

(19)



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer:

**AT 407 990 B**

(12)

## PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1869/98  
(22) Anmeldetag: 10.11.1998  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.2000  
(45) Ausgabetag: 25.07.2001

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/12**  
C12Q 1/68

(73) Patentinhaber:  
RED BULL GMBH.  
A-5330 FUSCHL AM SEE, SALZBURG (AT).  
(72) Erfinder:  
LUBEC BARBARA DR.  
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR DIAGNOSE VON HYPOXISCH ISCHÄMISCHEN ZUSTÄNDEN UND KRANKHEITSBILDERN

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Diagnose von hypoxisch ischämischen Zuständen und Krankheitsbildern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß in einer von einem Patienten mit Verdacht auf hypoxisch ischämische Zustände und Krankheitsbilder entnommenen Probe die Anwesenheit und Menge wenigstens eines Transkriptionsfaktor-(TF)-cDNA in vitro festgestellt wird.

**AT 407 990 B**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose von hypoxisch ischämischen Zuständen und Krankheitsbildern.

Die Pathomechanismen bei der perinatalen Asphyxie (Pa) auf Genexpressions-Niveau im allgemeinen und die Rolle von Transkriptionsfaktoren (TF) im besonderen sind bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Im Hirn, dem besonders dramatischen Ziel von asphyktischen Schäden, sind Informationen über die Rolle von TF nicht verfügbar. Dies kann dem Umstand zugeschrieben werden, daß kein geeignetes Tiermodell für PA verfügbar war und die bestehenden Modelle eher den Schlaganfall oder die Ischämie als PA wiedergaben (1).

Es gibt jedoch Berichte über TF in Hypoxie, einem pathophysiologischen Zustand, der der PA wenigstens ähnelt: Giacca und Mitarbeiter berichteten die Aktivierung des Hitzeschocktranskriptionsfaktors in normalen und Tumorzelllinien mit maximaler Induktion bei oder nach 3 Stunden (2). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Hypoxie in Tumorzellen wurde von Yao und Mitarbeitern 1994 berichtet (3) und die Analyse der Kinetik der TF-Expression zeigte an, daß die Expression von c-jun und junD während der hypoxischen Exposition induziert wurde und daß die mRNA-Niveaus während der erneuten Sauerstoffzufuhr abnahmen. AP-1-Induktion durch die Hypoxie aktivierenden Gene wie Endothelin-1, plättchenabgeleiteter Wachstumsfaktor, Collagenase IV, wurde dann in endothelialen Zellen durch Banyopadhyay (4) und in HeLa-Zellen durch andere (5) bestätigt.

Ein wichtiger TF, allgegenwärtig spezifisch und gut dokumentiert, ist der Hypoxie induzierbare Faktor (6-12): Er wurde zuerst als eine DNA bindende Aktivität beschrieben, die insbesondere ein 8bp-Motiv erkennt, das als wesentlich für die Hypoxie induzierbare Erythropoietin-Gentranskription bekannt ist. Später wurde HIF-1-Aktivität auch in Zelllinien gefunden, die Erythropoietin nicht exprimieren, was nahelegt, daß HIF-1 Teil eines weitreichenden Sauerstoff erfassenden Mechanismus ist. Es ist ein heterodimerer, basischer Helix-Schleifen-Helix- TF, der Gene steuert, deren Produkte Schlüsselrollen im Beibehalten der O<sub>2</sub>-Homeostase spielen. Kvietikova und Mitarbeiter haben berichtet, daß die TF ATF-1 und CREB-1 konstitutiv an das HIF-1 binden (13). Wir fanden die Hirn HIF-1-Expression im Hirn von hypoxischen Ratten Stunden nach der hypoxischen Exposition, waren jedoch nicht in der Lage, dessen Expression im Hirn von Ratten mit PA und einer asphyktischen Phase von 20 min zu entdecken (14). Ein anderer TF, EPAS1, verwandt zum HIF-1 und durch Hypoxie in endothelialen Zellen induzierbar, wurde unlängst durch Tian und Mitarbeiter veröffentlicht (15); er bildet mit dem Arylkohlenwasserstoff-Kerntransporter vor der transkriptionalen Aktivierung der Zielgene, wie beispielsweise dem Tyrosinkinasegen Tie-2, einen heterodimeren Komplex. Die Aktivierung von TF NF-kappa B p65, gefolgt von einer Induktion von Cyclooxygenase-2 in menschlichen, vasulären Endothelialzellen wurde von Schmedtje und seiner Gruppe gezeigt (16): menschliche endotheliale Zellen der Nabelvene zeigten eine mehr als vierfache Induktion von COX-2-Protein bei 1 % Sauerstoff, vermittelt durch Binden von NF-kappa B p65 zu dem 3'NF kappa B Konsensus-Element in der Promotorregion stromaufwärts von COX-2. Yan und Mitarbeiter berichteten unlängst, daß Kernfaktor Interleukin 6-Motive die gewebespezifische Gentranskription in Hypoxie medierte (17); Aktivierung der Transkription beim Nuklearfaktor-Interleukin 6-DNA-Bindungsmotiv veränderte die Expression von multiplen Genen, die wichtig sind in Wirtadaptation und Entwicklungsmechanismen. Transgene Mäuse, die eine durch Mutation inaktivierte NF Interleukin 6-Stelle tragen, zeigten keine Zunahme der Genexpression nach Exposition zu Hypoxie. So wichtig sie jedoch sind, zeigten die meisten Studien von TFs kein klares Muster oder eine konzertierte Wirkung von Transkriptionsfaktoren. Wir wendeten daher die subtraktive Hybridisierung an, eine Technik zum Auffinden von Genen, um die Unterschiede bei der TF-Expression zwischen dem normoxischen und dem asphyktischen Rattenhirn in einem gut dokumentierten Tiermodell von PA aufzuzeigen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war demgemäß ein verlässliches Verfahren zur Detektion von hypoxisch ischämischen Zuständen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Diagnose von hypoxisch ischämischen Zuständen und Krankheitsbildern, welches sich dadurch auszeichnet, daß in einer von einem Patienten mit Verdacht auf hypoxisch ischämische Zustände und Krankheitsbilder entnommenen Probe, die Anwesenheit und Menge wenigstens eines Transkriptionsfaktor-(TF)-cDNA in vitro festgestellt wird.

Bevorzugterweise werden dabei ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren der Gruppe

NFI/CAAT-Bindungsprotein (EMBL X92857), NF-kappa-B p65-Untereinheit (EMBL M62399), N-myc (EMBL X63281), basisches Helix-Schlaufen-Helix-Protein (EMBL D82868), MIBP1 (c-myc intron-Bindungsprotein) (EMBL D37951), SOX4 (EMBL X70683), neuronaler Todesfaktor (EMBL D83697), c-maf=c-Maf-Protein (Protooncogen) (EMBL S74567), PEBP2alphaA (PEBP major-Transkriptionsfaktor) (EMBL Af005936), DNA-Bindungsprotein (Brn-2) (EMBL L27663), Homeodomainprotein (EMBL Af004431) und Zink-Finger-Transkriptionsfaktor (EMBL M65008), detektiert und quantifiziert.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, näher erläutert.

**Beispiel:**

**Verfahren: Tiere und Versuchsmuster**

Asphyxie wurde induziert in Jungtieren, die durch Kaiserschnitt trächtiger Sprague-Dawley-Ratten (18, Review in 19) gewonnen wurden. Innerhalb des letzten Tages der Trächtigkeit, ermittelt durch Estabularium-Protokolle, wurden die Tiere durch Halsdislokation getötet und hysterektomiert. Die noch die Föten enthaltenden Gebärmutterhörner wurden 20 min lang in ein Wasserbad bei 37°C gegeben. Durch Kaiserschnitt gewonnene Kontrolljungtiere und asphyktische Jungtiere stammen von der selben Mutter, da jede Ratte etwa 10 bis 14 Jungtiere ergab. Nach der asphyktischen Phase von 10 oder 20 min, - d.h. Inkubation bei 37°C - wurden die Gebärmutterhörner rasch geöffnet und die Jungtiere entnommen. Die Jungtiere wurden durch Enthaupten 10 min nach der asphyktischen Phase getötet und die Gehirne rasch entfernt. Es wurden nur Würfe mit Jungtieren mit einem Gewicht von mehr als 4,5 g zum Zeitpunkt des Gewinnens in den Versuchen verwendet.

Die Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien der American Physiological Society durchgeführt.

Ganze Hirne (ein Vorrat von drei jeder Gruppe, d.h. von normoxischen Tieren, 10 min Asphyxie und 20 min Asphyxie) die für die subtraktiven Hybridisierungsstudien verwendet wurden, wurden bei -80° aufgehoben, bis die Versuche ausgeführt wurden.

Subtraktive Hybridisierung (SH)-Protokoll (20, 21)

Die gepoolten Gehirne von normoxischen und 10 oder 20 min asphyktischen Ratten-Jungtieren wurden für die Isolierung von mRNA zur Verwendung des Quick Prep Micro mRNA-Reinigungs-Kits (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden, Kat. 27 92 55 01) herangezogen.

1 Mikrogramm mRNA aus jeder Präparation wurde mit einem cDNA-Klonierungs-Kit (Gibco, Life Technologies, Eggenstein, Germany, Kat. 18248013) hinsichtlich Qualität überprüft, wobei der Einbau von [Alpha-<sup>32</sup>P]dATP] (Amersham, Buckinghamshire, UK, Kat. AA0004) mit nachfolgender Elektrophorese auf 1%-ig Agarose gefolgt von Autoradiographie verwendet wurde. Der Reflexionsfilm (Dupont NEF 496) wurde dem Gel für eine Zeitspanne von zwei Stunden bei Raumtemperatur exponiert.

Konstruktion der der subtraktiven Bank: 10 Mikrogramm jeweils von mRNA von Hirn von PA und Kontrolltieren wurden durch UV-Bestrahlung bei 360 nm gemäß den Vorschriften in dem Subtraktor-Kit (Invitrogen, Leek, Netherlands, Kat. K432001) biotinyliert. 1 Mikrogramm mRNA-Pools jeweils von dem DS-Hirn Probe wurden der reversen Transkriptasereaktion (Subtraktor-Satz, Invitrogen) unterworfen und die cDNA-Vorräte wurden mit der entsprechenden biotinylierten mRNAs aus den Versuchstieren hybridisiert.

Die SH-Mischung wurde mit Streptavidin gemäß dem obigen Subtraktor-Kit inkubiert und so die biotinylierten Moleküle (nichtinduzierte, biotinylierte mRNAs und das Hybrid [biotinylierte mRNAs / cDNAs]) komplexiert. Die Streptavidinkomplexe wurden durch wiederholte Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt und die subtrahierten cDNAs wurden aus der wässrigen Phase durch Alkohol-fällung (Subtraktor-Kit) abgetrennt.

Um subtrahierte cDNAs zu vermehren und zu klonieren, wurden sie mit Not I-Linkern ligiert, gefolgt durch Not I-Verdau. Die Not I-Linker tragenden cDNAs wurde in die Not I-Stelle des sPORT 1-Klonierungsvektors (cDNA-Klonierungs-Kit, Gibco) ligiert.

Um die Visualisierung von subtrahierten cDNAs zu ermöglichen, wurden die klonierten cDNAs unter Verwendung der universellen Primer  
I 5'-GTAAAACGACGACGGCCAGT-3' und

II 5'-ACAGCTATGACCATG-3'

aus der multiplen Klonierungsstelle des sSPORT-1-Vektors (cDNA-Klonierungs-Kit Gibco) amplifiziert. Die amplifizierten cDNAs wurden durch 1%ige Agarose-Elektrophorese analysiert.

Klonieren von subtrahierten Not I-gelinkten cDNAs

Not I-geklingte cDNAs, ligiert mit sSPORT 1-Vektor, wurden für die Transformation von hochkompetenten INFalpαF' E. coli-Zellen (Invitrogen, Leek, Netherlands, Kat. C2020-03) verwendet und platierte Klone wurden durch einen Plasmidisolations-Kit (Quiagen, Hilden, Germany, Kat. 12245) und Verdau mit Eco RI/Hind III analysiert. Rekombinante Klone wurden durch K. Granderath, MWG-Biotech (Ebersberg, Germany) sequenziert.

Homologien wurden durch computergestützten Vergleich der Daten aus der Genbanksequenzbank: fastA@ebi.ac.uk (GBALL, Gen, Bank, EMBL, Heidelberg, Germany) bestimmt.

SH wurde kreuzweise ausgeführt, d.h. PA-Proben mRNA-Subtraktion von der Kontrolle und umgekehrt beim 1:3-Niveau (asphyktisches Hirn-mRNA : normoxisches Hirn mRNA).

Ergebnisse

SH zeigte, daß eine Reihe von Sequenzen im PA-Hirn verschieden ist vom normoxischen Hirn, die wie in Tabelle 1 gezeigt, als TF identifiziert wurden.

Tabelle 1

Bei 10 min Asphyxie wurden fünf TF aufwärtsreguliert (NFI/CAAT-Bindungsprotein, NF-kappa-B p65, N-myc, basisches Helix-Schlaufen-Helix-Protein, c-myc-Intronbindungsprotein). Bei 20 min Asphyxie wurden nur zwei TF, SOX4 und der neurale Totfaktor als aufwärtsreguliert gefunden, eine Reihe von sechs TF (NF-H-Gen, c-maf, PEB-Haupttranskriptionsfaktor, brn-2, Homoedomainprotein und Zinkfingertranskriptionsfaktor) wurden hinunterreguliert.

Die Unterschiede in der TF-Expression waren wenigstens dreifach, da in der subtraktiven Hybridisierungsprozedur ein dreifacher Überschuß der entsprechenden mRNAs, wie oben angegeben, verwendet wurden.

Fig. 1 (a-l) zeigt die Ausrichtung der Sequenzen, die in unseren Klonen gefunden sind (asph) zu den Sequenzen aus der Genbank EMBL. Nur Sequenzen mit einer Homologie mehr als 50% wurden ausgerichtet.

**TABELLE 1. TRANSKRIPTIONSFAKTOREN aufwärts- oder hinunterreguliert in perinataler Asphyxie**

Nr.	Bank	Dauer d. Asphyxie	Name d. Gen	EMBL Nummer	Organismus	Länge der cDNA	Überlappung (bp)	% Homologie der cDNA
I	A/C	10 min	NFI/CAAT-Bind.prot.	X92857	hs	234	200	56
II	A/C	10 min	NF-kappa-B p65 Untereinheit	M62399	hs	513	513	90
III	A/C	10 min	N-myc	X63281	rat	272	272	100
IV	A/C	10 min	basisches Helix-Schlaufen-Helix-Protein	D82868	rat	349	349	100
V	A/C	10 min	MIBP1 (c-myc intron Bindungsprotein)	D37951	rat	477	477	100
VI	A/C	20 min	SOX4	X70683	hs	388	388	94
VII	A/C	20 min	Neuronaler Todesfaktor	D83697	rat	373	373	100
VIII	C/A	20 min	c-maf=c-Maf Protein (Protooncogen)	S74567	mouse	410	404	53

	Nr.	Bank	Dauer d. Asphyxie	Name d. Gen	EMBL Nummer	Organismus	Länge der cDNA	Überlap-pung (bp)	% Homologie der cDNA
5	IX	C/A	20 min	PEBP2alphaA (PEBP major-Transcriptionsfaktor)	Af005936	mouse	323	323	97
10	X	C/A	20 min	DNA Bindungsprotein (Brn-2)	L27663	rat	235	235	100
	XI	C/A	20 min	Homeodomainprotein	Af004431	rat	237	237	100
15	XII	C/A	20 min	Zink-Finger-Transcriptionsfaktor	M65008	rat	405	405	100

A/C - Durch Asphyxie induzierte Transkription

C/A - Durch Asphyxie hinunterregulierte Transkription

20

Die etwa 5000 TF in einem Säugetierhirn sind von fundamentaler Bedeutung für die Hirnfunktionen, wie Verknüpfungen im Hirn, Entwicklung, Reparatur, Plastizität, um einige wenige zu nennen (22). Wir fanden eine Änderung der steady-state von TF-mRNA im neonatalen Rattenhirn mit PA schon ab 10 min nach 10 oder 20 min Asphyxie.

25

Bei 10 min PA war eine Sequenz die den nuklearen Faktor I/CAAT-Bindungsprotein repräsentiert aufwärtsreguliert. Bislang wurde diesem spezifischen TF keine Funktion zugeordnet (23) und dies ist der erste Bericht der NFI in der Säugetierpathophysiologie eine mögliche Rolle zuordnet.

30

NF-kappa B p65 (p65) wurde in unserer Studie bei 10 min Asphyxie aufwärtsreguliert und ist bereits als in Hypoxie verwickelt gezeigt worden, indem es die NAD(P) H:Quinonoxidoreduktase in vitro induziert (24). Koong und Mitarbeiter haben gezeigt, daß Hypoxie die Aktivierung des Nuklearfaktors kappa B in vitro durch die Phosphorylierung von I kappa B Alpha auf Tyrosinresten verursacht. Es ist bekannt, daß die Aktivierung von NF-kappa B eine Vielzahl von frühen Antwortgenen induziert (25). Wir konnten hiermit die Relevanz dieses TF für den hypoxischen Zustand von PA in vivo bestätigen.

35

Die Aufwärtsregulieren von N-myc, das im Hirn von Ratten mit einer asphyktischen Spanne von 10 min gefunden wurde, kann die Verwicklung in den apoptotischen Wegen reflektieren. Die Teilnahme einer Reihe von myc-Protoonkogenen in den apoptotischen Wegen wurde beschrieben (26) und wir haben beschrieben, daß die Apoptose im Hirn von perinatal asphyktischen Ratten in dem oben beschriebenen Modell (27) stattfindet.

40

Das neue basische Helix-Schlaufen-Helix-Protein (bHLH) D82868 wurde bei 10 min von PA aufwärtsreguliert. Es ist einer der bHLH-TF, der bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine wesentliche Rolle spielt und der ausschließlich im Hirn exprimiert wird (28). Die einzige Veröffentlichung, die über diesen TF erhältlich ist, beschreibt das molekulare Klonieren aus dem Rattenhirn und wir ordnen der Pathophysiologie von PA in der frühen Phase eine vorläufige Rolle zu. Es wurde bereits beschrieben, daß Mitglieder der bHLH-Familie in hypoxischen Zuständen involviert sind: Das am meisten bekannte Mitglied ist das HIF-1, Sim-2 hemmt die Transkription durch aktive Repression und funktionelle Interferenz des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (29) und ein bHLH-PAS-Faktor mit einer Sequenzhomologie zu HIF-1 bindet in der Hypoxie zu dem HIF-1 kontrollierenden, vakulären, endothelischen Wachstumsfaktor (30).

50

Der fünfte TF, der bei 10 min von PA überexprimiert wird, ist das c-myc-Intron-Bindungsprotein (MIBP1). Der einzige veröffentlichte Bericht beschreibt das Klonieren und die Charakterisierung aus der Ratte, es ist reichlich im Hirn und enthält Zinkfingerregionen und bis jetzt wurde keine Funktion gezeigt. Wie oben vorgeschlagen, kann es sehr wohl mit myc-Motiven in dem Verfahren der Apoptose im Hirn von Ratten mit PA wechselwirken (31).

55

Zwei TFs werden bei 20 min PA im Rattenhirn aufwärtsreguliert: SOX4 ist ein Mitglied der

hochbeweglichen Gruppen TF und es wurde gezeigt, daß es den menschlichen CD2-Verstärker transaktiviert (32). Die beschriebene T-Zellen- und lymphoidspezifische Transkriptionsfunktion von SOX4 kann auf das Hirn ausgedehnt werden, wo es eine Funktion unterschiedlich zu der in Lymphozyten haben kann. Es kann durch seine Wechselwirkungen mit Interleukin - 2 NF-AT (32) zur PA-Pathophysiologie beitragen.

Der neuronale Todesfaktor D83697 wurde durch differentielles Display-Screening gefunden, ein Verfahren zum Suchen von Genen vergleichbar mit unserer Methode von SH. Dieser Faktor wurde durch Deprivation des Nervenwachstumsfaktors mit einer Spitze 15 Stunden nach der Induktion dessen programmierten, neuronalen Todes induziert. Überexpression des neuronalen Todesfaktors in kultivierten Neuronen war für sich hinreichend, um Apoptose zu induzieren (33). Diese Feststellungen zusammen mit unserer Beobachtung der frühen Aufwärtsregulierung legt eine Funktion im apoptotischen Prozeß nahe, die in der PA stattfindet.

Fünf TF wurden im Rattenhirn bei 20 min PA hinunterreguliert. Eine besondere Feststellung, wenn berücksichtigt wird, daß im Hirn etwa 5000 TF exprimiert werden:

Das Protooncogen c-maf ist ein basischer Zipper TF und ist verantwortlich für die gewebespezifische Expression von Interleukin-4 (34). Es wird im Hirn stark exprimiert und kann in der konzentrierten Aktion mit anderen Protooncogenen in Entwicklungsprozessen involviert sein (22, 35). Korschner und Morgan haben gefunden, daß maf die Transkription von mehrfachen Stellen in einem Promotor stimuliert, der die Purkinje neuron-spezifische Genexpression dirigiert (36). Überdies kann Maf an AP-1-Stellen binden und bildet mit Fos und Jun Heterodimere (37) und dieses bildet eine Verbindung zu einer Bedeutung von AP-1 in Hypoxie wie oben in der Einleitung erwähnt (3).

Die Regulierung von PEBP2alpha bei 20 min PA nach unten kann als die Regulierung nach unten eines anderen Protooncogens angesehen werden, zumal Stewart und Mitarbeiter dieses TF als ein direktes Onkogen beschrieben haben und überdies eine Wechselwirkung mit myc Protooncogenen berichtet worden ist (38).

Brn-2 ist ein zentrales Nervensystem-spezifischer POU-Domain TF, das in Migrations- und/oder Reifungsprozessen im Hirn eine Rolle spielt (39). Die Entfernung des genomischen Brn-2-Lokus beeinflusst die terminale Differenzierung und/oder die Beibehaltung von hypothalamischen, neurosekretorischen Neuronen (40, 41) und in der Tat haben wir in dem Tiermodell von PA, das für die vorliegende Studie verwendet worden ist (nicht veröffentlicht) morphologische Abnormalitäten in Ratten festgestellt, die 20 min Asphyxie drei Monate lang überlebt haben. Fuji und Hamada berichteten 1993, daß Brn-2 überhaupt für die Bildung neuralen Zell-Linien von Säugetieren benötigt wird: Wenn die Brn-2-Induktion durch Antisense-RNA blockiert oder verzögert wurde, waren undifferenzierte Zellen nicht in der Lage sich zu Neuronen und Astrozyten zu differenzieren. Stattdessen differenzierten sie in nonneurale Zellen einschließlich glatter und Skelettmuskelzellen (42). Die Regulierung nach unten bei 20 min PA kann sehr wohl Defekte der Hirnentwicklung und der Funktion erläutern werden, die PA begleitet und folgt (19).

Es gibt nur einen molekular-biologischen Nachweis für das homeodomäne Protein Af004431 und es sind keine funktionellen oder biologischen Daten verfügbar und Schlußfolgerungen können nicht direkt von Funktionen der homeodomänen Superfamilie gezogen werden. Manak und Scott haben zusammengefaßt, was über die konservierten Homeobox-Gen-Funktionen bekannt ist (43). Das Ergebnis dieses individuellen homeodomänen Proteins - Regulation nach unten im perinatalen, asphyktischen Hirn ist ein erster, vorläufiger Schlüssel zu einer möglichen Rolle in dem Pathomechanismus von PA.

Die frühe und verlängerte Expression der sechs TF "Zinkfingersofortfrühgene", nämlich NGFI-A, NGFI-B, NGFI-C, egr-2, egr-3 und Nurr1 während des hypoxischen/ischemischen Zustandes in der Ratte wurde beschrieben (44). Wir berichten die Regulation eines Zinkfinger TF, M65008 in PA schon 10 min nach einer asphyktischen Periode von 20 min nach unten. Dieser TF ist ein Zinkfinger-Transkriptions-Aktivator und ein Mitglied der GSG-Element-Bindeprotein-Familie und repräsentiert das Nervenwachstumsfaktor-induzierte frühe Antwortgen NGFI-C. NGFI-C mRNA ist innerhalb von Minuten der Stimulation von PC12-Zellen durch den Nervenwachstumsfaktor induziert (45).

In unserem Tiermodell von PA, eine Sequenz 100% homolog zu dem Nervenwachstumsfaktor J04154 wird etwa dreifach bei 20 min PA überexprimiert (nicht veröffentlicht), möglicherweise zu spät, um den Zinkfinger TF M65008 (NGFI-C) zu induzieren. Da die Tiere unseres Versuches

asphyktische Perioden länger als 20 min nicht überleben, kann die Regulation von NGFI-C nach oben, die in chronischen, hypoxischen Zuständen gefunden wurde, für unsere derzeitigen PA-Studien nicht relevant sein.

5 Zusammenfassend haben wir durch Anwendung der Genauffindungsmethode der SH ein Muster von TF-Expression in einem einfachen, gut dokumentierten Tiermodell von PA etabliert. Modifikation der TF-Expression schloß verschiedene Klassen von TF einschließlich POU, Zinkfinger, Homeodomain und basische Helix-Schlaufen-Helix-Motive ein. Diese Änderungen können mithelfen, die Hirnschädigung und Zerstörungsfunktion während und nach PA zu erklären. Unsere Feststellungen können zum Verstehen der postnatalen gestörten Hirnentwicklung hinsichtlich Struktur, Verknüpfung und Pathologie von perinataler Asphyxie beitragen. Die Änderung der konzentrierten Wirkung von TF, nämlich das pathophysiologische Muster von TF, das entwickelt wurde, kann auch die Basis für das Auffinden von Markern für die Hirnschädigung in PA bilden.

10 Obwohl Expressionsunterschiede individueller Transkriptionsfaktoren (TF) bei Ischämie und Hypoxie berichtet wurden, ist keine Information über TF in perinataler Asphyxie (PA) verfügbar. Daten über TF aus Ischämie oder Hypoxie können nicht einfach auf PA übertragen werden und es wurden keine Studien berichtet, wie ein Expressionsmuster oder eine konzentrierte Aktion von TF zeigen.

15 Wir haben daher eine Genauffindungstechnik, subtraktive Hybridisierung angewendet, um die Sequenzen verschieden im Hirn von normoxischen und perinatalen, asphyktischen (10 und 20 min von Asphyxie) Ratten zu zeigen. Diese subtrahierten Sequenzen wurden durch Genbank identifiziert und einzelnen Genen zugeordnet.

20 Bei 10 min PA wurden die TP NF1/CAAT-Bindungsprotein, NF-kappa-B p65, N-myc, basisches Helix-Schlaufen-Helix-Protein D82868 und c-myc intron Bindungsprotein aufwärtsreguliert. Bei 20 min PA wurden die TF SOX4 und neuronaler Todesfaktor aufwärtsreguliert, wogegen die TF c-maf, PEBP major Transkriptionsfaktor, brn-2, Homeodomain-Protein Af004431 und Zinkfinger-Transkriptionsfaktor M65008 nach unten reguliert wurden.

25 Die biologische Bedeutung unserer Feststellung, ist das Aufzeigen des pathophysiologischen Musters von TF einschließlich POU, Zinkfinger, Homeodomäne und basisches Helix-Schlaufen-Helix-Motiv in PA, das Vorschlagen von Pathomechanismen für die Hirnschädigung durch PA, Erläuterung transkriptionaler Änderungen im allgemeinen (wie beispielsweise NF-kappa-B p65, usw) oder in speziellen Begriffen (wie beispielsweise der neuronale Todesfaktor).

30 Diese Ergebnisse stellen die molekular-biologische Basis für weitere Studien der bislang schlecht verstandenen komplexen Pathophysiologie von PA dar und fordern diese heraus.

### 35 **Literatur**

1. Raju TNK (1992) Some animal models for the study of perinatal asphyxia. *Biol Neonate* 62: 202-214.
2. Giaccia AJ, Auger EA, Koong A, Terris DJ, Minchinton AI, Hahn GM and Brown JM (1992) Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in normal and tumour cells in vivo and in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23: 891-897
3. Yao KS, Xanthoudakis S, Curran T, O'Dwyer PJ (1994) Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia. *Mol Cell Biol* 14: 5997-6003.
4. Bandyopadhyay RS, Phelan M, Faller DV (1995) Hypoxia induces AP-1 regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochim Biophys Acta* 1264: 72-78.
5. Rupec RA and Bauerle PA (1995) The genomic response of tumour cells to hypoxia and reoxygenation. Differential activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B. *Eur J Biochem* 234: 632-640.
6. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia - inducible factor is a basic helix - loop - helix - PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514.
7. Jiang B-H, Semenza GL, Bauer C, Marti HH (1996) Hypoxia - inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* 271: C1172-C1180.

8. Wiener CM, Booth G and Semenza GL (1996) In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia - inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Comm* 225: 485-488
9. Wang GL and Semenza GL (1995) Purification and characterization of hypoxia - inducible factor 1. *J Biol Chem* 270: 1230-1237.
- 5 10. Jiang B-H, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL (1996) Dimerization, DNA binding and transactivation properties of hypoxia - inducible factor 1. *J Biol Chem* 271: 17771-17778.
11. Lee PJ, Jiang B-H, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AMK (1997) Hypoxia - inducible factor 1 mediates transcriptional activation of the Heme Oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 272: 5375-5381
- 10 12. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearheart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12: 149-162.
13. Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M (1995) The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia inducible factor - 1 DNA recognition site. *Nucleic Acids Res* 23: 4542-4550.
- 15 14. Chiappe-Gutierrez MA, Kitzmueller E, Labudova O, Fuerst G, Hoeger H, Hardmeier R, Nohl H, Gille L and Lubec B (1998) mRNA levels of the hypoxia inducible factor (HIF-1) and DNA repair genes in perinatal asphyxia of the rat. *Life Sci* (1998) accepted for publication
- 15 15. Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72-82
- 20 16. Schmedtje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS (1997) Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappa B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 601-608.
17. Yan SF, Zou MS, Mendelsohn M, Gao Y, Naka Y, Du-Yan S, Pinsky D, Stern D (1997) Nuclear factor interleukin 6 motifs mediate tissue-specific gene transcription in hypoxia. *J Biol Chem* 272: 4287-4294
- 25 18. Lubec B, Herrera-Marschitz M, Labudova O, Hoeger H, Marx M, Gille L, Nohl H, Mosgoeller W, Lubec G. (1997) Decrease of heart protein kinase C and cyclin dependent kinase precedes death in perinatal asphyxia of the rat. *FASEB J* 11: 481-492.
- 30 19. Chen Y. (1997) Perinatal asphyxia in the rat. Thesis. Karolinska Institutet, Repro Print AB, Stockholm.
- 20 20. Labudova O and Lubec G. (1998) cAMP upregulates the transposable element mys-1: a possible link between signalling and mobile DNA. *Life Sci* 62:431-437.
- 35 21. Labudova O, Fang-Kircher S, Cairns N, Moenkemann H, Yeghiazaryan K, Lubec G (1998) Brain vasopressin levels in Down Syndrome and Alzheimer's Disease. *Brain Res* accepted for publication
22. Stewart GJ and Davies RW (1997) in: *Molecular Biology of the Neuron* (Davies RW and Morris BJ, eds). Bios Scientific publishers, Oxford, UK, 1-18.
- 40 23. Novak A, Goyal N, Gronostajski RM (1992) Four conserved cysteine residues are required for the DNA binding activity of nuclear factor I. *J Biol Chem* 267: 12986-12990.
24. Yao KS and O'Dwyer PJ (1995) Involvement of NF-kappa B in the induction of NAD(P) quinone oxidoreductase by hypoxia, oltipraz and mitomycin C. *Biochem Pharmacol* 49: 275-282.
- 45 25. Koong AC, Chen EY, Giaccia AJ (1994) Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res* 54: 1425-1430.
26. Nakagomi T, Asai A, Kanemitsu H, Narita K, Kuchino Y, Tamura A, Kirino T (1996) Up-regulation of c-myc gene expression following focal ischemia in the rat brain. *Neurol Res* 18: 559-563.
- 50 27. Dell'Anna E, Young Chen, Engidawork E, Andersson K, Lubec G, Luthman J, Herrera-Marschitz M (1997) Delayed neuronal death following perinatal asphyxia in rat. *Exptl Brain Res* 5: 301-309.
28. Kume H, Mauyama K, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC, Obata K (1996) Molecular cloning of a novel basic helix-loop-helix protein from the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 526-530
- 55 29. Moffett P, Reece M, Pellettier J (1997) The murine Sim-2 gene product inhibits transcription

by active repression and functional interference. *Mol Cell Biol* 17: 4933-4947.

30. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4273-4278.

31. Makino R, Akiyama K, Yasuda J, Mashiyama S, Honda S, Sekiya T, Hayashi K (1994) Cloning and characterization of a c-myc intron binding protein (MIBP1). *Nucleic Acids Res* 22: 5679-5685.

32. Wotton D, Lake RA, Farr CJ, Owen MJ (1995) The high mobility group transcription factor, SOX4, transactivates the human CD2 enhancer. *J Biol Chemistry* 270: 7515-7522

33. Imaizumi K, Tsuda M, Imai Y, Wanaka A, Takagi T, Tohyama M (1997) Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem* 272: 18842-18848.

34. Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH (1996) The protooncogene c-maf is responsible for the tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85: 973-983.

35. Nakayama H, Yamasaki H, Nishizawa M, Goto N (1995) Tissue distribution of the DNA binding oncoprotein Maf during chicken development. *Int J Dev Biol* 39: 957-964.

36. Kurschner C, Morgan JI (1995) The maf proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 15: 246-254.

37. Kerppola TK, Curran T (1994) Maf and Nr1 can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun. *Oncogene* 9: 675-684.

38. Stewart M, Terry A, Hu M, O'Hara M, Blyth K, Baxter E, Cameron E, Onions DE, Neil JC (1997) Proviral insertions induce the expression of bone specific isoforms of PEB2 $\alpha$ A (CBFA1): evidence for a new myc collaborating oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8646-8651.

39. Hagino-Yamagishi K, Saijoh Y, Ikeda M, Ichikawa M, Minamikawa-Tachino R, Hamada H (1997) Predominant expression of Brn-2 in the postmitotic neurons of the developing mouse neocortex. *Brain Res* 752: 261-268.

40. Rosenfeld MG, Bach I, Erkman L, Li P, Lin C, Lin S, McEvelly R, Ryan A, Rhodes S, Schonemann M, Scully K (1996) Transcriptional control of cell phenotypes in the neuroendocrine system. *Recent Progr Horm Res* 51: 217-238.

41. Nakai S, Kawano H, Yudate T, Nishi M, Kuno J, Nagata A, Jishage K, Hamada H, Fujii H, Kawamura K (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev* 9: 3109-3121.

42. Fujii H, Hamada H (1993) A CNS specific POU transcription factor, Brn-2, is required for establishing mammalian neural cell lineages. *Neuron* 11: 1197-1206.

43. Manak JR, Scott MP (1994) A class Act: conservation of homeodomain protein function. *Development Suppl.* 61-77.

44. Honkaniemi J, States BA, Weinstein PR, Espinoza J, Sharp FR (1997) Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 636-646.

45. Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J (1991) The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGCG (GSG) element - binding protein family. *Mol Cell Biol* 11: 3835-3841.

#### PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Diagnose von hypoxisch ischämischen Zuständen und Krankheitsbildern, dadurch gekennzeichnet, daß in einer von einem Patienten mit Verdacht auf hypoxisch ischämische Zustände und Krankheitsbilder entnommenen Probe die Anwesenheit und Menge wenigstens eines Transkriptionsfaktor-(TF)-cDNA in vitro festgestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der entnommenen Probe die Anwesenheit und Menge wenigstens eines Transkriptionsfaktors, ausgewählt aus der Gruppe NF1/CAAT-Bindungsprotein (EMBL X92857), NF-kappa-B p65-Untereinheit (EMBL

**AT 407 990 B**

5 M62399), N-myc (EMBL X63281), basisches Helix-Schlaufen-Helix-Protein (EMBL D82868), MIBP1 (c-myc intron-Bindungsprotein) (EMBL D37951), SOX4 (EMBL X70683), neuronaler Todesfaktor (EMBL D83697), c-maf=c-Maf-Protein (Protooncogen) (EMBL S74567), PEBP2alphaA (PEBP major-Transkriptionsfaktor) (EMBL Af005936), DNA-Bindungsprotein (Brn-2) (EMBL L27663), Homeodomainprotein (EMBL Af004431) und Zink-Finger-Transkriptionsfaktor (EMBL M65008), festgestellt wird.

**HIEZU 12 BLATT ZEICHNUNGEN**

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1a

X12492 (EM HUM)menschl mRNA für CAAT-box bindendes Protein (1755 nt)

```

          10          20          30          40          50          60
asph7, ACCGTTATTTCCACTGGGGTGGGCAAGGTGGGGATTCCAGGCTGAGAGTAACAGAGGTAC
EM_HUM GCTGGACCTGGTCATGGTCATCCTGTTCAAGGGCATCCCCTGGAGAG-CACCGACGGCG
          430          440          450          460          470          480

          70          80          90          100          110          120
asph7, ATCTGCTGGTCCAGGCTGCGCAGTGCCTGGAAGGTGGGGTGTGTGTGTTGCTGTA-CAAA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_HUM AGCGCCTGGTCAAGGCTGCGCAGTGCCTGCAACCGGTCCTGTGCGTGCAGCCGCACCACA
          490          500          510          520          530          540

          130          140          150          160          170
asph7, TAG--GTGCCAGCATTGACCTGG---TTGACCACGATGACTTCCACAGTGATACCATCA
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_HUM TTGGCGTGGCCGTCAAGGAGCTGGACCTCTACCTGGCCTACTTCGTGCGTG--AGCGAGA
          550          560          570          580          590          600

          180          190          200          210          220          230
asph7, GGCAGCATGAGCCACGATGTCATCGG-CAGGGA-AGGCAGTGCCAGAGAAGGCAGCGGTG
: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
EM_HUM TGCAG-AGCAAAGCGGCAGTCCCCGGACAGGGATGGGCTCTGACCAGGAGGACAGCAAGC
          610          620          630          640          650          660
    
```

Fig. 1b

M62399 menschl. Transkriptions-Faktor p65 (NF-kappa-B p65 Untereinheit), 1767bp

```

                                10      20      30      40
asph30      ACCGGAACTCTGGGAGCTGCCTCGGTGGGGATGAGATCTTCTT
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 CAAGATCTGCCGAGTGAACCGAAACTCTGGCAGCTGCCTCGGTGGGGATGAGATCTTCTT
            670      680      690      700      710      720

                                50      60      70      80      90      100
asph30      ACTGTGCGACAAGGTGCAGAAAGAAGACATTGAGGTGTATTTACGGGACCAGGCTGGGA
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 ACTGTGTGACAAGGTGCAGAAAGAGGACATTGAGGTGTATTTACGGGACCAGGCTGGGA
            730      740      750      760      770      780

                                110     120     130     140     150     160
asph30      GGCACGAGGCTCCTTTTCTCAAGCTGATGTGCATCGGCAAGTGGCCATTGTGTCCGGAC
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 GGCCCCGAGGCTCCTTTTCTCAAGCTGATGTGCACCGACAAGTGGCCATTGTGTCCGGAC
            790      800      810      820      830      840

                                170     180     190     200     210     220
asph30      TCCTCCGTACGCCGACCCAGCCTCCAGGCTCCTGTTCGAGTCTCCATGCAGCTACGGCG
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 CCCTCCCTACGCAGACCCAGCCTGCAGGCTCCTGTGCCTGTCTCCATGCAGCTACGGCG
            850      860      870      880      890      900

                                230     240     250     260     270     280
asph30      GCCTTCTGACCGCGAGCTCAGTGAGCCCATGGAGTTCCAGTACTTGCCAGACACAGATGA
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 GCCTTCCGACCGGAGCTCAGTGAGCCCATGGAATTCAGTACCTGCCAGATACAGACGA
            910      920      930      940      950      960

                                290     300     310     320     330     340
asph30      TCGCCACCGGATTGAAGAGAAGCGCAAAGGACCTATGAGACCTTCAAGAGTATCATGAA
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 TCGTACCGGATTGAGGAGAAACGTAAAAGGACATATGAGACCTTCAAGAGTATCATGAA
            970      980      990      1000     1010     1020

                                350     360     370     380     390     400
asph30      GAAGAGTCCTTTCAAAGGACCATCAGAACCCCGGCTCCAACCCGGCTCATTGCTGTGCC
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 GAAGAGTCCTTTCAGCGGACCCAGCAGCCCGGCTCCACCTCGACGCATTGCTGTGCC
            1030     1040     1050     1060     1070     1080

                                410     420     430     440     450     460
asph30      TACCCGAACTCAACTTCTGTCCCAAGCCAGCCCGCAGCCCTACACCTTGGCTTCATC
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 TTCCCGCAGCTCAGCTTCTGTCCCAAGCCAGCAGCCCGCAGCCCTATCCCTTACGTCATC
            1090     1100     1110     1120     1130     1140

                                470     480     490     500     510
asph30      CCTCAGCACCATCAACTTTGATGAGTTTTCCCCATGCTGTTAGCTTCTG
            : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
m62399 CCTGAGCACCATCAACTATGATGAGTTTCCCACCATGGTGTTCCTTCTGGGCAGATC
            1150     1160     1170     1180     1190

```

Fig. 1c

X63281 R.norvegicus N-myc -Gen (6951 nt)

```
          10          20          30          40          50          60
asph38 TCAGACTCGGAGGACAGCGAGCGCCGCCGAAACCACAACATCCTGGAGCGCCAGCGCCGC
      .....
X63281 TCAGACTCGGAGGACAGCGAGCGCCGCCGAAACCACAACATCCTGGAGCGCCAGCGCCGC
      5570      5580      5590      5600      5610      5620
```

```
          70          80          90          100          110          120
asph38 AACGACCTGCGCTCCAGCTTCCTGACGCTCAGGGACCATGTGCCCGAGCTGGTGAAGAAC
      .....
X63281 AACGACCTGCGCTCCAGCTTCCTGACGCTCAGGGACCATGTGCCCGAGCTGGTGAAGAAC
      5630      5640      5650      5660      5670      5680
```

```
          130          140          150          160          170          180
asph38 GAGAAGGCCGCCAAGGTGGTCATCTTAAAAAAGGCCACCGAGTACGTCCACGCCCTACAG
      .....
X63281 GAGAAGGCCGCCAAGGTGGTCATCTTAAAAAAGGCCACCGAGTACGTCCACGCCCTACAG
      5690      5700      5710      5720      5730      5740
```

```
          190          200          210          220          230          240
asph38 GCCAACGAGCACCAGCTCCTGCTGGAAAAGGAGAAACTGCAGGCGAGGCAGCAGCAGTTG
      .....
X63281 GCCAACGAGCACCAGCTCCTGCTGGAAAAGGAGAAACTGCAGGCGAGGCAGCAGCAGTTG
      5750      5760      5770      5780      5790      5800
```

```
          250          260          270
asph38 CTAAGAAGATCGAACACGCTCGGACTTGCTA
      .....
X63281 CTAAGAAGATCGAACACGCTCGGACTTGCTA
      5810      5820      5830
```

Fig. 1d

D82868 Ratten mRNA für bHLH Protein (1843 nt)

```

          10      20      30      40      50      60
asph41 GAGGAAGGAGAGCTGGGCGGCGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAAGGACTAGAC
      :
d82868 GAGGAAGGAGAGCTGGGCGGCGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAAGGACTAGAC
          260    270    280    290    300    310

          70      80      90      100     110     120
asph41 GAGGCGGAAGGCGAGCGGCCCAAGAAGCGCGGGCCGAAGAAACGCAAGATGACCAAGGCG
      :
d82868 GAGGCGGAAGGCGAGCGGCCCAAGAAGCGCGGGCCGAAGAAACGCAAGATGACCAAGGCG
          320    330    340    350    360    370

          130     140     150     160     170     180
asph41 CGCCTGGAGCGCTCCAAGCTGCGGCGACAGAAGGCCAACGCGGGGAGCGCAACCGCATG
      :
d82868 CGCCTGGAGCGCTCCAAGCTGCGGCGACAGAAGGCCAACGCGGGGAGCGCAACCGCATG
          380    390    400    410    420    430

          190     200     210     220     230     240
asph41 CACGACCTGAACGCGGCGCTGGACAACCTGCGCAAGGTGGTGCCCTGCTACTCCAAGACG
      :
d82868 CACGACCTGAACGCGGCGCTGGACAACCTGCGCAAGGTGGTGCCCTGCTACTCCAAGACG
          440    450    460    470    480    490

          250     260     270     280     290     300
asph41 CAGAAGCTGTCCAAGATCGAAACGCTGCGCCTGGCCAAGAACTACATCTGGGCTCTCTCG
      :
d82868 CAGAAGCTGTCCAAGATCGAAACGCTGCGCCTGGCCAAGAACTACATCTGGGCTCTCTCG
          500    510    520    530    540    550

          310     320     330     340
asph41 GAGATCTTGGCTCCGGGAAGCGGCCGGATCTGGTGTCTACGTGCAGA
      :
d82868 GAGATCTTGGCTCCGGGAAGCGGCCGGATCTGGTGTCTACGTGCAGA
          560    570    580    590
    
```

Fig. 1e

D37951 Ratten mRNA für MIBP1 (c-myc Intron bindendes Protein) (9731 nt)

	10	20	30	40	50	60
asph42	ACACCAAACAGAGCTACAGAGATATCTCTTGCTTGAGCACCTTCAAACATGGAGGGGAA					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	ACACCAAACAGAGCTACAGAGATATCTCTTGCTTGAGCACCTTCAAACATGGAGGGGAA					
	2730	2740	2750	2760	2770	2780
	70	80	90	100	110	120
asph42	TATTTTATGGACCCCTCAGTGCCATTGCCGGGAGTGCCAACCATGTTCTGGGACGACCTGC					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	TATTTTATGGACCCCTCAGTGCCATTGCCGGGAGTGCCAACCATGTTCTGGGACGACCTGC					
	2790	2800	2810	2820	2830	2840
	130	140	150	160	170	180
asph42	GAGAACAGAAAGCGCAGGAAGGAGAAAAGTGTAGGGGACGAGGAGGATACGCCTATGATC					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	GAGAACAGAAAGCGCAGGAAGGAGAAAAGTGTAGGGGACGAGGAGGATACGCCTATGATC					
	2850	2860	2870	2880	2890	2900
	190	200	210	220	230	240
asph42	TGTGGTGGCATGGGGAGTGCTCCTGGGAGCATGATGTCTCAGAGTATGACTCCAAGCTG					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	TGTGGTGGCATGGGGAGTGCTCCTGGGAGCATGATGTCTCAGAGTATGACTCCAAGCTG					
	2910	2920	2930	2940	2950	2960
	250	260	270	280	290	300
asph42	CAGGACGGAGGAAGGAGTGGCTTCACCATGACTGGACATGAGAGTCTTCCTCATGGTTAC					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	CAGGACGGAGGAAGGAGTGGCTTCACCATGACTGGACATGAGAGTCTTCCTCATGGTTAC					
	2970	2980	2990	3000	3010	3020
	310	320	330	340	350	360
asph42	TCCGATCGTTTAGACCTGGCCCGGCCCCAGCTGCCGTCTAGAAGTCCGTCTCTTGGGTCT					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	TCCGATCGTTTAGACCTGGCCCGGCCCCAGCTGCCGTCTAGAAGTCCGTCTCTTGGGTCT					
	3030	3040	3050	3060	3070	3080
	370	380	390	400	410	420
asph42	GAGGATTTGCCCTCGGCTGGTGATCCTGACAAGATGACAGACCTGGGCAAGAAGCCTCCG					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	GAGGATTTGCCCTCGGCTGGTGATCCTGACAAGATGACAGACCTGGGCAAGAAGCCTCCG					
	3090	3100	3110	3120	3130	3140
	430	440	450	460	470	
asph42	GGAAATGTGATTTTCGGTGATTCAGCACACAAACTCGCTGAGCCGGCCCAATTCCTTC					
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
d37951	GGAAATGTGATTTTCGGTGATTCAGCACACAAACTCGCTGAGCCGGCCCAATTCCTTCGAA					
	3150	3160	3170	3180	3190	3200

Fig. 1f

x70683 menschl SOX4 mRNA (2979bp)

```

      10      20      30      40      50      60
asph33 AACACTGAGGCTCTGCTGGCCGGCGAGAGCTCGGACTCGGGCGCCGGCCTGGAGCTGGGC
      :::::  :: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
x70683 AACACGGAAGCTCTGCTGGCCGGCGAGAGCTCGGACTCGGGCGCCGGCCTCGAGCTGGGA
      690      700      710      720      730      740

      70      80      90      100     110     120
asph33 ATCGCCTCCTCCCCGACGCCTGGCTCCACCGCGTCGACGGGCGGCAAGGCGGACACCCC
      :::::::::::::::::::: ::::: ::::::::::::::: : :::::::::::::::::::: :::::::
x70683 ATCGCCTCCTCCCCACGCCCGGCTCCACCGCCTCCACGGGCGGCAAGGCGGACACCCC
      750      760      770      780      790      800

      130     140     150     160     170     180
asph33 AGCTGGTGCAAGACCCCCGAGTGGGCACATCAAGCGGCCCATGAACGCCTTTATGGTGTGG
      :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::
x70683 AGCTGGTGCAAGACCCCCGAGTGGGCACATCAAGCGGCCCATGAACGCCTTCATGGTGTGG
      810     820     830     840     850     860

      190     200     210     220     230     240
asph33 TCGCAGATCGAGCGGGCGCAAGATCATGGAGCAGTCGCCCCGACATGCACAACGCCGAGATC
      :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::
x70683 TCGCAGATCGAGCGGGCGCAAGATCATGGAGCAGTCGCCCCGACATGCACAACGCCGAGATC
      870     880     890     900     910     920

      250     260     270     280     290     300
asph33 TCCAAGCGGCTAGGCAAACGCTGGAAGCTGCTCAAGGACAGCGACAAGATCCATTCATA
      :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::
x70683 TCCAAGCGGCTAGGCAAACGCTGGAAGCTGCTCAAGGACAGCGACAAGATCCCTTTCATT
      930     940     950     960     970     980

      310     320     330     340     350     360
asph33 CGAGAGGCGGAGCGCCTGCGCCTCAAGCACATGGCTGACTACCCCTGACTACAAGTACCGG
      :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :::::::
x70683 CGAGAGGCGGAGCGCCTGCGCCTCAAGCACATGGCTGACTACCCCGACTACAAGTACCGG
      990     1000     1010     1020     1030     1040

      370     380
asph33 CCGCGCAAGAAGGTGAAGTCGGGCAACG
      :: : :::::::::::::::::::: :::::::
x70683 CCGCGCAAGAAGGTGAAGTCGGGCAACGCGGGCGGGGATCGGGCGGCCACAG
      1050     1060     1070     1080     1090
    
```

**Fig. 1g**

D83697 Ratten-Hirn mRNA für Neuronal-Todes-Faktor (5253 nt)

asph35				10	20	30	
				TGTGCCCCGTGTCCCCGGCATCGCGGCCGCGGGCC			
d83697	GTCCAGGGAGGCTCCTCCGCACGCCATGTGCCCGTGTCCCCGGCATCGCGGCCGCGGGCC						
	10	20	30	40	50	60	
asph35		40	50	60	70	80	90
		CCC GGCCGTGTGCGGTTGCGGGACGCTCGCCCCGGGCTGCGCTGGGCGGCCGCGCAGGT					
d83697	CCC GGCCGTGTGCGGTTGCGGGACGCTCGCCCCGGGCTGCGCTGGGCGGCCGCGCAGGT						
	70	80	90	100	110	120	
asph35		100	110	120	130	140	150
		GACCGCGCTGCGGCTGCAGGCGCTGGGCGACGAGCTGCACCGACGCGCCATGAGGCGTCG					
d83697	GACCGCGCTGCGGCTGCAGGCGCTGGGCGACGAGCTGCACCGACGCGCCATGAGGCGTCG						
	130	140	150	160	170	180	
asph35		160	170	180	190	200	210
		CGCGCGGCCCGGGACCCGCTGCCCGCGCTGCTGCCCGCGCTCCGCGCCCGCTGGCCCTG					
d83697	CGCGCGGCCCGGGACCCGCTGCCCGCGCTGCTGCCCGCGCTCCGCGCCCGCTGGCCCTG						
	190	200	210	220	230	240	
asph35		220	230	240	250	260	270
		GCTGTGCGCGGCCGCGCAGGTGGCGGCGCTGGCGGCCTGGCTGCTCGGCAGGCGGAGCGC					
d83697	GCTGTGCGCGGCCGCGCAGGTGGCGGCGCTGGCGGCCTGGCTGCTCGGCAGGCGGAGCGC						
	250	260	270	280	290	300	
asph35		280	290	300	310	320	330
		GTAGGCGGCGCGCGGGGCCTTCTTGGTGGGGGGACCGGAGCCGAGACCCAGCCCGGA					
d83697	GTAGGCGGCGCGCGGGGCCTTCTTGGTGGGGGGACCGGAGCCGAGACCCAGCCCGGA						
	310	320	330	340	350	360	
asph35		340	350	360	370		
		CCGAGCAACAGGTTGGCGAAACCCTGTGTCCTTGGAGGA					
d83697	CCGAGCAACAGGTTGGCGAAACCCTGTGTCCTTGGAGGA						
	370	380	390				

Fig. 1h

S74567 (EM\_RO) c-maf=c-Maf Protein (Proto-Onkogen) (2736 nt)

```

asph19                                     10      20      30
                                         TTCGCTGCGCACCGTCCGGGCATGATCGTCC
EM_RO: AGCCAGTGCGGCCGTCTCATCGCCGGGGGCTCGCTGTCTCCACCC--CCATGAGC-ACG
          1070      1080      1090      1100      1110

asph19          40      50      60      70      80      90
ATGACAAGGGGGTTTCCGCCGGGCTCCACTATCGCGGGCGCCCCCGATCAGGCGCGCGCCG
EM_RO: CCCTGCAGCTCGGTGCCCGCCGTCGCCCGAGCTTCTCGGCG-CCCAGCCCGGGCTCGGGCAG
          1120      1130      1140      1150      1160      1170

asph19          100      110      120      130      140
CCGAGGCGCTGGCCGACC-----GCCTGCAGATCGA-AACCGGTCTGACGCTGCAGCCCCG
EM_RO: -CGAACAGAAGGGCGCACCTGGAAGACTACTACTGGATGACCGGCTACCCGAGCAGCTCA
          1180      1190      1200      1210      1220      1230

asph19          150      160      170      180      190      200
GCCATATGGTGTGGAGCTGAAGACGCCCCGGCGGACCAAGG-GCACGGCCTTGACCGCC
EM_RO: ACCCGGAGGCGCTGGGCTTCAGCCCCGAGGACGCGGTTCGAGGCGCTCATCAGCAACAGCC
          1240      1250      1260      1270      1280      1290

asph19          210      220      230      240      250      260
TTCATGCGCGAGGGCGCCGTTCAAAGACGCCCTGCCCGTCATGGTTCGGGGACGACGTGACC
EM_RO: ACCA-GCTCCAGGGTGGCTTCGATG--GCTATGCGCG---GGGAGCGCAGCAGCTGGCC
          1300      1310      1320      1330      1340

asph19          270      280      290      300      310      320
GATGAAGACGGGTTCGAGGCCCAAGGCCCTGGGCGGCTACGGCGTTCGGTTCGGCCCC
EM_RO: GCGGCAGCGGGGGCCGGCGCCGCGCCTCCCTGGGCGGCGAGGCGGAGGATGGGCCCC
          1350      1360      1370      1380      1390      1400

asph19          330      340      350      360      370      380
GTCCGCCCCGACCGCCCGTTACGGGCTGGACGACGTCGACGCCGTCCTGACCTGGCTG
EM_RO: G-CCG-----CCGCCGTGGTGTCCGCCGTGATCGCCGCGGCCCGCGCAGAGCGGCCG
          1410      1420      1430      1440      1450      1460

asph19          390      400      410
GAAGCACTCGCCGAGGCCAGACGTG
EM_RO: GCACCCCACTACCATCACCACCACCA
          1470      1480      1490

```

**Fig. 1i**

Af005936 *Mus musculus* PEBP2alphaA Major Transkriptions-Faktor (2315 nt)

```

                                10      20
asph31                        ATCCTCCCCAAGTGGGCACTTACCACAG
                                :
af0059 GAGTTTCACCTTGACCATAACAGTCTTCACAAATCCTCCCCAAGTGGGCACTTACCACAG
                                970      980      990      1000      1010      1020

                                30      40      50      60      70
asph31 AGCTATTAATGTGACAGTGGACGGTCCCCGGGAACCAAGAAGGCACAGACAGAAGCTTGA
                                :
af0059 AGCTATTAAGTGTGACAGTGGACGGTCCCCGGGAACCAAGAAGGCACAGACAGAAGCTTGA
                                1030      1040      1050      1060      1070      1080

                                80      90      100      110      120
asph31 TGACTCTAAACCTAGTTTGTCTCTGATCGGCTCAGTGATTTAGGGCGCATTCCTCATCC
                                :
af0059 TGACTCTAAACCTAGTTTGTCTCTGATCGGCTCAGTGATTTAGGGCGCATTCCTCATCC
                                1090      1100      1110      1120      1130      1140

                                130      140      150      160      170
asph31 CAGTATGAGAGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACGGACGGCCCTCCCTGAACCTCTGCACCAAG
                                :
af0059 CAGTATGAGAGTAGGTGTCCCGCCTCAGAACCCACGGCCCTCCCTGAACCTCTGCACCAAG
                                1150      1160      1170      1180      1190      1200

                                180      190      200      210      220
asph31 TCCTTTTAATCCACAAGGACAGAGTCAGATTACAGATCCCAGGCAGGCACAGTCTTCCCC
                                :
af0059 TCCTTTTAATCCACAAGGACAGAGTCAGATTACAGATCCCAGGCAGGCACAGTCTTCCCC
                                1210      1220      1230      1240      1250      1260

                                230      240      250      260      270
asph31 ACCGTGGTCCTATGACCAGTCTTACGCCTCCTATCTGAGCCAGATGACATCCACATCCAT
                                :
af0059 ACCGTGGTCCTATGACCAGTCTTACCCCTCCTATCTGAGCCAGATGACATCCCATCCAT
                                1270      1280      1290      1300      1310      1320

                                280      290      300      310      320
asph31 CCACTCCACCAGCCGCTGTCTTCCACACGGGGCACCAGGGCTACCTGCCATCACT
                                :
af0059 CCACTCCACCAGCCGCTGTCTTCCACACGGGGCACCAGGGCTACCTGCCATCACTGACGT
                                1330      1340      1350      1360      1370      1380
    
```

Fig. 1j

L27663 Ratten DNA bindendes Protein(Brn-2) mRNA (1814 nt)

```

          10      20      30      40      50      60
asph36 CGGCTCCCCGTGGTCCACCAGCCCCCTAGGCCAGCCGGACATCAAGCCCTCGGTGGTGGT
      .....
L27663 CGGCTCCCCGTGGTCCACCAGCCCCCTAGGCCAGCCGGACATCAAGCCCTCGGTGGTGGT
          340      350      360      370      380      390

          70      80      90      100     110     120
asph36 ACAGCAGGGTGGCCGAGGCGACGAGCTGCACGGGCCAGGAGCGCTGCAGCAGCAGCACCA
      .....
L27663 ACAGCAGGGTGGCCGAGGCGACGAGCTGCACGGGCCAGGAGCGCTGCAGCAGCAGCACCA
          400      410      420      430      440      450

          130     140     150     160     170     180
asph36 ACAGCAACAGCAGCAGCAGCAACAGCAACAGCAGCAACAACAGCAACAGCAGCAGCAGCA
      .....
L27663 ACAGCAACAGCAGCAGCAGCAACAGCAACAGCAGCAACAACAGCAACAGCAGCAGCAGCA
          460      470      480      490      500      510

          190     200     210     220     230
asph36 ACAACAGCGACCCGACATCTGGTGCACCACGCTGCCAACAACCATCCCGGGGCC
      .....
L27663 ACAACAGCGACCCGACATCTGGTGCACCACGCTGCCAACAACCATCCCGGGGCC
          520      530      540      550      560      570
    
```

Fig. 1k

Af004431 Rattus norvegicus Homeodomain-Protein (3211 nt)

```

          10      20      30      40      50      60
asph39 GCAGCCCCCGCAGCAGCTTTCGGCGGCCACTCCGCACGGCATCAACGACATCCTGAGCC
      .....
af0044 GCAGCCCCCGCAGCAGCTTTCGGCGGCCACTCCGCACGGCATCAACGACATCCTGAGCC
      1040      1050      1060      1070      1080      1090

          70      80      90      100      110      120
asph39 GGCCCTCCATGCCGGTGGCCTCGGGGGCCGCCCTGCCCTCCGCCTCGCCCTCGGGGTCTT
      .....
af0044 GGCCCTCCATGCCGGTGGCCTCGGGGGCCGCCCTGCCCTCCGCCTCGCCCTCGGGGTCTT
      1100      1110      1120      1130      1140      1150

          130      140      150      160      170      180
asph39 CTTCTCTCTCTCTCTCTCGTCCGCCTCCGCCACCTCGGCCTCTGCGGCCGCCGCTGCTGCTG
      .....
af0044 CTTCTCTCTCTCTCTCTCGTCCGCCTCCGCCACCTCGGCCTCTGCGGCCGCCGCTGCTGCTG
      1160      1170      1180      1190      1200      1210

          190      200      210      220      230
asph39 CCGCTGCCGCCCGCGCTGCCGCCTCATCGCCCGCCGGGCTGTTGGCCGGCCTGCCCC
      .....
af0044 CCGCTGCCGCCCGCGCTGCCGCCTCATCGCCCGCCGGGCTGTTGGCCGGCCTGCCCCGCT
      1220      1230      1240      1250      1260      1270
    
```

Fig. 11

M65008 Rattus rattus Zink-Finger-Transkriptionsfaktor (2093 nt)

```

          10      20      30      40      50      60
asph40  GCCTTCATCCCCCGCCACCTCCTTCCCCGCGGCCAAAGCCCGGCGCAAGGGACGCCGGGG
          .....
m65008  GCCTTCATCCCCCGCCACCTCCTTCCCCGCGGCCAAAGCCCGGCGCAAGGGACGCCGGGG
          1150    1160    1170    1180    1190    1200

          70      80      90      100     110     120
asph40  CGGCAAGTGCAGCGCGCGCTGCTTCTGCCCGCGGCCGACGTCAAGGCCTTCGCCTGCC
          .....
m65008  CGGCAAGTGCAGCGCGCGCTGCTTCTGCCCGCGGCCGACGTCAAGGCCTTCGCCTGCC
          1210    1220    1230    1240    1250    1260

          130     140     150     160     170     180
asph40  CGTGGAGAGCTGCGTGCGGACGTTCCGCGCGCTCCGACGAGCTCAACCGCCACCTGCGCAT
          .....
m65008  CGTGGAGAGCTGCGTGCGGACGTTCCGCGCGCTCCGACGAGCTCAACCGCCACCTGCGCAT
          1270    1280    1290    1300    1310    1320

          190     200     210     220     230     240
asph40  CCACACGGGGCCACAAGCCCTTCCAGTGCCGCATCTGCCTGCGCAACTTCAGCCGCAGCGA
          .....
m65008  CCACACGGGGCCACAAGCCCTTCCAGTGCCGCATCTGCCTGCGCAACTTCAGCCGCAGCGA
          1330    1340    1350    1360    1370    1380

          250     260     270     280     290     300
asph40  CCACCTCACCACGCACGTGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTTCGCCTGCGACGTGTG
          .....
m65008  CCACCTCACCACGCACGTGCGCACCCACACCGGCGAGAAGCCCTTCGCCTGCGACGTGTG
          1390    1400    1410    1420    1430    1440

          310     320     330     340     350     360
asph40  CGGCCGCCGCTTCGCGCGCAGCGACGAGAAGAAGCGACACAGCAAGGTGCACCTCAAGCA
          .....
m65008  CGGCCGCCGCTTCGCGCGCAGCGACGAGAAGAAGCGACACAGCAAGGTGCACCTCAAGCA
          1450    1460    1470    1480    1490    1500

          370     380     390     400
asph40  GAAGGCGCGCGCCGAGGAGCGCCTCAAGGGCCTGGGCTTCTACTC
          .....
m65008  GAAGGCGCGCGCCGAGGAGCGCCTCAAGGGCCTGGGCTTCTACTC
          1510    1520    1530    1540
    
```