

3551 **TAGATAACAC CAGTCGTACC AGAGAAGA**  
**ATCTATTGTG GTCAGCATGG TCTCTTCTGG AAGT**GAGTAT CTAACGATAT

3601 TATTTGCTAT AATAAAATTG ATTATTAGAA GATTATGAGA ATTAAAAAAA

3651 ATATTGAATG TGTAATTTG AAATTGTATT CTAATAACTA ATTATGACAT

3701 ATGCAGTATT TAATATTGAT TTATATTTGT AAATGTCTTT GAGATTTAAA

3751 CTTGTATTTT ACTTGAGCAT ATTACTTTAA AGCACAATGT GTGAACAATA  
 3801 CTGAACCTTAT TTGATGAATC TCATTATTAA GTAAAGCATC GTCTAATCGA  
 3851 AGGTCAGAAC AAGTAAAATA GAAGTAAATT GTAAAATGTG GATACTAATT  
 3901 AATGTAAACT ACTCTTCAAC **AGTGCTGGAG GTCGCAAATG CTGTTCCCAT** Exon 6  
 3951 **CATTAGGGCA CAAACATCGG CACATCCGTC ACCAACACTC TTGTANCCAT**  
 4001 **TACACAAGTT GGGGACAGGA ACAAGTTCCG TAGGTAAGAT** ATGAACAAAC  
 4051 AATTTTATAG GAAAATTAAC AGAGCATATT TATTTCTCAA TTGTTGATCA  
 4101 TGTAATGCTT TAGATCAGGG CTGCTCAACC CGGTTCCCTGG AGATCTACCT  
 4151 TCCTGCAAAG CTCAGCTCCC ACCCTGATCA AACACACCTG AACCAATTAA  
 4201 TTAGGACCTA AACAGCACTT GATAATTACA GGCAGGTGTG TTTGAAATGG  
 4251 GTTGCAACTG AAACCTGCAT GAAGGAAGAT CTCTAGGAAC AGGTTGAGC  
 4301 ACCCCTGCTT TAGATCATAG GTGTCAAACCT GGAATCCTGG AGGGCCACAG  
 4351 CTCTGCACAG TTTTGTCTCA ACCCTAATCA AACACAGCTG ATCCAATTAA  
 4401 TCAAGGTGTC CAAGACTTCC ATCAACTATT AAGCAGGTGT GATTTGGAGG  
 4451 TGTTGGAGA TAAACTATGC AGAGCTCTGG CTCTCAAGAA ATTGAGTTTG  
 4501 AGACCATCGC TTTAGAAGAT TCAGAATATA CACTCAAATA TTATGTTTGC  
 4551 AGCTTGTTCA CACTAGTTAT TTCAAGTGAG CTGAAACAAA CCAATTCTTG  
 4601 AGATTTTGGG GGGACACTTA ATTGGTTCAT GTTCAATTAA CTAACATTTG  
 4651 GTAGGTTAAC AATCCAATTG ATGTTGGGAC AACATAAATT AATTGTGTAG  
 4701 AACCATGCAG TTTTTTACAG AGTCCATCAT TTTATTCATT TTAATTAATG  
 4751 GTCTATGAAG ATATGTCCA ATTTAAATAA TATCCNGTAT AAATATATCC  
 4801 TGTATAATAT ATATATATAT ATATAAATAT ATTTTTTTTA TTTTTTAAAA  
 4851 TACTATTTTT AAAGTTTTTT ACATTTTAAA AAACACATGT CAGTCAGCAA  
 4901 ATAATAATAA ACAAACACAT GTAAAATATA AAGTTATATG CACACCCAAA  
 4951 AATGTACAGA TACTTAATCT TATACCTCCA TGAATAATTT ATACATGCAC  
 5001 ATATGTAGAG TCCCCTCAA CATCTAAATT ACATATAGTG CATAGATATA  
 5051 TCATTAATGA AAATGATGAA AACAAAGAGG AAAAAAGAAA AGGAAAAGGA  
 5101 AAAAAAGAGT ACCATTATGT TTGAAAAATG GTCAAATTGA ATATTTCCCTT  
 5151 AATTTGCTCA GTAATGTTTCG TATAACAGAA AAACAAACAC AAAGTTATTA  
 5201 ATAAAGAACT GGGCATTTTA GATGGAAAGA ACAACCAGAA ATAACAATTT  
 5251 TATAGCTTAT AGTTTAATTC ATAAGTTAAA GCAGGGCTGC TCAAACGGTT  
 5301 TCTTAAAAAG TGCCAAAAAC CAAATATCAT TGAGAGCCGT TGGCCAAAGA  
 5351 TAATTATACC AAAGTGATTT ACATTAAGTT GTCATGTGTT CATTTTCATAT  
 5401 CTTATTTTCAT AACATTTCAA AAATAAATTG AAAACATTGA TTTAAATTGT  
 5451 TTTATCTAAT GCAGTATAGC TTTTAAAGTG ATAGCTTATT GGCAATAAAA  
 5501 ACATTGACAA GCTCAATGCT GAATACATTA GTCAAGCAGA ATCTGCCCTT  
 5551 GACTTGATTT GCTCACCAA TTCTCTGCAT TGTCACAGCA TGTACATTTA  
 5601 AATAAAATCT TATTAATTTA CACCGTTTAA TCGAAACATT TAATTTTAGT  
 5651 TAGCTTTTAA CAATAAAACA AACAAAAATG TACCTAAAAT TTGAATGGAC



5701 AATCTCTAAA CTCTCTCTAT CATTCTCCCT CTCTTCTCAG ACGGGATGGC  
 5751 GAGCCAAATA AAAAGTTATT TTGGGCCAAC TTTTGCCAC GGGCCCTAGT  
 5801 TTAAGCATCT CTGACTTAGA CTAAGTGTC AAGAGCAAAT GACTGGGGAA  
 5851 TTATTCTGTC AAACCAATT TCAGAGACTC GTACAATACT GTAATCATTT  
 5901 AGTATGAAGA TATTTATAAT ATTAATTTGG GATATGATTT TATTTTGTGT  
 5951 GTGC**ACGGCA** **TTTGCAAGGAG** **CCACTGTGCA** **TGATTTCTTT** **AACTGGCTCT** **Exon 7**  
 6001 **CAGTCTGGT** **GCTGCTGCCT** **CTGGAAGTGG** **CCTCGGGTTA** **CCTGGAGAAG**  
 6051 **GTTACGAGCC** **TCATTGTGAA** **ATCGTTTAAAC** **ATCGAGAGTG** **GAGAAAATGC**  
 6101 **ACCAGCTCTT** **CTAAATGTTA** **TCACCGATCC** **GCTCACCCAT** **TCAATCATTC**  
 6151 **AGGT**ATGTAA GAGTGTATTT GTTCTGTCGG TATGTTGAAA GCAGGTACAA  
 6201 TCATTAATAA CAGCGCAAGA ATGTGAATTA CCCCATGCGT TCACCTTATAT  
 6251 TGCCCTATG TACAGTACAA AGTTACAAGG GTTGCGGTTC AGAAAGGTTA  
 6301 ATAATCGTAA ACTATTTGTA AGATTAGACG ATAAATATGC ATAATTCGCA  
 6351 TATTAATGTT TTATCTTTCA **GCTGGACGAG** **TCTGTGATAA** **GCGGCATTGC** **Exon 8**  
 6401 **GGTTGGCGAT** **CCCAGGCCA** **GAAATAAATC** **TCTTATCAAG** **GTCTGGTGCC**  
 6451 **ACACAGCCTC** **AAACACGGTA** ATGATCGGAA TTAACAGAA TAAAAATTT  
 6501 CATTATTTTG TGTCAAAACC TCATTCTCAT TTTTATTTTG TGTCATTTTA  
 6551 **TAGACTCTCC** **AGAATGTGAC** **CACAACAAAC** **TGCACTGATC** **TTTGTGGGA** **Exon 9**  
 6601 **ATTGAAGAAT** **GTTACAGAAA** **TTATAAATAT** **TAAAAAATGT** CAGTTTAAAA  
 6651 ATGACTTCTC TACCGATGAT ATTAACACTG ATAATCGTCT AAATGTAAAA  
 6701 TGAGTACAGT GCTCAAACAA **TGA** **GAAAATACAA** **CAAGAGATAA** **Exon 3 (AS)**  
 GACTCCTACT CTTTACGTT GTTCTCTTTT  
 6751 **GTGTGTCCGT** **CAGTGTAGAA** **GCACTTGTGC** **TCGGAAAGCC** **TGGACCGCCA** **Exon 10**  
 CACAC**AGGCA** **GTCACATCTT** **CGTGAACACG** **AGCCTTTCGG** **ACCTGGCGGT**  
 6801 **CCCAGACTAA** **GACGACCGCC** **CAAGAGACGA** **GTAAGACACG** **TGAACGGAGT**  
**GGGTCTGATT** **CTGCTGGCGG** **GTTCTCTGCT** **CATTCTGTGC** **ACTGCTCA**  
 6851 **AAACATAACA** **CTTCGACGAC** **TTAAGCTACG** **AGTTCCTGT** **CCAACGA**  
**TTTGTATTGT** **GAAGCTGCTG** **AATTCGATGC** **TCAAGGGACA** **GGTTGCTGTT**  
 6901 **GTGATCAAGA** **AGATAGTGAA** **CACAGTCAG** CATTATTGAG ATACTTTAAG  
 6951 AGTCAAATAG ATATGAAACG ATACAGTTTG CATAATTAAT ATGCATTTAA  
 7001 CTTTTATGAA AACAATAGCT AATAGAGTGA AATATGTCCA AACCCAACCC  
 7051 ACTGACTTGG AAAATAAATN TANTATAATA AATTNGTAAA AATTATTGTA  
 7101 AAAACAATTC ATTTAAGTC TGCAGTACAC AAAATAGTGT TGAAACAGAC  
 7151 CAGCATATTT TCCAGAGTGT GATTTTTAAA ATGTTTAAACA GATGAATACA  
 7201 GATGTTTTTC AATGATGTTT TCTTGTGTTG TAC**AGATTTC** **CCTTTCCAT** **Exon 11**  
 7251 **TTGCTTGGCT** **GACTGGATAT** **ATTGCAATTC** **TGTTGGTGC** **GGGAATGACT**  
 7301 **TTTATGTGCC** **AGAGCAGTTC** **CGTCTTCACA** **TCGGCTATAA** **CTCCTCTTGT**  
 7351 **TGGT**GAGGAC AACCATCTGT CTATTATTTG TCTTTTATAA AGGTATTGTG  
 7401 ATCCAATGAA TAGTTATGGA TCCTCTTATF CTAGTCCATG AGCCACGATG

7451 CACATATTGC AACTCACGGA GGAAAAATAA ATAAATAAAA AAAATCCATC  
7501 CAAAATTCCC AATCAGGACC TAAGTCTGAC CTGGGGGATG GTGGGTCCAA  
7551 ATAGCTGTGG AGAGGATAAT TCCCCTCAGG ACCCCGTCTG ACCTGGGGGA  
7601 TGGTGGGTCC AAANAGCTGT GGCCAAGATN ATCCCCATTC CGGGACCCCA  
7651 GTCTGACCTG GGGGTATGGT GGGTCCACAA ACCGTGCC

## b) Klon 2a2

1 AAAANTTTTT NCTGCCAAAA TTNAATTCCA CCTNCCNNA NGCTTAGGTA  
51 TGGTTTGGTN GNAGNGGTTT GCGTTTACAT TTTTNGTCCG TAAATTAGTA  
101 AAGGTAAATT NGCCNTANGG TTTAANCATA AACGTTTTTT ACGANAACAA  
151 NNCCTTTCCN NAANAACNTT CAGCCNCGGG AANTCCTTGT TGTACNTCTT  
201 GTAAAGTTTT TTACTTTAAN CAAAGGGTTT GTTTTGATAT CATGTAGCCA  
251 TTCCGTAGCT TAGACAAGAT AAANANAAAA ACGTTTAGGC CCTCGGAAGA  
301 AATGNGTAT TTTATTTTTT CGCCTGTTTA TTTTTTAAAA ATAAAGNGCA  
351 TTTTTCATAT TATATACTGC AGTTGAATTN TAAGCTCATT AAAATTGAAC  
401 GGCTCTGTAA ATTAAGCAAA AAAAAATTAT ATTGNCAAAT CAATCAATAT  
451 TTCCTGAAT TGAAACTTAA GAATTAGCTT GAAGATCAAC AATATATTGA  
501 TCAATCAATA TTCCACTAAA TCTAACAGAA TGTATACCAT ATCACAGCAT  
551 TTTTTGAAGT ATCAACAAAT ATCAAATCGT GGCTGAAAGC AACAATATTA  
601 TATTGTATCA TGATGAGACA TCTGGTTTCG ATATATTGAT CCATATTCCA  
651 CTAAATCGAA TAGAATTTTT AAAATAAAAA CATAAGGCAA TAGCGACACA  
701 ATGTTCTCA AAAAAAAGC TAAATTACCA CTTACCCTGC TTTTTGGTT  
751 GAATTTGGGT TTTCAAATCT TCTGTTACTT AGTTTGTTAA TAGAAGACTA  
801 AGTAATCTCC TATTACTCTG TCCAATTTGT ATATTAATCA TATAGCTTTG  
851 TTTATTGAAC CAGATCAATC CATGGAATAA GAAATAAAGA TAATTATCTT  
901 AAACTTTAGA TAGTTCCTCA CATAATAAAA TATTCCAGA GGACTGCGAA  
951 TGTTCTGAAT CACTATGAAT GTTTCTAAA ACACCAAATG TCCTCAATTA  
1001 CAAGAATTGC ATGAAAAGAT CATGCATGTC AAAAATCCTG GAATGACATG  
1051 AGAACAAAGC TGAAAAAGC ATTGATCTTG ATTTTAAACN TGAGCCTATC  
1101 CCCCCAAGA CAATAGTTTA GTTCATTTAT TTTGCTTATT ACCNTTTTAT  
1151 TATTAECTAT TCCTGATTTT TAACATGATT AACAAACCCTG AACAAACTA  
1201 GTAAAGCCTG TCAGTAAGGG ATTTGCATTA TTTTCTGAT CACAGGTATC Exon 12  
1251 GGTGTTATAA GTATTGAAAG GGCATATCCT CTATCCCTGG GATCCAATAT  
1301 TGGACAACCT ACTACTGCAA TATTAGCCGC CATGGCTAGT CCTGGTGAAA  
1351 CACTTGAAA CTCATTACAG GTTAGCATGA AATATGAATA AATACATTCA  
1401 AACAAATTC TAATTAATC CAAATCTCAG TCCATAACGT TTTGTATCTT  
1451 TG GATATCTAAC GTAACCAAGT GGAGAAGAAG TTGAATAGGC Exon 2 (AS)  
CTCTACTCAC CTATAGATTG CATTGGTTCA CCTCTTCTTC AACTTATCTG Exon 13

1501 CCTATAACAA CACCATGGGT TAGGGGTAGT GTGCATAGG GGTAGGCTGA  
 GGATATTGTT GTGGTACCCA ATCCCATCA ACAAGAATCC CCATCCGACT  
 1551 CCGTTTCCCA GAACCACTTT GTTGTGGGT CATGGCAACC AAACGTCGGA  
 GGCAAAGGTT CTTGGTAAA CAACAGCCCA GTACCGTTGG TTTGCAGCCT  
 1601 AAATGTAGTA GGAAACGAAG AAGCCAAACG GAGATGACCA GAAACCAGAG  
 TTTACATCAT CGTTTGCTTC TTCGGTTTGC CTCTACTGGT CTTTGGTCTC  
 1651 AGATACCGGC CGACCGTCCA TGAGTACCCT CAAGAACAGG GGTATCGCCA  
 TCTATGGCCG GCTGGAAGGT ACTCGTGGGA GTTCTTGTC CCATAGCGGT  
 1701 ATAAGACTAG AAGCGGTAGT AACAGTTGTA AGACGTCTTC GTGTTTGGAG  
 TATTCTGATC TTCGCCATCA TTGTCAACAT TCTGCAGAAG CACAAACCTC  
 1751 TTACCGAAGG AAGACGAGAG GCCAGAACCC TAAAGGAAGG AGATACCCGA  
 AATGGCTTCC TTCTGCTCTC CGGTCTTGGG ATTTCTTCC TCTATGGGCT  
 1801 GTGAGAGAAC TAGGTACCCT GTCTCATCAG TGACAGTAAC GCGGGGCGAC  
 CACTCTTTG ATCCATGGGA CAGAGTAGTC ACTGTCATG CCGCCCGCTG  
 1851 AACGACAACG ACGTTCACGA CGTTAAGA  
 TTGCTGTTGC TGCAAGTGCT GCAATTCTAA AGAAGAAGAT GAGAAGGCGA  
 1901 AACTTGAAAA TTTGGCTAAT GGAATCGAGA TAAATGATAA TCCGATGACG  
 1951 ACTGTTGAAA TCATAGAGCC CAAGAAAACA GTGGACAGTT GCGAAATCCT  
 2001 GAAGGCAACA TCTTTATAGA CTCAAACAAA GCATTATAGG TTATTATTA  
 2051 ACATATCTAA ATCAAAGTGG CTTTGATTTT TGGTACCCAG AGTTGACAGT  
 2101 ATGCAATATC AGTGGACTTT AAAGGGTTTA TGTCACCTCTG TATTTCTTAA  
 2151 ATTAATTTTT TTTTATACAG CAATGCTATT TTTATAGGAC ATTGTAAATG  
 2201 TTGCAATATA TTTAAATATA CAATCTTATG TTACACACTG TGAGATCTGG  
 2251 TGATTGTTGT CGTACTTGTT CCAATGTGAA AAGGATACTT GTTTATTTTT  
 2301 AATACCATTG GGAGGATATA AAAGCCAAAG ACAA

.....

ATTGGTAGAA GAACCAGGAG GGTCTCAGG GTCGTGTGAC GTCTTATTTA Exon 1 (AS)  
 TAAAGGAGTC ACTTCGTTGT GACGGTAGAA TTTTGTCCGA AATATGACTT  
 CCTTACCAGC GTATACCTAC TAAAGAGACT CTAACCTCCT CCCAGATATA  
 TTCTTATACA TCATTATAGT AGTGAGATCG AGTAAGGACT TACCTCCTCA  
 GAACAACGTT GGCAGGCAGG GGTGAGAGGG ATGGAAACT AGACGAGGTG  
 CAGTCTAGAG GTAAAGGACC ACAGCCAGGA GTCACGAGCC CAAAGGAAGG  
 AAGGTCTTTA CAAAAAGAGT GCC

## 8.2.2 NaPi-IIb2

### a) Klon E13

1 ATAGAAGAGC TCGAGGATCA TAGCAATCAA TTTCTCACT ATTAAAGGGC  
 51 AGACCCCCC ATATATCGTT GGTGCGTTAG ACATGAAGTG CTTTTTTAAA  
 101 ATGCTTTCAT CATCCAAAAA AATCTGAAAT ATTAATTATT AATCCACACC

151 CCCATACATT TGAATGTCTT TCAGGGGGAT CAAGCATTAA TTAGAACTCC  
201 CCTGTAATTC ACACCTGAG TTCAAGTAGA ACTGATAAAT AATACCTAAA  
251 AGTGTAAGA GTACACACCA CACCATACAT GAACTTTGTA CTGTATAAAT  
301 ACCACTCCTT TTGATCAAGT TTTATTGGTA GATTTCTTAA AAGTGTGCTT  
351 TGAATGTTTT AGAAAGGACT TCAATCTTTG TAGAATATAA CAGCTGTTCT  
401 CTCTAATAAA ATTAAGTGGT TAACTTTTGA ACAAGTTTGT TCACCTTATT  
451 TAAACAAGTA ACCCCAAGT TTTAGTAAT AAAGGTGCAG TAGGTGATTG  
501 TCTCCATTTT TATGTTTATT TTTTGTGTC TAGTTGAAAG TCTCTTACA  
551 TCCCAGTAGT AATGATTAAG GTAAACGATC TGAATGTATT TATATGTATT  
601 TTTATATTCT GGGTAAGGCA TAACACAAAA ACAATGTTCA TCCAATTAAG  
651 TATTGTGCGG CCAACAATTC CCCTAATTCT GATAAGTAGC ACAAACGCTC  
701 TGTGACAAA TGTAGATTTG AACAACTGCG CACCCGTTCA CGCATGCACA  
751 CGTGCAAAA AGACAGTCGC GGTAAAATCA AATGCTGAAT TAAAACCTG  
801 AATCAACATC GGAGTTAGTC TAGTGATGCA AAGCTGATGT AGATTGTGTT  
851 GTTCTGAATG GGTATATATG ACAGAAGTGT TGTTTAGCCA CTGAAAGATT  
901 GATGTGACTA TTTTCAGATT CATAGGTGCC TTTTACAGCA TCAACAATGC  
951 AGATTTTATT TAGTTTAAACA AAACATCAGT AAATAGCGCT ATTATAATAT  
1001 ATGCTGAGCT AGTGTGTGTC GCATACTGAT AACTTCCGGT GACCTGTTAT  
1051 TGTGAGTTTT TTTCATTTTA TACGGTCCTT TTACAACATC GATGTTGTAA  
1101 TGAAATTCAA ATACAATCAG TTAAATAGAC TTTGGCATTC ATTTAATTGC  
1151 TCAAGCGTAA AACGAGACAA AAAGCCGCTT ACTCGCACAC GCCTATTATA  
1201 ATGGGCAGAG GAGCACAGAA NCTCCATTGA ATACACTGTG GTAATTAAGT  
1251 GCTCATATTA TAAAGACATG GCAGGGAAAA TGTAATTTAA TGCAGTGCCT  
1301 CTTGTACAAT CTGAGACCCA CTTTATATCG GGATATCACT CAGCCAGTGG  
1351 AGATCGCTAA TTTATAAAGA AACAGACCTT AAACGAGCCG TTTTGTCAAT  
1401 AGCATTCAGT TCACCGNAAG CGGTAAACCC AGGTACTGG CAAATTAAGT  
1451 GTCCTATCAG CATGCTTCAG CATTAACCCT ATTCCGCCAG CCTGCTTTAC  
1501 TGAGGGTAGT TGGTTTTATA TTCACATTGG GTCATTTTTG ATCAACGTCA  
1551 GCCTGTGACG CGCTCCCTAT ATCGTTCACC ATGCTGCGCT CAGTAATAAG  
1601 TGTAATTCGT GCACCCGCC AGCCAAACAC TAAGCATAA GTAGTGGCTT  
1651 TAGGACAAA CATGTGAGAT ATTGAAATAC TGCTCATCAT GAGAAGTTT  
1701 GCTTGCTACA CAACTGAAAA CGTCTAGAC ATAAGAGTTT TTCATTGGGA  
1751 ATTGTAGTAT TATAAAGTAC TATTAAGTTT TCTAACTGGT AAATGACATG  
1801 ATCTTTTCTA GAGTGAAAGC ACACGTCACA GAGGCTGATA TTAATTCATG  
1851 GCTGTGTTTT CTTTGACATT ATAGCTGTAT AATTATAAT CCGGCGACGC  
1901 AGGGCGCAGT AGGTAGTGCT GTCGACTCAC AGCAAAGAAG GTCGCTGGGN  
1951 TGCTGTTGG ATCCTCGGCT CAGTTGGCGT TTCTGTGTAG AGTTTGCATG  
2001 TTCTCCCTGC GTTCGCGTGG GTTTCCTTCG GGTGCTCCGG TTTCCCCAC  
2051 AGTCCAAACA CATGTGGTAC AGGTGAATTG AGTAGGCTAA ATTGTCCGTA

2101 GTGTATGAGT GTGTGTGTGA ATGTTTCCCA GAGATGGGTT GCAGCTGGAA  
2151 GGGCATCCGT TGCCTAAAAA CATGTCGGAT AAGTTGGCGG TTCATTCTGC  
2201 TGTGGTGACT CGGGATTAAT AAAGGGACTA AGCTGACAAG AAAATGAATG  
2251 AATAATTATA ATCCTATTTT ATCCACAGCT CAAGAGAGAA AGAGGTCACT  
2301 CTGCTGGTTT ATAGCAAAAT CTCCTCTCTT CCTTCTAGAT AAAATGAACC  
2351 TCTCCAACAC TTTAGTTGAA AAGATTAACA AGGACGCTTC TCAATTTATT  
2401 AAAATGTTTT ATGAGAGATT CATTTCACG TTTATTTTTA GAGTACATAA  
2451 AGTGCCTGTC TGTTTATGTG TGTGTGTCTG AGATGCTCTG AAGATCCACC  
2501 CGCTGCTGTG GACTTTAGAT CAGTGTGTGT GTCCTGCTGC AGGAGTATAT  
2551 AAGCTCCTCC TCCACCTGCA CAGGTGCATC ACACACTCTC ACAGCTCAGG  
2601 TAAGAACAGA AACATCTCTC TGCTTTTACT CCTCTGGTTT AATAGAGCGG  
2651 TGTGTGTGTG GATTTGCTTG TGCATGGCTC TTAAACATGA ATTCAGAAGC  
2701 TTTCTGAATC ACCTTTTAAA CTCGCAGTTA CTTTTGTGTG TACTGTTTGC  
2751 TTTAAGTTTT TAGTCTCTAA ACGCTCTCTA AATGAGACAG AAGTTTGTGT  
2801 GTTCACATTT TTACTCTGAC GTGTGATCC TGCTTTTATG TCGAGCATTG  
2851 GGTGTAGTGT TAGTCTCTGA GTTTGTTTCG TGTCTCATCT GGAGTGTGAG  
2901 GNAGAGCTGC TTAATAACTC TGATTAAACT ATGACTTCAC TTTGTGCTGG  
2951 CAATATTGAT GTGCAAGTGG TCTGCTGACA GATTGCTCAG TATTTAAATC  
3001 AGTAAACAGA GCGGGATATT AACACATTAT AAAAGCTGAG AGACAGTATA  
3051 ACACAGTAAT AATCCAGCAT AAACCACAGG TGAGACTGCT TTGCTTTACA  
3101 TTTTACTGCA TCAAAGTGT TATTGCTTTA GAAATAAGAT GTTGCATGCA  
3151 TTTTTATGGA AACTGTTTAT TAAATAGCGT GTTTAATGT TGATATTTAC  
3201 TTGTTGTTTT AATCGCTGTG TTCTATATAA GATGGTTTAT GTTAATATTT  
3251 ACTTTTATTG TTTGTAATCA CTGCTTGGTT TCTTAATATG ACCTTTAATG  
3301 TTTATATTTA GATAACTTTA ACTTTTATT GCTTTAATAG TTGCTTTCTA  
3351 AATAAAATGA TCCTATGTTA TTATATACTT ACTTTTAAAT TGTATTGTTT  
3401 TAATCACTGC TTTCTAAATA AGACTTTTTA TGGTAATATT TATCTTTTAT  
3451 TTAATTTTTA TTGTTTAAAT CACTGCATGA TTTCAAAAAT AAGATCTATT  
3501 TTTGTTTACA TTTGTGCATT TTTAACTTGT TTAATCAGGC TTGATCTTTC  
3551 CATGTAAATA ATGTTTAAAT CACCGCTTTC TAAATCAGAT CTTTTTGTGA  
3601 ATATTTACAT TTTTGTTTTA AACTGTTTAT TGTATTTAAT CACTGATATC  
3651 TAAATAAGAT GTTTTGTTTA ACATAAAAAA CAAACATATC TTGCTAGGC  
3701 ATGGAAGAT AACCCTTTC AAAACCACCA AACTTTTCTG CTATACCGTT  
3751 TCTAAGGTGT AAGATTTTTT ATTTATGTTT TTACAACAGT ATTTCAGCA  
3801 GAAAATATAT ACAGACGCCA TTTTAAATGG TAAAGAAATC AGTGTTTTTG  
3851 AAATAATGA AGGCAGCAGA AGTGAATGAT TCTCTTGAAT TATTTAGCCT  
3901 GACTTGTTTA CTGCTTCAAA ATATTATAAA TGTTCCTCAA AATAAAATAT  
3951 ATATTGTTCA AGAGGGAAAA AGTTGTAATT TTTTACACA AGCTTTAAAA

4001 GAATATACAG TATTTTAGAG CAGTGGTACG GTGATATTTT TATCCAAGGT  
 4051 TTTCATACCG TCAGAAACTT TCCGNNCCAT GCCTAATCTC GACAAACTAT  
 4101 ACATCCATAT NCCATATATA AATTTCAAGT CAGTCCCTCA AATCTGGGGC  
 4151 TGA CTGGTGA GAATGTTAAA CTACTTATAC CCTTTAAACA TTCCTTTCTT  
 4201 ATCATTTATG TGA ACTAAAN CTGTTGTTGT TGCATAAGTT TATCTATTAC  
 4251 TCTATCCTTT GCATTTCAAA GGGATAGTTC AGCCCAAAT AAAAATCATG  
 4301 TCATAATTTA TTCATCCTTT TCTTATTCCA GAGCAATTG AGTTTCTTTC  
 4351 TTCTGTTGAA CACAAAAGAA GATATTTTGA AGAATGTTAA AAACCTGTTA  
 4401 CCATGGACAA TATTTGTTTT CTCTAAACA TCTTCACAGA AAACGATATA  
 4451 AAGGTTTGAA ACCACACGAG TAAATTATTT TTTTGTAGTTG AACTTTCGCT  
 4501 TTAAC TTTTT GGTCAATAAT TTTAATCACT GCCTACTAAA TGAGAAAGAA  
 4551 ACGTAAAAA AACNCNAAA AAACTTTTC AGCTTTAGAG TTTTGTTTTG  
 4601 TGTCACACTT TTTAACC ACT TTTTGCTAAA TANANCANAC TAATCAGTGC  
 4651 TGAGCATAGA ATATATGTGT NTATATATAT ATATATATAT ATATATATAT  
 4701 ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT  
 4751 GTGTGTGTGT GTATGTACAG CTGTCAA ACT CACAGTCATC TTTGTCAAAT  
 4801 GAGTGTAGTT AACTCAAAT TAGTGAAAGT TAGTTCTACT CATTTGAATG  
 4851 AGTTTTGAAC TCAGTGTTGA AGGTAATGAG TTAATTAAT ACCTCATTAC  
 4901 TTCATCTTAA ATGGAGTAAG TTCACAGTAC TCATATACAT TAGTTTTTAA  
 4951 CTCAAAACGGT TTGTAACAAT TGGTPTCCAC AAGCGGTTGG ATTTGCCTTA  
 5001 ACTGATTGGG TTTTACAGTA CTCAGCTGGT TTGAGTTCTC TTCATTTATT  
 5051 GGGTTTTACT GTGCTCAAAT TGCTTCATTT ACTCAAATGG ATTAAGTTCA  
 5101 CAGTACTCAT TAGCATTCGA TTTTGA ACTT AAATGGTTTG TTGAGTCGG  
 5151 TTTCTCCTC AAATGGTTTG AGTTACCTTC ACTTTTTTGG GTTTTACAGT  
 5201 GTATATACAT ATTATATATA CACAACTTT TATTTTGGAT GTGATTTATT  
 5251 CGTGATTAAT CTTTTCCAG CACTAGAACA AACTACTTAA ACACACACAC  
 5301 AAAAAACAA ACAAACATAC AAATAAATAA ATCGCTTAGG TGACAAAAAT  
 5351 AAAACCTTAT CTTGACCAA TATCATTTAG TATGTTTTTT GTGTAATGTC  
 5401 AGGCTGATGG CTCCTCTGGC TGAGACTCAT CCCGCCTCGC CGCCACCGGA  
 5451 ACTCGGTAGG ATCTGCTATA AATCCGCGTC TGCTCAGAGG CGCACTCCT  
 5501 TCCGCCTGTG CACTTCTGTT GAGCTGCGTG TCAGTCTGAA TCTCTGGTTC  
 5551 TCCTCCAGGA GCGGACGCGG ACAACATGA GCCCAAACC CCGACGCGCA  
 5601 CCCTCAGTCC CTGGCCCGCG CAGCAGTGGG AGCCGGAGCA GGAGGAAGAG  
 5651 GTGGACCCCG TGGGAGCTGC CGGAGCTCCT GGACACCGGG GTGAAGTGGT  
 5701 CAGTGAGAA GTAAAGTTTG TTTCATACTT TCTCCTAAAT AATATTGTTT  
 5751 CATGCAAGTA TTGCAAATTC TAAATTGGGA ATCATATAAT ATTTTTAAGA  
 5801 AGGTCATGAC GCGTTTAAACA GTTTAAACTT CATCTTTTAA TGGACTTTTG  
 5851 CACTGTTTTA AACCATGGGC TGTGAAAATG GGAGCATAAC GTTGCTTTGG  
 5901 AAACAAACAA CTCAGCGCTC CTAAAAAAC CCATAACGTT ACCTTTTTAG

5951 GAAAAAACC CACGAGTGC CAGACTGTCT CTAAGTTACC CAAAAATCCC  
6001 AACAAATGGCC AGCCCTAAAG CTTTACATTA CACAATCAAC ATAATCACAC  
6051 ACCATAATAT AACACATGAA CTGTATTTAG AGCATGCTAC TAACGTTAAC  
6101 GTTATATTAT CAGCCAGTGA CCATTAACAT TGTTCAGTCA ATTAAATAGT  
6151 GCCTTTGTTG TTTTGAAGTC ATACTTTCGC GCGATTTTCAG ACCCAATTTA  
6201 TTCAAAAGTA TCTTGATAAA CAATAGAGGG CCATGTTAAA AATTAATGAA  
6251 CGTGTGAATA TAATACCCAT CTTCAGCTCC ATCCTCCGGG GTGGGCGAAT  
6301 GGCTGCTGGT GGCCGCTGTA AGGCTCTCTG TTTCCCGCAG AGTTGGACCG  
6351 GCGCGGGAAG GTCCTGCGGG TCTGCACCTC TGTCTGAAG TTGCTGCTGC  
6401 TGCTCGGCC TCTCTACATG TTCGTCTGCT CCCTGGACAT CCTCAGCTCT  
6451 GCTTTCAGC TGGTCGGAG TACTTTCTTT TTTCATTCAC AACTTTTCTC  
6501 CATGTCTTCT CTGGAAGTCC TTTGTTGGAG TTGGCTTTGT AGCGCTGGGA  
6551 TTGTGCTAAC CTAAACTAAC GTTACTGTGC TAGTGTGAAG ATCGACGCTC  
6601 GGACATTTGA CTTTTTTCGC TTTTGATCAA CACAAAAAGT CGAAGCAAAT  
6651 CTTTGTGAAA AGCGTGTAA AGTTAATAT ATTAAAAAAA AAACACTTGG  
6701 AGGGTAAAC TTGAGGCCAT TTTCCACGA AGACGTGATT TGTTTTAACG  
6751 TTAGCATGCT TTACCAGACT GCTGGTCTGA GGTAAACGTT AGACCTGGGG  
6801 TGTCCAAACT CGGTCTGGA GGGCCGATGT CCTGGAGAGT TTATCTCAA  
6851 CTTGCTTCAA CACACCTGCC AGGAAGTTT TAGTGTATCT AGTAAGAGCT  
6901 TGATAAGCTG GTTCAGGTGT GTTTGATTAG GGTGAGAGCT AAACCTCCA  
6951 GGACACTGGC CGTCCCAGGA CTGAGTTTGG TCACCTCTGC GTTAGACCAA  
7001 CTTCACTTTC TAAACTTCAT CTTTCTGGAA GTCTGTTTTT GTAGCTCTGG  
7051 AATTGTGCTA ATGTTAAACG TTATGCTGTA CATTAGTGTA AAGGTTTGAA  
7101 ATCTGTACCT TTTACTTTTT TCTTATTACA TTAATTAACA TTAAAATTGC  
7151 ATTTTGATAT GGCCTTGCTG AAAAATCCAG CTTAAACCAG CTAGGCCGAT  
7201 TGGCTGGTTT AGCAGGTCAA CCAGCTGGGT TTTAGAGGGA TTTGGCCATT  
7251 TCCAGGATGG TTTAGCCAT TTCCAGCCTG GTTTTAGCTG GTCAAGCTGG  
7301 GAGATGACCA CCTAAAACCA CCTTGACCAG CCTAGCCAGA CTGGTCAAGC  
7351 TGGTTTTAGC TGGTCATTTT CCAACCTGAG ACCAGGCTAC AAGTGACCAA  
7401 AACCCCTCTA AAACATGCT GGTCAACCAG CCTAGGCTGG TTTAATCAGT  
7451 TTTTTTCAAG CAGTAAGAGC AAAGTATACT TCACAATACT ATACTACAGA  
7501 TTTACTCAGT ACTTTTAATC TACTCAACTT CACAAGAACT ATGCTCTGTG  
7551 ATGATATTCA TCATATTTCA CACCATAAAC CGTGTTCAAA TAGAGAAAAA  
7601 TGTGTTAGTG TCTGATCTAT AGTATGTCAA AGTTGACTGG GTCCACACAG  
7651 ATGGCAGCTT ATCAGGACGC GCACACATAC CCCAGTTAAC CCTGGTTAAT  
7701 AAATAGTGAG TGCTGTTATC ATGGAGCAGA AATAACTCCG CTGTTGTGTC  
7751 TGTGCGCAGG GAAGGCAGCG GGGGACATCT TTAAGGATAA TGCGGTGCTG  
7801 TCCAACCCTG TGGCCGGGCT GGTGATCGGG GTGCTGGTCA CGGTTCTTGT

7851 **CCAGAGCTCC AGCACCTCCT CCTCCATCGT GGTGAGCATG GTATCGTCTG**  
7901 **GATGT**GTGTT TCTCTCTACT CTCTCTCTCT CACAAACACA CACACACATG  
7951 CACTCACACA TGCACCTACA CCTGTACTCA AACACACACA CACACACTCA  
8001 CAGACACTGT TTAACCTAAA CCATAAAACA GATCTGCCTA AACTGAGGCT  
8051 ATTGCTGTGC CGTATCCCAG GAGTTGTAAT CTGCAGAGAC AAAAACTGA  
8101 AGAGCTGATT GCAGTTTTAA CCCCCCATC CTGTTATGGT GTCCCCCTTT  
8151 TTGGGGACTG CTGATGTAGA GAAGTGTGAA CATTATTTCT CTGTTTTGTT  
8201 **TCAGTCTGG AGGTGAAGTC AGCAGTGCCT ATCATCATGG GTGCAAATAT**  
8251 **CGGCACTTCA GTAACAAACA CTATTGTGGC TGTGATGCAA GCTGGAGACC**  
8301 **GCAATGAGTT TCGCAG**TAA TCAGACTAAA GAAATAGCTA AACTTTGTCT  
8351 TCGTGAGGT AGTTTTGGAC TTGTGTGAAG GTTTAATGCA AATGATGGGA  
8401 GATGGAACG CGTTTGCTGG TCTTGGT**CAG GGCTTTTGGC GGGGCGACGG**  
8451 TGCATGACTT CTTCAACTGG CTGTCGGTGC TGGTGCTCCT GCCTCTAGAA  
8501 **GTGGCCTCAG GGATGCTCTA CAGACTCACC AAACCTTGTGA TCGATTCTTT**  
8551 **CAACATCCAG ACAGGCGCAG ACGCTCCAGA CCTGCTGAAA GTCATCACAG**  
8601 **AGCCGCTCAC CAAGAACATC ATTGAGGTGA GGT**CAACCCC TGCCTAATG  
8651 ACAGATCTCT GGCTTCTCTG AGTAGCTGCT GCTACAACAT AAACGGTTGA  
8701 AGTCTAAATT ATTTGCCTTC CCGTGAATTT TTTTTTCTGT CAAATATTTT  
8751 CCAAATTATG TTTATCAGAT TCTAAAATTT CTCACAGTAT TTCCTATAAT  
8801 ATTTTTTTTC TTCTGGAGAA AGTCTTATTT TATTTTGGCT AGAATAAAAG  
8851 CAGTTTTTAA TAGTTTTTAA CCAATTTTAA GGTCCATATT ATTACCCCC  
8901 CCCCCTTAAG CCGCATTTGT TTTGGATTGT CTACACAACA AATTCAGGGG  
8951 GGCTAATAAT TCTGACTTCA ACTGTGTGTG ATTTGCATCA TACATGCTTA  
9001 TCAAAGTCTC GTCTCCCAT TCCGTGAAAA GTCGGTTGCC TCGCTCCATG  
9051 ACACATTTGN TATTTACTGG CGACTTCTTA AGTGTA AAAA CTGAACACTT  
9101 CACTAGCAGN AAAACGGTTA AACAGAGCAT CTGCAGTGCA AGAATGAGAG  
9151 AATGAACCTC CTCATTCAGC CTATCACTCT CCCTTTCGTA GAGGCAAAAA  
9201 GTGTTGTTTG CACAGACGTC CCATTAGCCT ACATAATTTT CTTC AAGGCA  
9251 AGATTTGTTT CAAAATTNT TTCTTAATTN GGTTTTAATT TCCAGCAAAG  
9301 AATAAATTAA CCATAATTAA GAAGTGTGGT CAAAATTATA TAGTTCGATC  
9351 CCGAACACGC ATGCTATGCC CCATATGGTC CAAAACATGA CAGGTGGACA  
9401 AATCTTAGCT ACATTCGCG TGTATTAAGC AATGTGTAAG CGAGGTGCAC  
9451 AACTGACAGG ATCTGAGCTG GATTTAGACC TGCTTTCAGT CGATCTATTG  
9501 CACAGTCTAT TTTAGTTCCT CAAAATAGCA ACGCAGTGGC GCAGTGGGTA  
9551 GCACGTTTCG CTCACANCAA TAAGGTCGNT GGTTCGATCC TCTGCTTAGT  
9601 TGGCATTCCT GTGTGGAGTT TGCATGTTCT CCCTGTGTTT GCGTGGGTTT  
9651 CCTCCAGGTG CTCCCCAACA GTCCAAAGAC ATGCAGTACA GGTGAATTGG  
9701 GTAAGATAAA TTGTCCGTAG TGTATGAGTG TGAGTGTATG TGTGGATGTT



9751 TCCCAGAGAT GGGTTGCAGC TGGAAGGGCA TCCGCTGCGT AAAAACTTGC  
9801 TGGATAAGTT GCGCACCCEA GATTAATAAA GGGACTAAGC TGACAAGAAA  
9851 ATGAATGAAA ATAGCAACGC GCCAACAATG CGCCTTAACA CACCTCTTTT  
9901 CTAGACCGAA ACATCCTTGA GTCCACAAAG CGGCGCAAAT GGATTTGCTT  
9951 TTTAAACAAC ATGGCAGAAA ACGTGAAAAT TGCTGTTGCG TTGGTCTGAA  
10001 AATAGCAACA CATTGTGGAA ACACTCCTTG CGCCTTATTG CACCAGGTGT  
10051 ATCATAGGGC CCTTAGACTT TGTGTCTAGA TCATTAGAAT AGAGCCCCAT  
10101 GTGTGTAGTG ATGTTAATGA ATTTCTACT TGATGACTGT ATTTACTGAA  
10151 CACCGTTTGT CTTTGCTCTT **CCAGCTGGAC ACCTCTGTGA TTCGTGACAT**  
10201 **CGCCACTGGA GACCCTGCTG CCCGGAACAA AAGTTTGATC AAGATCTGGT**  
10251 **GTA AACCGGA AAAAATTACG** **GT**GAGCAATC TGAAACTGGA TTACTGGATA  
10301 AAACACTTCA CTGTGCCGAG GCTTGTGTTGA TTCTCTGCAG TCACAAGAGA  
10351 AATGGTGTGTT ATGACGATAT CCAAGCTGAC TTTCTTTTTA ATGATCTAAT  
10401 TTCTGAAAC TTCCAGGTA GAGGACATCC ATTATCTATA CTCTAGCATC  
10451 TTCCCTTGCT GTCTACATAG ACGGCTGCAA TAAAAGACAG CTTGTTAATT  
10501 GGAATTAAGC CTTGTAAATG TCGTCAGTGC AGCATAATTT GAGATAACCA  
10551 TTGCCAGTGT GATACTGTAG TTTATAATAG CCAGCTTCTG CATGTGGAAA  
10601 ACCACTCATT TTTAAACCTG TGTGAGTCCA GTTTTCAGAA TTGAAGTTTA  
10651 GTTCAGTGTG GTTTAATTTT CACTCCTGAA AGTCCAAACA CTGAAGAGCA  
10701 AATCCATCTA TGCACATCTC CACAAGTGCC TATCCAGTC CAATATATAT  
10751 GTTCAACATT GCGTATCCTG CGACATGAAT ATTGCGAAGG ATGACATTGC  
10801 GTTATCAATG CTGAAACCAG ATAATGTGCA GCCCTAATAC AAGTTAAGAA  
10851 ATGTCATGAT TGCAATTCTG AACAAATTG CACATTTTTT CAGTGTCCTG  
10901 TCAGCTTATG TAAAGTTTAA CGGGTTTAAA ATGTACAAAT ATATTAATTC  
10951 TAGTTTAATT CGTGGTTTCA AAAATACAGA AATGGTAAAC ATTACTGGAT  
11001 GTTATATTAT AATATTGTTA TTTCAATACT CAACATTTTT CTAGTGTGAT  
11051 GCAGCCCTAG TGCAGAAGAT TCAGACAGG TGAAGTGTGTT CTTTCCATCA  
11101 GGTGCCGTTT GTGAGGATTT TCTGTCTGTT **TCAGAACCTG GTGAATGTGA**  
11151 **CCGTCCCGG AATCGCAAAC TGCACTCCGG ACGCCCTGTG CTGGGTGGAT**  
11201 **GGAGACTTGA TCTGGACCCA AAAGAACCAA ACCGATACCA TCTACTTGAA**  
11251 **GAAATG**TAAG CGTTTCTGCT GTGTTTGATC AACATCAATG GTTTCCTTTT  
11301 AGAAATGATT ATTCAGTACT GGCAAAAAGA TTCATATGAA ATGTTTGGAT  
11351 TTGGATCTGA TATAAAATAT TAATATTTTA TCTTTTATTT ATAAAACAAC  
11401 AATTTTTTAA ACAAAATATT TAGGGGTAAA GNTTTAAATA TTGNTTTAGT  
11451 TCTTTAGCCA TTTTAAACTG CTCTAATTGT TCCCATGTAT TGTGGGAATT  
11501 GTTCCGAGTA AAGTACCTA GTCGGGCCGA CATCCATACA ATACATCTCA  
11551 ATAAAACATA TTTTTTTATA TTGTTATTTA ATATTATATT GTTTTATTCA  
11601 TATTTATATA TATAAAAAA AAAAAAATAT ATATATATAT ATATATATAT  
11651 ATATAAAATC TAATTATTTT CCTTTACATG ATCTTTCGTT AATACAAAAA

11701 CTATTAAC TG AAGAAGGCAG TCAACATTAA AAATGGGTGT GAGACTTTCC  
11751 TCTGGGTGCT TTGGGTAGAC CCACACATAA TATTGTTGTT GTTTTACCTT  
11801 ATTTTGTGA AATATGATAA AAAATAATAA TAATAGCCCA TCATGTTAAG  
11851 CTTTTATTTT ACATCTACAG AATCGTGATC AATATATTAA GCAAAAATAA  
11901 TTGCTTTTTT TTTTCCCATG ATTTTTTTTT CATGATTTTC GGAATCATGC  
11951 AGCTCTAATT AGGACTGTTG GCCACATGGC TGGAAAGTGCT CATTTCCTCC  
12001 AAATCACTAA ATCCACCCTT GCAAGCAAAC AAATGTGTGT GAATGACACC  
12051 AGCCACACA GGAACCTCCT GCAGCAACTG TAGCCAAAAA ACAGCCCATT  
12101 TCCTTACGGA GTTGACTTAT TAGAGCTGAG AGCCATGAAA CTGGACTCAC  
12151 TATAACAGCA ACGGGGACAA TGAATTCTCT TAAAATCAGA AGTTCTCCTT  
12201 CTAGTCTTCA ATGGGGCTTT TCTTCAGGGT CAGTGCACCC GAACAAAGAC  
12251 CCTCTGCCTG CAGCACTTCT GCTCCGGGGG CAGTTTTGGG AGATTTGAAT  
12301 CGGTGCTGGT GCCTGGATTC CCTCTTGAAA TTCCAGACTT TGGCCTTGGT  
12351 TGAGTGACTT TGAGATTTA ATCATTCTGG AGTCCTTCAA CTGTGACCGA  
12401 GTCTGCTGAA GGAGCGCCTT TCATCAGCTC CTGCTGTTTG TGAATCTGCC  
12451 TTGTTTTTCA TCAGCGCTGC ACCCTAATTT TAATTCTGTT AATTGCTCA  
12501 CCCTCAGGTC ATCTAATATG TTGGAGACGT TTGTCTCCA GCAGAACACC  
12551 TGAAGAGCTT CTTAGCTGAA TCTGTGGAGT TTCTGGAATA TTAGGGGATT  
12601 TTAATAACAC TTTCAACCGC AATAAATCAA TAAATTAAT TGACTTTTAA  
12651 TTTGAAAAG GGAATTTTTT TATTTAATTG TCCGGGTCAT TGAATATTCT  
12701 TTTTTTTTTA AATTAATAAA TTGTTAATAT CTATTTCTAC TTTCCGCTTA  
12751 TCAAGGTAGT TGTTAGTATC GGTATAATTT ATCAAAGCCA GGAATTCGA  
12801 TTTGGTAAAT AAACAATTTT TATTTCCAT TTATCAAGTC ACTGTTAGTG  
12851 TTATCATGAA ATTTCAAAG ATCTTTCCAG GAATTTGAGA GTCAGGGTAT  
12901 AAATTTTTTT TGTCCAGGTC ATGGAATATT AGGGCTTATT TTTATTTAAT  
12951 TTCTTTTAAT TAAAGATATT TGTATTAATT AAAGTTAATA AATNGTTGTT  
13001 TTTAAAATTT ACTTTCAATT TATCAATGTT CTTTATTGAT ATTAATATTT  
13051 ATAATATTTA TTATTATGAT GATGATGATG ATGATGATCA TGGAAATTTAA  
13101 AAAGTCTTTT CTAGATACTA GAAAGTCAGG GAATTTAAGT TATTATTATT  
13151 ATTATCATT AATTATATCGT CATCATTATC ATCATCATT TATTATTAT  
13201 ACTACTACTA CTTATTATTA TTATTATTAT TATCATTATC ATGGAGTTTA  
13251 AAAGTATTTT TCTAGATACT AGAAAGTCAG GGAATTTAAG TTATTTTTAT  
13301 TATTACTATT ATTATGATTA TTTTATCTA TATAAAATGC ATCTTTTTAT  
13351 ATAAAAAGCA CTTAAAATCA TAAGTGATAG ATTATATAAA TGCTAAAATT  
13401 GTAAAAACT AAATATACAA GTCTTAATAT TTTATTTGCT ATGTTTTTAT  
13451 GCAGTATTCT AGTTTTGTGC ATGAATTTAA TTCACATGTT TAGATGAAAA  
13501 CCGAGCTATC AATCCTCATT TCAAATCAGC CAAGATGAAA CCAAAAAAGT  
13551 AAAGAGAAAT CCTCCGATAT TTGTATTAGT TTTATTGATC AAGCCGTATT

13601 CTGCTTTCCT CTTTGGTGAA CATCACACAC TCCTCATGAC CAGTGTTCCT  
 13651 CTGCTTATC TTCAGGNACG CACATGTTTCG TGTTCGCGGA TCTGCCTGAT  
 13701 CTGGCGGGGG TTTGATCCTC GAGC

## b) Klon: B11

1 TTAATACTTT CGCCNCCCC CAANTTCNT TGAAGAAGNC TATTTTTTTN  
 51 NCACCGGGCG GTGGATCTTC CAATTTGGTC CNTNNNCCAT TACCCACACC  
 101 GGAGNGGCC NCCTAGGCC CACTGTAACA TAACTTTTTT GTCTGTACTT  
 151 TTTTTTTTAA ACATGCTGG TATCCTGCAG TAAATATACA ATAACAATGT  
 201 CACATTTATA AACGTCACGC ATTACACAAC TTATTATATT ATACTTAAAT  
 251 ATTTATATAC TTTAAATGTA AACTTGCGCA TTAACCTAAG CAGCTATGCA  
 301 TGAGCTGATC AAGTTCAGTT GGAGAAAGAA ATGCTGATCT CTTTTTTTTT  
 351 TTAAGATATT GCCACAGTCA CTCGTAATGT CTGCACTCCA TTGATAATGC  
 401 CTTTGTATATA GTCACAGTGC GCGCGCTTAA CTCTTAATCT TCTCAAAGTT  
 451 GATTGACCTA ACTCAGATCA GCTTTTCTGA AACCCAAAAC TCTGAGTTGA  
 501 TTTAACGAGA GATTAAACTC CGAGTTGGTT GAAGCTCTTT ACTGAAACAG  
 551 GCCCCGCTG CACTGCTGTC CACTGTGTCT GCATTCAGCC CTGGGGATTG  
 601 AGAAGGAGAG TTCCTCCATG TTTATATAAA CACTATAAAT GAGATAATCT  
 651 TTATAATGAT ACGACAAAAT GTGGTTGTGT GTGTGTATAT AAAACGGTTA  
 701 ATAACATGTG TAGCAGGGCA TTAAATTACT GTTATTTTCT TTGCATTTTA  
 751 ACTTTGTAAA CTAATAAAAT CATGCGTGTCT CTCAGTTTGT GAGCACACTG  
 801 ACAGTTGTTG GCTCTTCTCG ACTGTGCATT CACACGGGGC TCCAGCGTCA  
 851 ACGCTTGACN NAGGGTGTGT CTGAAATTAG GGCTGACACA ATCATCATAG  
 901 CAGTGTGACG CAATGAAATT AGTCCAAACT ATCTTGAGCT GGTGTATTTG  
 951 CATACTGTA TCTGATTGGC TGACTCTTCC CTTGGCCTTT GAAAAGTGGA  
 1001 GAGTCCCAAC TTTCAAAAGG GNNTGCATTC ATTACAATAA TTAATATTGC  
 1051 AGCTCATGAA ACGCTATTTT TATTAGGATG ATCTATGCAA ATAATAAGCT  
 1101 ATTATGTCAG TGTACCTGTG AAAACAGCAA AGTTATTATT GTTAACTAAG  
 1151 TTTCAATTCAT GTCGAGCAGC GCGTGCAGGG CCGGTGGGCG CATGCAGATG  
 1201 TCGTTTTGTT TGTTTCTTAG ATTGTTTAGT GTTGATTTTT CAAACGCAGG  
 1251 AAATCCGTTA ATACAACATT AAAACTTGTA GTAACGGTGC TTATTATTGG  
 1301 TCGGTGCAAC TAAATTTTGG CTGTTGCTCC TGACTTTTTA AAGTTGGGAG  
 1351 CACAGTGCTA CCAAGCAAAA AGGTCATTT CGAGCCCTGT ATATTGGTGT  
 1401 TGGATTGTCT TCAGAACAAA CCACTGGTAT ACAATGACTT GCCTAATTAC  
 1451 CCTAACTTTA CCCCAATTCC CTGCTGAAAC AGCCNANCAG CCCAGGCTGG  
 1501 TTTAAGCTGG TTTTTTCGGT AGGGTACCCT AGTGAAGCCT TTAATATGCA  
 1551 CTTTAAGCTG AACACTAGTG TCTTGAAGAA TATCTAGTCT AATATTATGT  
 1601 GCTGTATCA TGGCAAAGAG AAAGTAATCA GTGATTTAGA AATGAGTTAT  
 1651 TAAAACATAT ATGTTTAGA AATGTTGAAA ATATACAGTG TGGCTAATT

1701 AATCTGATGT TTTGAATGTG CGCCCTCTAG TGGTGATGTA ATGCTTAGTG  
1751 TAGTTTGTGT TTTCTCCAG ATTTCTCTGT GTCACTTCTT TTTCAACATC  
1801 GCTGGTATCC TGCTGTGGTN NNCCATCCCC TTCACACGTG TGCCCATCCG  
1851 ACTGGCCAAA GCGCTGGGCA ACCGTACAGC TAAATACCGC TGGTTTGCGG  
1901 GCCTGTATCT CATTCTCTGC TTTCTGCTGN NNNNGTTGAC CGTCNNGGGA  
1951 CTCTCCATTG CAGGATGGCA GGTCTGGTG GCGTCGGGG TGCCAGTGT  
2001 GGTGCTCGCC ATCTTTGTGA TTGTGGTAA CGTCATGCAG AAACGATGCC  
2051 CTCGCTTTCT GCCCTCGTTT ATCCGAGTT GGGAGTTTCT GCCCAAACCG  
2101 CTGCACTCCC TGAAGCCCTG GGACCGAGTG GTGACTGCGG GAATGAGCTT  
2151 CTGCAGGACT CGCTGCTGCT GCTGCTGTAA ATGCTGCAGA AATGAAGAGA  
2201 AAAACCACAT GGAGAGCAAC GACAGGAGCC TGGAGATGTA CGACAATCCA  
2251 GCACTCGCTA TAGAGGACGA GGCTAAAGTG ACTGCCACAC ATTTATAATG  
2301 CTACATGGAC TCCATTTTAA TTTATGCAAG TCGTGTTTTG ATGATCGCAG  
2351 GGTGAAGCAC CATGACTTTT TAAGCTGCTA TTGGTTTTTC GTTTGGTTAT  
2401 AATGCTGCAT TGAGATGCCT TGTGAGATT AGAGCGGTGG CGAAACACAT  
2451 CGTTTGAGAA ATCGGTTCTG CATCAAATAT NAGTTTCTCA AATGCATTG  
2501 CGACTCGGAT CGAATCGGAG GTTAGTTTTA AAAGCAGATG GTGCTGTGTG  
2551 CAGCTGTTTA ACCAGCCTAA GAGCGCCATC TGCTGTTTTAA CACAGCAGNA  
2601 GATTCAGNAG AGAATAGTTT TTTGTTGTTG TTGTTGTTGT TGTGTTATA  
2651 GAAATCTCAT TATTTGGTGC AGAGTCGATT TCACGAATAG TTTTTCACCA  
2701 CCGCTCTCTT TTGGATTATG CAGATGACTT GATTATACTT GAAGCATTAC  
2751 ACATCGCTAG TTAGAGATTG GGGTTTATGT GCAAATGCAT TTATGACTGT  
2801 AGTTTATAG TCCCTGCAAA GTCAGTGCC GTTCTCAAT TCCAAGAATG  
2851 CAGAGAACAG ACTTGTGNTC TAGTGACGAT CAGTCTTGCC AGGTCACCTC  
2901 GGAAGAATGA ACTCTGGAGA GAAATAAGAN GCTGCATGCG TTCTTCCCGA  
2951 TGGTCACATG ANCNTNACGT GTTTTTAATG GAGAGNTGAG CGTTACAGCA  
3001 TTCATACNAC GATTTGNTTT CCCACTTTTC ACAATCTATA TACTACACAT  
3051 AAAGACTATA CAAATATAAC TTGTGCAATA TAAATAACAC AGATTTAATA  
3101 TGAATTTAAG CAAATAAACA CCCTTAATGT GTTCATGCCT TTATTAAGAT  
3151 CGGCTTTTTT CAGCTCCATA GACTTTTTTT ATTATTATTT TTTTTTACGA  
3201 GTTGAAGTCT GCATTGAAGC ATCCTCTGTA TCAAGAGCAC ATCCGGGTAC  
3251 TTTCTCGCTT CCTCTGTTTT TGAGAAACAG CCAGTGACTT GGCCACCCTG  
3301 CCTGTTTTTG CATCAGCACT GGGAAAGTCG TGAGGTATTT GCAGTCAGCA  
3351 TGGTGATAT ATCGTTTGTA AGGTGTAAT CCAAGTGAAA CTGCTTGAAC  
3401 TAGAACAAAT GTGGGCGGG GCTTGATTTT TGTCCACTGG AAATTAGTGA  
3451 GGGTGTGTTG TGCTTFACTA TTGGTGTATG TCACATGATT GACAGGTTGA  
3501 TCCTGCCTTC ATTCACCAA TGCAAACCTC TGATCATTTT GCACATTGTC

3551 TGGAACTATA CAGAGATGTC TTTTAGTGTG TGTATAGTTT TTTTGAATTA  
3601 CACATGTAGT TTAACCCCTT AACTGACACG GGAATGTCTT TTTCACTACA  
3651 TATTTAATCA AATCTGTCTA AACCTGAACT TTATAAATTA GATAATGGAA  
3701 ACACTTCCTT GACAGTTAAG AATTAAATAT GTTGGTACTG GGCATTTTGA  
3751 CATTTTCATGA GTGTAAACGA TGTAAGATAC GGTCTCTGAA TAAATATTTA  
3801 ATACTGTAAA TGATTGTTTT CATCTCTGAA AAACAAAATG TGCAATTCAA  
3851 GTCCTGATGT TATCTGTCAG ACCTACTTCA TTTATTCCCTT GTCAGTTTGT  
3901 CCCTTATCCT TTGCATTGTG AGTCAGAGGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT  
3951 GTGTGTGTGG GGGGGGTATT GTTTGAGTTC TCGTCTGCTT ATCGGTATCT  
4001 GTGGGCGAGT TTTAGAAATG TTGTCACAGG CCAAGTGAAG GTTATTTAAT  
4051 GACACACCAG CCACACACTC TGAACATGGT GTTCTAATG AACAGTGGGA  
4101 CAGACTACAT CACACACTGN ACCCGGAAAA TAGATATACA GATACAAAGT  
4151 ACAGCTCCTA GACGTCTCAT TTACCATCAA GTGTCACAAA GCAAAACTCA  
4201 ATATCACAAA ACAATAATAT CATGAATTTA GCCTATTAAT GTGACAGACT  
4251 TTGATCAATT CCCAATGCTG NTTCTCCTTT TATCCGCCCA AAAGACAAAC  
4301 TTCTGAAGGA TTTTAAAGCA ATGCGGAACT GATTAACTAA ATTGGCTGTA  
4351 ATGTGTGTGT GTGTGWGAGA GAGAGAGAGA ATATGTGTAT GGTATTTCC  
4401 CAGTACACGC TTGCAACTGT AGGGGCATTC CGTTACATAA AACATACACT  
4451 GGAATAGTTG GAAGTTCATT CCACTGTGGC GACCTGATGA ATATCAGTTG  
4501 AATATCATGC CATGAACATG GCATGGTTGT TGCTGCCAGA CGGGCTGCTC  
4551 TGAGTATTTT AGAAACTGCT GATCTACTGG GATTTTCACG CACAACCATC  
4601 TCTAGGCTTT ACAGAGAATG CTCCGACAAA GAGGAAATAT CCAGTGAGCG  
4651 GCAGTTCGTG GGGCGCAAAT GCCTTGTGTA TGTGAGAGGA GAATGGCCAG  
4701 ACTGGTTCCA GTTGATAGAA AGGCAACAGT AACTCAAGTT TGCATGTTCT  
4751 CCCCATGTTG GCGTGGGTTT CCTCCGGGTG CTCCGGTTTC CCCCACAGT  
4801 CCAAACACAT GAGCAAAAGG GGGAACTGAT CAACTATATT GGCCTTAGTG  
4851 TGTGTGATGA GAATGAGTGT GTATAAGTGT TTCCCAGTAA TGGGTTGCAG  
4901 CTGTAAGGGC ATTCACACACA TAAAACATAC GCTGGAATAG TTGGAGTTCA  
4951 TTCCACTGTG GCGACCTGAT GAATAAGGGA CTGGGCTGAA GGAAAATAAG  
5001 TGAATGTCTT GTTGATTGTG TGTATAATAT ACCCCTTACC ACTAGGGGGA  
5051 GTCCTGCTAA TAAACAAGAC TTCAGTTTGC TTTTAAATCC GGTTTTCCAG  
5101 ATGAGGCTGA AGTGTACAAA GACATTTACT TGCAGTAGAA ACATTTGAGA  
5151 GTAATACCCT TAAGAGAGTA GATGACGGAT TACTGTGAAA GTGACTGATG  
5201 CTTTTATTCA GCATCTTTAC AGTAGATTTA CAGCGCTGCA GGGCCTGAG  
5251 GAGTGTGCTG ATGTGTGTAT AAGCTGAGCT TCAGAGCAGA TGTGACATGA  
5301 AGAGTGTAAG GACCACACAC GCACACACTC CCGTCACCGT GATCAGTATC  
5351 TCAGATGTGT GAAGTCTGTC AGGCTGCTGA ACTGAGCTGC TCTGCGCTGG  
5401 AGTGATGTCC TGCTCGTTAA ATGCTGCTGC TCCAGCTCTC TCTGATGACC  
5451 GGCTGGTGGG CTGTGTGGCC GCAGAGTAAC ATGCTGATGG TGAAACAACA

5501 AATGAAAGTG TCATTAAGAT CATGGCTGCA ANACCCCTAC GCAGTTCTGT  
 5551 AATACATATG CATGATGCCT ATTAATGTAT CAGAGCAGAG TCTGACCAAT  
 5601 CAGAGAAGAG GAGTCATCAG AGTAATCACA GCAGAGAAGG TTGCCGGTTF  
 5651 GAGCCCCAGC TGGCCTTTCT GTGTGGAGTF TGCATGTTCT CCTGTGTTGG  
 5701 TGTGAGTTTC CTCCGGGTGT CCGGTTTCCC CCACAGTCCA AACACATGAG  
 5751 TACAGGTGAA TTGGGTAGGC TAAATTAGCC GTAGTGTATG TGTGTGAATG  
 5801 TAAGAGTGTG TGGCTGTTTC CCAGTGACGG GTTGTAGCTG GAAGGGCATC  
 5851 CGCTGCGTAA CGCCTCATT CACACGGGGCT TCAGCGTCAA TGCTTGACTG  
 5901 AAGGCGTGTC TGAAGTTGGG GCTGACGCGA TCACCATAGC AGCGTCAGCC  
 5951 AATGAAATTA GTCAGCAATA GGCCACTGTC TGAGCTGGTG TATTTGCATA  
 6001 CAGTGATCTG ATTGCTGAC GCTTCTGTCG GCACTTGAAA AGTTGAGCAA  
 6051 GTCCTAACTT CTGCTGCGAG CAATGCCTCT GAAGCGGCGC CGACGGATTT  
 6101 GAAGCTGACG CCCTGTGTGA ATGGGACGCC AACATATGC TAATAAGTTG  
 6151 GTGGTTCATT CCGCTGTGGT AATAAAGGA CTAAGCTGAC TAGAAAATGA  
 6201 ATGAATGAAT GTATTGCAGA GGAATGAAAT ATTGCAATGT CATTTCCCAA  
 6251 TATCGTGCAG CCCGTATCAC CTGATCCTCG AGGGCNTCTA T

### 8.3 Primer

#### a) Standardprimer

<i>Primer-Name</i>	<i>5' @ 3'- Sequenz</i>	<i>Schmelztemperatur °C</i>
<b>M13 Universal</b>	GTAAAAGCACGGCCAGT	53.5
<b>M13 reverse</b>	CAGGAAACAGCTATGAC	52.1
<b>Embl r</b>	GATAACTTCCGGTGACCTGTTATTGTG	63.4
<b>2embl 1</b>	CCTCACTGGCCTAATACGACTCAC	60.0
pNot	AGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTT	
NotI[dT] <sub>18</sub>	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT <sub>18</sub>	

## b) NaPi-IIb1

<i>Primer-Name</i>	<i>5'®3'- Sequenz</i>	<i>Schmelztemperatur °C</i>
<i>ZFSeq1</i>	GGGAATTATTCTGTCAAACCTC	53.8
<i>ZFSeq3</i>	GCACTGTACTCATTTTACATTTAGACG	57.6
<i>ZFSeq4</i>	GAGTGAATATGTCCAAACCC	55.1
<i>ZFSeq6</i>	CAATTATGCAGAGCACTGTAG	55.1
<i>ZFSeq7</i>	CTACTAAAATTTATCAGCATTGC	53.6
<i>ZFSeq8</i>	AATAAAGCCTAACACAGTAAC	52.8
<i>ZFSeq9</i>	GATATCACAATATTACCCC	52.4
<i>ZFSeq10</i>	GTGATCCAATGAATAGTTATGG	54.3
<i>ZFSeq11</i>	CCTATGTACAGTACAAAGTTAC	54.3
<i>ZFSeq12</i>	TCCATCTAAAATGCCAGTTC	55.1
<i>ZFSeq13</i>	GACTGTTGTGAAGCTCTCCCTG	58.7
<i>ZFSeq14</i>	CCTGACTGCAGTATCGCC	56.7
<i>ZFSeq15</i>	GTCCGCTTTCACATCGG	55.3
<i>ZFSeq16</i>	GGACATTGTAATGTTGC	51.2
<i>ZFSeq17</i>	TGTGATGGGGATTGGGTACC	57.2
<i>ZFSeq18</i>	GGCTCAGTCCGGCCTCTGTTG	60.8
<i>ZFSeq19</i>	GTGCAACTGCTGTTCCC	56.6
<i>ZFSeq20</i>	AACTTCTCCTGTCCCAAC	63.2
<i>ZFSeq21</i>	GTATTGAAAGGGCATATCC	53.2
<i>ZFSeq22</i>	GCAGTAGTAGTTGTTCC	52.1
<i>ZFSeq23</i>	CAGGAATCAGTCACTCTTCTGGG	54.4
<i>ZFSeq24</i>	CAGTCTTGTCTCATGTCATTCCAGG	57.9
<i>PNI-1</i>	ACAGTGGCTCCTGCAAATGC	57.2
<i>PNI-2</i>	AGAGTGTGGTGACG	50.8
<i>PNI-3</i>	TGCGACCTCCAGCATTCCAG	58.4
<i>PNI-4</i>	ATCCCGATAACCAGGCCTGC	58.4
<i>PNI-5</i>	TGCTCATGCTTTGGACGTGG	57.2
<i>PNII-1</i>	CTCTCCAGAATGTTGACCAC	56.0
<i>PNII-2</i>	TATTAGCCGCCATGGCTAGTCC	58.7
<i>Zfendrück</i>	AATGCACAGATCAGGGTTGACG	57.6

## c) NaPi-IIb2

Primer-Name	5'®3'- Sequenz	Schmelztemperatur °C
<b>Kb1</b>	CTCCGGACGCCCTGTGCTG	60.7
<b>Kb7</b>	CTCATTGCGGTCTCCAGC	56.7
<b>Kb8</b>	GGATGCTCTACAGACTCACC	57.2
<b>Kb9</b>	CTGTGATTCGTGACATCGCC	57.0
<b>Kb10</b>	TCTTGATCAAACCTTTTGTTCGG	55.7
<b>Kb11</b>	GCTGGAGACCCGAATGAG	55.3
<b>Kb14</b>	CTCTTTGCCATGATGACAGCAC	56.5
<b>Kb15</b>	GCTATGATGATTGTGTCAGCCC	53.6
<b>Kb16</b>	TCCCGGCTCCCACGAGGATG	61.6
<b>Kb17</b>	AAACACCCTTAATGTGTTTCATCC	51.6
<b>Kb18</b>	CATGAGTGTAACGATGTAAGATAC	54.0
<b>Kb19</b>	GCATGATCTATGACACTTTCATTGTG	54.5
<b>Kb20</b>	CAGAGCTGAGGATGTCCAGG	58.4
<b>Kb21</b>	GTGGACCCGTGGGAGCTGCC	57.2
<b>Kb22</b>	TGTCCAGGAGCTTCCGGCAGC	60.8
<b>Kb29</b>	ACGCACATGTTTCGTGTTTGCC	58.1
<b>Kb30</b>	CTTAAATTCCTGACTTTCTAGTATCTAG	51.3
<b>Kb31</b>	TTGTCCGGGTCATTGAATATTC	54.8
<b>Kb32</b>	CCATTGAAGACTAGAAGGAGAACTTC	53.2
<b>Kb40</b>	GTAGCTGCTGCTACAACATAAACGG	59.2
<b>Kb42</b>	CATCTTCAGCTCCATCCTCC	58.4
<b>Kb43</b>	GTTC AACATTGCGTATCCTGC	57.6
<b>Kb44</b>	GAGTAAAGCTACCTAGTCGGGC	58.7
<b>Kb45</b>	GTTGATCAAACACAGCAGAAAACGC	58.0
<b>Kb46</b>	GCTCTGGACAAGAACCCTGAC	59.8
<b>Kb47</b>	GGTCACGGTCTTGTCCAGAGC	59.8
<b>Kb48</b>	CTCTATTTGAACACGGTTTATGG	55.7
<b>Kb49</b>	CACATATATT (C/A/G) TATGCTCAGCA (C/G) TG	56.2
<b>Kb50</b>	GGGTATAAGTAGTTTAACATTCTCACC	57.5
<b>Kb51</b>	GATAATGCGGTGCTGTCC	55.3
<b>Kb52</b>	CTGGACTAGAACCCTGACC	56.9
<b>Kb60</b>	TGAAGTTGCTGCTGCTGCTCGG	59.8
<b>Kb61</b>	GACCTGCTAAACCAGCCAATCGG	59.9
<b>KI-4</b>	ACAGAAGTGCCGATATTTGCAC	56.5



## 9 Danksagung

*Freunde und Kollegen haben mich bei dieser Arbeit persönlich und fachlich sehr unterstützt. Ganz besonders danke ich.....*

- ... Priv. Doz. Dr. Andreas Werner, der mir das Thema meiner Dissertation zur Verfügung stellte und mir durch die Zusammenarbeit mit ihm ein Teil seiner Energie und seines Optimismus übertrug.*
- ... Prof. Wolfgang Kreiser für die Übernahme des Korreferats und das Interesse und die Offenheit meiner Arbeit gegenüber.*
- ... Prof. Rolf K. H. Kinne, der mir die Möglichkeit gab, am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie zu arbeiten und mir jederzeit mit Anregungen zur Seite stand.*
- ... Prof. Roger S. Goody für seine Hilfe bei der Ermöglichung und zum Abschluß dieser Arbeit.*
- ... Leif Dehmelt für seine Ruhe, Geduld und Unterstützung in vielen Dingen des (Labor-) Alltags und für den Beweis, daß Liebe (wenn auch manchmal spät entdeckt!) das Leben wunderbar erhellen kann.*
- ... Beate Schölermann für die Durchführung der immunhistochemischen Arbeiten und die Analyse der genomischen Sequenzen. Sie führte dies mit großem experimentellen Aufwand und persönlichem Einsatz aus und unterstützte mich dabei besonders in der letzten Phase meiner Arbeit stets freundschaftlich.*
- ... meiner Freundin Semanur, die mich ohne müde zu werden mit aller Kraft unterstützte, mit viel Geduld meine diversen Krisen ertrug und mir Trost, Hoffnung und Lebensfreude gab.*
- ... meinen Freunden Kati & Simon, und natürlich meinem „Sonnenschein“, dem kleinen Christian. Sie boten mir einen wunderschönen Ausgleich zu der Laborarbeit und ließen mich trotz ihrer eigenen Sorgen nicht alleine.*

- ... *Ursula Strunck für ihre lebenswürdige Art und die freundschaftlichen Gespräche, die für mich immer eine schöne Abwechslung waren.*
- ... *den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Werner, mit Birgit Hülseweh, Beate Kohl und Heike Rimpel, die mir mit vielen kleinen und großen Tips und einem freundlichen Arbeitsklima beim Einstieg in die Molekularbiologie sehr geholfen haben.*
- ... *Christoph Böhmer für die elektrophysiologischen Experimente an Oozyten des *Xenopus laevis*.*
- ... *Hartmut Hentschel für die Bereitstellung der Zebrafische und die Beratung zur Histologie der Fische.*
- ... *Walburga Hecker und Ruth Anders für die DNA-Sequenzierung und die Synthese der Oligonukleotide.*
- ... *Astrid Dörner für ihre Freundschaft und die äußerst ausführliche Korrektur meiner Arbeit.*
- ... *Alexander Giffey, Myriam Kasch, Udo Kirschner, Sigrid Rosin-Steiner und Hanna Tinel für die netten kleinen Freuden am Arbeitsplatz.*
- ... *meinen Schwestern Sonnur & Suna, meinem Bruder Oktay und meinen zahlreichen Neffen und Nichten für soviel Abwechslung in meinem Leben.*
- ... *nicht zuletzt meiner Mutter für ihre Liebe. Ich wünsche Dir ein gesundes und langes Leben!*

*Allah saglik ve uzun ömürler versin!*

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Perihan Nalbant  
Geburtsdatum: 29.09.1971  
Geburtsort: Recklinghausen  
Nationalität: deutsch

## Schulbildung

1977-1980	Grundschule:	Istanbul/Türkei
1980-1982	Grundschule:	Recklinghausen
1982-1984	Hauptschule:	Recklinghausen
1984-1991	Gymnasium:	Recklinghausen

06. Juni 1991 Hochschulreife

## Studium

Oktober	1991	Studium Chemie-Diplom an der Universität Dortmund
bis August	1997	
17. Oktober	1994	Diplomvorprüfung für Studierende der Chemie
Januar	1997	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung Epithelphysiologie, Prof. Dr. R. K. H. Kinne in der Gruppe von PD Dr. A. Werner zum Thema "Klonierung des Natrium/Phosphat Kotransporters aus dem Gewebe des Zebrafisches ( <i>Brachydanio rerio</i> )" unter der Betreuung von Prof. Dr. B. Lippert, Universität Dortmund.
bis August	1997	
01. August	1997	Diplom-Prüfung
Oktober	1997	Promotion am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund, Abteilung Epithelphysiologie, Prof. Dr. R. K. H. Kinne in der Gruppe von PD Dr. A. Werner zum Thema "Charakterisierung von zwei Na <sup>+</sup> /Phosphat Kotransportern des Typs NaPi-IIb aus dem Zebrafisch ( <i>Brachydanio rerio</i> ) und die Regulation durch Antisense-Transkripte" unter der Betreuung von PD Dr. A. Werner und Prof. Dr. W. Kreiser, Universität Dortmund
bis Juli	2000	