

Diss. ETH Nr. 7854

ORGANISATION GENOMISCHER SEQUENZEN DES M-KREATINKINASE-GENS

A B H A N D L U N G
zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
Ulrich Robert A c h t n i c h
dipl. Natw. ETH
geboren am 14. Juni 1957
von Winterthur, Kt. Zuerich

Angenommen auf Antrag von:
PD. Dr. J.C. Perriard, Referent
Prof. Dr. T. Koller, Korreferent

1985

KAPITEL 1

ZUSAMMENFASSUNG

Fruehere Arbeiten zeigten, dass die Isoenzym-Transition der Kreatinkinase (CK) im Huhnerskelettmuskel waehrend der Myogenese hauptsaechlich auf der Ebene der Transkription reguliert wird. Diese Transition eignet sich nun als Modellsystem zur Aufklaerung von Fragen der Regulation der Genexpression waehrend der Muskelentwicklung.

Diese Arbeit befasst sich einerseits mit der Organisation von M-CK-Sequenzen im Huhnergenom und andererseits mit der Isolation und der partiellen Charakterisierung von genomischen M-CK-Sequenzen.

Es konnte gezeigt werden, dass fuer die untersuchten genomischen M-CK-Sequenzen kein Polymorphismus weder in den verschiedenen Geweben eines Huhnes, noch in White Leghorn Huehnern verschiedener Familien der Inzuchtlinie 79 vorliegt. Durch einen Vergleich der genomischen M-CK-Organisation von White Leghorn Huehnern amerikanischen Ursprungs, die nicht durch Inzucht vermehrt wurden, konnten grosse allelische Unterschiede entdeckt werden.

Die Anzahl der M-CK-Genloci konnte auf 1 bis 2 pro haploides Genom eingeschraenkt werden. Sie befinden sich auf einem 50kbp-EcoRI-Fragment.

Die Isolation von genomischen M-CK-Sequenzen wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Ordahl (Universitaet von Kalifornien, San Franzisko) durchgefuehrt. Aus der M-CK-5'-Region wurde eine Strecke von ca. 30kb isoliert und Restriktionsanalysen unterworfen. Es konnte gezeigt werden, dass am 3'Ende der M-CK-mRNA ein Element vorliegt, welches im Genom ca. 20-30 Mal reiteriert ist. Zu diesem Element entsprechende genomische Abschnitte wurden isoliert und ebenfalls Restriktionsanalysen unterworfen. Mit grosser Wahrscheinlichkeit konnte dabei ein solcher Abschnitt (λ MCK1) dem 3'Ende eines (des) M-CK-Gens zugeordnet werden.

Genauere Analysen des λ MCK1 ergaben, dass in einer nicht-transkribierten Region ein hochrepetitives Element vorliegt.

ZUSAMMENFASSUNG

Northern Blot Analysen ergaben, dass in der Region des niederrepetitiven Elementes Sequenzen existieren, die nicht nur mit M-CK-mRNA, sondern noch mit einer grösseren RNA hybridisieren können, die ebenfalls in Skelettmuskel akkumuliert wird, aber nicht in Herzmuskel noch im Kaumagen.

KAPITEL 2

SUMMARY

Earlier work showed that the isoenzyme transition of the creatine kinases (CK) in chicken skeletal muscle during myogenesis is probably regulated at the level of transcription. There are several features of the CK transition, which are discussed, that make this an excellent model system to study regulation of gene activity during a developmental process like myogenesis

The work presented here deals with the genomic organization of M-CK sequences in different tissues and in chicken from several "white leghorn" strains. Further experiments are shown dealing with isolation and characterization of genomic DNA containing M-CK sequences.

In neither the different tissues of "leghorn chicken" nor in erythrocyte DNA from several individual chicken of the inbred line 79 was a polymorphism for M-CK detected. However a comparison with the genomic organization of M-CK in DNA derived from not inbred american "white leghorn" revealed a different organization.

Gene titration experiments have shown that the number of loci is in the order of 1 or 2 M-CK genes per haploid genome. These sequences are located on a 50kb EcoRI fragment and its cloning on phages was very hard to achieve. The isolation of genomic M-CK sequences was carried in collaboration with the group of Prof. C. Ordahl (University of California, San Francisco). A region of about 30kb was isolated and analysed with several restriction enzymes and shown to contain the 5' region of M-CK. For the 3' end many clones were found to be positive with a 350bp 3' end M-CK cDNA probe. This probe was shown to contain a repetitive element reiterated 20-30 fold in the genome. One clone isolated with this probe, λ gMCK1, was characterized and was shown to be most likely a 3' segment of the M-CK gene. Further analysis of the clone λ gMCK1 revealed an additional highly repetitive element which is different from the already mentioned repetitive element. This latter element was investigated more thoroughly using northern blot analysis probed with different segments of this genomic piece of DNA. The genomic DNA probe containing the lowly repetitive element was shown to hybridize to M-CK mRNA and to a larger RNA which

SUMMARY

was found only in skeletal muscle, not in heart or gizzard.