

**Strukturelle Genomanalyse und Konstruktion  
von Targetingvektoren zur Erzeugung von  
großen Deletionen in der *wobbler* Region auf  
dem proximalen Chromosom 11 der Maus**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Biologie  
Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Cora Thiel  
aus Lippstadt

Juni 2002

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Mutagenese als Methode zur funktionellen Analyse von Genen in der Maus	2
2.1.1 Konventionelles <i>gene targeting</i>	3
2.1.2 Weiterentwicklung des <i>gene targeting</i>	4
2.1.2.1 Die beiden Rekombinase Systeme Cre/loxP und Flp	5
2.1.2.1.1 Das Cre/loxP-Rekombinasesystem	5
2.1.2.1.2 Das Flp-System	5
2.1.2.1.3 Vergleich der Cre- und Flp- Rekombinasen	5
2.1.2.1.4 Die Rekombinationsreaktion	6
2.1.2.1.5 Temperaturbedingungen	8
2.1.2.1.6 Rekombinationseffizienz	8
2.1.3 Targetingvektoren	8
2.1.3.1 Replacementvektoren	9
2.1.3.2 Insertionsvektoren	12
2.1.4 Anwendungsbeispiele für die vorgestellten Rekombinasesysteme	14
2.1.4.1 Deletion von Markergenen und genomischen Sequenzen ( <i>knockout</i> )	14
2.1.4.2 Erzeugung kleinerer Deletionen z.B. Punktmutationen	14
2.1.4.3 Einbringen von Sequenzen ( <i>knock in</i> )	15
2.1.4.4 Gewebespezifische <i>knockouts</i>	15
2.1.5 Konditionale Genexpression in der Maus	16
2.1.5.1 Das Tet-System	16
2.1.5.2 Weitere induzierbare Systeme	17
2.1.5.3 Vorteile der transkriptionellen Transaktivierung	18
2.1.5.4 Erzeugung von großen chromosomalen Rearrangements ( <i>chromosome engineering</i> )	18
2.1.5.5 Anwendungsbeispiele für das <i>chromosome engineering</i>	19
2.1.5.6 Strahleninduzierte Deletionen	20

2.2 Die <i>wobbler</i> Mutation der Maus	21
2.2.1 Physikalische Kartierung der <i>wobbler</i> Mutation	22
2.3 Zielsetzung der Arbeit	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 <i>E.coli</i> Stämme	24
3.1.2 Kulturmedien	24
3.1.3 Antibiotika	25
3.1.4 Zellkulturmedien	25
3.1.5 Vektoren	26
3.1.6 DNA-Längenstandards	26
3.1.7 Enzyme und Proteine	26
3.1.8 Verwendete Kits	27
3.1.9 Internet Ressourcen	27
3.1.10 Oligonukleotide	27
3.2 Methoden	33
3.2.1 Transformation von <i>E.coli</i> Stämmen mit Plasmid-DNA	33
3.2.1.1 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien	33
3.2.1.2 Elektroporation	33
3.2.1.3 Hitzeschocktransformation	34
3.2.1.4 Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Klone	34
3.2.1.5 Glycerinkulturen	34
3.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren	35
3.2.2.1 DNA aus Bakterien	35
3.2.2.1.1 Easy Prep	35
3.2.2.1.2 Eckhardt-Lyse	35
3.2.2.1.3 Alkalische Lyse	36
3.2.2.1.4 Qiagen/Nucleobond DNA-Präparation	37
3.2.2.2 Quantifizierung isolierter Nukleinsäuren	38
3.2.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	39
3.2.2.3.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit oder Minelute Kit	39
3.2.2.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)	39
3.2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten	40
3.2.3 Elektrophorese von Nukleinsäuren	40

3.2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese	40
3.2.3.1.1 Low Melting Point Agarose	41
3.2.3.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese	41
3.2.3.3 Fotodokumentation	42
3.2.4 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	42
3.2.4.1 Southern Blot	42
3.2.4.2 Kolonietransfer/Koloniehybridisierung	43
3.2.5 Hybridisierung	44
3.2.5.1 Radioaktive Hybridisierungen	44
3.2.5.1.1 Herstellung radioaktiv markierter Sonden	44
3.2.5.1.2 Hybridisierung	44
3.2.5.1.3 Entfernen von ungebundener Sonde	45
3.2.5.1.4 Autoradiographie	45
3.2.5.1.5 Entfernen gebundener Sonden	45
3.2.5.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	45
3.2.5.2.1 Fiber-FISH	45
3.2.6 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren	49
3.2.6.1 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	49
3.2.6.2 Aufreinigung und Ankonzentrierung von DNA nach enzymatischen Reaktionen	49
3.2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
3.2.6.3.1 Standard-PCR	51
3.2.6.3.2 Long-Distance-PCR	52
3.2.6.3.3 Kolonie-PCR	53
3.2.6.3.4 PCR- <i>Screening</i> der BAC-Bibliothek	53
3.2.6.4 Klonierungen	53
3.2.6.4.1 Klonierung von PCR-Produkten	53
3.2.6.4.2 Klonierung von Restriktionsfragmenten	54
3.2.6.5 Oligohybridisierung für loxP-Elemente	55
3.2.6.6 Sequenzierungen	56
3.2.7 Zellkulturmethoden	57
3.2.7.1 Calciumphosphat-Transfektion	57
3.2.7.2 Herstellung von primären embryonalen Fibroblasten (Feeder-Zellen)	57
3.2.7.2.1 Auftauen von Feeder-Zellen	58
3.2.7.2.2 Passagieren von Zellen (Splitten der Feeder-Zellen)	58
3.2.7.2.3 Kryokonservierung von Feeder-Zellen	58

3.2.7.2.4	Behandlung der Feeder-Zellen mit Mitomycin C (Unterdrückung der Teilungsfähigkeit)	58
3.2.7.2.5	Bestrahlung der Feeder-Zellen	59
3.2.7.3	ES-Zellen	59
3.2.7.3.1	Auftauen von ES-Zellen	59
3.2.7.3.2	Linearisierung des Targetingvektors	60
3.2.7.3.3	Elektroporation der ES-Zellen	60
3.2.7.3.4	Selektion auf G418 resistente Klone	60
3.2.7.3.5	Selektion auf Puromycin resistente Klone	60
3.2.7.3.6	Picken der resistenten Klone	61
3.2.7.3.7	Beschichtung von 96Well Platten mit Gelatine	61
3.2.7.3.8	Splitten der 96Well Platten	62
3.2.7.3.9	Einfrieren von ES-Zellen in 96Well Platten	62
3.2.7.3.10	Präparation genomischer DNA in 96Well Platten	62
3.2.7.3.11	Restriktionsverdau	62
3.2.7.3.12	Southern Blot und Hybridisierung	63
3.2.7.3.13	Auftauen von Einzelklonen in 96Well Platten	63
3.2.7.3.14	DNA aus ES-Zellen	63
3.2.7.3.15	Bestrahlung von ES-Zellen mit integriertem TKNeo-Konstrukt	64
4.	Ergebnisse	65
4.1	Kartierung der BACs	65
4.1.1	BAC-Screening und STS-Mapping	65
4.1.2	Fiber-FISH-Kartierung	67
4.2	Resistenzkassetten und loxP-Elemente	69
4.2.1	NeoloxP-TKDT- und HygroloxP-TKDT-Vektor	69
4.2.2	TKNeo-Vektor	70
4.2.3	PTV0-Vektor	70
4.2.4	HPRT-Minigen	70
4.2.5	TKNeoloxP-Vektoren	71
4.2.6	PuroloxP-Vektoren	73
4.3	Subklonierung genomischer Fragmente	75
4.3.1	Identifizierung und Klonierung von BAC-Fragmenten	75
4.3.2	Identifizierung und Klonierung von PCR-Fragmenten	81
4.4	Deletionsvektorkonstrukte	84
4.4.1	Insertionsvektor B4_TKNeoloxP	84
4.4.1.1	Ligation der Einzelfragmente	84

4.4.1.2 Orientierung des genomischen Fragmentes (135B4_SF)	87
4.4.1.3 Hybridisierungssonden	89
4.4.2 Insertionsvektor A5_TKNeoloxP	91
4.4.2.1 Ligation der Einzelfragmente	91
4.4.3 Insertionsvektor A5_PuroloxP	93
4.4.3.1 Ligation der Einzelfragmente	93
4.4.3.2 Orientierung des genomischen Subfragmentes (160A5)	94
4.4.4 Insertionsvektor L2_TKNeoloxP	95
4.4.4.1 Ligation der Einzelfragmente	95
4.4.4.2 Orientierung des genomischen Fragmentes (124L2_SF)	96
4.4.5 Insertionsvektor K22_PuroloxP	97
4.4.5.1 Ligation der Einzelfragmente	97
4.4.5.2 Orientierung des genomischen Fragmentes (185K22_SF)	98
4.4.6 Replacementvektor O9_PuroloxP	99
4.4.6.1 Ligation der Einzelfragmente	99
4.4.6.2 Orientierung des genomischen Subfragmentes (139O9)	104
4.4.6.3 Hybridisierungssonde	105
4.4.7 Anordnung der Targetingvektoren im Maus-Contig	106
4.5 Einbringung der Vektoren in die ES-Zellen	108
4.5.1 Insertionsvektor B4_TKNeoloxP	108
4.5.2 Replacementvektor O9_PuroloxP	110
4.5.2.1 Elektroporation von unbehandelten ES-Zellen	110
4.5.2.2 Zweite Elektroporation der ES-Zellklone	111
4.6 Strahleninduzierte Deletionen	114
4.6.1 O9_TKNeoRadiation-Replacementvektor	114
4.6.2 Hybridisierungssonde	115
4.6.3 Elektroporation des O9_TKNeoRadiation-Replacementvektors	116
4.6.4 Bestrahlung	118
4.6.5 Polymorphismen	119
5. Diskussion	121
5.1 Aufbau eines Maus-BAC-Contigs	121
5.2 Deletionsvektorkonstrukte	122
5.3 Lokalisation der Targetingvektoren und resultierende Deletionen	123
5.3.1 B4_TKNeoloxP-O9_PuroloxP	123
5.3.2 O9_PuroloxP-L2_TKNeoloxP	125
5.3.3 L2_TKNeoloxP-A5_PuroloxP oder K22_PuroloxP	126

5.4 Analyse der erzeugten Deletionen	126
5.4.1 Verpaarung der Chimären zu heterozygoten Deletionsmäusen	127
5.4.2 Verpaarung von Del1-Mäusen mit heterozygoten <i>wobbler</i> Mäusen	127
5.4.3 Homozygote Deletionsmäuse	127
5.4.4 Generierung neuer Deletionen	127
5.4.5 Verpaarung mit ENU-Mäusen	128
5.4.6 Strahleninduzierte Deletionen	129
5.5 ES-Zellkultur	129
5.6 Ausblick	130
6. Literaturverzeichnis	132
7. Anhang	146
7.1 In dieser Arbeit ermittelte BAC-Endsequenzen	146
7.2 In dieser Arbeit ermittelte Resistenzkassetten-Sequenzen	155
7.2.1 Puromycin-loxP-Resistenzkassette 2392 bp	155
7.2.2 Thymidin Kinase-Neomycin-Resistenzkassette 4000 bp	156
7.3 Abkürzungen	157
7.4 Maus-BAC/YAC-Contig der <i>wobbler</i> <i>kritischen</i> Region	159
7.5 UTR-Sequenzen des Rab1a Gens	160

## 1. Zusammenfassung

Das gezielte Ausschalten von Genen durch homologe Rekombination (*gene targeting*) in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus hat sich in den letzten Jahren schnell entwickelt und eignet sich zur Funktionsanalyse von Genen im Organismus, sowie zur Analyse von größeren Genomabschnitten im Rahmen von Positionsklonierungs- und Genom-Projekten. Im Laufe dieser Arbeit wurde eine weiterentwickelte Form des *gene targeting*, die Cre/loxP vermittelte Rekombination, eingesetzt, um große, sequenzspezifische Deletionen in das Chromosom 11 der Maus einzufügen. Grundlegend für das Cre/loxP-System ist eine gut charakterisierte Region im Mausgenom, in der zwei Deletionsendpunkte festgelegt werden können. In diese Deletionsendpunkte werden zwei loxP-Elemente integriert, die spezifisch von dem Cre-Enzym erkannt werden. Der genomische Bereich zwischen den beiden loxP-Elementen wird durch die Cre-Rekombinasereaktion deletiert.

Für das Einbringen der loxP-Elemente in das Mausgenom müssen zwei Targetingvektoren konstruiert werden, die aus dem loxP-Element, einer Resistenzkassette und genomischer, zum Ziellokus homologer, DNA bestehen. Die homologe genomische DNA sollte isogen zu der ES-Zell-DNA sein. Aus diesem Grund wurde in der bereits gut durch YACs charakterisierten *wobbler* Region auf Maus Chromosom 11 ein BAC-Contig erstellt. Nach einer BAC-Screening-, -Kartierungs und -Orientierungsphase konnte mit der Deletionsvektorkonstruktion begonnen werden. Es wurden insgesamt sechs Targetingvektoren hergestellt, die zur Generierung von Deletionen in der *wobbler* kritischen Region eingesetzt werden können. Zwei dieser Targetingvektoren wurden in aufeinanderfolgenden Elektroporationen in das ES-Zellgenom gebracht. Es existieren fünf ES-Zellklone, die zwei korrekt in das Genom integrierte Targetingvektoren tragen. Durch eine transiente Cre-Expression kann der Bereich zwischen den integrierten loxP-Elementen in den ES-Zellen deletiert werden. Die ES-Zellen werden anschließend für eine Blastozysteninjektion oder Morulaaggregation verwendet, um chimäre Mäuse zu generieren.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein „alternatives“ Konzept zur Herstellung von Deletionen im *wobbler* kritischen Bereich verfolgt. Durch die Integration eines negativen Selektionsmarkers (das Thymidin Kinase Gen = TK Gen) und einer anschließenden Bestrahlung der ES-Zellen mit  $\gamma$  Strahlen kann spezifisch auf den Verlust des TK Gens selektiert werden. Durch die Bestrahlung verlieren die ES-Zellen flankierend zu dem TK Gen auch genomische Bereiche. So entsteht eine ganze Reihe von unterschiedlichen Deletionen innerhalb der ausgewählten Region. Diese Strategie wurde für die *wobbler* Region angewandt. Es konnten elf Klone ermittelt werden, die durch die Bestrahlungsreaktion das TK Gen verloren haben. Diese Klone werden zurzeit charakterisiert, um die Größe der erzeugten Deletionen festzustellen. Anschließend werden auch diese Klone in Blastozysten injiziert oder mit Embryonen im Morulastadium aggregiert. Die aus beiden Methoden resultierenden Deletionsmäuse werden in verschiedenen Kombinationen verpaart, mit dem Ziel die *wobbler* kritische Region zu verkleinern und um die in dem Deletionsintervall liegenden Gene zu charakterisieren.



## 2. Einleitung

Die 1990 gegründete internationale Kollaboration, das Humane Genom Projekt (Watson, 1990), hatte sich zum Ziel gesetzt, die gesamte menschliche DNA Sequenz zu identifizieren. Seit 2000 liegt die nahezu komplette genomische Sequenz des Menschen in einer „working draft“ Version in den Datenbanken vor. Im Zuge dieses Projektes wurde die Sequenzierung weiterer eukaryotischer Genome, wie z.B. *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Mus musculus* vorangetrieben. Seit November 2001 ist ebenfalls eine „working draft“ Version des Mausgenoms verfügbar. Die Maus wird schon seit längerem als experimenteller Modellorganismus für menschliche Erbkrankheiten eingesetzt, da sich die Physiologie und Pathophysiologie von Maus und Mensch in den meisten Fällen sehr ähneln. An diese Sequenzierungsphase kann sich nun eine Phase der funktionellen Gen- und Genomanalyse anschließen. Das wahrscheinlich wichtigste Mittel, um die Rolle von Genen *in vivo* in einem komplexen Organismus wie z.B. der Maus zu charakterisieren, ist die Genmodifikation durch artifiziell eingebrachte Mutationen.

### 2.1 Mutagenese als Methode zur funktionellen Analyse von Genen in der Maus

Es gibt verschiedene Methoden, um artifizielle Mutationen ins Mausgenom einzubringen. Eine ungezielte, zufällige Methode ist die Erzeugung von Punktmutationen durch den Einsatz von chemischen Mutagenen. Ethylnitrosoharnstoff (ENU) ist solch ein chemisches Mutagen. Durch die Injektion von subletalen Dosen in männliche Mäuse entstehen Punktmutationen und kleinere Deletionen (Noveroske et al., 2000) in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen. Von besonderem Interesse für die weitere Analyse sind Mutationen, die die Keimbahn betreffen, da diese an die Nachkommen weitergegeben werden. Die auf diesem Wege erzeugten zufälligen Mutationen können unterschiedliche Auswirkungen auf den Phänotyp der Nachkommen haben. Es können dominante, rezessive und „stille“ Mutationen entstehen. Dominante Mutationen sind schon im heterozygoten Zustand phänotypisch detektierbar, rezessive Mutationen dagegen erst, wenn beide Kopien des betroffenen Gens die Mutation tragen (homozygoter Zustand). Stille Mutationen haben keine Auswirkung auf den Phänotyp.

Die ENU Mutagenese wird weltweit in vielen Laboren in großem Maßstab angewandt, mit dem Ziel das Mausgenom möglichst vollständig mit Mutationen „abzusättigen“ (Hrabe de Angelis und Balling 1998; Hrabe de Angelis et al., 2000). Die so erzeugten Mausmutanten werden in aufwendigen Screeningtests untersucht, um medizinisch relevante Phänotypen zu identifizieren (Balling et al., 2000; Rathkolb et al., 2000; Soewarto et al., 2000).

Eine weitere Methode, um Veränderungen im Mausgenom zu generieren, ist das Injizieren von Fremd-DNA in den Vorkern befruchteter Eizellen, auch Pronukleusinjektion genannt. Die Insertion der Fremd-

DNA (Transgen) in das Genom erfolgt zufällig und ungerichtet. Deshalb kann es eine oder mehrere Integrationsstellen geben, an denen jeweils eine oder mehrere Kopien des Transgens vorliegen. Das Transgen besteht in der Regel aus einer codierenden Gensequenz und den zu seiner Expression benötigten regulatorischen Elementen. Diese Fremd-DNA wird unter einem Mikroskop mit einer Glaskapillare in einen der beiden Vorkerne der befruchteten Eizelle injiziert. Die so behandelten Eizellen werden anschließend operativ in scheinchwangere Empfängertiere transferiert. Schätzungsweise 10-30 % der Nachkommen tragen das injizierte Transgen in ihrem Genom integriert (Lottspeich und Zorbas, 1998). Da das Transgen ungerichtet und zufällig integriert, repräsentiert jedes transgentragende Tier mindestens ein unabhängiges Integrationsereignis. Die Transgenexpression kann vom Integrationsort beeinflusst werden, daher ist es sinnvoll, das Transgen zusammen mit seiner natürlichen genetischen Umgebung, in Form eines großen genomischen DNA-Fragmentes zu injizieren. Künstliche Hefechromosomen (YACs) und künstliche bakterielle Chromosomen (BACs) sind zu diesem Zweck bereits erfolgreich eingesetzt worden (Schedl et al., 1993; Peterson et al., 1993; Yang et al., 1997).

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Methoden kann das Mausgenom auch gezielt verändert werden. Diese gezielte Modifikation wird in embryonalen Stammzellen (ES) der Maus durch homologe Rekombination eingeführt. Für diese Methode wird das Gen, das in der Maus verändert werden soll, zuerst in einen bakteriellen Vektor (Targetingvektor) kloniert und, entsprechend der Fragestellung des Experimentes, gezielt verändert. Der Vektor enthält zusätzlich noch einen positiven Selektionsmarker, der nach der Transfektion nur den Zellen ein Wachstum ermöglicht, welche die veränderte DNA und das Markergen durch homologe Rekombination in das Genom integriert haben. Zellen, die im Selektionsmedium wachsen, werden auf die korrekte Integration des Targetingvektors durch PCR oder Southern Blotting Methoden überprüft und anschließend in Maus Blastozysten injiziert oder mit Embryonen im Morula Stadium aggregiert. Die aus beiden Methoden entstehenden chimären Blastozysten werden operativ in scheinchwangere Weibchen transferiert. Die chimären Nachkommen werden verpaart und im Falle der Beteiligung der ES-Zellen an der Keimzellbildung können Nachkommen der ES-Zellen erhalten werden.

Im weiteren Verlauf soll auf die *gene targeting* Methoden ausführlicher eingegangen werden.

### **2.1.1 Konventionelles *gene targeting***

Bei der häufigsten hierfür angewandten Strategie wird die Genfunktion durch das Einbringen eines positiven Selektionsmarkers mittels homologer Rekombination inaktiviert (Capecchi, 1989). In der Regel besteht ein Targetingvektor, konstruiert als ein Replacementvektor, aus einem positiven Selektionsmarker, der von genomischer DNA flankiert ist. An einem Ende der genomischen DNA befindet sich ein negativer Selektionsmarker. Der positive Selektionsmarker erfüllt zwei Funktionen: 1. Durch die positive Selektion reichert man die ES-Zellen an, die stabil integrierte Targetingvektoren im Genom tragen (ca. 1 pro  $10^4$  elektroporierte Zellen), das heißt, der Selektionsmarker sowie die Mutation sind dauerhaft

im Genom vorhanden, werden also bei der Zellteilung weitergegeben. 2. Das Zielgen wird durch eine Mutation in codierenden Exons oder regulatorischen Sequenzen inaktiviert.

Der negative Selektionsmarker wird eingesetzt, um das homologe Rekombinationsereignis anzureichern. Hierbei werden die Zellen abgetötet, bei denen der Targetingvektor zufällig oder vollständig in das Genom integriert ist (Mansour et al., 1988). Trotz dieser Vorteile, die solche Selektionsmarker bringen, können sie auch nachteilige Effekte verursachen. Die Regulation oder auch das korrekte Spleißen des Zielgens können gestört werden (Jacks et al., 1994, Carmeliet et al., 1996). Weiterhin kann die Expression von benachbarten Genen durch die starken Promotoren, die häufig in Kombination mit den Selektionsmarkern eingesetzt werden, verändert werden (Lerner et al., 1993, Ohno et al., 1994; Olson et al., 1996; Braun et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass endogene Gene, die mehr als 100 kb entfernt vom Integrationsort liegen, durch den Selektionsmarker betroffen sein können (Pham et al., 1996). Diese *in cis* wirkenden Komplikationen sind natürlich besonders störend, wenn die Expressionsregulation eines Gens untersucht werden soll (Fiering et al., 1993), oder wenn eine Punktmutation analysiert wird, bei der alle weiteren Anteile des Gens unverändert bleiben sollen. Aus diesen Gründen sind Methoden entwickelt worden, um den eingebrachten Selektionsmarker wieder zu entfernen.

### 2.1.2 Weiterentwicklung des *gene targeting*

Bei dem weiterentwickelten modifizierten *gene targeting*, werden die eingebrachten Selektionsmarker durch lokusspezifische Rekombinasesysteme entfernt. Der positive Selektionsmarker wird von zwei Elementen flankiert, die von einer von außen eingebrachten Rekombinase erkannt werden. Bei der Rekombination wird dann der Selektionsmarker ausgeschnitten. Die verwendeten Rekombinasen Cre (causes recombination) und Flp (flippase) sind beides Mitglieder der Superfamilie der lambda Integrasen. Es sind sequenzspezifische Integrasen (Argos et al., 1986), die DNA an einer bestimmten Zielsequenz schneiden und dann an ein Stück DNA ligieren, das von einer zweiten sequenzidentischen Stelle stammt, um wieder einen durchgängigen DNA-Strang zu erzeugen. Die Rekombination erfolgt mit äußerster Genauigkeit, so dass am Ende nicht eine einzige Base verloren geht oder überzählig ist. Dieses Rekombinationssystem benötigt nur die Rekombinase, die spezifische *target*-DNA-Sequenz und einige ein- oder zweiwertige Kationen (Stark et al., 1992). Es werden keine Kofaktoren oder akzessorische Proteine benötigt, was die Möglichkeit eröffnet, diese Rekombinasesysteme in einer Vielzahl unterschiedlicher Umgebungen zu benutzen. Die minimale Zielsequenz für Cre und Flp besitzt mit 34 bp eine Größe, die es sehr unwahrscheinlich macht, dass dieses Element zufällig im Genom auftritt. Die Orientierung der *target sites* bestimmt die durch die Rekombinase erzeugte Modifikation. Eine direkte, d.h. gleichgerichtete Orientierung führt zu einem Ausschneiden der DNA, entgegengesetzte *sites* erzeugen eine Inversion und *target sites*, die auf unterschiedlichen DNA-Molekülen lokalisiert sind, ergeben eine Translokation (Hoess et al., 1985; Kilby et al., 1993; Yu und Bradley, 2001; siehe Abbildung 2.1). Die durch Cre erzeugten Deletionen sind reversibel, d.h. es ist ebenfalls möglich, zirkuläre extrachromosomale DNA zu integrieren. Diese Reaktion ist allerdings erschwert, da das Gleichgewicht in Rich-

tung des intramolekularen Ausschneidens verschoben ist. Die DNA-Topologie ist für die Rekombinationsreaktion unwichtig. Die DNA, die als Substrat dient, kann als supercoiled, kreisförmige DNA, als relaxierter Kreis oder als lineares Chromosom vorliegen (Abremski et al., 1983; Hoess und Abremski; 1985; Stark et al., 1992). Eine effiziente Rekombination kann in bereits differenzierten, postmitotischen Zellen (Agah et al., 1997) erfolgen, sowie auch in sich noch teilenden Zellen (Sauer and Henderson 1988, O’Gorman et al., 1991). Diese Eigenschaften machen Cre und Flp geeignet für den Einsatz in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen und somit zur Herstellung von transgenen Mäusen.

### 2.1.2.1 Die beiden Rekombinase Systeme Cre/loxP und Flp

#### 2.1.2.1.1 Das Cre/loxP-Rekombinasesystem

Das Cre/loxP-Rekombinasesystem stammt aus dem Bacteriophagen P1 (Sternberg and Hamilton 1981). Dort erfüllt es die Aufgabe Plasmid-Dimere in Monomere aufzulösen und somit die Erhaltung des Plasmids zu sichern, indem je ein Monomer an die Tochterzellen weitergegeben wird (Austin et al., 1981). Das für die Rekombination verantwortliche 38 kDa Enzym ist die Cre-Rekombinase, die zur Familie der Integrasen gehört (Argos et al. 1986). Cre vermittelt, ohne weitere Kofaktoren, die sequenzspezifische Rekombination zwischen zwei loxP-Elementen (*locus of crossing over* (X) in P1) (Sauer, 1987; Sauer and Henderson 1988). Die 34 bp Erkennungssequenz eines loxP-Elementes besteht aus zwei 13 bp langen invertierten *repeats*, die eine asymmetrische Kernsequenz von 8 bp flankieren (Hoess und Abremski 1984; Mack et al. 1992). Diese Kernsequenz bestimmt die Orientierung des loxP-Elementes.

#### 2.1.2.1.2 Das Flp-System

Das Flp System stammt aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und ist auf dem 2 $\mu$  Plasmid lokalisiert (Gerbaud et al., 1979, Broach und Hicks, 1980). Die natürliche Funktion des Enzyms ist es, die Anzahl der Kopien des 2 $\mu$  Plasmids zu erhöhen. Bei der Replikation werden Plasmid-Multimere gebildet, die FRT-*sites* (Flp **R**ecombination *target*) in der gleichen Orientierung tragen. Durch die nachfolgende Rekombination wird eine hohe Anzahl an Plasmid-Monomeren erzeugt (Futcher 1986).

#### 2.1.2.1.3 Vergleich der Cre- und Flp-Rekombinasen

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Cre und Flp ergab nur eine sehr geringe Homologie. Dies war allerdings zu erwarten, da die Enzyme sehr verschiedenen Ursprungs sind und sich auch die Erkennungssequenzen sehr unterscheiden. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass es vier konservierte Aminosäuren gibt: Arginin, Histidin, ein weiteres Arginin und ein Tyrosin (Sadowski, 1995). Es wird vermutet, dass diese konservierten Aminosäuren essentiell für das Schneiden und Religieren von DNA sind. LoxP- und FRT-*sites* haben die gleichen strukturellen Elemente, obwohl sie abweichende Sequenzen besitzen. Diese strukturellen Elemente sind invertierte symmetrische Sequenzen, die als

Bindungsstellen für Rekombinase-Monomere fungieren und einen AT-reichen asymmetrischen Kern, der die Stelle des Schneidens, des Austausches und der Ligation darstellt (Hoess et al., 1982; Jayaram, 1985). Der asymmetrische Kern hat eine sehr große Bedeutung, da er durch seine Orientierung das Endprodukt der Rekombination festlegt.

#### 2.1.2.1.4 Die Rekombinationsreaktion

Die Rekombination zwischen zwei loxP- bzw. FRT-Elementen erfolgt, indem eine Untereinheit der Rekombinase jeweils einen invertierten *repeat* des loxP- bzw. FRT-Elementes bindet, so dass zwei Untereinheiten an ein loxP- bzw. FRT-Element gebunden sind. Zwei dieser *target*-Sequenzen, die mindestens 82 bp (Hoess et al., 1985) voneinander entfernt liegen sollten, werden in einem synaptischen Komplex in räumliche Nähe gebracht, so dass die vier Rekombinaseuntereinheiten einen aktiven Komplex bilden können, der die DNA in der Kernsequenz schneidet (Mack et al., 1992) (Abbildung 2.1). Durch das Schneiden, Austauschen und Ligieren der DNA kommt es zu der Ausbildung eines Holliday-Intermediates. Das Schneiden, Austauschen und Ligieren des zweiten DNA-Stranges löst die Holliday-Struktur wieder auf und es entstehen zwei rekombinante Moleküle (Stark et al., 1992.). Im Falle einer intrachromosomalen Deletionsreaktion verbleibt eine *target*-Sequenz (die zur Hälfte aus der ersten und zur anderen Hälfte aus der zweiten besteht) in der chromosomalen DNA, so dass die Rekombinationsreaktion theoretisch reversibel ist. Allerdings ist die intermolekulare Integration energetisch ungünstiger, und das zirkuläre extrachromosomale Produkt geht oftmals verloren, so dass die Deletionsreaktion als irreversibel angesehen werden kann.

Um sicher zu gehen, dass das Rekombinationsereignis irreversibel ist können folgende Strategien angewendet werden:

1. Eine kurze Zeitspanne, in der die Rekombinase exprimiert wird (Gagneten et al., 1997).
2. Die Benutzung von zwei *target*-Sequenzen, die unterschiedliche Mutationen tragen. Eine Punktmutation im FRT-Element an Position -10 (Position +1 stellt die Mitte der Kernregion dar) erzeugt nur einen geringen Abfall in der Rekombinationseffizienz (Senecoff et al., 1988). Wenn in beiden FRT-Elementen also jeweils eine Punktmutation existiert, kann die Rekombination ganz normal erfolgen. Die resultierenden FRT-Sequenzen sehen dann so aus, dass eine Sequenz unverändert, d. h. ohne Mutationen ist und die andere zwei Mutationen trägt (an Position -10 und +10), wodurch weitere Rekombinationsreaktionen fast unmöglich sind. Besonders nützlich ist diese Strategie, wenn durch die Rekombinationsreaktion ein zirkuläres DNA-Molekül in ein lineares Molekül eingefügt wird und eine nachfolgende Exzision ausgeschlossen werden soll (Araki et al., 1997).

Auch in pflanzlichen Systemen wurden mutierte loxP-Sequenzen bereits erfolgreich angewendet (Albert et al., 1995).

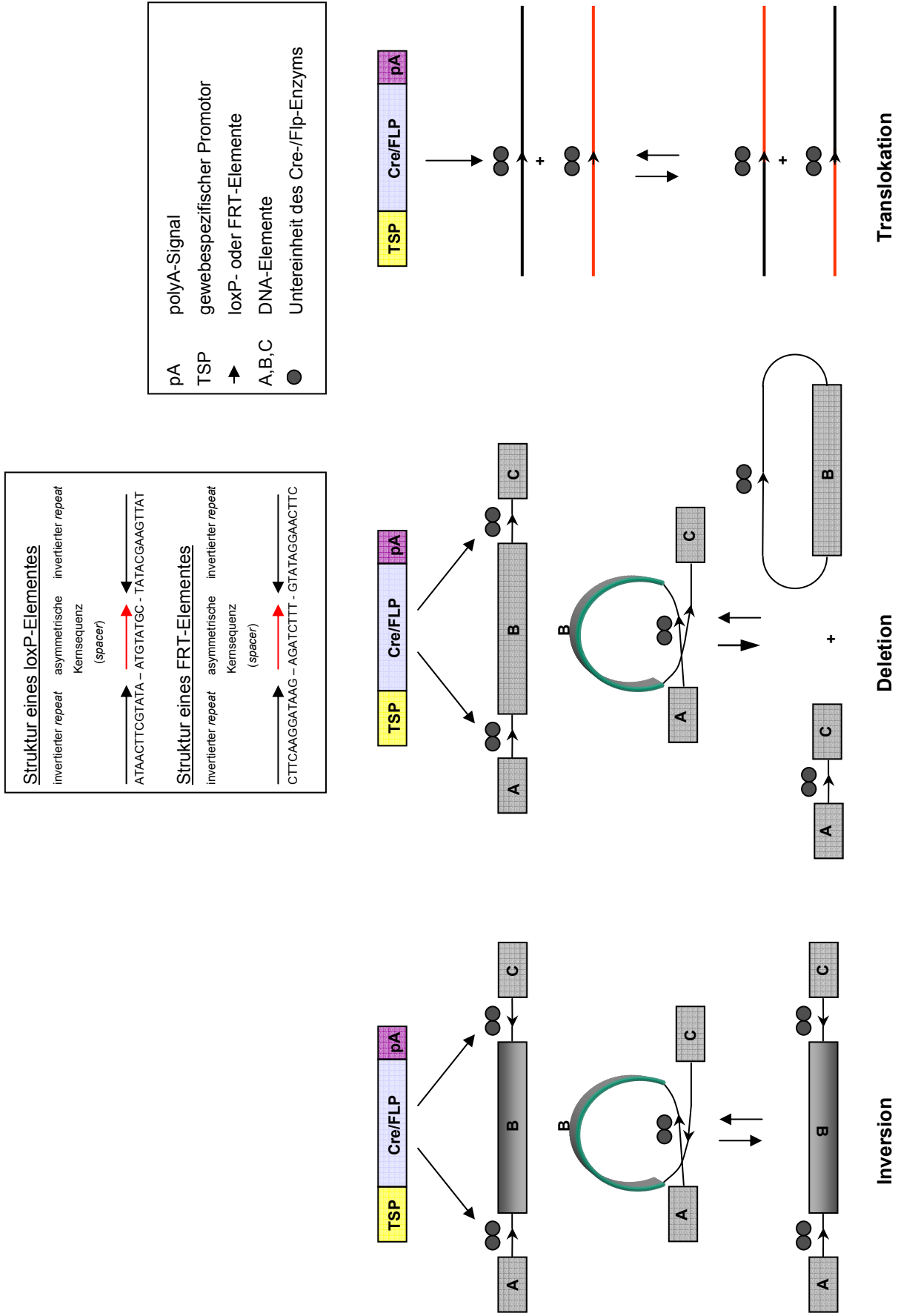


Abb. 2.1: Cre/FLP-Rekombinasereaktionen.

#### 2.1.2.1.5 Temperaturbedingungen

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft unterscheiden sich Cre und Flp in ihren anwendungsbezogenen Eigenschaften. Zwei grundlegende Unterschiede sind z.B. die optimalen Wachstumstemperaturen (37°C für Bakterien; 30°C für Hefen) und die Chromatinstruktur. Das Cre- und Flp-System sind deshalb in der Maus bzw. in Säugerzellen unterschiedlich beeinflusst durch die Körper- bzw. Wachstumstemperatur und durch die Chromatinstruktur, die die *target*-Sequenzen der Rekombinase umgeben. Die optimale Temperatur wurde von Cre und Flp ausgetestet (Buchholz et al., 1996). Cre ist über eine größere Temperaturspanne aktiv als Flp, mit einem Temperaturmaximum von 42°C. Flp besitzt sein Temperaturoptimum bei 30 °C und ist bei 37°C nicht mehr aktiv. Durch ungerichtete Mutationen wurde die Flp-Rekombinase so verändert, dass sie auch bei höheren Temperaturen mit der gleichen Effizienz einzusetzen ist wie Cre (Buchholz et al., 1998). Es wurde ein Flp-Klon mit vier Aminosäureaustauschen identifiziert, der eine bei 37° C um das 4fache und bei 40° C um das 10fache erhöhte Flp-Aktivität gegenüber der Wildtyp Flp besitzt. Diese Flp-Rekombinase wird Flpe genannt und ihre Aktivität ist in ES-Zellkultur mit der von Cre vergleichbar (Buchholz et al., 1998).

#### 2.1.2.1.6 Rekombinationseffizienz

Die Effizienz der Cre vermittelten Rekombination nimmt mit steigender Entfernung der eingebrachten loxP-*sites* ab (Zheng et al., 2000). Die Auswertung der Rekombinationseffizienz von vier erzeugten Deletionen und Inversionen mit einer Größe von 2, 24, 30 und 60 cM zeigte, dass der Logarithmus der Rekombinationseffizienz umgekehrt proportional zur genetischen Distanz zwischen den loxP-Elementen ist (Zheng et al., 2000). Mit zunehmendem Abstand (2-60 cM) nimmt die Rekombinationseffizienz also stark ab (11-0,01%). Aber nicht nur die Rekombinationseffizienz begrenzt die Größe der Deletion. Studien zeigten, dass Deletionen die größer als 22 cM sind, schwere Wachstumsstörungen in der ES-Zellkultur hervorrufen oder sogar letal sind. Wenn die Deletion zu groß ist, können Klone mit kompensatorischen Effekten auftreten, z.B. chromosomale Duplikationen (Zheng et al., 2000). Weiterhin sollte man bedenken, dass besonders große Deletionen auch einen Effekt auf benachbarte Gene haben können, die unbeeinflusst bleiben sollten, z.B. wenn gemeinsame regulatorische Elemente deletiert werden.

### 2.1.3 Targetingvektoren

Am Anfang eines jeden *gene targeting* Experimentes steht die Konstruktion eines Targetingvektors. Dieser Targetingvektor dient dazu, durch homologe Rekombination, eine endogene Sequenz in einem bestimmten chromosomalen Lokus, durch eine von außen eingebrachte Sequenz zu ersetzen. Die Art und Weise der Konstruktion des Vektors bestimmt das nachfolgende *gene targeting*-Experiment in erheblichem Maße. Deshalb soll hier etwas ausführlicher auf das Vektordesign eingegangen werden. Die minimalen Voraussetzungen für solch einen Vektor sind Sequenzanteile, die homolog zu der chromosomalen Region sind, an der der Austausch stattfinden soll und ein Plasmidvektor-Rückgrat zur Vermehrung in *E.coli*. Da die Transfektionseffizienz und die Targetingfrequenz sehr niedrig sein können,

ist es empfehlenswert, positive und/oder negative Selektionsmarker zu integrieren, die eine starke Selektion für das Rekombinationsprodukt gewährleisten (Capecchi 1997). Der positive Selektionsmarker kann zwei unterschiedliche Funktionen besitzen. Am häufigsten wird er dazu verwendet die Zellen zu isolieren, bei denen die transfizierte DNA stabil ins Genom integriert ist. Dies erfolgt mit einer Frequenz von ungefähr 1:10.000. Das heißt, dass in einer von 10.000 behandelten Zellen, die von außen zugeführte DNA stabil ins Genom integriert und das Selektionsmarkergen exprimiert wird. Weiterhin kann der Selektionsmarker als Mutagen benutzt werden, wenn er z.B. in ein codierendes Exon eines Gens platziert wird, oder wenn er ein oder mehrere codierende Exons ersetzt (Capecchi 1989). Negative Selektionsmarker werden benutzt, um gegen eine zufällige Integration des Targetingvektors in das Genom zu selektieren. Die Zellen mit einer zufälligen Integration sterben nach der Zugabe des Substrates für den negativen Selektionsmarker ab, so dass das korrekte *targeting*-Ereignis in der Zellpopulation nochmals angereichert wird (Mansour et al., 1988). Zwei verschiedene Vektorkonstruktionen können für das *targeting* in Säugetierzellen eingesetzt werden, Replacement- und Insertionsvektoren.

### 2.1.3.1 Replacementvektoren

Ein allgemeines Schema eines Replacementvektors ist in der folgenden Abbildung 2.2 zu sehen.

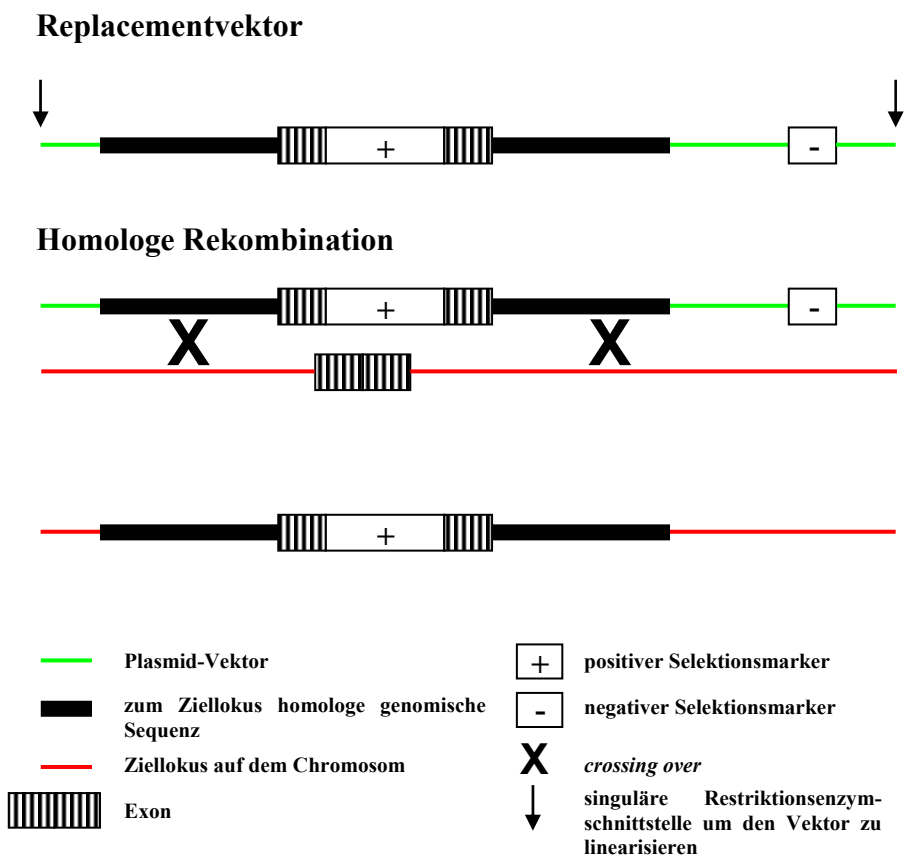


Abb. 2.2: Replacementvektor



---

Die homologe Rekombination erfolgt bei dem Einsatz eines Replacementvektors durch doppeltes *crossing over*, das zwischen dem Vektor und dem *targeting*-Lokus stattfindet (siehe Abb.1.2). Das Ergebnis ist ein DNA-Austausch zwischen Vektor und chromosomaler DNA, wobei sämtliche Komponenten, die zwischen den homologen Sequenzbereichen liegen mit ins Chromosom integrieren. Heterologe Sequenzen, die sich außerhalb der homologen Sequenzen befinden, integrieren nicht stabil ins Chromosom und gehen somit verloren (Hasty et al., 2000). Ein Targetingvektor setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

#### 1. homologe Sequenz

Die Länge der homologen Sequenz im Targetingvektor beeinflusst die Rekombinationsfrequenz (Thomas und Capecchi, 1987; Hasty et al., 1991). Es gilt generell die Regel: je länger die homologe Sequenz, umso höher ist die Rekombinationsfrequenz. Eine Sequenzlänge von 5-10 kb ist bei der Konstruktion des Targetingvektors gut handhabbar. Längere homologe Abschnitte würden die Frequenz zwar erhöhen, sie erschweren aber auch die Vektorkonstruktion, da ein Plasmid-Vektor ab einer Gesamtgröße von ca. 15-20 kb instabil wird. Außerdem wird die Auswahl an Restriktionsenzymstellen, zur späteren Linearisierung des Konstruktes und Southern Blot Analyse, mit zunehmender Sequenzlänge immer geringer. Die Mindestlänge der homologen Bereiche, die die Selektionskassette flankieren, sollte 2 kb betragen, damit bei der Rekombination eine effiziente Paarung und *crossing over* der homologen Bereiche erfolgen kann (Thomas et al., 1992).

#### 2. Isogene DNA

Die homologe DNA, die für die Vektorkonstruktion benutzt wird, sollte aus genomischen Banken stammen, deren DNA isogen zu der DNA der ES-Zellen ist. Es konnte festgestellt werden, dass sich eine deutliche Abweichung in der Homologie der Sequenzen negativ auf die Rekombinationsfrequenz auswirkt (te Riele et al., 1992). Das DNA-Mismatch-Reparatursystem in Zellen sorgt dafür, dass Sequenzen, die nicht vollständig homolog sind, daran gehindert werden zu rekombinieren. Dieses System hat die Aufgabe, Basenfehlpaarungen aufzudecken und zu korrigieren, die als Fehler bei der DNA-Replikation auftreten (Modrich und Lahue, 1996; Kolodner, 1996). Versuche in denen Mutationen in Komponenten dieses Mismatch-Reparaturweges eingefügt wurden, zeigten eine erhöhte Rate an Spontanmutationen, sowie eine erhöhte Rekombinationsrate zwischen abweichenden Sequenzen in *E.coli* (Rayssiguier et al., 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (Selva et al., 1995) und Säuger-Zellen (de Wind et al., 1995). Der Grad an polymorphen Variationen zwischen zwei Mausstämmen in einem bestimmten Locus ist unbekannt und variiert von Gen zu Gen. Intronsequenzen weichen meistens stärker voneinander ab als Exonsequenzen. Existieren Mismatches zwischen der Sequenz des Vektors und des *targeting*-Lokus, so ist die Targetingfrequenz stark reduziert, besonders wenn eine ununterbrochene „perfekte“ Homologie nicht existiert. Deshalb sollte darauf geachtet werden, dass die DNA, die zur Vektorkonstruktion benutzt wird isogen zu der ES-Zell-DNA ist.

3. Selektionsmarker

Selektionsmarker stammen vorwiegend aus Bakterien, Pilzen oder Viren. Sie bestehen meist aus kurzen, intronlosen Transkriptionseinheiten, die hinter Säugerpromotor- und Enhancersequenzen kloniert sind, gefolgt von Polyadenylierungselementen. Für positive und negative Selektionsmarker ist es von großer Bedeutung, dass sie konstant exprimiert werden, unabhängig vom Ort der Integration. Für diesen Zweck sind die Phosphoglycerat Kinase I und RNA Polymerase II Promotoren sehr gut geeignet, da sie relativ „positionsunabhängig“ sind (Soriano et al., 1991). Das Polyadenylierungssignal stammt meist ebenfalls von der Phosphoglycerat Kinase I oder von dem Rinderwachstumshormon. Beide Polyadenylierungssignale haben sich als effektive Terminatoren herausgestellt (Soriano et al., 1991). Häufig benutzte Selektionsmarker sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

**Tabelle 2.1: Selektionsmarker**

Selektionsmarker	Herkunft	Substrat für positive Selektion	Substrat für negative Selektion
Neomycin phosphotransferase (neo)	bakteriell	G418	
Puromycin-N-acetyltransferase (puro)	bakteriell	Puromycin	
Hygromycin B phosphotransferase (hph)	bakteriell	Hygromycin B	
Herpes simplex thymidin kinase (HSVtk)	viral		Gancyclovir, FIAU (1-2-deoxy-2-fluoro-β-D-arabinofuranosyl-5-iodouracil)
Diphtheria toxin A fragment (DTA)	bakteriell		Nicht benötigt

Replacementvektoren werden häufig eingesetzt, um einen Selektionsmarker in ein codierendes Exon zu setzen, oder um einen Teil des chromosomalen Bereiches zu ersetzen. Es ist wichtig dabei zu berücksichtigen, dass solche Unterbrechungen und kleine Deletionen die Genfunktion nicht immer vollständig unterbinden. Häufig werden noch Transkripte und trunkierte Proteine nachgewiesen, die noch teilweise biologische Aktivitäten aufweisen können. Ein Grund dafür ist, dass durch die Insertion des Selektionsmarkers in ein codierendes Exon ein unnatürlich großes Exon erzeugt wird, das von dem Spliceapparat nicht erkannt wird und einfach ausgelassen wird (Robberson et al., 1990). Wenn dieses ausgelassene Exon eine Nukleotidlänge besitzt, die ein Vielfaches von drei ist, besteht die Möglichkeit, dass das entstehende Protein teilweise oder sogar vollständig funktionsfähig ist. Dasselbe gilt für *in frame* Dele-

tionen von einem oder mehreren Exons. Wenn möglich, sollte deshalb zumindest der Transkriptionsstart deletiert werden.

#### 4. LoxP- und FRT-Elemente

Wenn nach der homologen Rekombination das Cre- oder das Flp-Rekombinasesystem zur gezielten Entfernung von Sequenzen eingesetzt werden soll, so muss der Targetingvektor, je nach Versuchsplanung, eine oder mehrere loxP- bzw. FRT-Elemente besitzen. Die Orientierung der Rekombinase-Erkennungssites ist wichtig für das Ergebnis der Reaktion (Hoess et al., 1985; Kilby et al., 1993), daher ist es besonders wichtig, die Orientierung relativ zur homologen genomischen DNA zu überprüfen. Außerdem ist es von großer Wichtigkeit, die Funktionalität der loxP- bzw. FRT-Sequenzen zu testen, bevor der eigentliche Versuch gestartet wird. Dies kann z.B. durch Sequenzierung erfolgen. Zusätzlich sollte der Targetingvektor noch einem Rekombinase Funktionstest unterworfen werden. Dieser Funktions-Assay kann in Bakterien (*E.coli*) durchgeführt werden, die ein ins Genom integriertes Cre- oder Flp-Gen besitzen (Buchholz et al., 1996). Der Targetingvektor wird in den entsprechenden Bakterienstamm transformiert. Es folgt eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Die Plasmid-DNA wird isoliert und mit Hilfe eines Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese analysiert. Der Targetingvektor sollte zu 100% rekombiniert sein.

#### 5. Singuläre Schnittstellen im Vektorrückgrat

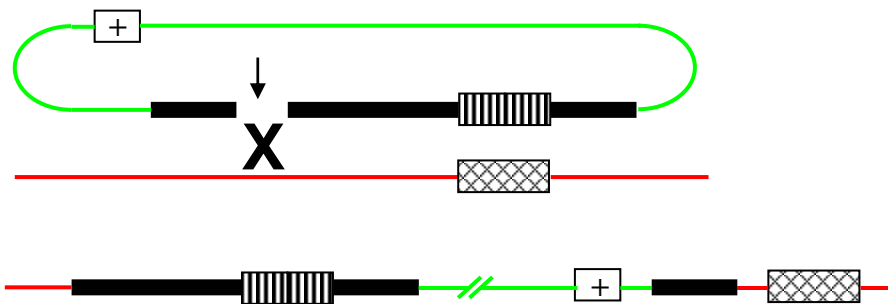
Der Targetingvektor sollte eine singuläre Schnittstelle im Vektorrückgrat besitzen, die zur Linearisierung des Konstruktes vor der Elektroporation dient, da die Integration von linearer DNA um ein Vielfaches effizienter ist, als die Integration zirkulärer DNA. Es bringt keinen Vorteil die homologe Sequenz von der Vektorsequenz zu trennen (Hasty et al., 1991).

Die transfizierten und positiv selektierten ES-Zellklone können entweder durch Southern Blotting oder durch eine PCR auf positive Klone abgesucht werden. Für die Southern Blot Analyse ist es wichtig Schnittstellen zu identifizieren, die die homologe Sequenz in der chromosomalen DNA flankieren und nicht in der homologen Sequenz oder der Vektorsequenz vorkommen. Außerdem wird eine Hybridisierungssonde benötigt, die eindeutig das *targeting*-Ereignis nachweist. Bei der PCR-Analyse sollte ein Primer in der Selektionskassette und der andere Primer außerhalb des homologen Bereiches liegen, so dass nur die Klone ein positives Signal ergeben, bei denen eine Integration am gewünschten Zielort stattgefunden hat. Für das PCR-*Screening* muss der Targetingvektor so konstruiert sein, dass ein Arm der homologen Sequenz eine Länge von 4 kb nicht überschreitet, damit die PCR durchführbar ist.

### 2.1.3.2 Insertionsvektoren

Die grundlegenden Elemente eines Insertionsvektors sind dieselben wie die eines Replacementvektors. Ein großer Unterschied ist allerdings, dass die Linearisierung innerhalb der homologen Sequenz erfolgt. Dies wirkt sich auf die Integration in den chromosomalen Zielort aus, die nur durch ein *crossing over* stattfindet, so dass der gesamte Targetingvektor, inklusive Vektorrückgrat integriert. Dies hat zur Folge,

dass der homologe Sequenzbereich anschließend doppelt vorliegt. Die duplizierte Sequenz ist allerdings durch das Vektorrückgrat getrennt (siehe Abbildung 2.3).



**Abb. 2 3: Insertionsvektor** (Legende siehe Abb. 2.2)

Ein Vergleich zwischen Replacement- und Insertionsvektorkonstrukten ergab, dass die Integrationsfrequenz von Insertionsvektoren um das 5-20 fache über der von Replacementvektoren liegt (Hasty et al., 1991).

Der positive Selektionsmarker kann innerhalb oder außerhalb der homologen Sequenz liegen. Liegt er innerhalb, so sollte darauf geachtet werden, dass sich die Linearisierungsstelle ca. 1,5 kb entfernt befindet. Das Ausschalten des Zielgens erfolgt meistens schon durch die Duplikation der eingebrachten Exonsequenz. Es sollte aber trotzdem darauf geachtet werden, dass durch Veränderung der homologen Sequenz im Vektor eine *frame shift* Mutation entsteht, oder ein Stop Codon eingeführt wird.

Dem Vorteil der relativ einfachen Konstruktion des Insertionsvektors steht das erschwerte Auffinden von positiven Klonen gegenüber. Wenn die homologe DNA keinerlei Veränderungen enthält, so kann es aufgrund des großen duplizierten Bereiches sein, dass ein PCR-Test nicht mehr praktikabel ist. Deshalb ist es ratsam eine kleinere Deletion in der homologen Sequenz des Deletionsvektors zu erzeugen, die später für den PCR-Test nützlich ist. Ein Primer befindet sich dann innerhalb des Selektionsmarkers und der andere in der deletierten Sequenz. So ergeben nur die Klone ein positives Signal, bei denen ein korrektes *targeting* stattgefunden hat. Auch das *Screening* mittels Southern Blotting kann hier erschwert sein. Deshalb sollte bei der Vektorkonstruktion darauf geachtet werden, dass geeignete Schnittstellen eingefügt werden, die eine eindeutige Identifizierung des *targeting*-Ereignisses zulassen.

## 2.1.4 Anwendungsbeispiele für die vorgestellten Rekombinasesysteme

### 2.1.4.1 Deletion von Markergenen und genomischen Sequenzen (*knockout*)

Die konventionelle *gene targeting* Methode kann eingesetzt werden, um bis zu 20 kb genomische Sequenz zu ersetzen oder zu deletieren (Zhang et al., 1994). Nachdem der Targetingvektor erfolgreich über homologe Rekombination in das ES-Zellgenom eingefügt wurde, kann die von loxP- oder FRT-*sites* flankierte Sequenz (z.B. der positive Selektionsmarker oder ein Exon) beim modifizierten *gene targeting* durch transiente Cre- oder Flp-Expression entfernt werden. Der Targetingvektor sollte so konstruiert werden, dass nach dem Ausschneiden des DNA-Stückes zwischen den beiden loxP- oder FRT-Sequenzen, ein DNA-Fragment mit einer neuen Größe entsteht, welches dann einfach per PCR oder Southern Blotting nachgewiesen werden kann. Wenn man den positiven Selektionsmarker aus dem ES-Zellgenom entfernt, kann man anschließend mit demselben Targetingvektor das zweite Allel mutieren, um auf diese Weise einen homozygoten Locus zu erzielen. Diese Methode hat den Vorteil, dass man nicht zwei unterschiedliche Targetingvektoren mit unterschiedlichen Resistenzgenen herstellen muss.

### 2.1.4.2 Erzeugung kleinerer Deletionen z.B. Punktmutationen

Im Gegensatz zu *knockout* Studien ist es bei diesem Versuchsaufbau von Interesse, den Effekt der erzeugten Punktmutation oder der eingeführten DNA-Sequenz zu untersuchen. Deshalb ist es wichtig, dass der Ziellokus, bis auf den veränderten Sequenzbereich, unverändert bleibt. Es sind folgende Punkte zu beachten:

1. Um eine potentielle Beeinträchtigung durch die nach der Rekombinasereaktion zurückbleibende loxP- oder FRT-*site* so gering wie möglich zu halten, sollte diese in einem Intron oder *downstream* des Polyadenylierungssignals liegen. Regionen, die nah an Enhancer-Elementen oder *splice sites* liegen sollten vermieden werden.
2. Die Neutralität der loxP- bzw. FRT-*sites* in Bezug auf die Genregulation und -funktion, sollte durch eine nicht mutierte Kontrollmaus überprüft werden, die nur die loxP- bzw. FRT-*site* trägt.
3. Die wichtigen Regionen des Targetingvektors sollten sequenziert werden, um sicherzustellen, dass während der Konstruktion keine Veränderungen eingeführt wurden.
4. Die eingeführte Mutation sollte nicht mehr als 10 kb vom Selektionsmarker entfernt liegen, damit sichergestellt ist, dass sie mit ins Genom integriert.
5. Ein geeignetes Testverfahren sollte bestehen, um mutierte Klone von wildtyp Klonen zu unterscheiden. Eine Möglichkeit wäre eine neu generierte Restriktionsschnittstelle einzufügen, um die Klone über Southern Blots zu testen.

### 2.1.4.3 Einbringen von Sequenzen (*knock in*)

Um heterologe DNA in einen bestimmten Locus einzubringen, wird sie in dem Vektorkonstrukt direkt neben die loxP- oder FRT-Sequenz und den Selektionsmarker gesetzt, so dass eine große nicht homologe Region entsteht. Die zweite loxP-Sequenz flankiert die homologe DNA bis zu der Stelle, die später aus dem Genom entfernt werden soll.

Durch die Rekombinasereaktion wird die endogene DNA zusammen mit dem Marker entfernt, so dass sie von der von außen eingebrachten Sequenz ersetzt wird. Auch hier ist es wichtig, dass der „Eingriff“ die Regulation des *target*-Lokus nicht stört und dass die loxP- oder FRT-Sequenz nicht störend wirkt. Diese Methode wurde zuerst angewandt, um 6 Exons des Maus Gens *Cy1* gegen humane Sequenz auszutauschen, um einen Mausstamm zu produzieren, der chimäre Antikörper generiert (Zou et al., 1994).

### 2.1.4.4 Gewebespezifische *knockouts*

Die Fähigkeit ein Gen mit zeitlicher und räumlicher Kontrolle zu inaktivieren bringt große Vorteile, wenn die ubiquitäre Genmutation zu einem embryonal letalem Phänotyp führt, oder wenn nur bestimmte Aspekte der Genfunktion näher betrachtet werden sollen. In diesen Fällen können Mäuse mit den bereits vorgestellten *gene targeting* Methoden erzeugt werden, die eine gefloxtete Zielregion (d.h. mit loxP-Elementen flankiert) besitzen. Diese Mäuse werden dann mit Mäusen gekreuzt, die eine gewebespezifische Cre-Expression besitzen, so dass nur in bestimmten Gewebe- oder Zelltypen eine Geninaktivierung stattfindet. In den meisten Fällen werden die loxP-Elemente in Introns plaziert. Der erste gewebespezifische *knockout* wurde 1994 publiziert (Gu et al., 1994). In dieser Arbeit wurden drei loxP-Elemente benutzt, zwei die den Selektionsmarker flankieren und ein weiteres, welches die Zielregion flankiert. Da die Selektionskassette einen störenden Einfluss auf die normale Expression des Zielgens vor der Cre-Rekombination haben kann, wird diese Selektionskassette, flankiert durch die beiden loxP-Elemente, durch partielle Cre-Rekombination entfernt, übrig bleibt das gefloxtete Zielgen. Dies geschieht meist bereits in der ES-Zellkultur, durch transiente Cre-Expression (Gu et al., 1994). Die Mäuse, die aus diesen ES-Zellen hergestellt werden, können dann mit gewebespezifisch Cre exprimierenden Mäusen verpaart werden. Drei loxP-Elemente wurden auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt (Xu et al., 2001; Holzenberger et al., 2000). Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist, das Zielgen zu „floxxen“ und die Selektionskassette mit FRT-Elementen zu flankieren, so dass nur die Selektionskassette durch den Einsatz der Flp-Rekombinase entfernt wird (Meyers et al., 1998).

### 2.1.5 Konditionale Genexpression in der Maus

Nicht alle biologischen Prozesse können mit den bereits vorgestellten Methoden der Geninaktivierung oder Transgenexpression untersucht werden. Viele Gene haben z.B. mehrere Rollen während der Embryogenese und im Erwachsenenalter, so dass ein vollständiges Ausschalten dieser Gene zu einem embryonal letalen Phänotyp führen kann. Ebenso kann die embryonale Expression eines Transgens Letalität hervorrufen, was die Analyse des Transgens unmöglich macht. Um diese Hindernisse zu umgehen, kann ein experimenteller Schalter benutzt werden, der es erlaubt das Zielgen nach Belieben zu aktivieren oder ruhig zu stellen. Durch diese Möglichkeit, die räumliche und zeitliche Ebene frei zu wählen, ergeben sich eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten, bisher unbeantwortete Fragestellungen zu lösen.

Die Kriterien für einen optimalen genetischen Schalter werden von binären Systemen erfüllt, bei denen die Genexpression durch die Interaktion von zwei Komponenten kontrolliert wird (Lewandoski, 2001). Das Produkt eines Effektor-Transgens wirkt auf ein Ziel-Transgen. Diese binären Systeme können in zwei Kategorien aufgeteilt werden: 1. Der Effektor transaktiviert die Transkription des Zielgens. 2. Der Effektor ist eine sequenzspezifische Rekombinase, die das Zielgen umstrukturiert. In den ersten binären Systemen wurde die Transkription des Transgens durch virale Proteine aktiviert (Bieberich et al., 1993). Ein großer Nachteil dieser Systeme war aber, dass in der Abwesenheit des Transaktivators eine hohe basale Zielgen-Expression vorhanden war (Khillan et al., 1988). In einigen Fällen verursachte die Expression des Transaktivators sogar die Ausbildung von Tumoren (Nerenberg et al., 1987). Ein großer Vorteil eines aktivierbaren Systems gegenüber dem DNA-Rekombinationssystem ist, dass die transkriptionelle Transaktivierung nur geschieht, wenn der Transaktivator vorhanden ist. Im Falle eines induzierbaren Systems kann die Zielgen-Aktivierung an einem beliebigen Zeitpunkt wieder rückgängig gemacht werden, wodurch eine viel größere Kontrolle über die Transgen-Expression gegeben ist (Lewandoski, 2001).

#### 2.1.5.1 Das Tet-System

Die am weitest verbreiteten binären Transkriptions-Transaktivierungs-Systeme sind die Tetracyclin abhängigen regulatorischen Systeme (Gossen und Bujard, 1992). In diesen Systemen besteht der Effektor aus einer fusionierten Sequenz der VP16 Transaktivierungsdomäne und dem *E.coli* Tetracyclin-Repressor-Protein (TetR). Dieses TetR-Protein kann spezifisch an Tetracyclin, sowie an die Operator Sequenzen (tetO) des tet-Operons des Zieltransgens binden, was die Transkription auslöst. Mittlerweile gibt es zwei Versionen dieses Systems. Im ursprünglichen System kann der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA) nicht an die DNA binden, wenn der Induktor vorhanden ist. In der modifizierten Variante reverses-tTA-System (rtTA) ist es genau umgekehrt, rtTA bindet nur bei Anwesenheit des Induktors an die DNA. Als Induktor wird Doxycyclin (Dox) eingesetzt, da es kommerziell erhältlich und sehr preisgünstig ist und weil geringe Dosen, die weit unter dem zytotoxischen Level liegen rtTA effizient aktivieren bzw. tTA inaktivieren (Baron und Bujard, 2000; Gossen et al., 1995). Der Hauptunter-

schied zwischen dem tTA und dem rtTA System ist, dass in dem tTA System für die Unterdrückung der Transgenexpression ständig Dox zugegeben werden muss. Eine Induktion erfolgt durch Entzug von Dox und hängt deshalb davon ab, wie schnell das restliche Dox im Körper abgebaut wird. In transgenen Mäusen kann die Induktion zwischen 24 Stunden und einer Woche dauern, abhängig von dem Gewebe, das betrachtet werden soll (Kistner et al., 1996). Bei dem rtTA System dagegen kann die Induktion durch die Zugabe von Dox sehr schnell erfolgen, z.B. innerhalb einer Stunde (Hasan et al., 2001). Eine anschließende Repression hängt wiederum davon ab, wie schnell Dox aus dem Gewebe entfernt wird. Diese Systeme wurden bereits vielfach angewendet, um Gene und ihre Funktionen zu charakterisieren. Einige Beispiele sind: Endothelin Rezeptor Typ B (Shin et al., 1999), Huntingtin (Yamamoto et al., 2000), verschiedene Onkogene (Ewald et al., 1996; Chin et al., 1999; Felsher und Bishop, 1999; Huettner et al., 2000). Die Tet-Systeme werden ständig modifiziert, um sie noch weiter zu verbessern (Baron et al., 1997; Baron und Bujard, 2000; Urlinger et al., 2000; Wells et al., 1999). In einer Variante können z.B. zwei Ziel-Transgene gleichzeitig reguliert werden (Baron et al., 1995). Dies kann von großem Nutzen sein, da man für eines der beiden Transgene ein Reporter gen wählen kann, so dass die Transaktivierung gut zu verfolgen ist (Lavon et al., 2000). Eine andere Variante ist, dass die Spezifität der DNA-Bindung des Transaktivators modifiziert wurde, so dass er bei unterschiedlichen Dox Konzentrationen an veränderte tetO Sequenzen bindet. Hierdurch kann die Transaktivierung zwischen zwei Genen hin und her geschaltet werden (Baron et al., 1999).

### 2.1.5.2 Weitere induzierbare Systeme

Neben den Tet-Systemen gibt es noch weitere induzierbare Systeme, wie z.B. das auf GAL4 basierende GLVP-System (Ornitz et al., 1991). Der Transkriptionsaktivator GAL4 stammt aus *Sacharomyces cerevisiae*. Die Aktivierung des Transgens erfolgt durch Zugabe der synthetischen Steroide RU486 oder ZK98.734. Weiterhin existiert noch ein System, in dem die Cre codierende Region mit einer mutierten Liganden-Binde-Domäne (LBD) des Progesteron- (Kellendonk et al., 1999; Kellendonk et al., 1996) oder des Östrogen-Rezeptors (Feil et al., 1996; Danielian et al., 1998; Schwenk et al., 1998; Metzger et al., 1995; Zhang et al., 1996) fusioniert wurde. Diese mutierten Liganden-Binde-Domänen werden durch die Zugabe der synthetischen Steroide RU486 bzw. Tamoxifen aktiviert, so dass das Cre-Fusionsprotein in den Kern transportiert wird, wo die Rekombination erfolgen kann. Diese Systeme wurden bereits erfolgreich von mehreren Arbeitsgruppen angewendet (Metzger und Chambon, 2001; Vasioukhin et al., 1999; Arin et al., 2001; Imai et al., 2001) und weiter modifiziert, um eine höhere Sensibilität zu erreichen (Wunderlich et al., 2001; Indra et al., 1999).



### 2.1.5.3 Vorteile der transkriptionellen Transaktivierung

Die Vorteile der transkriptionellen Transaktivierung gegenüber der konditionalen Kontrolle der Genexpression sind: die Reversibilität der Zielgen-Expression, die Sensibilität der Transgen-Aktivierung in Bezug auf die Induktor-Konzentration und die Fähigkeit, dass die Expression von mehreren Transgenen gleichzeitig kontrolliert werden kann. Aufgrund dieser Merkmale sind diese Systeme sehr gut für Experimente geeignet, bei denen das Transgen ektopisch- oder überexprimiert werden soll.

### 2.1.5.4 Erzeugung von großen chromosomalen Rearrangements (*chromosome engineering*)

Mit den bisher vorgestellten Targetingvektoren ist es möglich Deletionen mit einer Größe von bis zu 20 kb zu erzeugen (Zhanget al., 1994; Gu et al., 1993). In manchen Fällen reichen Modifikationen die bis zu 20 kb umfassen nicht aus, um Genfunktionen zu untersuchen oder Mausmodelle für humane Erkrankungen zu generieren (Smithies, 1993). Viele humane Krankheiten entstehen nicht durch die Mutation eines einzelnen Gens, sondern durch große chromosomale Rearrangements, wie z.B. Translokationen (Smithies, 1993), Duplikationen (Roa und Lupski, 1994), Inversionen (Denny et al., 1986), Deletionen (Popescu und Zimonjic, 1997) oder Chromosomen-Gewinn oder -Verlust (Hassold et al., 1996). Um humane Erkrankungen in der Maus zu simulieren, die durch große chromosomale Rearrangements erzeugt werden, wurden zwei *gene targeting* Schritte mit der Cre/loxP-Rekombination kombiniert, um große chromosomale Rearrangements in ES-Zellkultur zu erzeugen (Ramirez-Solis et al., 1995). Diese Methode wird auch *chromosome engineering* genannt. Da die Rekombinationseffizienz des Cre-Enzyms für sehr große Deletionsabschnitte (mehrere Mb) nicht bekannt war, wurde folgende Strategie angewandt: ein positiver Selektionsmarker, das Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Minigen (Hprt), wurde in zwei nicht funktionelle Fragmente geteilt, ein 5'- und ein 3'-Fragment. Beide Fragmente haben dasselbe Intron das jeweils eine loxP-*site* trägt. Jedes Fragment für sich genommen ist nicht funktionell. Erfolgt allerdings die Cre-Rekombination zwischen den beiden loxP-*sites*, so kommen die beiden Fragmente des Minigens in räumliche Nähe, so dass das positive Selektionsgen wieder hergestellt wird. Es werden zwei Targetingvektoren konstruiert, die unterschiedliche positive Selektionsmarker, wie z.B. Puromycin und Neomycin besitzen, damit die Vektoren nacheinander in dasselbe ES-Zellgenom gebracht werden können. Weiterhin enthalten die Vektoren ein Fragment des HPRT-Minigens mit der loxP-*site*, sowie DNA-Sequenzen, die zu den ausgewählten Deletionsendpunkten homolog sind. Die Targetingvektoren werden nacheinander in ES-Zellen eingebracht, die ein inaktiviertes HPRT-Gen tragen (Ramirez-Solis et al., 1995; Bradley et al., 1998). Es folgt eine transiente Cre-Expression in den manipulierten ES-Zellen durch Elektroporation eines Cre-Expressionsvektors (O'Gorman et al., 1997). Das HPRT-Gen wird durch die Rekombination vervollständigt und rekombinante Zellen überleben die Selektion mit HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin). Das Ergebnis der Cre vermittelten Rekombination hängt von der Orientierung und Lokalisation der beiden loxP

tragenden Selektionsgenhälften ab. Sind die beiden Hälften auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert, haben aber dieselbe Orientierung (relativ zum Zentromer), erfolgt eine chromosomale Translokation (Ramirez-Solis et al., 1995; Smith, 1995; Van Deursen et al., 1995). Sind die beiden Fragmente auf demselben Chromosom lokalisiert, erfolgt abhängig von der Orientierung der loxP-sites, eine Inversion, Deletion oder Duplikation. (Ramirez-Solis et al., 1995; Li et al., 1996). Die überlebenden Zellen werden isoliert und die Analyse des Rearrangements wird dann mit Hilfe von Southern Blots, PCR (Ramirez-Solis et al., 1995; Smith, 1995) oder auch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt (Zheng et al., 2001). Verifizierte ES-Zellklone können direkt zur Generierung von chimären Mäusen eingesetzt werden. Diese Methode wurde bereits erfolgreich von mehreren Gruppen eingesetzt, um gezielte Deletionen im Mausgenom zu generieren (Li et al., 1996; Schlake et al., 1999; Zhu et al., 2000; Madsen et al., 1999)

Eine Alternative zur HPRT-Selektion ist, auf den Verlust eines negativen Selektionsmarkers, z.B. das Herpes Simplex Thymidin Kinase-Gen (HSVtk), zu screenen. Es wird zwischen die beiden loxP-sites positioniert, so dass es bei erfolgreicher Rekombination entfernt wird. Die ES-Zellen werden dann mit dem Substrat für das HSVtk Gen, FIAU oder Gancyclovir, kultiviert. Zellen, die den negativen Selektionsmarker noch tragen sterben ab. Diese Negativselektion kann allerdings nicht dazu eingesetzt werden, um Duplikationen oder Inversionen zu detektieren.

#### 2.1.5.5 Anwendungsbeispiele für das *chromosome engineering*

Etwa 0,6% aller menschlichen Neugeborenen haben genetische Imbalancen (Schaffer et al., 2000), so dass man davon ausgehen kann, dass chromosomale Anomalien eine grundlegende Ursache für humane genetische Krankheiten sind. Da genetische Abschnitte bei Mensch und Maus häufig konserviert sind, ist die Maus ein guter Modellorganismus, um die molekularen Geschehnisse, die mit den Erkrankungen verknüpft sind, weiter zu erforschen.

Chromosomale Translokationen werden z.B. erzeugt, um Mausmodelle für humane Translokationen zu erhalten. Durch Translokationen entsteht häufig Krebs, da Onkogene abnormal exprimiert werden, oder neue Fusionsgene entstehen (Rabbitts, 1994). Verschiedene chromosomale Translokationen in der Maus sind bereits mit dem Cre/loxP-System erzeugt worden (Buchholz et al., 2000; Collins et al., 2000; Smith et al., 1995; Van Deursen et al., 1995), die z.B. Modelle für humane Leukämie assoziierte Translokationen t(8;21) (q22;q22) (Buchholz et al., 2000) und t(9;11) (p22;q23) (Collins et al., 2000) darstellen. Deletionen im Mausgenom können ebenfalls als Modelle für humane Erkrankungen dienen. Im Fall des DiGeorge- und des Prader Willi Syndroms führten in der Maus generierte Deletionen zu der Aufklärung des Gendefektes (Lindsay et al., 1999; Tsai et al., 1999; Merscher et al., 2001; Lindsay et al., 2001).

Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Kartierung von rezessiven Mutationen, die in dem erzeugten Deletionsintervall liegen, indem man Mäuse mit einer bestimmten Mutation mit hemizygoten Deletionsmäusen kreuzt (Ramirez-Solis et al., 1995; Zheng et al., 1999).

### 2.1.5.6 Strahleninduzierte Deletionen

Eine alternative Methode um Teile des Mausgenoms zu deletieren, stellt die Bestrahlung von ES-Zellen mit  $\gamma$ -Strahlen dar. Es entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich großen Deletionen ohne definierte Endpunkte. Um bestimmte Zielregionen zu deletieren, bedarf es einer regionspezifischen Selektion.

Die Deletionsstrategie besteht aus drei Schritten: 1) Integration eines negativen Selektionsmarkers mittels homologer Rekombination in einen definierten Lokus, 2) Bestrahlung der „getargeteten“ ES-Zellen mit anschließender Selektion auf den Verlust des Markers und 3) Charakterisierung der Deletionsgrößen und anschließende Herstellung von chimären Mäusen.

Für diese Versuche sollten ES-Zellen eingesetzt werden, deren Entwicklungspotential durch eine Bestrahlung nicht beeinträchtigt wird. 300 – 500 Rad ist eine Bestrahlungsintensität, die effizient genug ist, um große Deletionen in Säuger-Zellen zu erzeugen (Urlaub et al., 1986; Kavathas et al., 1980). Bestrahlungsversuche, die mit 129/Sv ES-Zellen durchgeführt wurden, zeigten, dass die Keimbahngängigkeit nach der Strahlenbehandlung zerstört war. F1 Hybride der ES-Zelllinien 129/Sv<sup>Jac</sup> x BALB/cJ und 129/Sv<sup>Jac</sup> x C57BL/6J sind dagegen nach einer Bestrahlung mit 400 Rad noch fähig, keimbahngängige Chimären zu generieren (You et al., 1997a). Ein zusätzlicher Vorteil der F1 Hybrid-Zelllinien ist, dass die Polymorphismen zwischen den beiden „Eltern-Linien“ eine schnelle Charakterisierung der Deletionsgrößen durch PCR-Analysen ermöglichen (Dietrich et al., 1994).

Um strahleninduzierte Deletionen zu erzeugen, wird zuerst ein negativer Selektionsmarker (HSVtk), gekoppelt mit einem positiven Selektionsmarker (Neomycin), durch homologe Rekombination an den gewünschten Lokus im ES-Zellgenom gebracht. Ein ES-Zellklon, mit der korrekten Integration der Selektionskassetten, wird ausgewählt und einer Bestrahlung zwischen 300–600 Rad ausgesetzt. Die Mutationsfrequenz ist proportional zu der Strahlendosis (You et al., 1997b). Nach der Bestrahlung erfolgt die Selektion auf den Verlust der HSVtk-Kassette mit 1,2'-deoxy-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-5-iodouracil (FIAU) oder mit Gancyclovir (Ganc). Die überlebenden Klone werden nochmals auf den Verlust der HSVtk- und Neo-Kassetten getestet, indem in einem parallelen Kontrollversuch Neomycin zum Medium hinzugegeben wird. Die Deletionsgrößen der Neomycin sensitiven Klone werden in nachfolgenden PCR-Analysen untersucht. In Regionen, in denen eine große Anzahl polymorpher Marker existiert, können die Deletionsendpunkte sehr gut kartiert werden. In Bereichen, in denen nur wenig polymorphe Marker zur Verfügung stehen, können Tiere, die von diesen ES-Zellen abstammen, mit Mausstämmen wie *Mus spretus* oder *Mus castaneus* gekreuzt werden. In den Nachkommen ist die Wahrscheinlichkeit für Polymorphismen durch den geringeren Verwandtschaftsgrad erhöht (You et al., 1997b).

Die aus den ES-Zellen erzeugten Mauslinien können für verschiedene Versuche eingesetzt werden. Innerhalb einer Mauslinie kann durch Verpaarungen ein homozygoter Zustand, das heißt das Fehlen der Deletionsregion erreicht werden. Es können aber auch Mäuse mit unterschiedlichen, sich überlappenden Deletionen gezüchtet werden, um Aufschluss über die Funktionen der in den Deletionsregionen befind-

lichen Gene zu bekommen. Weiterhin können diese Deletionskomplexe genutzt werden, um bestehende rezessive Mutationen zu kartieren.

## 2.2 Die *wobbler* Mutation der Maus

Ein Projekt in unserer Arbeitsgruppe ist die Positionsklonierung der *wobbler* Mutation der Maus. Zahlreiche Vorarbeiten, wie z.B. die Erstellung eines, die *wobbler* kritische Region überspannenden, YAC-Contigs bildeten eine detaillierte Basis für diese Arbeit. Im Folgenden möchte ich die *wobbler* Maus, sowie die zu Beginn meiner Arbeit vorliegenden Kartierungsdaten darstellen.

Die autosomal rezessive Mutation *wobbler* (Gensymbol *wr*; Phänotyp WR) trat 1955 spontan in dem C57BL/6-Inzuchtstamm auf und wurde erstmals 1956 von Falconer beschrieben. Die Mutation bewirkt die Degeneration von Motoneuronen im Rückenmark und im Hirnstamm. Dies verursacht eine Muskelatrophie hauptsächlich im Schulter- und Halsbereich (Falconer 1956, Duchon und Strich, 1968). Die ersten phänotypischen Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Wurfgeschwistern sind ab der 3. Lebenswoche zu erkennen. Betroffene Tiere haben einen wackligen Gang und zeigen einen Tremor bei körperlicher Anstrengung. Dieses Merkmal führte zur der Namensgebung der Mutation (to wobble = wackeln). Aufgrund des stark progressiven Krankheitsverlaufes, können erkrankte Tiere nach sechs Wochen nicht mehr mit den Vorderpfoten greifen. Außerdem erreichen die Tiere in den ersten Monaten nur 40-50% des Körpergewichtes ihrer Wurfgeschwister. Die Hinterbeinmuskulatur ist für gewöhnlich weniger stark betroffen, obwohl bei älteren Tieren ebenfalls degenerative Veränderungen beschrieben werden konnten (Harris, 1975). Mikroskopische Untersuchungen zeigten eine Degeneration von ca. 40% der Motoneuronen des cervikalen und thorakalen Rückenmarks bei *wobbler* Tieren (Baulac et al., 1983). Elektronenmikroskopische Analysen ergaben eine Vakuolisierung der degenerierenden Neuronen (Duchon und Strich, 1968; Andrews et al., 1975). Die Neurodegeneration wird von einer massiven Astrogliose im Hirnstamm und Rückenmark begleitet (Laage et al., 1988; Hantaz-Ambroise et al., 1993; Junier et al., 1994; Rathke-Hartlieb et al., 1999). Apoptose (Rathke 1996), virale Infektionen und Autoimmundefekte (Andrews et al., 1974) konnten als Ursache für das Neuronensterben ausgeschlossen werden. Außer dem neuralen System sind auch die männlichen Gonaden bei der *wobbler* Mutation betroffen. Die Spermien von *wr* Mäusen haben eine abnormale Morphologie. Ein bis vier der äußeren Mikrotubuli-Doublets der Flagellen fehlen (Leetsma und Sepsenwol, 1980) und es wird kein funktionelles Akrosom ausgebildet (Heimann et al., 1991). Im Mikroskop lassen sich die *wobbler* Spermien durch ihre runden Köpfe gut von der sichelförmigen Kopfstruktur normaler Mausspermien unterscheiden. Das Spermienmittelstück ist ebenfalls abnormal, die Mitochondrien werden bei der Spermio-genese in den Kopfbereich des Spermiums verschoben (Heimann und Herkströter, 1993). Durch die Herstellung von Aggregationschimären konnte die gewebeautonome Wirkung des *wobbler* Gens nachgewiesen werden (Augustin et al., 1997). Die Analyse der Testes zeigte ein Mosaik von gesunden und betroffenen Spermien. Nachkommen wurden aber nur durch gesunde Spermien erzeugt.

Die *wobbler* Maus dient, aufgrund ihres neurologischen Defektes, als Modell für spinale Muskelatrophien (SMAs) und für die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und wird, mit dem Ziel mögliche Therapien zu entwickeln, intensiv untersucht.

### 2.2.1 Physikalische Kartierung der *wobbler* Mutation

Zur Identifizierung des *wobbler* Gens wurde die Strategie der Positionsklonierung gewählt, bei der Kandidatengene nur aufgrund ihrer chromosomalen Lokalisation ausgewählt werden (Collins, 1992). Die Grundlage für die Positionsklonierung von *wobbler* stellte eine interspezifische Rückkreuzung zwischen *Mus musculus* C57BL/6 und *Mus spretus* SEG dar, die es ermöglichte den *wobbler* Locus auf den proximalen Abschnitt des Chromosoms 11 der Maus zu kartieren (Kaupmann, 1992; Kaupmann et al., 1992). Die Kandidatenregion wurde dabei proximal von dem Gen *Erythroblastosis oncogene B (Egfr)* und distal von dem Gen *Reticuloendotheliosis oncogene (Rel)* flankiert. Es folgten weitere Intra-Spezies-Rückkreuzungen mit Inzuchtstämmen. Durch mehrere neue Rekombinationsereignisse konnte das Kandidatengenintervall weiter eingeschränkt werden (Lengeling, 1994; Wedemeyer, 1995; Wedemeyer et al., 1996; Korthaus, 1996; Korthaus et al., 1997; Schmidt, 1997; Resch et al., 1998; Ulbrich, 2000; Fuchs 2001). Das BAC-Ende 147N22rev stellt zurzeit den proximal und das Gen *Murr1* den distal flankierenden Marker der ca. 2 Mb überspannenden *wobbler* kritischen Region dar.

Zu Beginn dieser Arbeit bestand die physikalische Karte des *wobbler* kritischen Bereiches aus 24 Maus-YACs (Yeast artificial chromosome) (Resch, 1997, Wedemeyer, 1995). Zusätzlich existierte noch ein humanes YAC-Contig von der, zum *wr*-Kandidatengenbereich, homologen Region auf Chromosom 2p13. Dieses Contig bestand aus 12 YACs (Resch, 1997). Nachteile von YACs sind allerdings eine hohe Chimerität und Instabilität (Monaco und Larin, 1994), sowie der Hintergrund der „natürlichen“ Hefechromosomen. Dieser Hintergrund erschwert die DNA-Aufreinigung in erheblichem Maße. Unter der Berücksichtigung zukünftiger Versuche (Subklonierungen, Sequenzierungen, Vorkerninjektionen, Konstruktion von Targetingvektoren) wurde der Entschluss gefasst, die Kandidatenregion zusätzlich durch ein BAC-Contig abzudecken. BACs (Bacterial Artificial Chromosomes; Shizuya et al., 1992) können Fremd-DNA bis zu einer Größe von 200 kb tragen, wachsen in *E.coli* und werden wie bakterielle Plasmide behandelt. Dies vereinfacht die Aufreinigung von DNA und damit alle nachfolgenden Versuche, wie z.B. Subklonierungen und Sequenzierungen. Basierend auf den vorliegenden YAC-Contig-Daten, wurde durch Zusammenarbeit mehrerer Arbeitsgruppenmitglieder begonnen, ein die Kandidatenregion überspannendes BAC-Contig zu erstellen.

### 2.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es einen Beitrag zu der Erstellung eines, die *wobbler* kritische Region überspannenden, BAC-Contigs zu leisten, um die bereits vorliegenden Kartierungsergebnisse zu vervollständigen und zu ergänzen. Ein besonderes Interesse lag dabei auf der Orientierung der BACs.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) sollte angewandt werden, um die Reihenfolge der einzelnen BACs zu bestätigen und um die Größe eventuell auftretender Lücken zwischen den BACs zu bestimmen.

Nach einer initialen Kartierungs- und Orientierungsphase sollten mehrere Deletionsvektorkonstrukte innerhalb der *wobbler* kritischen Region hergestellt werden.

Hierzu sollten verschiedene Ansätze getestet werden. Ein Ansatz war es, Vektoren für die Cre/loxP vermittelte Deletion in ES-Zellen herzustellen. Es sollten mindestens vier Vektoren konstruiert werden, die in unterschiedlicher Kombination die *wobbler* Region teilweise oder komplett deletieren.

Verschiedene Arten der Vektorkonstruktion (Replacement- und Insertionsvektoren) sollten ausgetestet und bewertet werden. Hierzu zählte ebenfalls die Überprüfung von Resistenzmarker tragenden Vektoren, die von auswärtigen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt wurden, sowie deren Bewertung hinsichtlich der Verwendbarkeit für diese Arbeit. Weiterhin sollte ein Deletionsvektorkonstrukt zur Generierung von strahleninduzierten Deletionen bearbeitet werden.

ES-Zellkulturtechniken sollten außerdem im Rahmen einer Kooperation erlernt werden, um sie in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren. Die fertig gestellten Deletionsvektorkonstrukte sollten auf ES-Zellebene ins Mausgenom integriert werden, um anschließend, wenn zeitlich möglich, Deletionen zu erzeugen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 *E.coli* Stämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz / Quelle
XL1Blue	RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZAM15 Tn10(tet <sup>r</sup> )]	Sambrook et al., 1989
TOP10F'	F' {lacI <sup>q</sup> Tn10(Tet <sup>R</sup> )} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZAM15 ΔlacX74recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	TOPO TA Cloning Kit, Instruction manual (2000), Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
SCS110	RpsL (Str <sup>S</sup> ) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI <sup>q</sup> ZAM15]	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

##### 3.1.2 Kulturmedien

Für das Anziehen von Bakterienkulturen wurden die folgenden Nährmedien verwendet. Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Liter:

LB-Broth	LB-Agar	Terrific Broth	Terrific Broth-Agar
10 g Bacto-Tryptone 5 g Yeast Extract 10 g NaCl	Wie LB; +15 g Bacto-Agar	12 g Bacto-Tryptone 24 g Yeast Extract 4 ml Glycerol auf 900 ml auffüllen nach dem Autoklavieren mit 100 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung (2,31g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 12,54g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) mischen	Wie Terrific Broth +15 g Bacto-Agar

Der pH-Wert der Lösungen wurde vor dem Autoklavieren mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt.

Nach dem Abkühlen der Lösungen auf Handtemperatur wurde das gewünschte Antibiotikum und im Fall der Agarlösungen 0,16 ml 1M IPTG und 0,26 ml 250mg/ml X-Gal zugegeben.

### 3.1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösungen	Arbeitskonzentrationen
Ampicillin	150 mg/ml in H <sub>2</sub> O	25-150 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol	10 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in Ethanol	12,5 µg/ml

### 3.1.4 Zellkulturmedien

#### Feeder-Medium (FM)

FCS	50 ml
100x Penstrep (10000U)	5 ml
L-Glutamin	5 ml
β-Mercaptoethnol.	1,2 ml
DMEM	438,8 ml

#### Complete-Medium (CM) für ES-Zellen

FCS	75 ml
100x Penstrep (10000U)	5 ml
L-Glutamin	5 ml
Na-Pyruvat	5 ml
Non essential aminoacids	5 ml
β-Mercaptoethanol	1,2 ml
DMEM	403,8 ml

#### 2 x Freezing-Medium

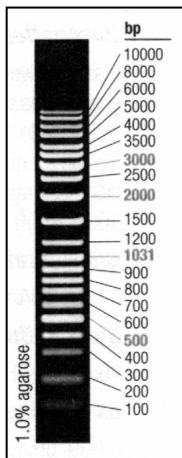
FCS	20 %
DMSO	20 %
DMEM	60 %



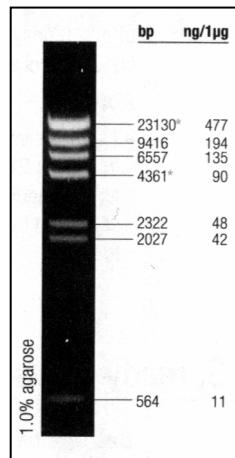
### 3.1.5 Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pCRII TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)
pCR2.1 TOPO	Invitrogen (Karlsruhe)
pBluescript SK (+/-)	Stratagene (Amsterdam)
pGEM-T Easy	Promega (Mannheim)

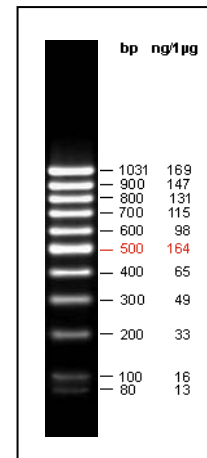
### 3.1.6 DNA-Längenstandards



Ladder Mix (M1)



Lambda DNA/HindIII (M2)



GeneRuler 100 bp (M3)

### 3.1.7 Enzyme und Proteine

Enzyme	Hersteller/Vertreiber
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL (Eggenstein)
Restriktionsendonukleasen	Gibco BRL (Eggenstein) Fermentas (St.Leon-Rot)
DNase	Roche (Mannheim)
DNA Polymerase I	Roche (Mannheim)
Proteinase K	Sigma (Taufkirchen)
PCR Master Mix	Qiagen (Hilden)
Expand Long Template PCR System	Roche (Mannheim)
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin/EDTA	PAA (Linz)

### 3.1.8 Verwendete Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
TOPO-Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Qiagen-Plasmid-Kits	Qiagen (Hilden)
Nucleobond AX Kit	Macherey und Nagel (Düren)
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit	Stratagene (Amsterdam)

### 3.1.9 Internet Ressourcen

Bezeichnung	Adresse
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>
Golden Path Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>
Ensembl Browser	<a href="http://ensembl.org">http://ensembl.org</a>
NCBI Browser	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Rummage Server IMB Jena	<a href="http://gen100.imb-jena.de/rummage/server/wobbler">http://gen100.imb-jena.de/rummage/server/wobbler</a>
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST">www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST</a>
RepeatMasker	<a href="http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker">http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker</a>
BCM Search launcher	<a href="http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/">http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/</a>
TBASE	<a href="http://tbase.jax.org">http://tbase.jax.org</a>
Mouse Genome Informatics	<a href="http://www.informatics.jax.org">www.informatics.jax.org</a>

### 3.1.10 Oligonukleotide

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C)	Größe (bp)	Quelle
<b>Mikrosatelliten-Marker/YAC-End-STs</b>				
D11Mit343A	AGA TTC CTG CTT CTC CCC TC	64	110	MIT
D11Mit343B	TGA GTT AGC AGG TTT TTA TCT CAC A			
D11Mit294A	TTC TGC ACA CAG GCA TTC AT	60	117	MIT
D11Mit294B	TTG ATT CAC AGA ATA ATT TGT ATT TGG			

D11Mit294.2A D11Mit294.2B	TCT TAG TGT TTG ATC TAC TGT GTG GTC GTG AAT TCT GGT GAA GAG AG	60	125	MIT
D11Mit19A D11Mit19B	CTA GCT GCT TCT AGA ACC TTC CC TTT GAT CCT GAG CAC AAA CG	60	140	MIT
D11Mit81A D11Mit81B	ATC GGC TAT ATT CCC ATC CC AGC AAA TAT AGT GCT GCA CTG TG	64	188	MIT
M1RA M1RB	CTT GCC ACT TAG GAC ATT CTC G CTT CAT GCT GCC CTG ACT CC	60	500	A.Lengeling (1997)
<b>STSs von Genen</b>				
Glns-ps1a Glns-ps1b	AGC TTT GGA GAC AAC AAT TAG ATC TGT TCA TCA GCT GAG GAA TGG ATG	60	210	Bhandari et al. (1990)
Rab1aEx6.2-a Rab1aEx6.2-b	CTG CTG CTA AAA TCT GCC TC CTA ACC AAC CAC GGG AAA C	58	301	Wichmann et al. (1989)
Otx1-555 a Otx1-555b	AAT GAT GTG GCC AGT GAG CC TCC CAC TGC GAA GTC CTT CA	62	555	Acampora (1996)
Mor2a Mor2b	GCT GAA GGG AGA GTT CAT CACG CAG CAG CAC CAC GCT GTT GCAC	70	450	Korthaus
<b>BAC-End-Primer</b>				
BAC25D8Reva BAC25D8Revb	GAC TCT GGC TTC TGG AAC CC GGC CCA GCA ATG CAC TAT GG	60	358	diese Arbeit
BAC25D8Fora BAC25D8Forb	CCA GCT GCC GGT AGC ACC TG CCA AGT GGG TGA CCT TGG GC	62	252	diese Arbeit
BAC48H20RevA BAC48H20RevB	CTG TGG GAG GTG GTA ACT TAG TTT CCA TGG CCT CTC ACA GTC	64	322	diese Arbeit
BAC48H20ForA BAC48H20ForB	CTC AAA GCA CAC ATT GCA CTT C GTT CTA GTT CTT CAG GTG TGT	62	444	diese Arbeit
BAC61H18Fora2 BAC61H18Forb2	CTG TGT CTA ATC TCC CAC AG GTG TGC CCT CAA GCC ACA TG	60	320	diese Arbeit
BAC65I11Fora2 BAC65I11Forb2	CAT ATA CCC AGA AGA TGT TC TCA GTG AGT ACA TAT TGT GC	62	275	diese Arbeit
BAC65I11Reva2 BAC65I11Revb2	GAC CAG CAA CTT CCA TCA GTC CCT GTC TTT GTA TCC CTG CAG	64	236	diese Arbeit
BAC72P24Reva2 BAC72P24Revb2	TCT CTT CCA TGT GGC TGG CC AGT CAT AGT AGA GCA TGT GTA G	62	404	diese Arbeit
BAC72P24Fora2 BAC72P24Forb2	CCT TGC CAG CAT CTG CTG TC CAA TCC TCC ATC TGA TAG AGG	60	273	diese Arbeit
BAC109N20ForA1 BAC109N20ForB1	CAG GGA TTG GTG AGA TTC TGG GTG AGT ATA TGA TTC ATG TGT GC	62	390	diese Arbeit

BAC109N20RevA BAC109N20RevB	CTT ACC TGT CAC CAC TAC TAG GTT GGA TAG TTC CAA GGT CC	64	356	diese Arbeit
BAC123J24Fora2 BAC123J24Forb2	GAG TCA TAC ATG CCC ACT TC CAT TGT AGG CAC ACA ATG TGC	60	232	diese Arbeit
BAC123J24Reva BAC123J24Revb	CTG AGG CCA TAT GCT GCA GCC CAG ATT GTT GAG TAG CTA GTG	60	330	D. Korthaus
BAC135B4Fora2 BAC135B4Forb2	CAC AGT CCC AGT GTG CAG GAG CAT GGC ACT GTG CAC ATG GC	60	412	diese Arbeit
BAC135B4Reva BAC135B4Revb	GTA ATT TCC AAG TCT CTA ACA G GCA TTC CAT TTC TTT GTG TCC	60	543	D.Korthaus
BAC139O9Rev1 BAC139O9Rev2	CCT TTG TAT GTA TTA ATT TCA CCC CTA TTA GAA GGG ACT TAC ATC ATC	60	591	D. Korthaus
BAC139O9Fora2 BAC139O9Forb2	AAG TAG CCA TGC TCT TCA CC GCT TAA TGG GCT ATC CTA TTC	60	368	diese Arbeit
BAC141E23Fora2 BAC141E23Forb2	CAG TAT AAA CCA AAC TGC TCT G GGG TAA GTT AAT GGC ATC ACT G	60	270	diese Arbeit
BAC147N22ForA BAC147N22ForB	CAT TTG ACC TCT CAG GCT AGA G GAG TGG CCA AGC ATG TGT AAC	62	290	diese Arbeit
BAC147N22RevA BAC147N22RevB	GAA GCT GCT GTG TCC TTG TCG TGC TGT AGA GAT CTC ACA GCC	65	358	diese Arbeit
BAC160A5Fora2 BAC160A5Forb2	CAG GCA GAT AGG ACA GGT CAG CTA AGA CAG GTA AGA TGT TC C	57	325	diese Arbeit
BAC160A5Reva2 BAC160A5Revb2	CAA ATT CTC TGT AAG ATT AAG CC GTT GGA GGT GTG TCA TTG GAG	60	587	diese Arbeit
BAC173M5Fora BAC173M5Forb	CCC TGA GTA AGT TAT GCA TCC GCT GAG GAG GCA GTG GTT TC	60	300	diese Arbeit
BAC173M5Reva BAC173M5Revb	GAG TCT GTG CGT GCA TTT CC ACG ATG AGG CTT AGG GTG AG	58	388	diese Arbeit
BAC180K15Fora BAC180K15Forb	GAA GTC AGT CTG TTC TTT CAG TTC TGC CTT GAG CAC TGT TC	57	382	diese Arbeit
BAC180K15Reva BAC180K15Revb	CTG CTT TCT CCT TAA CCT AAT G GAA TGT ACA GAT TGT ACA CTA CT	60	328	diese Arbeit
BAC185K22Ra2 BAC185K22Rb2	GAG TTG GCA GCA CTG CAA GAG CTG TGG AAC TTC TTA GTA TCA CTC	62	245	diese Arbeit
BAC185K22Fora2 BAC185K22Forb2	GGG AAG GCC TAT ATA AGA CCT G CAC ATC GTC AGC AGG TGT TAC C	62	280	diese Arbeit
BAC196N16RevA BAC196N16RevB	CTC TGA CGA GCT GTC ACT TC GGA CCT GAT CTA GTC TGA GG	66	337	diese Arbeit

BAC196N16ForA BAC196N16ForB	CAC AAG AGG CAG CAC TGA TG GTA GAT AGC CTG TGG CTC AC	63	247	diese Arbeit
BAC219P9ForA BAC219P9ForB	CTA CCT CCT GAA TGA ACA CA CTG TCA TGT TGG AAT ATG TC	56	264	diese Arbeit
BAC219P9RevA BAC219P9RevB	GTA GAT ACT CAG ATT GTC TGA TG CTT GCC AGA AGG TAG GAA GTG	62	262	diese Arbeit
BAC219P17RevA BAC219P17RevB	GTA AGC CAT TCC ATT ACC ACC GTT GAC ATT GAA AGC TAA GGG C	64	191	diese Arbeit
BAC219P17ForA BAC219P17ForB	CTG GAA CTA GAA CTG AGA AGG TC CTG GCC AGG CCT CAC ACA TG	64	164	diese Arbeit
BAC236P17RevA BAC236P17RevB	GCC TGT CTA CAT CAC ATA CTC CTC TGG AAT AAG TGT ATG CCT C	64	355	diese Arbeit
BAC236P17ForA BAC236P17ForB	GCA GAG TGC AGG AGT TAC ATG GGT CAT CTC AGT ATG GTC TGG	66	330	diese Arbeit
<b>Oligonukleotide für das loxP-Element</b>				
LoxBamHIa	GAT CAG CAT AAC TTC GTA TAG CAT ACA TTA TAC GAA GTT ATC G			diese Arbeit
LoxBamHIb	GAT CCG ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TGC T			diese Arbeit
LoxPBamHIc	GAT CCG CAT AAC TTC GTA TAG CAT ACA TTA TAC GAA GTT ATC T			diese Arbeit
loxPBamHI d	GAT CAG ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TGC G			diese Arbeit
<b>Sequenzierprimer für das Konstrukt O9_PuroloxP</b>				
O9puroloxPA	CTT TAC TTC AGG GCG TCT GAC			diese Arbeit
O9puroloxPB	CCA AGT TCA TTC CCA GCA TCC			diese Arbeit
O9puroloxPC	CAA GGC TTC CCT AGT CCT GG			diese Arbeit
O9puroloxPD	CTC TAA CAT AAA CAA GGA AGC CC			diese Arbeit
O9puroloxPE	AGT TCT AGC CTC GAG GCT AGA			diese Arbeit
O9puroloxPF	AGG CCT TCC ATC TGT TGC TGC			diese Arbeit
O9puroloxPG	CAC CGA GCT GCA AGA ACT CTT			diese Arbeit
O9puroloxPH	TAG AGC TTG GGC TGC AGG TC			diese Arbeit
O9puroloxPI	GTG AAC CAG TAC TGT CTA AAT GG			diese Arbeit
O9puroloxPJ	CTG CTA TGT TGA AAG TGT CTG G			diese Arbeit
O9puroloxPK	CCA GAC ACT TTC AAC ATA GCA G			diese Arbeit
O9puroloxPL	CTG TGC TTC AAG TAT GGT GTC C			diese Arbeit
O9puroloxPA2	TAG TAG TCG CCA ATG TGG CTC			diese Arbeit
O9puroloxPB2	CCC AGT GTC TAT AGT GAA GTA G			diese Arbeit
O9puroloxPC2	CAG TCC GTG ACA CTT GTA GGA			diese Arbeit
O9puroloxPD2	TGT TCT GGT CCC TAC AGA GTC			diese Arbeit

O9puroloxPI2	CTA GGT GAT CAA GAT CGG AGC			diese Arbeit
O9puroloxPL2	GGA CCA TAC CCA TAG AAC TGA T			diese Arbeit
<b>Sequenzierprimer für die TKNeoKassette</b>				
NeoTKrev1	CAT CTA CAC CAC ACA ACA CCG			diese Arbeit
NeoTKrev2	GAT ATG TGA GCT CCG AGC TTC			diese Arbeit
NeoTKrev3	GGT GGA AAC ATT CCA GGC CTG			diese Arbeit
NeoTKuni1	TGA GAT GAC AGG AGA TCC TGC			diese Arbeit
NeoTKuni2	CCG GTG CCT GAA TGA ACT GC			diese Arbeit
NeoTKuni3	CTT GAC GAG TTC TTC TGA GGG			diese Arbeit
TKNeo-rev4	CCT GGG CCT TGG ACG TCT TG			diese Arbeit
TKNeo-uni4	CTC CCA GCC TCA ATA CGC AC			diese Arbeit
TKNeouni5	GGC AAC GAA GGA GCT GCA AAG			diese Arbeit
TKNeorev5	GGC TAT TCC TGT ACA TCT GGG			diese Arbeit
<b>Genomische Subfragmente</b>				
MK5.7219A MK5.7219B	GTT GGT AGT TCA ACT AAC CCA ACA ATG ACA GGC ACC CAA GAA TAC ACC CAA G	68	5448	diese Arbeit
MK14.0456A MK14.0456B	TTC CTT GCA GTT CTT ATG GAA GGC TG CCA CCC TAA GAC ACT TGT TGG ACT G	68	9576	diese Arbeit
MK2.0910A2 MK2.0910B1	AGG GTA GAA ACC TAA CCT CCT GCT CA GAC ATA GTG GAA GTG GGC CTG TTT AG	68	5807	diese Arbeit
<b>Orientierungs- und Insert-Test-Primerpaare</b>				
TestMK2.1 NeoTKrev2	AGG CAG CAT GCC AAG CTG TAG GAT ATG TGA GCT CCG AGC TTC	60	900	diese Arbeit
MK2Test4 MK2Test5	GGA AGC CTC AGT ACT TAG CTG GCC TAG TCA GTC ATC AAT GGG	67	967	diese Arbeit
loxPori3sense CT8TKNeoloxPStuI1	TTC GTA TAA TGT ATG CTA TAC GAA GT TCG AAG GCC TGC AGC CCG GGG GA	59	57	diese Arbeit
NeoTKrev1 NeoTKrev2	CAT CTA CAC CAC ACA ACA CCG GAT ATG TGA GCT CCG AGC TTC	61	160	diese Arbeit
MK14.0456Test3 MK14.0456Test4	GGC AGC TAC AGT CTA GTC CTC TGC TGT GAC AGT GAC CAT CCC	70	1300	diese Arbeit
MK2-0872E1 MK2-0872E2	CAC TAG TCT AGA GCC TTA CTT GA TGG ACC TTG TCC AGT GAC CTA A	63	500	diese Arbeit
MK2-0872E3 MK2-0872E4	AGG TGT GCA GTC CTT CTT ATA GG ATC AAG AGA ATG GAT CCT GTG GA	63	500	diese Arbeit
MK5-7219E1 MK5-7219E2	GTA GGA GAT CTC TAT TGA GTA AC CTG TGA GTT TCA CAC ACA TTG AA	61	600	diese Arbeit
MK5-7219E3 MK5-7219E4	CAT ACA CTA ACT CAT CAG GAT GG GCA GAT GAT ATG AGG CAT AAT TAC	61	450	diese Arbeit

<b>Hybridisierungs sonden</b>				
MK2EcoRVA MK2EcoRVB	CCA CTG GGT ATG CAG CTA CTG CTG TGG CTT CTT GCC ACT TCC	60	679	diese Arbeit
MK2EcoRVC	TGT TGA TGG TTG GAG ACC TAC AG			diese Arbeit
F1BstXA F1BstXB	CAT CAG TCC AGA GCT CAA TGC AC ATC TCC CAC ACG GGT TTA AAT GC	66	1288	diese Arbeit
F2BstXA F2BstXB	CTG TAC TCC CTG CCT TCA CAG C CTG TTC AGC TCA TAT GAG CCA TTC	68	1170	diese Arbeit
F3BstXA F3BstXB	CAC CAA GCA TGC AGA ACC ACA TG TCA GAC CCT TCG CAC TAA GTA GC	68	1287	diese Arbeit
611P24U1 611P24U4	GCC ACC TTT AGG TTG GAA ATG A ATG GGT CGG GAC AAA ATA GGC	60	605	D. Ehling
<b>Sequenzier-/Vektorprimer</b>				
M13forward-20	GTA AAA CGA CGG CCA G			diese Arbeit
M13Reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC			diese Arbeit
<b>PuroloxP-AflIII Primer</b>				
O9Neo/PuroAflIIIA O9Neo/PuroAflIIB	CCT CAC TTA AGG GAA CAA AAG CTG GTA TCC TTA AGC TTG ATA TCG AAT TCC	64	2300	diese Arbeit
<b>ES-Zell-DNA Screening Primer</b>				
ESPuroTest3.s ESPuroTest.as	CCA CCG CGG TGG AGC TCC AGC CCT CAT TTC CAA CCT AAA GGT GGC	63	2500	diese Arbeit
K13TKNeo.s ESPuroTest.as	CGA ATG GGC TGA CCG CTT CCT CCT CAT TTC CAA CCT AAA GGT GGC	60	2500	diese Arbeit
<b>Chromosom 11 polymorphe Marker</b>				
D11Mit2A D11Mit2B	TCC CAG AGG TCT CCA AGA CA CCA CAG TGT GTG ATG TCT TC	55,5	107/122	MIT
Glns-ps1a Glns-ps1b	AGC TTT GGA GAC AAC AAT TAG ATC TGT TCA TCA GCT GAG GAA TGG ATG	63,5	185/190	Bhandari et al. (1990)
Stk10A Stk10B	GCT GAC TTT GCT TTT GTG TAT GTC G AGG TTC CAA TGC ATT GGT CCT AGG	68	260/270	Kuramochi et al. (1999)
D11Mit205A D11Mit205B	GGC AGA GTC TAG TCT GAT ATC TTG G CAG TGC ACA GCC AGG TTG	55,5	95/100	MIT

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Transformation von *E.coli* Stämmen mit Plasmid-DNA

#### 3.2.1.1 Herstellung von elektrokompetenten Bakterien

Transformationen wurden hauptsächlich mit dem *E.coli* Stamm XL1Blue durchgeführt. Zur Lösung besonderer Fragestellungen wurde auch mit dem *E.coli* Stamm SCS 110 gearbeitet, der  $\text{dam}/\text{dcm}^-$  ist, also keine Methylase-Aktivität mehr besitzt.

Für jede Präparation wurden die Bakterien aus einer Glycerinkultur erst auf eine LB-Agar-Platte mit  $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Tetracyclin ausgestrichen. Eine einzelne Kolonie wurde zum Animpfen einer 3 ml Übernachtkultur in LB-Medium verwendet. Am nächsten Morgen wurde diese Bakterien-Suspension in 250 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und ca. 4 Stunden bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0.5-0.6 bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. Die Kultur wurde dann für 15 min. auf Eis gekühlt. Die nachfolgende Behandlung der Bakterien-Suspension wurde bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlraum und in der Kühlzentrifuge (Sorvall RC5b) durchgeführt. Die Bakterien wurden für 15 min. bei 6000 rpm im GS-3-Rotor geerntet, der Überstand abgegossen und der Rücklauf vollständig abgezogen. Die Zentrifugenbecher wurden 2 x mit ca. 20 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  ausgeschüttelt, ohne das Bakterien-Pellet zu lösen. Die Zellen wurden in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  resuspendiert und das Volumen dann auf 250 ml aufgefüllt. Es folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm. Der Überstand wurde unverzüglich abgegossen und das Zellpellet im Rücklauf durch Schütteln resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei SS34-Zentrifugenbecher verteilt und jeweils 25 ml einer 15%igen Glycerin-Lösung zugegeben. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 20 min. im SS34-Rotor sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml 15% Glycerin aufgenommen und als  $60\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  im Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefroren. Die Lagerung der so hergestellten kompetenten Zellen erfolgte bei  $-70^\circ\text{C}$  über eine Zeitspanne von bis zu einem Jahr. Die Kompetenz der Zellen wurde für jede Präparation durch eine Testtransformation mit 100 pg pBlueskript Vektor ermittelt. Die Werte lagen bei  $0,7\text{-}1 \times 10^8$  cfu (colony forming units) pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA.

#### 3.2.1.2 Elektroporation

Zur Elektroporation wurde ein  $60\mu\text{l}$  Aliquot auf Eis aufgetaut und maximal  $5\mu\text{l}$  Plasmid-DNA gelöst in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  dazugegeben. Nach vorsichtigem Mischen (nicht pipettieren) wurde das DNA-Zell-Gemisch 1 min. auf Eis inkubiert und anschließend in eine auf Eis vorgekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvette (Biorad, München) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene Pulser Gerät (Biorad, München) bei  $25\mu\text{F}$ ,  $400\Omega$  und  $2,5\text{ kV}$ . Direkt nach dem elektrischen Impuls wurde 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen gegeben, die Suspension aus der Küvette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 60 min. bei  $37^\circ\text{C}$  im Schüttelinkubator regeneriert. Anschließend wurden  $50\mu\text{l}$  – 1ml des



---

Transformationsansatzes auf LB-Agar-Platten, versehen mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

### 3.2.1.3 Hitzeschocktransformation

Ein CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E.coli*-Stamm (Top10F'), mit dem eine Hitzeschocktransformation durchgeführt wird, wurde nur in Kombination mit den PCR-Klonierungskits von Invitrogen (TOPO TA Cloning) und Promega (pGEM-T Easy) eingesetzt. Die Transformationen wurden nach den Angaben des Herstellers ausgeführt. Unterschiede der Hitzeschocktransformation zur Elektroporation sind: eine 30-minütige Inkubation der Zellen, nach Zugabe der DNA, auf Eis und der 30-sekündige Hitzeschock bei 42°C zur Aufnahme der DNA in die Zellen. Die Regeneration der Bakterien sowie die Selektion erfolgten in derselben Weise wie bereits bei der Elektroporation beschrieben.

### 3.2.1.4 Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Klone

Bei Klonierungsreaktionen, in denen die Plasmid Vektoren eine β-Galaktosidase-Kassette trugen, konnten rekombinante Klone durch die Zerstörung der LacZ-Enzymaktivität aufgefunden werden. Die Insertion eines DNA-Fragmentes in die Multiple-Klonierungs-Stelle (MCS) des Vektors, die sich innerhalb der LacZ-cDNA befindet, zerstört, meist durch das Verschieben des Leserasters, die Enzymaktivität. Die Transkription des Reporters musste durch Zugabe von IPTG aktiviert werden. Die Enzymaktivität wurde durch die Umsetzung des farblosen Substrates X-Gal in ein tiefblaues Indolderivat angezeigt (Sambrook et al., 1989).

Bakterien-Suspensionen wurden z.B. nach einer Transformation auf IPTG-, X-Gal- und Antibiotika haltige Platten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Rekombinante Klone waren an der weißen Färbung der Kolonien und Vektorreliganden an der blauen Färbung zu erkennen.

### 3.2.1.5 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen wurden zur langfristigen Lagerung (2-3 Jahre) von Bakterien angelegt. Dazu wurden 800 µl einer Bakterien-Suspension mit 200 µl einer 100%igen Glycerin-Lösung (Sigma, Steinheim) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und anschließend bei -70°C gelagert. Eine kleine Menge der gefrorenen Bakterien-Glycerin-Suspension wurde bei Bedarf wieder auf eine LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und üN im Brutschrank inkubiert.

## 3.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

### 3.2.2.1 DNA aus Bakterien

#### 3.2.2.1.1 Easy Prep (nach Berghammer und Auer, 1993)

Diese Methode der DNA Isolierung kann zur schnellen, unreinen Aufreinigung von Plasmid-DNA verwendet werden. Dieses Verfahren wird hauptsächlich eingesetzt, wenn eine große Anzahl von Bakterienkolonien getestet werden muss. Die Aufreinigung kann nur bei Bakterienstämmen verwendet werden, die keine Endonuklease A ( $endA^-$ -Stämme; z.B. XL1Blue) besitzen. Da auf einen Phenolisierungsschritt verzichtet wird, würde die Endonuklease A, die sich durch eine Hitzebehandlung nicht vollständig inaktivieren lässt, in  $endA^+$ -Bakterienstämmen die DNA degradieren.

Von einer Übernachtskultur wurden 1,5 ml Bakterien-Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 sec. in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterien-Pellet in 50  $\mu$ l Lysispuffer durch eine fünfminütige Inkubation im Schüttler bei RT resuspendiert. Durch das Kochen in einem Wasserbad für 30 sec. wurden die Bakterien lysiert. Die Bakterien-Suspension wurde eine Minute lang auf Eis abgekühlt und danach wurden die lysierten Bakterienzellen von der Plasmid-DNA durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 13000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge getrennt. Die Reste der Bakterienzellen, sowie die chromosomale Bakterien-DNA wurden pelletiert, die Plasmid-DNA dagegen befand sich im Überstand, den man in ein neues Reaktionsgefäß überführte. Zwischen 3 und 6  $\mu$ l des Überstandes, je nach Ausbeute, wurden für eine DNA-Testspaltung eingesetzt.

#### **Lysis-Puffer:**

10mM Tris pH 8.0

1mM EDTA

15 % Sucrose

0,4 mg/ml RNaseA

2 mg/ml Lysozym

0,1 mg/ml BSA

#### 3.2.2.1.2 Eckhardt-Lyse (Eckhardt et al., 1978)

Diese Methode eignet sich ebenfalls zur schnellen Analyse einer größeren Anzahl von Klonen, was z.B. nach einer Ligation angebracht sein kann, um den gewünschten Klon zu identifizieren. Bei der Eckhardt-Lyse wird die Plasmid-DNA direkt in einem SDS-Agarosegel präpariert, so dass das Animpfen

einer Übernachtskultur nicht notwendig ist. Die Größe der analysierten Plasmide kann dann nach dem Gellauf mit Hilfe eines Längenstandards ermittelt werden. So können die Klone ausgesucht werden, die das gewünschte Insert tragen.

Ein 0,8 %iges Agarosegel wurde vorbereitet, indem 100 ml TBE Puffer zusammen mit 0,8g Agarose aufgeköcht wurden. Die Agarose ließ man auf ca. 60°C abkühlen, bevor 2 ml einer 10%igen SDS-Lösung hinzugegeben wurden. Die Agarose wurde in einen vorbereiteten Gelträger gegossen.

Für eine ausreichende Menge an Bakterienzellen, wurden die zu testenden Einzelkolonien auf Agar-Platten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Eine gut sichtbare Zellmenge wurde mit einer sterilen gelben Spitze oder einem Zahnstocher entnommen und mit einem Gemisch, bestehend aus 6µl TE-Puffer und 4µl 6x DNA-Probenpuffer, resuspendiert. Nach Zugabe von 20µl Eckhardt-Lysispuffer wurden 25µl in die Taschen des Gels geladen. Nach einem 30-minütigen Vorlauf bei 20 V folgte eine weitere Elektrophorese bei 100 V für zwei Stunden. Zur Entfernung des SDS wurde das Gel für 45 min gewässert, mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert.

#### **Eckhardt-Lysispuffer:**

8 % Sucrose

2 % Ficoll

50mM TrisCl pH8,0

20mM EDTA pH 8,0

2 mg/ml RNaseA

2 mg/ml Lysozym

#### 3.2.2.1.3 Alkalische Lyse

Diese von Birnboim und Doly (1979) vorgestellte Methode eignet sich, im Gegensatz zur Easy Prep, auch für endA<sup>+</sup>-Stämme. Darüber hinaus besitzt die präparierte DNA eine höhere Reinheit und kann somit bei nachfolgenden Versuchen, die einen höheren Reinheitsgrad der DNA erfordern, wie z.B. Spaltungen mit empfindlichen Restriktionsendonukleasen, Ligationen und Elektroporationen eingesetzt werden.

Von einer üN Kultur wurden 5 ml bei *high copy* Vektoren und 8 ml bei *low copy* Vektoren und sehr großen Vektorkonstrukten (über 10 kb) bei 4000 rpm für 5 min. im SS34-Rotor (Sorvall) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl eiskalter Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung 2 wurde das Gefäß 5-9 x invertiert und 5 min. auf Eis gelagert. Danach wurden 300 µl eiskalte Lösung 3 hinzugegeben, nochmals 5-9 x invertiert und 5 min. auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 5 min. bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 600 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die obere wäss-

rige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde die in der Lösung befindliche DNA durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm pelletiert. Die gefällte DNA wurde anschließend mit 500 µl 70%igem, -20°C kaltem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl 10 mM TrisCl pH 8,0 resuspendiert. Zur Restriktionsanalyse wurden 3 µl eingesetzt.

**Lösung 1:**

50 mM Glucose  
20 mM Tris-HCl pH 8,0  
10 mM EDTA pH 8,0

**Lösung 2:**

0,2 N NaOH  
1 % SDS

**Lösung 3:**

3 M Kaliumacetat pH 4,8

3.2.2.1.4 Qiagen/Nucleobond DNA-Präparation

Zur Isolierung hochreiner DNA, wie man sie für Klonierungen, Sequenzierungen und Elektroporationen von Bakterien- und Säuger-Zellen benötigt, wurden Kits von den Firmen Macherey und Nagel (Düren) und Qiagen (Hilden) verwendet. Exemplarisch ist hier nur die Präparation nach dem Protokoll von Macherey und Nagel aufgeführt, da dieses Kit häufiger benutzt wurde und die Aufreinigung mit dem Kit der Firma Qiagen nach demselben Prinzip verläuft.

Die DNA-Präparation ist eine Kombination aus alkalischer Lyse und Säulen-Anionenaustausch-Chromatographie, die anstatt der Phenol-Chloroform-Extraktion angewandt wird. Je nach gewünschter DNA-Menge wurden unterschiedliche Kulturvolumina angeimpft und Säulen mit unterschiedlicher Kapazität eingesetzt.

Säulenbezeichnung (Macherey-Nagel)	Kapazität (µg DNA)
AX 20 (Mini)	20
AX 100 (Midi)	100
AX 500 (Maxi)	500

Präparationsvorschrift für eine Plasmid-Maxi-Präparation (*high copy*).

Die Volumina, die für eine BAC-DNA oder *low copy* Plasmid Aufreinigung eingesetzt werden stehen in Klammern.

150 ml (500 ml) vorgewärmtes LB-Selektionsmedium wurden mit einem Einzelklon angeimpft und 12-16 Stunden üN bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien-Kultur wurde für 10 min. bei 5000 g und 4°C im GSA-Rotor (Sorvall) abzentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Kulturüberstand wurde vollständig abgezogen und das Bakterien-Pellet in 12 ml (24

ml) eiskaltem Puffer S1 resuspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 12 ml (24 ml) Puffer S2 (RT) und 6-8-maligem Invertieren. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT, wurden 12 ml (24 ml) eiskalter Puffer S3 hinzugegeben, erneut 6-8 x invertiert und für 5min. auf Eis gelagert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 40 min. bei 12000 g im GSA-Rotor abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand durch einen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angefeuchteten Faltenfilter filtriert, um noch vorhandene Präzipitatreste zu entfernen. Während der Filtration wurde die Säule mit 6 ml Puffer N2 äquilibriert. Die Säule wurde dann mit dem klaren Bakterien-Lysat beladen und nachdem die Flüssigkeit vollständig durchgelaufen war, 2 x mit je 16 ml (3 x 12 ml) Puffer N3, zur Entfernung von Proteinen und RNA, gewaschen. (Bei der Präparation von BACs und *low copy* Plasmiden wurde das Lysat nach dem Beladen der Säule aufgefangen und ein zweites Mal über die Säule gegeben. Dieser Schritt vergrößerte deutlich die DNA-Ausbeute.) Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 2 x 7 ml Puffer N5 (auf 50°C vorgewärmt) eluiert, dann mit 2 x 5 ml RT-Isopropanol gefällt und für 30 min. bei 15000 g im SS34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet vorsichtig mit 3 ml -20°C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min. bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig abgezogen, das Pellet einige Minuten luftgetrocknet und je nach Pelletgröße in 50-200µl autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Konzentration, Reinheit und Intaktheit der DNA wurden durch UV-Absorptionsspektrometrie und Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

**Puffer S1:**

50 mM Tris-HCl pH8,0  
10 mM EDTA  
100 µg RNase A/ml

**Puffer S2:**

200 mM NaOH  
1 % SDS

**Puffer S3:**

2,80 M Kac pH5,1

**Puffer N2:**

100 mM Tris  
15 % Ethanol  
900 mM KCl pH6,3  
0,15% Triton X-100

**Puffer N3:**

100 mM Tris  
15 % Ethanol  
1150 mM KCl pH6.3

**Puffer N5:**

100 mM Tris  
15 % Ethanol  
1000 mM KCl pH8,5

### 3.2.2.2 Quantifizierung isolierter Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Die DNA-Lösungen wurden 1:100 in 10 mM Tris-Cl pH 8,0 verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem UV-Photometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Die Konzentration der DNA in Lösung wird

wie folgt berechnet: Messwert x Verdünnungsfaktor x 50 (eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg/ml) = DNA-Konzentration (µg/ml). Ebenfalls wurde der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dieser  $OD_{260} / OD_{280}$  - Wert dient zur Bestimmung der Reinheit der untersuchten Nukleinsäure. Bei einem Wert von 1,8 - 2,0 liegt sehr reine DNA vor. Enthält die DNA-Lösung allerdings noch Proteine oder Phenol-Reste, hat der Quotient einen Wert, der niedriger als 1,8 ist.

### 3.2.2.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte bei Fragmenten bis 5 kb mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit oder dem Minelute Kit der Firma Qiagen (Hilden). DNA-Fragmente größer als 5 kb wurden nach einem modifizierten Protokoll von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Wenn DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert werden sollten, wurden diese aus Low Melting Point Agarose hergestellt. Diese Agarose hat den Vorteil, dass sie, wie der Name schon sagt, einen niedrigeren Schmelzpunkt hat und sich die DNA somit leichter aus der Agarose-Matrix herauslösen lässt.

Nach der Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem sauberen Skalpell auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten und das Gewicht des Gelblöckchens bestimmt.

#### 3.2.2.3.1 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit oder Minelute Kit

Maximal 400 mg Agarose wurden durch Zugabe von 3 Vol. Puffer QG und 10-minütiger Inkubation bei 50°C im Thermoschüttler aufgelöst. Die Lösung wurde auf die im Kit enthaltenen Minisäulen pipettiert und die DNA durch Zentrifugieren für 60 sec. bei 13000 rpm und RT an das Säulenmaterial gebunden. Alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden bei 13000 rpm und RT durchgeführt. Wenn das Volumen der DNA-Lösung die Säulenkapazität von 750 µl überschritt, musste dieser Zentrifugationsschritt mehrfach wiederholt werden.

Die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und anschließendes 1-minütiges Zentrifugieren gewaschen. Nachdem der Waschpuffer PE aus dem Sammelgefäß entfernt wurde, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, um Ethanolreste, die bei der Elution der DNA störend wirken würden, zu entfernen. Die DNA wurde dann mit 30 µl auf 50°C vorgewärmten Elutionspuffer (10 mM TrisCl pH 8,0) oder  $H_2O_{bidest}$  eluiert. Der einzige Unterschied des Minelute Kits ist der, dass es möglich ist, die gereinigte DNA in einem Volumen von nur 10 µl zu eluieren.

#### 3.2.2.3.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (modifiziert nach Sambrook et al. 1989)

Das Gewicht des Gelstückes sollte 200 mg nicht überschreiten. Zu dem Agaroseblöckchen wurden 3 Vol. (bei 200 mg = 600 µl) 20 mM TrisCl, 1mM EDTA pH 8,0 hinzugegeben. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei 65°C im Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg), um die Agarose zu schmelzen. Nachdem sich die Lösung auf RT abgekühlt hatte wurde 1 Vol. Phenol dazugegeben und 20 sec.

gevoertext. Die Phasen wurden durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 4000 g und RT getrennt, die obere wässrige Phase abgezogen und mit 1 Vol. Phenol-Chloroform extrahiert. Eine letzte Extraktion erfolgt mit 1 Vol. Chloroform. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Vol. 7,5M Ammonium-Acetat sowie 1 Vol. Isopropanol vermischt und 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung 20 min. bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl -20°C kaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.

Die Konzentration der gereinigten DNA wurde anschließend durch Agarosegel-Elektrophorese mit Hilfe eines Standard-Markers abgeschätzt.

#### 3.2.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die in nachfolgende Reaktionen eingesetzt werden sollten, wie z.B. Klonierungen oder Herstellung radioaktiv und nicht-radioaktiv markierter Sonden, mussten von Salzen, Nukleotiden, Primern und Polymerase gereinigt werden.

Dafür wurde der QiaQuick PCR Purification Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Das Reinigungsverfahren ist fast identisch zu dem bereits beschriebenen Aufreinigungs-Verfahren von DNA aus Agarosegelen (siehe 3.2.2.3). Das PCR-Produkt wurde mit dem fünffachen Vol. Puffer PB gemischt und auf die mitgelieferte Säule gegeben. Wasch- und Elutionsschritte sind bei beiden Verfahren identisch.

### 3.2.3 Elektrophorese von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die wohl häufigste Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren ist die Agarosegel-Elektrophorese, bei der die Nukleinsäuren nach ihren Molekularmassen aufgetrennt werden. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde Seakem Le Agarose (BioWhittaker, Verviers, Belgien) in 1x TBE-Puffer oder 1x TAE-Puffer aufgekocht und in einen Gelträger gegossen. TBE bzw. TAE dienen auch als Laufpuffer. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Vol. 6x Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Agarose-Konzentration des Gels hing von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ab. Agarose-Konzentrationen von 0,8% (für die Auftrennung von genomischen Spaltungen und DNA-Fragmenten über 3kb) bis zu 4% (speziell für die Auftrennung und Dokumentation von Fragmenten unter 200 bp) wurden eingesetzt. Ebenso hing die Größe der benutzten Gelkammern von der Fragmentgröße ab. Fragmente bis zu einer Größe von ca. 5 kb wurden in Minigelen (7x10 cm; Trennstrecke: 6 cm) bei ca. 10V/cm für 30-60min. aufgetrennt. Für die Auftrennung größerer Fragmente wurden große Gelkammern eingesetzt (13x15 cm; Trennstrecke: 12 cm) und die Laufzeit auf 2-5 h bei 5V/cm erhöht. Zur Auftrennung von genomischen Spaltungen und anschließender Southern Blot Hybridisierung wurden Gelkammern eines noch größeren Formates eingesetzt (25x50 cm; Trennstrecke: 42cm). Die Elektrophorese wurde üN bei 2-3V/cm durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA wurden die Gele in einer

Ethidiumbromid-Lösung (TBE oder TAE + 1 µg/ml Ethidiumbromid) für 20-30 min. gefärbt und dokumentiert.

Die folgende Tabelle soll einen Anhaltspunkt geben, welche Agarose-Konzentrationen bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten eingesetzt werden können.

Fragmentgrößen (bp)	Agarose-Konzentration in %
1000-23000	0,6
800-10000	0,8
400-8000	1,0
300-7000	1,2
200-4000	1,5
100-3000	2,0
10-500	4,0

#### 3.2.3.1.1 Low Melting Point Agarose

Eine spezielle Agarose ist die Low Melting Point Agarose (BioWhittaker, Verviers, Belgien), die wie der Name schon sagt einen niedrigeren Schmelzpunkt besitzt und schon bei 65°C anstatt bei 90°C schmilzt. Damit bietet diese Agarose die Möglichkeit der sehr schonenden Gelaufreinigung von großen Fragmenten.

#### 3.2.3.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der herkömmlichen Gelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle bis zu einer Größe von 20 kb auftrennen. Größere Fragmente können nicht mehr aufgetrennt werden, da sie sich in ihrer Wandergeschwindigkeit nicht mehr unterscheiden. Um die Auftrennung großer DNA-Fragmente (10-2000 kb) zu ermöglichen, benutzt man deshalb das von Schwartz und Cantor (1984) entwickelte Verfahren der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Die Richtung des elektrischen Feldes wird relativ zum Gel gesehen in bestimmten Zeitintervallen immer wieder geändert, so dass sich die DNA-Moleküle immer wieder neu ausrichten müssen und so im neu aufgebauten, elektrischen Feld wandern. Die Auftrennung hängt von verschiedenen Parametern wie Spannung, Pulszeit, Temperatur des Gels, Agarose-Konzentration und Puffer ab.

Für die PFGE wurde das Gerät CHEF (Biorad, München) verwendet. Die Bedingungen für die Elektrophorese wurden mit Hilfe des Programms „Chef Mapper“ für eine Auftrennung von 3 kb-250 kb errechnet. Folgende Einstellungen wurden für die Größenbestimmungen der BACs vorgenommen:



Initial switch time: 0,2 sec.

Final switch time: 21,8 sec.

Gradient: 6V/cm

Angle: 120°

Temperatur: 14 °C

Laufzeit: 8,3 h

Das Agarosegel bestand aus 1% FastLane Agarose (Biozym, Hess.-Oldendorf) in 0,5x TBE. Als Laufpuffer diente ebenfalls 0,5x TBE.

### 3.2.3.3 Fotodokumentation

Die mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Agarosegele wurden auf einen UV-Transilluminator (Intas UV-Systeme) gelegt, und das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von 312 nm zur Fluoreszenz angeregt. Die durch die Fluoreszenz sichtbaren DNA-Banden wurden mit Hilfe einer digitalen Kamera (CCDKamera KP-16a, Hitachi) und einem Fotodrucker (Mitsubishi photo printer P500) dokumentiert.

## 3.2.4 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

### 3.2.4.1 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine Methode, bei der DNA-Fragmente, die vorher durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf einer Membran fixiert werden, die später für Hybridisierungen mit markierten Sonden eingesetzt werden kann, um spezifisch bestimmte DNA-Fragmente nachweisen zu können.

Nach der Gelelektrophorese wurde die im Agarosegel enthaltene DNA, je nach Geldicke, durch eine 10 bis 30-minütige Inkubation in 0,25N HCl-Lösung teilweise depurinieren. Das Gel wurde dann kurz in  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen und für 30 min. in 0,5N NaOH und 1,5M NaCl denaturiert. Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (Biodyne B 0,45  $\mu\text{m}$ ; Pall, Portsmouth, England) erfolgte nach dem Kapillarblot-Verfahren nach Sambrook et al. (1989). Der Kapillarblot wurde folgendermaßen aufgebaut:

Eine Schale enthielt den Transferpuffer 20x SSC (3M NaCl; 0,3M NaCitrat; pH7,0). Über die Ränder der Schale wurde eine Glasplatte gelegt, auf der ein Streifen angefeuchtetes 3MM-Whatman-Papier (Schleicher u. Schuell, Dassel) lag, dessen Enden in die Pufferlösung hingen. Das Gel wurde nun umgekehrt auf das Whatman-Papier gelegt und die mit SSC angefeuchtete Membran luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Membran wurden drei Lagen angefeuchtetes 3MM Whatman-Papier und ein ca. 10 cm hoher Stapel saugfähiges Papier geschichtet. Zuoberst befand sich eine Glasplatte, die mit einem Gewicht beschwert war. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte  $\ddot{u}N$ . Nach dem Abbau des Blots

wurde die Membran ca. 10 min. an der Luft getrocknet und für 1 h bei 80°C gebacken, um die DNA kovalent an die Nylonmembran zu binden.

### 3.2.4.2 Kolonietransfer/Koloniehybridisierung

Bei diesem Verfahren werden die Bakterien-Kolonien von einer Agar-Platte direkt auf die Nylonmembran transferiert. Diese Technik wird hauptsächlich angewendet, wenn zu erwarten ist, dass nur wenige Klone das gewünschte Insert tragen. Durch das Herstellen der Kolonie-Filter und eine anschließende Hybridisierung kann eine sehr große Zahl von Bakterien auf das Vorhandensein eines bestimmten DNA-Abschnittes getestet werden.

Die Agar-Platten mit den Bakterien-Kolonien wurden für mindestens 30 min. bei 4°C gelagert. Vorsichtig wurde eine runde Nylon-Membran in der Größe der Platte luftblasenfrei auf die Agar-Oberfläche gelegt. Die Membran blieb für 1 min. auf der Agar-Platte liegen. Inzwischen wurde die Orientierung der Membran zur Platte festgelegt, indem mit einem Skalpell an zwei Stellen jeweils ein Stück aus der Membran und dem Agar herausgeschnitten wurde. Die Membran sowie die Platte müssen exakt markiert werden, um eine eindeutige Identifizierung der positiven Kolonien zu gewährleisten. Die Membran wurde dann mit zwei Pinzetten von der Agar-Platte abgehoben und kurz auf 3MM Whatman-Papier an der Luft getrocknet, wodurch die Bakterien auf dem Filter fixiert wurden. Anschließend wurde der Filter (Kolonieseite nach oben) für 15 min. auf einem mit Denaturierungs-Lösung (0,5N NaOH; 1,5M NaCl) durchtränkten 3 MM Whatman-Papier inkubiert. Dieser Denaturierungsschritt bricht die Bakterienzellen auf, denaturiert die DNA und zerstört die RNA. Nach der Denaturierung wurde die Membran kurz auf 3 MM Whatman-Papier gelegt, um die überschüssige Flüssigkeit abzusaugen und dann für 15 min. auf einem mit Neutralisierungs-Lösung (1,0M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5M NaCl) durchtränkten 3 MM Whatman-Papier inkubiert. Die Membran wurde nochmals kurz auf ein trockenes 3 MM Whatman-Papier gelegt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation auf einem mit 2x SSC (0,3mM NaCl; 30mM NaCitrat, pH 7,0) durchtränkten 3 MM Whatman-Papier. Die Nylonmembran wurde luftgetrocknet und für 60 min. bei 80°C gebacken, wodurch die DNA auf dem Filter fixiert wurde. Zum proteolytischen Abbau der Zellproteine, die noch an der DNA haften und eine Hybridisierung erschweren würden, wurde der Filter mit Proteinase K behandelt. Die Membran wurde auf Alufolie gelegt, mit einer 2 mg/ml Proteinase K Lösung (2 mg/ml Proteinase K in 2x SSC; Sigma, Taufkirchen) vollständig benetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Um Zelltrümmer und Agar-Reste zu entfernen, wurde die Membran zwischen zwei mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> durchtränkte 3MM Whatman-Papiere gelegt und mit einer leeren 1l Duran-Glas-Flasche unter festem Druck über die Membran gerollt. Das Filterpapier wurde 6x gewechselt, so dass ein Großteil der Zelltrümmer und des Agars, die an dem Papier haften blieben entfernt wurden. Nachdem der Filter luftgetrocknet war, konnte er direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden.

## 3.2.5 Hybridisierung

### 3.2.5.1 Radioaktive Hybridisierungen

#### 3.2.5.1.1 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die gewünschte Sonde wurde entweder mittels PCR amplifiziert und das Produkt mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt; oder wenn das als Sonde dienende Fragment in einem Vektor kloniert vorlag, wurde es mit einem geeigneten Restriktionsenzym herausgeschnitten, der Restriktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen, die der Sonde entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem Qiagen Gel Extraction Kit aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde die aufgereinigte Sonde auf einem Testgel analysiert und die Konzentration in ng/ $\mu$ l mit Hilfe eines Standardmarkers abgeschätzt.

50 ng der aufgereinigten DNA wurden zur Herstellung der Sonde verwendet. Die DNA wurde mit  $H_2O_{bidest}$  auf ein Volumen von 42 $\mu$ l aufgefüllt und in ein Reaktionsgefäß aus dem Stratagene Prime-IT RmT Random Primer Labeling Kit (Stratagene, Amsterdam) überführt. In diesem Gefäß befinden sich in dehydrierter Form bereits die Random Primer, die dNTPs und der Reaktionspuffer. Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für 5-10 min. gekocht, um die DNA zu denaturieren. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß kurz auf Eis gekühlt, 5 $\mu$ l radioaktives dCTP (P32; 3000 Ci/mmol; Amersham, Freiburg) und 3 $\mu$ l Magenta Polymerase (Stratagene, Amsterdam) hinzugegeben und durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Die Labeling-Reaktion erfolgte bei 37°C im Wasserbad für 10 min. Es folgte eine Aufreinigung über eine Amersham-Säule (ProbeQuant G-50 Micro Columns; Amersham, Freiburg). Das untere Ende, das die Säule verschließt wurde abgeknickt und die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt. Die Säule wurde bei 2500 rpm in der Biofuge A (Heräus) für 1 min. zentrifugiert und der Durchfluss in dem Eppi aufgefangen. Dann wurde der Labeling-Ansatz mittig auf die Säulenoberfläche langsam aufgetropft und für 2 min. bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einem Schraubdeckel Eppi aufgefangen und erneut für 10 min. gekocht. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis, wurde die Sonde direkt in die Hybridisierungslösung der bereits angesetzten Prehybridisierung gegeben.

#### 3.2.5.1.2 Hybridisierung

Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre (Biometra, Göttingen) platziert und 10 ml Sigma Hyb Plus (Sigma, Taufkirchen) Hybridisierungspuffer, der 1 ml denaturierte Heringssperma DNA (10 mg/ml; für 10 min. kochen) enthielt und auf 60°C vorgewärmt war, hinzugegeben und für mindestens 30 min. bis  $\bar{u}N$  bei 68°C prehybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte  $\bar{u}N$  bei 68°C in einem Hybridisierungssofen.

### 3.2.5.1.3 Entfernen von ungebundener Sonde

Die in der Hybridisierungsröhre befindliche Sonde wurde abgegossen und die zurückgebliebene ungebundene Sonde durch mehrere aufeinander folgende Waschschriffe entfernt.

Die erste Waschlösung setzte sich aus 2x SSC; 0,1% SDS zusammen. Die auf 60°C vorgewärmte Lösung wurde zu der Membran in die Hybridisierungsröhre gegeben und für 20 min. bei 68°C gewaschen. Die Lösung wurde anschließend verworfen und durch eine neue Waschlösung (0,1x SSC; 0,1% SDS; 60°C) ersetzt. Auch dieser Waschschriff dauerte 20 min. Der letzte Waschschriff wurde mit 0,1x SSC und 0,1% SDS in einer Box bei RT für 5-10 min. auf einem Schüttler durchgeführt.

### 3.2.5.1.4 Autoradiographie

Nach den Waschschriffen wurden die Membranen in Frischhaltefolie eingepackt und in eine Expositionskassette mit Verstärkerfolie gelegt. In der Dunkelkammer wurde unter grünem Licht ein Röntgenfilm (XomatAR; Kodak, Rochester NY) aufgelegt und abhängig von der Signalintensität für 30 min. bis mehrere Tage bei -70°C exponiert.

### 3.2.5.1.5 Entfernen gebundener Sonden

Von Membranen, die für eine weitere Hybridisierung eingesetzt werden sollten, musste vor der neuen Hybridisierung die alte gebundene Sonde entfernt werden. Eine 0,1%-ige (w/v) SDS Lösung wurde aufgeköcht und in eine Schale gegossen. Die Membran wurde dann in diese heiße aber nicht mehr köchende Lösung gegeben und geschüttelt, bis die Lösung auf RT abgekühlt war. Die auf dem Filter verbliebene Restaktivität wurde mit einem Handmonitor gemessen. Wenn mehr als 20 Zählheiten pro Sekunde gemessen wurden, dann wurde der Waschvorgang mit frischer SDS Lösung wiederholt.

## 3.2.5.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

### 3.2.5.2.1 *Fiber*-FISH

Die räumliche Nähe von zwei BAC-Klonen kann untersucht werden, indem sie mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gelabelt und in einer *Fiber*-FISH-Hybridisierung eingesetzt werden. Die DNA, die für diese Hybridisierung eingesetzt wird, z.B. aus ES-Zellen, wird mechanisch auf einem Objektträger gestreckt, so dass 400-600 kb lange DNA-Fragmente oder „Fibers“ entstehen. Die Fluoreszenz markierten BACs werden dann auf den Objektträger gegeben. Sie finden in der Hybridisierungsreaktion ihren „Gegenpart“ auf dem genomischen DNA-Strang, binden an ihn und markieren somit die Stelle, wo die BAC-DNA sich innerhalb des Genoms befindet. Wenn zwei BACs sich überlappen oder der Abstand zwischen ihnen nicht größer als 400-600 kb ist, so kann man dies deutlich sehen.

Für die *Fiber*-FISH-Reaktion wurde genomische DNA der ES-Zelllinie C57BL/6x129/SV<sup>JAE</sup> eingesetzt.

Die ES-Zellen wurden 1x in PBS gewaschen, trypsinisiert, abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1x PBS gelöst, so dass 2 Millionen Zellen / 100µl vorlagen. Die Zellsuspension wurde auf 37°C erhitzt. 1.9% Agarose (Seaplaque Low Melt Agarose) in TE Puffer wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf 50°C im Heizblock erhitzt.

Die Agarose und die Zellen wurden 1:1 gemischt und anschließend in Löcher einer Plastikschaablone mit einem maximalen Fassungsvermögen von 100µl pipettiert. Die Blöckchen wurden 30 min. bei 4°C abgekühlt und dann Proteinase K behandelt.

### **Proteinase K Behandlung**

Die Proteinase K Behandlung der Agaroseblöckchen erfolgte in folgendem Reaktionspuffer:

3 ml Proteinase K (Endkonzentration: 2 mg/ml; Sigma)  
6 ml 0,5M EDTA pH8 (Endkonzentration: 100 mM)  
0,3 ml n-Lauroyl-Sarcosine (Endkonzentration: 1%)  
20,7 ml H<sub>2</sub>O bidest  
-----  
30ml total Volumen

Die Agaroseblöckchen wurden in diesen Reaktionspuffer gegeben (maximal 12 Blöckchen in 50 ml) und 48-72h bei 50°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde anschließend für 30 min. bei 4°C gelagert, um die Agarose zu festigen. Danach wurden die Agaroseblöckchen in TE Puffer (pH 7,5) transferiert und für zwei Tage bei RT gewaschen. Während dieser Periode wurde der TE Puffer mehrmals gewechselt. Zur längeren Aufbewahrung (bis zu einem Jahr) wurden die Blöckchen in 50mM EDTA (pH8,0) bei 4°C gelagert.

### **Nick Translation der BAC-DNAs**

BACs wurden, je nach Fragestellung, aufgrund ihrer Lokalisation im Contig ausgewählt und durch eine Maxi-Präparation große Mengen an DNA von ihnen erzeugt. Da die bei der Nick Translation eingesetzte DNase I, vermutlich aufgrund von Sekundärstrukturen, die BAC-DNAs unterschiedlich effizient bzw. schnell schneidet, wurde für jeden BAC eine DNase I Titration durchgeführt. 2 µg der BAC-DNA wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:2000; 1:3000; 1:4000; 1:5000; 1:6000; 1:10.000; 1:15.000) des DNase I Enzyms (10U/µl; Roche, Mannheim) für 60 min. bei 15 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

1 µg DNA  
2,5 µl 10x Nick Translations Puffer  
2,5 µl DNase I (in verschiedenen Verdünnungen)  
mit H<sub>2</sub>O auf 25 µl auffüllen

Nach 60 min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 0,5M EDTA (pH8,0), 2 µl 10% SDS und 10-minütiges Erhitzen auf 68°C gestoppt. Anschließend wurden 5 µl auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen und die durch den DNase I Verdau erzeugten Fragmentgrößen überprüft. DNA-Fragmente zwischen 200 bp und 800 bp besitzen die optimale Größe, um für eine Hybridisierung eingesetzt zu werden. Wenn die DNA-Fragmente deutlich kleiner oder größer sind, wirkt sich das negativ auf die Signalintensität bei der Hybridisierung aus. Nachdem die optimale DNase I Konzentration für jeden BAC individuell ausgetestet wurde, konnte die Nick Translations Reaktion angesetzt werden:

5 µl 10 x Nick Translationspuffer  
0.5 µl 100mM DTT  
5 µl 0,5mM Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP)  
5 µl Biotin dUTP oder Digoxigenin dUTP (Roche, Mannheim)  
5 µl DNase I (10 U/µl) in der ermittelten Konzentration  
2,5 µl Polymerase I (10U/µl; Roche, Mannheim)  
2 µg DNA  
mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 50 µl auffüllen

Die Reaktion wurde 60 min. bei 15°C inkubiert und anschließend mit 5 µl 0,5M EDTA, 2 µl 10% SDS und durch Erhitzen auf 68°C für 10 min. gestoppt. Erneut wurden 5 µl auf ein Testgel aufgetragen und die Produktgrößen überprüft. Für die anschließende Hybridisierung wurden 2 Nick Translations Reaktionen der BACs, die gemeinsam hybridisiert werden sollten, zusammen mit Maus-Cot-1-DNA und Heringssperma DNA (Applichem, Darmstadt), die zur Absättigung repetitiver Sequenzen dienten, präzipitiert. Jeweils 8 µl der Nick Translation, 8 µl Maus-Cot1-DNA und 10 µl Heringssperma DNA wurden mit dem 3-fachen Volumen an Ethanol (102µl) für 30 min. bei -80°C gefällt und danach 30 min. bei 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 15µl deionisiertem Formamid (Promega, Mannheim) aufgenommen und in einem Thermoschüttler für 15 min. bei 42°C resuspendiert. Dann wurden 15 µl Hybridisierungslösung (20% Dextran Sulfat (Sigma, Taufkirchen) in 4x SSC) hinzugefügt und für 15 min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Denaturierung bei 80°C, woran sich das „Preannealing“ bei 37°C für 30-60 min. anschloss. Die Sonde konnte nun direkt auf den vorbereiteten Objektträger pipettiert werden.

### Vorbereitung der Objektträger

Ein Agaroseblöckchen wurde gedrittelt, auf einen Objektträger (Superfrost; Menzel-Gläser, Braunschweig) gelegt und mit 10 µl H<sub>2</sub>O bidest. überschichtet. Der Objektträger wurde auf eine 100°C heiße Heizplatte gelegt und abgewartet, bis das Agaroseblöckchen geschmolzen war. Der Objektträger wurde von der Heizplatte genommen und mit einem zweiten Objektträger wurde die geschmolzene Agarose in einem Winkel von ≤ 45°, unter mittlerem gleichmäßigem Druck, längs über den unteren Objektträger

gezogen. Dies bewirkt, dass die sich in der Agarose befindliche chromosomale DNA auseinandergezogen und zu einzelnen „DNA-Fäden“ auch „Fibers“ genannt gestreckt wird. In der Regel haben diese „DNA-Fäden“ eine Länge von 400-600 kb. Der Objektträger wurde senkrecht stehend für 30-60 min. luftgetrocknet und konnte dann direkt denaturiert werden. Die Denaturierungslösung setzte sich aus 140 µl deionisiertem Formamid, 20 µl 20x SSC und 40 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zusammen. Sie wurde auf den Objektträger pipettiert, ein Deckglas darüber gelegt und das Ganze für 2 min. bei 90°C im Ofen inkubiert. Das Deckglas wurde entfernt, der Objektträger für jeweils 3 min. in 70%, 85% und 100% -20°C kalten Ethanol getaucht und senkrecht stehend luftgetrocknet. Die Sonde wurde auf den Objektträger pipettiert, ein Deckglas möglichst luftblasenfrei darüber gelegt und die Ränder mit Fixogum (Marabu, Tamm) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht oder übers Wochenende bei 37°C in einer feuchten Kammer.

### Abwaschen der ungebundenen Sonde

Das Fixogum und das Deckglas wurden entfernt und der Objektträger erst 3 x 5 min. in 2x SSC (auf 42°C vorgewärmt) und dann 2 x 3 min. in 0,5x SSC (auf 42°C vorgewärmt) gewaschen. Der Objektträger wurde mit 1 ml Blockinglösung (5% BSA; 0,1% Tween20; 4x SSC) überschichtet und 1 h bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken, die bei der nachfolgenden Antikörperreaktion störend wirken können.

### Antikörperreaktion

Der Objektträger wurde kurz in 4x SSC; 0,1% Tween20 getaucht, um die überflüssige Blockinglösung abzuwaschen. Dann wurden nacheinander 3 Antikörper-Layer für Biotin bzw. 2 Antikörper-Layer für Digoxigenin auf den Objektträger gegeben.

	Biotin (Verdünnung)	Digoxigenin (Verdünnung)
1. Antikörper	Fluorescein-Avidin (1:200)	Cy3 Mouse-Anti-Dig (1:200)
2. Antikörper	Biotin-Anti-Avidin (1:200)	Cy3 Rabbit-Anti-Mouse (1:300)
3. Antikörper	Fluorescein-Avidin (1:200)	--

Die Antikörper wurden wie in der Tabelle beschrieben mit 2% BSA; 0,1% Tween20; 4x SSC verdünnt. Der Objektträger wurde jeweils für 30 min. mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach jeder Inkubation folgte ein Waschschriff mit 4x SSC; 0,1% Tween20 (vorgewärmt auf 42°C) für 3 x 5 min. im Dunkeln. Direkt nach dem letzten Waschschriff wurde der Objektträger 1 min. DAPI (Serva, Heidelberg) gefärbt, kurz mit H<sub>2</sub>O gespült und im Dunkeln luftgetrocknet. 2 Tropfen Mounting Medium (Vector Laborato-

ries, Burlingame CA) wurden auf den Objektträger gegeben, ein Deckglas wurde luftblasenfrei aufgelegt und die Hybridisierung wurde unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

### 3.2.6 Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

#### 3.2.6.1 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen des Herstellers Gibco BRL wurden für gezielte Aufspaltungen von DNA-Molekülen eingesetzt. Für optimale Reaktionsbedingungen wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10x Puffer eingesetzt und die empfohlenen Temperaturen eingehalten. Zur Spaltung von 1 µg DNA wurden in der Regel 1-2 U Enzym eingesetzt. Je nach eingesetzter DNA-Menge variierten die Reaktionsvolumina zwischen 20 µl und 200 µl. Dabei musste beachtet werden, dass die eingesetzte Enzymmenge maximal 1/10 des Gesamtvolumens ausmachen durfte. Bei einem höheren Wert könnte der Glycerinanteil, der in der Enzymlösung vorhanden ist, eine Sternaktivität hervorrufen, die bewirkt, dass das Enzym die DNA unspezifisch spaltet. Die Inkubationen erfolgten im Wärmeschrank, Wasserbad oder Thermoschüttler je nach DNA-Menge für mindestens 1 Stunde bis ün.

#### 3.2.6.2 Aufreinigung und Ankonzentrierung von DNA nach enzymatischen Reaktionen

DNA wurde nach enzymatischen Reaktionen, wie z.B. Spaltungen oder Ligationen durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung von Proteinen und Salzen getrennt. Das Volumen der Lösung wurde zunächst mit  $H_2O_{\text{bidest}}$  auf 200µl aufgefüllt und mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Das Gemisch wurde gevortext, 2 min. bei 13000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen. Zu dieser Phase wurde erneut 1 Vol. Chloroform hinzugegeben, gevortext und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und 1/10 Vol. 3M Na-Acetat pH 5,2, sowie 2,5 Vol. 100% -20°C kalter Ethanol hinzugegeben. Die Lösung wurde gemischt und die DNA entweder durch Inkubation ün bei -20°C oder für 20 min. bei -80°C gefällt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min. bei 13000 rpm und RT. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 500 µl -20°C kaltem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem für die folgenden Versuche angemessenen Volumen  $H_2O_{\text{bidest}}$  resuspendiert.

Bei sehr geringen DNA-Mengen ist der Verlust bei der Präzipitation sehr hoch. Deshalb wurde zu DNA-Mengen <300 ng vor der Fällung 1 µg Hefe tRNA hinzugefügt. Diese tRNA fungiert als Carrier, der dazu dient geringe Mengen an DNA möglichst vollständig zu präzipitieren und wirkt nicht störend in nachfolgenden Versuchen, wie z.B. Transformationen.



### 3.2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde Mitte der 80er Jahre entwickelt (Saiki et al. 1985, 1988) und ist eine Methode, um in kurzer Zeit eine milliardenfache Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz zu erzeugen. Für diesen Prozess macht man sich die Hitzestabilität einer aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierten Polymerase (Taq-Polymerase) zu nutze, die sogar noch bei einer Temperatur von 94° C aktiv ist. Folgende Komponenten müssen bei einer PCR-Reaktion vorhanden sein:

1. ein einzelsträngiges DNA-Molekül, das als *template* für die Synthese des komplementären Stranges dient
2. zwei sich entgegengerichtete Oligonukleotide (Primer) von ca. 20 bp Länge, die den zu vervielfältigenden Bereich flankieren
3. eine thermostabile Polymerase

Die PCR verläuft in einer zyklischen Reaktion bestehend aus drei Schritten:

1. Denaturierung (Erzeugung des einzelsträngigen DNA-templates)
2. Annealing (Bindung der Oligonukleotide an den jeweils komplementären DNA-Strang)
3. Elongation (Synthese des komplementären DNA-Stranges ausgehend vom 3`OH-Ende des Primers)

Durch die Wiederholung dieser drei Schritte für 30-35 Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts.

Die Anlagerungstemperatur (Annealing) der Oligonukleotide hängt von ihrer Basenzusammensetzung ab. Die optimale Temperatur eines Primers wurde mit der sogenannten „2+4“- Regel ermittelt, wonach Purine (G/C) mit 4°C und Pyrimidine (A/T) mit 2°C berechnet werden. Die Addition aller Basen sollte einen Wert zwischen 60°C und 72°C ergeben. Die tatsächlich optimale Annealing-Temperatur wurde durch eine Test-PCR im Eppendorf-Mastercycler (FA. Eppendorf, Hamburg) mit Hilfe eines Temperaturgradienten zwischen 50°C und 70°C festgestellt.

In dieser Arbeit wurden je nach Verwendungszweck unterschiedliche thermostabile Polymerasen eingesetzt:

- Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*): wurde für Standard-PCRs bis zu einer Produktgröße von 4 kb verwendet.
- Pwo-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*): wegen der Korrekturlesefähigkeit (3`-5`- Exonukleaseaktivität) wurde die Pwo-Polymerase zur Herstellung von PCR-Fragmenten eingesetzt, bei denen es auf die Genauigkeit der Sequenz ankam.

- Sehr lange PCR-Fragmente (5-15 kb) wurden mit Hilfe des Expand Long Template PCR-Systems (Boehringer, Mannheim), das aus einem Gemisch der beiden Polymerasen besteht, erzeugt.

Die PCR wurde in 0.2 ml oder 0,5 ml Gefäßen oder in 96-Well PCR-Platten durchgeführt, abhängig von der Probenanzahl und des PCR-Maschinen-Typs (TRIO-Thermoblock, FA. Biometra, Göttingen; Progene, FA. Techne; Genius FA. Techne; Eppendorf Mastercycler FA. Eppendorf)

### 3.2.6.3.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR wurde der Qiagen Master Mix (Qiagen, Hilden) benutzt. Dieser Mix enthält bereits den Reaktionspuffer, die dNTPs und das Enzym (2 x Reaktionspuffer, enthält 2,5 U Taq-Polymerase und 400 µM dNTPs). Eine typische PCR-Reaktion setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 1 µl *template*-DNA (1-100 ng)
- 10 µl Master Mix (2 x)
- 0,4 µl Primer A (50 pmol/µl)
- 0,4 µl Primer B (50 pmol/µl)
- 8,2 µl H<sub>2</sub>O
- 
- 20 µl Gesamtvolumen

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne *template*-DNA. Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen in einem „Mastercycler“ der Firma Eppendorf oder in dem „Progene“ oder Genius“ Gerät der Firma Techne durchgeführt:

94°C	5 min.		Denaturierung
94°C	30 sec.	} 35x	Denaturierung
55°C-72°C	30 sec.		Annealing
72°C	30 sec.- 4min.		Elongation
72°C	10 min.		finale Elongation

10 µl der PCR-Reaktionen wurden je nach Fragmentgröße auf einem 1%-igen oder 2%-igen Agarosegel analysiert.

## 3.2.6.3.2 Long-Distance-PCR

Die Amplifikation von langen genomischen DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des Expand Long Template PCR-Systems der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Dieses System benutzt einen Mix aus Taq- und Pwo-Polymerase. Der Unterschied zur Standard-PCR besteht zum einen in der optimalen Elongationstemperatur, die für die Pwo-Polymerase bei 68°C liegt, und zum anderen in einer zunehmenden Elongationszeit, die die Abnahme der Polymeraseaktivität kompensiert. Abhängig von der Produktgröße stehen 3 verschiedene Reaktionspuffer zur Auswahl. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Puffer 1 (10x Reaktionspuffer mit 17,5mM MgCl<sub>2</sub>) benutzt, der eine Amplifikation von Fragmenten bis zu 12 kb erlaubt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

3 µl	<i>template</i> -DNA (100 ng)
7 µl	dNTPs (2,5 mM)
0,5 µl	Primer A (50 pmol/µl)
0,5 µl	Primer B (50 pmol/µl)
5 µl	Puffer 1
1 µl	Polymerase
33 µl	H <sub>2</sub> O
-----	
50 µl	

Das verwendete PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

94°C	2 min.		Denaturierung
94°C	30 sec.	} 5x	Denaturierung
72°C	8 min.		Annealing + Elongation
94°C	30 sec.	} 5x	Denaturierung
70°C	8 min.		Annealing + Elongation
94°C	30 sec.	} 25x	Denaturierung
68°C	8 min.		Annealing + Elongation (10 sec. <i>increment</i> pro Schleife)
68°C	5 min.		finale Elongation

Die kombinierte Annealing- und Elongationszeit war abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über das Verhältnis von Elongationszeit zur Produktgröße.

Elongationszeit (min)	2	4	8	15	20	30
Fragmentlänge (kb)	3	6	10	20	30	40

### 3.2.6.3.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde als Verfahren zum schnellen Auffinden von rekombinanten Klonen nach einer Klonierungsreaktion verwendet. Als *template*-DNA wurde direkt die Bakterien-Kolonie von der Agar-Platte eingesetzt. Bevor die Bakterien zu dem PCR-Mix gegeben wurden, wurde auf einer frischen Agar-Platte nochmals zur Absicherung ein Ausstrich gemacht. Die Bakterien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in einen 20 µl PCR-Ansatz gegeben und die PCR wie oben beschrieben, durchgeführt.

### 3.2.6.3.4 PCR-Screening der BAC-Bibliothek

Die BAC-Bibliothek (Genome Systems, Missouri) wurde durch einen partiellen *HindIII* Verdau von genomischer DNA des Mausstammes 129/J und anschließender Klonierung der Fragmente in den pBeloBAC11Vektor hergestellt. Die Konstrukte mit Insertgrößen von 50-240 kb wurden in den *E.coli* Stamm DH10B elektroporiert. Die BAC-Bibliothek umfasst 240 Mikrotiterplatten, die zur Vereinfachung des *screenings* zu 24 *upper pools* zusammengefaßt wurden. Wird ein positives PCR-Signal in einem *upper pool* erhalten, so folgt das *Screening* der *plate pools*, bei dem die genaue Plattennummer ermittelt wird. In einem letzten *Screening* werden die Koordinaten des positiven BAC-Klons bestimmt. Die Koordinate setzt sich aus einer Zahl zwischen 1 und 24 (Spalte) sowie einem Buchstaben von A bis P (Zeile) zusammen. Die positiven Klone wurden anschließend bei Genome Systems bestellt.

## 3.2.6.4 Klonierungen

### 3.2.6.4.1 Klonierung von PCR-Produkten

#### **TOPO TA Cloning Kit**

Das TOPO TA Cloning System (Invitrogen; Groningen) basiert auf der terminalen Transferaseaktivität der Taq-Polymerase. Ein Deoxyadenosin (A) wird unabhängig von der *template*-DNA an das 3'Ende des PCR-Produktes gehängt. Der in dem Kit mitgelieferte Vektor besitzt an den 3'Enden jeweils einen überhängenden Deoxythymidin (T) Rest, was dazu führt, dass PCR-Produkte mit einem A-Überhang effizient in den Vektor ligieren können. Zusätzlich sind an die Enden des linearisierten Vektors aktivier-

te Topoisomerasen kovalent gebunden, was die Ligationseffizienz erhöht und die Ligationszeit beträchtlich verkürzt.

Ein Ligationsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

0,5-4 µl	PCR-Produkt
1 µl	PCR II TOPO oder PCR 2.1 TOPO Vektor
1 µl	Salz Lösung (1,2M NaCl; 0,06M MgCl <sub>2</sub> )

Die Reaktion wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest. auf 6 µl aufgefüllt und für 5 - 30 min. bei RT (ca. 25°C) inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des Reaktionsansatzes zu den mitgelieferten chemokompetenten Zellen (TOP10F') gegeben und der Ansatz wurde für 30 min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sec., ohne die Reaktion dabei zu schütteln. Das Reaktionsgefäß wurde für ca. 2 min. auf Eis gelagert, bevor 250 µl auf RT erwärmtes SOC Medium (2% Tryptone; 0,5% Yeast Extract; 10mM NaCl; 2,5mM KCL; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub>; 20mM Glucose) hinzu gegeben wurden. Die Zellen wurden für 1h im 37°C Schüttler inkubiert und anschließend auf Agar-Platten ausgestrichen. Die Agar-Platten enthielten je nach Resistenz des Vektors das passende Antibiotikum.

#### **pGEM-T Easy PCR-Klonierungen**

Dieses PCR-Klonierungssystem (Promega, Mannheim) basiert ebenfalls auf der terminalen Transferaseaktivität der Taq-Polymerase. Die Ligationsreaktion setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

5 µl	2x Rapid Ligation Buffer
1 µl	pGEM-T Easy-Vektor (50 ng)
3 µl	PCR-Produkt
1 µl	T4 DNA Ligase (3 U/µl)
----	
10 µl	

Die Reaktion wurde gemischt, 1h bei RT inkubiert und durch eine Hitzeschocktransformation in Top10F' Zellen eingebracht.

#### **3.2.6.4.2 Klonierungen von Restriktionsfragmenten**

In einer Klonierung wurde eine Insert-DNA (meist ein genomisches DNA-Fragment oder ein Gen) in einen Plasmid-Vektor ligiert. Wenn der Vektor, in den das Insert ligiert werden soll, nur mit einem Restriktionsfragment geöffnet wird, können bei der nachfolgenden Ligationsreaktion Vektorreliquanten entstehen, die die Suche nach dem gewünschten Ligationsprodukt enorm erschweren können. Vektorre-

ligationen können verringert und damit die Ligationseffizienz erhöht werden, indem der Vektor nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert wird.

### **Dephosphorylierung des Vektors**

Die alkalische Phosphatase (Amersham Pharmacia; Freiburg) ist in allen gängigen Reaktionspuffern aktiv, so dass die Dephosphorylierung zusammen mit der Restriktion erfolgen konnte. Die Vektor-DNA wurde mit dem gewählten Restriktionsenzym gespalten. Nach einer Zeitspanne von mindestens einer Stunde wurde die alkalische Phosphatase (shrimp alkaline Phosphatase; 1 µl Phosphatase wurden für bis zu 5 µg Vektor-DNA eingesetzt) hinzu gegeben und der Reaktionsansatz üN bei 37°C inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und das linearisierte Fragment ausgeschnitten und mit dem Qiagen Gel Extraction Kit aufgereinigt.

### **Restriktion und Aufreinigung des Inserts**

Das zu ligierende DNA-Fragment wurde wie bereits in 3.2.6.1 beschrieben gespalten und anschließend durch eine Gelextraktion oder eine Phenolisierung, gefolgt von einer Fällung, aufgereinigt.

### **Ligation**

Aufgereinigte Vektor- und Insert-DNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl üN bei 16°C in einem Wasserbad mit 1 µl T4-DNA-Ligase (1 Weiss Unit/µl; Life Technologies, Eggenstein) und 4 µl 5x Reaktionspuffer (250mM Tris-Cl pH 7,6; 50mM MgCl<sub>2</sub>; 5mM ATP; 5mM DTT) miteinander ligiert, d.h. kovalent verknüpft. Die Menge an eingesetzter Vektor- und Insert-DNA war variabel. Wenn Vektor- und Insert-DNA annähernd dieselbe Größe hatten, so wurde ein Vektor:Insert Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Bei sehr großen Inserts (10 kb und größer) wurde das Insert dagegen in einem bis zu 100-fachen Überschuss dazugegeben. Nach der Reaktion wurde das Ligationsprodukt entsalzt, in 5-10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und für eine Transformation eingesetzt.

### **3.2.6.5 Oligohybridisierung für loxP-Elemente**

Es sollte ein loxP-Element flankiert von zwei *Bam*HI Schnittstellen erzeugt werden, um eine TKNeo-loxP-Resistenzkassette zu erzeugen. Dazu wurden zwei Oligonukleotide mit der loxP-Sequenz bestellt, die komplementär zueinander waren und durch eine Hybridisierung *Bam*HI Schnittstellen an den Enden entstehen ließen. Die Oligos wurden auf eine Konzentration von 1 pmol/µl verdünnt. 2 µl des jeweiligen Oligos wurden dann in einer Kinasereaktion phosphoryliert.

Kinasereaktion:

2 µl	Forward Reaction Buffer (5x; Gibco BRL)
1 µl	ATP (10mM)
1 µl	T4 Polynukleotidkinase (10U/µl; Gibco BRL)
2 µl	Oligonukleotid a oder b (1 pmol/µl)
5 µl	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion wurde für 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide vermischt, in einem Wasserbad auf 95°C erhitzt und in diesem Wasserbad auf 37°C abgekühlt. Es war wichtig darauf zu achten, dass die Temperatur des Wasserbades für mindestens 15 min. über 72°C lag, damit die Kinase inaktiviert wurde. Nach dem Abkühlen auf 37°C wurde der Reaktionsansatz im 37°C Inkubator nochmals für 15 min. inkubiert. Danach konnten die hybridisierten Oligos direkt für eine Ligation in den pBS-Vektor eingesetzt werden.

Es wurden ca. 70 ng *Bam*HI geöffneter und dephosphorylierter pBS-Vektor und 1,5 µl des Oligogemisches in der Ligationsreaktion eingesetzt.

#### Ligationsreaktion

Ca. 70 ng	geöffneter, dephosphoylierter Vektor
1,5 µl	Oligogemisch
1 µl	ATP (10mM)
1 µl	T4 DNA Ligase (1 U/µl; Gibco BRL)
2 µl	Ligationspuffer (10x; Gibco BRL)
x µl	H <sub>2</sub> O

-----

20 µl

Die Reaktion wurde üN bei 16°C inkubiert.

#### 3.2.6.6 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden entweder beim IIT-Sequenzierservice der Universität Bielefeld oder bei den Firmen MWG (Ebersberg) und GATC (Konstanz) in Auftrag gegeben. Die Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruch-Methode mit Didesoxynukleotiden oder fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden durchgeführt und die Sequenzen an ABI-oder Li-Cor-Sequenzierautomaten gelesen. Die durchschnittliche Leseweite betrug 600 bp.

### 3.2.7 Zellkulturmethoden

#### 3.2.7.1 Calciumphosphat-Transfektion

Die Calciumphosphat-Transfektion ist neben der Elektroporation eine Möglichkeit, um z.B. Plasmid-DNA in tierische Zellen einzubringen. Drei Stunden vor der Transfektion wurde frisches Medium zu den Zellen hinzugegeben. Für jede Transfektion wurde die zu transfizierende DNA (5 µg) mit 37 µl 2M CaCl<sub>2</sub> vermischt, und mit H<sub>2</sub>O *bidest* auf ein Endvolumen von 300 µl aufgefüllt. Weiterhin wurde für jede Transfektionsreaktion ein Eppi mit 300 µl HBS-Puffer vorbereitet. Das Reaktionsgefäß mit dem HBS-Puffer wurde unter einer Sterilbank sanft gevortext, während gleichzeitig die DNA-Lösung tropfenweise hinzu gegeben wurde. Das Gemisch wurde für 30 min. bei RT inkubiert, nochmals gevortext und dann tropfenweise zu den Zellen in der Zellkulturschale gegeben. Das DNA-Präzipitat wurde durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt und die so behandelten Zellen wurden zurück in den 37°C Inkubator gestellt.

#### 3.2.7.2 Herstellung von primären embryonalen Fibroblasten (Feeder-Zellen)

Zur Herstellung von Neomycin sensitiven primären Fibroblasten wurden CD1- oder NMRI-Mausembryonen (13,5 Tage) verwendet. Der Uterus wurde mitsamt den Embryonen der schwangeren Maus entnommen und in PBS gewaschen. Die Embryonen befinden sich in dem Uterus wie an einer Perlenschnur aufgereiht. Es wurde jeweils ein Embryo vom Uterus abgetrennt, die Uteruswand mit zwei Pinzetten aufgerissen und der Embryo herausgeholt. Die „roten“ Organe (Herz, Lunge, Leber) wurden dann entfernt und der Embryo wurde in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß, in dem sich 1 ml Feeder-Medium befand transferiert. Mit einer sterilen Schere wurde der Embryo zerkleinert. Anschließend wurde der Zellbrei mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein engmaschiges Embryonensieb (Falcon) in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Feeder-Medium gedrückt. Dieser Vorgang wurde 5-7 x wiederholt. Anschließend wurden die Zellen eines Embryos auf eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete 150 mm Schale ausgesät und  $\bar{u}N$  im Inkubator bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und erneut auf eine mit 0,2 % Gelatine beschichtete 150 mm Schale ausgesät. Wenn nach 2-3 Tagen die Schale konfluent war, wurden die Fibroblasten trypsinisiert und auf 5 neue 150 mm Zellkulturschalen verteilt. Nachdem diese Schalen konfluent waren, wurden die Zellen eingefroren oder weiter expandiert, um genügend Feeder-Material für die folgenden ES-Zellexperimente zu haben. Die Feeder können 5 x gesplittet werden, bevor sie endgültig für die ES-Zellkulturexperimente eingesetzt werden. Für die ES-Zellkulturexperimente müssen die Feeder-Zellen erst teilungsunfähig gemacht werden, damit sie die ES-Zellen nicht überwuchern. Dies kann durch Bestrahlung der Zellen mit  $\gamma$  Strahlen erfolgen oder durch eine Behandlung mit Mitomycin (siehe unten).



### 3.2.7.2.1 Auftauen von Feeder-Zellen

Das Kryoröhrchen, in dem die Feeder-Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, wurde möglichst schnell bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein erbsengroßer Eisklumpen übrig war. Die Zell-Suspension wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen transferiert und tropfenweise 9 ml Feeder-Medium unter leichtem Schwenken des Röhrchens hinzugegeben. Die Zell-Suspension wurde für 2 min. bei RT und 1100 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810) zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 4 ml Feeder-Medium durch mehrfaches Pipettieren sorgfältig resuspendiert. In 4 x 150 mm Zellkultur-Platten wurden jeweils 14 ml Feeder-Medium vorgelegt, die Feeder-Zellen anschließend auf diesen Platten ausgesät und das Feeder-Medium jeden zweiten Tag gewechselt, bis die Zellen konfluent den Boden der Zellkulturschale bedeckten. Um die Zellen zu weiterem Wachstum anzuregen, wurden sie dann auf mehrere Platten verteilt.

### 3.2.7.2.2 Passagieren von Zellen (Splitten der Feeder-Zellen)

Das Medium wurde von einer 150 mm Zellkulturschale abgesaugt, die Feeder-Zellen 1 x mit 15 ml PBS gewaschen (um Trypsininhibitoren zu entfernen und Ca<sup>2+</sup>-abhängige Zelladhäsion zu destabilisieren) und anschließend 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (PAA, Linz), die auf 37°C vorgewärmt war, zugegeben. Während einer 5- 10-minütigen Inkubation bei 37°C, wurde das Ablösen der Zellen immer wieder unter dem Stereomikroskop kontrolliert. Nachdem sich nahezu alle Zellen abgelöst und eine rundliche Form bekommen hatten, wurden 7 ml Feeder-Medium dazu pipettiert und die Oberfläche der Schale mehrmals abgespült. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen transferiert und für 2 min. bei RT und 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wieder in Feeder-Medium resuspendiert und auf 4 x 150 mm Schalen ausgesät.

### 3.2.7.2.3 Kryokonservierung von Feeder-Zellen

Das Medium wurde von den Feeder-Zellen (auf 1 x 150 mm Schale) abgesaugt, diese mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA behandelt. Nach dem Inhibieren des Trypsins durch Zugabe von Medium und einem Zentrifugationsschritt, wurden die Feeder-Zellen in 0,5 ml eiskaltem Einfriermedium A (60% FCS in Feeder-Medium) resuspendiert. Dann wurden tropfenweise, unter Schwenken, 0,5 ml Einfriermedium B (20% DMSO in Feeder-Medium) hinzu gegeben und die Zellsuspension in auf -20°C vorgekühlte Kryoröhrchen gefüllt. Die Röhrchen wurden für eine Stunde bei -20°C eingefroren und dann üN bei -70°C gelagert. Nach einem Tag wurden die eingefrorenen Zellen dann in einem Stickstoff Tank, zur langfristigen Lagerung, untergebracht.

### 3.2.7.2.4 Behandlung der Feeder-Zellen mit Mitomycin C (Unterdrückung der Teilungsfähigkeit)

Das Volumen des Mediums einer 150 mm Zellkulturschale wurde von 15 auf 10 ml verringert und 100µl Mitomycin C Lösung hinzu gegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium verworfen, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und entweder direkt auf kleinere Schalen aufge-

teilt oder mit frischem Medium überschichtet. Mitomycin behandelte Feeder-Zellen können über einen Zeitraum von 2 Wochen benutzt werden. In dieser Zeit sollte das Medium jeden dritten Tag gewechselt werden.

#### 3.2.7.2.5 Bestrahlung der Feeder-Zellen

Fibroblasten-Zellen wurden bestrahlt, damit sie ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Diese teilungsunfähigen Fibroblasten wurden nachfolgend in ES-Zellkulturexperimenten eingesetzt, um die ES-Zellen vor allem mit LIF (Leukemia Inhibitory Factor) zu versorgen. Diese Substanz hält die ES-Zellen in einem undifferenzierten Zustand. Feeder-Zellen wurden ausgesät und expandiert, bis ca. 40 x 150 mm Platten konfluent waren. Dann wurden die Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und in 8 ml Feeder-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden mit  $\gamma$  Strahlen bestrahlt. Die Geräteeinstellung der Strahlenquelle (Radiologie; Franziskus Hospital, Bielefeld) waren wie folgt:

15 mA

250 kV

Th II Filter

25 cre = 2500 rad

17 min. 30 sec. Bestrahlungsdauer

Nachdem die Zeit abgelaufen war, wurde das Behältnis, in welches das Röhrchen mit den Zellen gestellt wurde gedreht, so dass die Rückseite ebenfalls 17 min. 30 sec. bestrahlt wurde. Die Feeder-Zellen wurden anschließend portioniert und eingefroren. Die so behandelten Feeder-Zellen können direkt für ES-Zellkulturexperimente eingesetzt werden.

### 3.2.7.3 ES-Zellen

#### 3.2.7.3.1 Auftauen von ES-Zellen

Das Auftauen von ES-Zellen war dem Auftauen von Feeder-Zellen sehr ähnlich. Unterschiede zu dem bereits oben beschriebenen Verfahren waren, dass anstatt Feeder-Medium ES-Zellmedium verwendet wurde. Außerdem erfolgte die Zentrifugation von ES-Zellen immer bei 900 rpm und RT für 2 min. Die ES-Zellsuspension wurde anschließend auf einer 60 mm Zellkulturschale, auf der sich bereits eine konfluente Feeder-Schicht (Mitomycin C behandelt) befand, ausgesät. Das Medium wurde bei ES-Zellkulturen täglich gewechselt. Nach 1-2 Tagen wurden die ES-Zellen trypsinisiert und auf eine 100 mm Zellkulturschale neu ausgesät. Nach weiteren 1-2 Tagen konnten die ES-Zellen zur Elektroporation eingesetzt werden.

### 3.2.7.3.2 Linearisierung des Targetingvektors

90 µg Targetingvektor-DNA wurden üN mit dem entsprechenden Enzym verdaut. Die Reinigung der DNA erfolgte über eine Phenol/Chloroform- und eine Chloroform-Extraktion. Nach der Fällung der DNA mit 3M NaAcetat und 2,5 Vol. 100%igem Ethanol und 3 Waschschritten mit 70%-igem Ethanol wurde die DNA unter der Sterilbank luftgetrocknet und in 60 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde auf einem Agarosegel abgeschätzt. Optimal war eine DNA-Konzentration von 1 µg/µl.

### 3.2.7.3.3 Elektroporation der ES-Zellen

Die Einstellungen der Elektroporationsanlage (Biorad, München) waren wie folgt:

Kapazität: 500µF; Spannung: 230V

Eine mit ES-Zellen dicht bewachsene (aber nicht konfluente) 100 mm Schale wurde wie bereits oben beschrieben mit Trypsin behandelt. Dabei war besonders darauf zu achten, dass die ES-Zellen anschließend vereinzelt vorlagen. Das Zellpellet wurde dann in 10 ml ES-Zellmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Es wurden 2 x 16 Felder ausgezählt, die Zellzahlen addiert und der Mittelwert gebildet. Der resultierende Wert wurde mit  $10^4$  multipliziert, um die Zellzahl in 1 ml zu ermitteln. Diese Zahl wurde mit 10 multipliziert, um die Gesamtzahl der Zellen zu errechnen. Die Elektroporation wurde mit  $1,2 \times 10^7$  Zellen durchgeführt. Das entsprechende Volumen wurde aus den 10 ml ES-Zellsuspension entnommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 800 µl PBS resuspendiert und 20 µg linearisierter Targetingvektor dazugegeben. Das Zell-DNA-Gemisch wurde in eine 4 mm Elektroporationsküvette (Biorad) transferiert und elektroporiert. Die ES-Zelllösung wurde danach in 200 µl Aliquots auf 4 x 100 mm Feeder-Platten (Mitomycin C behandelt) pipettiert und bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde täglich gewechselt.

### 3.2.7.3.4 Selektion auf G418 resistente Klone

Die Selektion auf das Vorhandensein des Neomycin-Gens mit G418 setzte erst am zweiten Tag nach der Elektroporation ein, um den ES-Zellen Zeit zum Regenerieren und zur Expression der Neomycin-Kassette zu geben. Es wurden täglich 40 µl G418 (Endkonzentration= 400µg/ml; Sigma, Taufkirchen) zu 10 ml ES-Zellmedium gegeben. Nach 4-5 Tagen waren die ersten resistenten Kolonien zu sehen und nach insgesamt 7-8 Tagen nach der Elektroporation wurden die Klone gepickt.

### 3.2.7.3.5 Selektion auf Puromycin resistente Klone

Der Verlauf des Experiments musste geringfügig verändert werden, wenn der Targetingvektor eine Puromycin-Resistenz-Kassette enthielt, da die Feeder-Zellen nicht Puromycin resistent waren. In diesem Fall wurden die ES-Zellen nach der Elektroporation auf Feeder-Matrix-Platten ausgesät. Diese Feeder-Matrix wurde wie folgt hergestellt: 4 x 100 mm Schalen wurden mit 10 ml einer 1%-igen Gelatine-Lösung überschichtet. Die Gelatine wurde nach 10 min. wieder abgesaugt und der Flüssigkeitsfilm, der

noch an der Oberfläche haftete, wurde unter der Sterilbank für 30-60 min. luftgetrocknet. Feeder-Zellen, die nicht mit Mitomycin C behandelt waren, wurden auf diesen gelatinisierten Platten ausgesät. Nach etwa 3 Tagen wurden die Feeder-Zellen durch Zugabe von Trypsin von der Platte gelöst, die Platte 1 x mit PBS gewaschen und 10 ml ES-Zellmedium hinzu gegeben. Auf der Oberfläche befand sich nun die Feeder-Matrix, bestehend aus den Substanzen, die die Feeder-Zellen während ihres Stoffwechsels nach außen abgeben und die den ES-Zellen optimale Wachstumsbedingungen liefern. Die so erzeugten Feeder-Matrix-Platten konnte direkt eingesetzt werden, um elektroporierte ES-Zellen auszusäen. Die Elektroporation erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema. Die Selektion auf das Puromycin-Gen setzte ebenfalls erst am zweiten Tag nach der Elektroporation ein. Allerdings ist zu beachten, dass zusätzlich zu dem Antibiotikum (Endkonzentration: 1,5 µg/ml) täglich noch 10 µl LIF (leukaemia inhibitory factor, Chemicon, Hofheim) / 100 mm Zellkulturschale zugesetzt werden mussten, um eine frühzeitige Differenzierung der ES-Zellen zu verhindern. 5-7 Tage nach der Elektroporation konnten die resistenten Klone gepickt werden.

#### 3.2.7.3.6 Picken der resistenten Klone

Nach dem Waschen der Zellkulturschale mit 1 x 10 ml PBS, wurden 12 ml PBS in die Schale pipettiert und die ES-Zellklone mit Hilfe eines Mikroskops gepickt. Dazu wurde eine 20 µl Pipette auf ein Volumen von 15 µl eingestellt, und ein geeigneter ES-Zellklon unter dem Mikroskop gesucht. Der Klon sollte eine runde, fast kugelige Form aufweisen und relativ hell und durchscheinend wirken. Klone, die einen unregelmäßigen Rand besaßen und eher dunkel, flach und „pfannkuchenartig“ erschienen, wurden nicht ausgewählt, da diese Merkmale Anzeichen für eine beginnende Differenzierung waren. Die Kolonie wurde gepickt, indem sie mit der Pipettenspitze seitlich leicht angekratzt und anschließend zusammen mit den 15 µl PBS in die gelbe Spitze gesaugt wurde. Die Kolonie wurde in eine Vertiefung einer 96Well Platte transferiert und die nächste Kolonie gepickt. Nachdem eine 96Well Platte komplett gefüllt war, wurde mit einer Achtkanalpipette zu jedem Klon 25 µl Trypsin dazu gegeben und die Kolonie durch gründliches Pipettieren in Einzelzellen aufgelöst. Anschließend wurden die ES-Zellen auf eine zweite 96Well Platte, auf der bereits Feeder-Zellen ausgesät waren, umgesetzt. Das Antibiotikum (G418) enthaltende ES-Zellmedium wurde täglich gewechselt. Im Fall der Puromycin-Selektion wurde aufgrund der nicht resistenten Feeder-Zellen auf eine weitere Zugabe von Antibiotikum verzichtet. Als die Zellen das Well nahezu konfluent bedeckten, wurden sie auf 2x 96Well Platten verteilt, von denen eine (=DNA-Platte) mit Gelatine beschichtet war und zur Herstellung von DNA und die andere (=Master-Platte) zur Aufbewahrung der ES-Zellklone für spätere Anwendungen diente.

#### 3.2.7.3.7 Beschichtung von 96Well Platten mit Gelatine

In jede Vertiefung der 96Well Platte wurden 150 µl einer 1%-igen Gelatine Lösung pipettiert. Nach 10 min. bei RT wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt und die Platten unter der Sterilbank für 30-60 min. getrocknet. Auf die gelatinisierten 96Well Platten wurden anschließend Feeder-Zellen ausgesät (Die

Feeder-Zellen einer konfluent bewachsenen 150 mm Zellkulturschale wurden auf 4 x 96Well- Platten verteilt).

#### 3.2.7.3.8 Splitten der 96Well Platten

Die Aufteilung der Zellen von einer auf zwei 96Well Platten wurde wie folgt durchgeführt: zuerst wurden die Zellen mit 100 µl PBS/Well gewaschen dann wurden in jedes Well 25 µl Trypsin gegeben und die Platten für 5-10 min. bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl ES-Zellmedium/Well wurden die ES-Zellklone durch Pipettieren gründlich vereinzelt. Je 25 µl Zell-Suspension wurden auf die DNA-Platte und die Master-Platte verteilt. Die Zellen auf der DNA-Platte wurden ca. 1 Woche bei 37°C inkubiert, bis sie den gesamten Boden des Wells bedeckten. Die DNA der Zellen wurde anschließend präpariert und für eine Southern Blot Analyse eingesetzt. Die Master-Platte wurde dagegen nur 2-3 weitere Tage inkubiert und danach eingefroren.

#### 3.2.7.3.9 Einfrieren von ES-Zellen in 96Well Platten

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. 25 µl Trypsin wurden in jedes Well gegeben und die Platte für 5-10 min. bei 37°C inkubiert. Die Zellklone wurden durch Pipettieren vereinzelt und die Platte ca. 2 min. auf Eis gekühlt. In jedes Well wurden 75 µl Einfriermedium (12,5% DMSO; 62,5% FCS in Feeder-Medium) gegeben. Die Platte wurde mit Parafilm abgedichtet, in mehrere Lagen Zellstoff eingewickelt, 10 min. bei -20°C und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 3.2.7.3.10 Präparation genomischer DNA in 96Well Platten

Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen, bevor 50 µl Lysispuffer (10mM Tris, pH7,5; 10mM EDTA, pH8,0; 10mM NaCl; 0,5% N-Lauroylsarcosine; 1 mg/ml Proteinase K) in jedes Well gegeben wurden. Die 96er Platte wurde mit Parafilm abgedichtet und üN bei 60°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden 100 µl eiskalter Ethanol-Mix (1,5 µl 5M NaCl/100 µl eiskalter Ethanol) pro Well hinzugegeben und die Platte für 30 min. bei RT inkubiert. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810), wurde der Überstand durch vorsichtiges Invertieren der Platte verworfen. Es folgte ein Waschschrift mit 100 µl 70% Ethanol (-20°C). Die Platte wurde für 5 min. bei 4000 rpm zentrifugiert, der Ethanol abgegossen und die DNA für 10-30 min. luftgetrocknet. Die DNA wurde entweder direkt für einen Restriktionsverdau mit anschließender Southern Blot Analyse eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

#### 3.2.7.3.11 Restriktionsverdau

3,5 µl 10x Restriktionspuffer, 10-15 U Restriktionsenzym und 50 µg/ml RNaseA wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 35 µl aufgefüllt und zu der DNA in der Platte gegeben. Die Platte wurde mit Parafilm abgedichtet und in einer feuchten Kammer bei der für das Restriktionsenzym optimalen Arbeitstemperatur üN inkubiert.

### 3.2.7.3.12 Southern Blot und Hybridisierung

Nach der Spaltung wurden 4 µl Probenpuffer in jedes Well gegeben und ca. 30 µl dieses Gemisches wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Je nach Fragmentgröße erfolgte der Gellauf für 10-14h bei 2-3 V/cm. Das Gel wurde anschließend gefärbt, dokumentiert und wie bereits unter Punkt 3.2.4.1 beschrieben geblottet. Die Membranen wurden in einer nachfolgenden Hybridisierungsreaktion eingesetzt (siehe 3.2.5).

### 3.2.7.3.13 Auftauen von Einzelklonen in 96Well Platten

Wenn nach dem Entwickeln der exponierten Röntgenfilme ein Signal entstand, das auf eine korrekte Integration des Targetingvektors hinwies, so wurde die Lokalisation des entsprechenden ES-Zellklons auf der 96Well Platte ermittelt und dieser aufgetaut. Dafür wurde ES-Zellmedium auf 37°C angewärmt und 100 µl in das entsprechende Well pipettiert. Die 100 µl wurden dann sofort wieder entnommen und in ein mit 5 ml ES-Zellmedium befülltes 15 ml Plastikröhrchen transferiert. Dieser Vorgang wurde 5-7x wiederholt, bis der Inhalt des Wells vollständig aufgetaut und in das 15 ml Reaktionsgefäß überführt war. Die Zellen wurden für 3 min. bei 1800 rpm pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die ES-Zellen in eine Vertiefung einer 24Well Platte, auf die vorher Feeder-Zellen ausgesät wurden, transferiert und bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und ca. jeden zweiten Tag (je nach Dichte und Wachstum der Klone) wurden die ES-Zellen trypsinisiert und auf eine größere Schale ausplattiert. Die Zellen wurden so lange expandiert, bis 5 x 100 mm Schalen des Zellklons vorlagen. Die Zellen wurden geerntet und bis zu ihrem Einsatz für weitere Experimente in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.2.7.3.14 DNA aus ES-Zellen

Um zu überprüfen, ob der korrekte Zellklon aufgetaut wurde, wurden Zellen auf eine weitere 100 mm Schale (ohne Feeder-Zellen) ausgesät und inkubiert, bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Das Medium wurde von der Schale abgesaugt, die Zellen 1 x mit PBS gewaschen, trypsinisiert, abzentrifugiert und in 5 ml Lysispuffer (10mM Tris, pH7,5; 10mM EDTA, pH8,0; 10mM NaCl; 0,5% N-Lauroylsarcosine; 1 mg/ml Proteinase K) vorsichtig aufgenommen. Die Zellsuspension wurde üN bei 60°C inkubiert. Es folgte eine zweifache Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol- (25:24:1) und eine Chloroform-Extraktion. Das 2,5 fache Volumen an eiskaltem Ethanol wurde zugegeben und die Lösung 10-15 x invertiert. Wenn genügend ungescherte DNA vorlag, so fiel sie in Fäden aus. Diese DNA-Fäden konnten mit einem gebogenen Glasstäbchen aus der Lösung „gefischt“ werden. Die DNA wurde an dem Stäbchen haftend für ca. 10 min. luftgetrocknet und anschließend in TE aufgenommen. Für den Fall, dass noch RNA Reste vorhanden waren, wurde der Lösung RNase A (5 µl 20mg/ml für 500 µl DNA-Lösung) zugesetzt. Die DNA wurde anschließend für eine Testspaltung eingesetzt, die dann elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit der Sonde hybridisiert wurde, die die Integration des Targetingkonstruktes spezifisch anzeigte.

### 3.2.7.3.15 Bestrahlung von ES-Zellen mit integriertem TKNeo-Konstrukt

Nachdem die korrekte Integration des Targetingvektors in einem Zellklon nachgewiesen war, wurde dieser expandiert. Die Zellen wurden trypsinisiert und ausgezählt. 200.000 Zellen in 8 ml ES-Zellmedium wurden in ein steriles Plastikröhrchen gefüllt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte wie bereits beschrieben in der Radiologie des Franziskus Hospitals (Bielefeld). Die Einstellungen bei der Bestrahlung von ES-Zellen unterscheiden sich von denen der Feeder-Zellbestrahlung.

15 mA

250 kV

Th II Filter

4 cre = 400 rad

2 min. 48sec.

Die ES-Zellen wurden ebenfalls von beiden Seiten bestrahlt. Danach wurden sie auf gelatinisierten Platten ausgesät. Drei Tage nach der Bestrahlung wurde dem Medium Gancyclovir (Sigma; Taufkirchen) mit einer Endkonzentration von 2 $\mu$ M hinzugegeben. Neun bis zwölf Tage nach dem Ausplattieren konnten die TK resistenten Klone in 96Well Platten mit Feeder-Zellen gepickt werden. Nach drei bis vier Tagen, wenn die Zellklone sich deutlich vermehrt hatten, wurde die 96Well Platte in drei Platten gesplittet. Eine Master-Platte, die bei -80°C aufbewahrt wurde, eine DNA-Platte, die für die PCR-Analysen benötigt wurde und eine Platte, die für eine Neomycin-Selektion eingesetzt wurde. Durch den Verlust der TKNeo-Kassette sollten die ES-Zellklone Neomycin sensitiv sein und unter diesen Kulturbedingungen absterben. Zusätzlich zu der Neomycin-Selektion konnte ein PCR-Test mit Primern, die spezifisch für die TKNeo-Kassette sind, durchgeführt werden, um den TKNeo-Verlust zu bestätigen. ES-Zellklone, bei denen keine TKNeo-Kassette nachweisbar war, wurden weiter durch PCR-Analysen mit polymorphen Markern charakterisiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kartierung der BACs

#### 4.1.1 BAC-Screening und STS-Mapping

Zu Beginn dieser Arbeit bestand die physikalische Karte des *wobbler* kritischen Bereiches aus 24 Maus-YACs. Die Marker, die in diesem YAC-Contig lokalisiert waren (STSs, ESTs und Gene), wurden für das *Screening* einer Maus-BAC-Bank eingesetzt, mit dem Ziel die Region vollständig mit BACs abzudecken. Dieses Ziel wurde gemeinschaftlich mit Karin Resch, Sonja Fuchs und zum Teil auch Dirk Korthaus verfolgt. In dieser Arbeit wurden die folgenden BACs ermittelt (siehe Tab.4.1).

**Tab. 4.1: Verwendete Marker für das *Screening* einer Maus-BAC-Bank.**

<i>Screening</i> Marker	<i>upper pool</i>	Platte/Koordinate	<i>Screening</i> Marker	<i>upper pool</i>	Platte/Koordinate
D11Mit343	3 12	25/D8 118/P12	D11Mit81	13	123/E14
D11Mit294	4 5 7 19 22 22 22	31/J13 48u.49/- 65/I11 185/K22 219/A17 219/P9 219/P17	M1R	4 [5] [5] 7 19 22	-/ [48/H18] [48/M18] -/ 185/K22 219/P9
D11Mit19	4 7 14 17 17 22 24	34u.37/- 62u.67/- 135/- 169/P1 180/K15 219/C13 236/P17	Mor2	[4] 4	[34/J13] 40/J13

- = kein Ergebnis (kein Signal, kein eindeutiges Signal oder zu viele Signale)

[ ] BACs, die anschließend nicht durch eine PCR mit dem *Screening*-Marker bestätigt werden konnten



---

Über eine PCR wurde getestet, ob die BACs den *Screening*-Marker tragen. Die Positiven wurden weiter für ein *STS-Mapping* verwendet. Jeder im Contig vorhandene Marker wurde über PCR auf jedem BAC getestet. Zusätzlich wurden die Enden der BAC-Klone sequenziert. In die BAC-Endsequenzen wurden neue Primer gelegt, so dass neue Marker für das *STS-Mapping* zur Verfügung standen. Die Ergebnisse wurden gesammelt und in einer Karte dargestellt. Wenn ein oder mehrere Marker auf zwei unterschiedlichen BACs lokalisiert werden konnten, so wurde angenommen, dass die BACs sich an dieser Stelle überlappen. Aus den Kartierungsdaten wurde anschließend ein Contig erstellt, das ständig aktualisiert wurde. Zurzeit umfasst das BAC-Contig annähernd 100 BAC-Klone. Die Größen der meisten BAC-Klone wurden mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese überprüft und sind ebenfalls im Contig annotiert. Die BACs bildeten die Grundlage für sämtliche Klonierungsversuche von genomischen Subfragmenten, die anschließend für die Targetingvektor-Konstruktion eingesetzt werden sollten. Ein sehr wichtiger Punkt für die Anwendung des Cre/loxP-Systems ist die tatsächliche Orientierung der loxP-Sequenz im Mausgenom. Die Integration der loxP-Sequenz ist abhängig von der Orientierung des genomischen Subfragmentes innerhalb des Targetingvektors. Deshalb ist es von großer Bedeutung, dass die Orientierung der genomischen Subfragmente relativ zu den BACs des Contigs geklärt ist. Dies legt natürlich die Kenntnis der BAC-Orientierung sowie die Anordnung der BACs zueinander zu Grunde. Das Orientieren der BACs war nicht immer so einfach wie anfangs gedacht. Häufig konnten die STS-Marker der BAC-Enden nicht als endständige Marker der BACs kartiert werden. Außerdem waren einige BAC-Endsequenzen repetitiv, so dass in diesen Fällen falsch positive Signale entstanden. Um dies zu verhindern, wurde jede BAC-Sequenz mit dem Repeatmasker Programm kontrolliert, bevor neue STS-Marker generiert wurden. Ein weiteres Problem war, dass einige BACs chimär waren, so dass z.T. Marker aus einer völlig anderen Region des Contigs Signale zeigten. Lücken, die durch Umstrukturierungen der BACs auftraten mussten durch erneute BAC-Screens geschlossen werden. Schließlich konnte das BAC-Contig nach einer enormen Kartierungsarbeit weiter ausgebaut werden und liegt zurzeit in der Form vor, in der es in dem Anhang dieser Arbeit gezeigt ist. Mit Hilfe dieses Contigs wurden die im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Targetingvektoren orientiert.

### 4.1.2 *Fiber-FISH-Kartierung*

Unterstützend zu dem STS-*Mapping* sollte die Lage einiger BACs durch *Fiber-FISH*-Hybridisierungen geklärt werden. Hierzu wurden zwei BACs, die vermutlich in räumlicher Nähe zueinander lagen, mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gelabelt und in einer *Fiber-FISH*-Hybridisierung eingesetzt. Wenn zwei BACs sich überlappen oder der Abstand zwischen ihnen nicht größer als eine „BAC-Länge“ (ca. 100 – 200 kb) ist, so kann man deutlich sehen, dass sie auf demselben DNA-Strang (*Fiber*) lokalisiert sind. Bei größeren Abständen ist es empfehlenswert, näher zusammenliegende BACs als Sonden zu wählen. Die *Fiber-FISH*-Methode wurde angewandt, um die Lage der in Tabelle 4.2 aufgeführten BACs paarweise zueinander zu überprüfen.

Tab. 4.2

BAC-Sonde Biotin markiert (grün)	BAC-Sonde Digoxigenin markiert (rot)	Auswertung
147N22 (ca. <b>150 kb</b> )	227L1 (ca. 110 kb)	Ü (5-15 kb)
147N22 (ca. <b>150 kb</b> )	95I23 (ca. 85 kb)	Ü (5-15 kb)
95I23 (ca. 85 kb)	165D7 (ca. 95 kb)	-
165D7 (ca. 95 kb)	126P12 (ca. 80 kb)	D (20-30 kb)
230A12 (ca. 120 kb)	208P2 (ca. 180 kb)	Ü (20-25 kb)
71M17 (ca. 100 kb)	208P2 (ca. 180 kb)	D (90-180 kb)
206F21 (ca. <b>130 kb</b> )	65I11 (ca. 90 kb)	Ü (10-20 kb)
206F21 (ca. <b>130 kb</b> )	201L21 (ca. 100 kb)	Ü (5-10 kb)
49J19 (ca. <b>130 kb</b> )	201L21 (ca. 100 kb)	-
147N22 (ca. <b>150 kb</b> )	169P1 (ca. <b>90 kb</b> )	-

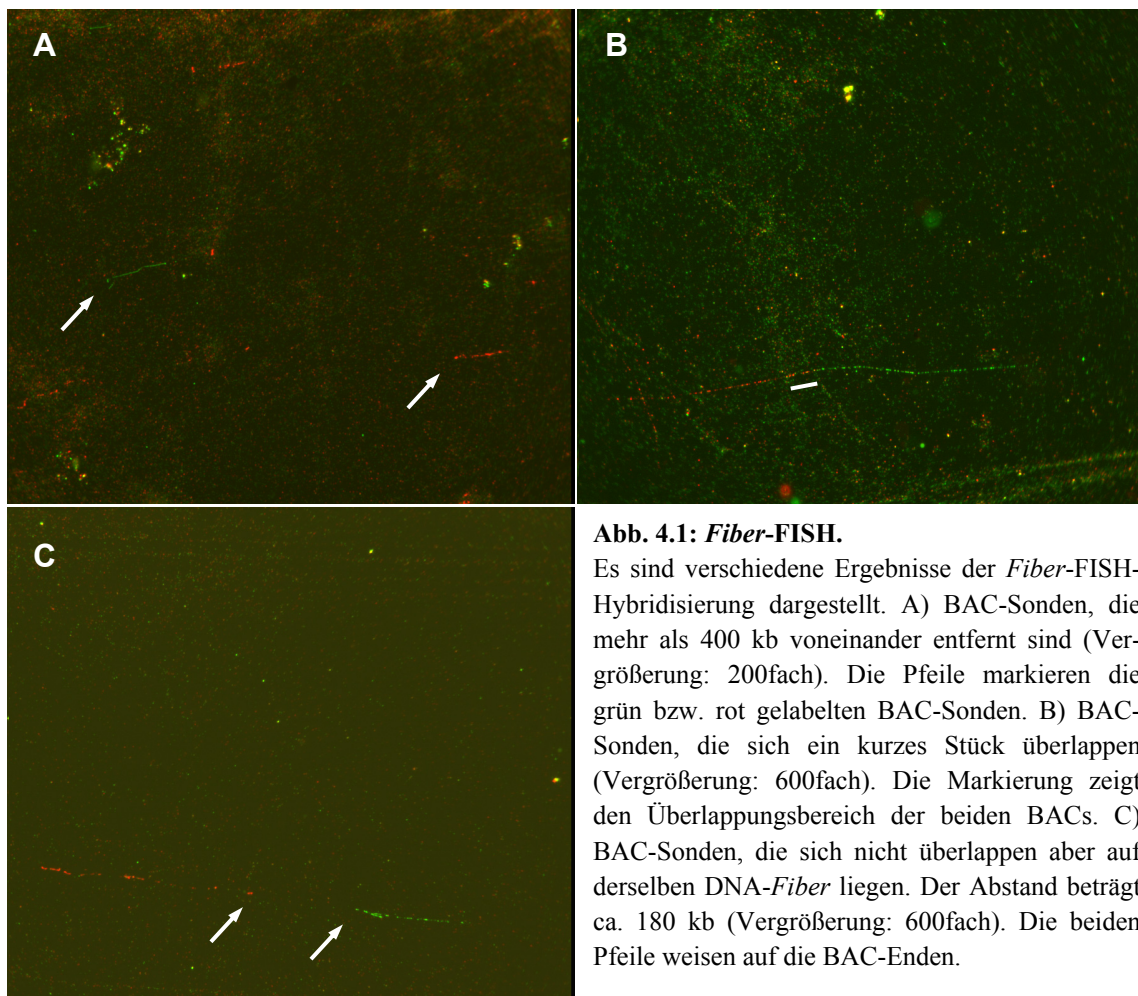
- = es konnte nicht detektiert werden, dass die BACs auf einer *Fiber* liegen

Ü = Überlappung mit geschätzter Größe

D = Distanz zwischen zwei BACs, die auf einer *Fiber* liegen

Fett gedruckte BAC-Größen sind durch die *Fiber-FISH*-Methode ermittelt worden

In Abbildung 4.1 sind drei verschiedene Hybridisierungsergebnisse der *Fiber-FISH*-Methode gezeigt.



**Abb. 4.1: *Fiber-FISH*.**

Es sind verschiedene Ergebnisse der *Fiber-FISH*-Hybridisierung dargestellt. A) BAC-Sonden, die mehr als 400 kb voneinander entfernt sind (Vergrößerung: 200fach). Die Pfeile markieren die grün bzw. rot gelabelten BAC-Sonden. B) BAC-Sonden, die sich ein kurzes Stück überlappen (Vergrößerung: 600fach). Die Markierung zeigt den Überlappungsbereich der beiden BACs. C) BAC-Sonden, die sich nicht überlappen aber auf derselben DNA-Fiber liegen. Der Abstand beträgt ca. 180 kb (Vergrößerung: 600fach). Die beiden Pfeile weisen auf die BAC-Enden.

Mit den Ergebnissen der *Fiber-FISH*-Versuche konnten die Kartierungsdaten bestätigt werden. In fünf Fällen konnte gezeigt werden, dass sich die BACs teilweise überlappen. Zusätzlich konnte die Größe der Überlappung abgeschätzt werden. In zwei Experimenten konnte die Distanz zwischen den BACs ermittelt werden. Hierdurch wurde gezeigt, dass sie in unserem Contig benachbart sind, obwohl sie keine gemeinsamen Marker tragen. Die Distanz wurde abgeschätzt, indem die BAC-Längen und die Abstände zwischen den BACs gemessen wurden (in cm). Waren die BAC-Größen (in kb) bekannt, wurde versucht diese Größen in Relation zu den Längen (in cm) zu setzen. Beispielfhaft soll das für die Hybridisierung 71M17 (ca. 100 kb) / 208P2 (ca. 180 kb) dargestellt werden. BAC 71M17 (grün markiert) zeigte eine Länge von durchschnittlich 5 cm, wohingegen bei BAC 208P8 eine durchschnittliche Länge von 10 cm zu messen war. Der gemessene Größenunterschied (5 cm:10 cm) entspricht in etwa dem tatsächlichen Größenunterschied in kb (100 kb:180 kb). Der Abstand zwischen den BACs variierte zwischen 5 und 10 cm in sechs ausgewerteten Fällen. Setzt man diesen Wert in Beziehung zu der BAC-

Größe, so ergibt sich für den Abstand zwischen den BACs ein geschätzter Wert von 90-180 kb. In vier Fällen konnte ein Abstand von 10 cm gemessen werden und in jeweils einem Fall ein Abstand von 5 bzw. 7 cm. Bei den geringeren Abständen lag die DNA-Fiber vermutlich nicht optimal gestreckt vor, so dass sich die Lücke zwischen den BACs optisch verkleinert. Es ist also anzunehmen, dass der tatsächliche Abstand der BACs eher dem größeren Wert von 180 kb entspricht. Mit dieser Methode konnten weiterhin vier BAC-Größen bestimmt werden, die bisher noch nicht bekannt waren. Die BAC-Klone, die für eine Hybridisierungsreaktion eingesetzt wurden, sind in dem BAC-Contig (Anhang) grau markiert.

## 4.2 Resistenzkassetten und loxP-Elemente

Für die Erzeugung von Deletionen im Mausgenom müssen zwei loxP-Elemente in das Genom inseriert werden, um durch eine nachfolgende Cre-Rekombinasereaktion die zwischen den loxP-sites lokalisierte DNA auszuschneiden. Für das Einbringen der loxP-sites in das Genom kann der Mechanismus der homologen Rekombination genutzt werden. Es wird ein Konstrukt bestehend aus homologer genomischer DNA, der loxP-site und einer Resistenzkassette generiert. Die genomische DNA dient dazu das loxP-Element in das Mausgenom zu integrieren und die Resistenzkassette wird benötigt, um auf die erfolgreiche Insertion zu selektieren. In einem fertigen Deletionsvektorkonstrukt müssen also die folgenden drei Komponenten enthalten sein: loxP-site, Resistenzkassette und zum Ziellokus homologe DNA. In diesem Abschnitt sollen die untersuchten, Resistenzkassetten tragenden Vektoren (zum Teil mit integrierter loxP-site) vorgestellt werden.

### 4.2.1 NeoloxP-TKDT- und HygroloxP-TKDT-Vektor

Am Anfang dieser Arbeit erhielten wir zwei Vektorkonstrukte aus dem Labor von H. Büeler (Universität Zürich, Schweiz). Das eine Vektorkonstrukt bestand aus einer Neomycin-Kassette (Neo), einer loxP-site, dem Thymidin-Kinase(TK)-Gen und einer Diphtheria-Toxin(DT)-Kassette. Der andere Vektor besaß ebenfalls eine DT- und eine TK-Kassette, ein Hygromycin(Hygro)-Resistenzgen und ein loxP-Element. Wenn die beiden Vektoren so in das ES-Zellgenom integrieren, dass die loxP-sites gleichgerichtet sind, dann werden beide TK/DT-Kassetten ausgeschnitten. Die Neo- und die Hygro-Kassette bleiben im Genom zurück. Testspaltungen der Vektoren zeigten, dass in beiden Konstrukten bereits genomische Maus-DNA integriert war. Die Ligation der genomischen Fragmente war mit Hilfe von Schnittstellen erzielt worden, die zwar in geschnittenem Zustand kompatibel sind, aber nach der Ligation nicht mehr mit Restriktionsenzymen geschnitten werden können. Es war unmöglich die Inserts auszuschneiden, um die Vektoren wieder in ihren Ursprungszustand zu versetzen. Damit waren die Vektoren nutzlos für die geplanten Experimente.

### 4.2.2 TKNeo-Vektor

Dieser Vektor enthält das Thymidin-Kinase-Gen und das Neomycin-Gen aber kein loxP-Element. Der Vektor stammt aus dem Labor von J. Schimenti (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) und wird dort zur Erzeugung von strahleninduzierten Deletionen eingesetzt. Die Sequenz der TKNeo-Kassette (4000 bp) wurde im Rahmen dieser Arbeit ermittelt (siehe Anhang), um die Restriktionsenzymanalyse bei der Deletionsvektorkonstruktion zu erleichtern. Die Analyse der Sequenzdaten zeigte, dass viele der für Klonierungen häufig benutzten Restriktionsenzyme aufgrund einer oder mehrerer Schnittstellen in der TKNeo-Kassette nicht einsetzbar sind. Enzyme, die nicht in der TKNeo-Kassette vorkommen, aber in der MCS des pBS-Vektors schneiden sind: *BamHI*, *NotI*, *SpeI* und *SstII*.

### 4.2.3 PTV0-Vektor

Dieser Vektor (erhalten von C. Birchmeier; MDC, Berlin) trägt ebenfalls eine TKNeo-Kassette ohne loxP-Element. Die Resistenzkassette ist allerdings nur 3000 bp groß und beinhaltet weniger Restriktionsenzymchnittstellen als der TKNeo-Vektor. Schwierigkeiten machte hier eine Vektorkarte, in der Restriktionsschnittstellen fehlerhaft bzw. gar nicht eingezeichnet waren. Nach einer diesbezüglichen Rücksprache erhielten wir die Vektorsequenz (siehe Anhang), mit deren Hilfe eine Schnittstellenanalyse durchgeführt werden konnte.

### 4.2.4 HPRT-Minigen

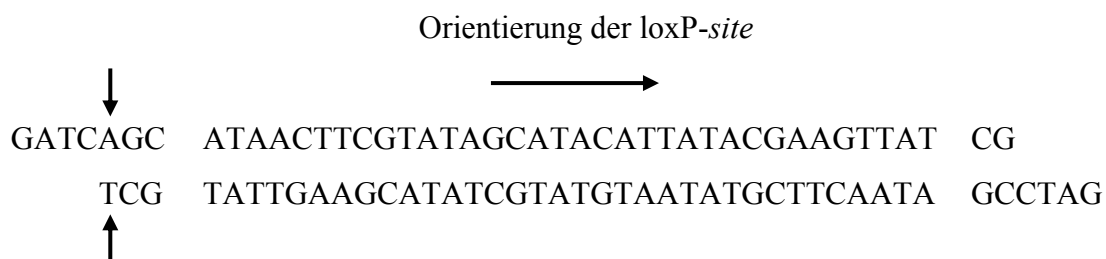
Zwei weitere Deletionsvektoren wurden uns von A. Bradley (Baylor College of Medicine; Houston, USA) zur Verfügung gestellt. Ein Vektor trägt die ersten beiden Exons des HPRT-Minigen, das HPRT-Intron, in das die loxP-*site* inseriert ist, Exon drei bis sechs des HPRT-Minigen und ein Neomycin-Resistenzgen. Der zweite Vektor besitzt ein Puromycin-Gen, das HPRT-Intron mit loxP-*site*, Exon drei bis neun und das PolyA-Signal. Zwischen den Sequenzen der beiden Kassetten besteht eine Sequenzüberlappung von 2 kb. In dieser Region ist jeweils die loxP-*site* enthalten. Wenn die beiden Kassetten nacheinander durch Neomycin- bzw. Puromycin-Selektion in das ES-Zellgenom integriert sind, erfolgt die Cre vermittelte Rekombination. Hierdurch werden die beiden Teile des HPRT-Minigen in räumliche Nähe gebracht und das Gen kann vollständig exprimiert werden. Das Resultat ist eine HAT-Resistenz (Ramirez-Solis et al., 1995). Einige Zeit nach Erhalt der Vektoren wurde uns mitgeteilt, dass innerhalb des HPRT-Gens eine Rasterschubmutation vorliegt, welche die Selektionseffizienz stark beeinträchtigt (Bradley, persönliche Mitteilung).

Nachdem die gründliche Charakterisierung der Vektoren ergab, dass keiner für die angestrebten Cre/loxP basierenden Experimente dieser Arbeit geeignet war, wurde der Entschluss gefasst eigene Vektoren zu konstruieren.

#### 4.2.5 TKNeoloxP-Vektoren

Zur Herstellung dieser Vektoren wurde zuerst das loxP-Element in den pBS-Vektor inseriert. Zwei Oligonukleotide mit der loxP-Sequenz, flankiert von *Bam*HI Schnittstellen wurden generiert. Eine der *Bam*HI Schnittstellen war allerdings so modifiziert worden, dass zwar ein Einsetzen in einen über *Bam*HI geöffneten Vektor möglich war, dass aber nach der Ligation diese *Bam*HI Schnittstelle nicht mehr funktionstüchtig war (siehe Abb. 4.2).

loxP-Oligonukleotide (a/b)



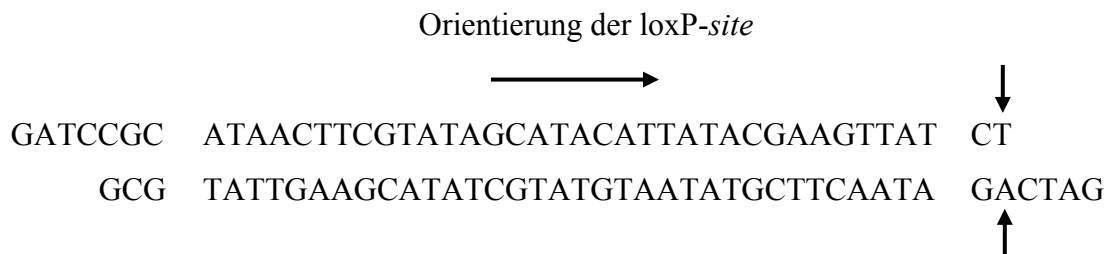
**Abb. 4.2: loxP-Oligonukleotide (a/b).** Es sind die beiden Oligos dargestellt (je 43 bp), die nach einer Hybridisierungsreaktion über *Bam*HI in den pBS-Vektor ligiert wurden. Die senkrechten Pfeile markieren die modifizierten Nucleotide in einer der *Bam*HI Schnittstellen. Durch diesen Basenaustausch ist die Ligation in einen mit *Bam*HI geöffneten Vektor möglich, aber das Enzym kann in nachfolgenden Reaktionen an dieser Stelle nicht mehr schneiden.

Die Intention dieser modifizierten Schnittstelle war, dass der loxP tragende Vektor mit *Bam*HI geöffnet werden kann (ohne das loxP-Element zu verlieren), um die TKNeo-Kassette (von J. Schimenti; Jackson Laboratory) einzusetzen. Die Oligonukleotide wurden phosphoryliert, anschließend hybridisiert und in einen über *Bam*HI geöffneten pBS-Vektor ligiert. Die nach der Transformation entstandenen Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR und eine Testspaltung auf das Insert getestet. Die Kolonie-PCR wurde mit den Vektor-Primern M13 Reverse und M13 Forward durchgeführt. Bei drei Kolonien wurde ein Produkt identifiziert, das um ca. 40 bp größer war als die MCS des Vektors. Von diesen drei Klonen wurde die DNA präpariert und eine Doppelspaltung mit *Bam*HI und *Pvu*I angesetzt. Dieser Verdau zeigte die Orientierung der loxP-Elemente. Die Spaltung des Klons, welcher die intakte *Bam*HI Schnittstelle in Nachbarschaft zu der *Pvu*I Schnittstelle besaß ergab eine Fragmentgröße von 216 bp. Dies war auch die Fragmentgröße, die man identifizierte, wenn der pBS-Vektor kein Insert trug. Der Klon, bei

dem die modifizierte *Bam*HI Schnittstelle flankierend zur *Pvu*I Schnittstelle saß, erzeugte ein 259 bp Fragment. Die beiden unterschiedlichen Fragmentgrößen konnten in einem 4% Nusieve Gel detektiert werden. Eine anschließende Sequenzierung bestätigte die Spaltungsergebnisse. In Abbildung 4.4. sind die durch die Sequenzierung ermittelten Positionen der *Bam*HI Schnittstellen und die Orientierungen der *loxP-sites* dargestellt. Die Kolonie Nr.2 wurde für die Ligation der TKNeo-Kassette ausgewählt. Die TKNeo-Kassette wurde durch *Bam*HI ausgeschnitten, durch eine Gelelektrophorese vom Vektor getrennt, aufgereinigt und mit dem über *Bam*HI geöffneten *loxP*-pBS-Vektor (Kol.2) ligiert. Nach der Transformation in *E.coli* wurden die Kolonien durch eine Testspaltung mit *Bam*HI auf die Insertion der TKNeo-Kassette überprüft. Für den Nachweis der *loxP*-Sequenz wurde eine *loxP* spezifische PCR entwickelt (Primer: *loxPori3sense/CT8TKNeoloxPStuI.1*; Produktgröße: 57 bp). Einer der doppelpositiven Klone wurde ansequenziert. Es konnte die *loxP*-Sequenz, sowie die TKNeo-Kassette identifiziert werden. Dieser Klon, der die TKNeo-Kassette und die *loxP-site* trägt wird im Folgenden TKNeoloxPI genannt (siehe Abb. 4.4).

Um eine TKNeoloxP-Kassette an jedem gewählten Ziellokus des Contigs einsetzen zu können, wurden zwei weitere *loxP*-Oligonukleotide hybridisiert, bei denen die Position der intakten und defekten *Bam*HI Schnittstellen vertauscht sind (siehe Abb. 4.3).

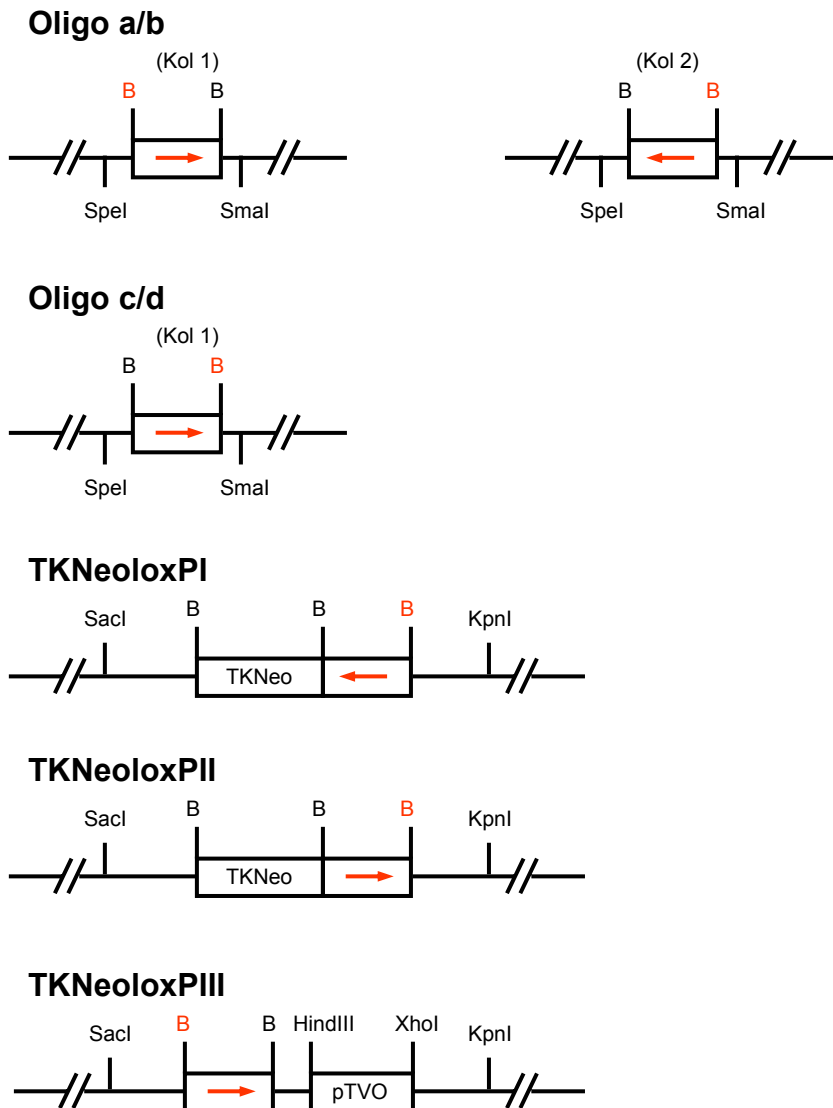
#### *loxP*-Oligonukleotide (c/d)



**Abb. 4.3: *loxP*-Oligonukleotide (c/d).** Es sind die beiden Oligos dargestellt (je 43 bp), die nach einer Hybridisierungsreaktion über *Bam*HI in den pBS-Vektor ligiert wurden. Die senkrechten Pfeile markieren die modifizierten Nukleotide in einer der *Bam*HI Schnittstellen. Durch diesen Basenaustausch ist die Ligation in einen mit *Bam*HI geöffneten Vektor möglich, aber das Enzym kann in nachfolgenden Reaktionen an dieser Stelle nicht mehr schneiden.

Die folgenden Klonierungsversuche verliefen wie bereits oben beschrieben. Schließlich konnte ein Klon identifiziert werden, der eine TKNeo-Kassette und ein *loxP*-Element trug. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit heißt dieser Klon TKNeoloxPII (siehe Abb. 4.4).

Ein dritter TKNeoloxP tragender Vektor (TKNeoloxPIII) wurde konstruiert, bei dem die TKNeo-Kassette aus dem PTV0-Vektor stammt. Die Resistenzkassette wurde über *HindIII* und *XhoI* aus dem Ursprungsvektor ausgeschnitten und in den loxP (loxP-Oligonukleotide a/b) tragenden pBS-Vektor eingesetzt (siehe Abb. 4.4). Durch die geringere Anzahl an Restriktionsenzymchnittstellen bot diese Resistenzkassette eine Ausweichmöglichkeit für die Deletionsvektorkonstruktion.



**Abb. 4.4: Schematische Darstellung der loxP- bzw. TKNeoloxP-Elemente.** (B=defekte *BamHI* Schnittstelle; B=*BamHI* Schnittstelle; roter Pfeil=Orientierung des loxP-Elementes)

#### 4.2.6 PuroloxP-Vektoren

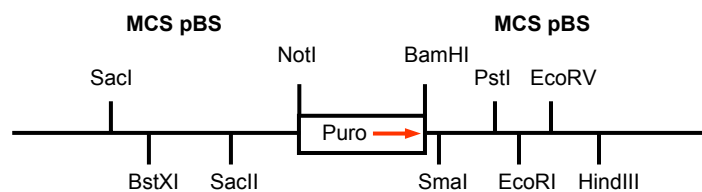
Die Puromycin-Kassette mit angrenzender loxP-site wurde aus dem HPRT-Minigen tragenden Vektor von A. Bradley (Baylor College of Medicine; Houston, USA) über *NotI* und *BamHI* ausgeschnitten und



in den pBS-Vektor kloniert. Die Klone wurden durch einen Restriktionsverdau mit *NotI* und *BamHI* auf das richtige Insert getestet. Anschließend wurde durch eine Sequenzierung überprüft, ob das loxP-Element und die Puromycin-Kassette in dem klonierten Fragment enthalten sind. Diese Puro-loxP-Resistenzkassette wird in der Arbeit mit PurloxPI bezeichnet und ist in Abbildung 4.5 gezeigt.

Es wurde weiterhin versucht *AflIII* Schnittstellen, flankierend zu der PuroloxPI-Kassette einzufügen. Flankierend zu der MCS-Region des pBS wurden modifizierte Primer konstruiert, die eine *AflIII* Schnittstelle tragen. Die Primer wurden in einer PCR-Reaktion mit der PuroloxPI-Kassette (in dem pBS-Vektor) eingesetzt und das PCR-Produkt in den TopoPCRII-Vektor kloniert. Die Klone wurden durch eine alkalische Lyse und eine *AflIII* Spaltung auf die PuroloxP-Kassette überprüft. Neben den beiden flankierenden *AflIII* Schnittstellen existieren noch zwei *BamHI* Schnittstellen. Eine stammt aus dem pBS-Vektor und die zweite ist in der MCS des TopoPCRII-Vektors vorhanden. Damit ist es möglich diese PuroloxP-Kassette wahlweise über *AflIII* oder *BamHI* auszuschneiden (siehe Abb. 4.5) Dieses Vektorkonstrukt wird als PuroloxPII bezeichnet.

### PuroloxPI



### PuroloxPII

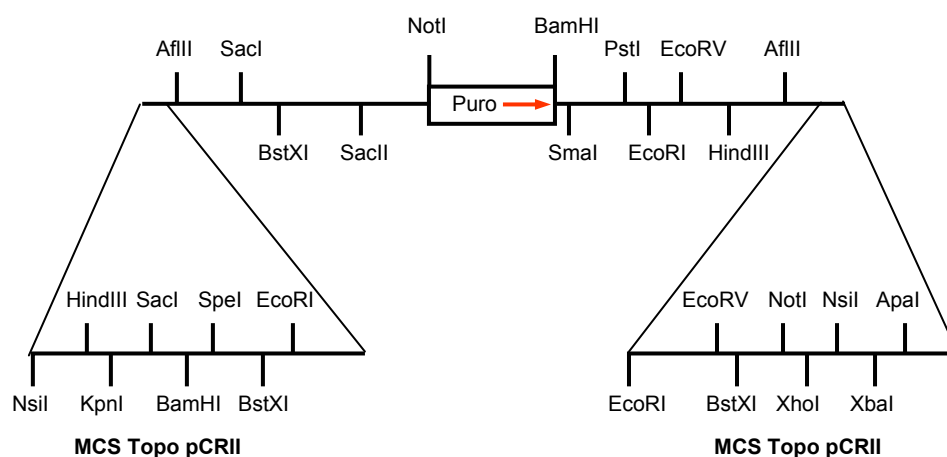


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der PuroloxP-Elemente. (roter Pfeil=Orientierung des loxP-Elementes)

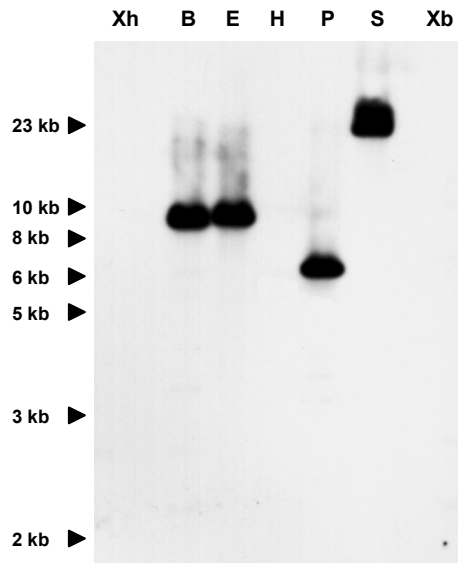
## 4.3 Subklonierung genomischer Fragmente

### 4.3.1 Identifizierung und Klonierung von BAC-Fragmenten

Einer der Bestandteile eines Deletionsvektors ist ein isogenes genomisches DNA-Fragment mit einer Größe von 5-10 kb, das homolog zum gewünschten Integrationslokus des Mausgenoms ist. Genomische Fragmente dieser Länge werden häufig von größeren genomischen Fragmenten, wie z.B. BACs subkloniert. Basierend auf der zuvor schon beschriebenen Kartierungsarbeit, war eine wachsende Anzahl von BACs im *wobbler* kritischen Bereich verfügbar. Diese BACs sowie die dazugehörigen BAC-Endsequenzen wurden für die Subklonierung genomischer Fragmente eingesetzt. Die Vorgehensweise wird exemplarisch für ein ausgewähltes BAC (160A5) dargestellt. Die Ergebnisse aller weiteren Subklonierungsexperimente sind dann anschließend in einer Tabelle zur besseren Übersicht zusammengefasst.

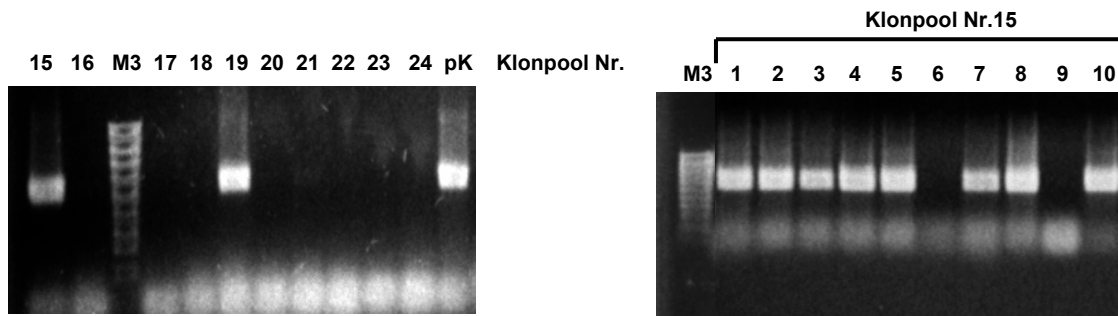
Zur Generierung von genomischen Subfragmenten wurden die BACs mit Restriktionsendonukleasen gespalten, die in der MCS des BAC-Vektors pBeloBAC11 (*BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SmaI*, *XbaI*, *XhoI*) eine Erkennungssequenz besitzen, in der Hoffnung, dass es noch eine weitere Schnittstelle des entsprechenden Enzyms in einem Abstand von 5-10 kb in der genomischen Sequenz gibt. Anschließend wurden dann die für das STS-Mapping generierten PCRs der BAC-Endsequenzen eingesetzt, um nach den Fragmenten zu suchen. Diese Strategie hat den Vorteil, dass die klonierten Subfragmente mit Hilfe der BAC-Enden an dem BAC-Contig ausgerichtet werden können. Dies ist besonders wichtig, um später die Orientierung der loxP-site zu bestimmen.

Die BAC-DNA wurde mit den oben genannten Enzymen geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. BAC-Endsonden wurden durch die Amplifikation der generierten BAC-End-STS-Marker hergestellt, aufgereinigt und in einer Hybridisierungsreaktion eingesetzt. In Abbildung 4.6 ist ein Hybridisierungsergebnis für den BAC 160A5 exemplarisch dargestellt. Die Spaltungen mit *BamHI* und *EcoRI* ergeben Signale, die einer Fragmentgröße von ca. 10 kb entsprechen. Die Spaltung der DNA mit *PstI* erzeugt ein ca. 7 kb großes detektierbares Fragment und der *SmaI* Verdau ergibt ein Signal in der Höhe von etwa 23 kb. Bei den Spaltungen mit *HindIII*, *XhoI*, und *XbaI* ist kein Signal zu erkennen. Fragmente, die kleiner waren als 2 kb, waren nicht mehr im Agarosegel vorhanden und wurden deshalb nicht geblottet. Vermutlich sind die Fragmente, die in diesen Spuren mit den Endsonden erkannt werden kleiner als 2 kb, und konnten deshalb nicht detektiert werden.



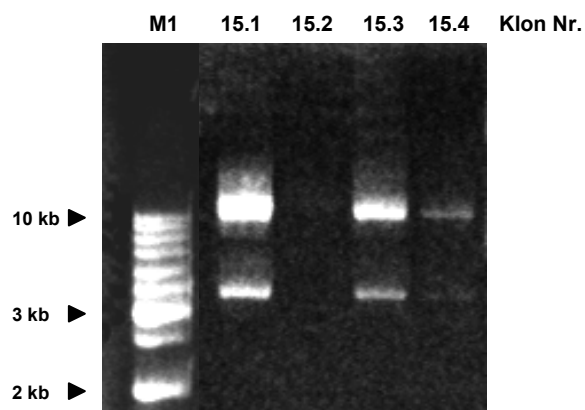
**Abb. 4.6: Identifizierung von 5-10 kb Fragmenten innerhalb des BAC 160A5.** Die BAC-DNA wurde mit verschiedenen Enzymen geschnitten und mit der BAC-End-Sonde 160A5Rev a2/b2 hybridisiert. Es können drei Fragmente der gewünschten Größe (5-10 kb) identifiziert werden. (Xh=*XhoI*; B=*BamHI*; E=*EcoRI*; H=*HindIII*; P=*PstI*; S=*SmaI*; Xb=*XbaI*)

Zunächst wurde versucht nur die 10 kb großen Fragmente der *BamHI* und *EcoRI* Verdauansätze für die Ligation in den pBS-Vektor einzusetzen. Dazu wurden die Spaltungsansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und die Fragmente in einem Bereich von 8-12 kb ausgeschnitten, aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. Trotz mehrfacher Wiederholung dieses Versuches konnten keine Klone identifiziert werden, die ein 10 kb Insert trugen. Deshalb wurde der umständlichere Weg gewählt, die geschnittene BAC-DNA komplett in einem Ligationsversuch zu verwenden und dann nachfolgend die Klone zu identifizieren, die das gewünschte Insert tragen. Dazu wurden 5 µg gespaltene BAC-DNA und 50 ng geöffneter pBS-Vektor in einer Ligationsreaktion eingesetzt. Der komplette Ligationsansatz wurde in *E.coli* XL1Blue-Zellen elektroporiert, die nach der Regenerationsphase auf vier 150 mm<sup>2</sup> große Agar-Platten ausplattiert wurden. Die auf den Platten wachsenden Kolonien wurden durch das Verfahren des Kolonietransfers auf Nylon-Membranen übertragen. Die Bakterien-DNA wurde auf der Membran aufgereinigt und anschließend fixiert. Die Membranen wurden mit der BAC-Endsonde (Primer: 160A5Reva2/b2; Produktgröße: 587 bp) hybridisiert. In vielen Fällen war es allerdings nicht möglich anhand der Hybridisierungssignale die Kolonien eindeutig zuzuordnen. Es wurden daher pro Signal bis zu 10 Kolonien gleichzeitig gepickt und auf einer neuen Platte zusammen ausgestrichen. Dieser „Klon-pool“ wurde anschließend mittels einer PCR auf das Vorhandensein des BAC-Endes überprüft. Im Falle eines positiven PCR-Signals wurden die gepoolten Klone durch einen weiteren Ausstrich auf eine neue Agar-Platte vereinzelt und erneut mittels PCR getestet. Ein Beispiel dieses Verfahrens ist in Abbildung 4.7 gezeigt.



**Abb. 4.7: Beispiel für einen PCR-Test der Klone der Koloniehybridisierung mit BAC-Endprimern.** Für die erste PCR wurde ein Klon-*pool* von bis zu 10 Kolonien pro Ansatz eingesetzt (linker Teil der Abbildung; pK=positiv Kontrolle). Die positiven *pools* wurden anschließend noch einmal ausgestrichen und Einzelkolonien für die zweite PCR eingesetzt (der rechte Teil der Abbildung zeigt ein Beispiel für den Klon-*pool* Nr. 15).

Die DNA von vier positiven Kolonien wurde anschließend durch eine Easy Prep aufgereinigt und zur Fragmentgrößenbestimmung mit dem Enzym *Bam*HI gespalten, mit dem auch das genomische Fragment aus dem BAC-Vektor gespalten wurde (siehe Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Testspaltung der positiven Klone Nr.15.1-15.4 der Koloniehybridisierung mit *Bam*HI.** Das obere ca. 10 kb große Fragment ist das genomische BAC-Fragment, die untere Bande entspricht dem pBS-Vektor (3 kb).

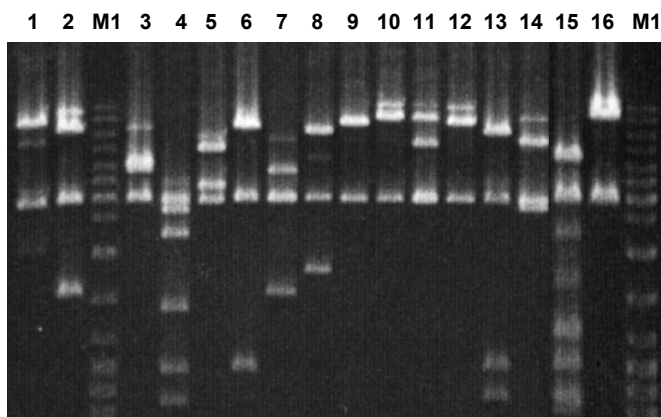
In der folgenden Tabelle sind alle durchgeführten Hybridisierungs- und Klonierungsergebnisse zusammengefasst. In der ersten Spalte sind die untersuchten BACs und gleichzeitig die zur Hybridisierung eingesetzten Endsonden aufgeführt. In der zweiten Spalte sind die Enzyme aufgeführt, die in einem Restriktionsverdau mit anschließender Hybridisierung detektierbare Fragmentgrößen zwischen 5 und 12 kb ergaben. In der dritten Spalte sind die ermittelten Fragmentgrößen angegeben. Die letzte Spalte zeigt, ob die Ligation der gewünschten Fragmente erfolgreich war.

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Hybridisierungs- und Klonierungsergebnisse der eingesetzten BACs

BAC-Ende	Restriktionsenzym	Fragmentgröße in kb	Klonierung der Fragmente in pBS
173M5Rev	<i>BamHI</i>	9	+
	<i>EcoRI</i>	10	+
	<i>PstI</i>	6	n.d.
173M5For	<i>BstxI</i>	5	n.d.
	<i>EcoRI</i>	8	+
180K15Rev	<i>EcoRI</i>	10	+
	<i>PstI</i>	5,5	n.d.
	<i>XbaI</i>	5	+
180K15For	<i>BamHI</i>	9	+
	<i>PstI</i>	5,5	n.d.
135B4Rev	<i>PstI</i>	10	+
	<i>SmaI</i>	15	+
135B4For	<i>EcoRI</i>	5,5	n.d.
123J24Rev	<i>XhoI</i>	7	+
123J24For	<i>BamHI</i>	5	+
	<i>HindIII</i>	6	+
160A5Rev	<i>BamHI</i>	10	+
	<i>EcoRI</i>	10	+
	<i>PstI</i>	7	n.d.
141E23For	<i>BamHI</i>	12	-
65I11For	<i>BamHI</i>	12	n.d.
185K22For	<i>BamHI</i>	9	n.d.
139O9Rev	<i>XhoI</i>	12	n.d.
	<i>EcoRI</i>	10	-
61H18For	<i>EcoRI</i>	9	-
	<i>HindIII</i>	9	-
219A17Rev	<i>EcoRI</i>	12	+
219P17Rev	<i>EcoRI</i>	12	+

(+ = in den pBS-Vektor subkloniert; - = es konnten keine Positiven ermittelt werden; n.d. = Ligation nicht durchgeführt).

Es folgten weitere Schnittstellenanalysen der subklonierten Fragmente mit Enzymen, die in der MCS des pBS-Vektors schneiden: *AccI*, *BamHI*, *BstXI*, *ClaI*, *EcoO109I*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *PstI*, *SallI*, *SmaI*, *SpeI*, *SstI*, *SstII*, *XbaI*, *XhoI*. Die Versuche sollen hier wieder nur für das Subfragment des BAC 160A5 (= 160A5Kol15.1) dargestellt werden, da dieses Fragment im weiteren Verlauf der Arbeit zur Herstellung von zwei Targetingvektoren benutzt wurde. Die Enzyme wurden in einem Doppelverdau zusammen mit *BamHI* eingesetzt, um Schnittstellen innerhalb des Inserts zu identifizieren (siehe Abb. 4.9).



**Abb. 4.9:** Testspaltung des Deletionsvektors 160A5Kol15.1 mit Enzymen der MCS des Vektorrückgrates (pBS). Die Enzyme wurden jeweils im Doppelverdau mit *BamHI* eingesetzt (1=*EcoO109I*, 2=*EcoRI*, 3=*EcoRV*, 4=*HincII*, 5=*KpnI*, 6=*NotI*, 7=*PstI*, 8=*SpeI*, 9=*SstI*, 10=*SstII*, 11=*XbaI*, 12=*HindIII*, 13=*SallI*, 14=*XhoI*, 15=*AccI*, 16=*ClaI*, M1=Ladder Mix).

Diese Schnittstellen können dann dazu verwendet werden, die loxP tragende Resistenzkassette im Falle eines Replacementvektors in das genomische Fragment zu setzen. In der folgenden Tabelle sind die Restriktionsenzyme aufgeführt, die das 8 kb große genomische Insert ein Mal schneiden.

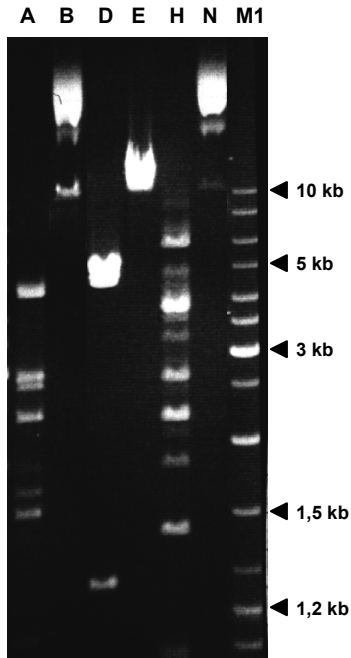
**Tab. 4.4:** Restriktionsenzyme, die das 8 kb Insert des Klons 160A5Kol15.1 ein Mal schneiden.

Enzym	<i>EcoO109</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>KpnI</i>	<i>NotI</i>	<i>SpeI</i>	<i>XbaI</i>	<i>XhoI</i>
Fragmentgröße [kb]	0,7 + 7,3	1,6 + 6,4	4 + 4	3,3 + 4,7	1 + 7	1,7 + 6,3	5 + 3	5,1 + 2,9

Wenn die Resistenzkassette in das genomische Fragment integriert ist, sollten flankierend jeweils noch mindestens 2 kb genomische DNA vorhanden sein, damit die homologe Rekombination zwischen Targetingvektor und Ziel-DNA effizient erfolgen kann. Die folgenden Enzyme schneiden das 8 kb genomische Insert in der gewünschten Art und Weise: *EcoRV*, *KpnI*, *XbaI* und *XhoI*.

Die Insert-DNA wurde weiterhin mit Enzymen verdaut, die nicht in der Sequenz des pBS-Vektors schneiden, damit im Falle einer Insertionsvektor-Konstruktion der Targetingvektor durch eine Schnittstelle innerhalb der genomischen DNA geöffnet werden kann. Es wurden die Enzyme *AflIII*, *BclI*, *DraI*-

*AflIII*, *Eco47III*, *HpaI* und *NheI* für eine Testspaltung eingesetzt (siehe Abb. 4.10). *Eco47III* ist das einzige Enzym, das die DNA nur ein Mal schneidet. Für *BclI* und *NheI* existiert keine Schnittstelle und alle weiteren Enzyme schneiden die DNA mindestens zwei Mal.



**Abb. 4.10: Testspaltung des Deletionsvektors 160A5Kol15.1.** Der Vektor wird durch *Eco47III* im genomischen Fragment linearisiert (Spur E; ca. 10 kb). Die Enzyme *BclI* und *NheI* (Spur B, N) besitzen keine Schnittstelle im Vektor, wohingegen *AflIII*, *HpaI* (Spur A, H) mehrmals im genomischen Fragment schneiden. (M1=Ladder Mix)

### 4.3.2 Identifizierung und Klonierung von PCR-Fragmenten

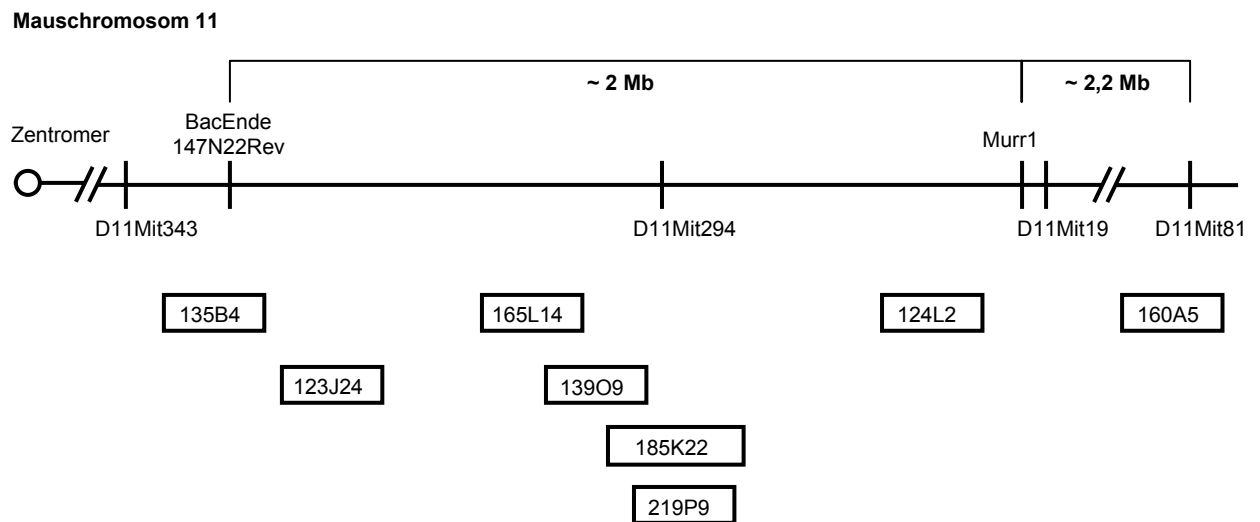
Die in der Kooperation mit dem IMB in Jena ermittelten BAC-Sequenzen boten einen neuen Ansatz für die Subklonierung genomischer Fragmente. Es wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten BACs sequenziert.

**Tab. 4.5: Sequenzierte BACs**

BAC	Verfügbare Sequenz [kb]	Anzahl der Contigs
135B4	214	8
123J24	104	4
139O9	75	1
185K22	286	7
219P9	191	4
165L14	191	3
124L2	84	2

Die Lage der sequenzierten BACs zueinander und zum *wobbler* Contig ist in Abbildung 4.11 schematisch dargestellt. Zur besseren Orientierung sind einige STS-Marker aus der *wobbler* kritischen Region gezeigt. Das BAC-Ende 147N22 Rev und ein für das Gen *Murr1* spezifischer STS-Marker flankieren den Kandidatengenbereich für *wobbler*. Die Lokalisation des BAC 160A5 ist ebenfalls eingezeichnet, obwohl er nicht sequenziert wurde, damit die Position des bereits subklonierten genomischen Fragmentes in der Kandidatengenregion deutlich wird.





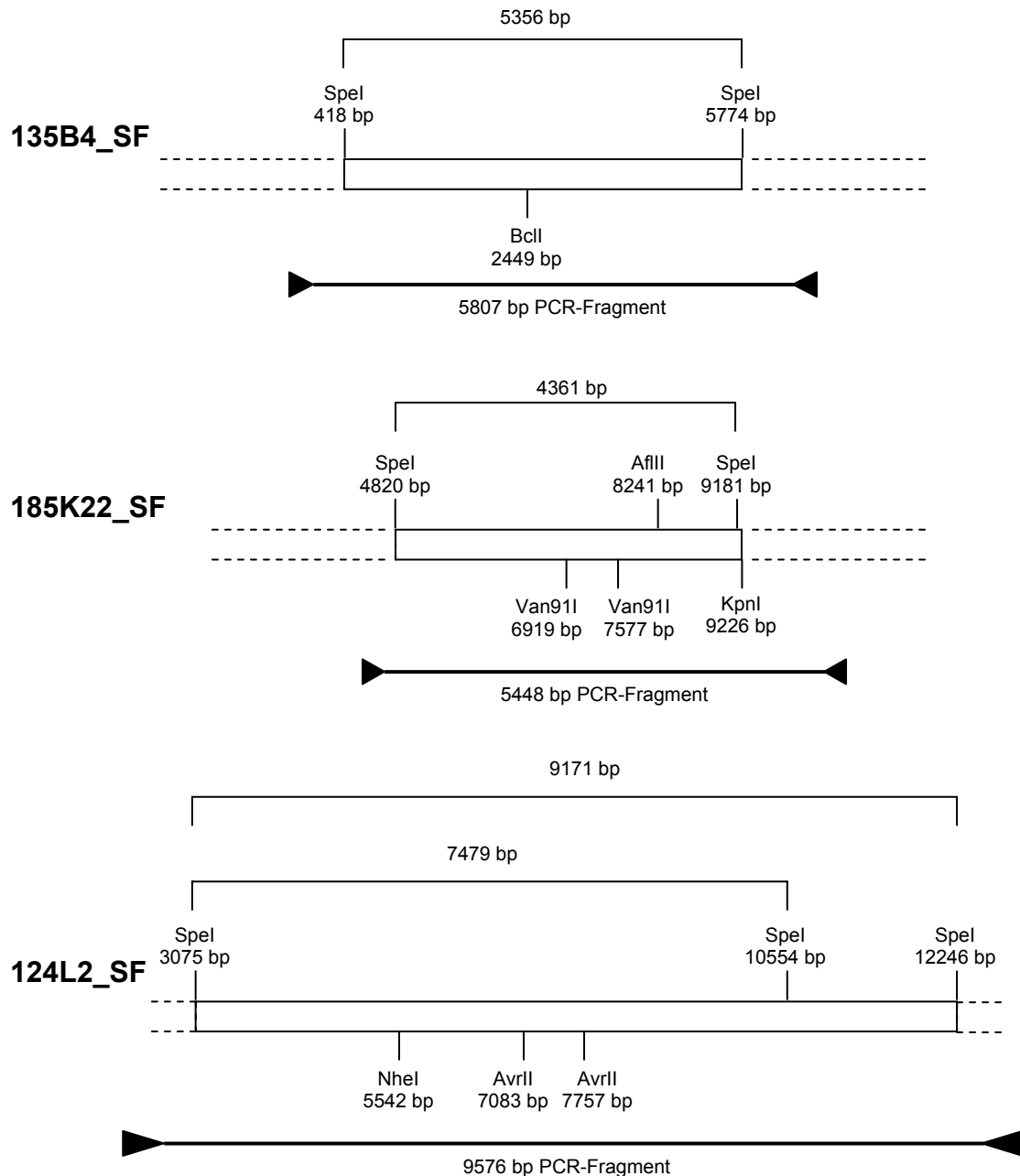
**Abb. 4.11: Lage der Sequenzierten BACs auf dem Mauschromosom 11.** Die Abstände der BACs und der Marker sind nicht maßstabsgetreu.

Die einzelnen Contigs wurden einer Schnittstellenanalyse mit dem „WebCutter“ Programm unterzogen. Es wurde gezielt nach 5-10 kb Fragmenten gesucht, die von Schnittstellen der Enzyme *SpeI*, *NotI* oder *SstII* flankiert wurden. Eine größere Auswahl an Enzymen stand nicht zur Verfügung, da die Enzyme für nachfolgende Umklonierungsversuche in der MCS des pBS-Vektors vorhanden sein sollten. Eine weitere Einschränkung der Enzymauswahl stellte die TKNeoloxP-Resistenzkassette dar, da sie beinahe alle Schnittstellen, die in der MCS des pBS-Vektors vorkommenden Enzyme beinhaltet. Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen blieben nur noch die oben genannten drei Restriktionsenzyme zur Auswahl. Außerdem sollte sich innerhalb des 5-10 kb Fragmentes eine weitere singuläre Schnittstelle befinden, damit im Falle eines angestrebten Insertionsvektor-Konstruktes diese Restriktionsschnittstelle zum Linearisieren des Vektors verwendet werden kann. Die Enzyme, die hierfür in Frage kommen, dürfen weder in der MCS des pBS-Vektors noch in der TKNeoloxP-Kassette schneiden. Diese Bedingungen werden von den folgenden Restriktionsenzymen erfüllt: *AflIII*, *BclI*, *Eco47III*, *HpaI*, *MfeI*, *NheI*, *NsiI* und *PmeI*. Für den Fall, dass die PuroloxP-Kassette einkloniert werden soll, stehen die folgenden Enzyme für das Öffnen des Konstruktes zur Verfügung: *AflIII*, *AvrII*, *Eco47III*, *EcoNI*, *HpaI*, *MfeI*, *MluI*, *MunI*, *NcoI*, *NdeI*, *NheI* und *Van9II*.

Durch eine Schnittstellenanalyse konnten drei BAC-Fragmente (135B4\_SF, 185K22\_SF und 124L2\_SF) identifiziert werden, die den genannten Anforderungen entsprachen (siehe Abb. 4.12).

Es wurden Primer flankierend zu den Fragmenten ausgewählt und in einer Long-Range-PCR eingesetzt. Als *template*-DNA diente der jeweilige BAC. Die generierten PCR Produkte 124L2\_SF (Primer: MK14.0456A/B; Produktgröße 9576 bp) 135B4\_SF (Primer: MK2.0910A2/B1; Produktgröße 5807 bp) und 185K22\_SF (Primer: MK5.7219A/B; Produktgröße 5448 bp) wurden in den TOPO PCR II Vektor

kloniert. Die Klone wurden mittels Kolonie-PCR und Testspaltung mit *SpeI* auf das genomische Fragment überprüft. Zusätzlich wurde jeweils ein positiver Klon pro subkloniertem genomischen Fragment ansequenziert.



**Abb. 4.12: Schematische Darstellung der potentiellen genomischen Fragmente.** Es sind die potentiellen genomischen Fragmente gezeigt, die durch eine Restriktionsschnittstellenanalyse der BAC-Sequenzen gefunden wurden. Dargestellt sind die flankierenden Restriktionsenzyme sowie das innerhalb des Fragmentes schneidende Enzym. Weiterhin sind die Primer mit denen die Fragmente amplifiziert wurden eingezeichnet.

## 4.4 Deletionsvektorkonstrukte

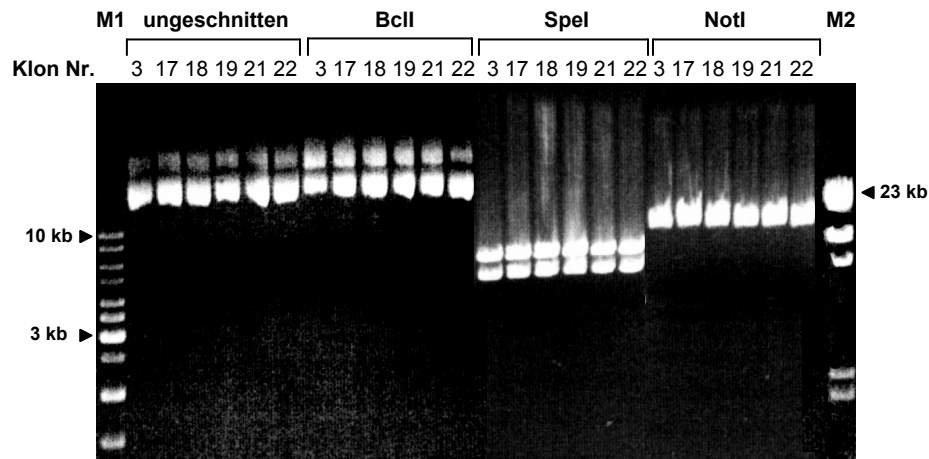
### 4.4.1 Insertionsvektor B4\_TKNeoloxP

#### 4.4.1.1 Ligation der Einzelfragmente

Das vom BAC 135B4 stammende 5542 bp genomische Fragment, wurde mit *SpeI* aus dem Topo PCRII-Vektor ausgeschnitten und in den durch *SpeI* geöffneten TKNeoloxPII (ca.7.2 kb) tragenden pBS-Vektor, direkt vor die TKNeoloxP-Kassette ligiert. Die Ligation wurde gefällt, in 5 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert, in XL1Blue-Zellen elektroporiert und anschließend ausplattiert. Es wurden 94 Kolonien mittels einer Kolonie-PCR auf das genomische Fragment (Primer: MK2Test4/5; Größe: 967 bp), die TKNeo-Kassette (Primer: TKNeoRev1/2; Größe: 160 bp) und das loxP-Element (Primer: loxPori3sense/ CT8TKNeoloxPStuI.1; Größe: 57 bp) getestet. Von den 49 positiven Klonen, wurde die DNA mittels Easy Prep aufgereinigt und anschließend mit *NotI* linearisiert. Bei 38 Klonen konnte ein ca. 12,7 kb großes Fragment identifiziert werden. Diese Fragmentgröße entspricht dem pBS-Vektor mit der genomischen Sequenz und der TKNeoloxPII-Kassette. Durch eine weitere PCR wurde die Orientierung des genomischen Fragmentes ermittelt (Primer: TKNeoRev2/TestMK2.1 Größe 900 bp). Von den 49 Klonen tragen 21 Klone das genomische Fragment in der gewünschten Orientierung. Es wurden 6 Klone mit den M13 Vektorprimern ansequenziert, und die Sequenzen mit der Gesamtsequenz des fertigen Konstruktes verglichen, um die Orientierung zu verifizieren.

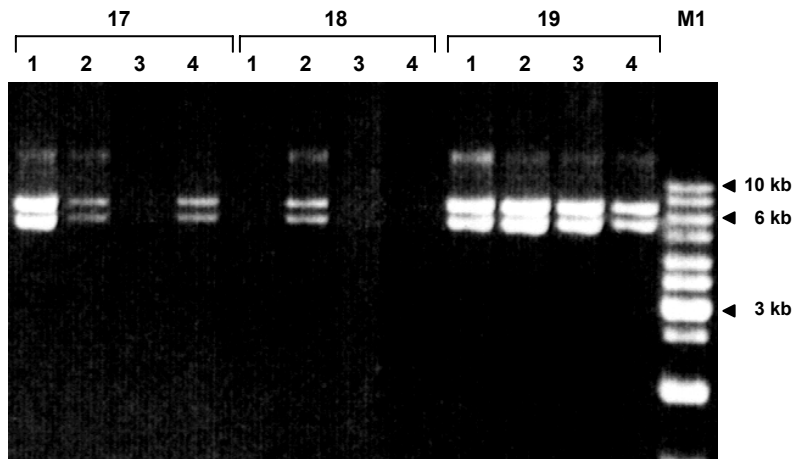
Da der Vergleich der sequenzierten Fragmente der 6 Klone mit der Gesamtsequenz die richtige Orientierung ergab, wurden die Klone durch folgende Testverdaus weiter überprüft:

- *NotI* linearisiert den 12,7 kb großen Targetingvektor, indem es ein Mal in der pBS-Vektorsequenz schneidet.
- *SpeI* schneidet das genomische Fragment aus dem Vektor, so dass zwei Fragmente von ca. 5,5 (genomische Sequenz) und 7,2 kb (pBS-Vektor und TKNeoloxPII-Kassette) entstehen.
- *BclI* linearisiert ebenfalls den Targetingvektor, allerdings befindet sich die Schnittstelle innerhalb des genomischen Fragmentes.



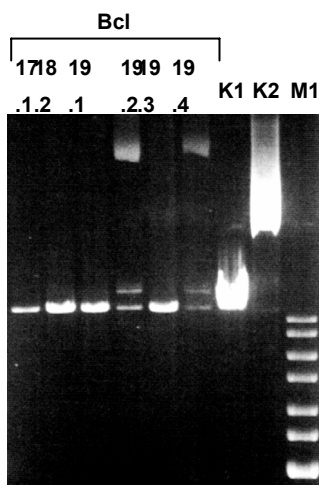
**Abb. 4.13: Restriktionsverdau des Targetingvektors B4\_TKNeoloxP.** 6 positive Klone, die jeweils das genomische Subfragment des BAC 135B4, die TKNeoloxPII-Kassette und das pBS-Vektorrückgrat tragen, wurden mit *BclI*, *SpeI* und *NotI* geschnitten. Als Kontrolle sind die DNAs der ungespaltenen Klone aufgetragen. (M1 = Lader Mix; M2 =  $\lambda$  HindIII)

Wie in der Abbildung 4.13 zu sehen ist, schneiden die Enzyme *SpeI* und *NotI* einwandfrei, wohingegen *BclI* sich nicht von der ungespaltenen DNA unterscheidet. Der Grund dafür ist, daß *BclI* eine methylierungssensitive Erkennungssequenz besitzt und der *E.coli* XL1Blue-Stamm die Dam- und Dcm-Methylasen enthält. Die Restriktionsschnittstellen werden methyliert und können von dem Enzym nicht mehr erkannt werden. Deshalb wurde die DNA von drei Kolonien (Kol. 17, 18, 19) in den Methylase defizienten *E.coli*-Stamm SCS110 transformiert. Es wurde von jeweils vier Kolonien eine alkalische Lyse angefertigt und die DNA zunächst mit *SpeI* verdaut (siehe Abb. 4.14), um zu überprüfen ob die Klone den pBS-Vektor mit der genomischen Sequenz besitzen.



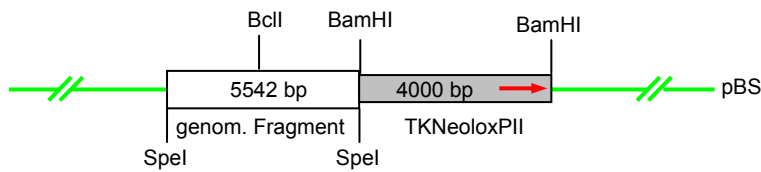
**Abb. 4.14: *SpeI* Testspaltung der B4\_TKNeoloxP Klone in SCS110 *E.coli*-Zellen.** Nach der Transformation der DNA der B4\_TKNeoloxP-Klone 17, 18 und 19 in den *E.coli*-Stamm SCS110 wurden jeweils 4 Kolonien ausgewählt, die DNA durch alkalische Lyse aufgereinigt und mit *SpeI* testgespalten. Positive Klone zeigen 2 Fragmente der Größe 7,2 und 5,5 kb. (M1 = Ladder Mix).

Anschließend wurden sechs Kolonien (17.1, 18.2, 19.1-4) für eine Linearisierung mit *BclI* ausgewählt (siehe Abb. 4.15). Vier der sechs verdauten DNAs wurden vollständig gespalten.



**Abb. 4.15: *BclI* Testspaltungen der B4\_TKNeoloxP-Klone in SCS110 *E.coli*-Zellen.** Von den in Abb. 4.14 gezeigten Klone wurden folgende für einen *BclI* Verdau ausgewählt: 17.1, 18.2, 19.1-4. Bei Klon 17.1, 18.2, 19.1 und 19.3 sieht man das linearisierte 12,7 kb Konstrukt. Bei 19.2 und 19.4 ist zusätzlich noch ungespaltenes Produkt zu sehen. In Spur K1 ist zur Fragmentgrößenkontrolle der durch *NotI* gesplattene B4\_TKNeoloxP Klon 18 (in XL1Blue) aufgetragen und in Spur K2 der ungesplattene Klon. (M1 = Ladder Mix)

Der Klon 19.3 wurde für eine DNA-Maxi-Präparation ausgewählt. Die Aufreinigung der DNA zeigte zuerst einen sehr starken Hintergrundschmier, der vermutlich auf eine Kontamination mit *E.coli* DNA zurückzuführen ist. Diese Kontamination verschwand erst, als die Bakterien vor dem Animpfen der  $\mu$ N Kultur als Einzelkolonieausstrich auf einer Agar-Platte angezogen wurden. Die DNA der nachfolgenden Maxi-Präparation wurde mit *BclI*  $\mu$ N gespalten, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, gefällt und in sterilfiltriertem TE mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l aufgenommen. Die DNA war nun einsatzbereit für die Elektroporation in ES-Zellen. In Abbildung 4.16 ist der Aufbau des nun vorliegenden Konstruktes noch einmal schematisch dargestellt.



**Abb. 4.16: Schematische Darstellung des Insertionsvektors B4\_TKNeoloxP.** Es sind die relevanten Komponenten des Deletionsvektors gezeigt: links die genomische Sequenz mit der *BclI*-Schnittstelle zum Linearisieren des Konstruktes; rechts daneben die TKNeo-Resistenzkassette mit dem loxP-Element (roter Pfeil). Die Komponenten wurden in den pBS-Vektor kloniert.

#### 4.4.1.2 Orientierung des genomischen Fragmentes (135B4\_SF)

Eine Analyse der zur Verfügung stehenden Sequenzcontigs ergab, dass das Contig (8362 bp) in dem das 135B4\_SF Fragment lag, eine Überlappung zu einem anderen Contig (18822 bp) zeigte, so dass insgesamt 19541 bp Sequenz für die Orientierung des Fragmentes genutzt werden konnten. Es wurde über eine elektronische PCR untersucht, ob die in der Region des Ursprungs-BACs verfügbaren Marker in dem vorliegenden 19541 bp Contig vorkommen. Diese Art der PCR vollzieht sich *in silico*, d.h. es wird mit Hilfe eines Programmes, wie z.B. „BLAST 2 Sequences“, untersucht, ob die Markersequenzen innerhalb der zu analysierenden Sequenz wieder zu finden sind. Die in Tabelle 4.6 aufgelisteten Marker wurden eingesetzt. Es konnte aber keiner der Marker auf dem Fragment lokalisiert werden.

**Tab. 4.6: Signale der verwendeten Marker**

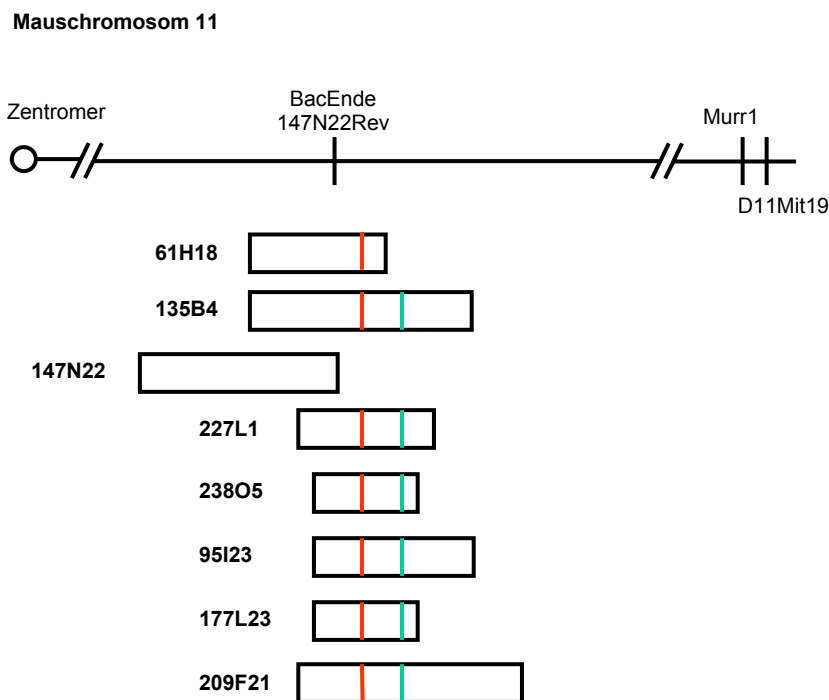
Marker	Positiv/Negativ	Marker	Positiv/Negativ
HSPC159	-	135B4F	-
66E5F	-	147N22rev	-
66E5rev	-	343aR	-

Zur weiteren Untersuchung wurden an den Enden der verfügbaren zusammengesetzten Sequenz (19541 bp) Primerpaare (MK2-0872.1/2 und MK2-0872.3/4 Produktgröße: jeweils 500 bp) generiert, um durch PCR-Tests eine Orientierung des 135B4\_SF Fragmentes zu ermöglichen (siehe Tab.4.7). Als *template* für diese PCRs dienten die BACs des Contigs. Durch den Unterschied, der mit dem BAC 61H18 erzielt werden konnte (grau unterlegt), wurde das Fragment 135B4\_SF schließlich, relativ zum BAC-Contig, orientiert. Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass das Primerpaar MK2-0872.1/2 proximal und das

Primerpaar MK2-0872.3/4 distal liegt. Die Kartierungsdaten sind in Abbildung 4.17 schematisch dargestellt.

**Tab. 4.7: Kartierung der neu generierten STS-Marker MK2-0872.1/2 und MK2-0872.3/4 auf den BACs des Contigs**

Getestete BACs	Signal für MK2-0872.1/2	Signal für MK2-0872.3/4
226N3	-	-
1C2	-	-
66E5	-	-
61H18	+	-
135B4 (positiv Kontrolle)	+	+
147M24	-	-
147N22	-	-
227L1	+	+
238O5	+	+
95I23	+	+
177L23	+	+
209F21	+	+
126P12	-	-
238H8	-	-
76L14	-	-
1D5	-	-



**Abb. 4.17: Orientierung des 135B4\_SF Fragmentes mittels PCR.** (rot = Primerpaar MK-0872.1/2; grün = Primerpaar MK-0872.3/4)

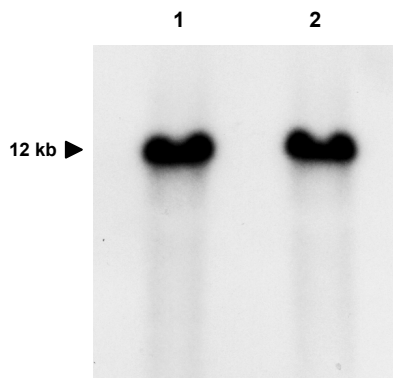
#### 4.4.1.3 Hybridisierungs sonden

Zur späteren Detektierung des Insertionsereignisses in den ES-Zellen wird eine spezifische DNA-Sonde benötigt. Deshalb werden flankierend zur genomischen DNA im Targetingvektor Restriktionsenzyme ausgewählt, die nicht innerhalb der homologen genomischen DNA des Targetingvektors schneiden und die eine Unterscheidung zwischen unbehandelter ES-Zell-DNA und korrekt integriertem Targetingvektor erlauben. Hierzu sollten Fragmentgrößenunterschiede von mindestens 500-1000 bp vorliegen. Je kleiner die zu detektierenden Fragmente, desto geringer ist der benötigte Größenunterschied, um die Restriktionsstücke gut voneinander unterscheiden zu können. Unter Verwendung der vorliegenden Sequenzinformationen wurden zwei Restriktionsenzyme, *EcoRV* und *BstXI*, ausgewählt. Das *EcoRV* Fragment wurde zuerst ausgetestet, da die Restriktionsfragmentgrößen kleiner und damit besser durch Hybridisierung mit einer Sonde zu testen waren. In der unveränderten ES-Zell-DNA erzeugt die Spaltung mit *EcoRV* ein Fragment der Größe 6377 bp. Die Integration des Targetingvektors dagegen vergrößert die Fragmentlänge. Durch die zusätzlich eingeführte *EcoRV* Schnittstelle des pBS-Vektorrückgrades entsteht ein 9362 bp Fragment. Die Differenz der beiden Fragmentgrößen beträgt also 2985 bp und ist gut im Southern Blot zu erkennen. Zur einwandfreien Detektierung der Fragmente sollten DNA-Sonden verwendet werden, die außerhalb der homologen Sequenz liegen. Die minimale Größe einer Hybridisierungssonde sollte 200 bp betragen. Die ideale Größe liegt zwischen 600 und



1500 bp. Der Abstand zwischen den flankierenden *EcoRV* Schnittstellen und der homologen DNA-Sequenz des integrierten Targetingvektors beträgt auf der einen Seite nur 10 bp, so dass hier keine Sonde generiert werden konnte. Auf der anderen Seite existiert ein Bereich von 825 bp, in den eine Hybridisierungssonde gelegt werden konnte. Die Analyse der flankierenden Sequenzbereiche der Sequenz des genomischen Fragmentes mit dem „RepeatMasker“ Programm zeigte keine *repeats* in dem für die Sonde relevanten Bereich. Zur Generierung der Sonde wurden Primer ausgewählt (MK2EcoRVA/B), die ein PCR-Produkt der Länge 679 bp erzeugten. Dieses PCR-Fragment wurde in den pGEM-T Easy-Vektor kloniert und die Klone durch eine alkalische Lyse und eine anschließende Spaltung mit *EcoRI* untersucht. Ein positiver Klon, der das Fragment enthält, wurde als Hybridisierungssonde eingesetzt. Es wurden 10 µg genomische, unbehandelte ES-Zell-DNA mit *EcoRV* üN gespalten, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, die DNA durch Southern Blotting auf eine Nylonmembran übertragen, durch UV-Crosslinking fixiert und für die Hybridisierung eingesetzt. Das Ergebnis der Hybridisierung war ein Schmier, der über die gesamte Spur der mit *EcoRV* geschnittenen DNA verteilt war. Dies lässt auf repetitive Anteile innerhalb der Sonde schließen. Deshalb wurde noch einmal auf genomische *repeats* überprüft, diesmal jedoch nur mit der Sondensequenz allein. Jetzt erkannte das „RepeatMasker“ Programm ein 258 bp langes LTR-Element an einem Ende der Sonde. Die Wahl eines neuen Primers und die Amplifikation des Sequenzbereiches, der laut Programm repeatfrei war, erzielte jedoch bei der nachfolgenden Testhybridisierung ein ähnliches Ergebnis wie bei der ersten Hybridisierung.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde das zweite zur Wahl stehende Enzym *BstXI* für Restriktionsanalysen getestet. Die Fragmentgrößen sind hier sehr viel größer: in der nicht-modifizierten DNA entsteht ein 11727 bp Fragment, wohingegen bei korrekter Integration des Targetingvektors ein 18559 bp Fragment entsteht (siehe Abb. 4.34). Die Differenz von 6832 bp sollte die Detektion des Größenunterschieds erlauben, dennoch lagen anfänglich Bedenken vor, ob Fragmente in dieser Größe noch gut zu detektieren sind. Die Hybridisierungssonden konnten wieder nur auf eine Seite gelegt werden, da auf der anderen Seite nur 106 bp zwischen der homologen Sequenz des Targetingvektors und der *BstXI* Schnittstelle lagen. Die zur Verfügung stehende Region war mit 6079 bp jedoch sehr groß, so dass drei potentielle Sonden (F1=1288 bp, F2=1170 bp, F3=1287 bp) ausgewählt werden konnten, die mittels PCR amplifiziert und in den pGEM-T Easy-Vektor kloniert wurden. Die DNA von je drei positiven Kolonien wurde durch alkalische Lysen aufgereinigt und das Insert mit folgenden Enzymen herausgespalten: F1-*HindIII/NcoI*; F2-*HindIII/SpeI*; F3-*NcoI*. Die Insert DNA (=Sonde) wurde dann durch einen Gellauf von der Vektor-DNA getrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt. Alle drei Sonden wurden für eine Testhybridisierung mit *BstXI* gespaltenen ES-Zell-DNA eingesetzt. Bei allen Sonden konnte eine spezifische Bande bei ca. 12 kb identifiziert werden. Das intensivste Signal wurde mit der Sonde F2 erhalten, die deshalb für weitere Hybridisierungen eingesetzt wurde (siehe Abb. 4.18).

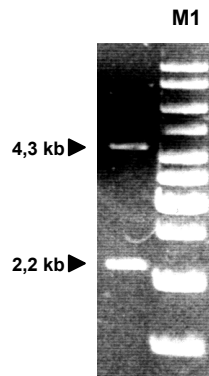


**Abb. 4.18: Testhybridisierung von *BstXI* gespaltener ES-Zell-DNA mit der Sonde F2.** Die gespaltene ES-Zell-DNA wurde doppelt aufgetragen (Spur 1 und 2).

## 4.4.2 Insertionsvektor A5\_TKNeoloxP

### 4.4.2.1 Ligation der Einzelfragmente

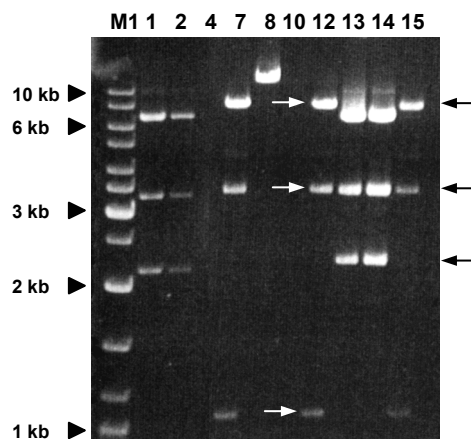
Ein weiterer Deletionsendpunkt wurde im distalen Bereich der *wobbler* kritischen Region gewählt. Das Subfragment des BAC 160A5 (ca. 8,2 kb im pBS-Vektor) wurde für den homologen genomischen Bereich des Targetingvektors ausgewählt. Das genomische Fragment des BAC 160A5 ist über *BamHI* in den pBS-Vektor kloniert worden. Die *BamHI* Schnittstelle eignete sich aber nicht, um das Fragment in den, die TKNeoloxPII-Kassette tragenden, Vektor einzusetzen, da *BamHI* ebenfalls in der TKNeoloxPII-Kassette schneidet. Ein Testverdau des genomischen Fragmentes mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen ergab, dass *SpeI* ein Mal innerhalb der genomischen Sequenz und ein Mal im Vektorrückgrat schneidet. Dadurch wird ein ca. 1,7 kb großes Fragment von der genomischen DNA abgespalten und es bleibt ein genomisches Reststück von 6,5 kb übrig. Die flankierenden *SpeI* Schnittstellen ermöglichen eine Klonierung des Fragmentes in den die Resistenzkassette tragenden Vektor. Weiterhin konnte eine *Eco47III* Schnittstelle innerhalb des *SpeI* Fragmentes identifiziert werden, die das *SpeI* Fragment in ein 4,4 kb und ein 2,2 b Fragment spaltet. Diese Schnittstelle ist wichtig, um den fertigen Insertionsvektor vor der Elektroporation in die ES-Zellen zu linearisieren (siehe Abb. 4.19).



**Abb. 4.19: Spaltprodukte des genomischen Subfragments 160A5 durch *SpeI* und *Eco47III* Verdau.**

Das durch *SpeI* flankierte genomische Subfragment des BAC 160A5 wurde mit *Eco47III* gespalten. Es entstehen zwei Fragmente der Größen 4,3 kb und 2,2 kb.

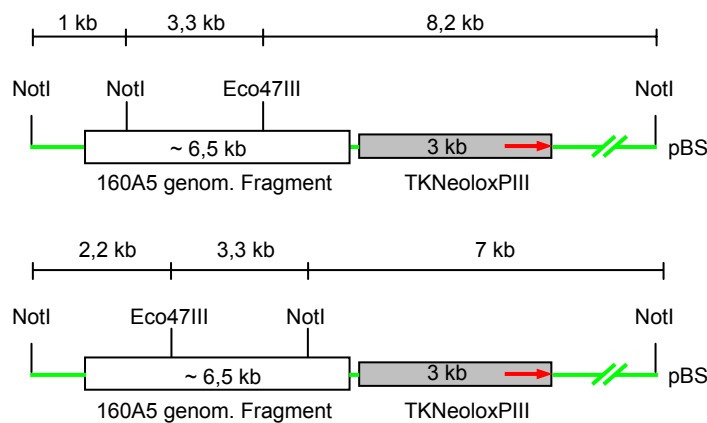
Das genomische Fragment wurde über die *SpeI* Schnittstelle in den TKNeoloxPIII pBS-Vektor eingesetzt. Die TKNeoloxP-Kassette III wurde in diesem Fall ausgewählt, da sie um 1 kb kleiner ist als die TKNeoloxP-Kassetten I und II und weniger interne Schnittstellen besitzt. Nach der Transformation wurden die Klone mittels einer PCR auf die genomische BAC-Endsequenz (Primer: 160A5 Reva2/b2; Produktgröße: 587 bp) getestet. Anschließend wurde die DNA der Klone durch eine alkalische Lyse aufgereinigt und mit *NotI* und *Eco47III* in einem Doppelverdau gespalten. Bei diesem Verdau entstanden drei Fragmente (siehe Abb. 4.20).



**Abb. 4.20: Testverdau der A5\_TKNeoloxP-Klone mit *NotI* und *Eco47III*.**

Die durch die PCR ermittelten positiven Klone wurden mit *NotI* und *Eco47III* gespalten. Das Gel zeigt, dass zwei unterschiedliche Bandenmuster bei der Spaltung entstehen, die auf unterschiedliche Orientierungen des genomischen Inserts schließen lassen.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass für das Enzym *Eco47III* nur eine Schnittstelle innerhalb des genomischen Fragmentes existiert, muss neben der *NotI*-Schnittstelle des Vektors noch eine zweite *NotI* Schnittstelle in dem genomischen Fragment existieren. Der Doppelverdau zeigte weiterhin zwei unterschiedliche Spaltungsmuster bei den analysierten Klonen. Es entstanden entweder die Fragmentgrößen 8,2 kb, 3,3 kb und 1 kb oder Fragmente mit den Größen 7 kb, 3,3 kb und 2,2 kb. Diese unterschiedlichen Größenkombinationen lassen auf die unterschiedliche Orientierung des inserierten genomischen Fragmentes schließen. Die Spaltungsergebnisse sind schematisch in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



**Abb. 4.21: *NotI* und *Eco47III* Spaltprodukte in Abhängigkeit von der Orientierung des genomischen Fragmentes.**

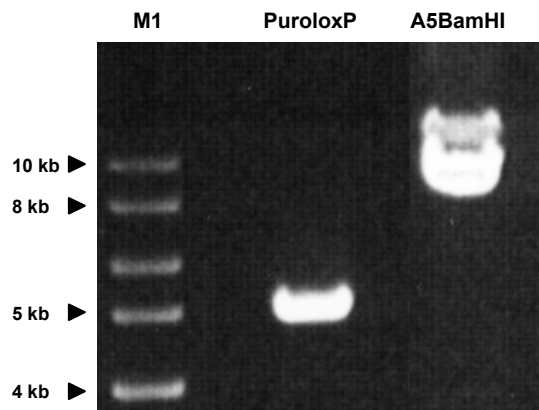
Die Orientierung der genomischen Inserts wurde zusätzlich durch eine PCR mit einem Vektor-Primer (M13 Reverse) und einem für das BAC-Ende spezifischem Primer (160A5Revb2) überprüft. Ein PCR-Produkt (ca. 600 bp) konnte nur bei den Klonen mit dem Spaltungsmuster 8,2 kb, 3,3 kb und 1 kb amplifiziert werden. Einer von diesen Klonen (Kolonie 12) wurde ansequenziert. Die Sequenzanalyse bestätigte die bereits zuvor bestimmte Orientierung des genomischen Fragmentes.

## 4.4.3 Insertionsvektor A5\_PuroloxP

### 4.4.3.1 Ligation der Einzelfragmente

Das Subfragment des BAC 160A5 wurde ebenfalls für die Konstruktion eines Puromycin tragenden Insertionsvektors ausgewählt. Für die Konstruktion dieses Vektors konnte das über *BamHI* subklonierte genomische Fragment des BAC 160A5 eingesetzt werden, da die PuroloxP-Kassette I keine *BamHI* Schnittstelle enthält, so dass das genomische Fragment über *BamHI* in den PuroloxPI-Vektor kloniert

werden konnte. In Abbildung 4.22 sind die für die Ligation eingesetzten Einzelfragmente dargestellt (PuroloxP: 5,3 kb; A5BamHI Fragment: 8,2 kb). Nach der Transformation wurden die Klone mittels einer PCR (160A5 Reva2/b2, Produktgröße 587 bp) auf die Integration des genomischen Fragmentes getestet. Die resultierenden positiven Klone wurden anschließend noch auf die Orientierung des genomischen Inserts durch eine weitere PCR (Primer M13 Forward / 160A5Revb2; Fragmentgröße: ca. 600 bp) getestet.



**Abb. 4.22: PuroloxPI-Vektor und das genomische Subfragment 160A5.** Der Vektor und das Subfragment wurden mit *BamHI* geschnitten. (M1=Ladder Mix)

Der Klon Nr.4 besitzt die benötigte Orientierung der genomischen Sequenz. Die teilweise Sequenzierung dieses Klons bestätigte die Orientierung des Inserts. Die Linearisierung dieses Vektorkonstruktes kann durch eine Spaltung mit *Eco47III* erfolgen.

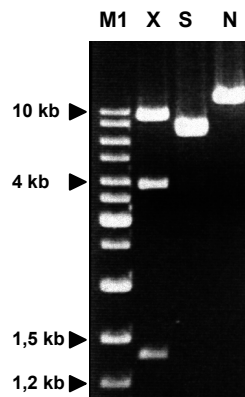
#### 4.4.3.2 Orientierung des genomischen Subfragmentes (160A5)

Das Subfragment des BAC 160A5 wurde durch das BAC-Ende 160A5Rev relativ zum Ursprungsbac 160A5 orientiert. Die Orientierung des BACs wiederum erfolgte durch ein STS-*Mapping* der BAC-Enden auf dem YAC-Contig. Eine zusätzliche Bestätigung der Orientierung durch die öffentliche Maus *working draft* Sequenz war bisher nicht möglich, da keine zu den BAC-Enden 160A5Rev und 160A5For homologen Sequenzen identifiziert werden konnten. An dieser Position ist die *working draft* Sequenz noch lückenhaft. Die Etablierung einer geeigneten Hybridisierungssonde für die Insertionsvektoren A5\_TKNeoloxPIII und A5\_PuroloxPI war somit auch nicht möglich und muss so lange zurückgestellt werden, bis geeignete Sequenzinformationen vorliegen.

## 4.4.4 Insertionsvektor L2\_TKNeoloxP

### 4.4.4.1 Ligation der Einzelfragmente

Für die Herstellung dieses Deletionsvektors wurde das in den Topo PCRII klonierte PCR-Fragment 124L2\_SF mit *SpeI* geschnitten und das entstehende Fragment (7479 bp) aufgereinigt. Dieses Fragment wurde in den mit *SpeI* geöffneten TKNeoloxP-II-Vektor (ca. 7000 bp) ligiert. Insgesamt wurde von 356 Kolonien die DNA durch eine Easy Prep aufgereinigt und ungespalten auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Größenkontrolle diente ein ungespaltenes ca. 14 kb großes Plasmid. Es konnten zwei positive Klone identifiziert werden, deren ungespaltene DNA sich im Gel wie die Kontroll-DNA verhielt. Es wurden PCR-Tests auf das Vorhandensein der genomischen DNA (Primer: MK14Test3/4, Produktgröße: 1300 bp), der TKNeo-Kassette (Primer:TKNeoRev1/2, Produktgröße: 160 bp) und der loxP-site (Primer: loxPori3sense/CT8TKNeoloxPStuI.1,Produktgröße: 57 bp) durchgeführt, die für beide Kolonien positiv waren. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen: *NheI*, *SpeI* und *XbaI* durchgeführt (siehe Abb. 4.23). *NheI* ist das Enzym, mit dem das fertige Konstrukt linearisiert werden soll. Es ist deutlich zu sehen, dass es nur ein Mal schneidet. *SpeI* erzeugt zwei Fragmente der Größe 7 kb und 7,5 kb, die aufgrund des geringen Größenunterschiedes im Gel nicht aufgetrennt werden und deshalb als nur eine Bande erscheinen. Dies sind die Fragmente, die ursprünglich in die Ligationsreaktion eingesetzt wurden. *XbaI* wurde eingesetzt, um die Gesamtgröße des Vektorkonstruktes besser ermitteln zu können, da es zwei Mal im genomischen Fragment und ein Mal im Vektor schneidet. Durch den Verdau entstehen die folgenden Fragmente: 9,4 kb, 3,8 kb und 1,3 kb. Das ergibt eine Größe von ca. 14,5 kb für das Vektorkonstrukt. Die Addition der einzelnen Ligationsfragmente ergibt ebenfalls eine Größe von 14,5 kb. Der Deletionsvektor besteht demnach aus den gewünschten Einzelkomponenten. Die Endsequenzierung des Vektorkonstruktes bestätigte die PCR- und Spaltungsanalysen. Der Deletionsvektor kann wie gezeigt durch eine Spaltung mit *NheI* linearisiert und direkt für Zellkulturexperimente eingesetzt werden. Für die folgende Southern Blot Analyse der elektroporierten ES-Zellklone könnte z.B. *HindIII* eingesetzt werden.



**Abb. 4.23:** Testspaltung des L2\_TKNeoloxP-Vektors mit den Enzymen *XbaI*, *SpeI* und *NheI*. (X=*XbaI*, S=*SpeI*, N=*NheI*, M1=Ladder Mix)

#### 4.4.4.2 Orientierung des genomischen Fragmentes (124L2\_SF)

Im Fall der Orientierung des Fragmentes 124L2\_SF konnten durch eine Sequenzanalyse ebenfalls zwei Contigs assembliert werden. Die Sequenz, die anschließend zur Verfügung stand hatte eine Gesamtlänge von 61179 bp. Die Sequenz wurde in drei ca. 20000 bp große Teile geteilt (Teil I; Teil II; Teil III), die jeweils mit den in der Tabelle 4.8 aufgeführten Markern wieder elektronisch untersucht wurden.

**Tab. 4.8:** Verwendete Marker zur Orientierung des 124L2\_SF Fragmentes.

Marker	PCR-Signal(Teil I)	PCR-Signal (Teil II)	PCR-Signal (Teil III)
124L2uni	-	-	+
135B4rev	-	-	+
178F18rev	-	+	-
152P17rev	-	-	-
45M7uni	-	-	-
m44/pellino 5'UTR	-	-	-
124L2rev	-	-	-
201L21uni	-	-	-
201L21rev	-	-	-

Anhand der durchgeführten Sequenzanalysen konnte das 61179 bp Fragment, welches das 124L2\_SF Fragment beinhaltet, orientiert werden. Innerhalb eines weiteren Sequenzcontigs des BAC 124L2 konnten der 5'UTR-Bereich des Pellino Gens und der Endmarker 124L2Rev des BACs lokalisiert werden. Die beiden Sequenzcontigs zeigen allerdings keine Überlappung, so dass die Größe der Sequenzlücke

zwischen den Contigs nicht bestimmt werden konnte. In Abbildung 4.24 ist diese Orientierung schematisch dargestellt.

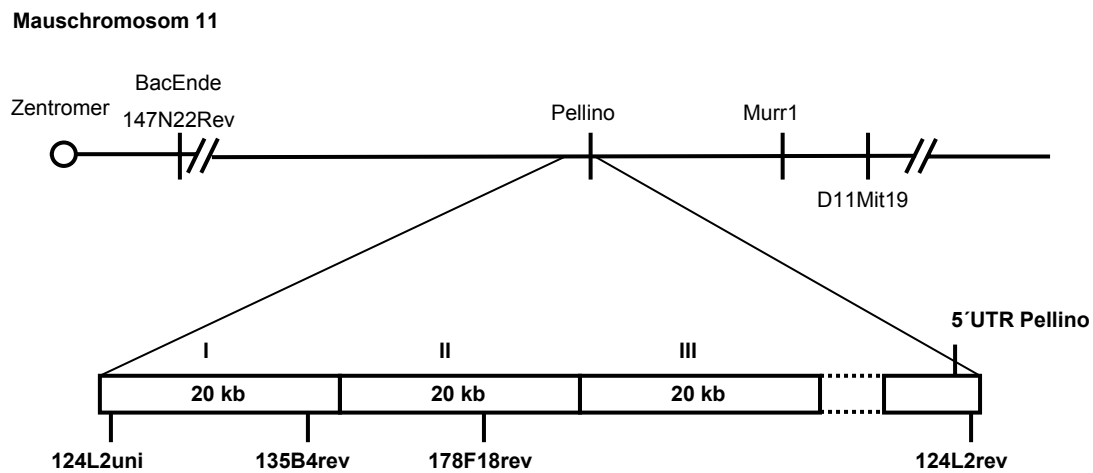


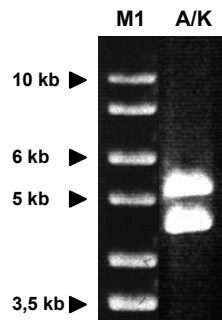
Abb. 4.24: Orientierung des 124L2 Fragmentes.

## 4.4.5 Insertionsvektor K22\_PuroloxP

### 4.4.5.1 Ligation der Einzelfragmente

Das subklonierte genomische Fragment 185K22\_SF wurde ausgewählt, um einen Insertionsvektor zu konstruieren, der eine PuroloxP-Kassette trägt. Das beidseitig flankierende Enzym *SpeI* konnte in diesem Fall allerdings nicht für die Umklonierung in den PuroloxPI-Vektor eingesetzt werden. *SpeI* wurde aus der MCS des PuroloxPI-Vektors durch das Einklonieren der PuroloxP-Kassette über *BamHI* und *NotI* entfernt. Eine Schnittstellenanalyse der genomischen DNA und der PuroloxP-Kassette ergab, dass die Klonierung über die Schnittstellen *ApaI* und *KpnI* möglich war. Das genomische Fragment (4406 bp) und der PuroloxPI-Vektor (ca. 5300 bp) wurden mit *ApaI* und *KpnI* verdaut und ligiert. Es wurden 24 Kolonien durch eine Easy Prep und anschließenden Verdau mit *ApaI* und *KpnI* getestet. Ein Klon zeigte das korrekte Spaltungsmuster (Kol.4, siehe Abb. 4.25). Der fertige Deletionsvektor kann mit *AflIII* oder *Van9II* linearisiert werden und steht somit für weitere Experimente zur Verfügung.





**Abb. 4.25: Doppelverdau des Vektors K22\_TKNeoloxP (Kol.4) mit *ApaI* und *KpnI*.** Durch den Doppelverdau mit *ApaI* und *KpnI* entstehen die ursprünglich für die Ligation eingesetzten Fragmente 185K22\_SF (4406 bp) und PuroloxP I (ca. 5300 bp). (A=*ApaI*, K=*KpnI*, M1=Ladder Mix)

#### 4.4.5.2 Orientierung des genomischen Fragmentes (185K22\_SF)

Das 185K22\_SF Fragment stammt aus einem 12871 bp großen Contig. Die *in silico* Analyse mit den in Tabelle 4.9 angegebenen Markern zeigte, dass keiner der Marker in dem Sequenzabschnitt wieder zu finden war.

**Tab. 4.9: Verwendete Marker zur Orientierung des 185K22\_SF Fragmentes.**

Getestete Marker	Positiv/Negativ	Getestete Marker	Positiv/Negativ
203O19F	-	M1R	-
Mor2e/f	-	40J13f	-
Mor2a/b	-	48H20rev	-
72P24rev	-	65I11rev	-
139O9rev	-	219P9rev	-
219P17rev	-	UGP-M24c/d	-
219P17rev	-	UGP-24a/b	-
185K22f	-	MM-1	-
185K22rev	-	m109	-
D11Mit294	-	206F21rev	-

Es wurden, wie bereits für das Fragment 135B4\_SF beschrieben, zwei endständige Primerpaare generiert (MK5\_E1/2, Produktgröße: 600 bp und MK5\_E3/4 Produktgröße: 450 bp). Diese Primer wurden in einer PCR mit den folgenden BACs des Contigs eingesetzt: 45I18, 71M17, 193F23, 203O19, 220E4, 165L14, 40J13, 139O9, 72P24, 65I11, 219P17, 48H20, 185K22 (positiv Kontrolle), 219P9, 132F7, 132M6, 198D17, 206F21 und 224M3. Das Primerpaar MK5\_E1/2 erzeugte bei fast allen BACs ein 450 bp Fragment. Dies führte zu der Annahme, dass ein repetitives Element enthalten ist, das durch die „Repeatmasker“ Analyse nicht detektiert wurde. Das Ergebnis dieser PCR ist also nicht auswertbar. Die Auswertung der PCR mit dem Primerpaar MK5\_E3/4 dagegen zeigte nur ein einziges Signal mit der positiv Kontrolle BAC 185K22. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte das Fragment 185K22\_SF vorerst nicht kartiert werden. Die Veröffentlichung der Maus *working draft* Sequenz bot eine neue Möglichkeit, um dieses Fragment zu kartieren und zu orientieren. Die Sequenzanalyse des Fragmentes 185K22\_SF ergab, dass es auf Chromosom 11 an Position 25484180-25488587 (bp) mit einer Sequenzhomologie von 100% kartiert. Um einen Eindruck zu bekommen, was diese Information für die Lage des Fragmentes in unserem BAC-Contig bedeutet, wurden die Positionen der Marker BAC-Ende 147N22Rev, Murr1 und D11Mit19 ermittelt (siehe Tab.4.10). Die in der Tabelle aufgeführten Positionsdaten zeigen, dass das 185K22\_SF Fragment distal zum Marker D11Mit19 kartiert. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass der Ursprung BAC 185K22 chimäre Anteile besitzt. Dieses 185K22\_SF Fragment scheint zu den chimären Anteilen zugehören, da es nicht wie vermutet zwischen den Markern BAC-Ende 147N22Rev und Murr1 kartiert, sondern distal zu dem Marker D11Mit19.

**Tab. 4.10: Ermittelte Positionen der vier Marker.**

Marker	Position auf Chr. 11 (in bp)
BAC-Ende 147N22Rev	20976034-20976683
Murr1	22928994-23011797
D11Mit19	25456031-25456171
185K22_SF Fragment	25484180-25488587

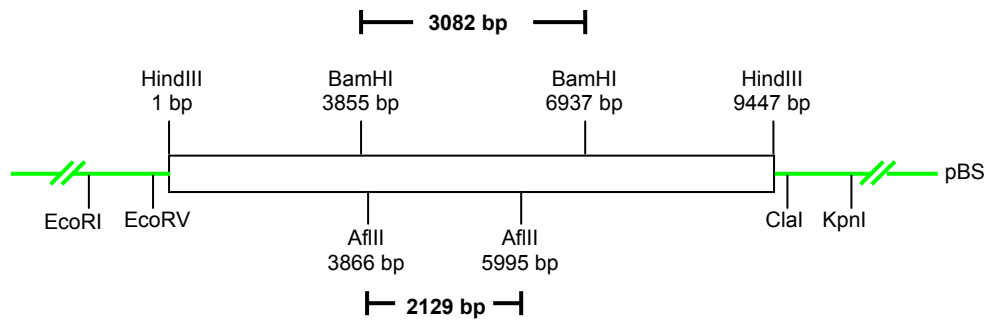
Trotz dieser nicht erwarteten Position des 185K22\_SF Fragmentes, kann der Insertionsvektor K22\_PuroloxP zur Erzeugung von Deletionen im Mausgenom eingesetzt werden.

#### 4.4.6 Replacementvektor O9\_PuroloxP

##### 4.4.6.1 Ligation der Einzelfragmente

Das genomische 9447 bp große Subfragment des BAC 139O9 wurde unter meiner Betreuung von Daniela Ehling im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Ehling, 1999) isoliert und in einen pBS-Vektor kloniert,

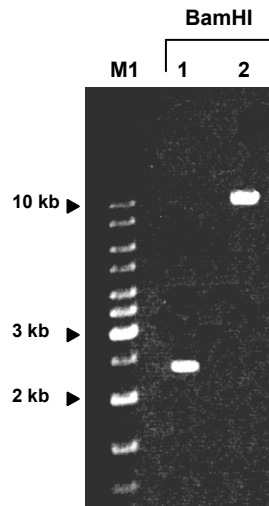
der keine intakte *BamHI* Schnittstelle mehr besitzt (pBS-SKΔBam). Aufgrund der durch die Kooperation mit dem IMB in Jena zur Verfügung gestellten Sequenzdaten konnte mit Hilfe des „WebCutter“ Programmes eine Schnittstellenanalyse durchgeführt werden. Diese Analyse ergab, dass innerhalb der 9447 bp Sequenz zwei *AflIII* Schnittstellen bei bp 3866 und bp 5995 lokalisiert waren.



**Abb. 4.26: Subfragment des BAC 13909.** Hier ist das 9447 bp große Subfragment des BAC 13909 dargestellt. Das Fragment ist über *HindIII* in den pBS-skΔBam-Vektor kloniert worden. In der Mitte des Fragmentes sind zwei *AflIII* und zwei *BamHI* Schnittstellen. Durch den Restriktionsverdau mit *AflIII* fällt ein 2129 bp und durch den Verdau mit *BamHI* ein 3082 bp Fragment aus dem Vektor heraus.

Für die Konstruktion des Replacementvektors bot sich an, die *AflIII* Schnittstellen für die Integration der PuroloxPII-Kassette zu verwenden. Durch Vorarbeiten lag die PuroloxPII-Kassette, flankiert von zwei *AflIII* Schnittstellen im Topo PCRII-Vektor vor. Die Ligationsversuche über die *AflIII* Schnittstelle ergaben keine positiven Klone. Eine Schnittstellenanalyse des PuroloxPII-Fragmentes in dem Topo PCRII-Vektor ergab aber, dass sich flankierend zur Resistenzkassette ebenfalls zwei *BamHI* Schnittstellen befanden. Der Restriktionsverdau mit *BamHI* hat einen kleinen Nachteil gegenüber *AflIII*: das Fragment, das innerhalb der genomischen DNA durch die beiden *BamHI* Stellen ausgeschnitten wird, ist mit 3082 bp um 953 bp größer als das *AflIII* Fragment, so dass die Länge des rechten homologen Sequenzabschnittes von vormals 3452 bp auf 2510 bp verkürzt ist (siehe Abb. 4.26). Da jedoch in der Literatur beschrieben ist, dass die untere kritische Sequenzlänge 2000 bp beträgt wurde der Versuch mit *BamHI* durchgeführt.

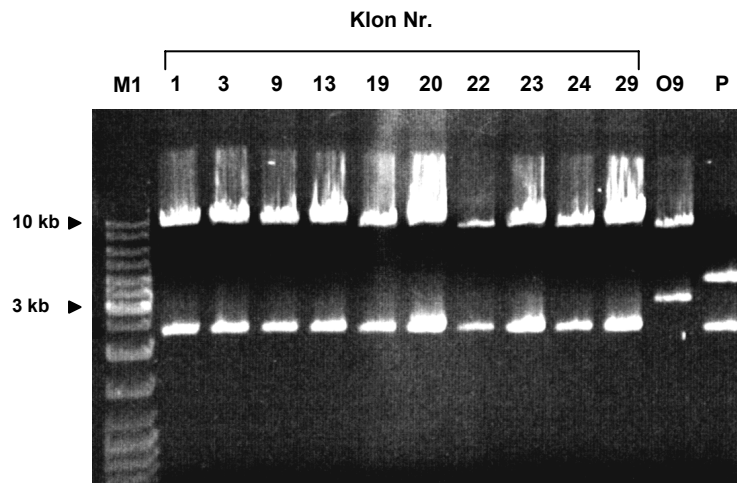
Das genomische Fragment (9447 bp) und die PuroloxPII-Kassette (2300 bp) wurden jeweils mit *BamHI* geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt, die Fragmente ausgeschnitten, aufgereinigt, in Wasser aufgenommen und ligiert (siehe Abb. 4.27).



**Abb. 4.27: Ligationsfragmente für den O9\_PuroloxP Replacementvektor.**

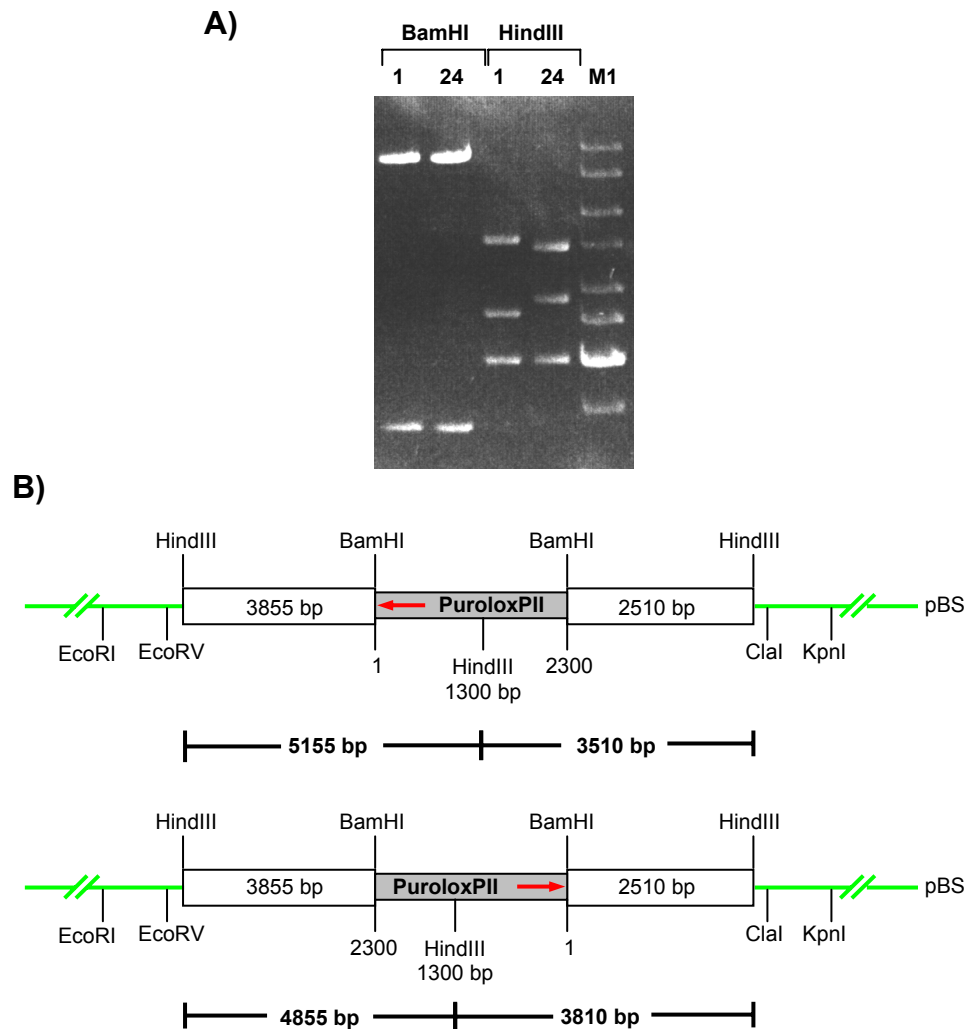
In Spur 1 ist die PuroloxPII-Kassette (2300 bp) zu sehen. Sie wurde über *BamHI* aus dem Topo PCRII-Vektor ausgeschnitten und durch eine Gelextraktion aufgereinigt. In Spur 2 ist das genomische Subfragment des BAC 139O9 (in dem Vektor pBS-SKΔBam) aufgetragen. Das Fragment stammt ebenfalls aus einer *BamHI* Spaltung und wurde durch eine Gelextraktion aufgereinigt. Die beiden Fragmente wurden für eine nachfolgende Ligation eingesetzt, bei der die PuroloxPII-Kassette über die *BamHI* Schnittstelle in das genomische Fragment integriert wurde. (M1 = Ladder Mix)

Die aus der Transformation in XL1Blue-Zellen resultierenden 29 Klone wurden durch eine PCR (Primer: 139O9Rev1/2, Produktgröße: 592 bp) auf das Vorhandensein des BAC-Subfragmentes getestet. Es zeigten 10 Klone das korrekte PCR-Produkt. Von diesen Klonen wurde die DNA durch eine alkalische Lyse aufgereinigt und anschließend mit *BamHI* gespalten (siehe Abb. 4.28). Als Kontrolle für den *BamHI* Verdau wurden parallel das genomische Subfragment des BAC 139O9 im pBS-SKΔBam Vektor und die PuroloxPII-Kassette im Topo PCRII-Vektor mit *BamHI* geschnitten (siehe Abb. 4.28). Alle getesteten Klone bestehen aus dem genomischen Subfragment inklusive Vektorrückgrat (12,4 kb) und der PuroloxPII-Kassette (2,3 kb). Bei den Kontrollen sind noch zusätzliche Banden zu sehen: die 3 kb Bande in der Spur des genomischen Fragmentes stammt von dem DNA-Stück, das durch den *BamHI* Verdau ausgeschnitten wird, die 4 kb Bande in der Spur des PuroloxPII-Vektors ist das Topo PCRII-Vektorrückgrat.



**Abb. 4.28: *Bam*HI Verdau der O9\_PuroloxP-Transformanten.** Die DNA von 10 Klonen wurde durch alkalische Lysen präpariert und mit *Bam*HI gespalten. *Bam*HI Kontrollspaltungen des genomischen Subfragmentes O9 (in pBS-SKΔBam) wurden ebenfalls durchgeführt. In der mit O9 bezeichneten Spur, entspricht das bei ca. 10 kb laufende Fragment dem bei der Ligation eingesetzten Fragment. Bei ca. 3 kb ist das über *Bam*HI aus der genomischen DNA herausgespaltene Mittelstück zu erkennen. In der letzten Spur (P) ist die PuroloxPII-Kassette (2300 bp) und das Vektorrückgrat des Topo PCRII-Vektors zu sehen. Bei allen getesteten Kolonien können eindeutig die PuroloxPII-Kassette sowie das O9 Fragment identifiziert werden. (M1 = Ladder Mix)

Alle getesteten Klone tragen das richtige Insert. Zwei der positiven Klone (Kol.1; Kol.24) wurden für eine DNA-Präparation ausgewählt. Eine Spaltung der beiden Klone mit *Hind*III zeigte, dass die PuroloxPII-Kassetten entgegengesetzte Orientierungen innerhalb der genomischen Fragmente besitzen (siehe Abb. 4.29).



**Abb. 4.29: A) Testspaltung der O9\_PuroloxP Replacementvektoren.** Zwei der positiv getesteten Kolonien wurden weiter charakterisiert (1, 24). Links ist der *Bam*HI Verdau aufgetragen, in dem die Fragmente der beiden Klone gleich groß sind. Rechts ist ein *Hind*III Verdau aufgetragen, der deutliche Unterschiede in den Fragmentgrößen zeigt. Die unterschiedlichen Größen der beiden oberen Banden lassen auf eine entgegengesetzte Integration der PuroloxPII-Kassette schließen. Die untere Bande, die bei beiden Klonen gleich ist, repräsentiert das Vektorrückgrat. (M1 = Ladder Mix)

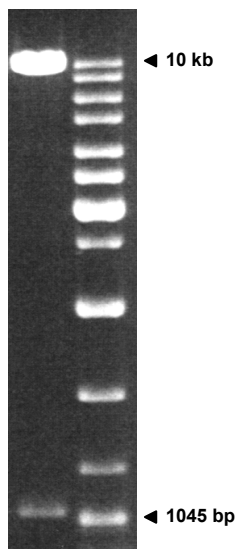
**B) Schematische Darstellung des Spaltungsmusters**

Die Orientierung der genomischen Sequenz und der PuroloxP-Kassette von Klon O9\_PuroloxP Kolonie 1 wurde durch Sequenzierungen verifiziert. Die Sequenzanalyse der Puromycin-Kassette ergab, dass durch die PCR-Reaktion zwei Punktmutationen in Form von Basenaustauschen stattgefunden haben. Bei bp 52 der codierenden Sequenz des Puromycin-Gens befindet sich auf der Nukleinsäureebene ein A anstatt eines C und bei bp 114 befindet sich ein T anstelle eines C. Der erste Austausch an Stelle bp 52 ersetzt das Codon CGG durch das Codon AGG. Dieser Austausch hat aber keine Auswirkungen auf die

Proteinsequenz, da beide Codons für die Aminosäure Arginin stehen. Der Austausch bei bp 114 ersetzt das Codon GAC durch das Codon GAT, was ebenfalls keine Auswirkung auf die Proteinsequenz hat, da beide Triplets für Aspartat kodieren. Der Vergleich der *codon usage* Häufigkeiten zeigte ebenfalls keine gravierenden Unterschiede.

Um die Funktionalität des Puromycin-Gens in Zellen zu testen, wurden Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen mit dem O9\_PuroloxP-Vektor transfiziert und mit Puromycin selektioniert. Die Zellen waren bei einer Puromycin-Konzentration von 5 µg/ml lebens- und teilungsfähig. Aufgrund der positiven Ergebnisse der beschriebenen Analysen, wurde der O9\_PuroloxP Replacementvektor (siehe Abb. 4.29B Kol.1, oberes Schema) trotz der beiden Punktmutationen im Puromycin-Gen für den weiteren Versuchsablauf eingesetzt.

Der Vektor O9\_PuroloxP Kol.1 wurde mit *PvuI* üN gespalten, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, gefällt und in sterilfiltriertem TE mit einer Endkonzentration von 1µg/µl aufgenommen (siehe Abb. 4.30). Die DNA war nun einsatzbereit für die Elektroporation in ES-Zellen.



**Abb. 4.30: *PvuI* Verdau des Replacementvektors O9\_PuroloxP.** Der Replacementvektor O9\_PuroloxP wurde für die nachfolgende Elektroporation in ES-Zellen mit *PvuI* gespalten, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und gefällt. Durch den *PvuI* Verdau wird ein 1045 bp Fragment aus dem Vektorrückgrat herausgeschnitten, das für die weiteren Experimente aber nicht störend wirkt.

#### 4.4.6.2 Orientierung des genomischen Subfragmentes (13909)

Das genomischen Subfragment des BAC 13909 (9447 bp) konnte direkt durch die BAC-Endsequenz 13909Rev relativ zu dem BAC-Contig orientiert werden. Da auch von diesem Fragment Sequenzen vorlagen, konnte eine *in silico* Analyse auf den Markergehalt des Fragmentes durchgeführt werden (siehe Tab.4.11). Eine weitere Sequenzanalyse des 13909 Subfragmentes durch das „BLAST“ Programm zeigt, dass die Exons 6, 7, 8 und 9 sowie der 3'UTR-Bereich von Mor2 enthalten sind.

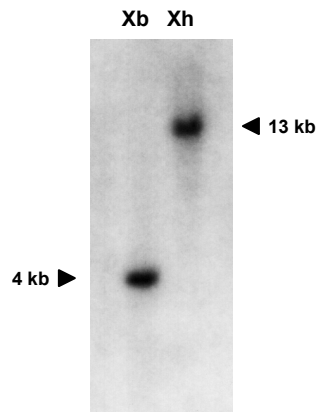
Tab. 4.11: Verwendete Marker zur Orientierung des 139O9 Subfragmentes

Getestete Marker	Positiv/Negativ	Getestete Marker	Positiv/Negativ
220E4For	-	185K22For	-
71M17Rev	-	219P9For	-
203O19For	-	185K22Rev	-
Mor2 e/f	-	D11Mit294	-
Mor2 a/b	+	M1R	-
72P24Rev	-	40J13For	-
139O9Rev	+	48H20Rev	-
219P17Rev	-	65I11Rev	-
139O9For	-	219P9Rev	-

#### 4.4.6.3 Hybridisierungssonde

Als Hybridisierungssonde wurde ein 605 bp Fragment gewählt, das außerhalb der homologen Sequenzbereiche liegt. Dieses Fragment wurde über eine PCR amplifiziert (Primer: 611P24U1/4, Produktgröße 605 bp), in den pGEM-T Easy-Vektor kloniert, über *EcoRI* ausgeschnitten und als aufgereinigtes Fragment als Sonde (U1/4) eingesetzt. Zum Test der Sonde wurde genomische DNA des Mausstammes 129 eingesetzt. Die DNA wurde mit den Enzymen *XbaI* und *XhoI*, die außerhalb der genomischen Sequenz schneiden, gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt (siehe Abb. 4.31). In jeder Spur ist nur eine einzige Bande zu erkennen, deren Größe mit den Sequenzdaten übereinstimmt: *XbaI* 4,083 kb und *XhoI* ca. 13 kb. Die Größe des *XhoI* Fragmentes konnte nicht genau ermittelt werden, da nur eine Restriktionsschnittstelle innerhalb der vorliegenden Sequenzdaten bekannt war. Aufgrund dieser Sequenzdaten konnte die Aussage getroffen werden, dass das Fragment größer als 12,194 kb sein muss. Die Hybridisierungsdaten zeigen eine Fragmentgröße von ca. 13 kb. Das Ergebnis der Testhybridisierung zeigt, dass das Fragment U1/4 als spezifische Sonde für nachfolgende Experimente eingesetzt werden kann.

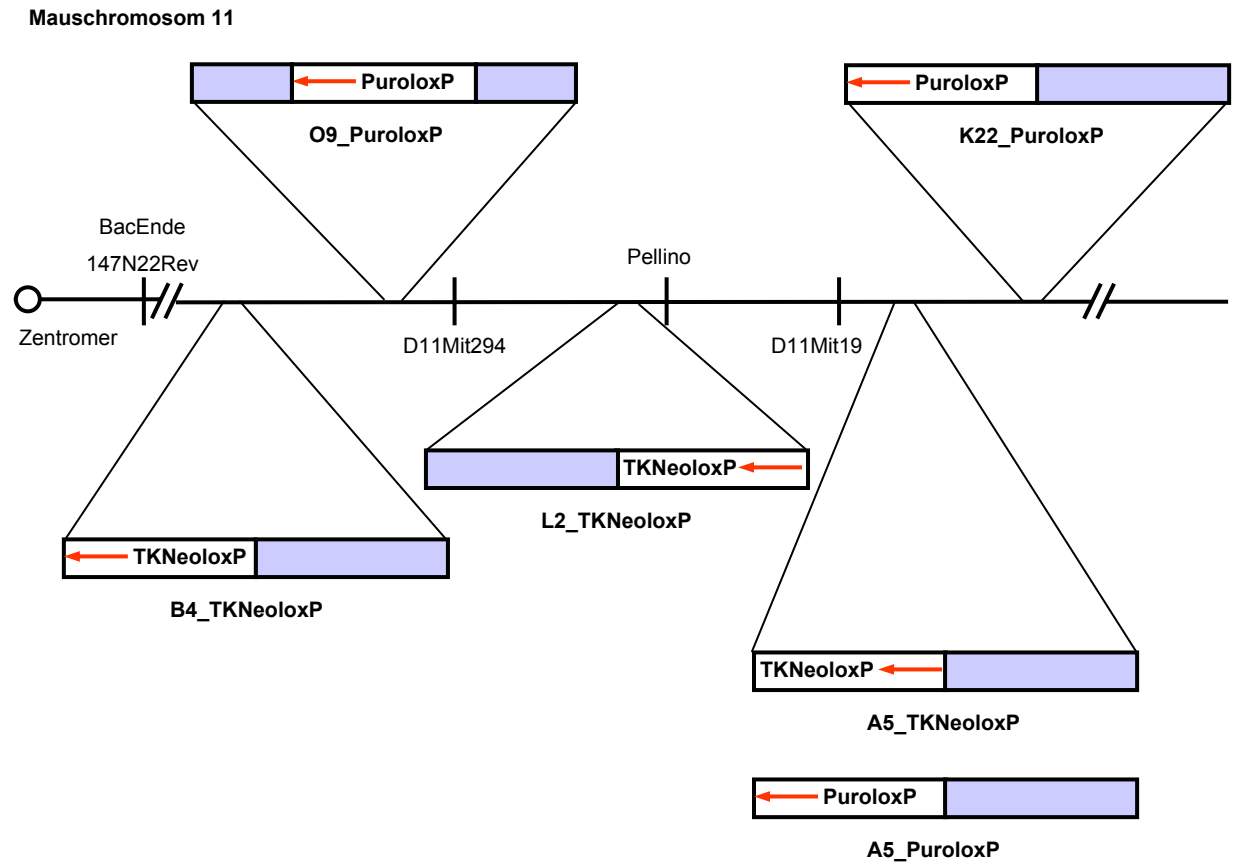




**Abb. 4.31: Sondentest O9\_PuroloxP 611P24 U1/U4.** Die Sonde erkennt spezifisch jeweils nur ein Fragment bei der *XbaI* (ca. 4 kb) und bei der *XhoI* (ca. 13 kb) Spaltung. (Xb=*XbaI*; Xh=*XhoI*)

#### 4.4.7 Anordnung der Targetingvektoren im Maus-Contig

Die in dieser Arbeit hergestellten sechs Targetingvektoren sind in Abbildung 4.32 nochmals schematisch dargestellt. Es ist die Lage der Vektorkonstrukte zueinander, sowie ihre Position im *wobbler* Maus-Contig skizziert. Es können jeweils ein PuroloxP und ein TKNeoloxP tragender Vektor kombiniert werden, um eine Deletion im Mausgenom zu erzeugen. Mit den vorliegenden Targetingvektoren stehen daher insgesamt acht verschiedene Kombinationsmöglichkeiten zur Verfügung, um Deletionen zu generieren. Im folgenden Teil dieser Arbeit soll die bereits durchgeführte Integration von zwei dieser Vektoren B4\_TKNeoloxP und O9\_PuroloxP in das ES-Zellgenom dargestellt werden.

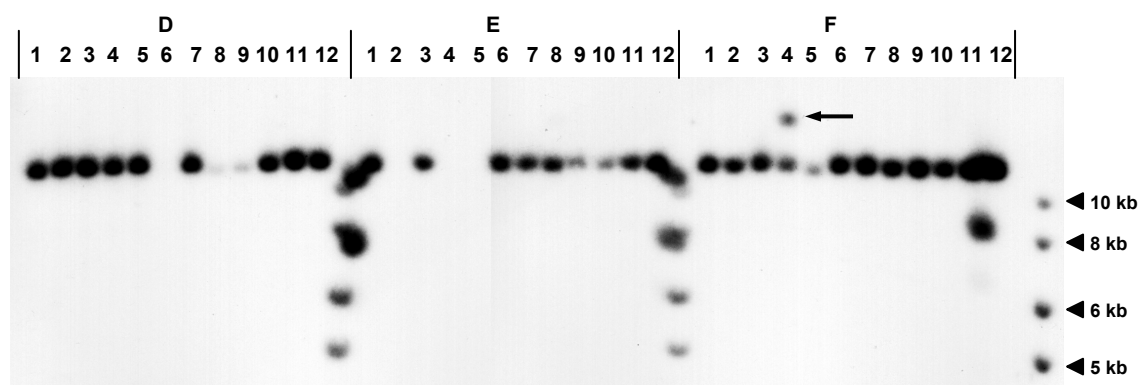


**Abb. 4.32: Lage der Targetingvektoren im *wobbler* Maus-Contig.** In dieser schematischen Darstellung sind alle generierten Targetingvektoren aufgeführt und ihre relative Lage zum *wobbler* Maus-Contig angezeigt.

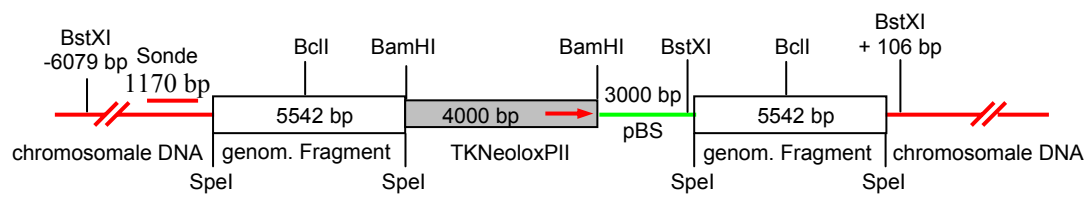
## 4.5 Einbringung der Vektoren in die ES-Zellen

### 4.5.1 Insertionsvektor B4\_TKNeoloxP

Jeweils 20 µg des linearisierten und aufgereinigten B4\_TKNeoloxP Targetingvektors wurden, in zwei zeitlich versetzten Versuchen, in ES-Zellen elektroporiert. Nach der Neomycin-Selektion wurden die resistenten Klone gepickt, expandiert und in eine Master Platte und eine DNA Platte aufgeteilt. Insgesamt wurden 1536 Klone gepickt. Von den ES-Zellen der DNA Platte wurde die DNA präpariert und mit *BstXI* üN gespalten. Nach der Trennung der Fragmente auf einem 1%igen Agarosegel wurden die Gele geblottet und die Filter mit der Sonde F2 hybridisiert. Auf diese Weise wurden 960 ES-Zellklone von den 1536 Klonen durch Hybridisierung getestet. Es konnten insgesamt sechs Positive (HA5, HC3, JF4, JH4, 3C3, 5E11) identifiziert werden. In Abbildung 4.33 ist das positive Hybridisierungssignal (18,5 kb) von Klon JF4 zu sehen. Unterhalb der 18,5 kb Bande sieht man die 11,7 kb Bande der nicht modifizierten ES-Zell-DNA. Das bedeutet, dass der Targetingvektor nur in ein Allel integriert ist und das andere Allel unverändert vorliegt. Es konnte beobachtet werden, dass bei nur 6 von 960 getesteten Klonen der Targetingvektor durch homologe Rekombination in den gewünschten Ziellokus integriert ist. Dies erlaubt unter Berücksichtigung aller Insertionsereignisse die Berechnung der Frequenz mit der der Targetingvektor ortsspezifisch integriert (ortsspezifische Integrationsfrequenz). In diesem Fall beträgt sie ca. 0,6%. Die Frequenz mit der dieser Targetingvektor in den Ziellokus integriert ist, beträgt also ca. 0,6 %. In Abbildung 4.34 ist schematisch die Integration des B4\_TKNeoloxP Insertionsvektor abgebildet.



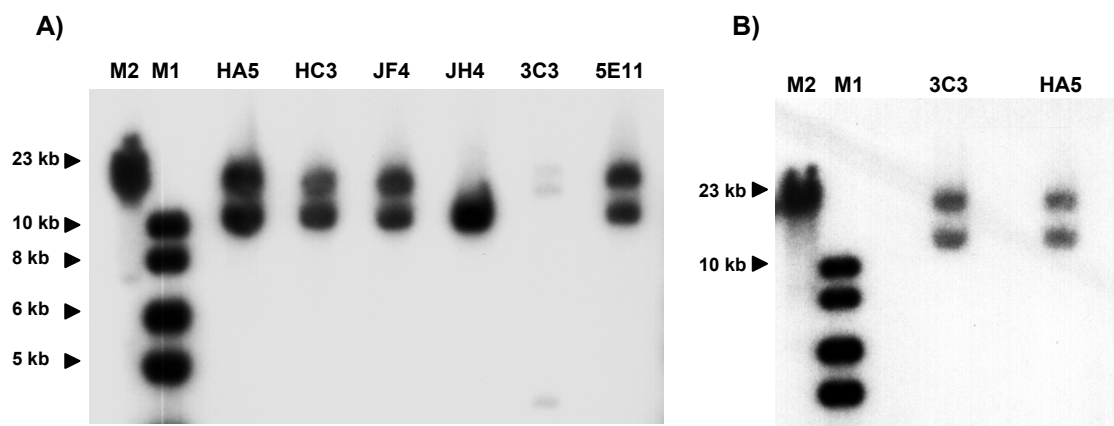
**Abb. 4.33: Hybridisierung der *BstXI* gespaltenen ES-Zellklone mit der Sonde F2.** Es sind 36 Klone der Platte J aufgetragen. Die Buchstaben D, E und F stehen für die entsprechenden Spalten der Platte und die Zahlen 1-12 sind die Wells pro Spalte. Der Pfeil markiert das Insertionsereignis des Vektors B4\_TKNeoloxP beim Klon JF4. Das Signal ist deutlich größer als bei den übrigen Klonen ohne Insertion des Vektors.



**Abb. 4.34: Schematische Darstellung der Integration des B4\_TKNeoloxP-Vektors in das ES-Zellgenom.**

Bei einer korrekten Integration des B4\_TKNeoloxP-Vektors und einem anschließenden *BstXI* Verdau kann in einer Hybridisierung mit der Sonde F2 (1170 bp) ein 18559 bp Fragment detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt die Hybridisierung von nicht modifizierter ES-Zell-DNA eine Bande der Größe 11727 bp.

Die positiven Klone HA5, HC3, JF4, JH4, 3C3, 5E11 wurden dann von den bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Master Platten expandiert. Von einem Teil der Zellen wurde DNA präpariert, um die korrekte Integration des Targetingvektors nochmals zu überprüfen. Die aufgereinigte DNA wurde mit *BstXI* gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und für eine Hybridisierung mit der Sonde F2 eingesetzt (siehe Abb. 4.35).



**Abb. 4.35: Hybridisierung der mit *BstXI* gespaltenen ES-Zellklone mit inseriertem B4\_TKNeoloxP-Vektor.**

A). Die gespaltenen DNAs der Klone HA5, HC3, JF4, JH4, 3C3 und 5E11 wurden mit der Sonde F2 hybridisiert. Der Klon JH4 zeigt nur eine 11,7 kb Bande ohne Insertion. Der Klon 3C3 zeigt zwei schwache Banden, die zu groß sind sowie ein zusätzliches Fragment bei 4,5 kb. Die übrigen Klone besitzen neben der 11,7 kb Bande zusätzlich die für die Insertion charakteristische 18,5 kb Bande. B). Wiederholung der Hybridisierung mit Klon 3C3 und HA5. (M2= $\lambda$  Marker, M1=Ladder Mix)

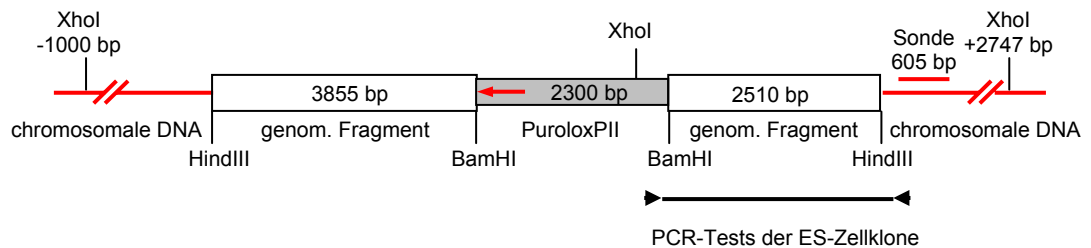
Die Klone HA5, HC3, JF4 und 5E11 zeigen eindeutig die 18,5 kb Bande, die dem integrierten Vektor entspricht. Bei Klon JH4 ist nur noch die 11,7 kb Bande zu erkennen. Schon bei dem ersten Hybridisierungsergebnis konnte festgestellt werden, dass die 18,5 kb Bande deutlich schwächer als die 11,7 kb

Bande war. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es sich bei dem Klon JH4 um einen Mischklon handelt. Wenn die DNA eines unveränderten Klons und eines Klons mit einem Targeting-Ereignis zusammen präpariert werden, so liegt die 11,7 kb Bande gegenüber der 18,5 kb Bande in einem Verhältnis von 3:1 vor. Das könnte die unterschiedliche Bandenstärke erklären. Weiterhin kann es sein, dass der unveränderte ES-Zellklon, im Vergleich zu dem modifizierten Klon, ein schnelleres Wachstum besitzt, so dass der unveränderte Klon nach einigen Passagen viel stärker repräsentiert ist und deshalb nur noch das von ihm stammende 11,7 kb Fragment zu detektieren ist. Bei dem ES-Zellklon 3C3 sieht man zwei Fragmente, die deutlich höher laufen, als die der anderen Klone, sowie ein weiteres 4,5 kb Fragment. Da die DNA-Konzentration von 3C3 deutlich geringer war als die der anderen Klone, wurde erneut DNA aufgereinigt und mit *BstXI* gespalten. Der Restriktionsverdau von 3C3 wurde für einen Größenvergleich neben einem Verdau des Klons HA5 auf ein Gel aufgetragen und der resultierende Blot mit der Sonde F2 hybridisiert (siehe Abb. 4.35B). Nun zeigte auch der 3C3 Klon die erwarteten Banden. Das abweichende Ergebnis der ersten Hybridisierung lässt sich eventuell dadurch erklären, dass die Enzymkonzentration für die geringe DNA-Menge zu hoch war, so dass es zu weiteren unspezifischen Spaltungen kam. Ein weiterer Grund könnte ein geringerer Reinheitsgrad der DNA sein. Die drei Klone (HA5, JF4 und 3C3) wurden für die Elektroporation des zweiten Targeting-Konstruktes ausgewählt.

## 4.5.2 Replacementvektor O9\_PuroloxP

### 4.5.2.1 Elektroporation von unbehandelten ES-Zellen

Zeitgleich zur Elektroporation des B4\_TKNeoloxP Insertionsvektors wurde auch der O9\_PuroloxP- Replacementvektor in ES-Zellen elektroporiert, um schnellstmöglich mit den ES-Zellklonen weiterzuarbeiten, die zuerst eine korrekte Integration des Targetingvektors aufwiesen. Es wurden 384 ES-Zellklone gepickt, mit *XhoI* gespalten, geblottet und durch eine Hybridisierung mit der Sonde U1/4 analysiert. Insgesamt konnten drei positive Klone (2E4, 2F3, 4E1) identifiziert werden. Die ortsspezifische Integrationsfrequenz beträgt für diesen Targetingvektor ca. 0,8%. Das Ergebnis des Integrationsereignisses des Replacementvektors ist in der Abbildung 4.36 schematisch dargestellt.

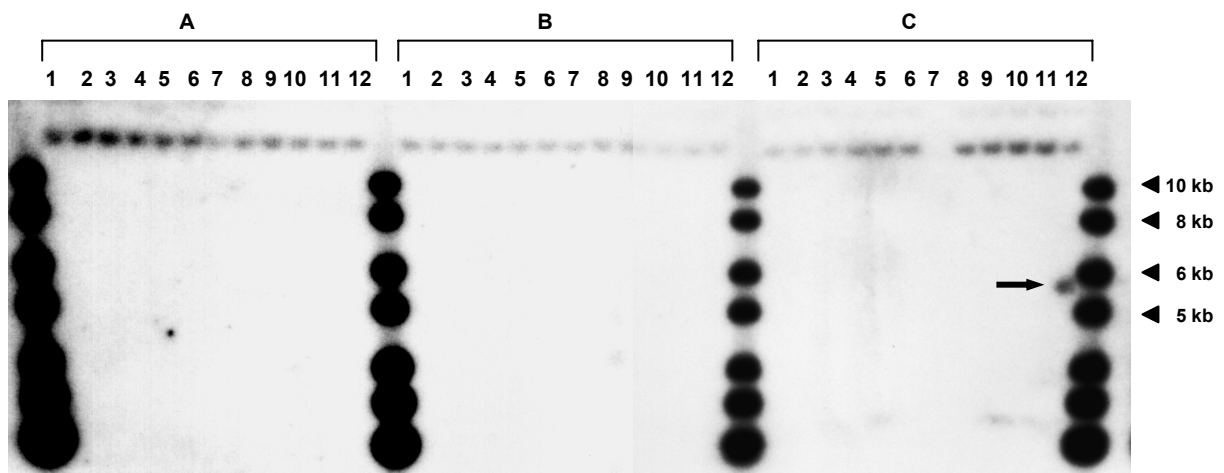


**Abb. 4.36: Schematische Darstellung des Integrationsereignisses des Replacementvektors O9\_PuroloxP.**

Durch das Einbringen des Deletionsvektors in das ES-Zellgenom wird gleichzeitig eine zusätzliche *XhoI* Schnittstelle integriert. Wenn die DNA mit *XhoI* gespalten wird, so entsteht ein ca. 5500 bp großes Fragment, das mit der Sonde U1/4 (605 bp) detektiert werden kann. Ist die DNA nicht modifiziert, so entsteht ein ca. 13 kb großes Fragment. Die Pfeile zeigen die Lage der Primer an, die für einen PCR-Screening-Test konstruiert wurden. Das PCR-Produkt überspannt den 2510 bp genomischen Bereich.

#### 4.5.2.2 Zweite Elektroporation der ES-Zellklone

Die ES-Zellklone HA5, JF4 und 3C3, die bereits den Insertionsvektor B4\_TKNeoloxP trugen, wurden mit dem zweiten Konstrukt (O9\_PuroloxP-Replacementvektor) elektroporiert. Von den Elektroporationen der Klone HA5 und JF4 wurden jeweils 480 Klone gepickt. Der Klon 3C3 wurde in zwei aufeinander folgenden Elektroporationen eingesetzt, so dass von diesem Klon 960 Klone gepickt wurden. Insgesamt wurden also 1920 Klone gepickt. Es wurden zuerst nur von 576 Klonen Spaltungen mit dem Enzym *XhoI* angesetzt, im Gel aufgetrennt, geblottet und mit der Sonde U1/4 hybridisiert. Es konnte nur ein einziges positives Signal (TKN-3C3\_P-4C12) identifiziert werden (siehe Abb. 4.37).



**Abb. 4.37: Hybridisierung der doppeltransfizierten ES-Zellklone mit der Sonde U1/4.** Es sind 36 Klone der Platte 4 *XhoI* gespalten aufgetragen. Die Buchstaben A, B und C stehen für die entsprechenden Spalten der Platte und die Zahlen 1-12 sind die Wells pro Spalte. Der Pfeil markiert das Integrationsereignis des Replacement-Vektors O9\_PuroloxP beim Klon 4C12. Das Signal ist mit ca. 5,5 kb deutlich kleiner als bei den übrigen Klonen (ca. 13 kb) ohne Integration des Vektors, da durch die PuroloxP-Kassette eine zusätzliche Schnittstelle in das Genom eingefügt wird.

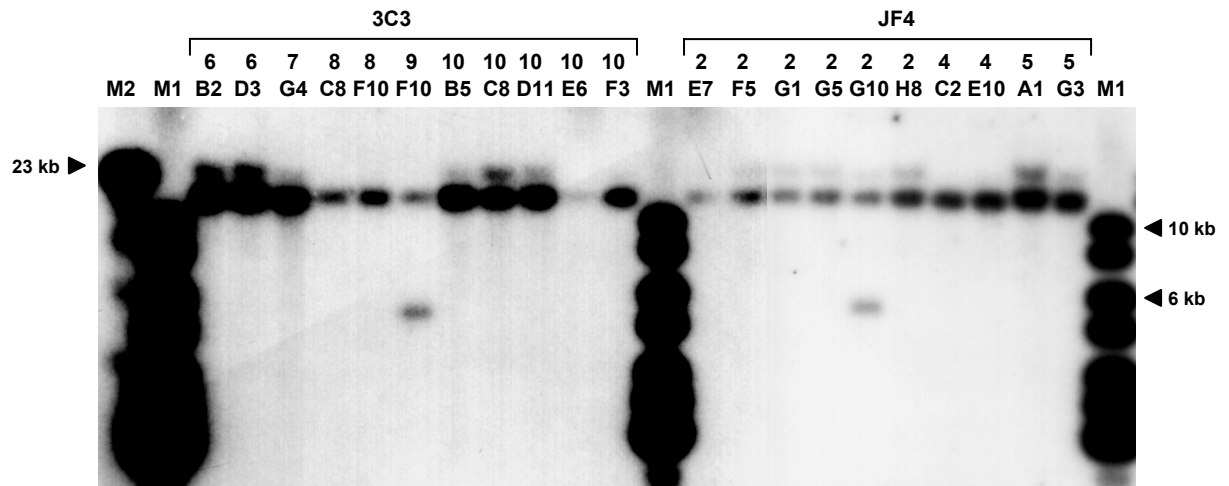
Ein positiver Klon unter ca. 600 getesteten Klonen bedeutet, dass nur 0,16% aller resistenten Klone eine ortsspezifische Integration des Targeting-Konstruktes aufweisen. Diese seltene lokusspezifische Integration, die der sehr zeit- und materialaufwendigen *Screening* Methode des Southern Blottings und Hybridisierens gegenüberstand, führte zu der Etablierung einer einfacheren *Screening* Methode. Basierend auf dem identifizierten positiven Klon (TKN-3C3\_P-4C12), wurde ein PCR-*Screening* entwickelt. In Abbildung 4.36 ist die Lage der verwendeten Primer (ESPuroTest3.s/ESPuroTest.as) gezeigt. Die Primer wurden so konstruiert, dass sie den 2510 bp homologen Bereich des Targetingvektors flankieren. Ein Primer liegt in der Puromycin-Resistenzkassette (ESPuroTest3.s) und der andere innerhalb der Hybridisierungssonde U1/4 (ESPuroTest.as). Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass auch die schon mit *XhoI* gespaltenen 576 Klone nochmals durch die PCR überprüft werden konnte. Es wurden also 1920 Klone mit Hilfe des PCR-Tests auf positive Signale gescreent. Obwohl der PCR-Test sehr spezifisch war und die Kontrollreaktion nur die 2,5 kb Bande zeigte, wurden während des *Screenings* häufig auch spezifische Banden der Größe 1,3 kb, 1,5 kb, 2 kb und 3 kb identifiziert. Sämtliche Klone, die ein spezifisches Signal zeigten sind in der folgenden Tabelle 4.12 zusammengefasst.

Tab. 4.12: Positive Klone des PCR-Screenings

Klonname und Platten-Nr.	Koordinaten der 96 Well Platte	Klonname und Platten-Nr.	Koordinaten der 96 Well Platte
HA5-1	D/2; D/3	3C3-2	C/3; D/5; E/11; F/2; G/3
HA5-3	C/5	3C3-3	<b>C11</b> ; D/3; G/1
HA5-4	C/1	3C3-4	B/9; <b>C/12</b> ; E/10; F/9; F/10; H/8
HA5-5	H/2	3C3-6	B/2; D/3
JF4-1	C/1	3C3-7	G/4
JF4-2	E/7; F/5; G/1; G/5; <b>G/10</b> ; H/8	3C3-8	C/8; F/10
JF4-4	C/2; E/10	3C3-9	<b>F/10</b>
JF4-5	A/1; G/3	3C3-10	B/5; C/8; D/11; E/6; F/3
3C3-1	B/7; E/10; G/1; <b>G/6</b>		

Von diesen 45 Signalen wiesen nur fünf die korrekte Fragmentgröße von 2,5 kb auf (3C3-1G6; 3C3-4C12; 3C3-9F10; JF4-2G10; 3C3-3C11). Es wurde von allen in der Tabelle 4.12 aufgeführten Klonen eine Restriktionsspaltung mit *XhoI* angesetzt. Ausgenommen sind die Klone, die bereits in einer Hybridisierung eingesetzt wurden (3C3 Platte 1-4; JF4 Platte 1; HA5 Platte 1). Die Hybridisierung ergab, dass zwei der Klone (JF-2G10 und 3C3-9F10) positiv waren (siehe Abb. 4.38).





**Abb. 4.38: Hybridisierung der positiven Klone aus Tab.4.12 mit der Sonde U1/4.** Zu sehen sind die beiden positiven Signale 3C3-9F10 und JF4-2G10 mit einer Fragmentgröße von ca. 5,5 kb.

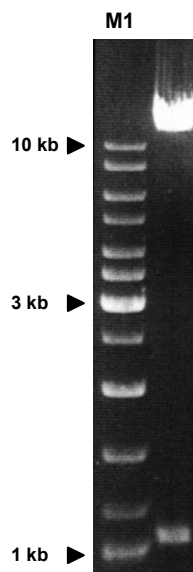
Die beiden positiven Signale stammen ebenso von Klonen, deren PCR-Fragmente eine Größe von 2,5 kb aufweisen, wie der zuerst ermittelte positive Klon 3C3-4C12. Da drei von den fünf Klonen mit einem korrekten PCR Signal auch im Southern Blot als Positive identifiziert werden konnten, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die restlichen beiden (3C3-1G6 und 3C3-3C11) ebenfalls einen korrekt integrierten Targetingvektor besitzen. Vermutlich wurden sie bei den durchgeführten Hybridisierungsexperimenten nicht detektiert, weil eine zu geringe Menge an ES-Zell-DNA eingesetzt wurde. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass von 1920 getesteten Klonen fünf einen korrekt integrierten Targetingvektor enthalten. Das entspricht einer ortspezifischen Integrationsfrequenz von 0,26%. Die positiven Klone werden schnellstmöglich aufgetaut, expandiert und für die Elektroporation mit dem Cre-Expressionsplasmid vorbereitet.

## 4.6 Strahleninduzierte Deletionen

### 4.6.1 O9\_TKNeoRadiation-Replacementvektor

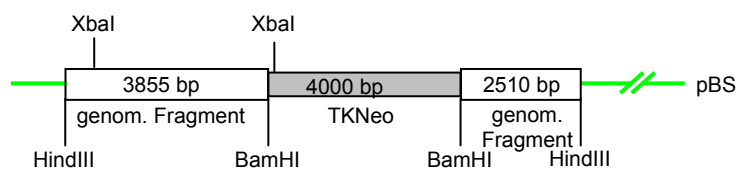
Wie bereits erwähnt wurde das genomische 9447 bp große Subfragment des BAC 13909 unter meiner Betreuung von Daniela Ehling im Rahmen ihrer Diplomarbeit (Ehling, 1999) isoliert. Weiterhin wurde die TKNeo-Kassette (ohne loxP-Element; von J. Schimenti Jackson Laboratory Bar Harbor USA), über eine *Bam*HI Schnittstelle in das genomische Fragment gesetzt. Der Targetingvektor hat eine Gesamtgröße von 13365 bp. Die Orientierung der TKNeo-Kassette innerhalb des genomischen Fragmentes ist irrelevant, so dass der fertig gestellte Vektor direkt von mir weiter bearbeitet werden konnte. Das Konstrukt wurde mit dem Enzym *Pvu*I im Vektorrückgrat linearisiert, der Ansatz mit Phe-

nol/Chloroform/Isoamylalkohol gereinigt, gefällt und mit einer Konzentration von 1 µg/µl in sterilisiertem TE aufgenommen (siehe Abb. 4.39).



**Abb. 4.39: Mittels *PvuI* linearisierter O9\_TKNeoRadiation-Replacementvektor.** Durch die *PvuI* Spaltung wird ein kurzes Stück (1045 bp) herausgeschnitten, das jedoch für die weiteren Experimente keine Relevanz besitzt (M1=Ladder Mix).

Die so aufbereitete DNA wurde für die Elektroporation in ES-Zellen eingesetzt. Eine schematische Darstellung des O9\_TKNeoRadiation-Replacementvektors zeigt die Abbildung 4.40.



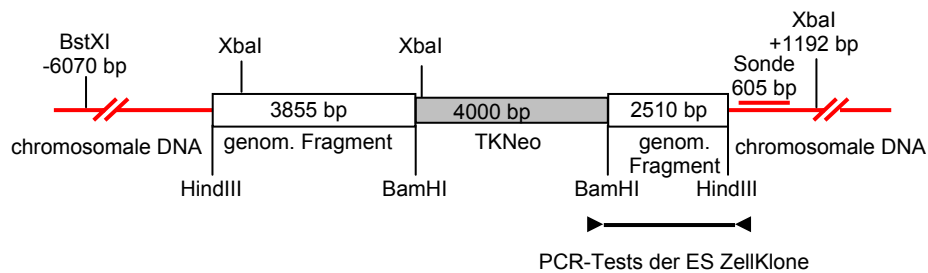
**Abb. 4.40: Aufbau des O9\_TKNeoRadiation-Replacementvektors.**

## 4.6.2 Hybridisierungssonde

Als Hybridisierungssonde diente die bereits für den Replacementvektor O9\_PuroloxP getestete Sonde U1/4, da die homologe genomische DNA des Vektors auf demselben Subfragment des BAC 13909 basiert. Das Restriktionsenzym, mit dem die genomische ES-Zell-DNA geschnitten wurde war in diesem Fall *XbaI*. Die Größe der Fragmente beträgt 4083 bp für die ES-Zell-DNA ohne Targetingereignis und 7702 bp wenn es zu einer korrekten Integration in das Genom kommt (siehe Abb. 4.31 und 4.42).

### 4.6.3 Elektroporation des O9\_TKNeoRadiation-Replacementvektors

Der O9\_TKNeoRadiation-Replacementvektor wurde in die ES-Hybridzelllinie C57BL/6x129/SV<sup>Jae</sup> e-lektroporiert (siehe Abb. 4.41).



**Abb. 4.41: Schematische Darstellung der Integration des O9\_TKNeoRadiation-Vektors in das ES-Zellgenom.** Die Insertion des O9\_TKNeoRadiation-Vektors in die ES-Zell-DNA fügt eine zusätzliche *XbaI* Schnittstelle ein, so dass bei einer Hybridisierung mit der Sonde U1/4 (605 bp) ein 7,7 kb Fragment sichtbar wird. Im Normalfall, ohne Deletionsvektor, ist eine 4,1 kb Bande zu sehen.

Diese Zelllinie hat den Vorteil, dass nach Erzeugung der Deletionen ein PCR-Screening zur Identifizierung der Deletionsgröße durchgeführt werden kann. Nach der Neomycin-Selektion wurden 1248 Klone gepickt. Das Southern Blot Screening von 384 Klonen ergab zwei positive Signale (1C12; 1H4). Für die Analyse der restlichen 864 Klone wurde ein PCR Screening entwickelt (Primer: ESPuroTest.as / K13TKNeo.s; Produktgröße ca. 2,5 kb). Sämtliche 1248 Klone wurden mit Hilfe dieses Screenings auf eine korrekte Integration des Targetingvektors getestet. Auch bei diesem PCR-Screening wurden Fragmente amplifiziert, deren Größe von 2,5 kb deutlich abwich. Nur fünf der 13 PCR-Signale waren 2,5 kb groß. In der folgenden Tabelle 4.13 sind die 13 detektierten PCR-Signale aufgeführt.

Tab. 4.13: In der Test-PCR positive O9\_TKNeoRadiation-Deletionsklone.

Platte-Nr.	Koordinaten der 96 Well Platte
1	C/12; H/04
3	D/06; D/07; F/08
6	A/08; D/10
10	F/10
13	C/02; D/03; E/11; F/04; F/05

Die DNA der Klone, die noch nicht für eine Hybridisierung eingesetzt wurden (ab Platte 5) wurden mit *Xba*I gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit der Sonde U1/4 hybridisiert. Es konnten zwei Positive detektiert werden: 6D10 und 13F5. In Abbildung 4.42 sind alle positiven Hybridisierungssignale aufgeführt.

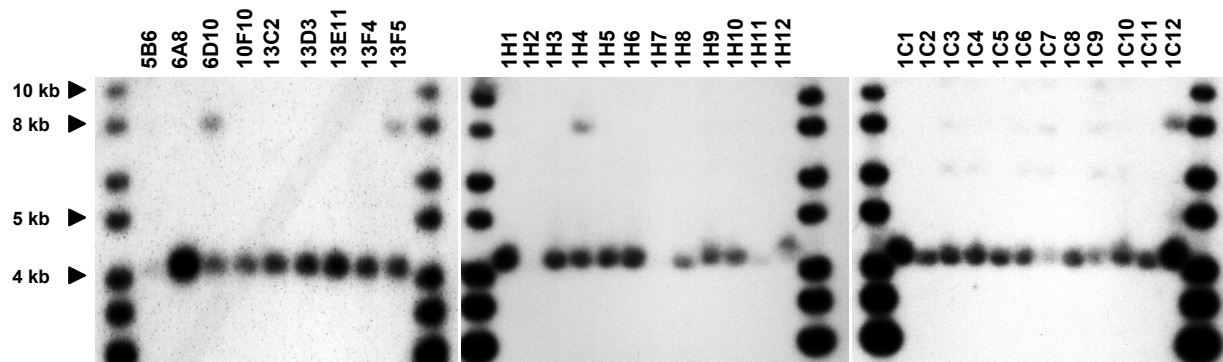
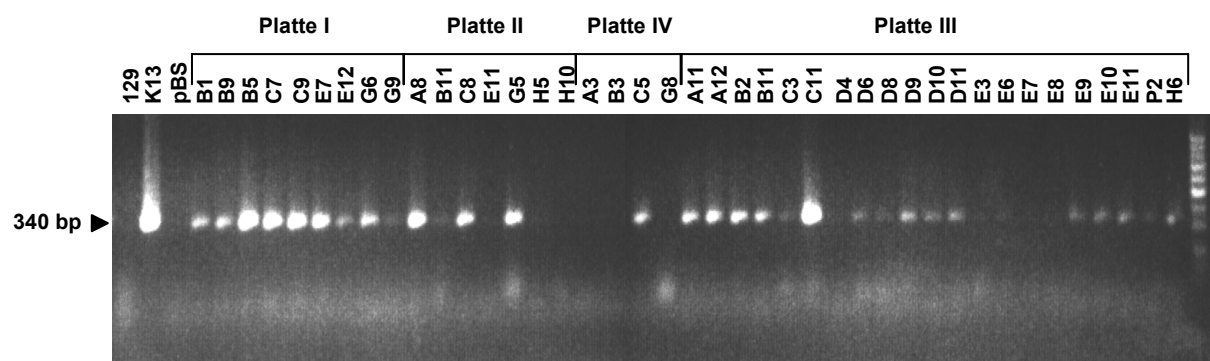


Abb. 4.42: O9\_TKNeoRadiation positive Klone.

Auch in diesem Experiment kann festgestellt werden, dass alle in der Hybridisierung als positiv identifizierten Klone die korrekte Produktgröße in der PCR zeigten. Die einzige Ausnahme ist der Klon 3F8, der in der PCR ein 2,5 kb Signal zeigte, aber kein Signal in der Hybridisierung erbrachte. Vermutlich ist der Grund eine zu geringe DNA-Konzentration, die für die Spaltung eingesetzt wurde. Die Integrationsfrequenz dieses Targeting-Konstruktes beträgt 0,4%, da fünf von 1248 Klonen positiv waren. In der folgenden Tabelle sind die 13 detektierten positiven Signale aufgeführt. Der Klon 1H4 wurde für weitere Versuche ausgewählt.

#### 4.6.4 Bestrahlung

Der Klon 1H4 wurde expandiert und anschließend für ein Bestrahlungsexperiment eingesetzt. Hierzu wurden ca. 200.000 Zellen  $\gamma$  Strahlung ausgesetzt, anschließend ausgesät und mit 2  $\mu$ M Gancyclovir auf den Verlust der TK-Kassette selektioniert. Es wurden 368 resistente Klone in 4 x 96Well Platten gepickt. Von jeder 96Well Platte wurde eine Kopie angefertigt, die mit Neomycin selektioniert wurde. Die Klone, bei denen tatsächlich die TKNeo-Kassette deletiert ist, sollten sensitiv gegenüber Neomycin sein. Neomycin wurde nach ca. 24 h zu dem Medium hinzugegeben und die Selektion wurde für 5 Tage aufrechterhalten. In nur fünf Wells waren zum Schluss noch teilungsfähige Klone sichtbar. In den meisten anderen Wells konnten zwar noch Zellklone identifiziert werden, die aber die typischen bläschenförmigen Abschnürungen zeigten, die für das Absterben der Zellen charakteristisch sind. In 12 Wells waren nach der Selektion gar keine Zellen mehr vorhanden. Auf DNA-Ebene wurde ebenfalls der Verlust der TKNeo-Kassette überprüft. Hierzu wurde eine für die TKNeo-Kassette spezifische PCR etabliert (Primer:TKNeoRev5/Uni5; Fragmentgröße: 340 bp). Wenn die TKNeo-Kassette durch die Bestrahlung verloren geht, wird in der PCR kein Produkt amplifiziert. Die PCR wurde für die 368 Klone durchgeführt. Bei 41 Klonen konnte kein oder nur ein schwaches Signal erkannt werden. Für diese Klone wurde die PCR wiederholt. Von den 41 Klonen blieben 11 (IIB11, IIE11, IIH5, IIH10, IIID4, IIIE3, IIIE7, IIIE9, IVA3, IVB3, IVG8) übrig, bei denen kein positives Signal detektierbar war (siehe Abbildung 4.43).



**Abb. 4.43: PCR-Screening auf den Verlust der TKNeo-Kassette.**

Diese 11 ES-Zellklone tragen vermutlich unterschiedliche, sich überlappende Deletionen. Um die Deletionen zu verifizieren und um ihre Größe zu kartieren, wurden polymorphe Marker auf Chromosom 11 zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und 129 gesucht. Bei einem polymorphen Marker, der innerhalb der Deletionsregion lokalisiert ist, sollte die PCR nur das Fragment des C57BL/6 Allels amplifizieren, da das 129er Allel durch die Bestrahlungsreaktion deletiert ist. Wenn genügend Polymorphismen vorliegen, ist es möglich die Größe und Lage der Deletionsregion präzise zu charakterisieren.

### 4.6.5 Polymorphismen

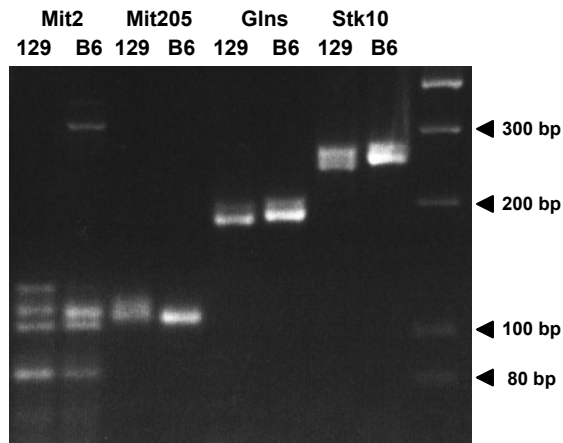
Eine Übersicht über die Polymorphismen zwischen den in Laboren häufig gehaltenen Mausstämmen gibt die folgende Adresse: <http://www.informatics.jax.org>.

Zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und 129 konnten vier PCR-Polymorphismen für Maus Chromosom 11 (2,4 cM – 17 cM) gefunden werden (siehe Tab.4.14).

**Tab. 4.14: Marker für Polymorphismen zwischen C57BL/6 und 129.**

Marker (cM)	Größe (Stamm)
D11Mit2 (2,4)	122 bp (C57BL/6) 116 bp (129)
Glns-ps1 (11,0)	190 bp (C57BL/6) 185 bp (129)
Stk10 (16)	270 bp (C57BL/6) 260 bp (129)
D11Mit205 (17)	95 bp (C57BL/6) 100 bp (129)

Die optimale Annealing Temperatur wurde für jeden Marker durch eine Gradienten-PCR ermittelt. Anschließend wurde die PCR für jeden Marker mit C57BL/6 und 129 DNA durchgeführt und auf ein 4% Nusieve Gel aufgetragen. In Abbildung 4.44 ist das PCR-Ergebnis gezeigt. Der für den Marker D11Mit2 angegebene Unterschied (122 bp/116 bp) kann hier nicht identifiziert werden. Bei den PCR-Produkten der restlichen drei Marker sind leichte Unterschiede in der Bandenhöhe zu erkennen.



**Abb. 4.44: Polymorphismen-Marker zwischen den Mausstämmen 129 und C57Bl/6.**

(Mit2=D11Mit2, Mit205=D11Mit205, Glns=Glns-ps1)

Diese Marker werden in den folgenden Experimenten eingesetzt, um die Deletionen der oben genannten Klone zu bestätigen und zu charakterisieren. Zusätzlich ist eine eigene Polymorphismen-Suche gestartet worden. Dazu wird nach kurzen *repeats* (100-200 bp) in der Maussequenz gesucht. Es werden dann Primer flankierend zu diesen *repeats* ausgesucht und die PCR mit DNA der Mausstämmen C57BL/6 und 129 durchgeführt. Die Produktgrößen werden anschließend auf einem 4% NuSieve Gel überprüft. Bisher wurden keine weiteren für die Deletionscharakterisierung adäquaten Polymorphismen identifiziert.

## 5. Diskussion

### 5.1 Aufbau eines Maus-BAC-Contigs

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein YAC-Contig vor, das die *wobbler* kritische Region abdeckte. Aufgrund der Nachteile, die mit YACs verbunden sind, wie z.B. eine hohe Chimäritätsrate und der störende Hintergrund der natürlichen Hefechromosomen, sollte ein die Kandidatengenregion überspannendes BAC-Contig erstellt werden. BACs haben den Vorteil, dass sie relativ große Inserts (100-200 kb) tragen und trotzdem wie bakterielle Plasmide behandelt werden können. BAC-DNA kann schnell in großen Mengen aufgereinigt werden. Dies stellt einen enormen Vorteil dar und erleichtert nachfolgende Experimente, wie z.B. Subklonierungen von genomischen Fragmenten. Die Erstellung des BAC-Contigs sollte innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne abgeschlossen sein. Das war allerdings nicht möglich, da sich das Erstellen der physikalischen BAC-Karte als weitaus anspruchsvoller als zu Anfang angenommen herausstellte. Es kostete sehr viel Zeit die PCR-Ergebnisse zu bewerten und in das Contig einzufügen. PCRs mussten häufig wiederholt werden, da die Signale nicht eindeutig waren. Einige BAC-Enden enthielten repetitive Sequenzen. Die Signale, die mit diesen Enden erzielt wurden, wurden aus dem Contig wieder entfernt. Ebenso schwierig war die Orientierung der BACs. Häufig konnten die BAC-End-STS-Marker nicht als endständige Marker der BACs kartiert werden, so dass einige BACs zwar im Contig lokalisiert, aber die Enden zunächst nicht orientiert werden konnten.

Das Aufspüren eines neuen EST-Markers (Maus-EST13; Resch, 2000) sowie des *Murr1* Gens (Fuchs, 2001), die auf dem YAC-Contig aber nicht auf dem BAC-Contig kartiert werden konnten, zeigte neue Lücken innerhalb des Contigs auf. Es wurde ein BAC-Screen von S. Fuchs für beide Regionen durchgeführt. In der Region des Maus-EST13 konnte die Lücke, durch die neuen BACs (Fuchs, 2001) verkleinert und durch die in dieser Arbeit durchgeführte *Fiber-FISH*-Methode geschlossen werden (siehe unten). Die Region um *Murr1* konnte mit BACs einer anderen Maus-BAC-Bank (RCPI23; IMB Jena) abgedeckt werden. Es war aber nicht möglich, eine Überlappung zu den proximal liegenden (mit dem *Pellino* Gen identifizierten) BACs zu finden. Hier besteht also noch eine Lücke in dem aktuellen Contig. Eine weiter proximal lokalisierte Lücke konnte durch den BAC 209F21 geschlossen werden. Dieser BAC trägt das 5' Ende des Gens *Kiaa0903*, sowie den die *wobbler* kritische Region proximal flankierenden Marker 147N22Rev. Zusätzlich konnten die beiden Marker (MK2-0872.1/2 und MK2-0872.3/4), die zur Orientierung des 135B4 Subfragmentes dienten, auf diesem BAC detektiert werden.

Die *Fiber-FISH*- und auch die *FISH*-Methode eignen sich hervorragend, um Kartierungsergebnisse zu überprüfen, was bereits schon von anderen Gruppen angewandt wurde (Klockars et al., 1996; Brunner et al., 1998). Wie in dieser Arbeit gezeigt, können sich überschneidende Sequenzbereiche in BACs detektiert und die Größe der Überlappung leicht abgeschätzt werden. Bei nicht überlappenden Sequenzen



dürfen die eingesetzten Sonden allerdings nicht zu weit auseinander liegen. Es wurde die Erfahrung gemacht, dass Distanzen zwischen zwei BAC-Sonden von bis zu 200 kb gut identifiziert werden können, was im Fall der Hybridisierung der BACs 71M17 und 208P2 gezeigt werden konnte. Der BAC 208P2 trägt das 3' Ende der anonymen cDNA *Homoloc-13* (Marker: m13-3' Ende) und der BAC 71M17 trägt als Marker einen weiter 5' liegenden Teil der cDNA (Marker: m13). Zwischen den beiden BACs konnte aber durch das STS-Mapping keine Überlappung festgestellt werden. Obwohl es eher selten vorkommt, dass das 5' und das 3' Ende eines Gens mehrere 100 kb auseinander liegen, war es doch sehr wichtig, zu versuchen diese Lücke durch die *Fiber-FISH*-Methode zu überbrücken. In dem *Fiber-FISH*-Experiment konnte gezeigt werden, dass die beiden BACs auf einem DNA-Strang liegen mit einem Abstand von ungefähr 180 kb.

Die *Fiber-FISH*- und die FISH-Methode können nicht nur für Kartierungsarbeiten eingesetzt werden, sondern sind ebenfalls geeignet, um natürlich auftretende (Michalet et al., 1997; Henrick und Bensimon, 1999) oder erzeugte (Zheng et al., 2001) Deletionen im Genom nachzuweisen. Hierfür müssen natürlich die Deletionsendpunkte relativ gut charakterisiert sein, damit die Hybridisierungssonden möglichst direkt flankierend zu der Deletion gewählt werden können. Es bietet sich an, die Deletionen, die mit den in dieser Arbeit hergestellten Deletionsvektorkonstrukten erzeugt werden, mit der *Fiber-FISH*-Methode zu verifizieren und charakterisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit kann gesagt werden, dass die zeitaufwendigen Kartierungs- und Orientierungsarbeiten letztendlich sehr nützlich für die Orientierung der genomischen Subfragmente war.

## 5.2 Deletionsvektorkonstrukte

Die Suche nach geeigneten genomischen Subfragmenten stellte sich ohne jegliche Sequenzinformation als sehr mühselig heraus. Neben der Subklonierung waren auch die weitere Schnittstellenanalyse, sowie die Ermittlung von flankierenden Sequenzen sehr zeitaufwendig. Außerdem war die Orientierung der BAC-Enden wie bereits erwähnt nicht immer sicher gegeben. Daher war die Orientierung der Subfragmente, die nur eines der BAC-Enden als Marker trugen ebenfalls unklar. Deshalb wurde versucht die für die Targetingvektoren eingesetzten genomischen Subfragmente nicht nur anhand der BAC-Enden, sondern noch mit zusätzlichen Markern zu orientieren. Dies gelang erst mit den Fragmenten, die basierend auf der Sequenzinformation vom IMB aus Jena konstruiert wurden. Die genomischen Subfragmente 135B4\_SF, 124L2\_SF und 139O9\_SF konnten somit durch mindestens zwei Marker orientiert werden. Durch die vorliegenden Sequenzinformationen waren eine gezielte Schnittstellensuche und die Analyse der flankierenden Sequenzen für die Generierung der Hybridisierungssonde möglich. Deshalb konnten die Vektorkonstruktionen, bei denen man auf diese Sequenzinformationen zurückgreifen konnte, schneller fertiggestellt und für ES-Zellkulturexperimente eingesetzt werden. Die vor kurzem veröffentlichte Maus *working draft* Sequenz wird die Generierung von genomischen Subfragmenten und die Targetingvektor-Konstruktion weiter stark vorantreiben.

Im Rahmen der Vektorkonstruktion soll ebenfalls kurz auf die Resistenzkassetten eingegangen werden. Die Sequenzierung der Resistenzkassetten zeigte, dass vor allem das Konstrukt der TKNeo-Kassette (erhalten von J. Schimenti) sehr viele Restriktionsschnittstellen aus der MCS des pBS-Vektors enthält. Dadurch werden die Klonierungsarbeiten bei der Konstruktion des endgültigen Targetingvektors stark beeinträchtigt. Die Auswahl an verwendbaren Restriktionsenzymen war auf drei für die Subklonierung des Fragmentes und acht für die spätere Linearisierung beschränkt.

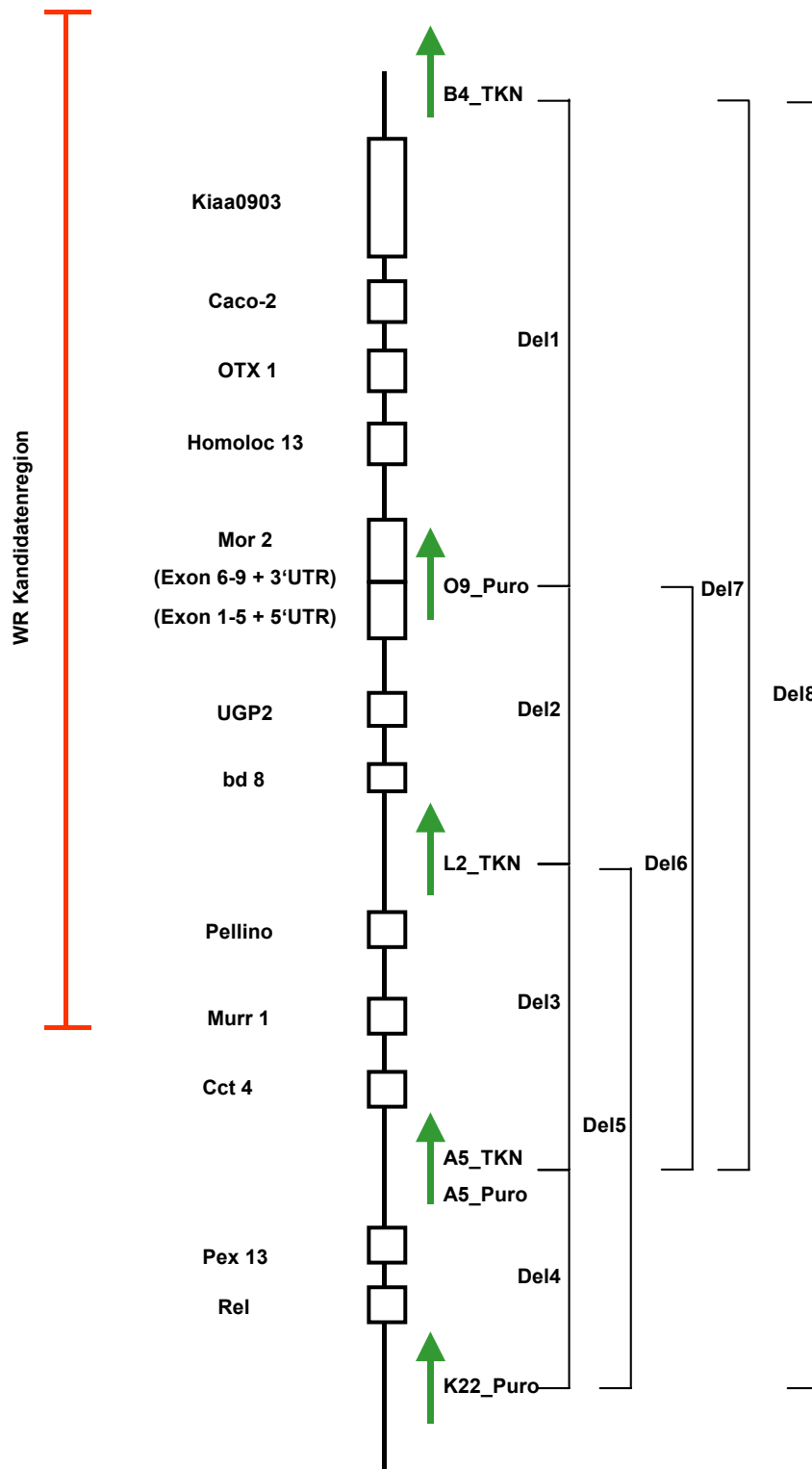
Das Einfügen neuer Schnittstellen flankierend zu der Resistenzkassette mittels PCR ist nicht empfehlenswert, wenn das gewünschte PCR-Produkt nur mittels einer Taq-Polymerase und nicht mit einer Proofreading-Polymerase amplifiziert werden kann. Es wurde in mehreren Fällen die Erfahrung gemacht, dass ein 2,5 –4 kb großes Fragment problemlos mit einer Taq-Polymerase aber nicht mit einer Proofreading-Polymerase amplifiziert werden konnte. Die PuroloxPII-Kassette ist ein Beispiel dafür. Bei der Sequenzierung dieser PCR-amplifizierten Kassette konnte allerdings festgestellt werden, dass zwei Punktmutationen in die codierende Region durch die Polymerase eingefügt wurden. Es musste erst ein Funktionstest durchgeführt werden, um die Verwendbarkeit des Resistenzgens zu überprüfen.

Wenn das Einfügen von neuen Schnittstellen nicht zu umgehen ist, dann sollte dies durch *linker* geschehen. Im Fall des loxP-Elementes, das von zwei *BamHI* Schnittstellen flankiert wird, wurden zwei Oligonukleotide mit der gewünschten Sequenz generiert, hybridisiert und in den geöffneten pBS-Vektor ligiert. Diese Methode ist ohne Komplikationen durchführbar und die Sequenz des sich im Vektor befindlichen Inserts wird nicht modifiziert.

### 5.3 Lokalisation der Targetingvektoren und resultierende Deletionen

#### 5.3.1 B4\_TKNeoloxP – O9\_PuroloxP

Die Deletionsvektoren B4\_TKNeoloxP und O9\_PuroloxP wurden in dieser Arbeit nacheinander in das ES-Zellgenom über homologe Rekombination ortsspezifisch integriert. Es existieren 5 doppelpositive Klone, die für die transiente Transfektion des Cre-Enzyms zur Verfügung stehen. Durch die Cre vermittelte Rekombination entsteht eine Deletion, deren Endpunkte durch die homologe genomische Sequenz der Targetingvektoren flankiert wird. Durch die festgelegten Deletionsendpunkte können die Gene, die deletiert werden genau bestimmt werden. In dem Fall der eingesetzten Targetingvektoren B4\_TKNeoloxP – O9\_PuroloxP sind die Gene oder cDNAs *Kiaa0903*, *Caco-2*, *Otx1*, *Homoloc13*, *Mor2-Ex6-9+3'UTR* betroffen (siehe Abb.5.1).



**Abb.5.1: Mögliche Deletionen (Del1-Del8).** Durch verschiedene Kombinationen der Deletionsvektoren können acht Deletionen erzeugt werden. Es sind die Lage der Deletionsvektoren sowie die in den Deletionsregionen liegenden Gene gezeigt. Die Größenverhältnisse sind nicht maßstabsgetreu dargestellt.

Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die zu den Genen bisher bekannten Informationen gegeben werden.

### ***Kiaa0903***

Diese anonyme cDNA stammt aus einem Sequenzierprojekt für sehr lange cDNAs (Nagase et al., 1998). Über die tatsächliche biologische Funktion des Gens ist bisher noch nichts bekannt. Aufgrund von Homologien in der Proteinsequenz, durch die eine CAAX-Box und eine Calponin-Homologie-Domäne identifiziert wurden, könnte es sich bei *Kiaa0903* um ein membranverankertes Signaltransduktionsprotein handeln (Fuchs, 2001). In unserer Arbeitsgruppe wurde ein *knockout*-Vektor für dieses Gen hergestellt, der zurzeit in Zellkultur getestet wird. Es soll untersucht werden, ob *Kiaa0903* das für die *wobbler* Mutation verantwortliche Gen ist.

### ***Caco-2***

*Caco-2* ist ein ubiquitär exprimiertes Gen (Resch, 2000) dessen biologische Funktion unbekannt ist.

### ***Otx1***

*Otx1* ist ein Homöobox-Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns besitzt (Boncinelli et al., 1993). Es konnten bereits *Otx1 knockout*-Mäuse durch den Austausch des *Otx1* Gens mit LacZ generiert werden (Acampora et al., 1996). *Otx1 (-/-)* Mäuse zeigen ein epileptisches Verhalten mit lokalen und auch ganzkörperlichen Anfällen. Anatomische und histologische Analysen zeigten, dass zusätzliche Abnormalitäten in Bereichen des Telencephalon, Mesencephalon, Hippokampus, Cerebellum und akustischen und visuellen Sinnesorganen vorkommen (Acampora et al., 1996).

### ***Homoloc-13***

Diese anonyme cDNA zeigt keine Homologie zu bereits bekannten Genen und auch sonst gibt es keine weiteren Hinweise auf die Funktion.

### ***Mor2***

Das *Mor2* Gen codiert für die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase, ein ubiquitär exprimiertes Haushaltsgen. Bisher wurde kein vollständiger *knockout* für das Gen *Mor2* generiert. Im Rahmen dieser Targetingvektor Kombination werden die Exons 6-9, sowie der 3'UTR Bereich deletiert.

## **5.3.2 O9\_PuroloxP - L2\_TKNeoloxP**

Die ES-Zellen, die bereits das Konstrukt O9\_PuroloxP tragen können in einer zweiten Runde mit dem fertiggestellten Deletionsvektor L2\_TKNeoloxP elektroporiert werden. Die Kombination dieser beiden Targetingvektoren bewirkt die Deletion der folgenden Gene (siehe Abb.5.1):

*Mor2*-5'UTR+Ex1-5, *Ugp2* und *SLP-8P*

### ***Mor2***

*Mor2* wurde bereits oben beschrieben. Der Einsatz dieser beiden Targetingvektoren erzeugt die Deletion des 5'UTR und der Exons 1-5.

### ***Ugp2***

Die Uridyl-Diphosphat-Glucose-Pyrophosphorylase-2 (*Ugp2*) codiert für ein Enzym des Glycogenstoffwechsels. Es ist eine von zwei bekannten Ugp-Isoformen und wird ubiquitär exprimiert. Ein *knockout* dieses Gens ist bislang nicht durchgeführt worden.

### ***SLP-8P***

Das Gen *SLP-8P* ist ein Tumorantigen (Stenner-Liewen et al., 2000), das zusammen mit dem Hepatocellulärem Carcinom (HCC) auftritt. Die Funktion des Proteins konnte aber bisher nicht identifiziert werden.

## **5.3.3 L2\_TKNeoloxP – A5PuroloxP oder K22\_PuroloxP**

Die Konstrukte L2\_TKNeoloxP, A5\_PuroloxP und K22\_PuroloxP können direkt für die ES-Zellkultur eingesetzt werden. Der Targetingvektor K22\_PuroloxP ist allerdings dem A5\_PuroloxP Konstrukt vorzuziehen, da die flankierenden Sequenzen zu K22\_PuroloxP bekannt sind. Für den A5\_PuroloxP-Vektor liegen dagegen keine flankierenden Sequenzen vor. Die Gene, die in diesem Deletionsbereich (siehe Abb.5.1) liegen, sind: *Pellino1*, *Murr1*, *B3GNT1* (Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase), *U2AF1RS1* (U2 small nuclearrbonucleoprotein auxiliary factor, small subunit 1), *Cct4* (Delta Unter-einheit des cytosolischen Chaperonin- Komplexes), eine anonyme cDNA (1700093K21Rik), *Pex13* (peroxisome biogenesis factor 13) und *Rel* (reticuloendotheliosis viral oncogene). Es sollen hier nur die für die *wobbler* kritische Region relevanten Gene kurz beschrieben werden.

### ***Pellino1***

*Pellino1* ist das Maus-Homolog des Drosophila *Pellino* Gens. *Pellino* spielt bei Drosophila in der Pelle-Toll-Signalkaskade eine Rolle (Groshans et al., 1999; Rich et al., 2000). Diese Signalkaskade ist bei Drosophila involviert bei der Festlegung der dorsoventralen Achse im Embryo sowie bei der Immunabwehr. Bei Säugetieren besitzt es ebenfalls in der Immunantwort eine Funktion. Bisher wurde noch kein *Pellino knockout* bei der Maus beschrieben. Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe von S. Fuchs ein *knockout*-Vektor konstruiert, um die Funktion des Gens und eine mögliche Beziehung zu der *wobbler* Mutation zu überprüfen. Es konnten zwei chimäre Mäuse generiert werden, die bislang aber keine Nachkommen zeugten, die das gewünschte modifizierte *Pellino1* Gen tragen.

### ***Murr1***

Die Funktion des *Murr1* Gens ist bislang noch unbekannt, es gibt aber Hinweise darauf, dass es eine Rolle im Kupfer Metabolismus spielt (van de Sluis; 2002).

## **5.4 Analyse der erzeugten Deletionen**

Die in dieser Arbeit konstruierten sechs Targetingvektoren innerhalb des *wobbler* Contigs auf Maus Chromosom 11 können auf acht verschiedene Arten (Del1-Del8; siehe Abb.5.1) miteinander kombiniert werden, so dass wahlweise unterschiedliche Deletionen erzeugt werden können. Das größte Interesse besteht in unserer Arbeitsgruppe an den Kombinationen, die Teile der *wobbler* kritischen Region dele-

tieren. Die Positionsklonierung des *wobbler* Gens ist eines der Hauptarbeitsgebiete in unserer Arbeitsgruppe. Trotz eines enormen Arbeitseinsatzes, der die vergleichende Sequenzierung aller bekannten Kandidatengene bei wildtyp und bei *wobbler* Mäusen beinhaltet, konnte das *wobbler* Gen bislang nicht identifiziert werden. Die Generierung von Deletionen im *wobbler* kritischen Bereich wird zu einer Verkleinerung des Kandidatengenintervalls führen. Da mehrere sich zum Teil überlappende Deletionen hergestellt werden können, kann genau definiert werden, in welchem Bereich die Mutation lokalisiert sein muss. Folgende Versuche sind mit den Deletionsmäusen geplant, um die Deletion zu charakterisieren und sie im Hinblick auf die *wobbler* Mutation zu analysieren.

#### 5.4.1 Verpaarung der Chimären zu heterozygoten Deletionsmäusen

Die nach der Blastozysteninjektion geborenen chimären Nachkommen werden weiter verpaart, mit dem Ziel Mäuse zu erhalten, die heterozygot für den Deletionsloкус sind. Diese heterozygoten Deletionsmäuse werden vermutlich keinen Phänotyp zeigen, da die meisten heterozygoten Mutationen rezessiv sind. Innerhalb des Deletionsbereiches Del1 kann nur über *Otx1* diesbezüglich eine Aussage getroffen werden. Es existiert bereits eine *Otx1 knockout*-Maus, die im heterozygoten (+/-) Zustand den Wildtypstatus zeigt. Für alle weiteren Gene dieser Region ist noch kein *knockout* bekannt.

#### 5.4.2 Verpaarung von Del1-Mäusen mit heterozygoten *wobbler* Mäusen

Die Del1 tragenden Mäuse werden mit heterozygoten *wobbler* Mäusen gekreuzt, um zu untersuchen, ob der *wobbler* Lokus innerhalb der Deletionsregion liegt. Ist dies der Fall, so sollten  $\frac{1}{4}$  der Nachkommen den *wobbler* Phänotyp zeigen. Ist kein *wobbler* Phänotyp zu erkennen, kann daraus geschlossen werden, dass die *wobbler* Mutation nicht in diesem Deletionsbereich lokalisiert ist (siehe Abb.5.2).

#### 5.4.3 Homozygote Deletionsmäuse

Weiterhin ist geplant die Deletionsmäuse miteinander zu verpaaren, so dass die Nachkommen homozygot für den Del1 Lokus sind. Eine Phänotyp-Analyse dieser Mäuse wird durchgeführt, wobei das Augenmerk besonders auf der Identifizierung von neurologischen und neuromuskulären Krankheiten liegt. Es wird erwartet, dass diese Del1 Mäuse unter anderem Merkmale des *Otx1* knockouts zeigen, die sich wie bereits beschrieben, als epileptische Anfälle und Abnormalitäten in der Anatomie des Gehirns äußern. Es ist aber auch durchaus denkbar, dass der Verlust von fünf Genen so starke Auswirkungen hat, dass die Nachkommen embryonal letal sind. In diesem Fall würde eine Analyse und Charakterisierung des embryonalen Phänotyps erfolgen.

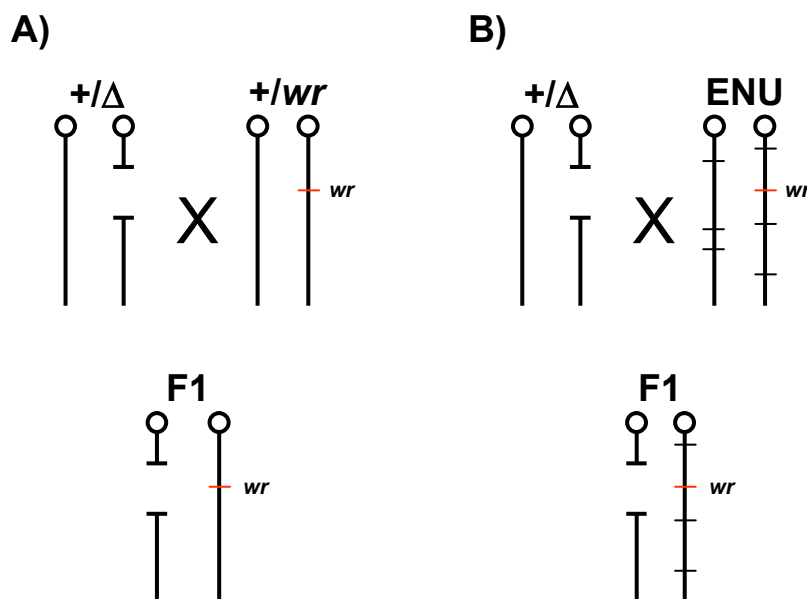
#### 5.4.4 Generierung neuer Deletionen

Wenn die Verpaarung dieser Deletionsmäuse mit heterozygoten *wobbler* Mäusen keine homozygoten *wobbler* Nachkommen erzeugt, kann durch die Generierung einer zweiten Deletionsregion (z. B. Del 8)

der verbleibende Teil der *wobbler* kritischen Region überspannt werden. Entstehen bei Kreuzungen von Del 8 und *wr* +/- Mäusen Nachkommen mit einem *wobbler* Phänotyp, so kann die kritische Region durch die Deletionen Del 2 und Del 3 weiter eingengt werden.

### 5.4.5 Verpaarung mit ENU-Mäusen

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Deletionsmäuse ist die Verpaarung mit ENU behandelten Mäusen (siehe Abb.5.2). In der F1 Generation zeigen sich nicht nur die dominanten Phänotypen, sondern auch die ENU-Mutationen mit rezessiven Phänotypen, die innerhalb der Deletionsregion lokalisiert sind. Durch das relativ kleine Deletionsfenster können die rezessiven Mutationen schnell identifiziert und analysiert werden. Es ist anzunehmen, dass auch der *wobbler* Locus bei der ENU-Mutagenese getroffen wird, so dass eine Verpaarung mit der den *wobbler* Locus tragenden Deletionsmaus, Nachkommen mit einem *wobbler* Phänotyp erzeugt. Durch dieses Experiment wäre es möglich, neue Allele der *wobbler* Mutation zu generieren. Diese neuen Allele wären sehr hilfreich bei der Analyse des neurologischen und des Spermatogenese-Defektes.



**Abb.5.2: Mögliche Verpaarungen der Deletionsmäuse.** A) Die heterozygoten Deletionsmäuse werden mit heterozygoten *wobbler* Mäusen verpaart. Liegt die *wobbler* Mutation innerhalb der Deletionsregion, so entsteht ein homozygoter Zustand für diesen spezifischen Locus. In der F1 Generation sollten  $\frac{1}{4}$  der Nachkommen den *wobbler* Phänotyp zeigen. B) Die Deletionsmäuse werden mit ENU behandelten Mäusen verpaart. Ist durch die ENU-Behandlung der *wobbler* Locus zufällig betroffen, so entstehen in der F1 Generation ebenfalls homozygote *wobbler* Tiere. (In der F1 Generation sind nur die Nachkommen dargestellt, die den *wobbler* Phänotyp zeigen.)

### 5.4.6 Strahleninduzierte Deletionen

Neben der Cre-Rekombinase vermittelten Deletionsstrategie wurde ein „alternatives“ Konzept verfolgt. In die Region des O9\_PuroloxP Targetingvektors wurde über homologe Rekombination eine TKNeo-Kassette in das Mausgenom eingefügt. Es folgte eine Bestrahlung der ES-Zellen (C57BL/6x129/SV<sup>JA<sup>E</sup></sup>) und eine Selektion auf den Verlust der TK-Kassette. Zusätzlich wurde der Verlust über ein PCR-Screening bestätigt. Letztendlich konnten 11 Klone identifiziert werden, die das TK-Gen nicht mehr besitzen. Es wurde nach geeigneten Polymorphismen gesucht, mit denen die erzeugten Deletionen charakterisiert werden können. In dem den Vektor-Integrationsort (bei ca. 11cM) umgebenden Bereich zwischen 2,4 und 17 cM konnten nur drei Polymorphismen zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und 129/SV identifiziert werden. Das ist nicht ausreichend, um die Deletionen umfassend zu charakterisieren. Deshalb ist eine eigene Polymorphismensuche gestartet worden. Wenn diese Suche nicht die gewünschten Ergebnisse bringt, ist es alternativ möglich die aus den ES-Zellen erzeugten Mäuse mit *Mus spretus* oder *Mus castaneus* zu kreuzen. Durch diese Interspezies-Kreuzung kann ein höherer Gehalt an Polymorphismen erzeugt werden (You et al., 1997).

Die Deletionsmäuse, die aus diesem Experiment entstehen, können zu verschiedenen Zwecken eingesetzt werden. Sie können zur Homozygotie gekreuzt werden, wobei die Vitalität der Nachkommen von der Größe der Deletion abhängt. Sie können mit *wobbler* Mäusen verpaart werden, um zu zeigen, dass die *wobbler* Mutation innerhalb des Deletionsbereiches liegt. Um weitere Aussagen hinsichtlich der Lokalisation der *wobbler* Mutation treffen zu können, müssen die Deletionsendpunkte aber erst genau analysiert werden. Ebenso können die Strahlendeletionsmäuse mit den oben beschriebenen Cre/loxP-Deletionsmäusen gekreuzt werden. Es entstehen dadurch heterozygote Deletionsbereiche und an Stellen an denen sich die Deletionen überlappen homozygote Deletionsbereiche. Auch diese Strategie könnte hilfreich zur weiteren Einengung des *wobbler* kritischen Bereiches sein.

## 5.5 ES-Zellkultur

Die ortsspezifische Integrationsfrequenz von Deletionsvektoren ist im Allgemeinen sehr gering. Erfahrungsgemäß liegen die Werte zwischen 0,25 und 1 %. Für die in dieser Arbeit eingesetzten Deletionsvektoren ließen sich in ES-Zellkulturexperimenten die in der folgenden Tabelle angegebenen ortsspezifischen Integrationsfrequenzen errechnen.

**Tab.5.1: Ortspezifische Integrationsfrequenz**

Targetingvektor	B4_TKNeoloxP	O9_PuroloxP_A	O9_PuroloxP_B	O9_TKNeo
Ortspezifische Integrationsfrequenz	0,6%	0,8%	0,26%	0,4%

Es ist ein deutlicher Unterschied in der ortsspezifischen Integrationsfrequenz zwischen B4\_TKNeoloxP und O9\_PuroloxP\_A zu erkennen. Bei diesen beiden Versuchen handelte es sich um die Elektroporati-



on der Vektorkonstrukte in unbehandelte ES-Zellen. Der Unterschied zwischen den beiden Klonen lässt sich durch die Länge der homologen Sequenz des Vektorkonstruktes sowie der Länge der Resistenzkassette erklären. Das Konstrukt B4\_TKNeoloxP (Insertionsvektor) trägt eine homologe Sequenz der Länge 5542 bp und eine 4000 bp große Resistenzkassette, wobei das O9\_PuroloxP-Konstrukt (Replacementvektor) insgesamt 6365 bp homologe Sequenz und eine nur 2300 bp große Resistenzkassette besitzt. Ein Vorteil, der in der Regel bei der Integration eines Insertionsvektors gegenüber eines Replacementvektors bestehen soll (Hasty et al., 1991), ist hier nicht zu beobachten.

Ein weiterer Vergleich kann zwischen O9\_PuroloxP\_A, O9\_PuroloxP\_B und O9\_TKNeo angestellt werden. In allen drei Fällen wurde dieselbe homologe DNA benutzt. O9\_PuroloxP\_A und O9\_PuroloxP\_B stellen sogar dasselbe Konstrukt dar, das in zwei unterschiedlichen Reaktionen eingesetzt wurde. In Reaktion A wurde das Konstrukt in unbehandelte ES-Zellen elektroporiert. In Reaktion B dagegen wurde dieses Konstrukt in einer zweiten Elektroporationsreaktion in ES-Zellen eingesetzt, die bereits das B4\_TKNeoloxP-Konstrukt trugen. Im Fall O9\_PuroloxP\_B ist die ortsspezifische Integrationsfrequenz um einen Faktor drei geringer als in Fall A. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass mehrfache Elektroporationen einen negativen Einfluss auf die ES-Zellen haben. Ein weiterer Vergleich kann mit dem Konstrukt O9\_TKNeo gezogen werden. Dieser Targetingvektor unterscheidet sich von dem O9\_PuroloxP-Vektor nur in der Resistenzkassette. Die TKNeo-Kassette scheint die ortsspezifische Integrationsfrequenz um die Hälfte zu senken. Vermutlich liegt das an der fast doppelten Sequenzlänge.

Abschließend kann hierzu gesagt werden, dass in diesen Experimenten kein gravierender Unterschied zwischen Insertions- und Replacementvektoren festgestellt werden konnte. Es konnte allerdings eine Beziehung zwischen der Länge der Resistenzkassette und der ortsspezifischen Integrationsfrequenz festgestellt werden. Weiterhin wurde beobachtet, dass mehrfache Elektroporationen eines ES-Zellklons eine negative Auswirkung haben.

## 5.6 Ausblick

In nächster Zeit werden die Cre/loxP vermittelten Deletionen im ES-Zellgenom erzeugt, so dass nach Erhalt der Deletionsmäuse die vorgestellten Kreuzungsexperimente durchgeführt werden können. Durch die resultierenden Ergebnisse wird es möglich sein, die *wobbler* kritische Region drastisch einzuschränken. Neben der Identifizierung der *wobbler* Mutation ist generell die Analyse der in den Deletionsregionen liegenden Gene von großem Interesse. Die heterozygoten und homozygoten Deletionsmäuse werden auf anatomische und physiologische Besonderheiten oder Abnormalitäten sowie auf Verhaltensauffälligkeiten hin untersucht. Es wird dann versucht, die beobachteten phänotypischen Merkmale den deletierten Genen zuzuordnen, so dass ein Einblick in die mögliche Funktion der mutierten Gene gewonnen werden kann. In dieser Hinsicht sind auch die Ergebnisse der laufenden *knockout*-Versuche der Gene *Kiaa0903* und *Pel11* von großem Interesse. Die Kenntnisse, die in diesen Versuchen über den *knockout*-Phänotyp gewonnen werden, können dann bei der Zuordnung von phänotypischen

---

Merkmale zu einzelnen Genen der Deletionsregionen hilfreich sein. Auch die strahleninduzierten Deletionsmäuse werden einen Einblick in die Funktionen der deletierten Gene geben.

Da bereits alle in der *wobbler* kritischen Region bekannten Gene als Kandidaten für die *wobbler* Mutation ausgeschlossen werden konnten (Resch, 2000; Fuchs, 2001), muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass ein nicht kodierendes regulatorisches Element betroffen ist. Durch die ständig wachsende Menge an Sequenzdaten bei Mensch und Maus werden zurzeit durch Sequenzvergleiche immer mehr von diesen konservierten nicht kodierenden Elementen (conserved non-coding sequences = CNS) entdeckt (Hardison, 2000; Levy et al., 2001). Für einige konnte bereits gezeigt werden, dass sie an der Regulation von z.T. mehr als 100 kb entfernten Genen beteiligt sind (Loots et al., 2000). Die Deletion dieser Regionen in Mäusen zeigte, dass die mit den CNS korrelierten Gene in ihrer Funktion stark beeinträchtigt sind (Loots et al., 2000; Mohrs et al., 2001).

Eine Suche nach CNS-Elementen zwischen Mensch und Maus wird zurzeit von J. Choudhuri im Bereich des BAC 123J24 durchgeführt. Es konnte eine unerwartet große Anzahl an CNS-Elementen in diesem Bereich identifiziert werden, die eine Untersuchung aller in der *wobbler* kritischen Region vorkommenden CNS-Elemente unmöglich macht. Diese CNS-Anzahl kann durch die Einschränkung des *wobbler* kritischen Bereiches durch die Analyse der Deletionsmäuse stark reduziert werden. Die verbleibenden CNS-Elemente stellen dann vielleicht eine überschaubare Menge dar, die auf ihre Funktion experimentell überprüft werden können.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abremski, K., R. Hoess, and N. Sternberg, *Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination*. Cell, 1983. **32**(4): p. 1301-11.
- Acampora, D., S. Mazan, V. Avantaggiato, P. Barone, F. Tuorto, Y. Lallemand, P. Brulet, and A. Simeone, *Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 218-22.
- Agah, R., P.A. Frenkel, B.A. French, L.H. Michael, P.A. Overbeek, and M.D. Schneider, *Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 169-79.
- Albert, H., E.C. Dale, E. Lee, and D.W. Ow, *Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome*. Plant J, 1995. **7**(4): p. 649-59.
- Andrews, J.M., M.B. Gardner, F.J. Wolfgram, G.W. Ellison, D.D. Porter, and W.W. Brandkamp, *Studies on a murine form of spontaneous lower motor neuron degeneration- -the wobbler (wa) mouse*. Am J Pathol, 1974. **76**(1): p. 63-78.
- Andrews, J.M., *The fine structure of the cervical spinal cord, ventral root and brachial nerves in the wobbler (wr) mouse*. J Neuropathol Exp Neurol, 1975. **34**(1): p. 12-27.
- Araki, K., M. Araki, and K. Yamamura, *Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(4): p. 868-72.
- Argos, P., A. Landy, K. Abremski, J.B. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R.H. Hoess, M.L. Kahn, B. Kalionis, S.V. Narayana, L.S. Pierson, 3rd, and et al., *The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity*. Embo J, 1986. **5**(2): p. 433-40.
- Arin, M.J., M.A. Longley, X.J. Wang, and D.R. Roop, *Focal activation of a mutant allele defines the role of stem cells in mosaic skin disorders*. J Cell Biol, 2001. **152**(3): p. 645-9.
- Augustin, M., P. Heimann, S. Rathke, and H. Jockusch, *Spinal muscular atrophy gene wobbler of the mouse: evidence from chimeric spinal cord and testis for cell-autonomous function*. Dev Dyn, 1997. **209**(3): p. 286-95.
- Austin, S., M. Ziese, and N. Sternberg, *A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons*. Cell, 1981. **25**(3): p. 729-36.
- Balling, R., S.D.M. Brown, M. Hrabe de Angelis, M. Justice, J. Nadeau, J. Peters, *Great times for mouse gene genetics: Getting ready for large scale ENU-mutagenesis*. Mamm. Genome, 2000. **11**: p. 471.
- Baron, U., S. Freundlieb, M. Gossen, and H. Bujard, *Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(17): p. 3605-6.

- 
- Baron, U., M. Gossen, and H. Bujard, *Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(14): p. 2723-9.
- Baron, U., D. Schnappinger, V. Helbl, M. Gossen, W. Hillen, and H. Bujard, *Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 1013-8.
- Baron, U. and H. Bujard, *Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances*. Methods Enzymol, 2000. **327**: p. 401-21.
- Baulac, M., F. Rieger, and V. Meininger, *The loss of motorneurons corresponding to specific muscles in the wobblers mutant mouse*. Neurosci Lett, 1983. **37**(1): p. 99-104.
- Berghammer, H. and B. Auer, *"Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in E. coli*. Biotechniques, 1993. **14**(4): p. 524, 528.
- Bhandari, B., Roesler, W.J., DeLisio, K.D., Klemm, D.J., Ross, N.S. und Miller, R.E. *A functional promotor flanks an intronless glutamine synthetase gene*. J. Biol. Chem., 1990. **266**: 7784-7792
- Bieberich, C.J., C.M. King, B.T. Tinkle, and G. Jay, *A transgenic model of transactivation by the Tax protein of HTLV-I*. Virology, 1993. **196**(1): p. 309-18.
- Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
- Boncinelli, E., M. Gulisano, and V. Broccoli, *Emx and Otx homeobox genes in the developing mouse brain*. J Neurobiol, 1993. **24**(10): p. 1356-66.
- Bradley, A., B. Zheng, and P. Liu, *Thirteen years of manipulating the mouse genome: a personal history*. Int J Dev Biol, 1998. **42**(7): p. 943-50.
- Braun, T., E. Bober, M.A. Rudnicki, R. Jaenisch, and H.H. Arnold, *MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice*. Development, 1994. **120**(11): p. 3083-92.
- Broach, J.R. and J.B. Hicks, *Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle*. Cell, 1980. **21**(2): p. 501-8.
- Brunner, R.M., T. Goldammer, R. Furbass, J. Vanselow, and M. Schwerin, *Genomic organization of the bovine aromatase encoding gene and a homologous pseudogene as revealed by DNA fiber FISH*. Cytogenet Cell Genet, 1998. **82**(1-2): p. 37-40.
- Buchholz, F., L. Ringrose, P.O. Angrand, F. Rossi, and A.F. Stewart, *Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4256-62.
- Buchholz, F., P.O. Angrand, and A.F. Stewart, *A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(15): p. 3118-9.
- Buchholz, F., P.O. Angrand, and A.F. Stewart, *Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 657-62.

- Buchholz, F., Y. Refaeli, A. Trumpp, and J.M. Bishop, *Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse*. EMBO Rep, 2000. **1**(2): p. 133-9.
- Capecchi, M.R., *Altering the genome by homologous recombination*. Science, 1989. **244**(4910): p. 1288-92.
- Capecchi, M.R., *Gezielter Austausch von Genen, in Spektrum der Wissenschaft*. 1997. p. 62-70.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy, *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
- Chin, L., A. Tam, J. Pomerantz, M. Wong, J. Holash, N. Bardeesy, Q. Shen, R. O'Hagan, J. Pantginis, H. Zhou, J.W. Horner, 2nd, C. Cordon-Cardo, G.D. Yancopoulos, and R.A. DePinho, *Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 468-72.
- Collins, F.S., *Positional cloning: let's not call it reverse anymore*. Nat Genet, 1992. **1**(1): p. 3-6.
- Collins, E.C., R. Pannell, E.M. Simpson, A. Forster, and T.H. Rabbitts, *Inter-chromosomal recombination of Mll and Af9 genes mediated by cre-loxP in mouse development*. EMBO Rep, 2000. **1**(2): p. 127-32.
- Danielian, P.S., D. Muccino, D.H. Rowitch, S.K. Michael, and A.P. McMahon, *Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase*. Curr Biol, 1998. **8**(24): p. 1323-6.
- de Wind, N., M. Dekker, A. Berns, M. Radman, and H. te Riele, *Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer*. Cell, 1995. **82**(2): p. 321-30.
- Denny, C.T., G.F. Hollis, F. Hecht, R. Morgan, M.P. Link, S.D. Smith, and I.R. Kirsch, *Common mechanism of chromosome inversion in B- and T-cell tumors: relevance to lymphoid development*. Science, 1986. **234**(4773): p. 197-200.
- Dietrich, W.F., J.C. Miller, R.G. Steen, M. Merchant, D. Damron, R. Nahf, A. Gross, D.C. Joyce, M. Wessel, R.D. Dredge, and et al., *A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms*. Nat Genet, 1994. **7**(2 Spec No): p. 220-45.
- Duchen, L.W. and S.J. Strich, *An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant 'wobbler'*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1968. **31**(6): p. 535-42.
- Eckhardt, T., *A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria*. Plasmid, 1978. **1**(4): p. 584-8.
- Ehling, D. *Ergänzung des BAC-Contigs und Konstruktion eines Targeting-Vektors für die "wobbler-kritische" Region*. 1999, Bielefeld

- Ewald, D., M. Li, S. Efrat, G. Auer, R.J. Wall, P.A. Furth, and L. Hennighausen, *Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1384-6.
- Falconer, D.S., *Wobbler (wr)*. Mouse News Letters, 1956. **15**: p. 22.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger, and P. Chambon, *Ligand-activated site-specific recombination in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10887-90.
- Felsher, D.W. and J.M. Bishop, *Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages*. Mol Cell, 1999. **4**(2): p. 199-207.
- Fiering, S., C.G. Kim, E.M. Epner, and M. Groudine, *An "in-out" strategy using gene targeting and FLP recombinase for the functional dissection of complex DNA regulatory elements: analysis of the beta-globin locus control region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8469-73.
- Fuchs, S., *Mutationsanalyse von Kandidatengenen für die neurologische Mutation wobbler der Maus.*, in *Entwicklungsbiologie*. 2001, Bielefeld.
- Futcher, A.B., *Copy number amplification of the 2 micron circle plasmid of Saccharomyces cerevisiae*. J Theor Biol, 1986. **119**(2): p. 197-204.
- Gagneten, S., Y. Le, J. Miller, and B. Sauer, *Brief expression of a GFP cre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(16): p. 3326-31.
- Gerbaud, C., P. Fournier, H. Blanc, M. Aigle, H. Heslot, and M. Guerineau, *High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2-micron yeast plasmid*. Gene, 1979. **5**(3): p. 233-53.
- Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen, and H. Bujard, *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
- Grosshans, J., F. Schnorrer, and C. Nusslein-Volhard, *Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of dorsal*. Mech Dev, 1999. **81**(1-2): p. 127-38.
- Gu, H., Y.R. Zou, and K. Rajewsky, *Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1155-64.
- Gu, H., J.D. Marth, P.C. Orban, H. Mossmann, and K. Rajewsky, *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting*. Science, 1994. **265**(5168): p. 103-6.
- Hantaz-Ambroise, D., B. Blondet, M. Murawsky, and F. Rieger, *Abnormal astrocyte differentiation and defective cellular interactions in wobbler mouse spinal cord*. J Neurocytol, 1994. **23**(3): p. 179-92.

- Hardison, R.C., *Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements*. Trends Genet, 2000. **16**(9): p. 369-72.
- Harris, J.B., *A note on severe hind-limb involvement in mice with inherited motor neurone disease*. J Neurol Sci, 1975. **24**(1): p. 53-8.
- Hasan, M.T., K. Schonig, S. Berger, W. Graewe, and H. Bujard, *Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice*. Genesis, 2001. **29**(3): p. 116-22.
- Hassold, T., M. Abruzzo, K. Adkins, D. Griffin, M. Merrill, E. Millie, D. Saker, J. Shen, and M. Zaragoza, *Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology*. Environ Mol Mutagen, 1996. **28**(3): p. 167-75.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, and A. Bradley, *The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(11): p. 5586-91.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, C. Chang, and A. Bradley, *Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(9): p. 4509-17.
- Hasty, P., A. Abuin, A. Bradley, *Gene targeting, principles, and practice in mammalian cells.*, in *Gene Targeting*, A.L. Joyner, Editor. 2000.
- Heimann, P., S. Laage, and H. Jockusch, *Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse, wobbler (WR)*. Differentiation, 1991. **47**(2): p. 77-83.
- Heimann, P., E. Herkströter, *Mid piece and axonemal defects in spermatozoa of the neurological mouse mutant 'wobbler'*. Eur. J. Biol. Supplement, 1993. **60**: p. 127.
- Herrick, J. and A. Bensimon, *Single molecule analysis of DNA replication*. Biochimie, 1999. **81**(8-9): p. 859-71.
- Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg, *PI site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3398-402.
- Hoess, R.H. and K. Abremski, *Interaction of the bacteriophage PI recombinase Cre with the recombining site loxP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(4): p. 1026-9.
- Hoess, R., A. Wierzbicki, and K. Abremski, *Formation of small circular DNA molecules via an in vitro site-specific recombination system*. Gene, 1985. **40**(2-3): p. 325-9.
- Hoess, R.H. and K. Abremski, *Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system*. J Mol Biol, 1985. **181**(3): p. 351-62.
- Holzenberger, M., C. Lenzner, P. Leneuve, R. Zaoui, G. Hamard, S. Vaulont, and Y.L. Bouc, *Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(21): p. E92.
- Hrabe de Angelis, M. and R. Balling, *Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics*. Mutat Res, 1998. **400**(1-2): p. 25-32.
- Hrabe de Angelis, M.H., H. Flaswinkel, H. Fuchs, B. Rathkolb, D. Soewarto, S. Marschall, S. Heffner, W. Pargent, K. Wuensch, M. Jung, A. Reis, T. Richter, F. Alessandrini, T. Jakob, E. Fuchs, H.

- Kolb, E. Kremmer, K. Schaeble, B. Rollinski, A. Roscher, C. Peters, T. Meitinger, T. Strom, T. Steckler, F. Holsboer, T. Klopstock, F. Gekeler, C. Schindewolf, T. Jung, K. Avraham, H. Behrendt, J. Ring, A. Zimmer, K. Schughart, K. Pfeffer, E. Wolf, and R. Balling, *Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis*. Nat Genet, 2000. **25**(4): p. 444-7.
- Huettner, C.S., P. Zhang, R.A. Van Etten, and D.G. Tenen, *Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 57-60.
- Imai, T., M. Jiang, P. Kastner, P. Chambon, and D. Metzger, *Selective ablation of retinoid X receptor alpha in hepatocytes impairs their lifespan and regenerative capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4581-6.
- Indra, A.K., X. Warot, J. Brocard, J.M. Bornert, J.H. Xiao, P. Chambon, and D. Metzger, *Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(22): p. 4324-7.
- Jacks, T., T.S. Shih, E.M. Schmitt, R.T. Bronson, A. Bernardis, and R.A. Weinberg, *Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in Nf1*. Nat Genet, 1994. **7**(3): p. 353-61.
- Jayaram, M., *Two-micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(17): p. 5875-9.
- Junier, M.P., M. Coulpier, N. Le Forestier, J. Cadusseau, F. Suzuki, M. Peschanski, and P.A. Dreyfus, *Transforming growth factor alpha (TGF alpha) expression in degenerating motoneurons of the murine mutant wobbler: a neuronal signal for astrogliosis?* J Neurosci, 1994. **14**(7): p. 4206-16.
- Kaupmann, K., D. Simon-Chazottes, J.L. Guenet, and H. Jockusch, *Wobbler, a mutation affecting motoneuron survival and gonadal functions in the mouse, maps to proximal chromosome 11*. Genomics, 1992. **13**(1): p. 39-43.
- Kaupmann, K., *Genetische Kopplungsanalyse an Interspezies-Hybriden der Maus. Chromosomale Kartierung des Gens für die spinale Muskelatrophie "Wobbler".*, in *Entwicklungsbiologie*. 1992, Bielefeld.
- Kavathas, P., F.H. Bach, and R. DeMars, *Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(7): p. 4251-5.
- Kellendonk, C., F. Tronche, A.P. Monaghan, P.O. Angrand, F. Stewart, and G. Schutz, *Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(8): p. 1404-11.
- Kellendonk, C., F. Tronche, E. Casanova, K. Anlag, C. Opherk, and G. Schutz, *Inducible site-specific recombination in the brain*. J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 175-82.



- Khillan, J.S., K.C. Deen, S.H. Yu, R.W. Sweet, M. Rosenberg, and H. Westphal, *Gene transactivation mediated by the TAT gene of human immunodeficiency virus in transgenic mice*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(4): p. 1423-30.
- Kilby, N.J., M.R. Snaith, and J.A. Murray, *Site-specific recombinases: tools for genome engineering*. Trends Genet, 1993. **9**(12): p. 413-21.
- Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmer, H. Lubbert, and H. Bujard, *Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10933-8.
- Klockars, T., M. Savukoski, J. Isosomppi, M. Laan, I. Jarvela, K. Petrukhin, A. Palotie, and L. Peltonen, *Efficient construction of a physical map by fiber-FISH of the CLN5 region: refined assignment and long-range contig covering the critical region on 13q22*. Genomics, 1996. **35**(1): p. 71-8.
- Kolodner, R., *Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair*. Genes Dev, 1996. **10**(12): p. 1433-42.
- Korthaus, D., *Feinkartierung des Gens Mor2 für die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase auf Chromosom 11 der Maus in der Nähe des wobbler-Gens und seines Homologons MDH1 auf dem humanen Chromosom 2p.*, in *Entwicklungsbiologie*. 1996, Bielefeld.
- Korthaus, D., N. Wedemeyer, A. Lengeling, M. Ronsiek, H. Jockusch, and T. Schmitt-John, *Integrated radiation hybrid map of human chromosome 2p13: possible involvement of dynactin in neuromuscular diseases*. Genomics, 1997. **43**(2): p. 242-4.
- Kuramochi S; Matsuda Y; Okamoto M; Kitamura F; Yonekawa H; Karasuyama H. *Molecular cloning of the human gene STK10 encoding lymphocyte-oriented kinase, and comparative chromosomal mapping of the human, mouse, and rat homologues*. Immunogenetics, 1999. **49**: 369-375
- Laage, S., G. Zobel, and H. Jockusch, *Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal atrophy, wobbler*. Dev Neurosci, 1988. **10**(3): p. 190-8.
- Lavon, I., I. Goldberg, S. Amit, L. Landsman, S. Jung, B.Z. Tsuberi, I. Barshack, J. Kopolovic, E. Galun, H. Bujard, and Y. Ben-Neriah, *High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 573-7.
- Leestma, J.E. and S. Sepsenwol, *Sperm tail axoneme alterations in the Wobbler mouse*. J Reprod Fertil, 1980. **58**(1): p. 267-70.
- Lengeling, A., W.E. Zimmer, S.R. Goodman, Y. Ma, M.L. Bloom, G. Bruneau, M. Krieger, J. Thibault, K. Kaupmann, and H. Jockusch, *Exclusion of two candidate genes, Spnb-2 and Dcd, for the wobbler spinal muscular atrophy gene on proximal mouse chromosome 11*. Mamm Genome, 1994. **5**(3): p. 163-6.

- Lengeling, A. *Klonierung und Charakterisierung neuer Kandidatengene für die pleiotrope Mutation wobbler der Maus*. 1997, Bielefeld
- Lerner, A., L. D'Adamio, A.C. Diener, L.K. Clayton, and E.L. Reinherz, *CD3 zeta/eta/theta locus is colinear with and transcribed antisense to the gene encoding the transcription factor Oct-1*. *J Immunol*, 1993. **151**(6): p. 3152-62.
- Levy, S., S. Hannenhalli, and C. Workman, *Enrichment of regulatory signals in conserved non-coding genomic sequence*. *Bioinformatics*, 2001. **17**(10): p. 871-7.
- Lewandoski, M., *Conditional control of gene expression in the mouse*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(10): p. 743-55.
- Li, Z.W., G. Stark, J. Gotz, T. Rulicke, M. Gschwind, G. Huber, U. Muller, and C. Weissmann, *Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 6158-62.
- Lindsay, E.A., A. Botta, V. Jurecic, S. Carattini-Rivera, Y.C. Cheah, H.M. Rosenblatt, A. Bradley, and A. Baldini, *Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region*. *Nature*, 1999. **401**(6751): p. 379-83.
- Lindsay, E.A., F. Vitelli, H. Su, M. Morishima, T. Huynh, T. Pramparo, V. Jurecic, G. Ogunrinu, H.F. Sutherland, P.J. Scambler, A. Bradley, and A. Baldini, *Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice*. *Nature*, 2001. **410**(6824): p. 97-101.
- Loots, G.G., R.M. Locksley, C.M. Blankespoor, Z.E. Wang, W. Miller, E.M. Rubin, and K.A. Frazer, *Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons*. *Science*, 2000. **288**(5463): p. 136-40.
- Lottspeich, F., H. Zorbas, *Bioanalytik*. 1998.
- Mack, A., B. Sauer, K. Abremski, and R. Hoess, *Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(17): p. 4451-5.
- Madsen, L., N. Labrecque, J. Engberg, A. Dierich, A. Svejgaard, C. Benoist, D. Mathis, and L. Fugger, *Mice lacking all conventional MHC class II genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(18): p. 10338-43.
- Mansour, S.L., K.R. Thomas, and M.R. Capecchi, *Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes*. *Nature*, 1988. **336**(6197): p. 348-52.
- Merscher, S., B. Funke, J.A. Epstein, J. Heyer, A. Puech, M.M. Lu, R.J. Xavier, M.B. Demay, R.G. Russell, S. Factor, K. Tokooya, B.S. Jore, M. Lopez, R.K. Pandita, M. Lia, D. Carrion, H. Xu, H. Schorle, J.B. Kobler, P. Scambler, A. Wynshaw-Boris, A.I. Skoultchi, B.E. Morrow, and R. Kucherlapati, *TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 619-29.

- Metzger, D., J. Clifford, H. Chiba, and P. Chambon, *Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6991-5.
- Metzger, D. and P. Chambon, *Site- and time-specific gene targeting in the mouse*. Methods, 2001. **24**(1): p. 71-80.
- Meyers, E.N., M. Lewandoski, and G.R. Martin, *An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 136-41.
- Michalet, X., R. Ekong, F. Fougerousse, S. Rousseaux, C. Schurra, N. Hornigold, M. van Slegtenhorst, J. Wolfe, S. Povey, J.S. Beckmann, and A. Bensimon, *Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1518-23.
- Modrich, P. and R. Lahue, *Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 101-33.
- Mohrs, M., C.M. Blankespoor, Z.E. Wang, G.G. Loots, V. Afzal, H. Hadeiba, K. Shinkai, E.M. Rubin, and R.M. Locksley, *Deletion of a coordinate regulator of type 2 cytokine expression in mice*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 842-7.
- Monaco, A.P. and Z. Larin, *YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools*. Trends Biotechnol, 1994. **12**(7): p. 280-6.
- Nagase, T., K. Ishikawa, N. Miyajima, A. Tanaka, H. Kotani, N. Nomura, and O. Ohara, *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro*. DNA Res, 1998. **5**(1): p. 31-9.
- Nerenberg, M., S.H. Hinrichs, R.K. Reynolds, G. Khoury, and G. Jay, *The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice*. Science, 1987. **237**(4820): p. 1324-9.
- Noveroske, J.K., J.S. Weber, and M.J. Justice, *The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse*. Mamm Genome, 2000. **11**(7): p. 478-83.
- O'Gorman, S., D.T. Fox, and G.M. Wahl, *Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells*. Science, 1991. **251**(4999): p. 1351-5.
- O'Gorman, S., N.A. Dagenais, M. Qian, and Y. Marchuk, *Protamine-Cre recombinase transgenes efficiently recombine target sequences in the male germ line of mice, but not in embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14602-7.
- Ohno, H., S. Goto, S. Taki, T. Shirasawa, H. Nakano, S. Miyatake, T. Aoe, Y. Ishida, H. Maeda, T. Shirai, and et al., *Targeted disruption of the CD3 epsilon locus causes high lethality in mice: modulation of Oct-1 transcription on the opposite strand*. Embo J, 1994. **13**(5): p. 1157-65.
- Olson, E.N., H.H. Arnold, P.W. Rigby, and B.J. Wold, *Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4*. Cell, 1996. **85**(1): p. 1-4.

- Ornitz, D.M., R.W. Moreadith, and P. Leder, *Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 698-702.
- Peterson, K.R., C.H. Clegg, C. Huxley, B.M. Josephson, H.S. Haugen, T. Furukawa, and G. Stamatoyannopoulos, *Transgenic mice containing a 248-kilobase human beta locus yeast artificial chromosome display proper developmental control of human globin genes*. Trans Assoc Am Physicians, 1993. **106**: p. 101-9.
- Pham, C.T., D.M. MacIvor, B.A. Hug, J.W. Heusel, and T.J. Ley, *Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13090-5.
- Popescu, N.C. and D.B. Zimonjic, *Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **93**(1): p. 10-21.
- Rabbitts, T.H., *Chromosomal translocations in human cancer*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 143-9.
- Ramirez-Solis, R., P. Liu, and A. Bradley, *Chromosome engineering in mice*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 720-4.
- Rathke, S., *Strukturelle Veränderungen im Zentralnervensystem neurologischer Mutanten der Maus.* 1996, Bielefeld.
- Rathke-Hartlieb, S., V.C. Schmidt, H. Jockusch, T. Schmitt-John, and J.W. Bartsch, *Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse*. Neuroreport, 1999. **10**(16): p. 3411-6.
- Rathkolb, B., T. Decker, E. Fuchs, D. Soewarto, C. Fella, S. Heffner, W. Pargent, R. Wanke, R. Balling, M. Hrabe de Angelis, H.J. Kolb, and E. Wolf, *The clinical-chemical screen in the Munich ENU Mouse Mutagenesis Project: screening for clinically relevant phenotypes*. Mamm Genome, 2000. **11**(7): p. 543-6.
- Rayssiguier, C., D.S. Thaler, and M. Radman, *The barrier to recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch-repair mutants*. Nature, 1989. **342**(6248): p. 396-401.
- Resch, K., *Physikalische Kartierung von Genen und anonymen Markern auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus und dem humanen Chromosomenabschnitt 2p13: Ein Beitrag zur Positionsklonierung des wobbler-Gens.*, in *Entwicklungsbiologie*. 1997, Bielefeld.
- Resch, K., D. Korthaus, N. Wedemeyer, A. Lengeling, M. Ronsiek, C. Thiel, K. Baer, H. Jockusch, and T. Schmitt-John, *Homology between human chromosome 2p13.3 and the wobbler critical region on mouse chromosome 11: comparative high-resolution mapping of STS and EST loci on YAC/BAC contigs*. Mamm Genome, 1998. **9**(11): p. 893-8.
- Resch, K., *Interspezies-Genom-Vergleich im Bereich des humanen Chr 2p13: Neue Kandidatengene für die neurologische Mutation Wobbler der Maus.*, in *Entwicklungsbiologie*. 2000, Bielefeld.
- Rich, T., R. Allen, and J. Trowsdale, *How low can toll go?* Trends Genet, 2000. **16**(7): p. 292-4.

- Roa, B.B. and J.R. Lupski, *Molecular genetics of Charcot-Marie-Tooth neuropathy*. Adv Hum Genet, 1994. **22**: p. 117-52.
- Robberson, B.L., G.J. Cote, and S.M. Berget, *Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(1): p. 84-94.
- Sadowski, P.D., *The Flp recombinase of the 2-microns plasmid of Saccharomyces cerevisiae*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1995. **51**: p. 53-91.
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Falcoona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. und Arnheim, N. *Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia*. Science, 1985 **230**: 1350-1354
- Saiki, R.K., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharff, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K.B. und Ehrlich, H. *Primer-detected enzymatic amplification with thermostable DNA polymerase*. Science, 1988 **239**: 487-492
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. 2nd ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratoy Press.
- Sauer, B., *Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(6): p. 2087-96.
- Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
- Schedl, A., L. Montoliu, G. Kelsey, and G. Schutz, *A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 258-61.
- Schlake, T., I. Schupp, K. Kutsche, A. Mincheva, P. Lichter, and T. Boehm, *Predetermined chromosomal deletion encompassing the Nf-1 gene*. Oncogene, 1999. **18**(44): p. 6078-82.
- Schmidt, V.C., *Ausschluß des Gens Cct4, das die delta-Untereinheit des cytosolischen TCP-1 enthaltenden Chaperonin-Komplexes (CCT) kodiert, für die Mutation wobbler der Maus und weitere Eingrenzung des Kandidatengenbereichs auf dem proximalen Chromosom 11.*, in *Entwicklungsbiologie*. 1997, Bielefeld.
- Schwartz, D.C. and C.R. Cantor, *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. Cell, 1984. **37**(1): p. 67-75.
- Schwenk, F., R. Kuhn, P.O. Angrand, K. Rajewsky, and A.F. Stewart, *Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(6): p. 1427-32.
- Selva, E.M., L. New, G.F. Crouse, and R.S. Lahue, *Mismatch correction acts as a barrier to homeologous recombination in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1995. **139**(3): p. 1175-88.
- Senecoff, J.F., P.J. Rossmessl, and M.M. Cox, *DNA recognition by the FLP recombinase of the yeast 2 mu plasmid. A mutational analysis of the FLP binding site*. J Mol Biol, 1988. **201**(2): p. 405-21.
- Shaffer, L.G. and J.R. Lupski, *Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: p. 297-329.

- Shin, M.K., J.M. LeVorse, R.S. Ingram, and S.M. Tilghman, *The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development*. Nature, 1999. **402**(6761): p. 496-501.
- Shizuya, H., B. Birren, U.J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon, *Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8794-7.
- Smith, A.J., M.A. De Sousa, B. Kwabi-Addo, A. Heppell-Parton, H. Impey, and P. Rabbitts, *A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination*. Nat Genet, 1995. **9**(4): p. 376-85.
- Smithies, O., *Animal models of human genetic diseases*. Trends Genet, 1993. **9**(4): p. 112-6.
- Soewarto, D., C. Fella, A. Teubner, B. Rathkolb, W. Pargent, S. Heffner, S. Marschall, E. Wolf, R. Balting, and M. Hrabe de Angelis, *The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen*. Mamm Genome, 2000. **11**(7): p. 507-10.
- Soriano, P., C. Montgomery, R. Geske, and A. Bradley, *Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice*. Cell, 1991. **64**(4): p. 693-702.
- Stark, W.M., M.R. Boocock, and D.J. Sherratt, *Catalysis by site-specific recombinases*. Trends Genet, 1992. **8**(12): p. 432-9.
- Stenner-Liewen, F., G. Luo, U. Sahin, O. Tureci, M. Koslovski, I. Kautz, H. Liewen, and M. Pfreundschuh, *Definition of tumor-associated antigens in hepatocellular carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(3): p. 285-90.
- Sternberg, N. and D. Hamilton, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites*. J Mol Biol, 1981. **150**(4): p. 467-86.
- te Riele, H., E.R. Maandag, and A. Berns, *Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 5128-32.
- Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell, 1987. **51**(3): p. 503-12.
- Thomas, K.R., C. Deng, and M.R. Capecchi, *High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(7): p. 2919-23.
- Tsai, T.F., Y.H. Jiang, J. Bressler, D. Armstrong, and A.L. Beaudet, *Paternal deletion from Snrpn to Ube3a in the mouse causes hypotonia, growth retardation and partial lethality and provides evidence for a gene contributing to Prader-Willi syndrome*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(8): p. 1357-64.
- Ulbrich, M., *Kartierung von Rekombinations-Bruchpunkten in der wobblers-kritischen Region auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus.*, in *Entwicklungsbiologie*. 2000, Bielefeld.
- Urlaub, G., P.J. Mitchell, E. Kas, L.A. Chasin, V.L. Funanage, T.T. Myoda, and J. Hamlin, *Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions*. Somat Cell Mol Genet, 1986. **12**(6): p. 555-66.

- Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M.T. Hasan, H. Bujard, and W. Hillen, *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7963-8.
- van De Sluis, B., J. Rothuizen, P.L. Pearson, B.A. van Oost, and C. Wijmenga, *Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(2): p. 165-73.
- Van Deursen, J., M. Fornerod, B. Van Rees, and G. Grosveld, *Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7376-80.
- Vasioukhin, V., L. Degenstein, B. Wise, and E. Fuchs, *The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8551-6.
- Watson, J.D., *The human genome project: past, present, and future*. Science, 1990. **248**(4951): p. 44-9.
- Wedemeyer, N., *Charakterisierung der Rab1-Genregion auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus, als Beitrag zur Positionsklonierung des Gens für die spinale Muskelatrophie (Wobbler)*., in *Entwicklungsbiologie*. 1995, Bielefeld.
- Wedemeyer, N., A. Lengeling, M. Ronsiek, D. Korthaus, K. Baer, M. Wuttke, and H. Jockusch, *YAC contigs of the Rab1 and wobbler (wr) spinal muscular atrophy gene region on proximal mouse chromosome 11 and of the homologous region on human chromosome 2p*. Genomics, 1996. **32**(3): p. 447-54.
- Wells, K.D., J.A. Foster, K. Moore, V.G. Pursel, and R.J. Wall, *Codon optimization, genetic insulation, and an rtTA reporter improve performance of the tetracycline switch*. Transgenic Res, 1999. **8**(5): p. 371-81.
- Wichmann, H., Disela, C., Haubruck, H. und Gallwitz, D. *Nucleotide sequence of the mouse ypt1 gene encoding a ras-related GTP-binding protein*. Nucl. Acids Res., 1989. **17**: 6737-6737
- Wunderlich, F.T., H. Wildner, K. Rajewsky, and F. Edenhofer, *New variants of inducible Cre recombinase: a novel mutant of Cre-PR fusion protein exhibits enhanced sensitivity and an expanded range of inducibility*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(10): p. E47.
- Xu, X., C. Li, L. Garrett-Beal, D. Larson, A. Wynshaw-Boris, and C.X. Deng, *Direct removal in the mouse of a floxed neo gene from a three-loxP conditional knockout allele by two novel approaches*. Genesis, 2001. **30**(1): p. 1-6.
- Yamamoto, A., J.J. Lucas, and R. Hen, *Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease*. Cell, 2000. **101**(1): p. 57-66.
- Yang, X.W., P. Model, and N. Heintz, *Homologous recombination based modification in Escherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 859-65.

- 
- You, Y., V.L. Browning, and J.C. Schimenti, *Generation of radiation-induced deletion complexes in the mouse genome using embryonic stem cells*. *Methods*, 1997. **13**(4): p. 409-21.
- You, Y., R. Bergstrom, M. Klemm, B. Lederman, H. Nelson, C. Ticknor, R. Jaenisch, and J. Schimenti, *Chromosomal deletion complexes in mice by radiation of embryonic stem cells*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 285-8.
- Yu, Y. and A. Bradley, *Engineering chromosomal rearrangements in mice*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(10): p. 780-90.
- Zhang, H., P. Hasty, and A. Bradley, *Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(4): p. 2404-10.
- Zhang, Y., C. Riesterer, A.M. Ayrall, F. Sablitzky, T.D. Littlewood, and M. Reth, *Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells*. *Nucleic Acids Res*, 1996. **24**(4): p. 543-8.
- Zheng, B., A.A. Mills, and A. Bradley, *A system for rapid generation of coat color-tagged knockouts and defined chromosomal rearrangements in mice*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(11): p. 2354-60.
- Zheng, B., M. Sage, E.A. Sheppard, V. Jurecic, and A. Bradley, *Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(2): p. 648-55.
- Zheng, B., A.A. Mills, and A. Bradley, *Introducing defined chromosomal rearrangements into the mouse genome*. *Methods*, 2001. **24**(1): p. 81-94.
- Zhu, Y., M.C. Jong, K.A. Frazer, E. Gong, R.M. Krauss, J.F. Cheng, D. Boffelli, and E.M. Rubin, *Genomic interval engineering of mice identifies a novel modulator of triglyceride production*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(3): p. 1137-42.
- Zou, Y.R., W. Muller, H. Gu, and K. Rajewsky, *Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies*. *Curr Biol*, 1994. **4**(12): p. 1099-103.



## 7. Anhang

### 7.1 In dieser Arbeit ermittelte BAC-Endsequenzen

#### BAC 25D8 For

CAGCTGTTTGTGGCACTGACATGGAaaTAGTGGAAAGCCCgGGCTCGAGCTGCCTCTGGGGGAAGGGCCAGCTGCC  
GGTAGCACCTGTGTGGTAGCCCCCTCAGCAGAGCCCCAAGAATGGAATCTTAGCTCTCAGACTGAGCTCAATGACCT  
GAAGAGGTCTTATCTCTCAGACTGAGGCCTGGAGAGGAAC TAACAGAAAAGCACACCCAGGC

#### BAC 25D8 Rev

GTGGGGAAAGTTTAGGACTGAAAATAAGACACAAATGCTTTGTAAGTTGCTCAGCTTGTCTAGAAGAATATAAAAC  
AAATCCACCTTCACACAATTTTAAATGGAAAGTAGAATTTAAATGGTAATGATGGGTTTGTCTCTTCAATAAGACA  
TGTCCCTCCAAACTTTTCATGGTCAGACAATCACTCAAGCCATCTTCCGGTTTCAAAGTCTAGAGAAAACAGGACA  
TTAACCAAGGCTTCTCACATGGGCCACCTGCCTCTCCCCATAGTGCATTGCTGGGCCACACAAAGGGCAGGTGCA  
GCTCTCCATGGCTCTACAAAGAGGAAAGGAAC T CAGGAGGGCCGATACTAAACTCTTCAACAAGCTGACACCCAG  
GCACAAAATGACCTCACTGACTGCATGGCCTACCTTTTACTCAAGATCTCTGTAAGCCAGAAGACACTTTGAGCA  
GGTGCTTTTTTCCTCAGGAA

#### BAC 48H20 For

TATTAAGCTCAAAGCACACATTGCACTTCCCTCAGTAATAATGGGAGATTTCAATACCCAACCTCTCATCAATGGA  
CAGATCATGGAAATAGAACTAAACAGAGACACAGCAAACTAGCAGAAGTTATGAACCAAATAGATTTAATAGAT  
ATCTATAGAACATATCATCTAAAAGAAAATAATATAGCTTCTTCTAAGCACCTCCTGGTACCTTCTCTAAAAC T G  
ACAATATAATTGGTCATAAACTGGCCTCAACAGATACAAGAAGATTTAAATAATCCCATTCATCTAGTCAGATCA  
GAAGGCTGGTCTTCAATAGCAACAAAAACAAAAGAAAGCCACATATACATGGAATCTGAACAATGCTCTACTCAA  
TAATAACTTGCTAAAGGAAGAAAATAAGAAATTAACAATTTTTTAGAATTTAATGAAAATGAAGGCACAAATACCC  
AGACTTATGAGATACAATGAAAGCAGTGCTAAGAGAAAACTCATAGCTCTAAGTACCTCCAAAAGAAACTGGAG  
AAAGCATACAGTAGCTTGACAACACACCTGAAGTTCTAGAACAAAAC TAAGGAAGTTCAATCAAGAGGAGTAGA  
T

#### BAC 48H20 Rev

GGGCTATTGCTTACGTGACTACTGACCATGCTTCTCTTGTGGGGCTGTGGGAGGTGGTAACTTAGGCAGGGGCCA  
GAGTTCCAGGAGCATGAGGGAACGCC T ACCGTGTATGTAGGTGAAT TATGACCATCAGGGTTCAGACCTCAGTTC  
GACTGGATAACCAGCCTGCAAATCCCCACAGAGCCCAATGCCAACAGTGT TTTCTGAGAGCACAGAAAAGCTGTGT  
TTCAGAGTCAGCCACAGTTGTACCTCGTGTGCTGCAGCTGGACTTGGTAATGTGTAACAGTCACCCAGGTGGTACTGG  
TTTTGAAGGCATGAAGGGTTCATGAAGAGCAGCTGAGGCTCAGGACTGTGAGAGGCCATGGAAAGCCATTGGTAA  
GGTGCAATCTTAGTTGCAATTGATGGCCCAGGATTGAAGGGTTCATGCAAAGGAGATGAGGCTTGGCACCATGAAG  
AGAGCCTATGAGAGGCTATTGGTGAAACCCAGTTGCAGCAGAAGATAGCAGTGTCTTGGAGATGCCAGTACCTTAA  
GATGACTACCAAGAACAGCAACAGCAGTGGAGTACAGGCAGCTAGAGCCTAGAAGACAAGCTGTGTGCTACCAGTG  
TCAGAGCTAGAGAAGTGACCCAAGCCCTTGGAGGAGCC

**BAC 65I11 For**

GTACAACCACTCTGGAAATCAGTCTGGCGGTTCCCTCAGAAAATTGGACATAGTACTACCGGAGGATCCC GCAATAC  
CTCTCTGGGCATATACCCAGAAGATGTTCCAACCGGTAAGAAGGACACATGCTCCACTATGTTTCATAGCAGCCTT  
ATTTATAATAGCCAGATGCTGGAAAGAACCAGATGCCCTCAACAGAGGAATGGATACAGAAAATGTGGTACATT  
TACACAATGGAATACTACTCAGCTATTAATAAATGAATTTATGAAATTCCTAGACAAATGGATGGACCTGGAGGGC  
ATCATCCTGAGTGAGGTAACCCAAACACAAAGGAACCTCGCACAATATGTACTCACTGATAAATGGATATTAGCGCA  
GAAACTTAGGATACCCAAGATATAAGATACAATTTGCTAAACACATGAAATTCAGAAGAACAAAGACCAAAGTGT  
GGACATTTTGCCCTTCTTAGAAATGGGAACAAAACACCCATTT

**BAC 61H18 For**

TNNNNGCNTGACNNATGNTCGGNCATTTATACTANCCCTCNNGGNGNGGGGGNGTAAGGCCTTCTCTAAAGAGCT  
GTGTCTAATCTCCACAGGAAAGTCTCCAGTGTTCAGTGACTAGAACGGACCAAGGATTCCCCCAAAGCAGG  
AATCACCCATAGCCTCCTAACCCCAACCTTGTTCCTTTGAGCCAGGGCCACTGCCACCATCACCCCTTCTCAG  
CACTTCCAAGGTTTCCAGAGATGTCTATGATGCCCGAGAGCTAGAAC TTGTTGTCCCTAGATTCTATGAGGCCCA  
GGTACCACGTACTGCACCCTCCCAAACCCCAAGAACTGTCTTATTATGGCTTCCATTGACAGATGCCACCATGT  
GGCTTGAGGGCACACACAGTCCAACCTCCACATCTGCATGCCTTTATTTCCCCACATCTAACCCCAACATCCATC  
AACTTCTGTATCCCATACACTTGTACCTCCAGAGTGCATGTACATCCACACATGTGTACGCAGGTGCCCTAACAGA  
CAATGTGCTGG

**BAC 65I11 Rev**

GCTTCATCCTCCCCGTCACCACCACTTCCCTTCTCGGCACTCCCAGGATCCGGGCCGGCAGCTGTGCCCCAGCCCCG  
GCCGGCGTCCGCAGGTGCCGCCCCAGTCCCTCGCCCCCTCCGGAATCCGGGACCAGCAACTTCCATCAGTCCTT  
GTAGACGGGAGCCAAACTTTCCCTGTCTCCTTTCAGCCAGGCCCTGAGCCCCCTTGGAGCCTTCTAGAATAAAA  
ACACCGCCCCCCCCACCCCGCCGAGAATACTAAACCAAAGAAGAACTCGGCATTGTGCAGTTTTGCATTGTAG  
TTTAAATTATTTTATTTCTTTCAGTTTTGCTAACTGCTGTCTGCAGGGATACAAAGACAGGCCCTTCCCTGTTCCCT  
GTGGGTTGTCTGGGAACCTTTGCTGACCATTATAATTAGCTACTTGGCCTGT

**BAC 72P24 Rev**

TACCTCCCCGAATGAACCACAACCCAGAGTATGACAACATCCTGAAATCCTTTTCAAGGATGTTCTCTTCCATGTG  
GCTGGCCATGATGTTTCGCTCAAGTTCAACCACCTACTCTCATATAGAACCAGGAATATATGAGGCTAGAAATAAA  
AATTAATGGAATTTTAGAAGGAATTCTCTATCATGAACTCTGAGATCCCCAAACAACCCAATGATGCTCCCCAAG  
GATATAGAAAACCCGGAAGATCCCAACCACAAACGAGTAGAGGAGGAATTGTAGTAAAGGTCAGAGATGATTTTCAG  
TGAAGGGGGCATGCAAAGGGAAATACTGAGAGTACAGCAATAATTAGCTGGTTATTTTCAAGACCACCATGCAAAC  
TGTTACATAACTGATCAAGTGAGACCTGATACCGTTTACAGAACAGAAAACAATAAACTGATGTTCTACACATGC  
TCTACTATGACTACAATCTAGATGATCTTTCAGAGATGCTTCAATTTTTATGCTTCTAGAAATTAGAAAATATAAA  
AGGAGATTTTAGATATGTGTAAGTTTTGAAATAAGATGAAATAAAACATGTAAACAAGAATCATAAGCAACACGTA  
TGGGATAGCAAAAACCGTAACCTCCATCAAAGCAGAGTCCAGGCCCTCATGGATTC

**BAC 72P24 For**

GCAATCCCATCAGCAATAGAGAAGTGTTCCTCTTTCTCCAAATCCTTGCCAGCATCTGCTGTCACATGAATTTTTG  
ATCTTAGCCATTCTGGCTGGTGTGAGATGGAATCTCAGGGTTGTTTTGATTTGTATTTCCCTGATGACTAAGGATG

TTAAACATTTCTTAGGTGCTTCTCAGCTATTCCGTATTTCTCAATTGAGAATTCTGTGTTTAACTCTATAACCCAT  
TTTAAAAATAGGGTTATATGGTTCTCTGGAGTCTAAGTTCTTGAGTTCTATGTATATTTGATATCAGCCCTCTATC  
AGATGGAGGATTGGTAAAGATCTTTTCCCAATCTGTTGGTTGCCATTTTGTCCATTGACCATGTCCTTTGCCTTA  
TAGAAGCTTTGCAATGATATGAGGTCTCATTTGTCAGTTCC

**BAC 109N20 For**

AGGGATTGGTGGGATTTTTGTGCTCAGGGATTGGTGAGATTCTGGGTCTTGACCCTGGCTTGGGCTTGGTGTCAAG  
TCAGGGTTAAGGTGTTTTTCCCTATTACCCTGGTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAGATATATTTA  
TTTATTACACTGTAGCTGTCTTCAGACACTCCAGAAGAGGGCATCAGATCTCATTACAGATGGTTGTGAGCCACCA  
TGTGGTTGCTGGGATTTGAACTCGGGCCTTCTGGAAGAGCAGTGCTCTTGACCCTGAGTGTCTCTCCAGCCCTAC  
CCTGGTTCTTTTACCCTACACCTATTGTTGGCAGCTTATAACTCTAGCTCCAGGGAGCCATCACCCCTCTTCTGGCC  
TCAGCAGCACCTGCACACATGAATCATATACTCACAAACACATTCAGAAAATTA AAAAGAAAACATTAATAATTG  
CTTGGTTTCAGACCCCAGGACAAGGGGTGAGGTACATATTTTACATACCAAAGCAGACCTGGCCTCTAGTTCT  
CTCAGCATCCCTGAGTCCCTACCTAGCATACCTGCCCTCAACCTTGAACCTTCCAGCCCAGGGCT

**BAC 109N20 Rev**

CCTAACTGCTGCATAGCAGCTACTGTTTTATCCTTATTCTGAAGGCGTAGAACAGAGAGATTGAATTGCTCACCC  
AAACTCACTCAGGCTCCCCGGGGCTTCCTTACCTGTCCACTACTAGAACTGTTCCCTGGTAAATTTGTTTATTA  
GTGTAAACAAAGCCGACGTGACTGTGAGTGTCTCCCTGCGTCACCGTTAGATCTGAGATGTTTCTTAATGGTGAAT  
CAGAAGCAAATGACACCGCTACCCATCGGTCTTCGATGCGTTTGCTTGGTCATCCGAGAGCTTCATGGGAGTCAGA  
CCTTTCCTGGAATGCATCTAGTTAACCTGGACATTAGTGAACCTCTATTGAGAGTATATTTGTGGTTAAATTTAAG  
GGTCTGTTTATCAGCTACTGGGCCATGGCCTAGATTTTGTGACAGAGCTGGAAGGGATGAGGGACCTTGGAACAT  
CCAACCAATAATTTTTTACTGCTCTGGGCTGTACAGGAAAGAGGGGTGACTCTGCCCTCCACCCAGCCGACATG  
CCTTGTACATAAAGGACTGAAGGGCTCAAAATCTACCAACCTTTTTTTTTTTTTTAAAGAGAAAACATGTATTAAA  
AAATTAGTTGAGGAGCTGGTGAACCTGACTAGCAGGT

**BAC 123J24 Rev**

TCTAGTGCTGAGGCCATATGCTGCAGCCTTTAAGCTATTGCGTCCATCAGTTTCATTATCACCTGCCTCTGAGTC  
TCCAATATCATCAGTAAGCACATGCAGAATCATAATTATGCCATGTACAAGTTCTTTGATAACATGTACAGTTTTTC  
TTCTTAATTCTTTATCAAATGCATTGATCGTGGCATGTGTGCATTGATCCAGGTCCGCCATCTGGCTGTGTGTGAT  
AAGCACAGTGGCATCTTTGCATTTCCACTGTCATTTCATTGCACTACAATTTGGCTGCAGGGGAGTAGTGGCTGGGA  
TTAGCCCTGTTCTGCTACTTACTTGCATTTTAAGTTGACACCTNTACAGCGGCTCAGACCACATTACAAACTGAAA  
CACATACGCACGACTTAGTGATGTGACACTTCTCAATAAGCTTACTNCACTAGCTACTCAACAATCTGTNATTGGA  
TTTGTAGGAATAACAGCAAAAAGATTTCCTAAGAATTGCGAGGGACAGAAGGTGAANTTTTCTCATTATTGGCAAAA  
GGCTAGGNATAGATTCTAGACNATTGGTATTTTCCATTA AAAACAAAGCTGTCAACAGNNTTNGGANGC

**BAC 123 J24 For**

CTGAGCTTCACACTGGAACCAAATTAGTGCATCCTCACATGAAAGGCTACACTCCATACAAAAAATAGTTTGTATC  
ATAGTCAAACCTAAAACCTAACTTAAACAACAAATGTGCCTGATTTTCTTTGTTTCAGAGAGTCATACATGCCCACTTC  
TGCCCTCTTGTCTAGTTAGACTGCACTAGAGTTCTTAGCAGAGCAATTAGAGAGAAAATGAAAGGTATTCAAGACG  
GAATGAAGAAGTAAAAATCATCTCTAGTTATGGAGGCGTGTCTTCCATGCAGAATAATCCATGTAAAATCTGCTAGG  
ATGAATAAACATTCAGCAATGTTGGGGGACATAGAATGGGGCACATTTGTGTGCCTACAATGGCAGGACTCTGGAGA  
CTGAGACTCATAACAAGATTAGTGTGAGACCACATTGAGGCTACACAGCCCACCCATGGGTACACAACCTTCATCT

**BAC 135B4 Rev**

TTGAATTTCCAAGTCTCTAACAGACCACACCTAAATCCTGGCCACCCAACCCTAACAAAGAGTGAGTCTCCAACCTGC  
CTCCTAGGTAGTCTGGGGAAAAGTGCCCAAGGGAAGGAGATAAGCAGAGGAGGTGATATGTGCACCTATTTCTTATA  
TGTGACACAGAAAACCTACTGTTAGGATTCTGTTGATGTGAGATTCAGGAGTCATAGTAGGTCTTGATAAATAAGCAG  
AGCAGTACAGTGAGAACCCTGTCTGTGGCTATTGAGCAATGAGACTGATACACAAAATAAGCTCTTTCATAACCT  
GTATCTCAGCCAAAACCTCTGTTTATGCAATTTCTAGATTTAATTGTTTCAGCACAGCCGCAAATGCATCCCATTTTA  
TGAGACCATTGCACCGTCTCAGTTTGTGAGATGTATAACTATTCACCCTCATTTTTTTTTCCCTCTCCATTTCTAAA  
TTCTCATAAGTTATTCAACTGGAGGATTAGATTTGTGCTAATGGCTGAAGACAAAATAGATGATATTTGGACACAAA  
GAAATGGAATGCACAACACAAAATACTTTACAATGTTCTCCGAGTCTGAAACAAGGAAGGTGTTAAGCTTTATAAAC  
ATAACCACTGGGAACCTTTTACAGATAACCGGGTGTGTTTGTAGACTGGGCTGTTGACATATGGCCACTTGTGAGTGA  
AAGGCAAACA

**BAC 135B4 For**

AGTGGTAGCAGAGCCACTGTAGTTTGTCTCTTATCCCACAGTCCCAGTGTGCAGGAGATAAAGGGAGACAGAGGGA  
GAGGTACTAACAGAGGGTGTCTACTACAAGTCTCCAAGACACTCCACTCCCATTAAACCTGCTTCTTCATGGC  
TCTGACAGTAAAACCTCGATGCTAAGACTTGTAAATTTACAAATGGAGGCTAAAGCCAAGGTGTTCTGGGTTGACAGT  
GATGTATGTCAAGAAAATCAAAGCCTGACGATAGAACTGAATTGCTCAAGATGCCAAGGGCAGCAGTGCCCTTCTC  
TCAGGGTAGCTTGGTCTGGGAAGCCCCATCTCCTCTGCAGATAAACACACAGGGGTTGGAAGCCCCCTCCTTCTAT  
CTGTGACTTTGGGAGAGATTCATCTCTCTGAGCATCAGCTCTGTGGTGCCATGTGCACAGTGCCATGGTTAATAGC  
AGCACTGGTATGAAGATCCCTTGTGCGATTCAGGAGCCACCAGGATTTGCATTATGAGTTTCTATGCACCAAGG  
TNAAGGGGCTGCAGTCACCAGACCTTGCTGCTTACAGCTCAAGGATTTAAAGGGAGCTTATTTTACTGCTGG  
ATCGCTTGCTTGC

**BAC 13909 Rev**

GCCTAAGGAAGCAAGAAAATATTATCCTTTGTATGTATTAATTTACCCTGATTCTGACATGATTTACAATCAGAAG  
CAGCACCTGCTAGGCACAGAATACCTGTGCTTTGTTAACTCAAGAGATCAAAGAATAAGAGACCATAAGCAACAT  
AAACAAAGGAAGGGAACCTAAGGGGCTGCAGTGAGGAGGGGCTGCAGTGAGGAGGGGCTGCAGTGAGGAGACG  
TCTAGAGGCAGTTGGTCTCACTATTTTTGAGTACTTAAAGCCAATATTCAAGGGTCAAGAGTTCTAAAGTTCTT  
AGTACACTCTGGTTTTTACCCAAAGTATTAGTATAAAATATTCATACATAAATGTGTTAAATATTTTCTTATAAAAA  
GACTGTGAGAGCAGACTTTGTATAGCTATAGGCTGATGCAAATGTCTGAGTGTGTTTAAAGCATGCTGAGTTTCAT  
TATGATCTCTGTCTTAAATGCATTTTCAAGCTAGAAATATTCTCAGCTTCTGCTGAGTTTATCAGAATGACCATTCTGT  
CATTGTGTTACATCACAAGGCTTAGTCCCTCAGATCTATAAAACAGGGGACCCACAGTTTGTATGATGTAAGTCCCT  
TCTAATAGCAACATCTCTAATTACAATTAATAACACAAAATTTTCATCAGATTAGGATAAGTACACCT

**BAC 13909 For**

GTTCCACTTGGTCAAAATGTTCTTTATGAAACTTAACCCAGAACAAAGTCTCTGCTGGGCATTTTGTGGATTTTC  
TTTGTCAATATAATTAATATAAAATCTCTTTGTATTAGCCCCGATTCTTTCACACAAGGACAAAAGTAGCCATGCTC  
TTCACCAAAAATCCAACAACAACAACAACAACAGTCTCTAGGCTACACATTGAAATTTCTCCGTTGAGGGCTGGAGA  
GATGGCTTAACAGTTAAGAGCAGTACTGATCCTCCAGAGGTCCTGAGTTCAATTTCCAGGAACCACATGGTGGCT  
CACAACCATCTGTAATAGGATCTGATGTCTCTTCTGGTGTGTGTGAAGACAGCACCAGTGTACTCACACATTAAG  
AAAAATAAATAAATGAAATTTCTCCACTGAACTTCTTGGGCCAGGTCCACACAGTTCAAATAACTCTCAGTAACAA  
AGTCTTTTATATTCTACTAGGAATAGTAGGAATAGGATAGCCATTAAGCCCCACTTAAAGCAATCCACTGCTTT  
CCAAATCCGAAGTCCCCAAATGCATTTCTCGAAACAAAGCATGGTCAGGCCATGACAGCAAAACCCAGTCCCTG  
GTACCAACTTCTGTCTTAGTTAGAATTTTACTGCTGTGAACAGACACCATGACCAA

**BAC 141E23 Rev**

TTGGACCATCATAACCCTGAGAACACCCCATGGCTCACATGTACAGCACTTACCTGACTGCAGAGCAGTGTAGCAG  
CAAGTATCAAGTTCCCTTAGAAATGCCTATGTTGGGGCTGAAGAGGAAGCATGAAC'TCCACCACGCTTACGTACAA  
AGCTGAGTGTGAGATAGTCTTTTGACACCCCCATGCCTGGAGAGGGAAGGCAGGCTAACTTCATACAGGGCAGGAC  
CTCTGGCCTGGCCAAGCCTAGGGAGAGTAAGCAGGGGTTACCCATCATGACCTCTAACCATCCACATGCACACGT  
ACATGNAACTCACA

**BAC 141E23 For**

GTGCACACGCATGCGCACACAGACAGACGCACATAGACACACACAGTGCAGACACACACACAGACAGACACACAC  
ACACGCACACATGCTCTCTCAATAAAAAATTAGGTTTAAAGTAATGTCTTTCATTTAGATCAGTATAAACCAAAGTGC  
TCTGAATTTATTTCAGACATTTTCTATCAGCACTTTGGAATTNAAACAAACAGAGATGAAGCATGATAAGTATGAAG  
AACATTTATAATAGCCAGTATACTTTGATTAGTCTTACATGCTCCCAACACTCTTATAAGGCAATTAGTATTATTA  
TNTACTCTTACAGAGGAACAAGCATGNNANTGATACAGCTCTATGTNNTGACATTGGTGTCTGCCATTACTGAA  
GGACAGTATGCCATTAACCTTACCCAGGTTTAGTTCATGTCTAAGCAAAGACGCAAAGGTTGACTAGGAATACA

**BAC 147N22 For**

GAAATTGCACTTTCATCCTGAATTTCCACATTTGACCTCTCAGGCTGAGGAGACTGTGAACTTGTCCCTAGTTTC  
TAGCTAGCCATTTGGACAGTGAAGTTGGGCTGTGGCCCCATTGATTAAC'TAGTCCAAAATCAACTCAATGCACCAC  
TTAGACGGCTCCAGGAGGCTGATCTGGGATTTAATACTGCTTTTTCATTACCAAGCAGCCTACGGGATTGGCTGCT  
TCTGAGTTAGCTGACAGGTAGAGAAAAGCCACTTCCAATCTTTTATAC'TCCCGTACCCCAAGCTTCTGCTGAGTTA  
CACATGCTTGGCCACTCAGAAGATCCCTCGGGGGGGGGGTGG

**BAC 147N22 Rev**

CCTGAAGTCTTAGGCTGCTCACCCAGAGGAAACGGGAATTAATAAAGTGAAGGTATTTCTCAGAGAAGCTGCTG  
TGTCCCTGTGCCTCAGGCTGGGCCTGCAGAGACTAAAGAGAACTAGGTACATTTCTCCAGGGGCTCCTCTAGCAG  
AGCTCAGGCACCTTATCTAGGCTATGTGGAAGTCACTGAACCTCCAGAACCACCGTTTGCCTTAATCCCCACTTCT  
GAAAGCCCAGGCTAAGCATGGGCTGAAATGTCTGCTACTCCAGGGTAGCCGCCAAGTACACTCTAGGTCTT  
CAGTAGACTGGCTTTAGGTGTGTGCCCCAGGGAAATTTCTGACTTCATCCCTGGCCCTGCCCTTAGCTCTCTCAGGT  
TTCTAGGAAGCAGTCCCTTGGCTGGCTGTGAGATCTCTACAGCAGGCAACATGGTGTCTAAGACTTCTTTAATGAC  
CTTACAAATGCAGCCCGGACCTACCTCCTTTACCTGCTCCCCATCAGGGGCCATGCCAAGTTCCTGGCTCCCTG

AGCCTGTGTTAAGAATAGTTCTGAGGTGAGCCCAAGAGTACTTGCTCATTCTGACCTGGAATACTATATCATCTTC  
CTAAGAAGTATATTTACTTCTTCTGGGTTTTTTTTTAAAAA

**BAC 160A5 Rev**

CTGCCTCAAATTTCTCTGTAAGATTAAGCCATAGATTTTCATCTGTGGTTTAACTTACTGTGGGTTCTCAAAGAATAC  
CTACCACCACCACCACCACCACGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCA  
TCATCTATAGTGTACCTATAAAGTTTGGTTATGAATTGCATTTTGCTTTTAATAGTCTTAAATATTTAAAACTCTG  
GTGATATTATATAATAGGTTGTCTTAGTTACTTTTGTGTTGCTGTGAAGAAACAATAGGATCAAGCAACTTAGAAA  
AGAAAACATTCAGGTGTTGCTTACTGTTCTCAAGGGTGAATCCATCATGGCAAGGAGCATGGCAGCAGGCAGGAAG  
ATACAGTGTGTAGCTGAAAGCTGAAAGCTTACATATGATCTACAAGCAAGAGGCANAGAGACTGACAGGGACACAC  
ACACACACACACACACACACACTGGAGACAGACAGACAGACAGACAGAAAGACAGAGCCAGAGAATTA  
ACAGGGAATGGTATGAGCTTTTGAAACCCAAAACCCACCTCCAATGACACACCTCCAACATAGCCTCACCTCCTA  
ATCCTTTCCAAACAGTTCTACAAAATATGGACCAAGCATTCAGAC

**BAC 160 A5 For**

TCAGCTTAAAGACAGGAATGAACTCACCATTTTGGTTGGGGTGTCAAAGCTCTTCAGTAAAACAGGCAGATAGGAC  
AGGTCAGGAAAGAGCCAAGGCGGCTTCCACCTGGACTCTTATGTTCTCCATACACACCAAGACCACTATATCTCGG  
CCAAAATGTTCTTTTTTAACTTTCTGTCAAATCTTTCTTGCTCTTAGAGCTCAGAGGACGTCATTCCTCCTGGG  
TAGAGGTCCTATTGGCTCCCTCATTCATTTCTGTGGATTAATTTCTTCTGTATTCTCAGAGGTTTACCTGGTATCT  
TGGTATCTTTTTGTATTGAATTCATTGAAATGAAAGGCAGCTGGGGATGAGGACCCACTGGGAACATCTTACCTG  
TCTTAGGAATGCACGAAATATCTGGTATTGACATCCATCCATTGTAAGCAGAGCGGAGAGTAAAGCACATGGATC  
AGGAAATATTGCACCAGAACAACGAAGGTGATTTGAGACCAAGGAAAAGATACTGTGAGGTGGGACAGGAAAGCAT  
GACTTATTCGAAGGCAAGGATTT

**BAC 173M5 For**

CCCTTCCTGAGCATTTTCTTCTGTGAAAGATATTTAATTTCTAACCACCCTGAGTAAGTTATGCATCCATTTTC  
CATGACGAACAATAAAAACAGTTTGGACAAGTAAGGACTGTCTCATCAAGAACTGCTGTGGGAGGGAAGACTTC  
GTTGTGGTACAGAGCTGCCTAAGTCTCCTGCAGAAGGCCCTCTGCACCTCTGGACACTCACCCATGAGCCAAGCAG  
GAGTTCCTTGTCCCCTAGGCCCATCAGCCCAAGTGCCGACCCCCCTCGTTCCCACTCCATACCAGGTTCTCAGC  
AGCAACTGGGCGCTGGGAGTTTGAAACCCTGCCTCCTCAGCCTCAGCCTGCCTCATTTCTCATCCAGGTTTGG  
GGCCCCATCCTTGGCTGTGTTCTGTACCCTCCACCCCTGGTGGCAGTGAGGATGGAATATAGCCGAGTGCTCTC  
CCATTTCTGTTTCCAAGTGGAAGTTCACACACCCCAACAGNCAGATGATGACGGaAAGCAGAACCACANGTCAC  
CTCCTTATCTTCCCCTTcCCCAANTCCTACAAgTtCACgGGTTCAACCAAGCACCGGG

**BAC 173M5 Rev**

CTAATCCAGAAAAAGATGTAGTTGGGATTCTATAAACTGTTGGTCCATGTGCTAGGGGAAGGGTGAAGTCTGTGCG  
TGCATTTCCCTGCTCATCAGTAAGGCACACGCTGTCCACATGTTTTCTAACTGTTCCATTTTGCTAATCGTCTGTT  
CATGAACTTAGCTCCTTTTACTACTGGTGTGATCGTCATTTTCAATTAATTAATTAATTAATTCATTCATTCATTA  
TTTTTCTTGCAGTTTCTTGTCAGGTCAGGCAAGTGCTCTATCATGGAGCTATATTTCCATCTACCCATATTACTT  
TTAAATATAATAATAATAATATTAATAATAATAATATATAtGTAATAATAATGACGAGATGAAAATGCAAACAGTA  
TTTAGTTCATTATTCATATAGGTAAACAAAACAAAACCAACANAACACCCTCACCTAAGCCTCATCGTgGCCA

TTCTCCCTTGAATATCTCCATTCACATTTTCAGAGCAGCACACAGGTTGTAAGGCTGTNACGCTCTTGCAATGCCTA  
CTCCTTCTTCTCCAGACCTCTTTCGGGATTCCTTTATG

**BAC 180K15 For**

CATCTTCAGTATTAGCTTAATGCTATATAGAAGTCAGTCTGTTCTTTCAGTGAATAACACTTAAAACAGATATAAA  
AAGGCTGTAAAGTCAGGGCTGTCTTCACAGTTTGACATGCAGGTATTAACATGTTGGTATGTTTCATCACTTTATAT  
TGATAAACAGGTCGATGGCTGATGATCAGCTAAGGTAAATGTATGCAAATATGGTTGATAGCTCTCAACTAAAAGC  
ACTGAGACACAATTACAAGTAAGTAATAGTCAGTACACTGAGAGTTTAGATCTTATTTAAAACTGTTCTTCAGGG  
ATGGAGAGAGATGGATCATTTTCAGGGCTGAGACTTAGAGAGTATGATATCATTCATATTATTAGATAGTATAATTA  
TAAGGGAATTTAGAACAGTGCTCAAGGCAGAAATATTGTATATCAAAAGGTTGTAGAATCTACTTAAAGTGCCTCCA  
TTGTACAAATTTGAGATGATTTAGATATTTAAAAATGATAGTAACAGGTTCTTATTACCCATACACTAAAATGAGAA  
TATGTGAGTGACTGATATAAATGAACCAATAAGTATATTGTGGGGAACAaGAAATATGGCT

**BAC 180K15 Rev**

TATCTTGTAGCTTTAAAGTACTTAGCAATAAATGTTATTTTATCTGATATTAATGTTGTTCTACCTTCTTGAAAAT  
GGTATTTACATTGTGTTTATTTCTGCTTTCTCCTTAACCTAATGATATGGGCTTTTGTAGGAGATCTCTATTGAGT  
AACATCCAGCTCTACCTGTTAGCAGACATGATCACCTCTGCTCCACTGTGTAATTTTGTGATGCAGTTGTTTTGA  
ATTCTCACTTATCATTCATTTACTTGATTACTGATACAGTTAGGGTTATTTTTGCAATCAGGTCTGGCATTGCT  
GTTTTTTTTTTTTTTCTTCATTTGAAGCTTCTGTTAGATTACAAGACTATTTTATATTCTTCTCACTTTTGCC  
ACGTGCTTAATTTTTTTTTCTTTGATAGTGTACAATCTGTACATTCTGTTTCAGTTTATGTAATATGTGCCATTA  
ATTTTGTAAACATACCTCTGTGACAAAATTTTTTAAAAATAAATCTGTAACAACGCCACCATTTTTCTATCTTTGTTG  
TAAAAGCCAGTATAATTTTAAACAGGACTTAGCTATCCATTTAAACACACTATTTTATTCCATAGAATT

**BAC 185K22 Rev**

CAGACAGAGTTGGCAGCACTGCAAGAGCGGCAATTTGCTCTTGAAGGAGGGCTGATAGCAGAGAATGATGGGCTGG  
TTTTGGTATAAACTGAAGGACGTTTTGTGTTGGCAAAAACCTGAAAAGTTGGGTACATATGGGTTATAGTAGTTTTA  
AAGGGCTAAGTTAAGGTGCTGGCAAATCAGAAGAAATTTGTTGGTAGAATCTGAAACACATTCCTGATTTTTTTGA  
GAGTGATACTAAGAAGTCCACAGATTTCCCTGGAAGTCTTCTGGGGTCAAAGGTATGATTTGTGATTTGATGG  
GAATTATTTCCCATGTTGGAGAGACAAGAATAATTTATGGATTCTTTACAAAGCTGATGTGATGTTGTGGTTCCCTA  
TTTTGGAATCTTATAAGGAGCCAAATAAATCTCCTTAGTCATATGAGCCTTGAAGGTTtACCAAGAACTTACcCC  
TCTCCCTTGCAAGCAAAGGGCCCCATGTGCcCCAGgGGAAAAGAACACCACCTGACATCTtCTAATGCCAATGTG  
GAACCTCGTTTTGCTTTATATGAGCAGTGATTCCAGGCATCATCCAAAACATTGCTGCaAATTATTAATTCAaGAn  
TCAAGATGCaAGTTTCCATAAAAATGTTTTGCAAGCaAGCTTCAAGaAGGATAAATTACTAAGTAATAAAAATGCTGG  
CTCTCATGgTAAAGGATTAATTTtCCTTCCCTGGTCCCTTGNAAAAAGTGGTCCAAaTTAAaTTTTNAAGGGTCT  
GACTAGCCCT

**BAC 185K22 For**

TAAAAAGACTTACCAGTGAATAAGTGATAAAAAGATTATCAGTGTATAAAATCACTCTACTTTTTTTAAAAAAT  
CTATCTAAATAGATTCATATAGATAGAATTTTTGTATTATAGTTGCAGCCAGAGTTATCTGAAATGCTAGTAGCCC  
ACATATAGGATTTAATGGGAAGGCCATATAAGACCTGAACTACTCTCTTTTAAAGTCTAGTTTTTTGTATTATTA  
CTAATAATTAATTTTTCTTTTTGGTTTTCTACTTTTTCTGTTAGGTATTTATAAGCAAATGTATATTTACATTTACA

TAGCCCCAAATTAGCTTTTTCTTTTTTTCTTCTTTAAGAGCTAGGCAAGGATCTGGTCCACAGGAGTTACTGGAG  
AGAGGCTCCTTTAGTTTTCTTTATTTATGTTATCAGCTGGTAAGGGTAACACCTGCTGACGATGTGGTCTCCC  
TtGGAAGTTCTGGAGACTTTTTCTTTTGTGTTGGCCCTGCTGTTTGTATACGAAGTGTACAGTGGTCTTGAGCCAA  
TCTTTGGATCAGGAGGACAGATAAGTCATCAGTGCAGTAGGCAAGAAGTGTAGCATCATCCTCAAC

**BAC 196N16 For**

CAGTTTAATCTTGCCACTCACCTGGCTTAACCTCTGACGAGCTGTCACTTCCCTCAAATCAAACCCAAACTCCCC  
CACCCTGCCCACAGAGCACCTACAGCTTCTGCCAGGCTCAGCCAAGCTCAGCACTGCTTCCCACACACCATGCTG  
ATGTCCACCTGAGGACTAACGACCCGTAAGGCTCTCGTCTCCGCCCTCTCATGTATAGCTCCTTGTTAACTCTGTT  
CTCAGACAAGTGATGTTGCTGACTGAAGAGTAGGAGGCAGGGGTTACAAGTCAAAGACCACAGGCATTTTTACAAG  
CAGAAAAGCAAAGGAATGGGTTCTCTGCATGACGCTGGGCTGTCACCTCAGACTAGATCAGGTCCTACCTACAGCT  
ACTTTCACGGGACAAATGTTTAGATAACTACAGATATATAGATGTGTAATATGAGCACACAAGTCAAACATACCT  
GYTAATGAATTGTAACGAAATGTATTTTAAAAGAAATTCATCGATGTATATGTGATTTTATGATTTCTTAAAGTTTA  
AACCCAAATTTGCATGTTAATGAAATGGGTG

**BAC 196N16 Rev**

TAGAGAGGCAGGACCGACCGTGAGCACAAAGAGGCAGCACTGATGTCAGGATCACTGGGGAAAGAGTCTTTAACTTC  
ATCAGCACATTTAGTCATATGGGATCTGTTAGGATAGTGGGAGGGATATTGATACCTTCTGGCAATTCATGGCCT  
TACAATGCCATTTTGTAGGGGAGGAACATGCGTTGTTAACCCAGGATTCAGACAAAGACAGGGAGTATGGTCATC  
AGCCTAGCATAGGCTGGTGGTCCAGTGAGCCACAGGCTATCTACTTGTCTCTGCCCTCTCTAGCGTGTGGATTAT  
AAGTTTGTGTTACCATGCCCTTCTTCCCTCCCTCCCTCCCTCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCT

**BAC 219P9 For**

GTTCCAGCAGACAGAAGCCACTGGGGAAACCCTCCATGTGTCTACCTCCTGAATGAACACAGGAAAGTAGATGCAT  
TTGGTATATGCCATTTTGTAGCCTCAGGAGAGCAGCAAAGCTGAACTTGCTGTTCTCTGTGTAGGCAGGAGGGCTT  
CTTCCCTGGGGAATACAGGAATTTGTACAACTTGTTTCATTTCTCTAGAATAGACTCCATCATTCCCTCATATAGGTA  
GATAATYTCTTATGCATTTTCCATGTTAATCTGTCTGAAWGAGGCACAAATAGTTTAGACATATCCAACATGAC  
AGTCTATTAACAAATAACCAAAGAGAATCACTGGTTGCTCCTGTGTGTAGCTACACTGGTGATTTTAAAAGAAAAT  
ATGTTAGAATACCAAGGGCTMTCATGCTGG

**BAC 219P9 Rev**

TTTGCTATTTTTATTTTTGTAGATACTCAGATTGTCTGATGTTTTATTGGTGGTCTACCAGTTTCTTGAGTCCTT  
TTAATGAGTCCATGAGAAAATAACTTGAAAATGTGCTTTCTTTGTGCTGTGACAGCATACTTACACATTTTTTATCT  
TGGATATGTAAGCTGTCACCTGCTTTATGGATTCTTCCTTTTAAAAGAAAATTTAAATGTTATTATCCTGTGTGTA  
TGTGTGTATGTATGCGTATAACTTCTAGGAGTCACTTCCCTACCTTCTGGCAAGGCTTGTGCTGWTTCCTTGTCTTA  
GTTAGCCCAGYTCTTTTGGAGACAGYTTCCCTCTTCTAGTTG

**BAC 219P17 For**

AAAAAAAAATAGTCAAGCATGAGCAACCATTCCCCAGGGCTTTCCCTAGTAAGCCATTCCATTACCACCCACAGACT  
CCAGCATYCTGAACACACCTACTTGAATTATATATTCATGTATCTATCTGCCTTGCTTGCTTAACACAGCCCCAAA  
CACCTTACTCCTCAAATGTCTACCAGCACGTGTGCTGCTGGTAAAGTGAAGAAGCCACAACCCGTGCCCTTAGCTT



TCAATGTCAACTTGAAAAGGAGTGGGGGAGTTCCTCAGGCTTYGGGAATCCAATAATTAACAAACAGCATATCCAA  
TGGGGGCATAAGTGGTGTCTATTTACAAACCAAAAAACCCAAGGACCAGAGAGCTTAGGTAACCTCCCTAAATC  
ACACAGCTAGATGACAAACACTCCTACTCTGCCACAACATGCCCTSACGTATAGTCAACAAAAGTTAATTATGAT  
AAACAGAGACACTAACGGGAGCATACTGGACTTAGCTGCTTCAAGCACAGCAGCTCATA

**BAC 219P17 Rev**

CTTACTGTGAGATGCTCCGTTCTTTATTTGGGAGTAGTTGTGTGAAGCAGAAGGAAGAAGACCTGGAAC TAGAACT  
GAGAAGGTCTGGATTTAAGTTCTTCATTACTTTCTGGTCTTGTCTTGTGTTTTGACAAACCATGTAACATTCAGAAC  
CTTGCATTCTTTATGTACAAAGAATCATCCCCCTGGGGCTGTAGACGGCCACTTCCATGTGTGAGGCCTGGCCAGG  
GCCGTCAACCACCATCACCAATAATGATAATGATTTTCTTGTATAACGTAAAATGAGAGCGCTATAGAAAGAACYT  
GTACACTGGGAGCCTTCATACAGATAGGCGTGATGCTGCCGCTTTTAAAGAAAGTG

**BAC 236P17 For**

TTCTCTGGCCTTGCCAGCATCTGAGCTCCCCAGCTTCCTCTACAGTGGGCCTGTCTACATCACATACTCTCATGC  
CATAATGTGTTTTCTTGAGGAAGCCAAAGTCTCTCTTTCTTGGTAATTTACATCTTCTAGTTTCAGCTTCAAAGAGAT  
CTCTAAATTTGGACTCCGATGGATGAGATCTGCTGAAGGTGAAAACCTGACTGGGAAGCGCCAAGAAAGTCTC  
GATAGGATTTGGGTCCTCGTTTTCTGCTTTTGGCTCTCTTTTTCAGGACTGTGAGTTCTCATGGGGCCCGACCTGACTT  
CCCACCTGAAGACTTTATAAACTGCTGTAGACCTTTACAGTTCTTACAGCCCTGAAATGGGAAAAGCAGCTCATCC  
TGGGAGGCATACACTTATTCAGAGAATCTACTGTTGCTTCAGTGTCTTTTAGGTCTTTTATGAATGAGTCCTTTA  
TGCATGGYTAGAAACAATCCTTCTTGCTTTGGATTTATAACATGCAAATATGAGGYCGGCATATACAGG

**BAC 236P17 Rev**

TATTAATAACAACCATTTCTGATTTGCATACCATAAGGGGAAAAATTGCAGAGTGCAGGAGTTACATGAGTCTAAC  
TGACAAAGCCTGAAATATCTGTTACTTGGTGCTCTATATTTAACTTTGCTGATCATTGGTAGAACAATAATCTAA  
GAGAGAGATTTTGCAATGACCCAAATCTAAAAACACATATTTGGTAACAAAACCTTGAAGTACCTAAAATCTTTTA  
TTGGTAATGATATAAAATTTACTTGAATTAATATCAAGTTATATAACAGGCTTTATTATTTCCACTGGGAATATTTA  
TACAATTTATTACAGAAATAGTAATATATGCCATACCATTACAAGGAACCTATCCCAGACCATACTGAGATGACCAA  
ATATTTTACAATTATTCTACTCTCTCAACAATCTAAAATATCTTTAAATTTAAACCTACCATCTTCCAAAGTGCGA  
TTTAAGTGGACAAATGTTAGGTAAACCCTAAACT

## 7.2 In dieser Arbeit ermittelte Resistenzkassetten-Sequenzen

### 7.2.1 Puromycin-loxP-Resistenzkassette 2392 bp

Die loxP Sequenz ist fett gedruckt hervorgehoben.

AATCAATTTTCAGAGGGATCCGGAACCCTTAAT**ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT**TAGGTCCCTC  
 GACCTGCAGCCCAAGCTCTAGACACACTAATATTTAAAAGTGTCCAATAACATTTAAAACATACTCATACGTTAAA  
 ATATAAATGTATATATGTACTTTTGCATATAGTACACATGCATAGCCAGTGCTTGAGAAGAAATGTGTACAGAAG  
 CTGAAAGGAGAGAACTTTAGTCTTCTTGTATTATGGCCTCCATAGTTAGAATATTTTATAACACAAATATTTTGATA  
 TTATAATTTTAAAAATAAAAAACAGAAATAGCCAGACATAACAATGCAAGCATTCAATACCAGGTAAGGTTTTTCACT  
 GTAATTGACTTAACAGAAAAATTTCAAGCTAGATGTGCATAATAATAAAAATCTGACCTTGCCTTCATGTGATTCA  
 GCCCCAGTCCATTACCCTGTTTAGGACTGAGAAATGCAAGACTCTGGCTAGAGTTCCTTCTTCCATCTCCCTTCAA  
 TGTTTACTTTTGTCTGGTCCCTACAGAGTCCCACTATAACCACAACCTGATACTAAGTAATTAGTAAGGCCCTCCTCT  
 TTTATTTTAAATAAAGAAGATTTTAGAAAAGCATCAGTTATTTAATAAGTTGGCCTAGTTTATGTTCAAATAGCAAG  
 TACTCAGAACAGCTGCTGATGTTTGAATTAACACAAGAAAAAGTAAAAAACCTCATTTTAAGATCCACTAGCGAC  
 CTCGAAATTTTACCAGGTTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGGCTTTAGCAGCCCCGCTGGG  
 CACTTGGCGCTACACAAGTGGCTCTGGCTCGCACACATTCACATCCACCCGGTAGGCGCCCAACCGGCTCCGT  
 TCTTTGGTGGCCCCTTTCGCGCCACCTTCATACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCGCCCCCGCAGCTCGC  
 GTCGTGCAGGACGTGACAAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGG  
 AAGCGGGTAGGCCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAGGG  
 GTGGGTCCGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCGGGCGCCGAAGTCTCCGGAGGCCCGGCATT  
 CTGCACGCTTCAAAAGCGCACGTCTGCCGCGTGTCTCCTCTTCCCTCATCTCCGGGCCCTTTCGACCTGCATCCAT  
 CTAGATCTCGAGCAGCTGAAGCTTACCATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCC  
 CCAGGGCCGTACGCACCCCTCGCCGCCGCGTTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGATCCGGACCGCCA  
 CATCGAGCGGGTCAACCAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTCCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTGCGG  
 GACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCCGAGAGCGTCAAGCGGGGGCGGTGTTCGCCGAGATCGGCC  
 CGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCCTCCTGGCGCCGCACCGGCC  
 CAAGGAGCCCGGTGGTTCTTGGCCACCGTCCGCGTCTCGCCGACCACCAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTC  
 GTGCTCCCCGGAGTGAGGGCGCCGAGCGCGCGGGGTGCCCGCTTCTTGAGACCTCCGCGCCCCGCAACCTCC  
 CCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTCACCGTCACCGCCGACGTGAGGTGCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGAC  
 CCGCAAGCCCGGTGCTGACGCCCGCCCCACGACCCGCGAGCGCCCGACCGAAAGGAGCGCACGACCCCATGCATCG  
 ATGATCTAGAGCTCGTGTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAATTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTG  
 CCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGA  
 GTAGGTGTCATTTCTATTTCTGGGGGTGGGGTGGGGCACGACACCAAGGGGAGGATTGGGAAAGACAATAGCAAGC  
 ATGCCTGGGGGAATGCCGGTGGGCTCCTAATGGCTTCTTGAAGGCGGAAAGAAACAACTGGGGGCTCGAGATCC  
 ACTAATTCCTAACCCCTCCAGGCTAGAGCGGGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTAAGTGAGGAA  
 GGGCGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGA

## 7.2.2 Thymidin Kinase-Neomycin-Resistenzkassette 4000 bp

GCGATATCTAGATCTCGAGCAGTGTGGTTTTCAAGAGGAAGCAAAAAGCCTCTCCACCCAGGCCTGGAATGTTTCC  
ACCCAATGTTCGAGCAGTGTGGTTTTTCAAGAGGAAGCAAAAAGCCTCTCCACCCAGGCCTGGAATGTTTCCACCCA  
ATGTTCGAGCAAAACCCCGCTCAGCGTCTTGTTCATTGGCGAATTGCAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGCGCGTCC  
GAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACNCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAACAGC  
GTCAACAGCGTGCCGAGATCTTGGTGGCGTGAAACTCCCGCACCTCTTCGGCCAGNNNCTTGTAGAAGCGCGTAT  
GGCTTCGTACCCCGGCCATCAACACGCGTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCCTCGCGGCCATAGCAACCGACGT  
ACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCCGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGG  
TTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATGGGGAAAACCACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTTCGCGCAGCA  
TATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTTCCGAGACAATCGCGAACATCTACACC  
ACACAACACCGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGGACGCGGCNNNNGTGGTAATGACAAGCGCCAGATAA  
CAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCCGTTCTGGCTCCTCATATCGGGGGGAAGCTCGGAGCTCACATAC  
CCAGCCCCCGCCCTCACCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCCCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTAA  
CTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGGCCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACCAACA  
TCGTGCTTGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGGCCAAACGCCAGCGCCCCGGCGAGCGGCTGGA  
CCTGGCTATGCTGGCTGCGATTTCGCCGCGTTTACGGGCTACTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAGTGCGGCGGG  
TCGTGGCGGGAGGACTGGGGACAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCCAGAGCAACGCGG  
GCCCACGACCCCATATCGGGGGACACGTTATTTACCCTGTTTCGGGCCCCCGAGTTGCTGGCCCCAACGGCGACC  
TGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTGACGCTCTTGCCAAACGCCCTCCGTTNCATGCACGTCTTTATCCTGGATT  
ACGACCAATCGCCCCCGCGCTGCCGGGACGCCCTGCTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCAC  
CCCCGGCTCCATAACCGACGATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGAAACAG  
GAAGGAGACAATAACCGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTC  
GTTTGTTCATAAACCGGGGTTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCACCGAGACCCCATGGGGCCAA  
TACGCCCGCGTTTCTTCTTTTCCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTTCG  
GGCGCGCAGGCCCTGCCATAGCCACTGGCCCCGTGGGTTAGGGACGGGTCCCCATGGGGAATGGTTTTATGGTTC  
GTGGGGTTATTATTTTGGGCGTTGCGTGGGGTTCAGGTCCATGACCCAAGCTTGATATCGAATTCGAGCTCGGTAC  
CCCCTAGTAACCGAGACATTGAATGGGGCAGTGTCCACAAGGGCGGAGGCTATTCTGTACATCTGGGCCTACGGA  
GCCAGCACCCATCGCCAAAACCTTTCATCCTCTTCTCAATCTCGCTTCTCTCTCGCTTTTTTTTTTTTTTCTTCT  
TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAAAAGGAGGGGAGAGGGGTAAAAAATGCTGCACTGTGCGGCGAGGCCGGTGAGT  
GAGCGACGCGGAGCCAATCAGCGCCCGCGTTCGAAAAGTTGCCTTTTATGGCTCGAGTGGCCGCTGTGGCGTCTT  
ATAAAACCCGCGCGCAACGCGCAGCCACTGTCGAGTCGCGTCCACCCGCGAGCACAGCTTCTTTGCGACTCCTT  
CGTTGCCGGTCCACACCCGCCACCAGGTAAGCAGGGACGCCGGGCCAGCGGGCCTTCGCTCTCTCGTGGCTAGTA  
CCTCACTGCAGGGTCTTGAGGATCACTCAGAACGGACACCATGGGCGGGTGGAGGGTGGTGCAGGGCCGCGGAGCG  
GACACTGGCACAGCCAACCTTACGCCTAGCGTGTAGACTCTTTGCAGCCACATTCGCGGGTGTAGACTCGTGG  
GCCCCTCCCGCTCGGTGCGTGGGGCTTGGGGACACACTAGGGTTCGCGGTGTGGGCATTTGATGAGCCGGTGCGGC  
TTGCGGGTGTAAAAGCCGTATTAGGTCCATCTTGAGAGTACACAGTATTGGGAACCAGACGCTACGATCACCCCT  
CAATGGCCTCTGGGTCTTTGTCCAAACCGGTTGTGCGTATTGCGGCTTGCCGGAGCGCGGCTGGGCGGGGTTGGGC  
GAGGCGCGCAGGGCCGGCTTGTCCGGGTGGGGGCTGGGGTGCACAGTGGCGCGTGCCTCTCTGTCAGTGGGCAT  
CGAGGCGCGTGTGCTGCTAGGGTGTGAGCTCTTCTCTCCGCGCTTCACTAGTTAGCTGCGCCCGTCCGCGCAG  
TGTAGGCGGAGCTTGCGCCCGTTTGGGGAGGGGGCGGAGGCTGGCTTCCCTGCCCTAGGTCCGCTCCGGGCCAGC

GTTTGCCTTTTATGGTAATAATGCGGCCGGTCTGCGCTTCCTTTGTCCCCTGAGCTTGGGCGCGCGCCCCCTGGCG  
 GCTCGAGCCCCGCGCTTGCCGGAAGTGGGCAGGGCGGCAGCGGCTGCTCTTGGCGGCCCGAGGTGACTATAGCCT  
 TCTTTTGTGTCTTGATAGTTCGCCATGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTTCGTCGACGCAGGTTCTCCGGCCGCTT  
 GGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTC  
 AGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCG  
 CGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACT  
 GGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCAT  
 GGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC  
 GAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGC  
 CAGCCGAACTGTTGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTG  
 CTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGC  
 CTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTG  
 CTTTACGGTATCGCCGCTCCGATTCGCAGCGCATGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGGGGATC  
 GGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTC

### 7.3 Abkürzungen

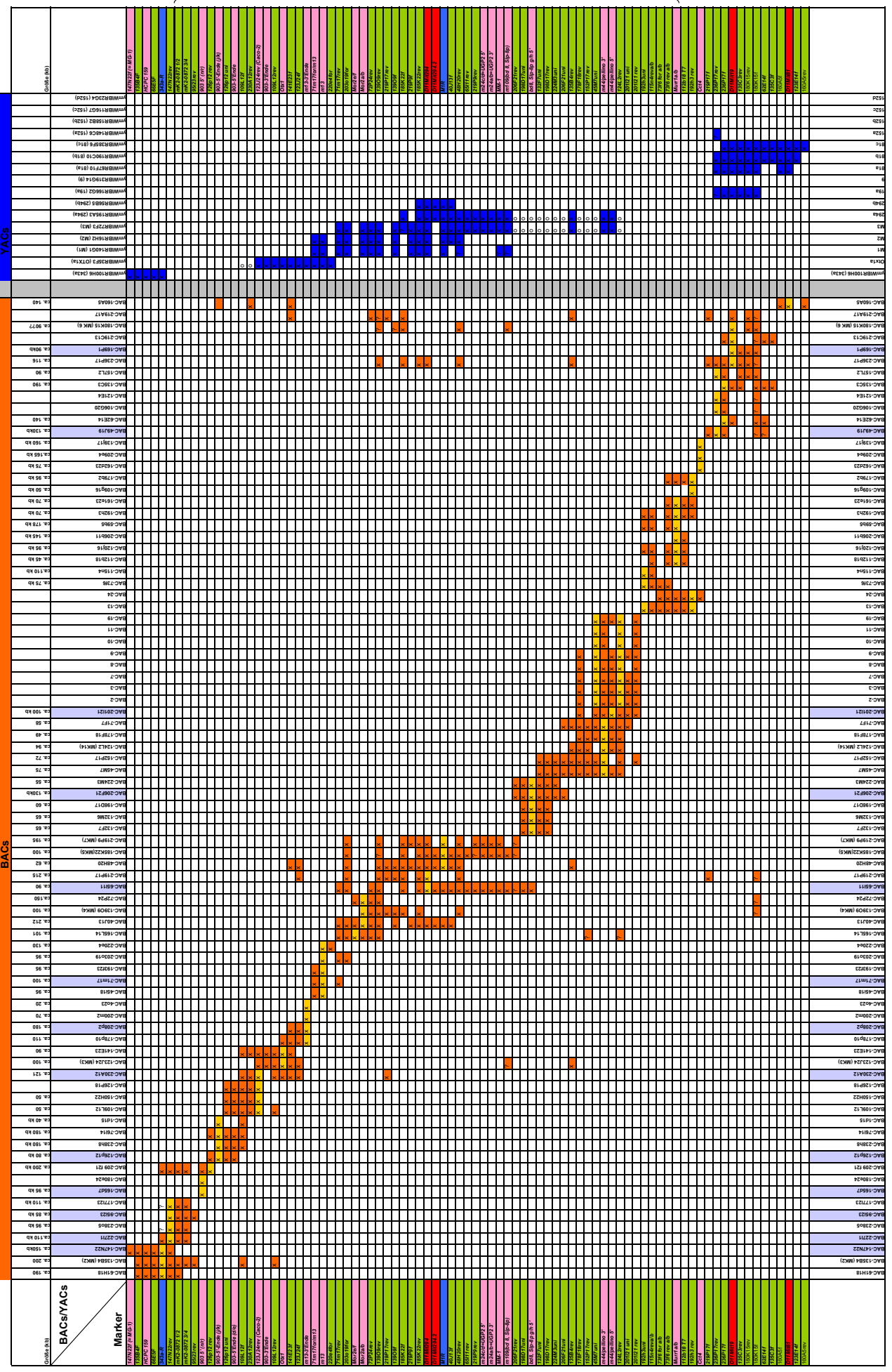
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bakterielles artifizielles Chromosom
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
Caco-2	ubiquitär exprimiertes Gen
cDNA	komplementäre DNA
CNS	conserved non-coding sequenz
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy-Nucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed sequence tag
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Homoloc-13	anonyme cDNA

---

IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-Galaktosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Kiaa0903	anonyme cDNA
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
$\mu$	mikro
min.	Minuten
Mor2	cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase
N	Normal
NCBI	National Center For Biology and Information
Otx1	Homöobox-Transkriptionsfaktor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNase	Ribonuklease
Rpm	rounds per minute
SLP-8P	Tumorantigen
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
STS	Sequence tagged site
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
U	Units
Ugp2	Uridyl-Diphosphat-Glucose-Pyrophosphorylase-2
UTR	Untranslated region
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galaktosid
YAC	Künstliches Hefechromosom

---

#### 7.4 Maus-BAC/YAC-Contig der *wobbler* kritischen Region



BAC-Enden

Mikrosatelliten

YAC-Enden

Screening Marker

Experiments Sequenzen

## **7.5 UTR-Sequenzen des Rab1a Gens**



# Conservation of the 3'-untranslated region of the *Rab1a* gene in amniote vertebrates: exceptional structure in marsupials and possible role for posttranscriptional regulation

Niels Wedemeyer<sup>a,1</sup>, Thomas Schmitt-John<sup>a</sup>, Dirk Evers<sup>b</sup>, Cora Thiel<sup>a</sup>, Daniel Eberhard<sup>a</sup>, Harald Jockusch<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Developmental Biology and Molecular Pathology, W7, University of Bielefeld, D-33501 Bielefeld, Germany

<sup>b</sup>Faculty of Technology, Practical Computer Science, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany

Received 12 April 2000; received in revised form 16 June 2000

Edited by Takashi Gojobori

**Abstract** The YPT1/RAB1 protein, a key regulator of the intracellular vesicle transport in eukaryotes, is highly conserved in function and amino acid sequence. Here we report that the most highly conserved nucleotide sequence of the *Rab1a* gene of amniote vertebrates corresponds to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the mRNA. Sequences of 27 species ranging from mammals to sauropsida are >91% identical in this region. Secondary structure prediction procedures applied to the 3'-UTR sequences between positions 750 and 984 and 1428 (mouse cDNA: Y00094), respectively, of the RAB1a mRNAs revealed families of alternative structures around nucleotide position 800 as recurrent features. The two hairpin loops are also predicted for marsupials, despite of their exceptional extension of the A-rich sequence in between. Yet, sequence conservation is much higher than required to conserve secondary structure. Implications for posttranscriptional regulation and protein binding are discussed. © 2000 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Key words:** *Rab1*; 3'-UTR; RNA folding; Sequence conservation; Eutheria; Marsupial; RNA-protein interaction

## 1. Introduction

In the last few years, the non-coding regions of eukaryotic genes were shown to contain essential regulatory information (reviewed in [5]). 3'-Untranslated sequence regions (3'-UTRs) of a number of transcripts are involved in mRNA stability and translational control (reviewed in [15]). In particular, several oncogenes contain specific AU-rich sequences in their 3'-UTRs which are determinants for mRNA degradation and are likely to be involved in the down-regulation of the translation rate ([30]; reviewed in [4]). Another example for the regulation of mRNA stability by specific 3'-UTR sequences is the iron response elements (IREs) in the 3'-UTR of the transferrin receptor (Tfr) mRNA. At a low cellular iron level, the IREs are bound by the *trans*-acting IRE binding protein

IRP1 which leads to a protection of the Tfr mRNA against degradation whereas at a high iron level the unbound Tfr mRNA is rapidly degraded [3]. Moreover, the localization of mRNAs in particular cytoplasmic compartments can be regulated by 3'-non-coding sequences as shown for bicoid and nanos mRNAs in the *Drosophila* egg [9,20] and for  $\beta$ -actin mRNA in myotubes [16]. 3'-UTR sequences may control not only the translation of their own mRNA but also the expression of other genes [27].

A general indication for an important functional role of the 3'-UTRs is the high evolutionary conservation in a number of mRNA species [13,19,29,38]. In nearly a third of the investigated genes, preferentially in housekeeping genes, the 3'-UTRs are more than 70% identical in vertebrate species, over stretches of 100–1450 nucleotides. This implies a strong selective pressure which cannot be explained by protein-RNA interactions only, because a specific binding of regulatory proteins would require less nucleotide conservation over shorter RNA sequences [6].

This work deals with a gene encoding a small GTP binding protein belonging to the RAS superfamily and the members of RAB family which are homologous to each other and highly conserved among eukaryotes (reviewed in [21]). The *Rab1a* gene of mouse and human, located on mouse proximal chromosome 11 and human chromosome 2p, respectively, came into the focus of our comparative analysis of these homologous genomic regions [17,28,35]. This gene encodes the small GTP binding protein RAB1 which is found in every eukaryote and is a key regulatory component for the transport of vesicles from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus (reviewed in [1,25]). Studies on mutations of YPT1, the yeast counterpart of RAB1, showed that this protein is necessary for the budding of vesicles of the endoplasmic reticulum as well as for their transport to, and fusion with, the Golgi apparatus [33,37]. Conservation between mammalian RAB1 and YPT1 was previously shown at different levels. Haubruck et al. [11] used the yeast cDNA as a hybridization probe to isolate the corresponding mouse cDNA. They found 71% identity at the amino acid level. Functional equivalence was demonstrated by the complementation of yeast YPT1 mutations by mouse RAB1a protein [12].

Here we report an extreme sequence conservation of an exonic non-coding region of the *Rab1a* gene, the 3'-UTR, within amniote vertebrates. Secondary structure predictions and binding experiments imply a posttranscriptional cellular function involving protein-RNA interactions.

\*Corresponding author. Fax: (49)-521-106 5654.  
E-mail: h.jockusch@biologie.uni-bielefeld.de

<sup>1</sup> Present address: Institute of Radiobiology, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Germany.

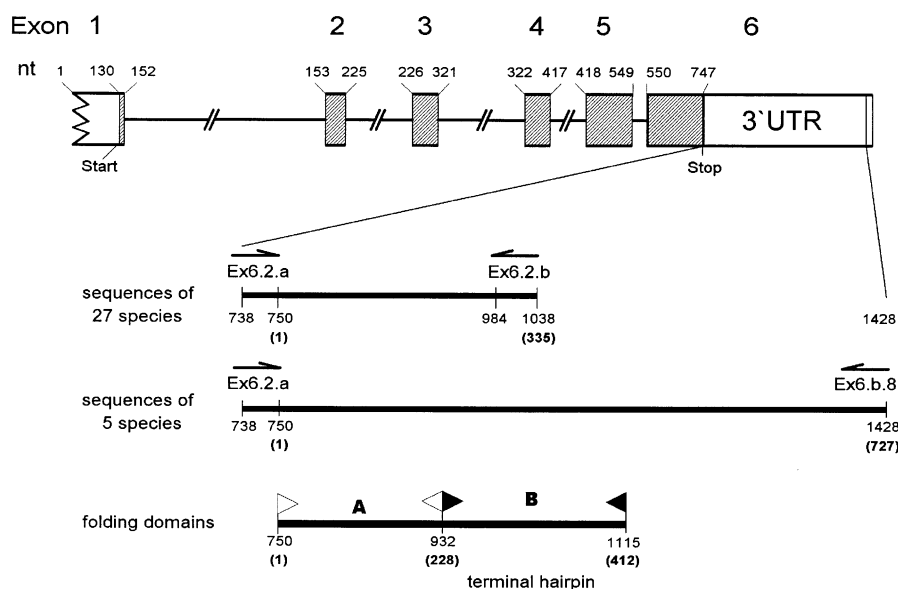


Fig. 1. Structure of the *Rab1a* gene of the mouse, nucleotide numbering system and primers used in this work. Exons and introns of *Rab1a* are shown with protein coding regions shaded. Nucleotide positions (nt) are numbered according to the mouse cDNA sequence of Wichmann et al. [36]. Positions of primers used, and sequences determined, in this work are indicated by half arrows and bold horizontal lines, respectively. Numbers in brackets refer to the nucleotide position in the alignment (see Fig. 2). Folding domains A and B are indicated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Origin of tissues and GenBank accession numbers

DNAs were prepared from tissues of the following vertebrates: human (*Homo sapiens*, nasal mucosa; AF170935), baboon (*Papio hamadryas*, muscle, Zoo Hellabrunn, Munich, Germany; AF170927), laboratory mouse (*Mus musculus laboratorius*, brain, liver, muscle; Y00094), laboratory rat (*Rattus norvegicus*, kidney; AF170942), horseshoe bat (*Rhinolophus rouxii*, kidney, Zool. Inst. University Munich; AF170928), European mole (*Talpa europaea*, kidney, Bielefeld; AF170937), polecat (*Putorius putorius*, kidney, Bielefeld, Germany; AF170939), serval (*Leptailurus serval*, skeletal muscle, Zoo Hellabrunn, Munich, Germany; AF170943), domestic cat (*Felis catus*, testis, veterinarian, Bielefeld, Germany; AF227734), porpoise (*Phocoena phocoena*, skeletal muscle, Sea Mammal Research Unit, Cambridge, UK; AF170940), fin whale (*Balaenoptera physalus*, stranded male, connective tissue from fluke, Schleswig-Holstein, Germany; AF170934), moose (*Alces alces*, neck muscle, Zoo Hellabrunn, Munich, Germany; AF170932), muntiac (*Muntiacus reevesi*, kidney, Behavioural Sciences, University of Bielefeld; AF170936), cattle (*Bos taurus domestica*, liver; AF227735), sheep (*Ovis aries*, kidney; AF170944), camel (*Camelus bactrianus*, testis, Zoo Hannover; AF170929), Indian elephant (*Elephas maximus*, placenta, Zoo Hagenbeck, Hamburg; AF170933), agile wallaby (*Macropus parma*, kidney, Behavioural Sciences, University of Bielefeld; AF170931), common brush-tailed possum (*Trichosurus vulpecula*, MPI Tübingen; AF227733), Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*, MPI Tübingen; AF227736), quolls (*Dasyurus byrnei*, MPI Tübingen; AF233389), South American short-tailed gray opossum (*Monodelphis domestica*, MPI Tübingen; AF233388), chicken (*Gallus gallus gallus*, liver; AF170930), zebra finch (*Poephila guttata*, lung, behavioral sciences, Bielefeld; AF170946), ostrich (*Struthio camelus*, liver, ostrich farm via Zoology Department, Tel-Aviv, Israel; AF170938), Mississippi alligator (*Alligator mississippiensis*, kidney, alligator farm via Zoology Department, Tel-Aviv, Israel; AF170926), painted turtle (*Chrysemys scripta elegans*, lung, animal trade; AF170945). Wild animals with

'Bielefeld' given as the origin were either killed by car traffic or by the cat of H. Jockusch.

### 2.2. DNA preparation, amplification and sequencing

DNAs from vertebrate tissues were prepared by SDS phenol extraction or according to Laird et al. [18]. DNAs were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers Rab1Ex6.2a biotin 5'-GTACTACCTGCTAAACCGTAGGC-3' and Rab1Ex6.2b 5'-CTTCTGGCCTGCTGCTGTGTCC-3' or Rab1Ex6.b.8 5'-GAATGCAAAGCCTATTTCCC-3' (Fig. 1). PCR was performed using 100 ng total DNA, 50 pmol of each primer, 3 U Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), 200  $\mu$ mol of each nucleotide and buffers as recommended by the suppliers. Cycle conditions were one cycle at 94°C for 4 min and 35 cycles at 60°C (for Rab1Ex6.2a and Rab1Ex6.2b primers) or 56°C (for Rab1Ex6.2a and Rab1Ex6.b.8) for 1 min, 72°C for 90 s, and 90°C for 1 min. 10  $\mu$ l of the amplification product was controlled on an agarose gel and both strands were sequenced.

### 2.3. RNA secondary structure prediction

Secondary structure calculations were performed using Michael Zukers 'mfold 3.0' [22] at 37°C with default parameters and verified using 'RNAfold 1.2.1' [14]. The secondary structure polygonal plots were produced by 'RNA Movies 1.0' [8]. Furthermore the tool was used to compare alternative secondary structures. Covariation methods were not employed because of insufficient input data.

## 3. Results

### 3.1. Evidence for sequence conservation

Genomic PCR was originally applied to the *Rab1a* gene as it was considered a positional candidate for the neuromuscular disease gene *wobbler* (*wr*) of the mouse [35]. Comparative genomic PCR analysis on a variety of mammalian species was

Fig. 2. Comparison of the RAB1 3'-UTR sequences of 27 vertebrate species. For species 1–27, positions 750–985, for species 1, 3, 9, 11 and 12, positions 750–1428 relative to the mouse cDNA sequence (accession # Y00094) are shown, this means that nucleotide 1 corresponds to nucleotide 750 in the mouse cDNA. Sequence variations relative to the human sequence are indicated in black, those not determined by dots. The borders of folding region A are indicated by white, and those of region B by black arrow heads.

Table with 13 columns (1-130) and 27 rows (1-27) showing DNA sequence alignments for various species including human, baboon, mouse, rat, bat, mole, polecat, serval, house cat, porpoise, fin whale, moose, muntiac, cattle, sheep, camel, elephant, opossum, quolls, T.devil, possum, wallaby, chicken, zebra finch, ostrich, alligator, and turtle.

Table with 13 columns (111-220) and 27 rows (1-27) showing DNA sequence alignments for various species including human, baboon, mouse, rat, bat, mole, polecat, serval, house cat, porpoise, fin whale, moose, muntiac, cattle, sheep, camel, elephant, opossum, quolls, T.devil, possum, wallaby, chicken, zebra finch, ostrich, alligator, and turtle.

Table with 13 columns (221-330) and 27 rows (1-27) showing DNA sequence alignments for various species including human, baboon, mouse, rat, bat, mole, polecat, serval, house cat, porpoise, fin whale, moose, muntiac, cattle, sheep, camel, elephant, opossum, quolls, T.devil, possum, wallaby, chicken, zebra finch, ostrich, alligator, and turtle.

Table with 13 columns (331-440) and 27 rows (1-27) showing DNA sequence alignments for various species including human, mouse, house cat, fin whale, moose, opossum, quolls, T.devil, possum, chicken, zebra finch, ostrich, alligator, and turtle.

Table with 13 columns (441-550) and 27 rows (1-27) showing DNA sequence alignments for various species including human, mouse, house cat, fin whale, moose, opossum, quolls, T.devil, possum, chicken, zebra finch, ostrich, alligator, and turtle.

Table with 13 columns (551-660) and 27 rows (1-27) showing DNA sequence alignments for various species including human, mouse, house cat, fin whale, moose, opossum, quolls, T.devil, possum, chicken, zebra finch, ostrich, alligator, and turtle.

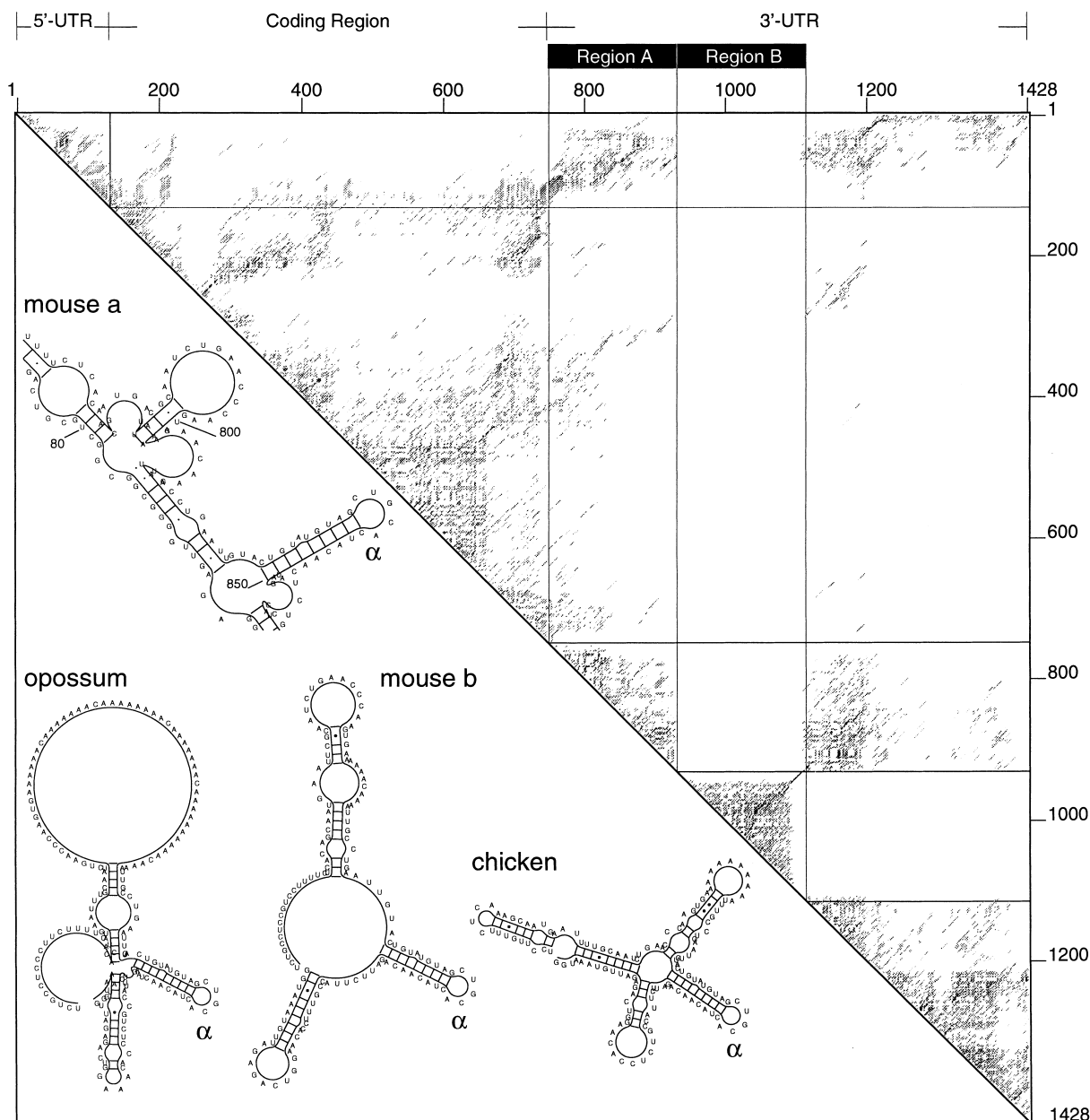


Fig. 3. Predicted secondary structures for RAB1a mRNA and 3'-UTRs. Upper right half: energy dot plot of complete mouse RAB1a mRNA. Numbers at the axes indicate nucleotides according to Figs. 1 and 2. Dots indicate free energy of base pairing interaction, with free energy  $-404.6 < \Delta G \leq -392.6$  kcal/mol. Lower left half: models for secondary structures with participation of region A. Mouse a, detail from folding of total mouse *Rab1a* mRNA (minimal free energy, MFE,  $-404.6$  kcal/mol): backfolding of region A to 5'-UTR. Mouse b, opossum, chicken: interspecies comparison of secondary structures of isolated region A (within a 10% range of the MFE); hairpin  $\alpha$  is visible in all models; marsupial is unique by a large single-stranded A-rich loop.

performed in order to identify conserved sequences. In the course of this work, the high conservation among mammalian species of the 3'-UTR region of the *Rab1a* gene became evident and the analysis was therefore extended to a wide variety of vertebrates, using primers flanking approximately 300 bp/680 bp of sequence between the stop codon and the polyadenylation site (Fig. 1).

The *Rab1a* 3'-UTR sequences of 17 eutherian, five marsupial (wallaby, possum, Tasmanian devil, opossum, quolls), three bird (chicken, zebra finch and ostrich) and two reptile species (alligator and turtle) have been amplified. In the case of marsupials, PCR products approximately 20–40 bp longer

than in the other tested species were obtained. Under stringent conditions, no amplification products were obtained from some lower vertebrates, amphibians (frog), elasmobranchs (shark), teleosts (medaka, zebrafish) as well as deuterostome (sea urchin) and protostome (cockchafer) invertebrates.

### 3.2. Selected sequences and their alignment

Sequences from amniote vertebrates were aligned (Fig. 2). Even between the species with the greatest phylogenetic distance (man and turtle), the sequences were found to be 92% identical. Within the placental mammals (Eutheria), the lowest observed sequence conservation was 95%.

In addition, the sequence analysis showed the expected conservation within particular orders and families, e.g. sequences specific for rodents (bp 155), carnivores (bp 18), for marsupials (bp 62–63, 70–105) and sauropsida (bp 16–17, 24, 202, 275–279). There were particular sequence identities across phylogenetical boundaries, e.g. alligator and ostrich were identical in positions 21 and 65–69 but different from other bird species and turtle. However, the overwhelming part of the 3'-UTR sequence shows very little variability, except for the A-rich region between bp 56 and 105. The A-rich sequences within the 3'-UTRs of marsupials were extended as compared to all other species investigated.

For five species (human, mouse, cat, fin whale and moose), the RAB1a 3'-UTR was completely sequenced. The results revealed a higher degree of conservation (>97%) as for the shorter region (Fig. 2).

### 3.3. Predicted secondary structure

Standard RNA secondary structure prediction tools were employed to determine the free energy ensemble of the complete mouse RAB1 transcript (Fig. 3). The energy dot plot reveals a region of high stability forming a long helical region of 72 bp (labeled B) in the 3'-UTR (nucleotides 932–1115 of the complete mouse mRNA sequence, accession number Y00094) that overlaps the PCR-amplified region by 52 nucleotides. The amplified region itself approximately coincides with a domain in the ensemble covering nucleotides 750–932 (labeled A) exhibiting mainly local folding and binding to the 5'-UTR. Basepair probability dot plots generated with 'RNA-fold' also accentuate region A (not shown).

Because the coding region of an mRNA may be prevented from folding by bound ribosomes, and since 3'-UTR regions A and B exhibit mainly local folding, we have predicted the secondary structure of the isolated region A. The secondary structure ensembles of the 3'-UTR fragments of all species show broad energy minima leading to families of alternative structures. However, there are recurrent features especially a conserved hairpin structure (labeled  $\alpha$  in Fig. 3) throughout all ensembles.

### 3.4. Preliminary evidence for protein binding

A reason for the conservation of a non-coding RNA sequence and a defined folding pattern might be the recognition by protein(s) with a conserved RNA binding site. Therefore, gel-shift experiments with cell extracts were performed. PCR products derived from mouse and chicken were cloned, transcribed and <sup>32</sup>P-radiolabeled in vitro. Subsequently, the labeled RNAs were incubated with total soluble protein extracts from mouse brain, liver and skeletal muscle. Complexes were electrophoretically separated under non-denaturing conditions. A shift of the position of radiolabeled RNAs was observed upon incubation of mouse and chicken 3'-UTRs with any of the mouse extracts, indicating interaction within a species and across species boundaries (not shown). After covalent cross linking and RNase treatment, a 200 kDa polypeptide(s)/RNA complex was detected on gel electrophoresis under denaturing conditions (not shown).

## 4. Discussion

We describe an extreme sequence conservation among the 3'-UTRs of the *Rab1a* genes among 27 amniote vertebrate

species. Although 3'-UTRs from several other genes have been shown to be conserved from mammals to lower vertebrates [6,7], the sequence homologies, e.g. between mammals and sauropsida, were not as high as with *Rab1a*. In the coding sequences (618 bp) of the *Rab1* genes, the following nucleotide identities relative to humans were found in the database: dog 96% (603 nucleotides of 618), mouse 95% (592/618), rat 93% (577/618). In comparison, the lowest sequence conservation we identified in the *Rab1a* 3'-UTR of placental mammals was 95%, the average 98%. Thus, the sequence conservation of the RAB1a 3'-UTR is higher than that of the protein coding region. The exceptional extension of the poly-A-rich sequence in marsupials underlines the uniqueness of this group relative to the placental animals. It would suggest a monophyletic origin as accepted in the recent literature [31].

This result raises three questions:

1. What is the relation of the 3'-UTRs sequenced to possible isoforms of the *Rab1* transcripts?
2. What is the nature of the presumed protein binding site within the *Rab1a* 3'-UTR?
3. What might be the cellular function of the *Rab1a* 3'-UTR and of *Rab* 3'-UTRs in general?

### 4.1. Ad 1: relation of the 3'-UTRs sequenced to possible isoforms of the RAB1 transcripts

In mammals, two *Rab1* RNA species with 1.6 and 3.2 kb have been found in a variety of tissues [21,37]. Haubruck and colleagues [12] suggested that both RNA species are expressed, by differential splicing, from the same gene and differ only in the lengths of their 3'-UTRs. The same phenomenon was recently described for the human *Rab1a* gene [10]. On the protein level, two functionally interchangeable *Rab1* isoforms, a and b, have been identified with 92% amino acid sequence identity [26]. In the rat, the 3'-UTR amplified from the *Rab1a* gene shows no homology to the 3'-UTR sequence of the *Rab1b* isoform. Mapping studies using the *Rab1a* 3'-cDNA as a probe revealed the identity of a further *Rab1*-like gene [34,39]. In all vertebrate species analyzed in this work, except for rat and man, very little is known about *Rab1* transcriptional or genomic isoforms. However, based on the experimental evidence on the better analyzed species, especially the isoform specificity of the 3'-UTRs, it seems likely that our amplified products are indeed genetic orthologs to the mouse and human *Rab1a* standard isoforms.

### 4.2. Ad 2: the nature of the binding site within the RAB1a 3'-UTR

The secondary structure prediction gives rise to two hypotheses: (1) the A-rich variable region between nucleotides 56 and 103 (as in Fig. 2) is single-stranded. (2) The region 113–136 (as in Fig. 2) forms a stable hairpin structure.

For several 3'-UTRs, specific binding proteins are known, e.g. the U-rich element RNA binding protein (AUF1), the hnRNP L protein which interacts specifically with *VEGF* mRNA in hypoxic cells, the IRP1 in the iron regulatory system and the stem-loop binding protein(s) which stabilize(s) the histone mRNA during the DNA synthesis [23,24,32]. Specific RNA foldings have been predicted, and according to these, most of the conserved sequences are located not in the base-paired but in the single-stranded regions [37].

In the case of *Rab1a* 3'-UTRs, the sequence homology is

certainly higher than required to maintain a given secondary structure. Furthermore, except for the  $\alpha$ -hairpin, there is no clearly defined stable overall secondary structure. Thus, some hitherto unknown biological function must reside in the primary sequences themselves.

#### 4.3. Ad 3: possible physiological function of the highly conserved 3'-UTR of the RAB1a transcript

Nothing is known about the protein(s) we have found to bind to the 3'-UTR of the RAB1a transcript. Therefore we can only speculate on the significance of this interaction. Two functions of 3'-UTRs are well documented in the literature: regulation of mRNA stability [4] and localization of mRNAs to specific regions of the cytoplasm [2]. In contrast to the *Rab1* coding region which is highly homologous among all members of the *Rab* family, the *Rab1a* 3'-UTR shows no significant homology to that of other genes, including other members of the *Rab* gene family. Even between isoforms RAB1A and RAB1B the 3'-UTRs are dissimilar. All RAB proteins are involved in intracellular vesicle transport but can be clearly distinguished regarding the cellular compartment in which they are active (reviewed in [21]). Therefore it is likely that the function of the *Rab1a* 3'-UTR is to localize the message to specific regions of the cytoplasm, so that translation would occur close to the localization of the respective RAB protein.

**Acknowledgements:** We thank Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 223/C4 and Graduiertenkolleg 'Strukturbildungsprozesse', project Dr. R. Giegerich) for financial support. We are grateful to Professor H. Wiesner (director), Drs. med. vet. Ch. Lendl and J. Hector (Zoo Hellabrunn), Dr. med. vet. P. Brandt (Zoo Hannover), Prof. G. Neuweiler and Dr. H. Schweizer (Zoological Institute, University Munich), Dr. M. Walton (Sea Mammal Research Unit, Cambridge, UK), Dr. med. vet. Schulze (Husum), Professors F. Trillmich and H.H. Hendrichs (Behavioural Sciences, University of Bielefeld, Germany), Dr. med. vet. S. Kozik (Bielefeld), Dr. med. vet. M. Flügger (Zoo Hagenbeck, Hamburg, Germany); Professor U. Oron (Zoology Department, Tel-Aviv, Israel) and Dr. Tichy (Max-Planck-Institute for Biology, Tübingen, Germany) for providing, or helping to obtain, tissue samples for DNA preparation or DNA samples. Some DNAs have been prepared in the course of Dr. C. Witt's diploma thesis. Technical assistance of M. Ronsiek and B. Mersch is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] Balch, W.E. (1990) Trends Biochem. Sci. 15, 473–477.
- [2] Bashirullah, A., Cooperstock, R.L. and Lipshitz, H.D. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 335–394.
- [3] Binder, R., Horowitz, J.A., Basilion, J.P., Koeller, D.M., Klausner, R.D. and Harford, J.B. (1994) EMBO J. 13, 1969–1980.
- [4] Chen, C.-Y.A. and Shyu, A.-B. (1995) Trends Biochem. Sci. 20, 465–470.
- [5] Decker, C.J. and Parker, R. (1995) Curr. Opin. Cell Biol. 7, 386–392.
- [6] Duret, L., Dorkeld, F. and Gautier, C. (1993) Nucleic Acids Res. 21, 2315–2322.
- [7] Eastman, E.M. and Gilula, N.B. (1989) Gene 79, 151–158.
- [8] Evers, D. and Giegerich, R. (1999) Bioinformatics 15, 32–37.
- [9] Gavis, E.R., Curtis, D. and Lehmann, R. (1996) Dev. Biol. 176, 36–50.
- [10] Gromov, P.S., Celis, J.E., Hansen, C., Tommerup, N., Gromova, I. and Madsen, P. (1999) FEBS Lett. 429, 359–364.
- [11] Haubruck, H., Disela, C., Wagner, P. and Gallwitz, D. (1987) EMBO J. 6, 4049–4053.
- [12] Haubruck, H., Prange, R., Vorgias, C. and Gallwitz, D. (1989) EMBO J. 8, 1427–1432.
- [13] Hill, K.E., Lloyd, R.S. and Burk, R.F. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 537–541.
- [14] Hofacker, I.L., Fontana, W., Stadler, P.F., Bonhoeffer, L.S., Tacker, M. and Schuster, P. (1994) Mon. heft. Chem. 125, 167–188.
- [15] Jackson, R.J. (1993) Cell 74, 9–14.
- [16] Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H. and Taneja, K.L. (1993) J. Cell Biol. 123, 165–172.
- [17] Korthaus, D., Wedemeyer, N., Lengeling, A., Ronsiek, M., Jockusch, H. and Schmitt-John, T. (1997) Genomics 43, 242–244.
- [18] Laird, P.W., Zijderfeld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. and Berns, A. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4293.
- [19] Määttä, A., Bornstein, P. and Penttinen, R.P. (1991) FEBS Lett. 279, 9–13.
- [20] MacDonald, P.M. and Struhl, G. (1988) Nature 336, 595–598.
- [21] Martinez, O. and Goud, B. (1998) Biochim. Biophys. Acta 1404, 101–102.
- [22] Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. and Turner, D.H. (1999) J. Mol. Biol. 288, 911–940.
- [23] McCarthy, J.E.G. and Kollmus, H. (1995) Trends Biochem. Sci. 20, 191–197.
- [24] Nakamaki, T., Imamura, J., Brewer, G., Tsuruoka, N. and Koefler, H.P. (1995) J. Cell Physiol. 165, 484–492.
- [25] Nuoffer, C. and Balch, W.E. (1994) Annu. Rev. Biochem. 63, 949–990.
- [26] Nuoffer, C., Davidson, H.W., Matteson, J., Meinkoth, J. and Balch, W.E. (1994) J. Cell Biol. 125, 225–237.
- [27] Rastinejad, F. and Blau, H.M. (1993) Cell 72, 903–917.
- [28] Resch, K., Korthaus, D., Wedemeyer, N., Lengeling, A., Thiel, C., Ronsiek, M., Baer, K., Jockusch, H. and Schmitt-John, T. (1998) Mamm. Genome 9, 893–898.
- [29] Rouault, J.P., Samarut, C., Duret, L., Tessa, C., Samarut, J. and Magaud, J.P. (1993) Gene 129, 303–306.
- [30] Shaw and Kamen (1986) Cell 46, 659–667.
- [31] Shoshani, J. and McKenna, M. (1998) Mol. Phylogenet. Evol. 9, 572–584.
- [32] Shih, S.C. and Claffey, K.P. (1999) J. Biol. Chem. 274, 1359–1365.
- [33] Tisdale, E.J., Bourne, J.R., Khosravi-Far, R., Davidson, H.W., Der, C.J. and Balch, W.E. (1992) J. Cell Biol. 119, 749–761.
- [34] Vielh, E., Touchot, N., Zahraoui, A. and Tavitian, A. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 1770.
- [35] Wedemeyer, N., Lengeling, A., Ronsiek, M., Korthaus, D., Baer, K., Wuttke, M. and Jockusch, H. (1996) Genomics 32, 447–454.
- [36] Wichmann, H., Disela, C., Haubruck, H. and Gallwitz, D. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 6737–6738.
- [37] Wilson, B.S., Nuoffer, C., Meinkoth, J.L., McCaffery, M., Feramisco, J.R., Balch, W.E. and Farquhar, M.G. (1994) J. Cell Biol. 125, 557–571.
- [38] Yaffe, D., Nudel, U., Mayer, Y. and Neuman, S. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 3723–3737.
- [39] Zahraoui, A., Touchot, N., Chardin, P. and Tavitian, A. (1989) J. Biol. Chem. 264, 12394–12401.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit allein und ohne weitere, als die von mir genannten Hilfsmittel durchgeführt habe.

Bielefeld, den 20.06.2002

Cora Thiel