

**Physikalische Kartierung des *Fused toes* Lokus
und funktionelle Analyse des *Iroquois 3 (Irx3)* Gens
in der Maus**

Von dem Fachbereich der Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Katrin Ausmeier

geboren am 15.08.1968 in Göttingen

2001

Referent: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Korreferent: Prof. Dr. Achim Gossler

Tag der Promotion: 24.11.2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG, ABSTRACT	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	Die <i>Fused toes (Ft)</i> Mausmutation	12
2.1.1	Der Phänotyp der <i>Ft</i> Mutante	12
2.1.2	Die Organisation des <i>Fused toes</i> Lokus zu Beginn der Arbeit	15
2.2	Aufgabenstellung	18
3	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
3.2	Lösungen und Puffer	20
3.3	Nährmedien und Antibiotika	24
3.4	DNA-Bibliotheken	25
3.4.1	P1 DNA-Bibliothek	25
3.4.2	BAC DNA-Bibliothek	26
3.4.3	PAC DNA-Bibliothek	26
3.4.4	cDNA-Bibliothek	27
3.5	Isolierung von Nukleinsäuren	28
3.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
3.5.1.1	Präparation im analytischen Maßstab („Miniprep“)	28
3.5.1.2	Präparation im präparativen Maßstab („Maxiprep“)	28
3.5.1.3	P1 Plasmidpräparation	29
3.5.1.4	BAC Plasmidpräparation	29
3.5.1.5	PAC Plasmidpräparation	30
3.5.2	Isolierung von genomischer DNA	31
3.5.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen und kultivierten Zellen	31
3.5.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.5.4.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	32
3.5.4.2	Konzentrationsabschätzung im Agarosegel	33
3.6	Gelelektrophorese	33
3.6.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	33
3.6.2	DNA-Fragmentlängenbestimmung	34
3.7	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	34
3.7.1	Präparation von genomischer DNA für die Pulsfeld-Gelelektrophorese	35
3.7.2	Restriktionsenzymatische Spaltung genomischer DNA in Agaroseblöckchen	37
3.8	Hybridisierungstechniken	37
3.8.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	37
3.8.2	Hybridisierung einer DNA-Bibliothek	38
3.8.3	Hybridisierung von genomischer DNA (Southern-Blot)	38
3.9	Klonierungstechniken	39
3.9.1	Sequenzspezifische Spaltung von DNA	39

3.9.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	40
3.9.2.1	Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion	40
3.9.2.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.9.3	Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.9.4	Herstellung kompetenter Bakterien	42
3.9.5	Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien	43
3.9.6	Langzeitlagerung von Bakterien	43
3.10	Sequenzierung von DNA	43
3.11	Polymerase Ketten Reaktion	44
3.11.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide („ <i>Primer</i> “)	44
3.11.2	Standard-PCR	44
3.11.3	Reverse Transkription	45
3.12	Suppressions-PCR	46
3.13	„<i>Plasmid Rescue</i>“	47
3.14	„<i>Exon Trapping</i>“-Technik	47
3.15	Zellkulturtechnik	48
3.15.1	Zell-Linien	48
3.15.2	Kultivierung und Passagierung von Zellen	48
3.15.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
3.15.4	Bestimmung der Gesamtzellzahl	49
3.15.5	Transiente Transfektion	49
3.16	Herstellung von transgenen Mäusen	50
3.16.1	Tierhaltung	50
3.16.2	Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Mikroinjektion	50
3.16.3	Präparation von Zygoten, Mikroinjektion und Transfer	51
3.16.4	Genotypisierung	52
3.16.5	Isolierung definierter Embryonalstadien	52
3.17	„<i>Whole mount</i>“ in situ Hybridisierung	53
3.17.1	Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden	53
3.17.2	Durchführung der in situ Hybridisierung	53
3.18	Knochen- und Knorpelfärbung	55
4	ERGEBNISSE	56
4.1	Genetische Kartierung des <i>Fused toes</i> Lokus auf Chromosom 8	56
4.2	Physikalische Feinkartierung des <i>Fused toes</i> Lokus	60
4.2.1	Methodische Untersuchungen zur Isolierung von terminalen Sonden für die Durchführung der „ <i>Chromosome Walking</i> “-Technik	60
4.2.2	Die Kartierung des <i>Ft</i> Lokus	65
4.2.2.1	Identifizierung genomischer P1-, BAC- und PAC-Klone aus DNA-Bibliotheken	66
4.2.2.2	Bestimmung der Insertionsgröße der genomischen Klone über PFGE und Kontrolle der Klonidentität durch Southern-Blot Analyse („Rescreening“)	67
4.2.2.3	Isolierung terminaler Sonden aus den P1-, BAC- und PAC-Klonen	68
4.2.2.4	Southern-Blot Analyse zur Bestimmung der Position der Klone im Contig sowie zum Deletionsnachweis	68
4.2.2.5	Erstellung einer physikalischen Karte des <i>Fused toes</i> Lokus	72
4.2.2.6	Verifizierung der Kartierung des <i>Ft</i> Lokus auf genomischer DNA	75

4.3	Identifizierung von Genen am <i>Fused toes</i> Lokus	77
4.3.1	Klonierung bisher unbekannter Sequenzanteile der <i>Ft1</i> cDNA aus RLDB-5	78
4.3.2	Partielle Klonierung des <i>Ft2</i> Gens	80
4.3.3	Beschreibung weiterer am <i>Fused toes</i> Lokus lokalisierter Gene	85
4.4	„Rescue“-Experiment: Herstellung <i>Irx3</i>-transgener Mäuse	86
4.4.1	<i>Irx3</i> kann mit Hilfe der Klone PAC43 und PAC44 in <i>Ft/Ft</i> Mausfibroblasten exprimiert werden.	86
4.4.2	Generierung <i>Irx3</i> -transgener Mauslinien	88
4.4.3	<i>Irx3</i> als Transgen beeinflusst nicht den heterozygoten <i>Ft</i> Phänotyp	91
4.4.4	Der homozygote <i>Ft</i> Phänotyp wird nicht durch die Anwesenheit der <i>Irx3</i> Transgene PAC43 und PAC44 verändert	92
4.4.5	Nachweis der transgenen <i>Irx3</i> Expression in homozygoten <i>Ft</i> Embryonen	96
4.4.6	<i>Sonic hedgehog</i> (<i>Shh</i>) Expression in <i>Irx3</i> -transgenen und nicht transgenen homozygoten <i>Ft</i> Embryonen	100
4.5	Neue Aspekte zum Phänotyp der <i>Fused toes</i> Mutante	103
5	DISKUSSION	106
5.1	Kartierung des <i>Fused toes</i> Lokus	106
5.2	Genidentifizierung	112
5.2.1	Identifizierung eines neuen Transkripts von <i>Ft1</i>	114
5.2.2	<i>Ft2</i> : Identifizierung eines neuen Gens am <i>Fused toes</i> Lokus	115
5.3	Funktionelle Analyse des <i>Irx3</i> Gens durch Transgen-„Rescue“	116
5.3.1	Einfluß der <i>Irx3</i> Transgene auf die <i>Shh</i> Expression in <i>Ft/Ft</i> Embryonen	121
5.4	Fazit der Arbeit und Zukunftsperspektiven	123
6	LITERATUR	125
7	ANHANG	137
7.1	Oligonukleotide	137
7.2	Partielle cDNA-Sequenz von <i>Ft2</i>	140
7.3	Identitätsnummern der P1-, BAC- und PAC-Klone	146
7.4	Abkürzungen	147

1 Zusammenfassung, Abstract

Die *Fused toes (Ft)* Mausmutation stellt das Resultat einer insertionellen Mutagenese, d.h. in diesem Fall der durch eine Transgenintegration verursachten Deletion genomischer DNA, dar. Der heterozygote Phänotyp zeichnet sich durch eine partielle Syndactylie der vorderen Extremitäten und eine Thymushyperplasie aus. Homozygote *Ft* Mäuse sterben etwa in der Mitte der Embryonalentwicklung, zeigen abnormale Veränderungen des Kopf- und Gesichtsbereiches sowie der Extremitäten und weisen einen Verlust der genetischen Kontrolle der Rechts-Links-Asymmetrie auf. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen die physikalische Größe der *Ft* Deletion festzustellen und zum anderen möglicherweise durch die Deletion betroffene Gene zu identifizieren. Dazu wurde zunächst eine genetische Kartierung, die eine grobe Lokalisierung der *Ft* Mutation zwischen den MIT Marker D8MIT109 und D8MIT110 auf Chromosom 8 ermöglichte, durchgeführt. Mit Hilfe weiterer genetischer Marker konnte die Ausdehnung der *Ft* Deletion auf nicht größer als 1 cM, was in etwa 2 Mb entspricht, abgeschätzt werden. Im Anschluß an die genetische Grobkartierung wurde mit Hilfe des „*Chromosome Walking*“ eine physikalische Kartierung des *Ft* Locus vorgenommen. Als Ergebnis wurde unter Verwendung von P1, BAC und PAC DNA-Bibliotheken ein aus 52 genomischen Fragmenten bestehender Contig erhalten, der insgesamt 1,6 Mb an genomischer DNA abdeckt und damit die gesamte in der *Ft* Mutation deletierte genomische DNA beinhaltet. Die Analyse einiger genomischer Fragmente mit Hilfe der „*Exon Trapping*“-Technik resultierte in der Identifizierung einer neuen Spleißvariante des bereits bekannten *Ft1* Gens sowie des bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Gens *Ft2*. Letzteres kodiert für ein ca. 6 kb großes Transkript, von dem 4 kb in dieser Arbeit kloniert und sequenziert werden konnten. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, daß das bekannte *Iroquois 3 (Irx3)* Gen am *Ft* Locus lokalisiert ist. Eine erste Analyse dieses Gens hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an der Ausbildung des *Ft* Phänotyps wurde mit Hilfe eines „*Rescue*“-Experiments vorgenommen. Unter Verwendung zweier genomischer Fragmente, die jeweils das *Irx3* Gen samt unterschiedlich großer Be-

reiche an flankierenden Sequenzen beinhalteten, wurden *Irx3*-transgene Mäuse hergestellt. Diese wurden mit heterozygoten *Ft* Tieren gekreuzt, um so das *Irx3* Gen bzw. die Genfunktion in die *Ft* Mutante zurückzuführen. Trotz einer nachweisbaren Expression des *Irx3* Gens konnten in drei etablierten transgenen Linien weder Veränderungen des heterozygoten noch des homozygoten *Ft* Phänotyps beobachtet werden. Da das „Rescue“-Experiment nur im Falle des Nachweises einer Phänotypänderung Rückschlüsse auf die Genfunktion erlaubt hätte, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt prinzipiell eine Beteiligung von *Irx3* an der Ausprägung des *Ft* Phänotyps weder nachgewiesen noch ausgeschlossen werden. Andererseits stellt die vollständige physikalische Kartierung und Klonierung der in der *Ft* Mutation deletierten genomischen DNA die Basis für weitere Genfunktionsanalysen bereits identifizierter sowie möglicherweise zusätzlich vorhandener aber bisher noch nicht detektierter Gene, z. B. durch die Generierung entsprechender „loss-of-function“ Mutationen, dar und trägt somit in grundlegender Weise zur molekularen Aufklärung des *Ft* Phänotyps bei.

Fused toes, Iroquois 3, Physikalische Kartierung

The mouse mutation *Fused toes (Ft)* was generated by insertional mutagenesis of a transgene resulting in the deletion of genomic DNA. The phenotype of heterozygous *Ft* mice is characterized by a partial syndactyly of the forelimbs and a thymushyperplasia. In contrast, homozygous *Ft* mice die during midgestation showing malformations of the forebrain region, an abnormal development of the limbs and a loss of the control of the left-right asymmetry. The aim of the following study was to determine the size of the affected genomic region and to identify genes deleted as a result by the *Ft* mutation. During the genetic mapping of the *Ft* locus the mutation could be localised between the genomic markers D8MIT109 and D8MIT110 on mouse chromosome 8. Using additional genetic markers located in this region, the size of the *Ft* deletion could be estimated to less than 1

cM which is about 2 Mb. Subsequently to the genetic mapping chromosomal walking experiments were carried out in order to obtain a physical map of the genomic region affected by the *Ft* mutation. Using P1, BAC and PAC DNA-libraries a continuous contig of 52 genomic fragments could be isolated spanning over approx. 1,6 Mb of genomic DNA carrying the whole genomic DNA deleted in the *Ft* mutation. Exon Trapping analysis of a part of the contig revealed a new splice variant of the already known *Ft1* gene and, in addition, the presence of the new gene *Ft2*, encoding a 6 kb transcript of which 4 kb were cloned and sequenced in the present work. Furthermore it could be demonstrated that the already known gene *Iroquois 3 (Irx3)* is located at the Fused toes locus. A preliminary analysis of the *Irx3* gene function in relation to a potential involvement in the generation of the *Ft* phenotype was carried out using two different genomic fragments, each consisting of the complete *Irx3* gene and additional flanking sequences different in size, for generation of transgenic mice in a rescue experiment. Following the crossing of *Irx3* transgenic mice with heterozygous *Ft* animals no alteration of either the heterozygous or homozygous *Ft* phenotype in three established transgenic lines could be detected, though in each line expression of the *Irx3* gene could be demonstrated. In view of the fact that exclusively an observed alteration of the phenotype as a result of the rescue experiment would permit conclusions for the gene function the involvement of *Irx3* in the generation of the *Ft* phenotype neither can be proved nor be excluded, so far. However, the complete physical mapping and cloning of the genomic DNA deleted as a result of the *Ft* Mutation provides the basis for further investigations aiming at the analysis of genes of either already identified or so far unknown genes eg by using the construction of corresponding loss of function mutations, thus giving substantial contribution for the molecular analysis of the *Ft* phenotype.

Fused toes, Iroquois 3, physical mapping

2 Einleitung

Wie sich aus einer einzelnen Eizelle ein komplexes, vielzelliges Lebewesen entwickelt, ist die zentrale Frage, mit der sich die Entwicklungsbiologie beschäftigt. Der Bauplan eines jeden Organismus, der die Entwicklung einer totipotenten Eizelle in unterschiedliche spezialisierte Gewebe steuert, ist im Genom der Zelle in Form von Genen, von denen Vertebraten etwa 50.000 bis 100.000 besitzen, gespeichert (Bird, 1995). Von besonderem Interesse sind für die Entwicklungsbiologie dabei diejenigen Gene, die eine Kontrollfunktion bei der Individualentwicklung ausüben.

Auf welche Weise können nun solche Gene identifiziert werden? Phänotypische Veränderungen sind, sofern diese weitervererbt werden, immer auf eine Veränderung des genetischen Materials, d. h. auf eine Mutation zurückzuführen. Die Analyse phänotypisch auffälliger Mutanten sollte demnach die Identifizierung des oder der betroffenen Gene gestatten und durch den Vergleich der phänotypischen und molekularen Veränderungen Rückschlüsse auf die Funktion des betroffenen Gens ermöglichen. Erste Anhaltspunkte für die Identifizierung von wichtigen Kontrollgenen der Entwicklung wurden so z.B. durch auffällige Phänotypen der Taufliege *Drosophila melanogaster*, die aufgrund von Mutationen Abweichungen in ihrer Entwicklung zeigen, erhalten (Ingham, 1988).

Wie können aber genau die durch die Mutation betroffenen Gene im Genom aufgespürt werden? Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Wege von einem auffälligen Merkmal, also einer Mutation, zu einem Gen im Genom zu gelangen. Bei der funktionellen Klonierung („*Functional Cloning*“) (Collins, 1992) müssen zunächst Informationen über das Genprodukt oder dessen Funktion bekannt sein, so wie z.B. eine Proteinsequenz. Auf der Grundlage dieser Information kann dann die Kartierung des zugehörigen Gens durchgeführt werden. Ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung der funktionellen Klonierung ist die Identifizierung des humanen HPRT Gens (Jolly, 1982) im Zusammenhang mit dem Lesch-Nyhan-Syndrom (van der Zee, 1968). Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung dieser Strategie ist aber in jedem Fall ein Vorwissen um mögliche biochemische

Zusammenhänge bei der Ausprägung des Phänotyps, was allerdings in der Mehrzahl der Fälle als solches nicht vorliegt.

Aus diesem Grund wird viel häufiger zur funktionellen Klonierung die entgegengesetzte Strategie der positionellen Klonierung („*Positional Cloning*“) verfolgt (Meese, 1995). Dabei wird die Mutation im Genom zunächst kartiert und damit das zugehörige Gen identifiziert. Ausgangspunkt dieser Strategie ist somit eine Kartierung der Mutation bevor die Funktion des Genproduktes ermittelt werden kann. Eine grobe Lokalisierung kann mittels klassischer cytogenetischer Methoden erfolgen, bei der jedoch nur Verluste ganzer Chromosomen oder größerer Chromosomenregionen erfaßt werden können. Wesentlich genauer erfolgt dagegen die chromosomale Lokalisierung einer Mutation mit Hilfe einer Kopplungsanalyse. Voraussetzung dafür ist jedoch eine Reihe von verfügbaren Markern, die über das gesamte Genom verteilt sind und als Bezugspunkte für die zu kartierende Mutation herangezogen werden können. Dabei gilt, je größer die Anzahl der verfügbaren Marker, desto kleiner wird der die Mutation enthaltene genomische Bereich. Da die Lage der Marker in einer genetischen Karte bekannt sind, läßt sich bei Kopplung der Mutation mit den Markern diese im Genom lokalisieren. Auf diese Weise konnte z.B. die in der Maus spontan auftretende *truncate* (*tc*) Mutation auf Chromosom 6 zwischen zwei bereits bekannten Markern kartiert werden (Pavlova, 1998).

Der nächste Schritt zur Überbrückung der Informationslücke zwischen den genetischen Markern und dem Kandidatengen ist das „*Chromosome Walking*“. Die „*Chromosome Walking*“-Technik beinhaltet im wesentlichen die Identifizierung überlappender genomischer Fragmente aus einer genomischen DNA-Bibliothek (Bender, 1983). Dies wird durch die Isolierung endständiger Sequenzen erreicht, die wiederum als Sonden eingesetzt werden, um überlappende Fragmente in einer entsprechenden genomischen Bibliothek zu identifizieren. Auf diese Weise können die überlappenden genomischen Fragmente zu einem Contig zusammengesetzt werden. Um die Prozedur des „*Chromosome Walking*“ und somit der physikalischen Kartierung zu beschleunigen, sind DNA-Bibliotheken mit möglichst großen genomischen Insertionen von Vorteil, wie sie z.B. in YAC („*Yeast Artificial Chromosome*“) DNA-Bibliotheken, die bis zu 1000 kb an

klonierter genomischer DNA enthalten können, zu finden sind (Burke, 1987); (Meese, 1995). Der Nachteil dieser Bibliotheken besteht jedoch in einem höheren Anteil an chimären Klonen (bis zu 50%), d. h. es können zwei oder mehr genomische DNA-Fragmente in ein einzelnes YAC subkloniert sein, die aus unterschiedlichen Bereichen des Genoms stammen (Monaco, 1994). Ein zusätzliches Problem ist, daß viele YAC-Klone instabil sind, d.h. sie neigen dazu Sequenzanteile der Insertionen zu verlieren (Kouprina, 1994). Außerdem ist die Präparation der aus Hefezellen stammenden YAC-DNA verhältnismäßig zeitaufwendig (Meese, 1995).

Alternativen zur Verwendung von YAC-Klonen stellen P1, BAC und PAC DNA-Bibliotheken dar. Die Bezeichnung P1 stammt von dem hier verwendeten Bakteriophagen P1-System (Sternberg, 1990); (Pierce, 1992). Die Abkürzung BAC steht für künstliches Bakterienchromosom („*Bacterial Artificial Chromosome*“) (Shizuya, 1992). Das PAC-System („*P1-derived Artificial Chromosome*“) ist ein vom P1 abgeleitetes artifizielles Chromosom, in dem die Eigenschaften des P1- und des BAC-Systems kombiniert wurden (Ioannou, 1994). Die genomische Insertionsgröße dieser Klone beträgt je nach Art des verwendeten Systems zwischen 85 und 100 kb für P1- sowie 100 und 300 kb für BAC- und PAC-Klone und ist somit wesentlich kleiner als die von YAC-Klonen (Meese, 1995). In methodischer Hinsicht läßt sich die Plasmid-DNA dieser genomischen Klone im Vergleich zur YAC-DNA jedoch wesentlich leichter präparieren und die geringere Insertionsgröße macht diese Klone auch unempfindlicher gegen Scherkräfte. Neben dem Aspekt der Insertionsgröße und möglichen Scherungsvorgängen während der Präparation, weist die Verwendung von P1, BAC und PAC-Klonen zusätzlichen den Vorteil gegenüber YAC-Klonen auf, daß die in den Klonen enthaltene genomische DNA in den seltensten Fällen chimär und wesentlich stabiler gegenüber Restrukturierungsvorgängen ist (Woo, 1994). In einer murinen P1-Bibliothek konnten beispielsweise nur bei 5% der enthaltenen Klone eine Chimerität nachgewiesen werden (Sternberg, 1994).

Obwohl prinzipiell nicht ausgeschlossen werden kann, daß ein nicht klonierbarer genomischer DNA-Bereich die Fortsetzung des „*Chromosome Walking*“ jederzeit erschweren bzw. unter Umständen gänzlich verhindern kann, stellt diese

Methode einen der systematischen Ansätze dar, die in der Literatur für vergleichbare Fragestellungen erfolgreich angewendet werden konnten (siehe z.B. (Horvat, 1998); (Matsuura, 1998) und (Mochizuki, 1998)). Hat man den Lokus, der das oder die für die Mutation verantwortlichen Gene enthält durch die Erstellung eines Contigs kartiert, kann nun mit Hilfe verschiedenster Strategien die Identifizierung des Kandidatengens durchgeführt werden.

Zum einen können die in den „*Chromosome Walking*“-Experimenten isolierten Sonden der genomischen Klone, dazu verwendet werden, Northern Blot Analysen durchzuführen, wobei ein positives Signal auf eine codierende Sequenz hinweisen würde. Hat man ein Transkript identifiziert, kann man die Sonde auch für Hybridisierungen von cDNA-Bibliotheken einsetzen. Eine Alternativmethode mit der ebenfalls schon Gene detektiert werden konnten ist, ganze P1-, BAC- oder PAC-Kloninsertionen direkt gegen cDNA-Bibliotheken zu hybridisieren, wobei ein Unterdrückung von Signalen, die aus repetitiven Sequenzen in der markierten Sonde stammen, notwendig ist (Kern, 1997). Eine sogenannte reverse Northern Blot Analyse, die durch Hybridisierung der genomischen Klone mit einer komplexen, d.h. aus einer kompletten cDNA-Bibliothek bestehenden Sonde, erhalten wird, könnte ebenfalls Hinweise liefern, ob und in welchem Bereich auf den genomischen Klonen codierende Sequenzen zu finden sind. Auf diese Weise konnten z.B. am *kkt* („*Kyphoscoliosis Kinked Tail*“) Lokus lokalisierte codierende Sequenzen in einem PAC-Klon nachgewiesen werden (Bialek, 2000).

In den letzten Jahren wurden in der Literatur eine Reihe von weiteren Techniken beschrieben, unter anderem die sogenannte „*cDNA Selection*“- und „*Exon Trapping*“-Technik, die speziell für die Identifizierung von Genen innerhalb genomischer Fragmente entwickelt wurden. Bei der „*cDNA Selection*“-Technik wird ein genomisches Fragment, das Teile oder ein komplettes Kandidatengen enthält, mit einer komplexen cDNA-Bibliothek hybridisiert (Lovett, 1991); (Korn, 1992). Die Voraussetzung dafür ist jedoch die Präsenz der zugehörigen cDNA in der für die Hybridisierung verwendeten cDNA-Bibliothek. Wird beispielsweise ein Gen nur in wenigen Zelltypen oder nur innerhalb eines kurzen Zeitabschnitts exprimiert, kann die zugehörige cDNA in der Bibliothek unter Umständen nicht detektiert werden. In der Literatur lassen sich viele Beispiele für die mit Hilfe dieser Technik klo-

nierten Gene finden (siehe (Zhao, 1997); (Guimera, 1997); (Akiyama, 1997); (Goldwurm, 1997); (Trachtulec, 1997)).

Eine methodische Alternative zur „*cDNA-Selection*“ stellt das „*Exon Trapping*“ dar, das den Spleißvorgang eukaryotischer Zellen für die Detektion ‘interner’ Exons, d.h. Exons mit einer Spleißdonor und -akzeptor Stelle, ausnutzt (Auch, 1990); (Duyk, 1990); (Buckler, 1991); (Hamaguchi, 1992). Nicht detektierbar sind mit diesem Verfahren somit Gene, die lediglich aus zwei Exons bestehen. Allerdings beträgt deren Anteil im Vertebratengenome nur etwa 10% (Lewin, 1994). Ein genereller Vorteil der „*Exon-Trapping*“ Methode ist, daß Gene unabhängig vom Transkriptionsstatus detektiert werden können. Nachteilig dagegen wirken sich kryptische Spleißstellen in genomischen Fragmenten aus, die durch diese Methode erkannt werden und so zur Detektion von nicht kodierende Sequenzen beinhaltende ‘Pseudoexons’ führen können. Trotzdem arbeitet die Methode relativ genau. Eine entsprechende Untersuchung unter Verwendung des gesamten Mausgenoms zeigte, daß 62% der erhaltenen Exons tatsächlich exprimierte Sequenzen darstellen (Nehls, 1994).

Eine weitere Methode der Genidentifizierung in genomischen Fragmenten beruht auf der im Rahmen der Genomprojekte immer größer werdenden Sammlung von Sequenzdaten. Ziel dieser Projekte ist unter anderem der Erhalt der vollständigen genomischen Sequenz verschiedener Organismen, wie z.B. die von Mensch und Maus, die wahrscheinlich in wenigen Jahren abgeschlossen sein wird. Nach dem Erhalt der genomischen Sequenz ist es möglich, unter Verwendung computerbasierter Analysen, mit deren Hilfe z.B. Exon-Intron Übergänge oder Promotoren identifiziert werden können, Hinweise auf die Präsenz von Genen zu bekommen. Eines der bekanntesten Programme, die für solche Analysen verwendet werden kann, ist das Programm GRAIL (Uberbacher, 1996), welches Exons auf verschiedene Weise versucht zu identifizieren und alle Ergebnisse zu einer Prognose zusammenfasst. Desweiteren werden im Rahmen dieser Projekte auch Kartierungen durchgeführt, in denen die genomische Lokalisierung von bereits bekannten Genen und von sogenannten EST-Klonen („*Expressed Sequence Tags*“), die ansequenzierte cDNAs darstellen, vorgenommen wird. Noch bevor die aufwendige Suche nach unbekanntem Genen in einer Region aufgenommen wird,

kann möglicherweise also die Analyse entsprechender 'Kandidaten-cDNAs' bereits zum Kandidatengen führen.

Nach der Identifizierung von einem oder mehreren Kandidatengenen in der durch die Mutation betroffenen DNA-Region können nun unter Verwendung des jeweiligen Tiermodells funktionelle Analysen dieser Gene durchgeführt werden. Aufgrund der in den letzten Jahren erzielten Fortschritte, die hinsichtlich der Möglichkeiten der genetischen Manipulation von Mäusen erzielt werden konnten, bieten sich die Maus als ideales Modellsystem für entwicklungsbiologische und krankheitsassoziierte Studien auf Säugetierebene an.

So kann z.B. durch die Erzeugung transgener Tiere mittels Injektion von DNA in den Pronukleus, die Auswirkung einer Fehlexpression oder Überexpression („*gain-of-function*“) eines Gens, welches auch in mutierter Form eingesetzt werden kann, untersucht werden (Hogan, 1994). Ein Beispiel stellt die Etablierung einer transgenen Mauslinie dar, bei der als Transgen ein YAC injiziert wurde, das die gesamte genomische Region mit den Genen für das „*Amyloid Precursor Protein*“ (APP) sowie „*Presenilin*“ (PS1) enthielt, wodurch ein Mausmodell für die familiär bedingte Alzheimer Krankheit entwickelt werden konnte (Lamb, 1999). Dieses Mausmodell bietet somit die Möglichkeit, die Funktion dieser Gene bei der Entstehung der Krankheit zu untersuchen und neue Therapieansätze zu entwickeln.

Darüberhinaus stellt die Maus das einzige Säugetier dar, an dem gezielt Manipulationen am Genom vorgenommen werden können, indem zielgerichtet Genmutationen eingefügt werden können. Dazu wird diese zunächst durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht. Diese manipulierten ES-Zellen können nach Injektion in Blastozysten potentiell bei der Ausbildung jeglicher Gewebe im Organismus der Maus teilhaben (Joyner, 1993). Die zielgerichtete Mutagenese in der Maus wurde so auch für entwicklungsbiologische Fragestellungen eingesetzt. Zum Beispiel konnte in einem „*loss-of-function*“-Experiment durch die gezielte Inaktivierung von *Hoxd13*, einem Mitglied der Homeodomänen Familie von Transkriptionsfaktoren, gezeigt werden, daß dieses Gen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Skeletts spielt. Eine

homozygote Null-Mutation von *Hoxd13* in der Maus verursacht Skelettanomalien entlang der gesamten Körperachse, einen Verlust von Zehengliedern, Knochenfusionen und Duplikationen in den Extremitäten (Dolbe, 1993). Bei dieser Strategie der Geninaktivierung wurde das zu untersuchende Gen in jeder Zelle des Organismus ausgeschaltet. Mittlerweile existieren Verfahren, die sogar eine steuerbare Variation der genotypischen Veränderungen erlauben. Mit Hilfe des Cre/loxP-Systems beispielsweise können konditionale Geninaktivierungen in spezifischen Zelltypen vorgenommen werden (Gu, 1993). Durch die mittels homologer Rekombination erreichte Einfügung von sogenannten *loxP*-Stellen auf einem Chromosom und der Expression eines Enzyms, der Cre Rekombinase, können die genomischen Bereiche zwischen zwei *loxP*-Stellen entfernt werden. Die gewünschte Genmutation kann somit mit Hilfe eines für das Cre Gen gewebespezifischen Promotors in der gewünschten Zellpopulation eingebracht werden. Sollen größere chromosomale Regionen untersucht werden, besteht die Möglichkeit auch größere Deletionen mit diesem System zu generieren, indem beide *loxP* Stellen in zwei verschiedenen Chromosomen eingebracht werden. Durch interchromosomale Rearrangements kann auf einem Chromosom eine Deletion entstehen, während auf dem anderen Chromosom eine Duplikation der genomischen DNA erfolgen kann (Medberry, 1995); (Smith, 1995).

Die Maus weist nicht nur aufgrund der technisch durchführbaren Manipulationen, sondern aufgrund der Existenz einer Vielzahl von Inzuchtstämmen entscheidende Vorteile gegenüber anderen Modellorganismen auf. Bei einem Inzuchtstamm liegen aufgrund der fortwährenden Kreuzung von Geschwistertieren über mindestens 20 Generationen hin alle genetischen Loci, mit Ausnahme der spontan auftretenden Mutationen, in homozygoter Form vor (Hogan, 1994). Da der genetische Hintergrund die phänotypische Ausprägung einer Mutation beeinflussen kann (Miklos, 1996), eignen sich Inzuchtstämme, die einen definierten weitgehend konstanten genetischen Hintergrund aufweisen, für die Analysen von Mutationen am besten.

Das Potential der Maus als Säugetiermodellsystem hat zusätzlich von der in den letzten Jahren vorangetriebenen Kartierung des Mausgenoms profitiert. Mit Hilfe

von interspezifischen Kreuzungen zweier entfernt verwandter Mausstämme und der Verwendung einer Reihe von Markern konnten genetische Karten mit einer Auflösung von bis zu 0,2 cM erstellt werden (Dietrich, 1996). Genetische Karten ermöglichen die chromosomale Lokalisierung von Mutationen sowie klonierter Gene und stellen damit eine Voraussetzung für die nachfolgende molekulare Analyse von Mutanten dar. Außerdem liefern genetische Karten ein Gerüst für die Erstellung physikalischer Karten, die aus Contigs, d.h. überlappenden Klonen zusammengesetzt werden (Copeland, 1993). Im Gegensatz zu den genetischen Karten, in denen der Abstand zweier Loci mit Hilfe von Rekombinationswahrscheinlichkeiten angegeben wird, beziehen sich physikalische Genomkarten auf tatsächlich vorliegende in Basenpaaren angegebene Abstände. Mittlerweile ist eine auf YACs basierende physikalische Karte des Mausgenoms publiziert (Nusbaum, 1999). Der durchschnittliche Abstand der für diese Karte verwendeten Marker beträgt nur noch 300 kb und ist somit eine wertvolle Unterstützung für die positionelle Klonierung von Genen sowie der Sequenzierung des gesamten Genoms der Maus. Wie oben erwähnt wurde, wird das Genom der Maus zur Zeit, wie auch die Genome weiterer Modellorganismen (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* etc.) und dem menschlichem Genom im Rahmen des Humanen Genom Projekts sequenziert (Primrose, 1996). Mit der erhaltenen kompletten Sequenz des Genoms der Maus, die wahrscheinlich in wenigen Jahren zu erwarten ist, wird die Identifizierung von Mutationen, assoziierter Gene und als Resultat die zugehörige Funktionsanalyse in Organismen erheblich vereinfacht. Darüberhinaus können die erhaltenen Sequenzen dazu beitragen auch komplexere Merkmale, die sich über mehrer Loci im Genom verteilen, untersuchen zu können.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt bieten allerdings Mutationen der Maus einen Anhaltspunkt, der für die Funktionsanalysen von Genen in systematischer Weise genutzt werden kann. Während künstlich im Genom, wie z.B. durch mutagene Substanzen oder Röntgenstrahlung hervorgerufene Mutationen (Übersicht bei (Doolittle, 1996)) jedoch weniger für eine spätere molekulare Analyse geeignet sind, da sich die Lokalisierungen der Mutation im komplexen Genom der Maus als schwierig erweisen kann, was im besonderen zutrifft, wenn mehrere Gene an

verschiedenen Locus betroffen sind, kann die Identifizierung eines durch insertionelle Mutagenese unter Verwendung von transgener DNA mutierten Locus wesentlich leichter erfolgen. Ein Mutationsereignis als Folge einer Transgenintegration tritt sehr häufig bei der Generierung von transgenen Mäusen auf (Rijkers, 1994); (Woychik, 1998). Wird nämlich durch die Integration die Funktion eines endogenen Gens ausgeschaltet, kann dies einen mutierten Phänotyp verursachen. Der Ort des Mutationsereignisses liegt dann durch das Transgen quasi markiert vor und kann daher vergleichsweise leichter identifiziert werden. Ein wichtiger Aspekt, der im Zusammenhang mit der insertionellen Mutagenese zu beachten ist, stellt der notwendige Nachweis einer 100%igen Korrelation zwischen dem auftretenden Phänotyp und der Integration des Transgens dar. Dabei muß unterschieden werden, ob die Expression des Transgens oder der Verlust der Funktion eines endogenen Gens für die Ausbildung des Phänotyps verantwortlich ist. Mit Hilfe von insertioneller Mutagenese konnten bis heute eine Reihe von Mutanten erzeugt werden, wie z.B. die Mausmutation *kkt* („*Kyphoskoliosis Kinked Tail*“), bei der durch die Integration eines Transgens auf Chromosom 2 Defekte bei der Entwicklung der Wirbelsäule erhalten werden (Bialek, 2000). Eine weitere durch insertionelle Mutagenese entstandene Mutante, bei der eine 20 kb große Deletion als Folge der Insertion entstand, stellt ein neues Allel des bereits bekannten *Fused* Locus dar (Perry, 1995).

2.1 Die *Fused toes (Ft)* Mausmutation

2.1.1 Der Phänotyp der *Ft* Mutante

Die in dieser Arbeit untersuchte Mausmutation *Fused toes (Ft)* ist ebenfalls das Produkt einer insertionellen Mutagenese durch ein Transgen. Entdeckt wurde die *Ft* Mutation durch ein auffälliges Merkmal an den vorderen Extremitäten. Die Mäuse zeigten eine partielle Syndaktylie, d. h. eine Verschmelzung der Zehenspitzen 1 bis 3 oder auch 1 bis 4. Eine Fusion der 4. und 5. Zehe konnte dagegen niemals beobachtet werden (van der Hoeven, 1994). Nach mehrmaligen Rückkreuzungen der ursprünglichen *Ft* Mäuse (F_2 (C57BL/6xSJL)) auf einen reinen

C57BL/6-Hintergrund konnte an den hinteren Extremitäten ebenfalls eine Fusion der Zehen beobachtet werden, die sich jedoch nur auf das Zwischengewebe der mittleren drei Zehen beschränkt. Im Gegensatz zu den Vorderextremitäten wurde hier keine Verschmelzung der Knochen beobachtet (eigene Beobachtung). Bei der Entwicklung der Extremitäten findet die Ausbildung der Finger am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung statt. Der Prozeß geht mit einem kontrolliertem Absterben des Zwischenzehengewebes einher und wird bei heterozygoten *Ft* Mäusen nur zwischen der 4. und 5. Zehe beobachtet (van der Hoeven, 1994). Weitere Untersuchungen mit verschiedenen molekularen Markern zeigten, daß die generelle Musterbildung bei der Entwicklung der Extremitäten in *Ft* Mäusen nicht beeinflusst wird (Heymer, 1999).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal heterozygoter *Ft* Mäuse ist die Präsenz eines im Vergleich zum Wildtyp vergrößerten Thymus. Das Wachstum des Thymus erfolgt unter normalen Umständen bis zu einem Alter von sechs Wochen. In heterozygoten *Ft* Mutanten wächst der Thymus jedoch nach den ersten sechs Wochen kontinuierlich weiter, was zu einer erheblichen Vergrößerung des Thymus, der sogenannten Thymushyperplasie führt. Experimente, die zur Aufklärung der Hyperplasie durchgeführt wurden, zeigten, daß auch in diesem Organ wie in den Extremitäten, der Prozeß des programmierten Zelltods gestört ist (van der Hoeven, 1994); (Volkman, 1996). Zusätzlich zur der Vergrößerung des Thymus wurde in einigen Fällen auch eine Vergrößerung der Milz beobachtet (Volkman, 1996). Die heterozygoten *Ft* Mäuse sterben letztendlich nach etwa 8 bis 10 Monaten als Folge einer vom Thymus verursachten Beeinträchtigung der Lungenfunktion. Abgesehen von der beschriebenen Fusion der Zehen und der Thymushyperplasie konnten bisher keine weiteren Veränderungen in heterozygoten *Ft* Mäusen festgestellt werden.

Homozygote *Ft* Mäuse weisen im Vergleich zu heterozygoten *Ft* Mäusen einen veränderten Phänotyp auf und sind aufgrund massiver Entwicklungsstörungen nicht lebensfähig. Abhängig vom genetischen Hintergrund sterben sie etwa in der Mitte der Embryonalentwicklung zwischen Tag 9,5 und Tag 14,5 p.c. Vergleicht man *Ft/Ft* Embryonen mit gleichaltrigen Wildtyp Embryonen, so kann zusätzlich

eine Reduktion der Größe beobachtet werden. Ein weiteres Merkmal des homozygoten Phänotyps ist eine abnormale Ausbildung des Kopf- und Gesichtsbereichs, der insgesamt einer starken Variabilität unterliegt. Neben Deformationen des Vorder- und Mittelhirnbereichs tritt auch das völlige Fehlen dieser Gehirnstrukturen auf. Teilweise kann sich der Kopfbereich auch als annähernd normal entwickelt darstellen (siehe Abschnitt 4.4.4, Seite 95, Abbildung 25).

Während der Entwicklung bei Nagetieren findet eine Drehung des Embryos statt, bei dem dieser sich in seine Embryonalhüllen einwickelt. Die Drehung hat zur Folge, daß sich der Schwanz bei Wildtyp Mäusen immer auf der rechten Seite des Embryos befindet. Bei der Isolierung homozygoter *Ft* Embryonen fiel auf, daß in etwa 50% der Fälle die Lage des Schwanzes auf der entgegengesetzten Seite im Vergleich zum Wildtyp zu finden war (van der Hoeven, 1994). Dieses Auftreten des Schwanzes auf der linken Seite deutet auf einen Verlust der Kontrolle der Rechts-links-Asymmetrie hin, welche durch eine Expressionsanalyse von asymmetrisch exprimierten molekularen Markern bestätigt werden konnte. Die beiden Gene *nodal* und *lefty*, normalerweise nur auf der linken Seite des lateralen Plattenmesoderms exprimiert, zeigen in homozygoten *Ft* Embryonen ein bilaterales Expressionsmuster (Heymer, 1997).

Weitere phänotypischen Veränderungen homozygoter *Ft* Embryonen konnten in den Extremitätsknospen beobachtet werden. Embryonen, die sich über Tag 11,5 p.c. hinaus entwickeln, zeigen eine Verbreiterung der gesamten Extremität mit einer Verdickung des Gewebes im distalen Bereich (Heymer, persönliche Mitteilung). Diese Verdickung des Gewebes kann an den vorderen und hinteren Extremitätenknospen beobachtet werden. Zu Beginn der Arbeit zeigten Knochen und Knorpelfärbungen, daß trotz einer Verbreiterung der Extremitätenknospe keine zusätzlichen Kondensationsregionen, in denen die Finger gebildet werden, erkennbar waren (Heymer, persönliche Mitteilung). Auf dieses besondere phänotypische Merkmal wird im Ergebnissteil dieser Arbeit unter 4.5 noch näher eingegangen.

Zusammengefasst zeigt die *Fused toes* Mutante Störungen bei einer Reihe von entwicklungsbiologisch relevanten Prozessen, wie z. B. den programmierten

Zelltod, die Entwicklung der Extremitäten, der Entwicklung craniofacialer Strukturen und der Ausbildung der Rechts-links-Asymmetrie. Diese Vielzahl von phänotypischen Veränderungen lassen vermuten, daß in der *Ft* Mutante ein Gen mit übergeordneten Kontrollfunktionen oder unterschiedlichen Wirkungsbereichen betroffen ist. Alternativ könnte auch die Funktion mehrere verschiedener Gene durch die Mutation beeinträchtigt sein. Somit kann die Analyse der *Ft* Mutation einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der Funktion potentiell entwicklungsbiologisch wichtiger Gene leisten.

2.1.2 Die Organisation des *Fused toes* Lokus zu Beginn der Arbeit

Die durch insertionelle Mutagenese entstandene *Fused toes* Mausmutante wurde durch die Injektion eines Transgen generiert. Das Transgen, welches das humane *Ha-ras* Gen unter der Kontrolle des humanen β -Interferonpromotors enthält, ist in *Ft* Mäusen nicht exprimiert und ist deshalb an der Ausprägung des Phänotyps nicht beteiligt (van der Hoeven, 1994).

Um die molekularen Veränderungen in der *Ft* Mutation näher charakterisieren zu können, wurde versucht, die Integrationsstelle des Transgens innerhalb des genomischen Kontext zu klonieren. Dazu wurde mit einer für das Transgen spezifischen Sonde, dem β -Interferonpromotor, zunächst eine aus heterozygoten *Ft* Mäusen generierte DNA-Bibliothek hybridisiert und ein positiver Klon identifiziert. Um die chromosomale Lokalisierung der Mutation zu bestimmen, wurde mit dem 250 bp großen genomischen Anteils dieses Klons eine in situ Hybridisierung auf Metaphasenchromosomen durchgeführt und spezifische Signale in der D Region von Chromosom 8 erhalten (van der Hoeven, 1994). Das 250 bp Fragment wurde außerdem dazu verwendet, aus einer Wt DNA-Bibliothek einen Cosmid Klon (Cos-5) zu identifizieren, der 36 kb der genomischen Sequenz der Präintegrationsstelle des Transgens beinhaltet. Southern-Blot Analysen mit nicht repetitiven Subfragmenten aus Cos-5 zeigten, daß der *Ft* Lokus nicht nur durch die Transgenintegration charakterisiert ist, sondern als Folge dieser Integration auch eine Deletion benachbarter genomischer Sequenzen stattgefunden hatte.

Erste Analysen zur Identifizierung von Genen am *Fused toes* Lokus führten zu der Isolierung des *Ft1* Gens (Lesche, 1997), welches durch die *Ft* Mutation fast voll-

ständig deletiert ist. Northern-Blot Analysen zeigten eine Reduktion der Expression um 50% in Bezug auf das *Ft1* Gen in heterozygoten und einen Verlust der Expression von *Ft1* in homozygoten *Ft* Mäusen (Lesche, 1997). Die *Ft* Mutation hat also eine Inaktivierung des *Ft1* Gens bewirkt. Um die Funktion des *Ft1* Gens im Zusammenhang mit dem Phänotyp der *Ft* Mutante zu untersuchen, wurde das Gen in einem sogenannten „knock out“-Experiment gezielt inaktiviert. Dabei konnte gezeigt werden, daß weder der heterozygote noch der homozygote Phänotyp der *Ft* Mutante mit der Funktionalität des *Ft1* Gens korreliert (Lesche, 1997). Dieses Ergebniss wurde durch ein komplementäres Experiment unterstützt, in dem *Ft1*-transgene Mäuse erzeugt und diese mit *Ft* Mäusen gekreuzt wurden. Obwohl eine Transgenexpression nachgewiesen werden konnte, war keine Beeinflussung des *Ft* Phänotyps festzustellen (Lesche, 1997). Obwohl die gezielte Inaktivierung des *Ft1* Gens keine Konsequenz auf die Ausprägung des *Fused toes* Phänotyp hatte, kann nicht ausgeschlossen werden, daß zusammen mit anderen in der *Ft* Mutation deletierten Genen, die Deletion von *Ft1* mit an der Ausprägung des *Fused toes* Phänotyps beteiligt ist.

In direkter Nachbarschaft des *Ft1* Gens konnte ein weiteres Gen, das mit dem Retinoblastom verwandte *p130* Gen, identifiziert werden (Peetz, 1997). Das 3' Ende der transkribierten *p130* Sequenz liegt ca. 1 kb von der Transgenintegrationsstelle entfernt und erfährt durch die Transgenintegration keine Strukturveränderung. Analysen die einen Zusammenhang zwischen diesem Gen und der *Ft* Mutante klären sollten, zeigten entsprechend, daß der *Fused toes* Phänotyp unabhängig vom *p130* Gen war.

Die in der *Ft* Mutation durch die Transgenintegration entstandene Deletion wurde wie oben beschrieben zunächst mit DNA-Sonden, die aus dem erwähnten Cosmid Cos-5 isoliert wurden, näher analysiert. So konnte gezeigt werden, daß unter Verwendung von Sonde 1 (siehe Abbildung 1) ein für die *Ft* Mutation spezifischer Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) detektiert werden kann, wohingegen Sonde 2 (siehe Abbildung 1) kein Signal auf genomischer *Ft/Ft* DNA erzeugen kann (van der Hoeven, 1994).

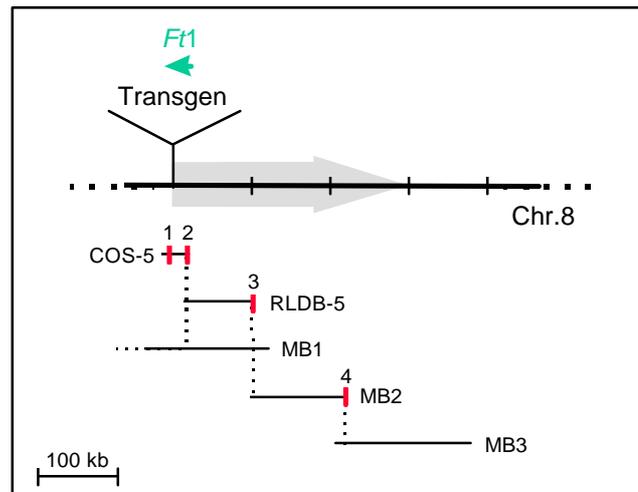


Abbildung 1: Übersicht über den Fused toes Lokus auf Chromosom 8. Dargestellt ist die Präintegrationsstelle des Transgen und die daran angrenzende DNA-Region, die durch die Mutation deletiert wurde (grau unterlegt). Auf den isolierten genomischen Klonen (schwarze Linien) sind in rot genomische Sonden (1: HPP500, 2: BH600, 3: TN1800, 4: KX1200) eingezeichnet. Grün dargestellt ist das durch die Ft Mutation fast vollständig deletierte Ft1 Gen.

Ausgehend von Sonde 2 wurden „Chromosome Walking“-Experimente durchgeführt und verschiedene überlappende Klone aus genomischen DNA-Bibliotheken isoliert, die zusammengenommen fast 400 kb an genomischer DNA abdeckten (Ausmeier, 1997). Da zu diesem Zeitpunkt die Isolierung der beiden terminalen Fragmente aus MB3 noch ausstand, konnte die als gesicherte minimale Ausdehnung der Deletion in diesem Stadium nur mit ca. 200 kb angegeben werden.

2.2 Aufgabenstellung

Die Aufgabe, die in der vorliegenden Dissertationsarbeit bearbeitet werden sollte, beinhaltete primär die vollständige Kartierung des *Ft* Locus. Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, wurde die Lokalisierung des *Ft* Locus auf Chromosom 8 in der D Region mittels in situ Hybridisierung auf Metaphasen Chromosomen unter Verwendung einer *Ft* spezifischen genomischen Sonde bestimmt (van der Hoeven, 1994). Diese Art der Kartierung ist jedoch sehr ungenau, da die D Region ca. 1/6 des gesamten Chromosoms 8 abdeckt (1999 Chromosome Committee Report) was bei einer Gesamtgröße von etwa. 149,1 Mb (Nusbaum, 1999) etwa 25 Mb entspricht. Eine im Vergleich zur in situ Hybridisierung genauere Kartierung kann durch die Verwendung genetischer Karten anhand bereits identifizierter genomischer Marker erreicht werden. Dadurch sollte eine genauere Auskunft über die Lokalisierung der *Ft* Mutation möglich werden. Darüberhinaus sollte es möglich sein, anhand der genomischen Marker die Ausmaße der durch die Insertion verursachten Deletion grob abzuschätzen. Ein weiterer Vorteil dieser Kartierung ist die Möglichkeit, in der Nachbarschaft liegende bereits bekannte Gene, die durch die Deletion betroffen sind, zu identifizieren, da diese direkt auf ihre Anwesenheit im *Ft* Genom hin untersucht werden können.

Im Anschluß an die genetische sollte dann eine physikalische Kartierung des *Ft* Locus durchgeführt werden. Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt waren zu Beginn der Arbeit bereits 400 kb an genomischer DNA kloniert (siehe Abbildung 1) und die Ausdehnung der Deletion auf eine Größe von mindestens 200 kb abgeschätzt. Die Aufgabe bestand nun zunächst darin festzustellen, ob mit dem klonierten DNA-Bereich von 400 kb eventuell bereits die gesamte deletierte Region abgedeckt wurde oder ob mit Hilfe von „*Chromosome Walking*“-Experimenten weitere genomische Klone aus DNA-Bibliotheken isoliert werden mußten, um zum einen die Ausdehnung der Deletion festzustellen und zum anderen eine vollständige physikalische Karte der in der *Ft* Mutation deletierten Region erstellen zu können. Zusätzlich sollten durch die Mutation betroffene Gene identifiziert werden. Daher sollten z.B. mit Hilfe der sogenannten „*Exon Trapping*“-Technik

(Auch, 1990); (Buckler, 1991); (Hamaguchi, 1992); (Church, 1994) versucht werden, Exons in den am *Ft* Locus identifizierten genomischen Fragmenten zu dektieren.

Da die Identifizierung eines oder mehrere in der *Ft* Mutation deletierter Gene sofort die Frage aufwirft, ob diese Gene bei der Ausprägung des Phänotyps eine Rolle spielen, sollte beispielhaft anhand eines der bei der Kartierung identifizierten Gens eine funktionelle Analyse durchgeführt werden. Dazu sollte in einem „Rescue“-Experiment eine transgene Maus hergestellt werden, die eines der vom *Ft* Locus identifizierten Gene in Form eines Transgens beinhaltet. Diese transgenen Mäuse sollten dann mit *Ft* Mäusen gekreuzt werden, um das zu analysierende Gen in die Mutante zurückzuführen und auf diese Weise analysieren zu können, ob der Wildtyp Phänotyp ganz bzw. teilweise durch dieses Gen wiederhergestellt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht gesondert aufgelistet, wurden im Rahmen dieser Arbeit Chemikalien von der Firma Merck, AppliChem GmbH, Riedel de Haën und Roche Diagnostics GmbH (Boehringer Mannheim) mit den Reinheitsgraden „p. A.“ verwendet. Darüberhinaus wurden weitere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Buchler	[α - ³² P] dCTP
Appligene	„ <i>Low melting point</i> “ Agarose
Dupont	GeneScreen
Fluka	N-Lauroylsarcosin Natriumsalz (Sarcosyl)
Fuji Photo Film Co., LTD.	Fujifilm Imaging Plate für Bio Imaging Analyzer
Gibco BRL	Trypsin/EDTA, Agarose, HEPES, DMEM, L-Glutamin, Penizillin/Streptomycin, M2-Medium, T4 DNA-Ligase
Kodak	Kodak X-OMAT AR
New England BioLabs Inc.	Yeast Chromosome PFG Marker, Lambda Ladder PFG Marker
Schleicher & Schuell	Sterilfilter, Watmanpapier
Sigma, St.Louis, USA	DMSO, DEPC, Hyaluronidase, hCG, PMS, Mineralöl, Nonidet P-40
Stratagene	Prime-It [®] II Random Primer Labeling Kit, RNase Inhibitor, λ Hind III, ϕ X174 Hae III, 1 kb Leiter

3.2 Lösungen und Puffer

AP-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris-HCl, pH 9,5 0,01% Tween-20
Auftragspuffer	50% Glycerin 0,2% (w/v) Orange G in TAE-Puffer

„Blocking Solution“	10% „Blocking Reagent“ (Roche Diagnostics GmbH) in MAB autoklavieren 0,1% Tween-20, bei -20°C lagern
CaCl ₂ -Lösung	60 mM CaCl ₂ 15% Glycerin 10 mM PIPES, pH 7,0
Church-Puffer	250 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, pH 7,2 7% (w/v) SDS 1 mM EDTA, pH 8,0
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
DEPC-behandeltes H ₂ O	50 µl DEPC auf 500 ml bidest. H ₂ O Inkubation bei RT über Nacht, autoklavieren
dNTP-Mischung	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
GTE	50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8,0 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Hebs (2x)	274 mM NaCl 42 mM HEPES 9,6 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,1
Heparin	100 mg/ml in 4x SSC, pH 7,0
HEPES	6,7 mM KCl 142 mM NaCl 10 mM HEPES, pH 7,3
Hybridisierungspuffer (für in situ Hybridisierungen)	50% Formamid 5x SSC, pH 7,0 0,05% Heparin 0,1% Tween-20

Injektionspuffer (Schedl, 1993)	mit 1 M Zitronensäure auf pH 6,0 einstellen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1 mM EDTA 100 mM NaCl 30 μ M Spermin 70 μ M Spermidin durch 0,2 μ m sterilfiltrieren, bei 4°C lagern
Lösung1	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100 μ g/ml RNase A, bei 4°C lagern
Lösung 2	200 mM NaOH, 1% SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Lösung 4	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol 0,15% Triton [®] X-100
Lösung 5	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol
Lösung 6	1,25 M NaCl 50 mM Tris-Cl, pH 8,5 15% Isopropanol
Lösung D	4 M Guanidinthiocyanat 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0 100 mM β -Mercaptoethanol 0,5% (w/v) Sarcosyl 0,1% Antifoam A
L-Puffer	0,1 M EDTA, pH 8,0 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6 0,02 M NaCl
Lysepuffer	100 mM EDTA 100 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

MAB	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl mit NaOH-Plätzchen auf pH 7,5 einstellen
MABT	MAB mit 0,1% Tween-20
PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1,45 mM KH ₂ HPO ₄ pH 7,2 ohne Einstellung, autoklavieren
PBT	0,1% Tween-20 in PBS
PFA/Glutaraldehyd	4% PFA in PBS 0,2% Glutaraldehyd mit konz. HCl pH 6-7 einstellen, frisch ansetzen
PFA	4% Paraformaldehyd in PBS
RIPA	0,05 % SDS 0,15 M NaCl 1% Nonidet P-40 0,5 % Desoxycholinsäure 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit DEPC-behandeltem H ₂ O ansetzen
RNase-Puffer	0,5 M NaCl 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5 0,001% Tween-20
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat x 2H ₂ O mit konz. HCl auf pH 7,0 einstellen autoklavieren
SSC/Formamid-Puffer	2x SSC, pH 7,0 50% Formamid 0,001% Tween-20
TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0

TBE-Puffer (5x)	445 mM Borsäure 446 mM Tris-Base 0,01 M EDTA
TBST (10x)	1,37 M NaCl 0,03 M KCl 0,25 M Tris-HCl, pH 7,5 1% Tween-20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
Waschpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, pH 7,2 1% (w/v) SDS

3.3 Nährmedien und Antibiotika

Ampizillin-Stammlösung	100 mg/ml in 70% Äthanol
Chloramphenikol-Stammlösung	12,5 mg/ml in 50% Äthanol
DMEM	1x DMEM („Dulbeco's Modified Eagle Medium“) 10% FCS, hitzeinaktiviert 20 mM L-Glutamin 100 U/ml Penizillin 100 mg/ml Streptomycin
Einfriermedium	10% DMSO in 100% FCS, hitzeinaktiviert
Kanamycin-Stammlösung	25 mg/ml in H ₂ O
LB-Agar	LB-Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar autoklaviert
LB-Medium	1% (w/v) NaCl 1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt autoklaviert

3.4 DNA-Bibliotheken

Eine DNA-Bibliothek ist eine Sammlung klonierter DNA-Fragmente, die zusammengenommen das gesamte Genom eines Organismus oder die Gesamtheit der exprimierten Gene eines Gewebes oder Entwicklungsstadiums repräsentieren. In dieser Arbeit wurden eine P1, eine BAC und eine PAC DNA-Bibliothek, sowie eine Hoden spezifische cDNA-Bibliothek verwendet.

3.4.1 P1 DNA-Bibliothek

Die in dieser Arbeit verwendete P1 DNA-Bibliothek (RZPD No. 703) wurde von Fiona Francis (Francis, 1994) konstruiert und vom Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genom Projekts, Heubnerweg 6, 14059 Berlin (Internet:<http://www.rzpd.de>) zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung der Bibliothek wurde genomische DNA von Mäusen des Stammes C57BL/6 mit dem Restriktionsenzym *Mbo* I partiell verdaut und in die *Bam*H I-Klonierungsstelle des P1-Vektors pAD10SacBII eingebracht. Der P1-Vektor hat eine Länge von ca. 16 kb und enthält neben einer multiplen Klonierungsstelle ein Gen für eine Antibiotikum-Resistenz gegen Kanamycin. Die so klonierten genomischen Fragmente haben eine durchschnittliche Länge von 75-100 kb. Das Plasmid wird mit einer geringen Kopienzahl vermehrt, kann aber durch Induktion des lytischen P1-Operons mit IPTG amplifiziert werden.

Die Klone der Bibliothek wurden maschinell auf 22 cm x 22 cm große Nylonmembranen aufgebracht. Auf jedem der 7 Filter befinden sich 18432 verschiedene Klone, die in 48 x 48 Blöcken zu je 16 Klonen aufgebracht sind. Jeder Klon ist zweimal auf dem Filter vorhanden. Das Durchsuchen dieser Bibliothek erfolgte über eine Hybridisierung mit einer Sonde und wird unter Punkt 3.8.2 beschrieben. Die erhaltenen positiven Klone wurden beim Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genom Projekt bezogen. Geliefert wurden die Klone als *E.coli* (NS3516)-Stechagarkultur. Die Bakterien wurden auf einer kanamycinhaltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufarbeitung einer so vereinzelt Bakterienkolonie mit dem darin enthaltenen P1-Klon ist unter Punkt 3.5.1 beschrieben.

3.4.2 BAC DNA-Bibliothek

Die in dieser Arbeit verwendete BAC DNA-Bibliothek (#BAC-4921) wurde bei der Firma Genome Systems, INC., 8620 Pennell drive, St. Louis, Missouri 63114 U.S.A. bezogen. Die für diese Bibliothek verwendete genomische DNA stammt von embryonalen Stammzellen des Mäusestammes 129Svj. Nach einer partiellen Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Hind* III wurde die DNA in die *Hind* III-Klonierungsstelle des BAC-Vektors pBeloBAC11 eingebracht. Der BAC-Vektor hat eine Länge von 7,35 kb und enthält neben einer multiplen Klonierungsstelle ein Gen für eine Antibiotikum-Resistenz gegen Chloramphenicol. Das Plasmid läßt sich im Gegensatz zum P1 Plasmid nicht in der Wirtszelle amplifizieren. Die klonierten genomischen Fragmente haben eine durchschnittliche Länge von 50-240 kb mit einem hohen Grad an Stabilität (Woo, 1994).

Auch hier wurden die Klone maschinell auf 22 cm x 22 cm große Nylonmembranen aufgebracht. Die Bibliothek umfasst jedoch nur 5 Filter. Auf jedem Filter wurden wieder 48 x 48 Blöcken zu je 16 Klonen aufgebracht, wobei jeder Klon zweimal vorhanden ist. Das Durchsuchen dieser Bibliothek erfolgte über eine Hybridisierung mit einer Sonde und wird unter Punkt 3.8.2 beschrieben. Die erhaltenen positiven Klone wurden bei der Firma Genome Systems, Inc., bezogen. Geliefert wurden die BAC-Klone als *E. coli* (DH10B)-Stechagarkulturen. Die Bakterien wurden auf einer chloramphenikolhaltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Aufarbeitung einer so vereinzelt Bakterienkolonie mit dem darin enthaltenen BAC-Klon ist unter Punkt 3.5.1 beschrieben.

3.4.3 PAC DNA-Bibliothek

Die in dieser Arbeit verwendete PAC DNA-Bibliothek (RZPD No. 711 oder RPCI 21) wurde von Kazutoyo Osoeagawa und Pieter de Jong (Roswell Park Cancer Institut) konstruiert und wie die P1 DNA-Bibliothek vom Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genom Projekts zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung der Bibliothek wurde genomische DNA von Mäusen des Stammes 126/SvevTACfBr mit dem Restriktionsenzym *Mbo* I partiell verdaut und in die *Bam*H I-Klonierungsstelle des PAC-Vektors pPAC4 eingebracht. Der PAC-

Vektor hat eine Länge von ca. 19 kb und enthält neben einer multiplen Klonierungsstelle ein Gen für eine Antibiotikum-Resistenz gegen Kanamycin. Die so klonierten genomischen Fragmente haben eine durchschnittliche Länge von 150 kb. Das Plasmid wird mit einer geringen Kopienzahl vermehrt, kann aber durch Induktion mit IPTG amplifiziert werden.

Die Klone der Bibliothek sind wie bei der P1 DNA-Bibliothek auf Nylonmembranen aufgebracht. Das Durchsuchen wurde, wie bereits für die P1-Klone unter 3.4.1 beschrieben, durchgeführt. Die Aufarbeitung einer vereinzelt Bakterienkolonie mit dem darin enthaltenen PAC-Klon ist unter 3.5.1.5 beschrieben.

3.4.4 cDNA-Bibliothek

Die in dieser Arbeit verwendete murine Hoden cDNA-Bibliothek (RZPD No. 411) wurde von Bernhard Korn konstruiert und wie die DNA-Bibliotheken vom Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genom Projekts zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung der Bibliothek wurde polyA⁺-RNA aus den Hoden von 9 bis 10 Wochen alten Mäusen des Stammes Balb/c verwendet. Für die Klonierung wurden spezielle Linker verwendet durch die die cDNA-Fragmente in die *Not I/SaI I* Spaltstellen des Vektors pSPORT 1 ligiert werden konnten. Der Vektor pSPORT1 hat eine Länge von ca. 4,1 kb und enthält ein Gen für eine Antibiotikum-Resistenz gegen Ampizillin. Die durchschnittliche Insertionsgröße der Klone beträgt 0,5 bis 2,6 kb.

Die Klone der Bibliothek sind, wie bei den DNA-Bibliotheken, maschinell auf Nylonmembranen aufgebracht und konnten nach erfolgreicher Hybridisierung als Stechagarkulturen beim Ressourcen Zentrum des Deutschen Humanen Genom Projekt bezogen werden. Die Aufarbeitung der in den Bakterien enthaltenen Plasmid-DNA ist unter Punkt 3.5.1.2 beschrieben.

3.5 Isolierung von Nukleinsäuren

3.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA

3.5.1.1 *Präparation im analytischen Maßstab („Miniprep“)*

Die vom Ressourcen Zentrum des Humanen Genom Projekts und von der Firma Genome System Inc. bezogenen P1, BAC und PAC- Klone wurden zur Kontrolle zunächst im kleinen Maßstab präpariert, bevor dann größere Mengen an Plasmid-DNA hergestellt wurden. Außerdem diente diese Methode zur Kontrolle der erfolgreichen Insertion von DNA-Fragmenten in Vektoren.

Für die Plasmidpräparation wurden Teile einer Bakterienkolonie in jeweils 2,5 ml selektives LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampizillin oder 25 µg/ml Kanamycin oder 12,5 µg/ml Chloramphenikol) gegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden in einer Tischzentrifuge sedimentiert (7 min, 2500 Upm, RT), mit 200 µl Lösung 1 resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 exakt 5 min bei RT lysiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 3, die zur Neutralisierung und Fällung der Proteine führt, wurde der Ansatz für mind. 5 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (10 min, 15000 Upm, RT). Zur Fällung der Plasmide im Überstand wurde der Ansatz mit 500 µl Isopropanol versetzt und zentrifugiert (10 min, 15000 Upm, RT). Das Pellet wurde mit 70% Äthanol gewaschen und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug je nach Art des Vektors 1 bis 10 µg.

3.5.1.2 *Präparation im präparativen Maßstab („Maxiprep“)*

Plasmidpräparationen, die besonders sauber sein mußten, da sie für Transfektionen mit eukaryotischen Zellen (siehe 3.15.5) oder für eine Sequenzierreaktion (siehe 3.10) eingesetzt werden sollten, wurden mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midikits (100) von der Firma Qiagen GmbH durchgeführt. Bei Verwendung dieses Midi-Präparationskit konnten aus 25 ml einer Übernachtskultur max.100 µg an Plasmid-DNA gewonnen werden, die in 100 µl bidest. H₂O aufgenommen wurden.

3.5.1.3 P1 Plasmidpräparation

3 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin wurden mit einer P1 Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C bis zur stationären Phase inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Übernachtskultur wurde am nächsten Tag 75 ml kanamycinhaltiges LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 1,5 h wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 500 µM zugegeben. IPTG bewirkt eine Zunahme der Kopienzahl des Plasmids innerhalb der Wirtszelle (bis max. 20 Kopien/ Zelle) und somit eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA. Die Bakteriensuspension wurde daraufhin weitere 5 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Je 30 ml dieser Bakteriensuspension wurden in einem 50 ml Röhrchen zentrifugiert (30 min, 5000 Upm, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml GTE vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl Lysozym (50 mg/ml) und vorsichtigem Umschwenken wurden die Zellen 5 min bei RT lysiert. Danach wurde 6 ml frisch angesetzte Lösung 2 zugegeben, der Ansatz wiederum vorsichtig vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Mit 4,5 ml Lösung 3 wurden die Proteine ausgefällt und der Ansatz anschließend zentrifugiert (10000 xg, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt, mit DNase-freier RNase mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Ansatz mit einem Volumen Phenol (Tris-HCl, pH 7,6 bis 8,3, gesättigt)/ Chloroform extrahiert. Die Plasmide in der wässrigen Phase konnten nun mit einem Volumen Isopropanol ausgefällt und zentrifugiert (20 min, 5000 Upm, 4°C) werden. Nach einmaligem Waschen des Plasmid-Pellets mit 2 ml 70% Äthanol wurde dieses in 100 µl TE-Puffer oder bidest. H₂O aufgenommen. Die Ausbeute an P1 Plasmid-DNA war in der Regel 10 bis 20 µg.

3.5.1.4 BAC Plasmidpräparation

2 ml LB-Medium mit 12,5 µg/ml Chloramphenikol wurden mit einer BAC Plasmid enthaltenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C bis zur stationären Phase inkubiert. Mit 0,5 ml dieser Übernachtskultur wurde am näch-

sten Tag 100 ml chloramphenikolhaltiges LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die BAC Plasmide liegen als Einzelkopie in den Wirtszellen vor und können nicht wie die P1 Plasmide mit IPTG zu einer höheren Kopienzahl induziert werden.

Die Präparation der BAC Plasmide erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midikits (100) von der Firma Qiagen GmbH. Da im Gegensatz zu „*High Copy Number*“ Plasmiden ein größeres Volumen an Bakterienkultur aufgearbeitet wurde, mußte das Volumen der verwendeten Lösungen erhöht werden um eine optimale Aufreinigung der Plasmide zu gewährleisten.

Die Übernachtskultur wurde in einem 250 ml Zentrifugengefäß in einer Zentrifuge der Firma Beckman J2-21 (30 min, 5000xg, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 20 ml Lösung 1 resuspendiert, mit 20 ml Lösung 2 versetzt und exakt 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Lösung 3 und einer 15 min Inkubation auf Eis wurden die ausgefallenen Proteine abzentrifugiert (30 min, 10000xg, 4°C). Die Zentrifugation wurde wiederholt um jegliche Proteinreste im Überstand zu entfernen und um ein späteres Verstopfen der Säule zu verhindern. Die so entstandene klare Lösung wurde auf eine mit ca. 10 ml Lösung 4 äquilibrierten Qiagen 100 Säule gegeben und zweimal mit je 10 ml Lösung 5 gewaschen. Die auf der Säule gebundenen Plasmide wurden fünfmal mit je 1 ml Lösung 6 (65°C) eluiert. Nach Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurden die Plasmide bei 4°C über Nacht gefällt, anschließend zentrifugiert (30 min, 5000xg, 4°C), mit 70% Äthanol gewaschen und in 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute an BAC Plasmid-DNA war in der Regel 10 bis 50 µg.

3.5.1.5 PAC Plasmidpräparation

Die Präparation der PAC Plasmide erfolgte ebenfalls mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midikit (100) von der Firma Qiagen GmbH. Im Gegensatz zur BAC Plasmid-Präparation wurden hier 800 ml einer kanamycinhaltigen Übernachtskultur eingesetzt und mit der doppelten Menge an Lysepuffern, wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben, aufgearbeitet. Die Ausbeute an PAC Plasmid-DNA war in der Regel 60 bis 90 µg.

3.5.2 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde in der Regel aus 0,5 cm langen Schwanzstücken der Maus gewonnen. Eine Ausnahme stellt homozygote *Ft* DNA dar, die aus kultivierten Fibroblastenzellen, isoliert aus homozygoten *Ft* Embryonen, präpariert wurde.

Die Schwanzstücke bzw. Fibroblastenzellen wurde in 750 µl Lysepuffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl gesättigter NaCl-Lösung und 5 minütigem Schütteln, wurden die ausgefallenen Proteine in einer Tischzentrifuge pelletiert (10 min, 13000 Upm, RT) und 750 µl des Überstands abgenommen. Ausgefällt wurde die genomische DNA mit 500 µl Isopropanol. Nach abermaliger Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 70% Äthanol gewaschen und in 100-200 µl TE-Puffer aufgenommen. Für Southern-Blot Analysen (siehe 3.8.3) wurden 50 µl, für PCR-Analysen (siehe 3.11.2) 0,5 bis 1 µl der präparierten DNA eingesetzt.

3.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen und kultivierten Zellen

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der Methode der sauren Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion (Chomczynski, 1987). Adhärenz wachsende Zellen einer 10 cm Kulturschale (Falcon) wurden geerntet, indem sie mit Trypsin/EDTA abgelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt wurden. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden diese in 500 µl Lösung D aufgenommen und die Suspension konnte bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagert werden. Zur Weiterverarbeitung der eingefrorenen Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und nacheinander folgende Reagenzien hinzugefügt: 50 µl 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 500 µl saures Phenol (H₂O gesättigt) und 100 µl Chloroform. Der Ansatz wurde dabei jedesmal gut durchgeschüttelt und danach für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 Upm, 4°C) in einer Tischzentrifuge, konnte die obere wäßrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß die Protein- und DNA-haltige Interphase nicht mitüberführt wurde. Danach wurden nochmal 400 µl Chloroform hinzugegeben und erneut wie oben zentrifu-

giert. Nach der Phasentrennung wurde zum Überstand 1 Volumen Isopropanol zugefügt und zur Fällung der RNA mindestens 90 min bei -20°C inkubiert. Der Ansatz wurde wie oben zentrifugiert und das RNA-Pellet zunächst mit 80%igem, dann mit 100%igem Äthanol gewaschen. Nach kurzem Lufttrocknen konnte die RNA in 30 μl DEPC-behandeltem H_2O aufgenommen und bei -80°C eingefroren werden. Aus einer dicht bewachsenen 10 cm Kulturschale können so je nach Zellart 50-100 μg RNA gewonnen werden.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls RNA aus Organen adulter Mäuse, wie z.B. dem Schwanz, präpariert. Die Organe wurden der Maus entnommen und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Diese konnten dann für unbestimmte Zeit bei -80°C zwischengelagert werden. Zur RNA-Aufarbeitung wurden die Organe in 8 ml Lösung D mit Hilfe eines Polytrons für ca. 30 Sekunden homogenisiert. Dann erfolgte die Zugabe von 0,8 ml 2 M Natriumacetat, 8 ml H_2O -gesättigtem Phenol und 1,6 ml Chloroform. Der Ansatz wurde gut durchmischt, 15 min auf Eis inkubiert und in einem Corex-Röhrchen in einer Zentrifuge der Firma Beckman J2-21 zentrifugiert (15 min, 1000xg, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig ohne die Interphase abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und bei -20°C für mind. 90 min die RNA ausgefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 5000xg, 4°C) wurde das RNA-Pellet in 2 ml DEPC-behandeltem H_2O aufgenommen, mit 2 ml Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut durchmischt und wiederholt zentrifugiert (5 min, 5000xg, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und die RNA mit 0,5fachen Volumen an 7,5 M Ammoniumacetat und 3fachen Volumen an 100 %igem Äthanol ausgefällt und zentrifugiert (30 min, 5000xg, 4°C). Das so aufgereinigte RNA-Pellet wurde in ca.100 μl DEPC-behandeltem H_2O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.5.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte durch eine Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer. Die Messung der Extinktion von Nukleinsäurelösungen gegen die

entsprechenden Pufferlösungen entspricht, bei Verwendung einer Quarzküvette mit der Schichtdicke von 1 cm, dabei folgenden Konzentrationen:

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ dsDNA} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ ssDNA} = 30 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ RNA} = 23 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Die Messungen wurden mit verdünnten Nukleinsäuren durchgeführt. Der Grad der Verunreinigung durch Proteine konnte mit dieser Methode ebenfalls festgestellt werden. Das Verhältnis $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ liegt bei Proben mit lediglich geringer Proteinverunreinigung zwischen 1,8 und 2,0.

3.5.4.2 Konzentrationsabschätzung im Agarosegel

In gleicher Weise wie die Abschätzung von DNA-Fragmentlängen (siehe 3.6.2) durchgeführt wurde, konnte durch einen Vergleich mit Standard-Fragmenten mit bekannter Konzentration, die Menge einer zu analysierende DNA geschätzt werden.

3.6 Gelelektrophorese

3.6.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,6 bis 3%ige Gele in TAE-Puffer angesetzt, der auch als Laufpuffer verwendet wurde. Zu 100 ml eines flüssigen Gels wurden 7 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Die Gelmenge war abhängig von der jeweiligen Trägergröße. Um die DNA-Proben in die Taschen des Agarosegels laden zu können, wurden diese mit Auftragspuffer versehen. Der Auftragspuffer enthielt neben Glycerin einen Farbmaler, um den Verlauf der Elektrophorese optisch sichtbar zu machen. Zur Abschätzung der Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde ebenfalls ein Längenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in der Regel bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm bei RT durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten unter UV-Licht durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und

zur Dokumentation mit einer Polaroidkamera fotografiert oder mit einem Videodokumentationssystem festgehalten werden.

3.6.2 DNA-Fragmentlängenbestimmung

Ein Längenstandard, der DNA-Fragmente mit bekannter Länge enthält, wird in einer Gelelektrophorese parallel zu den analysierenden Proben aufgetragen. Dabei wandern Fragmente mit gleicher Länge und Konformation gleich schnell, unabhängig von deren Sequenz. So können unbekannte Fragmentlängen durch einfachen Vergleich mit diesem Standard ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden folgende Längenstandards verwendet:

λ Hind III (Stratagene):

23130; 9416; 6557; 4361; 2322; 2027; 564; 125 bp

ϕ X174 Hae III (Stratagene):

1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp

1 kb Leiter (Stratagene):

12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 506; 517; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75 bp

Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs):

1018,5; 970,0; 921,5; 873,0; 824,5; 776,0; 727,5; 679,0; 630,5; 582,0; 533,5; 485,0; 436,5; 388,8; 339,5; 291,0; 242,5; 194,0; 145,5; 97,0; 48,5 kb

Yeast Chromosome PFG Marker (New England Biolabs):

1900; 1640; 1120; 1100; 945; 915; 815; 785; 745; 680; 610; 555; 450; 375; 295; 225 kb

3.7 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer Gelkammer der Firma Pharmacia (Gene Navigator System) mit einer hexagonalen Elektrode. An ein 1,2%iges Agarosegel mit der Größe von 15 x 15 cm² wurde eine konstante Spannung von 180 V angelegt. Als Lauf- wie auch als Gelpuffer wurde 0,5x TBE-Puffer (11°C) verwendet. Die Gellaufzeit sowie die Zeiten der Nord/Süd- bzw. Ost/West-Richtungsänderung des angelegten Feldes („*Switch Time*“) wurde je nach Auftrennungsbereich der DNA-Fragmente variiert. So konnten z.B. in einem 1,2%igen Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer (11°C) bei einer Gellaufzeit von 19 h und einer Richtungsänderung von 5-20 s (Interpolation:

Phase 1: 21h, Phase 2: 21 h) DNA-Fragmente von ca. 6 bis 200 kb aufgetrennt werden (siehe 4.2.2, Abbildung 8)

Eine weitere Pulsfeld-Gelelektrophoresekammer, die in dieser Arbeit verwendet wurde, stammte von der Firma BioRad (CHEF-DR[®]III Pulsed Field Electrophoresis System). Für die Auftrennung der DNA-Fragmente in dieser Gelkammer wurden ausschließlich 1%ige Agarosegele angesetzt, wobei Agarose mit verschiedenen Reinheitsgraden („*Molecular Biology Certified*“ und „*Puls Field Certified*“) verwendet wurde. Als Laufpuffer diente wiederum 0,5x TBE-Puffer. Die folgenden Parameter wurden für eine Auftrennung von DNA-Fragmenten von 50 bis 1000 kb eingestellt:

Agarose:	1% „ <i>Molecular Biology Certified</i> “
Kühlungstemperatur:	14°C
Richtungsänderung („ <i>Switch Time</i> “):	50-90 s
Laufzeit:	22 h
Winkel („ <i>Angle</i> “):	120°
Spannung:	6 V/cm

Nachdem die Elektrophorese beendet war, wurden die DNA-Fragmente mit Ethidiumbromid angefärbt. Dazu wurden 40 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) auf 400 ml 0,5x TBE-Puffer gegeben und das Gel 30 min darin inkubiert. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente sichtbar und konnten mit einer Polaroidkamera fotografiert oder mit einem Videodokumentationssystem festgehalten werden. Das Gel konnte anschließend bei Bedarf nach dem unter 3.8.3 beschriebenen Verfahren geblottet werden.

3.7.1 Präparation von genomischer DNA für die Pulsfeld-Gelelektrophorese

Genomische DNA, die mit dem unter 3.5.2 beschriebenen Verfahren präpariert wurde, unterliegt sehr starken Scherkräften, die die DNA in ca 20-30 kb große Fragmente zerteilt. Für eine Analyse, bei der größere Fragmente erwartet werden, wie z.B. nach der Spaltung mit einem selten schneidenden Restriktionsenzym, ist diese Art der Präparation deshalb nicht geeignet. Deshalb wurden die Zellen, aus denen die DNA isoliert werden sollte, in Agarose eingebettet, in der die gesamte

Aufarbeitung bis hin zur restriktionsenzymatischen Spaltung stattfand (Sambrook, 1989).

In dieser Arbeit wurde homozygote *Ft* DNA für die PFGE aus kultivierten Fibroblastenzellen gewonnen. Die Zellen wurden durch die Behandlung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale (Falcon) abgelöst und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden diese in einem 50 ml Röhrchen zentrifugiert (7 min, 1000 Upm, RT), mehrmals mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einer Endkonzentration von 66×10^6 Zellen/ml in eiskaltem L-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 42°C erwärmt, mit einem äquivalenten Volumen an 1%iger „*Low-melting-temperature*“ Agarose versetzt und in dafür vorgesehene Plexiglasvertiefungen („*Disposable Plug Mold*“, BioRad) pipettiert. Jede Plexiglasvertiefung mit ca. 80-100 µl Zellsuspension enthielt ca 10-20 µg genomische DNA. Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Blöckchen in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 50 ml L-Puffer, der 1 mg/ml Proteinase K und 1% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin Natriumsalz) enthielt, für 24 h bei 50°C inkubiert. Nach der ersten Inkubationszeit wurde die Lösung ausgetauscht und wiederum 24 h inkubiert. Durch zweimalige Behandlung der Agaroseblöckchen mit 50 ml TE-Puffer und 40 µg/ml PMSF für 1 h bei 50°C konnte die Proteinase K inaktiviert werden. In TE können die Agaroseblöckchen für mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden. Für einen längeren Zeitraum sollten diese jedoch in 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) überführt werden.

Im Gegensatz zu homozygoter *Ft* DNA wurde heterozygote *Ft* und *Wt* DNA aus der Milz adulter Mäusen isoliert. Die Milz wurde der Maus entnommen und in einer mit PBS gefüllten Petrischale mit einer Schere zerkleinert. Durch mehrmaliges Auf- und Abnehmen der Lösung mit einer 10 ml Glaspipette wurden die Zellen aus dem Gewebeverband herausgelöst. Zusätzlich wurden die Gewebestückchen in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit einem Eppendorf Homogenisator zerkleinert. Die mit Zellen angereicherte PBS-Lösung wurde in einem 50 ml Röhrchen auf Eis gesammelt und die Zellzahl mit Hilfe einer

Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die weitere Verarbeitung der Zellen erfolgte wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben.

3.7.2 Restriktionsenzymatische Spaltung genomischer DNA in Agaroseblöckchen

Die unter 3.7.1 beschriebenen Agaroseblöckchen mit der darin enthaltenen genomischen DNA wurden, sofern diese sich in 0,5 M EDTA befanden, 30 min in einem 50fachen Volumen an TE-Puffer bei RT äquilibriert. Danach wurden die Blöckchen in ein 10faches Volumen in den für das Restriktionsenzym vorgesehenen Puffer überführt und bei 4°C 30 min leicht schwenkend inkubiert. Anschließend wurde der Puffer durch ein geringeres Volumen (2-3fach) und mit 50 U des entsprechenden Enzyms ersetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei der für das Restriktionsenzym vorgesehenen Temperatur inkubiert. Um jegliche Salzreste aus den so behandelten Agaroseblöckchen zu entfernen, wurden diese vor dem Beladen des Gels nochmal in einem 50 fachen Volumen an TE-Puffer für 1 h bei 4°C äquilibriert.

3.8 Hybridisierungstechniken

3.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Bei dem Verfahren des „*Random Primed Labeling*“ wird die zu markierende DNA denaturiert und mit Hexameren mit statistisch verteilter Sequenz hybridisiert. Von diesen aus wird der Doppelstrang durch die Klenow-Polymerase in Gegenwart von markierten Nukleotidtriphosphaten wieder aufgefüllt und man erhält einen markierten DNA-Strang.

Die Markierung der Nukleinsäuren nach diesem Verfahren wurde mit Hilfe des „*Prime-It II Random Primer Labeling Kits*“ von der Firma Stratagene durchgeführt. Dabei wurden zunächst 25 ng Matritzen-DNA, wenn nötig mit H₂O auf ein Volumen von 23 µl aufgefüllt, mit 10 µl „*Random*“ Oligonukleotid-Primer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Der Ansatz wurde anschließend kurz zentrifugiert, nacheinander 10 µl dCTP-Primer-Puffer (5x), 5 µl [α -³²P] dCTP (Amersham Buchler), 1 µl Exo(-)Klenow Enzym (5 U/µl) zupipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reak-

tion wurde mit 2 µl Stop-Mix beendet. Zur Fällung und Aufreinigung der markierten Sonde wurden 2 µl tRNA (20 mg/ml), 26 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 200 µl 100%iges Äthanol zugegeben. Die ausgefällte Sonde wurde zentrifugiert (10 min, 15000 Upm, RT), das Pellet mit 70%igem Äthanol gewaschen und in 100 µl bidest. H₂O aufgenommen.

Zur Quantifizierung der eingebauten Radioaktivität wurde von 1 µl der Lösung in einem Szintillationszähler der Firma Beckman die Cerenkov-Strahlung gemessen. Für einen genomischen Southern-Blot wurden 2 bis 3×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung benötigt. Für die Hybridisierung von Plasmid-DNA und einer genomischen DNA-Bibliothek wurden 1×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

Vor der Hybridisierung mußte die markierte Sonde noch denaturiert werden. Die entsprechende Menge an Sonde wurde auf 100 µl mit bidest. H₂O aufgefüllt, mit 30 µl 2 M NaOH versetzt und zu der Hybridisierungslösung zugegeben.

3.8.2 Hybridisierung einer DNA-Bibliothek

Zur Hybridisierung der unter 3.4 beschriebenen Filter der DNA-Bibliotheken wurden diese zuerst in destilliertem H₂O eingeweicht und je zwei dieser Filter zusammen in einer Plastikfolie an drei Seiten eingeschweißt. Danach wurden 15 ml Church-Puffer und die entsprechende Menge an radioaktiv markierter Sonde (siehe 3.8.1) hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht in einem Wasserbad.

Zur Entfernung nichtgebundener Sonde wurden die Filter am nächsten Tag 5 min bei RT, 5 min bei 65°C und 20 min bei 65°C unter Schütteln mit Waschpuffer A gewaschen. Die Filter wurden dann in einer neuen Plastikfolie eingeschweißt und für die Exposition wurde ein Kodak X-OMAT AR Film mit einer Verstärkerfolie aufgelegt, der bis zur Entwicklung bei -80°C gelagert wurde.

3.8.3 Hybridisierung von genomischer DNA (Southern-Blot)

In dieser Arbeit wurden Blots mit genomischer DNA sowie mit Plasmid-DNA nach Southern, 1975 hergestellt und hybridisiert.

Für die Herstellung eines genomischen Blots wurden 5 bis 10 µg DNA mit 30 bis 40 U Enzym über Nacht restriktionsenzymatisch gespalten und gelelektrophoretisch in 0,8%iger Agarose aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz in destilliertem H₂O geschwenkt und exakt 15 min in 0,25 M HCl inkubiert. Die Behandlung mit Salzsäure erzeugt ca. 1000 bp Fragmente und ermöglicht damit eine bessere Übertragung auf die Membran. Nach diesen 15 min wurde das Gel erneut mit destilliertem H₂O behandelt und anschließend in Denaturierungslösung 20 min wieder leicht schwenkend inkubiert. Der alkalische pH-Wert der Lösung denaturiert die DNA in Einzelstränge, damit diese später mit der Sonde hybridisieren können. Jetzt konnte die DNA auf die Nylonmembran übertragen werden. Hierzu wurden auf einer ebenen Grundfläche (Glasplatte) zuerst drei mit Denaturierungslösung durchtränkte Watmanpapiere und darauf das Agarosegel mit der Unterseite nach oben gelegt. Dann folgten eine passend zurechtgeschnittene Nylonmembran, wiederum drei Lagen Watmanpapiere und zum Schluß zusammengefaltete Zellstofflagen, auf die eine Glasplatte mit einem Gewicht von ca 500 g gelegt wurde. Beim Aufbau sollte darauf geachtet werden, daß sich keine Luftblasen zwischen den Watmanpapieren, dem Gel und der Nylonmembran befinden. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Am nächsten Tag wurden die Taschen des Agarosegels auf der Membran mit einem Bleistift markiert. Die 15 minütige Behandlung der Membran mit 50 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH 7,2 sollte den alkalischen pH-Wert wieder neutralisieren. Um die DNA auf der Membran zu fixieren, wurde die Membran mit UV-Licht (Strata-Linker) bestrahlt und anschließend ca 1 h bei 80°C gebacken.

Die auf die Membran aufgebrachte DNA konnte nun mit einer markierten Sonde, wie unter 3.8.2 beschrieben, hybridisiert werden.

3.9 Klonierungstechniken

3.9.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA

Sequenzspezifische Spaltungen von DNA wurden in dieser Arbeit mit verschiedenen Restriktionsenzymen der Firma Roche Diagnostics GmbH oder New Eng-

land Biolabs, Inc. (USA) durchgeführt Die Enzymmenge war abhängig von der eingesetzten DNA-Menge. Für eine vollständige Spaltung von DNA-Mengen bis 1 µg wurde eine Enzymmenge von 10 U gewählt und 1 h bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Ein typischer Ansatz einer restriktionsenzymatischen Spaltung setzte sich nach folgendem Schema zusammen:

- 1-17 µl DNA-Lösung
- 2 µl 10x Reaktionspuffer (je nach verwendetem Enzym)
- 1 µl Enzymlösung (10 U)
- 1 bis 16 µl bidest. H₂O

Größere Volumina an DNA-Lösungen konnten, sofern die DNA in H₂O gelöst war, zuvor in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt werden, oder das Volumen des Spaltungsansatzes wurde dementsprechend vergrößert.

Wurden die Fragmente aus Spaltungen mit Restriktionsenzymen direkt für Ligationen eingesetzt, so mußten diese Enzyme zunächst inaktiviert werden, um die nachfolgende Ligasereaktion nicht zu stören. Die Restriktionsansätze wurden deshalb 20 min auf 75°C erhitzt und so inaktiviert.

3.9.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.9.2.1 Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Einige DNA-Fragmente, z.B. linearisierte Plasmide, die als Vorlagen für die Generierung von RNA-Sonden dienten, wurden nach einer restriktionsenzymatischen Spaltung zusätzlich aufgereinigt. Der Ansatz wurde mit bidest. H₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform (1:1) versetzt. Nach dem Durchmischen des Ansatzes wurde zentrifugiert (5 min, 15000 Upm, RT) und die obere wäßrige Phase abgenommen. Zur Fällung der DNA wurde ein halbes Volumen an 7,5 M Ammoniumacetat oder 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat zugegeben. Nach der Zugabe von einem dreifachen Volumen an Äthanol wurde zentrifugiert (10 min, 15000 Upm, RT) und das Pellet mit 70%igem Äthanol gewaschen. Das so erhaltene DNA-Pellet konnte dann in der erforderlichen Menge an dest. H₂O oder

TE-Puffer aufgenommen werden. Bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde als Fällungshilfe 1 μ l tRNA (20 mg/ml) oder Glycogen (20 mg/ml) zugegeben.

3.9.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Einzelne DNA-Fragmente, die in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden, konnten mit Hilfe des „*QIAquick Gel-Extraction-Kit*“ der Firma Qiagen GmbH aufgereinigt werden. Das betreffende Fragment wurde mit einer Skalpellklinge exakt aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit der dreifachen Menge an QX1-Puffer wurde das Gemisch bei 50°C ca 10 min inkubiert, bis sich das gesamte Agarosegel aufgelöst hatte. Nach der Zugabe von einem Volumen an Isopropanol wurde diese Lösung dann auf eine im Kit enthaltene Minisäule gegeben, auf ein Auffanggefäß gesteckt und zentrifugiert (2 min, 15000 Upm, RT). Die von der Säule gebundene DNA wurde mit 750 μ l PE-Puffer gewaschen und zum Entfernen jeglicher Pufferreste noch ein zweites Mal zentrifugiert. Nun wurde die Säule auf ein neues Auffanggefäß plaziert und die DNA konnte dann mit 50 μ l H₂O oder TE-Puffer eluiert werden. Die erfolgreiche Aufreinigung wurde anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft, bei der auch eine Abschätzung der Konzentration erfolgen konnte (siehe 3.5.4.1).

3.9.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die meisten der in dieser Arbeit durchgeführten Ligasereaktionen dienten dem Anfügen von Adaptoren an DNA-Fragmente mit sogenannten glatten Enden (siehe 3.12) oder dem Klonieren von PCR-Produkten in einen Plasmidvektor. Letzteres wurde mit dem von der Firma Promega vertriebenen „*pGEM⁰-T and pGEM⁰-T Easy Vector System*“ durchgeführt. Der Kit beinhaltet einen linearisierten Vektor mit Thymidin-Überhang, sowie eine T4 DNA-Ligase mit dem zugehörigen Puffersystem. Die PCR-Produkte wurden in einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insertions-DNA von 1:3 ligiert. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

50 ng linearisierter „*pGEM⁰-T Vector*“
25 ng Insertions-DNA (bei 500 bp)
5 µl 2x „*Rapid Ligation Buffer*“
1 µl T4 DNA-Ligase (3 U/µl)
mit dest. H₂O auf 10 µl auffüllen

Die Ligation erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C. Der Ligationsansatz konnte dann für die Transformation von Bakterien (siehe 3.9.5) eingesetzt werden.

3.9.4 Herstellung kompetenter Bakterien

Das im folgenden beschriebene Protokoll stellt eine Modifikation der Methode nach Mandel und Higa dar (Mandel, 1992). 5 ml einer Übernachtskultur, angeimpft mit einer Kolonie *E. coli* (JM109, XL1Blue, HB101), wurden in 400 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C auf einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,4 (OD₅₉₅) inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und in 50 ml Aliquots zentrifugiert (15 min, 3000 Upm, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt wobei zwischendurch die Bakterien jeweils 30 min auf Eis gelagert wurden. Im letzten Schritt wurden die Bakterien in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen und in Aliquots von 100 µl bei -80°C gelagert.

3.9.5 Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien

Für die Transformation wurde die Hälfte des unter Punkt 3.9.3 beschriebenen Ligationsansatzes zu 100 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen addiert und 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit lagert sich die DNA an die Zelloberfläche an. Der darauffolgende einminütige Hitzeschock von 42°C bewirkt die Aufnahme der DNA ins Zellinnere. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum inkubiert man die Bakterien weitere 20 bis 40 min bei 37°C, um sie dann auf einer Platte mit Selektivagar auszustreichen. Der Selektivagar enthält, je nach transformierten Plasmid ein bestimmtes Antibiotikum; in den meisten Fällen war dies 100 µg/ml Ampizillin. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und hochgewachsene Kolonien konnten zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden.

3.9.6 Langzeitlagerung von Bakterien

Für einen längeren Lagerungszeitraum wurden wichtige Plasmide, z.B. P1-, BAC- oder PAC-Klone, als Bakterienkultur bei -80°C eingefroren. Aus einer mit Bakterien gesättigten Flüssigkultur wurden 800 µl in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 200 µl 100% Glycerin versetzt. Das Glycerin wurde mit der Bakteriensuspension gut durchmischt und konnte jetzt bei -80°C eingefroren werden. Zum Animpfen einer neuen Flüssigkultur wurden wenige der Bakterien mit einem sterilen Spatel abgekratzt und direkt in das Medium überführt.

3.10 Sequenzierung von DNA

In dieser Arbeit wurden Sequenzierungen mit dem „ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit“ der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Ein 10 µl Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 10 pmol Sequenzierungsprimer, 50 ng saubere Plasmid-DNA (Präparation siehe 3.5.1.2) bzw. aufgereinigtes PCR-Produkt (siehe 3.9.2.2), 2 µl Premix. Die Sequenzierreaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Vordenaturierung 2 min bei 96°C, und 25 Zyklen mit je 96°C 10 s, 48-50°C 5 s, 60°C 4 min. Anschließend wurde der

Reaktionsansatz durch eine Natriumacetat/Äthanol-fällung (siehe 3.9.2.1) aufgereinigt (die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C) und das Pellet in $5\ \mu\text{l}$ Probenpuffer aufgenommen.

Für die Sequenzierung von PAC- und BAC-Plasmiden wurden ca. 2 bis $2,5\ \mu\text{g}$ saubere Plasmid-DNA (Präparation siehe 3.5.1.4 und 3.5.1.5) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde auf $20\ \mu\text{l}$ heraufgesetzt, der $8\ \mu\text{l}$ Premix sowie $25\ \text{pmol}$ Sequenzierungsprimer beinhaltete. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Vordenaturierung 95°C 5 min und 30 Zyklen mit je 95°C 30 s, $48-50^{\circ}\text{C}$ 10 s und 60°C 4 min. Der Ansatz wurde mit einer Natriumacetat/Äthanol-fällung aufgereinigt und das erhaltene DNA-Pellet in $2\ \mu\text{l}$ Probenpuffer aufgenommen.

Die Sequenzierungsreaktion wurde anschließend auf einem „ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer“ aufgetragen und mit der zugehörigen Software ausgewertet. Eine spätere Bearbeitung der Sequenz wurde mit Hilfe des Programms MacVector durchgeführt.

3.11 Polymerase Ketten Reaktion

3.11.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide („Primer“)

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide finden sich im Anhang unter 7.1 wieder.

3.11.2 Standard-PCR

In dieser Arbeit wurden verschiedene Fragestellungen mit Hilfe der PCR-Technik bearbeitet. Einen großen Anteil bildete dabei die Genotypisierung von transgenen Mäusen (siehe 3.16.4) und die Amplifizierung genomischer Fragmente, die als Sonden in Hybridisierungen eingesetzt wurden (siehe 3.8.1). Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten bis ca. 2 kb wurde das Enzym Taq DNA-Polymerase mit dem dazugehörigen Puffersystem von der Firma Roche Diagnostics GmbH eingesetzt. Ein $50\ \mu\text{l}$ Reaktionsansatz einer PCR sah in der Regel wie folgt aus:

Bidest. H₂O

variabel

10x PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mischung	1-1,5 µl
Primer1 (10 µM)	2-2,5 µl
Primer2 (10 µM)	2-2,5 µl
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3-0,75 µl
Template-DNA	variabel

Bei jedem Versuch wurde ein Mastermix, der alle Komponenten enthielt außer der Template-DNA, zusammengestellt und auf die entsprechenden Reaktionsgefäße verteilt. Erst dann erfolgte die Zugabe der Template-DNA. Zusätzlich wurde bei jeder PCR eine Negativkontrolle ohne Template-DNA sowie eine Positivkontrolle (Zugabe einer DNA, die ein PCR-Produkt bekannter Größe liefert) mitgeführt. Die PCR wurde in den Thermocyclern „GeneAmp 2400“ von der Firma Perkin Elmer oder „Primus 96^{Plus}“ der Firma MWG-Biotech durchgeführt

Die Reaktionsbedingungen der PCR variierten je nach Art der verwendeten Primer und Template-DNA sowie Länge des erhaltenen PCR-Produktes. Für die Dauer der Elongation galt die Richtlinie von einer Minute pro 1000 bp. Ein Standardprogramm sah wie folgt aus:

Vordenaturierung	94°C	5 min
40 Zyklen mit je	Denaturierung	94°C 30 s
	Annealing	55°C 30 s
	Elongation	72°C 30 s
Finale Elongation	72°C	7 min

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese (siehe 3.6.1).

3.11.3 Reverse Transkription

Alle in dieser Arbeit durchgeführten reversen Transkriptionen wurden mit der „SUPERSCRIPTTM II RNase H Reverse Transcriptase“ der Firma Gibco nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die Reaktion wurden ca. 3 bis 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die wie unter 3.5.3 beschrieben isoliert wurde. In der dar-

auffolgenden PCR wurden je nach Fragestellung 1-10 μl des 20 μl Reaktionsansatzes eingesetzt.

3.12 Suppressions-PCR

0,5 bis 2 μg BAC- bzw. PAC-Plasmid-DNA wurde mit den glatten-Enden-generierenden Restriktionsenzymen *RsaI*, *SmaI*, *SspI*, *EcoRV* und *HpaI*, wie unter 3.9.1 beschrieben, gespalten, durch eine Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Äthanol-fällung aufgereinigt (siehe 3.9.2.1) und in 16 μl bidest. H_2O aufgenommen. 8 μl des Spaltproduktes wurden dann in einem 20 μl Ansatz mit 5 μl Adaptor (10 μM), 3 μl T4 DNA-Ligase (1 U/ μl , Gibco) und 4 μl 5x T4 Ligationspuffer 1 h oder bei Bedarf über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Generierung des Adaptors erfolgte zuvor aus zwei komplementär gestalteten Oligonukleotiden (Adaptor-lang und Adaptor-kurz). Eine Lösung mit 10 μM Adaptor-lang und 10 μM Adaptor-kurz wurde 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Um die Ligationsreaktion der Adaptoren an die Spaltprodukte abzustoppen wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 75°C inkubiert und auf ein Endvolumen von 200 μl mit bidest. H_2O aufgefüllt. 1 μl des Ansatzes wurde in die darauffolgende PCR, die mit dem „ExpandTM Long Template PCR System“ von der Firma Roche Diagnostics GmbH durchgeführt wurde, eingesetzt. Der 50 μl PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Bidest. H_2O	36,75 μl
10x PCR-Puffer 3	5 μl
dNTP-Mischung	2,5 μl
AP1 (10 μM)	2,5 μl
PCR Anchor-T7-P1/PAC (10 μM)	2,5 μl
Enzym Mix (5 U/ μl)	0,75 μl

Die Bedingungen bei der die PCR durchgeführt wurde waren wie folgt:

Vordenaturierung	94°C	2 min
10 Zyklen mit je	Denaturierung	94°C, 15 s
	Annealing	52°C 30 s
	Elongation	68°C 4 min

25 Zyklen mit je	Denaturierung	94°C,	15 s
	Annealing	52°C	30 s
	Elongation	68°C	4 min + 20 s
			Verlängerung bei jedem Zyklus
Finale Elongation		68°C	7 min

Bei der Verwendung der Primerkombination von AP1 und PCR Anchor-SP6-P1/PAC wurde eine Annealingtemperatur von 48°C verwendet.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend nach einer Verdünnung von 1:100 in einer weiteren PCR mit der Primerkombination AP2 und PCR Anchor unter den gleichen Bedingungen wie bereits beschrieben reamplifiziert. Nach der gelelektrophoretischen Analyse der PCR-Produkte wurden bei Bedarf ausgewählte Fragmente in einen Vektor mit einem Thymidin-Überhang kloniert (siehe 3.9.3) und sequenziert (siehe 3.10).

3.13 „Plasmid Rescue“

2 ng P1-, PAC- oder BAC- Plasmid-DNA wurde, wie unter 3.9.1 beschrieben, restriktionsenzymatisch gespalten. Dabei wurde ein Restriktionsenzym verwendet, welches keine Erkennungssequenz im Klonierungsvektor besaß. Das Restriktionsenzym wurde hitzeinaktiviert (20 min, 75°C) und der gesamte Ansatz in der darauffolgenden Ligationsreaktion bei einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml an Plasmid-DNA über Nacht inkubiert. Die so religierten Vektoren wurden wie unter 3.9.5 beschrieben in kompetente Bakterien transformiert.

3.14 „Exon Trapping“-Technik

Das „Exon Trapping“ wurde mit Hilfe des „Exon Trapping Systems“ der Firma Gibco (CAT.No. 18449-017) nach Anweisung des im Kit enthaltenen „*Instruction Manuals*“ durchgeführt. Für die Subklonierung der zu untersuchenden P1-, BAC- bzw. P1-Klone wurde zusätzlich ein modifizierter „Exon Trap“-Vektor (pSPL3B) verwendet, der von der Firma Genzyme Genetics, U.S.A. bezogen wurde. Die nach der Durchführung der Methode erhaltenen PCR-Produkte wurden in den dafür vorgesehenen Klonierungsvektor „pAMP10“, der ebenfalls im Kit enthalten ist, ligiert (siehe 3.9.3) und in kompetente Bakterien transformiert (siehe 3.9.5).

Einzelne Bakterienkolonien wurden dann für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab verwendet (siehe 3.5.1.1). Die so erhaltenen Plasmide mit den darin enthaltenen Exons konnten nun, wie unter 3.10 beschrieben, sequenziert werden.

3.15 Zellkulturtechnik

3.15.1 Zell-Linien

COS7-Zellen

Bei COS7-Zellen handelt es sich um Derivate der fibroblastenartigen Affennieren-Zelllinie CV-1, die mit einer Mutante des SV40-Virus infiziert wurden. Sie bilden ein als großes T-Antigen bezeichnetes Protein, welches die Replikation von Vektoren, die den Replikationsursprung des SV40-Virus tragen, ermöglicht. Diese Zell-Linie wurde ausschließlich für die „*Exon Trapping*“-Technik eingesetzt.

Embryonale Maus-Fibroblasten

Die embryonalen Fibroblasten stammten von Tag 8,5 der Embryonalentwicklung isolierten *Ft/Ft* Embryonen und wurden von Dr. Astrid Peetz zur Verfügung gestellt.

3.15.2 Kultivierung und Passagierung von Zellen

Die Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen (Falcon) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zusammensetzung des verwendeten DMEM ist unter 3.3 beschrieben. Alle 4-5 Tage wurden die COS7-Zellen im Verhältnis 1:10 und die Maus-Fibroblasten im Verhältnis 1:5 passagiert. Bei beiden Zelltypen handelte es sich um adhärenente Zellen, die nach dem Erreichen der Konfluenz durch die Behandlung einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Zellkulturschale abgelöst wurden. Das Medium wurde dazu abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung und einer Inkubationszeit von ca 2-3 min bei 37°C wurden die abgelösten Zellen in 8,5 ml Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension konnte dann in dem entsprechenden Verhältnis auf neue Kulturschalen ausgesät werden.

3.15.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde eine 10 cm Kulturschale mit konfluenten Zellen, wie oben beschrieben, suspendiert und zentrifugiert (8 min, 1000 Upm, RT). Das Zellpellet wurde mit 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Das Einfrieren erfolgte zunächst für 30 min auf Eis, danach für mehrere Stunden bei -20°C. Nach dieser Zeit mußten die Zellen bei -80°C gelagert werden. Nach mehreren Tagen und zur längeren Aufbewahrung sollten die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Das Auftauen von Zellen sollte sehr schnell erfolgen. Die Zellen wurden kurzzeitig in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurden sie mit Medium gewaschen und anschließend ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um die verbliebenen DMSO-Rückstände zu entfernen.

3.15.4 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer konnte die Gesamtzellzahl einer Zellsuspension ermittelt werden. Die Zellzahl von 8 Großquadranten wurde ausgezählt und die Gesamtzellzahl aus dem Mittelwert der gezählten Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = (\text{Mittelwert der gezählten Zellen} / \text{Anzahl der Großquadrate}) \times 10^4$$

3.15.5 Transiente Transfektion

In dieser Arbeit wurden COS7-Zellen und *Ft/Ft* Fibroblasten mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode transfiziert.

Einen Tag vor der Transfektion wurden COS7-Zellen mit einer Dichte von 8×10^5 Zellen pro 10 cm Kulturschale (Falcon) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zwei Stunden vor der eigentlichen Transfektion wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel vorgenommen. Anschließend wurden 20 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA in 500 µl 2x Hebs aufgenommen. Dieser Lösung wurde innerhalb von 10 s tropfenweise 500 µl 0,25 M CaCl₂-Lösung, die kurz zuvor aus einer 2,5 M Stammlösung in einer 1:10 Verdünnung hergestellt wurde,

zugesetzt. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Pipettieren vermischt und gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Danach erfolgte eine Inkubation von 4 bis 6 h der Zellen im Brutschrank. Das Präzipitat wurde nach dieser Zeit durch zweimaliges Waschen mit HEPES entfernt und die Zellen erneut mit frischem Medium versetzt. Einen Tag später konnten die Zellen geerntet werden.

Ft/Ft Fibroblasten wurden in 6 cm Kulturschalen (Falcon) transfiziert. Sie wurden mit einer Dichte von 3×10^5 und $7,4 \times 10^5$ Zellen pro 6 cm Kulturschale ausgesät. Die Volumina an verwendetem Medium, sowie der für die Transfektion verwendeten Lösungen wurde im Verhältnis zu den oben genannten Volumina reduziert. Das Präzipitat wurde über Nacht auf den Fibroblastenzellen belassen. Einen Tag später wurden diese dann geerntet und für die Präparation von Gesamt-RNA (siehe 3.5.3) aufgearbeitet.

3.16 Herstellung von transgenen Mäusen

3.16.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte im Zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover.

3.16.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Mikroinjektion

In dieser Arbeit wurden für die Mikroinjektion linearisierte PAC-Klone verwendet. Diese Plasmide lassen sich nicht über eine gelelektrophoretische Auftrennung aufreinigen, da die Gefahr besteht, daß bei der Aufarbeitung die bis zu 100 kb großen DNA-Fragmente geschert werden könnten. 5 µg der Plasmide wurden restriktionsenzymatisch mit *Asc I* verdaut (siehe 3.9.1). Der Ansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Hilfe von Ammoniumacetat und Äthanol gefällt (siehe 3.9.2.1). Das so erhaltene DNA-Pellet wurde mit einer ungefähren Endkonzentration von 200 bis 100 ng/µl in Injektionspuffer (Schedl, 1993) aufgenommen. Die genaue DNA-Konzentration wurde mit einer Messung in einem Spektralphotometer (siehe 3.5.4.1) bestimmt und auf eine Endkonzentration von 3 ng/µl eingestellt. Um jegliche Phenol- bzw. Chloroformreste zu entfernen, wurde die linearisierte DNA gegen Injektionspuffer über Nacht bei 4°C dialysiert.

Bei der darauffolgenden Mikroinjektion zeigte sich, daß eine Endkonzentration von 1 ng/ μ l für die Eizellen optimal war.

3.16.3 Präparation von Zygoten, Mikroinjektion und Transfer

Die zu injizierenden Eizellen (Zygoten) wurden jeweils 3 bis 6 Wochen alten weiblichen Hybridmäusen (C57Bl/6 x C3H) entnommen. Durch das Auslösen einer Superovulation konnte die Anzahl der Eizellen erhöht werden. Dazu wurde den Mäusen intraperitoneal 5 bis 10 U PMS („*Pregnant Mare's Serum*“, 50 U/ml in PBS) und etwa 48 h später dieselbe Menge an hCG („*Human Chorionic Gonadotropin*“, 50 U/ml in PBS) gespritzt. Durch die Zugabe von PMS wird bei der Maus die Reifung von Follikeln stimuliert, während das luteinisierende Hormon hCG letztendlich die Ovulation auslöst. Nach der zweiten Injektion wurden die weiblichen Mäuse mit männlichen Hybridmäusen über Nacht verpaart und anschließend getötet. Die Ovidukte wurden den Mäusen entnommen und die Eizellen durch vorsichtiges Aufreißen der Ampulle in M2-Medium freigesetzt. Anschließend wurden die Eizellen umgebenden Kumuluszellen durch die Behandlung mit Hyaluronidase (300 μ g Hyaluronidase pro ml M2-Medium) abgelöst. Nach mehrmaligem Waschen der Eizellen in M2-Medium wurden diese bis zur Injektion bei 37°C im Brutschrank gehalten. Um Verdunstungen zu vermeiden wurde das Medium mit den darin befindlichen Eizellen mit Mineralöl überschichtet. Fertilisierte Eizellen sind in diesem Stadium am Vorhandensein von zwei Pronuklei erkennbar und stellen ca. 75 bis 90% der isolierten Eizellen dar.

Die DNA-Mikroinjektion wurde an einem Mikromanipulator durchgeführt. Pro Injektionseinheit wurden 10 bis 15 Eizellen auf einen Objekträger mit Öl überschichteten M2-Medium gegeben. Eine fein ausgezogene Glaskapillare, die die DNA in einer Konzentration von 1 ng/ μ l in Injektionspuffer enthielt wurde in einen der beiden Pronuklei eingeführt und so die DNA-Lösung injiziert. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente ist unter Punkt 3.16.2 beschrieben. Eine erfolgreiche Injektion ist an einem Anschwellen des Pronukleus zu erkennen. Nach der Injektion wurden die Eizellen bis zum Ovidukttransfer im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die injizierten Eizellen wurden am selben Tag in die Eileiter von schein-schwangeren Weibchen („*Foster*“), die über Nacht erfolgreich mit vasktomierten Männchen verpaart waren, transferiert. Der operative Eingriff wurde nach der Narkotisierung der Maus mit dem Anästhetikum Avertin (ca. 0,5 ml Avertin-Gebrauchslösung pro Maus) vorgenommen. Nach dorsaler Öffnung der Bauchhöhle wurde eine feine Glaskapillare, die die zu transferierenden Eizellen enthielt, in das Infundibulum eingeführt, die Eizellen in das Ovidukt transferiert und die Operationswunde der Maus mit einem Wundclip verschlossen. Pro Rezipient wurden ca. 30 Eier transferiert. Die Mikroinjektion und der Ovidukttransfer wurden unter der Mitwirkung von Dr. Joachim Heymer und Dipl. biol. Natascha Schröder durchgeführt.

3.16.4 Genotypisierung

Zur Genotypisierung adulter Mäuse wurde eine Schwanzbiopsie vorgenommen. Aus dem entnommenen Gewebe wurde die genomische DNA isoliert (siehe 3.5.1) und mittels PCR analysiert.

Die Genotypisierung von Embryonen erfolgte über die Präparation der Membranhüllen, dem Dottersack und das Amnion, in die der Embryo während seiner Entwicklung eingeschlossen ist. Diese Membranen wurden während der Präparation der Embryonen vorsichtig entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl PCR-Puffer überführt und nach Zugabe von 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) für ca. 4 h bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K 15 min bei 95°C hitzeinaktiviert. Für die darauffolgende PCR (siehe 3.11.2) wurden 1 bis 2 µl dieses Ansatzes als Template eingesetzt.

3.16.5 Isolierung definierter Embryonalstadien

Um Embryonen mit definiertem Entwicklungsstadium zu erhalten, wurden die entsprechenden Mäuse verpaart und am darauffolgendem Tag auf Präsenz eines Vaginalpropfens hin untersucht. Die Hell- und Dunkelphasen in dem Raum, in dem sich die Mäuse befanden, wurden so reguliert, daß um 12 Uhr am Tag des Vaginalpropfens dies als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung angesehen werden konnte. Nach Erreichen des erwünschten Alters der Embryonen wurde das

Muttertier getötet und die Embryonen entnommen. Die Präparation der Embryonen erfolgte in PBS.

3.17 „Whole mount“ in situ Hybridisierung

Das im folgenden beschriebenen Protokoll stellt eine Modifikation der Methode nach Wilkinson dar (Wilkinson, 1993).

3.17.1 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Die für die Herstellung von RNA-Sonden benötigten Plasmide wurden wie unter 3.9.1 und 3.9.2.1 beschrieben linearisiert und aufgereinigt. Für die in vitro Transkription wurde folgender Ansatz 2 h bei 37°C inkubiert:

- 1-4 µg linearisiertes Plasmid
- 2 µl 10x „DIG RNA Labeling Mix“ (Roche Diagnostics GmbH)
- 2 µl RNA-Polymerase (T7-, T3- oder SP6-RNA-Polymerase; Roche Diagnostics GmbH)
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl, Stratagene)
- mit bidest. H₂O auf 20 µl auffüllen

Nach Zugabe von 2 µl RNase-freier DNase (10 U/µl) wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 100 µl bidest. H₂O, 1 µl tRNA (10µg/µl), 33µl 7,5 M Ammoniumacetat, 300 µl Äthanol versetzt und die RNA mind. 30 min bei -80°C ausgefällt. Das Pellet wurde mit 70% Äthanol gewaschen und in 100 µl DEPC-behandeltem H₂O mit 1 µl RNase Inhibitor aufgenommen. Zur Kontrolle der RNA-Sonde wurden 5 µl in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.6.1) Die Konzentrationen konnten im Vergleich zur Bande der tRNA abgeschätzt werden.

3.17.2 Durchführung der in situ Hybridisierung

Die Behandlung, der in dieser Methode beschriebenen Embryonen, wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen mit Sicherheitsverschluß durchgeführt, die sofern diese nicht bei RT inkubiert wurden, in einem auf einer Wippe schräggestellten Eppendorf-Inkubator steckten.

Die präparierten Embryonen, wie unter 3.16.5 beschrieben, wurden über Nacht bei 4°C in PFA fixiert, zweimal mit PBS gewaschen (30 min, Eis) und mit einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100% Methanol, je 10 min, Eis) dehydriert. Die fixierten Embryonen können so bei -20°C mehrere Monate aufbewahrt werden. Für die in situ Hybridisierung mußten die Embryonen mit einer absteigenden Methanolreihe (100%, 75%, 50%, 25% Methanol, je 10 min, Eis) wieder rehydriert werden. Dann folgten drei Waschschrte mit PBT (10 min, Eis), ein Bleichschritt mit 6% H₂O₂ in PBT (1 h, Eis) und wiederum drei Waschschrte mit PBT. Da in dieser Arbeit nur Embryonen bis Tag 10,5 p.c. verwendet wurden, brauchten diese nicht mit Proteinase K behandelt werden, sondern wurden sofort dreimal mit RIPA-Puffer und dreimal mit PBT (jeweils 5 min, RT) gewaschen. Darauf folgte eine Fixierung mit PFA/Glutaraldehyd (exakt 20 min, RT), dreimaliges Waschen mit PBT (5 min, RT) und ein Umpuffern in Hybridisierungspuffer/PBT im Verhältnis 1:1 (10 min, RT). Nach der Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (mind. 1 h, 65°C) wurde die Lösung gegen frischen Hybridisierungspuffer mit 100 µg/ml tRNA und 500 ng/ml DIG-markierter RNA-Sonde, die zuvor 3 min bei 80°C denaturiert wurde, ausgetauscht und der Ansatz bei 65°C über Nacht inkubiert.

Nach der Hybridisierung folgten zwei Waschschrte mit Hybridisierungspuffer (30 min, 65°C) und ein Abkühlen der Embryonen auf RT. Die Embryonen wurden mit Hybridisierungspuffer/RNase-Puffer im Verhältnis 1:1 behandelt (5 min, RT) und zweimal mit 100 µg/ml RNase A in RNase-Puffer inkubiert (30 min, 37°C). Dann folgte ein Waschschrte mit RNase- und SSC/Formamid-Puffer im Verhältnis 1:1 (50 min, RT). Die Embryonen wurden danach in reinen SSC/Formamid-Puffer überführt, auf 65°C erhitzt und folgenden Waschschrten unterzogen: zweimal 5 min, dreimal 10 min, einmal 30 min und fünfmal 1 h in SSC/Formamid-Puffer bei 65°C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde mit SSC/Formamid-Puffer und TBST im Verhältnis 1:1 umgepuffert (5 min, RT), zweimal mit TBST und MABT gewaschen (10 min, RT) und die Embryonen in 10% Blocking Solution inkubiert (mind. 1 h, RT). Während dieser Zeit wurde in einer Verdünnung von 1:5000 der gegen DIG gerichtete und mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper („Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragments“) in 1% „Blocking Solution“

präabsorbiert (mind. 1 h, 4°C) Die 10%ige „*Blocking Solution*“ wurde durch die Antikörper enthaltenen „*Blocking Solution*“ ersetzt und die Embryonen bei 4°C über Nacht leicht schwenkend inkubiert.

Nach der Bindung des Antikörpers wurden die Embryonen dreimal 5 min, achtmal 1 h in TBST bei RT gewaschen und für mind. einen weiteren Tag in TBST bei 4°C leicht schwenkend belassen, wobei der Puffer gelegentlich ausgetauscht wurde. Die Färbung der Embryonen erfolgte nach dreimaliger Behandlung mit AP-Puffer (20 min, RT) in Färbelösung („*BM Purple AP Substrat*“, gebrauchsfertige Lösung von Roche Diagnostics GmbH) bei RT, bis eine deutliche Färbung der Embryonen erkennbar war. Die Färbedauer von 10,5 Tage alten Embryonen betrug in der Regel ca. 5 h für den Expressionsnachweis des *Irx3* Gens während die Färbung für die Expression des *Shh* Gens bei 12 h lag.

3.18 Knochen- und Knorpelfärbung

Die Vorder- und Hinterbeine von adulten Mäusen wurden zunächst in 95% Äthanol und anschließend in Aceton jeweils über Nacht bei RT fixiert. Danach erfolgte die Anfärbung für drei Tage bei 37°C in einer Lösung bestehend aus einem Volumen 0,3%iger „*Alcian Blue*“ Lösung (in 70% Äthanol), einem Volumen 0,1%iger „*Alizarin Red S*“ Lösung (in 95% Äthanol), einem Volumen Eisessig und 17 Volumen 70%igem Äthanol. Die gefärbten Gewebestücke wurden kurz mit H₂O gewaschen und mit 1% Kaliumhydroxid in 20% Glycerin bis zur Durchsichtigkeit hin gefärbt. Danach wurden sie in 40% Glycerin überführt. Für eine längerfristige Lagerung sollten die gefärbten Gewebe eine steigende Glycerinreihe (bis 87% Glycerin) durchlaufen. Die Anfärbung knorpeliger Strukturen in Embryonen erfolgte im Prinzip nach der gleichen Methode, wie die Färbung der Extremitäten. Die Alizarin Red S Lösung, die für die Anfärbung knochenartiger Strukturen verantwortlich ist, wurde bei dieser Färbung jedoch weggelassen.

4 Ergebnisse

4.1 Genetische Kartierung des *Fused toes* Locus auf - Chromosom 8

Um herauszufinden, zwischen welchen der bereits bekannten genetischen Markern der *Ft* Locus lokalisiert ist, wurde zunächst eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Diese wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Jean Louis Guenet (Unite de Genetique des Mammiferes, Institut Pasteur, Paris) ausgeführt. Die Voraussetzung für diese Kopplungsanalyse war die Identifizierung eines für den *Ft* Locus spezifischen (gekoppelten) genetischen Marker, der informativ für die Mausstämmen *Mus musculus musculus*, zu denen die Inzuchtstämmen C57BL/6, DBA/2 und 129Svj gehören, sowie *Mus spretus* sein sollte um eine genetische Differenzierung beider Stämme zu erlauben.

Zur Identifizierung eines Polymorphismus zwischen den Mausstämmen *Mus musculus musculus* und *Mus spretus* wurden daher zunächst verschiedene genomische Fragmente mit Hilfe der PCR amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung der 204 bp großen PCR-Produkte, welche mit den Primern BH600-F3 und BH600-B8 generiert wurden, zeigte mehrere Unterschiede in der Basenabfolge zwischen *Mus musculus musculus* und *Mus spretus*. Demnach sollte das aus *Mus spretus* DNA amplifizierte PCR-Produkt Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *EcoR* I, *Taq* I und *Bcl* I aufweisen. Entsprechende restriktionsenzymatische Spaltungen bestätigten allerdings lediglich die Präsenz eines *Bcl* I Restriktionspolymorphismus (siehe Abbildung 2), der für die vorgesehene Kopplungsanalyse jedoch ausreichend war.

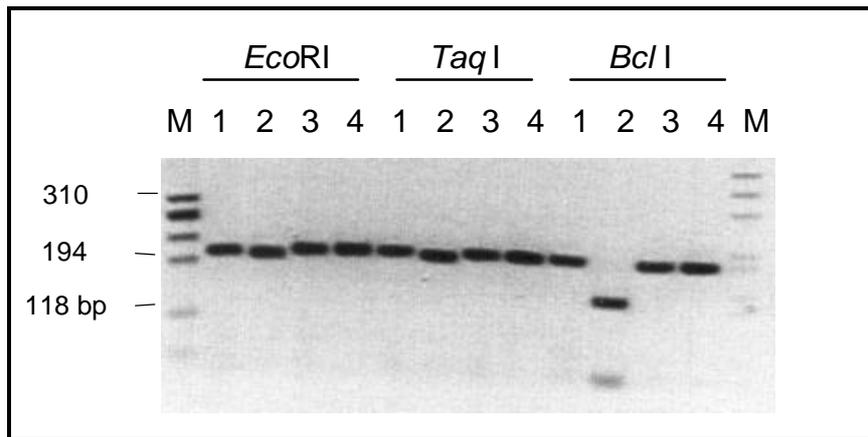


Abbildung 2: Nachweis eines Restriktionspolymorphismus zwischen *Mus musculus* und *Mus spretus* DNA durch Restriktionsspaltung der PCR-Produkte BH600-F3/B8. PCR-Produkte amplifiziert von genomischer *Mus musculus musculus* DNA (Spur 1: C57BL/6, Spur 2: DBA2 und Spur 4: 129Svj) sowie *Mus spretus* DNA (Spur 3) wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten. M (Längenstandard: ϕ X Hae III, 1 kb Leiter)

Das Ergebnis der am Institut Pasteur durchgeführten Kopplungsanalyse zeigte, daß der *Fused toes* Locus zwischen den MIT Markern (Whitehead Institut/MIT Center for Genome Research) D8Mit109 und D8Mit110 lokalisiert ist. Bei den MIT Markern handelt es sich um sogenannte STSs („*Sequence Tagged Sites*“); kurze DNA-Regionen von etwa 200-300 Basenpaaren, deren Sequenz im Genom als einmalig angenommen wird (Olson, 1989). Jeder STS Marker ist durch flankierende PCR-Primer spezifisch aus dem gesamten Genom heraus amplifizierbar. In einer vom Whitehead Institut for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research (U.S.A.) herausgegebenen genetischen Karte des Mausgenoms, in der 7377 genetische Marker im gesamten Genom der Maus kartiert wurden, bilden sie mit 6580 Markern den größten Anteil (Dietrich, 1996). Diese Karte wurde als Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen verwendet.

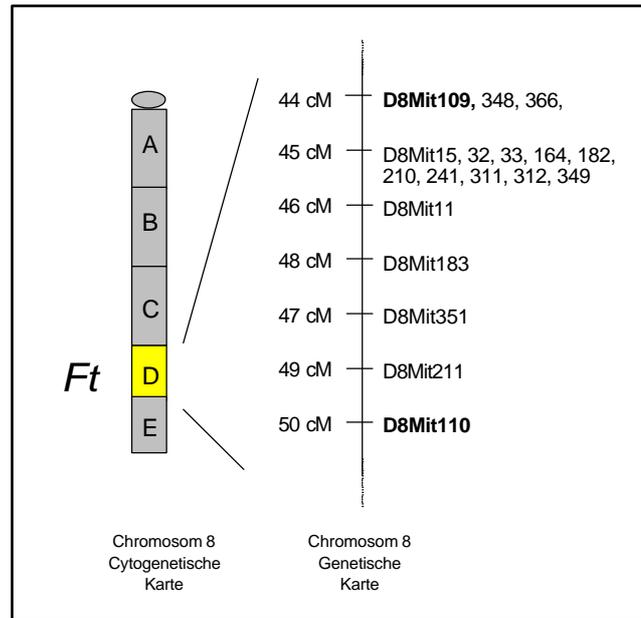


Abbildung 3: :Cytogenetische und genetische Karte von Chromosom 8. Der linke Teil der Grafik zeigt die Einteilung von Chromosom 8 in die verschiedenen Regionen A bis E. Rechts ist ein Ausschnitt der genetischen Karte von Chromosom 8 dargestellt, in der alle in dieser Arbeit getesteten MIT Marker eingezeichnet sind. Hervorgehoben sind die beiden MIT Marker, die mit dem *Ft* Locus gekoppelt sind.

Die naheliegendste Frage war nun, ob ein oder mehrere Marker identifiziert werden können, die zum einen in der durch die *Fused toes* Mutation betroffenen Region zwischen D8Mit109 und D8Mit110 lokalisiert sind (siehe Abbildung 3) und zusätzlich als in *Ft/Ft* DNA deletiert nachgewiesen werden können. Der genetische Abstand zwischen D8Mit109 und D8Mit110 beträgt 6 cM. Daher wurde mindestens ein STS Marker je Centi-Morgan analysiert (siehe Abbildung 3 und Tabelle 1). Die Information für die Sequenzen, der für die Marker spezifischen Primer, sowie die erwartete PCR-Produktlänge in den verschiedenen Mausstämmen wurde aus der Datenbank des Whitehead Institut for Biomedical Research/Mit Center for Genome Research bezogen und finden sich außer in Tabelle 1 auch detailliert im Anhang dieser Arbeit wieder. In der STS Analyse mittels PCR sollte ein von der *Ft* Mutation betroffener Marker bei Amplifizierung von genomischer *Ft/Ft* DNA kein PCR-Produkt bilden, während ein nicht-betroffener Marker bei Vorlage von genomischer *Ft/Ft* bzw. Wildtyp DNA jeweils in Form gleichgroßer PCR-Produkte detektiert wird.

MIT Marker	PCR-Produktgröße mit Wt (C57BL/6) DNA	MIT Marker	PCR-Produktgröße mit Wt (C57BL/6) DNA
D8Mit109	133	D8Mit241	116
D8Mit348	200	D8Mit311	122
D8Mit366	206	D8Mit312	91
D8Mit15	177	D8Mit349	124
D8Mit32	134	D8Mit11	211
D8Mit33	226	D8Mit183	152
D8Mit164	146	D8Mit351	92
D8Mit182	143	D8Mit211	154
D8Mit210	154	D8Mit110	148

Tabelle 1 Zusammenfassung der getesteten MIT Marker und deren erwarteten PCR-Produktgrößen in Wt (C57BL/6) DNA

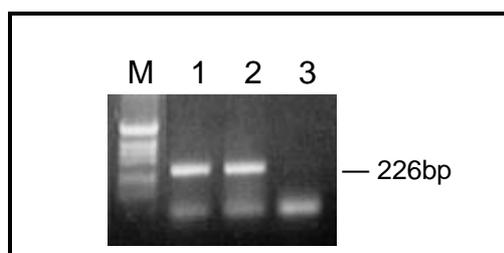


Abbildung 4: STS Analyse mittels PCR von D8Mit33. Amplifizierung von D8Mit33 von genomischer Wt DNA (Spur 1) und Ft/Ft DNA (Spur 2). In beiden Fällen wurde ein 226 bp PCR-Produkt amplifiziert, welches spezifisch für D8Mit33 ist. Spur 3: Wasserkontrolle. M (Längenstandard: 1 kb Leiter).

Alle getesteten Marker zeigten ein spezifisches PCR-Produkt bei der Amplifizierung von genomischer Wt und homozygoter Ft DNA. Dies bedeutete, daß kein Marker durch die Ft Mutation betroffen bzw. deletiert wurde. Die homozygote Ft DNA lieferte im Vergleich zu C57BL/6 DNA PCR-Produkte gleicher Größe, da die Ft/Ft DNA aus Mausfibroblasten isoliert wurde, die wiederum von auf dem C57BL/6 Hintergrund gezüchteten Mutanten abstammten.

Die Auflösung der genetischen Karte reichte demnach nicht aus, die Ft Mutation zu erfassen. Trotzdem zeigte dieses Ergebnis, daß die Größe der durch die Ft Mutation vorliegenden Deletion nicht über 1 cM beträgt, da keiner der jeweils im Abstand von 1 cM getesteten genetischen Marker als deletiert nachgewiesen werden konnte. Wie in der Diskussion dieser Arbeit näher erläutert wird, konnte

deshalb die physikalische Ausdehnung der in der *Ft* Mutation vorliegenden Deletion auf nicht größer als 2 Mb abgeschätzt werden.

4.2 Physikalische Feinkartierung des *Fused toes* Lokus

Die molekulare Ursache der *Fused toes* Mutation ist, wie bereits unter 2.1 beschrieben, eine durch insertionelle Mutagenese entstandene Deletion genomischer DNA. Die genetische Kartierung des *Ft* Lokus ermöglichte die Abschätzung der durch die Mutation entstandenen Deletion auf eine Größe von weniger als 2 Mb. Damit waren hinsichtlich der maximalen Größe der Deletion die Voraussetzungen geschaffen eine exakte physikalische Kartierung auch im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit durchführen zu können. Darüberhinaus können weder die Ergebnisse der in situ Hybridisierung noch die genetische Charakterisierung die Feinkartierung der Mutation bzw. Identifizierung der durch die Deletion betroffenen Gene ermöglichen. Diese Fragestellung sollte durch die Erstellung eines Contigs mit Hilfe der „*Chromosome Walking*“-Technik bearbeitet werden. Die Klonierung und die damit verbundene physikalische Kartierung der in der *Ft* Mutation deletierten genomischen DNA stellt eine essentielle Grundlage für die Identifizierung und spätere funktionelle Charakterisierung der Gene dar, die an der Ausprägung des *Ft* Phänotyps beteiligt sind.

4.2.1 Methodische Untersuchungen zur Isolierung von terminalen Sonden für die Durchführung der „*Chromosome Walking*“-Technik

Zur Durchführung der „*Chromosome Walking*“-Experimente wurden in dieser Arbeit genomische P1, BAC und PAC DNA-Bibliotheken verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit stellte es sich jedoch heraus, daß es relativ schwierig war die für das „*Walking*“ geeigneten terminalen Hybridisierungssonden aus den genomischen Fragmenten zu isolieren. Die verschiedenen methodischen Strategien, die zur Isolierung der Hybridisierungssonden führten werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

„Plasmid Rescue“

Beim „Plasmid Rescue“ werden die P1, PAC oder BAC-Klone mit einem Restriktionsenzym geschnitten, welches keine Erkennungssequenz innerhalb des Klonierungsvektors besitzt. Durch entsprechende Verdünnung der Spaltprodukte auf 0,1 µg/ml und einer darauffolgenden Ligationsreaktion wird die Religation des Vektors begünstigt. Dadurch wird der größte Teil der genomischen Insertion des Klons entfernt und terminal gelegene Fragmente zusammengeführt. Für jede Seite der genomischen Insertion können nun die Fragmente mit der entsprechenden Spaltung isoliert werden. Mit diesem Verfahren wurden die Sonden 46-1, 48-1 und 48-2 isoliert (siehe Abbildung 11 und Tabelle 2).

Sequenzierung von P1-, BAC- und PAC-Klonen

Eine weitere Möglichkeit endständige Sonden zu isolieren, ist das direkte Sequenzieren der Klone mit Hilfe der flankierenden T7 bzw. SP6-Sequenzen. Bei einer Sequenzierung können je nach Sequenzierungsbedingungen bis zu 800 bp an einem Stück gelesen werden. Bevor die durch die Sequenzierung erhaltenen Sequenzen als Hybridisierungssonde eingesetzt wurden, wurde ein Vergleich mit Eintragungen der Datenbank GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) mit Hilfe des Programms BLAST durchgeführt, um bekannte repetitive Sequenzmotive sowie unbekannte, repetitive Sequenzen mittleren Grades zu identifizieren. Entsprechende Sequenzen mit repetitiven Anteilen konnten nicht für Hybridisierungen eingesetzt werden, da mit ihnen keine lokusspezifischen Signale erhalten werden können. Als vermutlich nicht repetitive Sequenzbereiche wurden dagegen mit Hilfe von geeigneten Primerpaaren spezifisch von den jeweiligen Klonen amplifiziert und als Hybridisierungssonden eingesetzt. In Abbildung 11 und Tabelle 2 finden sich alle auf diese Art isolierten genomischen Sonden wieder.

Suppressions-PCR

Die Suppressions-PCR dient dem selektiven Amplifizieren unbekannter DNA-Fragmente. Das Prinzip dieser Methode ist unter Abbildung 5 dargestellt. Diese Methode wurde ebenfalls für die Isolierung von terminalen genomischen Sonden aus P1, PAC oder BAC-Klonen verwendet.

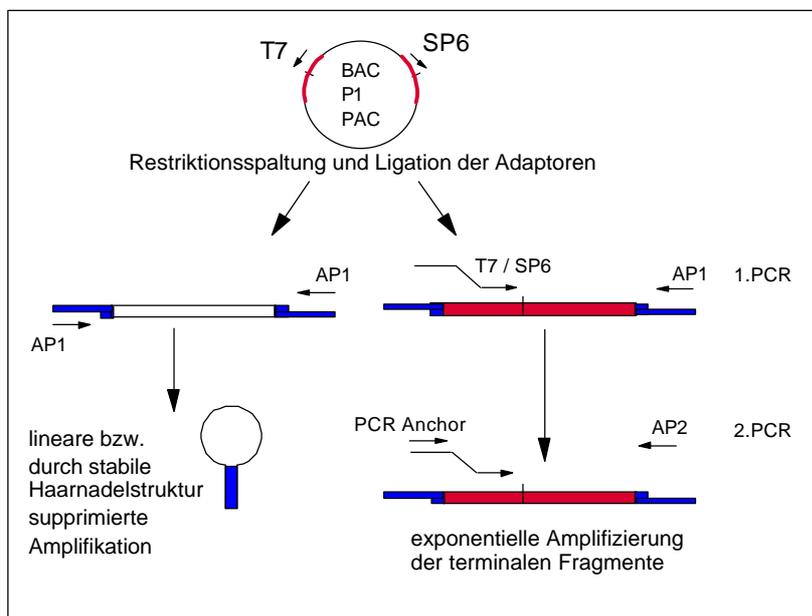


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Suppressions-PCR. Nach einer restriktionsenzymatischen Spaltung der P1-, BAC- oder PAC-Klone mit einem stumpfe Enden generierenden Enzym erfolgte die Ligation von Adaptoren (blau). In der darauffolgenden PCR wird nur das T7- bzw. SP6-Sequenz enthaltene Fragment (rot) exponentiell amplifiziert. Alle anderen Fragmente werden nicht exponentiell, sondern nur linear amplifiziert oder bilden eine stabile Haarnadel, die ein Anlagern der PCR-Primer verhindert und so die PCR suppressiert.

Die Klone wurden zunächst jeweils mit den Restriktionsenzymen *Rsa* I, *Sma* I, *Ssp* I, *EcoR* V und *Hpa* I gespalten. Bei der Auswahl der Enzyme war darauf zu achten, daß zum einen nach der Spaltung stumpfe Enden entstehen und zum anderen die flankierenden T7- bzw. SP6-Sequenzen des Klonierungsvektor nicht von den genomischen Insertions-Sequenzen getrennt wurden. Nach der Spaltung erfolgte eine Ligation mit speziellen Adaptoren (Siebert, 1995). Diese waren

asymmetrisch gestaltet, d.h. ein Strang war wesentlich kürzer und enthielt zusätzlich eine Aminogruppe am 3' Ende, so daß eine Verlängerung durch die Taq-Polymerase verhindert wurde. In einer der Ligation folgenden PCR können prinzipiell drei verschiedene Produkte entstehen: Ein Produkt stellt das gewünschte Zielfragment dar. Es wird mit den PCR-Primern T7 bzw. SP6 und AP1 während der PCR exponentiell amplifiziert (siehe Abbildung 5, rechte Seite). Ein Nebenprodukt stellen hingegen die Fragmente ohne interne T7- bzw. SP6-Sequenzen dar. Sie werden mit AP1 nur linear amplifiziert, da der kurze Teil des Adaptors die Verlängerung des Stranges verhindert und keine zweite AP1-Bindungsstelle entstehen kann (siehe Abbildung 5, linke Seite). Durch Reannealing zweier Einzelstränge, deren Enden durch die Taq-Polymerase aufgefüllt werden, können Fragmente mit doppelsträngigen Adaptoren an beiden Seiten entstehen, die wiederum unter Verwendung des PCR-Primer AP1 Voraussetzungen für eine exponentielle Amplifizierung darstellen. Diese wird jedoch durch sogenannte „*Inverted Terminal Repeats*“ in der Adaptorsequenz verhindert. Dabei bilden sich bei jedem Denaturierungsschritt stabile Haarnadelstrukturen aus und supprimieren in effizienter Weise die Amplifizierung dieser unerwünschten Nebenprodukte. Als Resultat wird aus dem Gemisch der verschiedenen DNA-Fragmente (siehe Abbildung 5) jeweils nur das gewünschte spezifische DNA-Fragment exponentiell amplifiziert.

In einer zweiten PCR kann die Spezifität der Produkte noch erhöht werden, da hier sogenannte „*nested*“ Primer eingesetzt werden. Dabei werden nur solche PCR-Produkte exponentiell reamplifiziert, die in der ersten PCR einen verlängerten T7- bzw. SP6-Primer integriert hatten. In Abbildung 6 ist ein Agarosegel mit amplifizierten terminalen Fragmenten als Beispiel dargestellt.

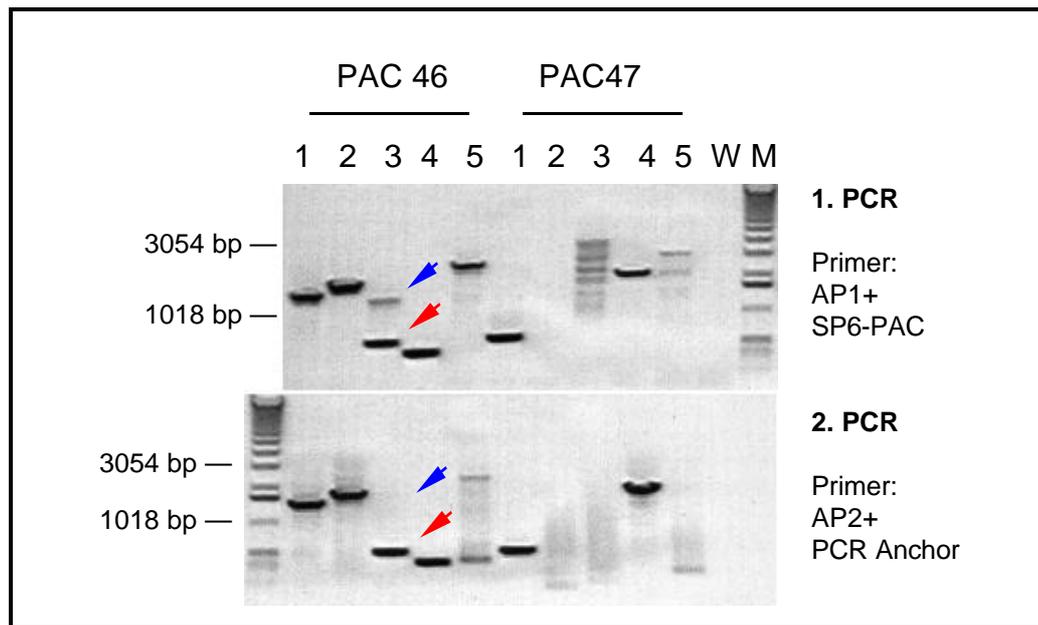


Abbildung 6: Amplifizierung terminaler Fragmente mittels Suppressions-PCR. PAC46 und PAC47 wurden mit den Restriktionsenzymen *Rsa I* (Spur 1), *Sma I* (Spur 2), *Ssp I* (Spur 3), *EcoR V* (Spur 4) und *Hpa I* (Spur 5) gespalten. Nach Ligation der Adaptoren erfolgte die erste PCR mit den Primern AP1 und SP6-P1/PAC. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden 1:100 verdünnt und die zweite PCR mit den Primern AP2 und PCR Anchor durchgeführt. Auf diese Weise wurden für die SP6 -Seite spezifische Fragmente amplifiziert. Die roten Pfeile markieren ein PCR-Produkt, welches spezifisch in der zweiten PCR reamplifiziert wurde, die blauen Pfeile ein Produkt, welches nicht reamplifiziert werden konnte. W (Wasserkontrolle), M (Längenstandard: 1 kb Leiter).

Die amplifizierten Produkte wurden in einen Thymidin-Überhang Vektor subkloniert und sequenziert. Innerhalb der erhaltenen Sequenz konnten nun PCR-Primer ausgewählt werden, mit denen für den *Ft* Locus spezifische Sonden in einer PCR amplifiziert werden konnten. Dabei mußte bei der Auswahl der Primer darauf geachtet werden, daß keine repetitiven Bereiche amplifiziert wurden, da diese in einer Hybridisierungsreaktion unspezifische Signale zeigen würden. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurde die Sequenz mit den Einträgen der Datenbank GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) mit dem Programm BLAST verglichen, um so potentiell repetitive Bereiche ausschließen zu können. Die mit dieser Methode isolierten Sonden sind in Abbildung 11 und Tabelle 2 aufgeführt.

Sonderfälle

Wenn mit keiner der bisher beschriebenen Methoden ein terminales Fragment isoliert werden konnte, wurden als Alternativverfahren die „Shotgun“ Subklonierung von Restriktionsfragmenten der Kandidatenklone eingesetzt.

Eine andere Möglichkeit war die Verwendung von Gensequenzen aus dem *Fused toes* Locus, die durch verschiedene Verfahren der positionellen Klonierung, auf die in Abschnitt 4.3 weiter eingegangen wird, identifiziert werden konnten.

Schlußfolgerung der methodischen Arbeiten

Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, daß die Kombination von direkter Sequenzierung der P1-, BAC- bzw. PAC-Klone und die Anwendung der Suppressions-PCR am geeignetesten war in relativ kurzer Zeit gute Hybridisierungs sondens zu isolieren.

4.2.2 Die Kartierung des *Ft* Locus

Die Kartierung des *Fused toes* Locus wurde gemäß der in Abbildung 7 schematisch dargestellten Strategie durchgeführt.

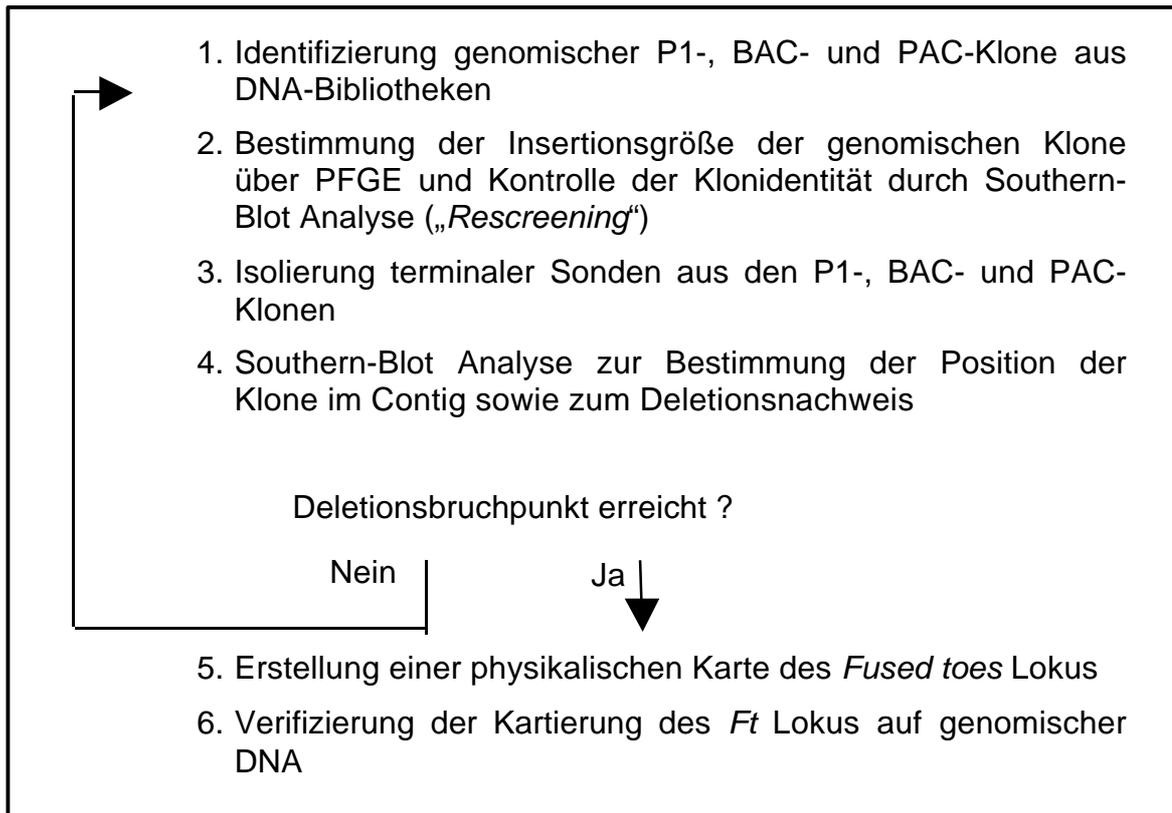


Abbildung 7: Strategie der Feinkartierung des *Fused toes* Lokus.

In den folgenden Abschnitten wird auf die in Abbildung 7 aufgelisteten Verfahrensschritte zur Durchführung der Feinkartierung näher eingegangen.

4.2.2.1 Identifizierung genomischer P1-, BAC- und PAC-Klone aus DNA-Bibliotheken

Wie in Abbildung 7 dargestellt ist die Voraussetzung zur Durchführung des „*Chromosome Walking*“, also der Identifizierung entsprechender Klone aus genomischen DNA-Bibliotheken (Abbildung 7, Schritt 1), die Verfügbarkeit einer initialen Sonde. Diese sollte zu Beginn des Projekts aus einem 180 kb großen Fragment genomischer DNA des *Ft* Lokus (MB3) mit Hilfe der oben beschriebenen Verfahren isoliert werden, um daran anschließend weitere genomische Fragmente aus den in dieser Arbeit verwendeten P1, BAC und PAC DNA-Bibliotheken (siehe 3.4) identifizieren zu können.

4.2.2.2 Bestimmung der Insertionsgröße der genomischen Klone über PFGE und Kontrolle der Klonidentität durch Southern-Blot Analyse („Rescreening“)

Die Größe der aus den DNA-Bibliotheken isolierten genomischen Fragmente wurde nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit dem Enzym *Not* I ermittelt. Die verwendeten Klonierungsvektoren für die Herstellung der P1, PAC sowie BAC DNA-Bibliothek enthielten eine bzw. zwei flankierende Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *Not* I, so daß mit der entsprechenden Restriktionsspaltung die Klone linearisiert bzw. die enthaltenen Fragmente ausgeschnitten werden konnten. Die erhaltenen Fragmente konnten daraufhin mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. In Abbildung 8 ist ein solches Pulsfeldgel mit einigen PAC-Klonen dargestellt.

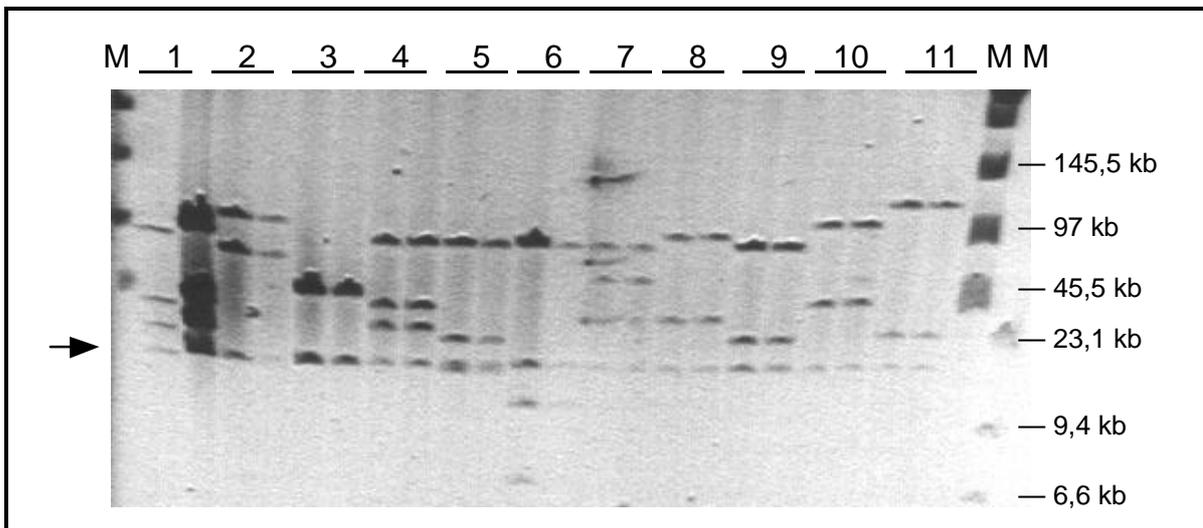


Abbildung 8: Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Bestimmung der Insertionsgrößen von PAC-Klonen. Je zwei verschiedene Plasmidpräparationen der Klone PAC71 (1), PAC 73 (2), PAC74 (3), PAC 75 (4), PAC76(5), PAC77 (6), PAC78 (7), PAC79 (8), PAC80 (10), PAC81 (11), PAC82 (11) wurden mit *Not* I restriktionsenzymatisch gespalten und in einer Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Pfeil markiert die für den Klonierungsvektor *pPAC4* spezifische Bande von ca. 19 kb. Alle anderen Banden repräsentieren die genomische Insertion der Klone. M (Längenstandard: I Ladder, I *Hind* III)

Nach der Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde die Identität der Klone im Bezug zur Sonde, die für die Hybridisierung der DNA-Bibliothek eingesetzt wurde, ermittelt indem die Gele geblottet und hybridisiert wurden. Durch dieses sogenannte „Rescreening“ konnten falsch positive Klone identifiziert und aussortiert werden.

4.2.2.3 Isolierung terminaler Sonden aus den P1-, BAC- und PAC-Klonen

Im vorherigen Abschnitt 4.2.1 wurden bereits die methodischen Vorarbeiten und Verfahren für die Isolierung der für das „*Chromosome Walking*“ benötigten Sonden erläutert.

4.2.2.4 Southern-Blot Analyse zur Bestimmung der Position der Klone im Contig sowie zum Deletionsnachweis

Nach jedem „*Walking*“-Schritt wurde zunächst die relative Anordnung der identifizierten genomischen Fragmente zueinander bestimmt, indem die aus den genomischen Klonen isolierten terminalen Fragmente nachfolgend als Sonden für die Hybridisierung der Contig-Klone eingesetzt wurden. Außerdem konnte auf diese Weise die von der Transgenintegrationsstelle in physikalischer Hinsicht entfernteste Sonde ermittelt werden. Diese Sonde wurde daraufhin für die Analyse des Deletionsstatus, die eine Southern Blot Analyse der genomischen DNA der drei Genotypen $+/+$, $Ft/+$ und Ft/Ft beinhaltet, verwendet. Dabei zeigte das Ausbleiben eines Signals auf homozygoter Ft/Ft DNA an, daß die Ft Deletion über den bis dahin klonierten genomischen DNA Abschnitt hinausging und ein weiterer „*Walking*“-Schritt durchgeführt werden mußte. In Abbildung 9 auf Seite 69 sind einige genomische Southern-Blot Analysen mit verschiedenen Sonden dargestellt.

Die Analyse der terminalen Sonden der in einem Cluster vorliegenden Klone PAC95 (Sonde 43), PAC94 (Sonde 45) und PAC93 (Sonde 47) ergab, daß nur eine Sonde aus diesem Cluster (Sonde 43 aus PAC95) durch die Ft Mutation deletiert wurde (siehe Abbildung 9, H bis J). So zeigte diese Sonde 43 kein spezifisches Signal auf genomischer Ft/Ft DNA, während bei den Sonden 45 (aus PAC94) und 47 (aus PAC93) auf homozygoter Ft DNA ein Hybridisierungssignal beobachtet werden konnte. Dies bedeutete, daß die genomische Region zwischen Sonde 43 und 45 bzw. 47, den Übergang vom deletierten in den nicht deletierten DNA Bereich beinhaltete. Um diese Beobachtung zu verifizieren wurden weitere Hybridisierungen mit diesen Sonden durchgeführt, die in Abbildung 10 auf Seite 71 dargestellt sind.

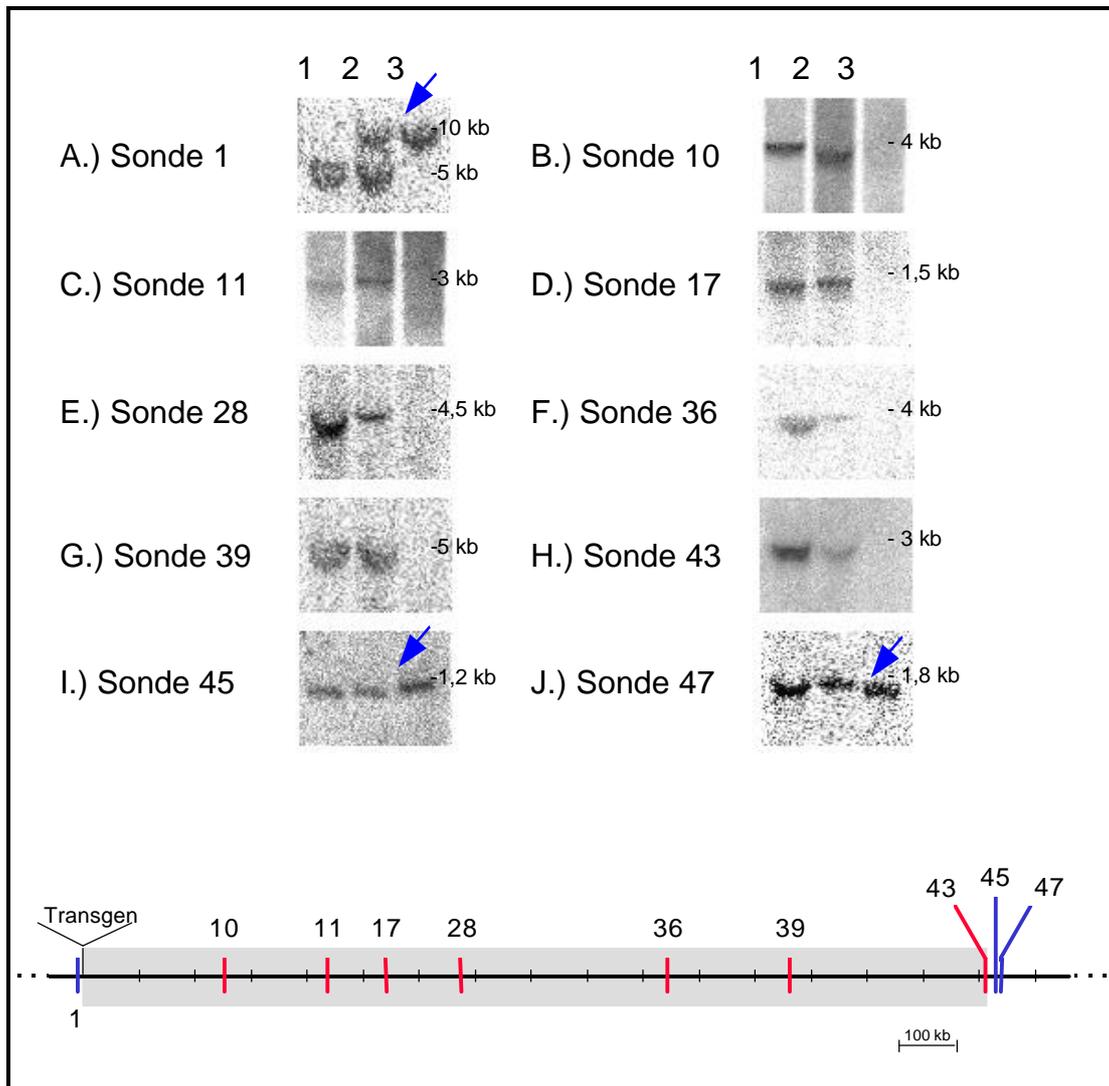


Abbildung 9: Southern-Blot Analysen unter Verwendung aus dem Ft Lokus isolierter genomischer Sonden. Spur 1: genomische Wt DNA, Spur 2: Ft/+ DNA, Spur 3: Ft/Ft DNA mit Hind III (A, E, F, G, H und I), Bgl II (C, D) und Ssp I (B, J) gespalten. Die untere Abbildung zeigt den Ft Lokus mit der Position der verwendeten Sonden. Sonde Nr.1 (van der Hoeven, 1994), außerhalb der Ft Deletion lokalisiert (blaue Linie), zeigte ein Ft-spezifisches polymorphes Hybridisierungsmuster. Die Sonden aus B bis H (rote Linien) zeigten keine Signale mit Ft/Ft DNA, da sie durch die Mutation deletiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigte die Hybridisierung der Sonden 45 und 47 (blaue Linien) eindeutige Signale in der Spur mit homozygoter Ft DNA (blaue Pfeile). Diese Sonden sind somit nicht in dem durch die Ft Mutation deletierten DNA Bereich.

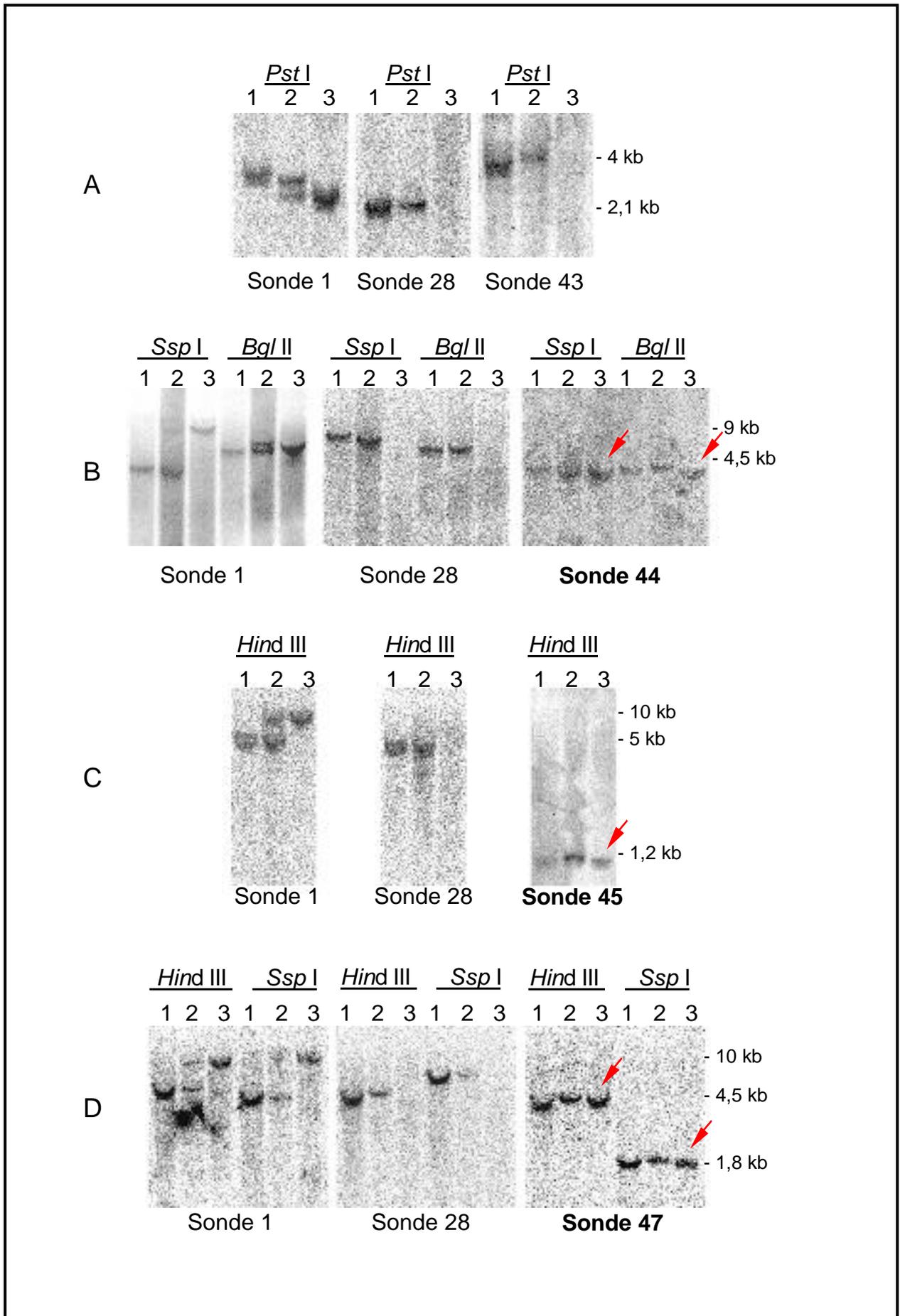


Abbildung 10: Southern-Blot Analyse zur Verifizierung des Deletionsendpunktes. Gezeigt sind vier verschiedene Blots (A bis D) auf die jeweils Spaltungen genomischer DNA (wie angegeben) der Genotypen $+/+$ (1), $Ft/+$ (2) und Ft/Ft (3) aufgebracht wurden. Für die Blots B und D wurden zusätzlich eine weitere Restriktion der drei Genotypen aufgebracht. Die Blots (A bis D) wurden mit Sonde 1 (siehe Abbildung 9, nicht deletiert!) hybridisiert, um den korrekten Genotyp der jeweiligen auf 1 bis 3 geladenen genomischen DNA nachzuweisen (Signale in allen Spuren). Sonde 28 (siehe Abbildung 9, deletierter Status!) wurde hybridisiert, um den Deletionsnachweis für die genomische Ft/Ft DNA zu führen. (Signalverlust in Spur 3). Durch Hybridisierung mit den Sonden 43, 44, 45 und 47 (vergleiche Abbildung 9 und Abbildung 11) wird durch Verlust der Signale in Spur 3, Blot A bzw. Signale in Spur 3 Blot B bis D (siehe rote Pfeile) der Deletionsendpunkt definiert.

Die zusätzliche Hybridisierung genomischer Southern-Blots unter Verwendung verschiedener restriktionsenzymatischer Spaltungen genomischer DNA aller drei Genotypen mit den Sonden 43 (PAC95), 44 (PAC96), 45 (PAC94) und 47 (PAC93) zeigte, daß nur mit den Sonden 44, 45 und 47 Signale in der Spur, die mit homozygoter Ft DNA beladen wurde, erhalten wurden (siehe Abbildung 10 A bis D, rechte Abbildung). Hingegen zeigt die Sonde 43 kein Signal mit genomischer Ft/Ft DNA (siehe Abbildung 10 A).

Dieselben Blots wurden ebenfalls mit zwei für den Ft Locus spezifischen Sonden hybridisiert, um den Genotyp der geladenen genomischen DNA nochmals zu bestätigen. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß eine Verwechslung der DNA Proben bei der Herstellung der Blots stattgefunden hatte. Eine der dafür verwendeten Sonden, stammte aus dem nicht deletierten Bereich der Transgenintegration (siehe Abbildung 9, Sonde 1). Diese Sonde zeigte bei allen verwendeten Restriktionsspaltungen der DNA polymorphe Hybridisierungssignale, die durch die Ft Mutation hervorgerufen wurden. Die andere verwendete Sonde, die aus dem deletierten Bereich stammte (siehe Abbildung 9, Sonde 28), zeigte dementsprechend nur Hybridisierungssignale mit genomischer Wt und $Ft/+$ DNA. Damit konnte gezeigt werden, daß genomische DNA der drei Genotypen $+/+$, $Ft/+$ und Ft/Ft auf den Blots vorhanden war und die Hybridisierungssignale der Sonden 44, 45 und 47 spezifisch auf genomischer Ft/Ft DNA erhalten wurden.

Zusammengenommen zeigten diese Experimente, daß der Übergang zwischen von in der Ft Mutation deletierter in nicht mehr deletierter genomischer DNA auf

den Fragmenten PAC96, PAC94 und PAC93 lokalisiert sein mußte und die bis dahin klonierte und zu einem Contig zusammengesetzte genomische DNA, den gesamten in der *Ft* Mutation deletierten Bereich abdeckte (siehe Abbildung 11)

4.2.2.5 Erstellung einer physikalischen Karte des *Fused toes* Lokus

Mit Hilfe des „*Chromosome Walking*“ konnten insgesamt 52 genomische Fragmente aus P1, BAC und PAC DNA-Bibliotheken isoliert und zu einem Contig zusammengesetzt werden. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht über den erhaltenen Contig, der insgesamt ca. 1,6 Mb von Chromosom 8 überspannt. In Tabelle 2 sind die am *Ft* Lokus eingezeichneten Sonden nochmal zusammengefasst. Die zugehörigen Identitätsnummern der einzelnen Klone sind im Anhang dieser Arbeit unter 7.3 angegeben.

Durch die parallel durchgeführten Experimente zur Identifizierung kodierender Sequenzen am *Ft* Lokus, auf die in Abschnitt 4.3 näher eingegangen wird, konnten die Gene *Ft2*, *Fto* (Peters, 1999), *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* (Peters, zur Publikation eingereicht) isoliert werden. Zur besseren Verständlichkeit der Lage dieser Gene innerhalb des Contigs am *Ft* Lokus werden diese bereits in diesem Abschnitt der Arbeit erwähnt.

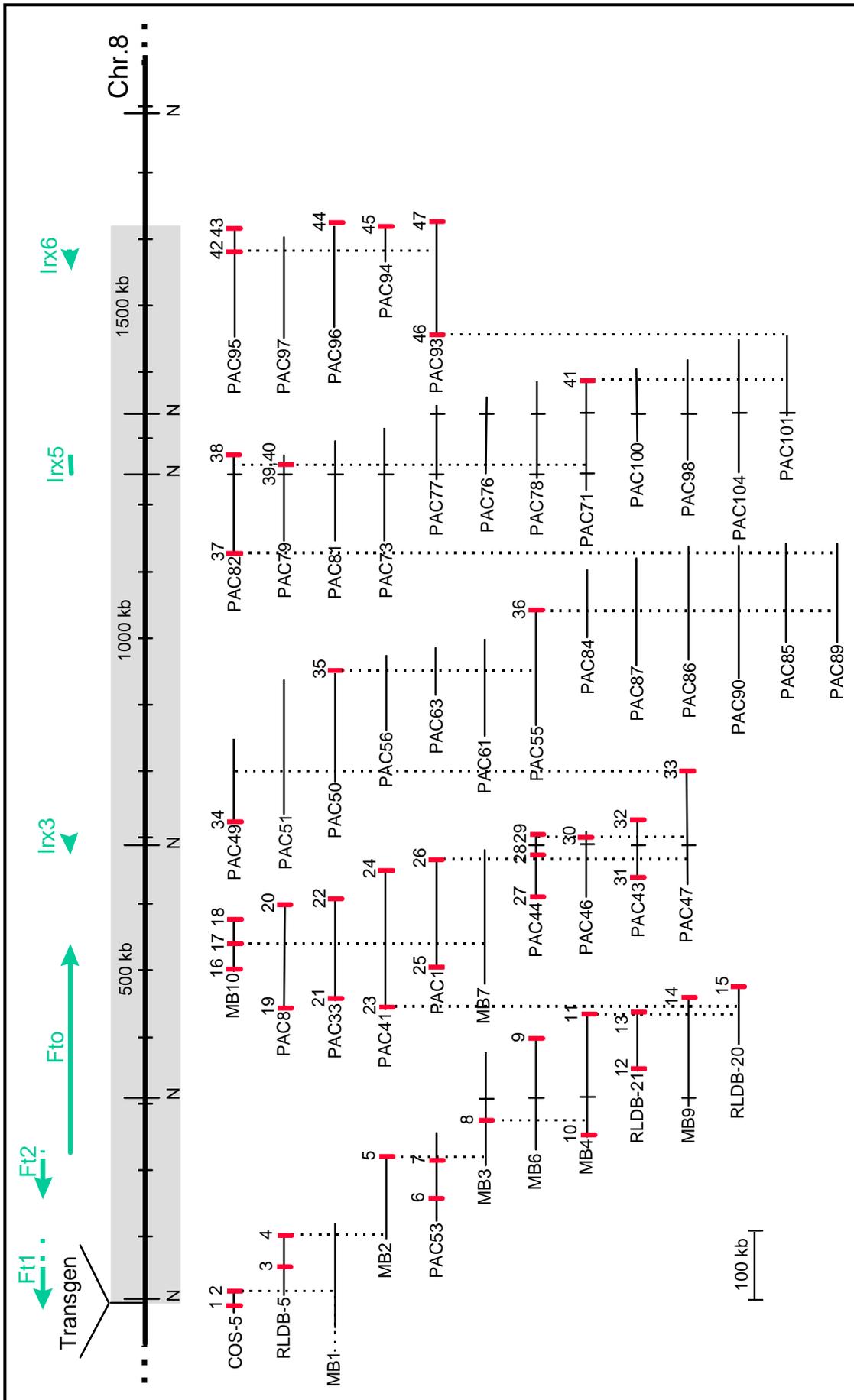


Abbildung 11 Physikalische Karte des Fused toes Lokus auf Chromosom 8. Die Abbildung zeigt den Bereich von Chromosom 8 in der die Integration des Transgens erfolgte. In Grau unterlegt ist der durch die Ft Mutation deletierte Teil der genomischen DNA. Ebenfalls dargestellt sind alle genomischen Fragmente, die mit Hilfe der „Chromosome Walking“-Technik identifiziert und zu einem Contig zusammengesetzt wurden. Im Anhang dieser Arbeit finden sich die zugehörigen Identitätsnummern der einzelnen Klone unter 7.3 wieder. Alle für die Kartierung verwendeten Hybridisierungs sonden (rot) sind von 1 bis 47 durchnummeriert und in Tabelle 2 nochmals aufgeführt. Die gestrichelten Linien verbinden alle genomischen Fragmente, die positive Signale für die jeweilige Sonde zeigten. Grüne Pfeile symbolisieren die bis zu diesem Zeitpunkt bereits identifizierten Gene, auf die in Abschnitt 4.3 näher eingegangen wird. N (Not I Restriktionsschnittstelle)

Nr.	Sondenbezeichnung	Herstellung der Sonde
1.	HPP500	400 bp <i>Pvu</i> II Fragment aus BP2.7 (van der Hoeven, 1994)
2.	BH600-F3/B8*	204 bp PCR-Produkt aus RLDB-5
3.	Exon 5/144-F1/B1*	84 bp PCR-Produkt aus RLDB-5
4.	TN1800-1100 (T7)	1100 bp <i>Pst</i> I/ <i>Sal</i> I Fragment aus TN1800 (Lesche, 1997)
5.	KX1200 (SP6)	1200 <i>Kpn</i> I/ <i>Xba</i> I Fragment aus pKA22
6.	3' <i>F2</i>	885 bp PCR-Produkt mit den Primern Exon 2/2-F1 und C153'-B1 aus C15
7.	5' <i>F2</i>	499 bp PCR-Produkt mit den Primern <i>F2</i> -F1 und <i>F2</i> -B1 aus PCR860
8.	27-1	500 bp <i>Apa</i> I Fragment aus pKA27
9.	39-1 (T7)	900 bp <i>Kpn</i> I Fragment aus pKA39
10.	35-4 (T7)	1200 bp <i>Kpn</i> I/ <i>Bam</i> H I Fragment aus pKA35
11.	41-2 (SP6)	900 bp <i>Kpn</i> I/ <i>Eco</i> R I Fragment aus pKA41
12.	48-2 (SP6)	1600 bp <i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I Fragment aus pKA48
13.	48-1 (T7)	2000 bp <i>Not</i> I/ <i>Xba</i> I Fragment aus pKA48
14.	MB9T7-BAC	37 bp Oligonukleotid
15.	46-1 (T7)	750 bp <i>Sac</i> I/ <i>Not</i> I Fragment aus pKA46
16.	MB10-F1/B4* (SP6)	180 bp PCR-Produkt aus MB10
17.	3' <i>Fto</i>	254 bp <i>Bst</i> X I/ <i>Xba</i> I Fragment aus MPMGc559J0125 (Peters, 1999)
18.	MB10-F3/B3* (T7)	247 bp PCR-Produkt aus MB10
19.	PAC8T7-F1/B2*	120 bp PCR -Produkt aus PAC8
20.	PAC8SP6-F1/B10*	238 bp PCR-Produkt aus PAC8
21.	PAC33T7-F1/B2*	105 bp PCR-Produkt aus PAC33
22.	PAC33SP6-F5/B2*	346 bp PCR-Produkt aus PAC33
23.	PAC41SP6-F3/B1*	187 bp PCR-Produkt aus PAC41
24.	PAC41T7-F1/B1*	300 bp PCR-Produkt aus PAC41
25.	PAC1T7-F1/B4*	204 bp PCR-Produkt aus PAC1
26.	PAC1SP6-F2/B10*	396 bp PCR-Produkt aus PAC1

27.	PAC44T7-F7/B1*	274 bp PCR-Produkt aus PAC44
28.	<i>lrx3</i> -F2/B2*	500 bp PCR-Produkt aus PAC44
29.	PAC44SP6-F1/B8	411 bp PCR-Produkt aus PAC44
30.	<i>lrx3</i> -F1/B1*	350 bp PCR-Produkt mit den Primern <i>lrx3</i> -F1/B1 aus PAC46
31.	PAC43SP6-F2/B5*	330 bp PCR-Produkt aus PAC43
32.	PAC43T7-F1/B1*	225 bp PCR-Produkt aus PAC43
33.	PAC47T7-F1/B5*	285 bp PCR-Produkt aus PAC47
34.	PAC49SP6	ca. 1500 bp PCR-Produkt mit den Primern AP2/PCR-Anchor aus pKA79
35.	PAC50T7	ca. 1300 bp PCR-Produkt mit den Primern AP2/PCR-Anchor aus pKA78
36.	PAC55T7-F5/B4*	271 bp PCR-Produkt aus PAC55
37.	PAC82T7-F1/B2*	172 bp PCR-Produkt aus PAC82
38.	PAC82SP6-F1/B15*	229 bp PCR-Produkt aus PAC82
39.	3' <i>lrx5</i>	399 bp <i>Nco</i> I Fragment aus W54596 (Peters, zur Publikation eingereicht)
40.	<i>lrx5</i> -F1/B2*	149 bp PCR-Produkt mit den Primern <i>lrx5</i> -F1/B2 aus W54596 (Peters, zur Publikation eingereicht)
41.	PAC71T7-F4/B2*	219 bp PCR-Produkt aus PAC71
42.	<i>lrx6</i> -F1/B1*	ca. 1000 bp PCR-Produkt mit den Primern <i>lrx6</i> -F1/B1 aus PAC95
43.	PAC95SP6-F1/B3*	552 bp PCR-Produkt aus PAC95
44.	PAC96T7-F1/B2*	241 bp PCR-Produkt aus PAC96
45.	PAC94SP6-F5/B3*	364 bp PCR-Produkt aus PAC94
46.	PAC93Sp6-FF1/B6*	198 bp PCR-Produkt aus PAC93
47.	PAC93T7-F1/B1*	196 bp PCR-Produkt aus PAC93

Tabelle 2 Zusammenfassung aller vom *Ft* Locus isolierten Sonden.

(* Bezeichnung der Sonde identisch mit den verwendeten Primern)

4.2.2.6 Verifizierung der Kartierung des *Ft* Locus auf genomischer DNA

Durch die Erstellung einer Restriktionskarte sollte die durchgeführte Kartierung des *Fused toes* Locus mit den isolierten Klonen auf genomischer Ebene verifiziert werden. Da es sich hierbei um eine relativ große zu kartierende DNA-Region handelte, konnten dafür nur sehr selten schneidende Restriktionsenzyme verwendet werden. Zur Bestimmung der Insertionsgröße der genomischen Klone wurde daher das Restriktionsenzym *Not* I eingesetzt, da es zum einen erlaubte die genomische Insertion vom Klonierungsvektor abzuspalten und zum anderen eine mittlere Fragmentlänge von ca. 200 kb bei Spaltung genomischer Maus-DNA liefert. Entsprechend konnten zuvor in einzelnen Klonen im Rahmen der Größenanalytik (siehe 4.2.2.2, Abbildung 8) *Not* I Restriktionsschnittstellen detektiert und

für die interne Klonzuordnung zur Erstellung des Contigs genutzt werden. Folglich sollten diese Spaltstellen auch für die Restriktionskartierung der genomischen DNA nutzbar sein.

In den folgenden Experimenten wurde daher genomische DNA mit *Not* I gespalten und in einer Pulsfeld-Gelelektrophorese aufgetrennt. Danach erfolgte die Hybridisierung mit ausgewählten Sonden, um die Größe der aufeinander folgenden *Not* I Fragmente sichtbar zu machen (siehe Abbildung 12, A bis D).

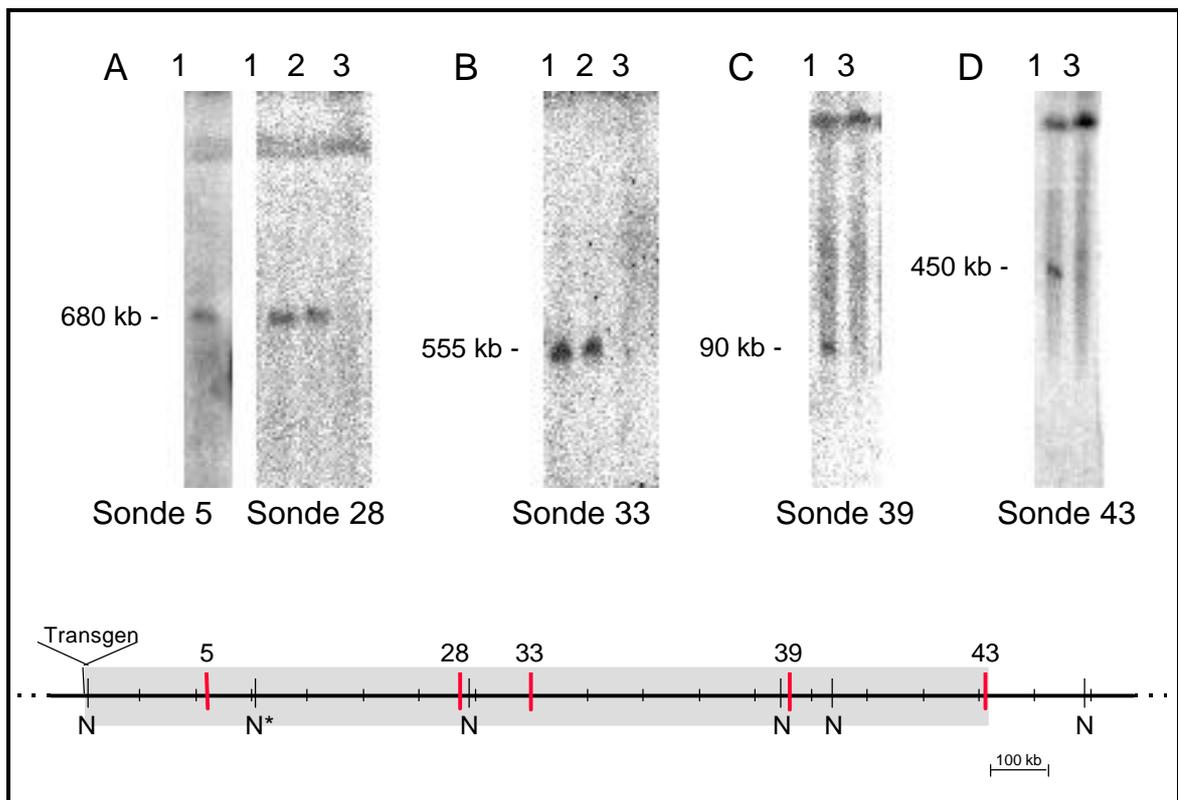


Abbildung 12: Verifizierung der *Not* I Fragmentgrößen am *Ft* Locus. Die oberen Abbildungen (A bis D) zeigen die mit *Not* I gesplante *Wt* DNA (1), *Ft/+* DNA (2) und *Ft/Ft* DNA (3), nach Auftrennung in einer Pulsfeld-Gelelektrophorese und Hybridisierung mit den jeweils angegebenen Sonden 5, 28, 33, 39 und 43. In der unteren Abbildung sind die Positionen der Sonden auf den *Not* I Fragmenten am *Ft* Locus in rot eingezeichnet. Grau unterlegt ist der Bereich der genomischen DNA, der durch die *Ft* Mutation deletiert wurde. Alle für die Hybridisierung verwendeten Sonden sind durch die *Ft* Mutation deletiert. N (*Not* I Restriktionsspaltsstelle), N* (*Not* I Restriktionsspaltsstelle, nur in genomischen Klonen nachweisbar, siehe Text).

In dem unteren Teil von Abbildung 12 ist die so erhaltene physikalische *Not* I Restriktionskarte des *Ft* Locus dargestellt. Die erhaltenen *Not* I Fragmentgrößen

bestätigten zum einen die Reihenfolge der aus dem Contig vorhergesagten *Not* I Schnittstellen und zum anderen konnten sie nun dazu benutzt werden eine im physikalischen Sinne maßstabsgenaue Anordnung der einzelnen Klone des Contigs vorzunehmen. (Erhaltene *Not* I Fragmentgrößen wurden bei der Anfertigung der physikalischen Karte des *Fused toes* Locus in Abbildung 11 mit berücksichtigt)

Die Hybridisierungen mit Sonde 5 und Sonde 28 ergaben allerdings nicht die erwarteten ca. 300 und 380 kb großen DNA-Fragmente (siehe Abbildung 11). Vielmehr wurde mit beiden Sonden ein 680 kb großes Fragment detektiert, was auf den Verlust bzw. die Maskierung durch Methylierung der entsprechenden *Not* I Erkennungssequenz hindeutet (siehe Abbildung 12, N*). Für die Verlusthypothese spricht, daß die isolierten genomischen Klone aus einer vom Mausstamm 129Svj angefertigten DNA-Bibliothek stammten, während die für die Pulsfeld-Gelelektrophorese verwendete DNA aus C57BL/6 Mäusen isoliert wurde. Die nicht vorhandene *Not* I Schnittstelle könnte demnach einen Polymorphismus zwischen diesen beiden Mausstämmen darstellen. Diese Hypothese wurde in einer weiteren Pulsfeld-Gelelektrophorese unter Verwendung genomischer DNA, die zuvor aus einer 129Svj Maus isoliert wurde, überprüft (Daten hier nicht gezeigt). Da auch hier die *Not* I Schnittstelle nicht nachgewiesen werden konnte wurde angenommen, daß eine genomisch vorliegende Methylierung die Spaltung durch das methylierungssensitive Enzym *Not* I (Nelson, 1993); (Roberts, 1993) verhindert. Eine derartige Inhibition kann offensichtlich nach bakterieller Replikation nicht mehr zum Tragen kommen. Auf einen entsprechenden experimentellen Nachweis, der die Demethylierung einer ausreichenden Menge in Agarose eingebetteter genomischer DNA mit nicht unerheblichen Mengen an Demethylasen erfordert hätte, wurde verzichtet.

4.3 Identifizierung von Genen am *Fused toes* Locus

Durch die physikalische Kartierung des *Fused toes* Locus mit Hilfe der „*Chromosome Walking*“-Technik konnten genomische Fragmente isoliert werden, die den gesamten durch die *Ft* Mutation deletierten Bereich abdecken. Mit der Klonierung dieser genomischen Fragmente war die Voraussetzung geschaffen

auch kodierende Sequenzen zu identifizieren. Eine Methode, die dafür verwendet wurde, war das sogenannte „*Exon Trapping*“, daß die Detektion von Genen aufgrund vorhandener Spleißstellen zwischen den Exon-Intron-Übergängen ermöglicht.

4.3.1 Klonierung bisher unbekannter Sequenzanteile der *Ft1* cDNA aus RLDB-5

Zur Analyse des genomischen Klons RLDB-5 mit Hilfe der „*Exon Trapping*“-Technik wurde dieser Klon zunächst mit den Restriktionsenzymen *Bgl* II und *Sac* I gespalten und die erhaltenen Subfragmente durch eine „*Shotgun*“ Klonierung in den „*Exon Trap*“-Vektor pSPL3B subkloniert. Nach Durchführung des „*Exon Trapping*“ (siehe 3.14) konnte ein 103 bp großes Fragment, welches als Exon 5/144 bezeichnet wurde, identifiziert werden. Die Sequenz ist in Abbildung 13 dargestellt.

Exon 5/144 (103 bp)

```

1 ACAGGCAACA GGCCCCCTGT GATGGCGGTG TCTTGAAGC AGGCCGATCT
51 AATGAACATG CTTGTTTTGT GTTGAGGACA GAGCCTTACA GACAACCTCA
101 AAG

```

Abbildung 13: Sequenz des mit „*Exon Trapping*“ erhaltenen Fragments aus dem P1-Klon RLDB-5.

Der Vergleich dieser Sequenz mit den Eintragungen der Datenbank GenBank mouse EST („*Expressed Sequence Tags*“) unter Verwendung des Programms BLASTN (Altschul, 1997) führte zur Identifizierung zweier EST Klone (gb:AA684254, gb:AA681324). Von EST AA684254 und EST AA681324 liegen 797 bzw. 538 bp der Sequenz publiziert vor. Wie in Abbildung 14 schematisch dargestellt, enthielten die beiden EST Klone 86 bzw. 85 bp der 3' Sequenz von Exon 5/144 und daran anschließend die Sequenz des *Ft1* Gens ab Exon 3 (Lesche, 1997). *Ft1* ist ein, wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, am *Ft* Locus durch die Mutation deletiertes Gen.

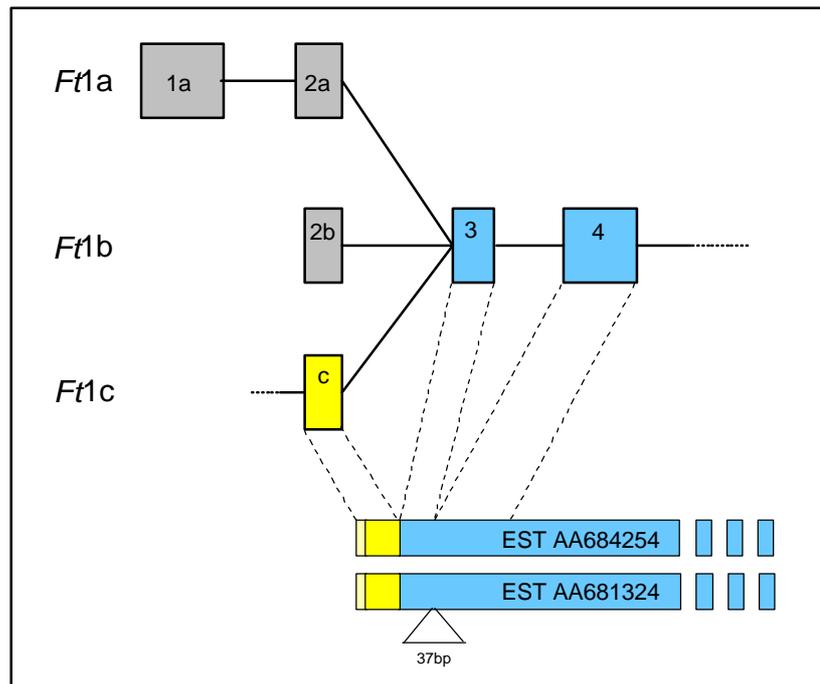


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Ft1 cDNA. Durch die „Exon Trapping“-Technik konnte ein 103 bp großes Exon (gelb) identifiziert werden, welches wahrscheinlich zu einer neuen Spleißvariante der Ft1 cDNA (Ft1c) gehört. Die murinen EST Klone AA681324 und AA684254 enthalten 86 bzw. 85 bp der neuen Exonsequenz sowie in 3' Richtung von Exon 3 liegende Ft1 Sequenzen (blau). EST AA681324 enthält zusätzlich 37 bp aus Intron 3.

Die Identifizierung der in der Datenbank enthaltenen EST Klone legt den Schluß nahe, daß es sich bei Exon 5/144 um weitere bisher unbekannte Sequenzanteile des Ft1 Gens handelt. Bis zu diesem Zeitpunkt der Arbeit waren zwei verschiedene Transkripte von Ft1 (Ft1a und Ft1b) mit zwei verschiedenen 5'-UTR-Bereichen kloniert ((Lesche, 1997) und siehe Abbildung 14). Der längste offene Leserahmen für das potentielle Ft1 Protein wird durch die unterschiedlichen 5'-UTR-Bereiche nicht betroffen, da der Translationsstart sich in Exon 3 befindet.

Exon 5/144 stellt wahrscheinlich einen weiteren 5'-UTR-Bereich dar, der zu einem weiteren Transkript von Ft1 (Ft1c) zählt. Da die EST Klone aus einer cDNA-Bibliothek, die wiederum aus RNA von Embryonen im Zweizellstadium hergestellt wurde stammen, ist anzunehmen das Ft1c in frühen Embryonen exprimiert wird. Hierbei wird betont, daß es sich bei Exon 5/144 nicht um den vollständigen 5'-

UTR-Bereich handeln kann, da mit dem Verfahren des „*Exon Trapping*“ keine terminalen Exons detektiert werden können. Es sollten demnach noch weitere unbekannte Sequenzen von *Ft1c* existieren, die bisher noch nicht weiter kloniert werden konnten. In dieser Arbeit wurden aus zeitlichen Gründen keine weiteren Untersuchungen bezüglich der Klonierung *Ft1* relevanter Sequenzen durchgeführt.

4.3.2 Partielle Klonierung des *Ft2* Gens

Ein weiteres genomisches Fragment welches mit Hilfe der „*Exon Trapping*“-Technik untersucht wurde, war der BAC-Klon MB2. Dieser Klon wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen *BamH* I, *Bgl* II, *Sac* I und *BamH* I/*Bgl* II gespalten, die erhaltenen Subfragmente ebenfalls durch eine „*Shotgun*“ Klonierung in den „*Exon Trap*“ Vektor pSPL3B eingebracht und das „*Exon Trapping*“ Protokoll durchgeführt. Dabei konnten zwei Fragmente, die als Exon 1/25 und Exon 2/2 bezeichnet wurden und deren Sequenz in Abbildung 15 dargestellt ist, identifiziert werden

Exon 1/25 (85 bp)

Exon 1/25-F1 →

1 TGATCTACCT GGATAAAGAA AACAACCCAG CGGTGAGAGA CATCTTAAAA
 51 GCCATACTGC AAAGGCGAGA ACTGCCTCAC AGAAG
 ← Exon 1/25-B1

Exon 2/2 (134 bp)

Exon 2/2-F1 →

1 TGTGCGCTTC ACCGTGGTCA GTGATCCTCC CGAGGACGAG CAGGACCTAG
 51 AATGTGAGGA CATTGGGGTT GCCCATGTTG ACCTTGCTGA CCTGTTTCAG
 101 AAAGGAAGAG ACATCATAGA GCAAGATATC GATG ← Exon 2/2-B8

Abbildung 15: Sequenzen der durch das „*Exon Trapping*“-Verfahren aus dem BAC-Klon MB2 identifizierten Fragmente. Unterstrichene Bereiche markieren die für die Fragmente ausgewählten Primerpaare.

Die Sequenz beider Fragmente wurde mit Hilfe des Programms BLASTN (Altschul, 1997) gegen die Eintragungen der Datenbank GenBank verglichen. Dabei konnten keine nennenswerten Homologien zu anderen Sequenzeinträgen in

der Datenbank festgestellt werden. Um zu klären, ob es sich bei den isolierten Exons 1/25 und Exon 2/2 tatsächlich um exprimierte Sequenzen handelt, wurde eine RT-PCR Analyse der Expression in verschiedenen Organen und Embryonalstadien durchgeführt. Auf diese Weise wurde zunächst Exon 1/25, mit den unter Abbildung 15 angegebenen Primern, analysiert. Um eine Amplifizierung von eventuell kontaminierender genomischer DNA erkenntlich zu machen, wurde als Kontrollprobe für jedes untersuchte Organ jeweils ein Reaktionsansatz ohne das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. In diesen Fällen sollte nur bei Vorliegen einer DNA Kontaminierung ein PCR-Produkt amplifiziert werden. In Abbildung 16 ist das Ergebnis der durchgeführten RT-PCR Analyse dargestellt.

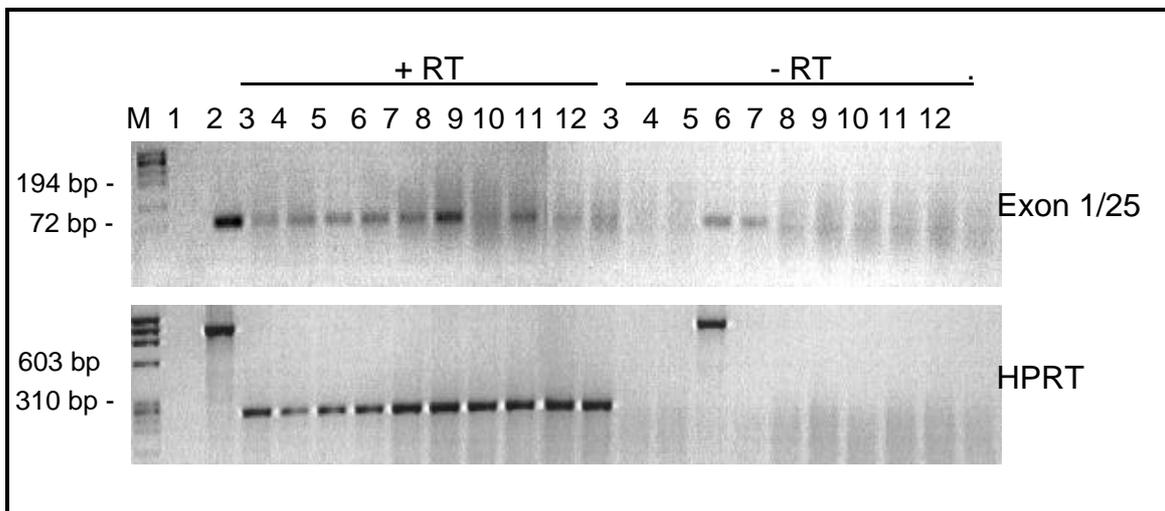


Abbildung 16: Expressionsanalyse von Exon 1/25 mittels RT-PCR. RNA aus 13,5 (3), 12,5 (4), 11,5 (5) Tage alten Embryonen und Gehirn (6), Niere (7), Hoden (8), Lunge (9), Herz (10), Leber (11) Milz (12) adulter Mäuse wurde mit oligo dT-Primern revers transkribiert (+RT) und in einer PCR mit Exon 1/25-spezifischen Primern eingesetzt (obere Abbildung). Als Kontrolle wurden die gleichen Ansätze ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase angesetzt (-RT). In der unteren Abbildung wurde die Amplifizierung mit HPRT-spezifischen Primern (3'HPRT und 5'HPRT) durchgeführt. Spur 1: Wasserkontrolle; Spur 2: Amplifikat von genomischer DNA. M (Längenstandard: FX Hae III). In Spur 5 (11,5 Embryo) und 6 (Gehirn) ist eine Amplifizierung der PCR-Produkte von genomischer DNA nicht auszuschließen, da selbst ohne das Enzym Reverse Transkriptase eine Amplifizierung erfolgte.

Aus der RT-PCR Analyse wurde ersichtlich, daß Exon 1/25 tatsächlich exprimiert wird. Das stärkste Signal wurde im Hoden adulter Mäuse nachgewiesen. Weiter-

hin wurden Signale in Niere, Herz, 13,5 und 12,5 Tage alten Embryonen detektiert. Außerdem zeigte die Analyse, daß es sich bei Exon 1/25 nur um ein einzeln isoliert vorliegendes Exon handelte, da die Amplifizierung genomischer DNA, die als Positivkontrolle mitgeführt wurde (siehe Abbildung 16, Spur 2) ein im Vergleich zur Amplifizierung aus RNA Produkt gleicher Größe lieferte.

Nach dem Nachweis der Expression von Exon 1/25 in Hoden-Gewebe wurde dieses Fragment als Sonde eingesetzt um eine Hoden spezifische cDNA-Bibliothek (siehe 3.4.4) zu hybridisieren. Auf diese Weise konnte ein positiver cDNA-Klon, der als C15 (DKFZp411B13166Q2) bezeichnet wurde, identifiziert werden. Die PCR Analyse zeigte, daß dieser Klon neben des Exon 1/25 auch in direkter Nachbarschaft das zweite, des aus MB2 mit Hilfe der „*Exon Trapping*“-Technik isolierte, Exon 2/2 beinhaltete. Durch eine Hoden spezifische RT-PCR Analyse mit den Primern Exon 1/25-F1 und Exon 2/2-B8 (siehe Abbildung 15) konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Daten hier nicht gezeigt). Die beiden Exons stammen demnach aus dem gleichen Gen. Die Transkriptgröße des zugehörigen Gens wurde mit Hilfe einer Northern-Blot Analyse unter Verwendung von C15 als Sonde untersucht (siehe Abbildung 17).

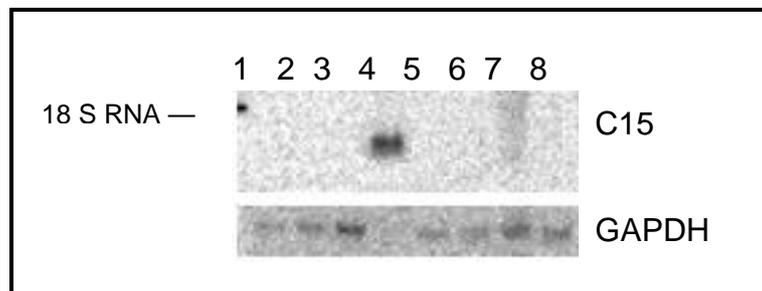


Abbildung 17: Northern-Blot Analyse zur Identifizierung der Transkriptgröße des zum cDNA-Klon C15 zugehörigen Gens. Der Blot mit Gesamt-RNA aus Milz (1), Leber (2), Thymus (3), Hoden (4), Niere (5), Gehirn (6), Embryonen Tag 11,5 (7) und 12,5 (8) wurde mit einem ca. 3 kb großen Not I/Sal I Fragment aus dem cDNA-Klon C15 hybridisiert (obere Abbildung). Zur Kontrolle der RNA-Beladung wurde der Blot mit GAPDH hybridisiert (untere Abbildung).

Obwohl die aus C15 isolierte Sonde 3 kb groß war, wurde ein nur ca. 0,9 kb großes Transkript in aus Hoden isolierter RNA identifiziert. Die Sequenzierung von C15 zeigte, daß zwei polyA Sequenzen innerhalb des cDNA-Klons vorhanden

waren, was auf die Existenz zwei verschiedener Transkripte in einem cDNA-Klon hinweisen könnte.

Mit PCR und Southern-Blot Analysen konnte in der Tat bewiesen werden, daß nur ein Teil der in C15 enthaltenen Sequenz spezifisch für den *Ft* Locus war. Dieser Teil beinhaltete bei einer Größe von 2 kb die Exons 1/25 und 2/2 und hybridisierte entsprechend mit dem genomischen Klon MB2, aber nicht mit homozygoter *Ft* DNA. Der hingegen 0,9 kb große 5' lokalisierte Sequenzanteil aus C15, der genau der im Northern-Blot erhaltenen Transkriptgröße entsprach, war nicht spezifisch für die *Ft* Mutation, da diese Sequenz nicht in genomischer *Ft/Ft* DNA deletiert war. Zudem konnte diese Sequenz auch nicht auf einem für den *Ft* Locus spezifischen genomischen Klon nachgewiesen werden.

Um die zugehörige Transkriptgröße für den *Ft* spezifischen 3' lokalisierten Sequenzanteil von C15 zu ermitteln, wurde mit einer für diesen Bereich spezifischen Sonde erneut eine Northern-Blot Analyse durchgeführt (siehe Abbildung 18).

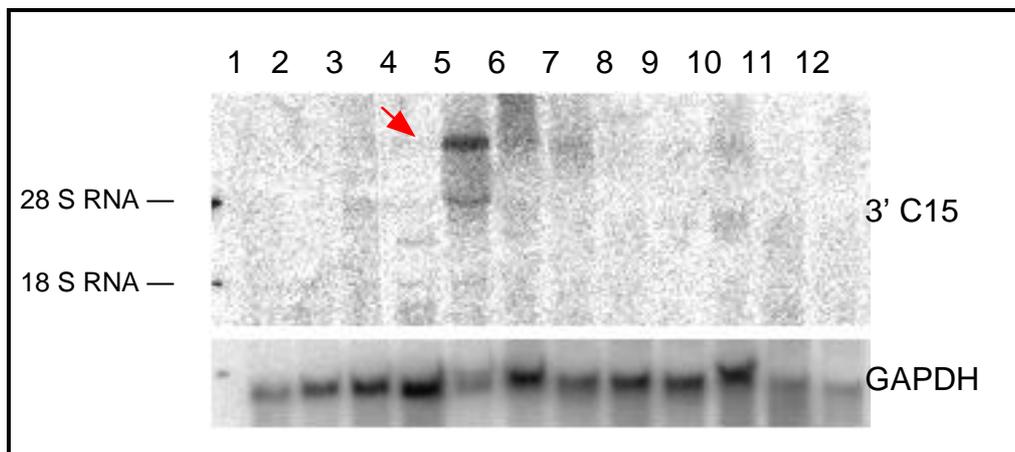


Abbildung 18: Northern-Blot Analyse unter Verwendung des *Ft*-spezifischen Sequenzanteils aus dem cDNA-Klon C15. Auf dem Blot wurde aus Geweben isolierte Gesamt-RNA (Milz (1), Leber (2), Thymus (3), Herz (4), Hoden (5), Niere (6), Gehirn (7), Embryo Tag 8,5 (8), Tag 10,5 (9), Tag 11,5 (10), Tag 12,5 (11) und Tag 14,0 (12)) geladen. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 885 bp großen PCR-Produkt generiert mit den Primern Exon2/2-F1 und C15 3'-B1 aus dem 3' Bereich des cDNA-Klons C15 (obere Abbildung). Der rote Pfeil markiert ein ca 6 kb großes Transkript. Eine Hybridisierung mit GAPDH diente als Kontrolle zum Vergleich der geladenen RNA Mengen (untere Abbildung).

In dieser Analyse konnte ein etwa 6 kb großes Transkript wiederum in RNA isoliert aus Hoden detektiert werden. Der cDNA-Klon C15 enthielt somit nur etwa 2 kb der Sequenz des am *Ft* Locus neu entdeckten Gens, welches in Anlehnung an die *Ft* Mutante als *Ft2* bezeichnet wurde. Die zusätzliche in derselben Spur etwa 4,5 kb große Bande ist vermutlich auf eine Kreuzhybridisierung mit der 28 S RNA zurückzuführen. Im Gegensatz zur RT-PCR-Analytik, die eine Expression des *Ft2* Gens auch in anderen Organen zeigte (siehe Abbildung 16), konnte dieses Expressionsmuster nicht auf Northern-Blot Ebene wiederholt werden. Die Ursache könnte in der geringeren Sensitivität des Northern Blot Verfahrens liegen, die jedoch durch eine Verwendung von polyA⁺-RNA erhöht werden könnte.

Bis zu diesem Zeitpunkt gab es noch weitere zusammenhängende Fragmente, die von Dipl.biol. T. Peters in einer parallel angefertigten Doktorarbeit, aus dem BAC-Klon MB3 isoliert und mit Hilfe einer als „*Rapid Amplifikation of cDNA Ends*“ (RACE) bezeichneten Technik erweitert wurden. Dieses Fragment, welches hier als PCR860 bezeichnet wurde, war eine Kandidatensequenz für den fehlenden 5' Sequenzanteil von *Ft2*, da die BAC-Klone MB3 und MB2, dem Klon aus dem Exon 1/25 und 2/2 isoliert wurde, überlappten. Sollten PCR860 und der 3' Sequenzanteil von *Ft2* auf einem Transkript lokalisiert sein, mußte dies mittels einer RT-PCR unter Verwendung der Primer *Ft2*-F820 und Exon 1/25-B1 (siehe Abbildung 19) und RNA aus Hoden nachweisbar sein. Tatsächlich konnte ein Produkt amplifiziert werden, das die Sequenzanteile aus C15 und PCR860 sowie die Verbindung beider Sequenzen umfasst. In Abbildung 19 auf Seite 85 ist die erhaltene cDNA Sequenz von *Ft2* schematisch dargestellt.

Die 3894 bp lange Sequenz aus dem 3'-Bereich der *Ft2* cDNA wurde kloniert und sequenziert. Die erhaltene Sequenz ist im Anhang dieser Arbeit wiedergegeben. Der längste gefundene offene Leserahmen in dieser Sequenz erstreckt sich über 2528 bp; wobei kein Translationsstart für ein potentiell *Ft2* Protein identifiziert werden konnte. Weitere Untersuchungen des *Ft2* Gens, wie die Klonierung weiterer 5' cDNA Sequenzen oder Expressionsanalysen wurden aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

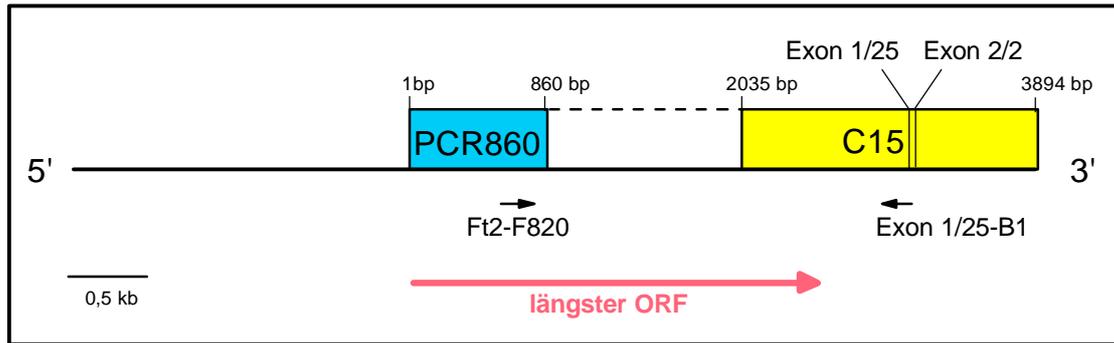


Abbildung 19: Schematische Darstellung der cDNA von Ft2. Die in dem cDNA-Klon C15 enthaltene Sequenz (gelb) konnte mit Hilfe eines RT-PCR Nachweises aus Hoden unter Verwendung der Primer Exon 1/25-B1 und Ft2-F820 mit dem Fragment PCR860 (blau) verbunden werden. Die Sequenzierung der 3894 bp großen cDNA ergab einen über 2528 bp langen offenen Leserahmen (ORF), der wahrscheinlich für das potentielle Ft2 Protein kodiert.

4.3.3 Beschreibung weiterer am *Fused toes* Locus lokalisierter Gene

Zunächst konnte unter Verwendung des genomischen Klonen MB3 ein weiteres vollständig kloniertes Gen, das *Fto* Gen, isoliert werden (Peters, 1999). Die Position des Gens am *Ft* Locus und dessen Lage auf den genomischen Klonen ist unter Abschnitt 4.2.2.5, Abbildung 11 dargestellt.

Ende 1998 wurde eine Karte des humanen Genoms publiziert in der die relative Anordnung von ca. 30.000 humanen EST Klonen, die mittels „Radiation Hybrid Mapping“ kartiert wurden, aufgeführt wird (Deloukas, 1998, www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap). Es ist bekannt, daß einige chromosomale Regionen des humanen Genoms in einer gleichen oder ähnlichen Anordnung im Mausgenom auftreten. So findet sich, z. B. der Abschnitt von Chromosom 8, der den *Fused toes* Locus beinhaltet, im Menschen auf Chromosom 16 wieder (siehe Mouse to Human Homology Region Map, Chromosome 8, www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Homology). Mit Hilfe des in der Einleitung erwähnten, zum *Ft1* benachbarten und in der nicht deletierten Region lokalisierten *p130* Gens, das zum humanen RETINOBLASTOMA-LIKE PROTEIN 2 (RB-LIKE 2) homolog ist, konnte die in der Karte korrespondierende Region identifiziert werden (in Zusammenarbeit mit Dipl.biol. T. Peters, gleiche Arbeitsgruppe). Der Sequenzvergleich benachbarter Klone mit der *Fto* Sequenz

lieferte den zu *Fto* homologen EST-Klon sTSG31520 und damit den zweiten Referenzpunkt in der EST-Karte. Die Analyse des nächstgelegenen Nachbarklons EST Klon sTSG10226 identifizierte das humane Homolog zu dem bereits bekannten murinen *Iroquois 3 (Irx3)* Gens (Bosse, 1997). Deshalb wurde das *Irx3* auf seine Präsenz in *Ft/Ft* DNA hin untersucht. Es stellte sich heraus, daß auch dieses Gen durch die *Ft* Mutation im Genom deletiert war (siehe 4.2.2.5, Abbildung 11).

In der Folgezeit wurden durch Homologie gestützte Analysen die am *Fused toes* Locus lokalisierten und ebenfalls vollständig deletierten Gene *Irx5* und *Irx6* identifiziert (Peters, zur Publikation eingereicht). Ihre genaue Position und Lage auf den genomischen Fragmenten ist ebenfalls unter 4.2.2.5, Abbildung 11 dargestellt.

4.4 „Rescue“-Experiment: Herstellung *Irx3*-transgener Mäuse

Das *Irx3* Gen ist als Folge der *Fused toes* Mutation vollständig deletiert. Die Frage, die sich nun stellte war, welchen Anteil der Verlust dieses Gens auf den *Ft* Phänotyp der Maus hat. Zu diesem Zweck sollte *Irx3* wieder in das Genom der *Ft* Maus in Form eines Transgens zurückgebracht werden. Wenn der *Fused toes* Phänotyp ganz oder teilweise auf eine fehlende *Irx3* Expression zurückzuführen wäre, dann müßte ein *Irx3*-Transgen, das ein endogenes *Irx3*-Expressionsmuster aufweist, den Wildtyp-Phänotyp in der *Ft* Maus ganz bzw. teilweise wiederherstellen können („Rescue“-Experiment). Aus diesem Grund wurden mit zwei genomischen Fragmenten, welche die gesamte kodierende Sequenz von *Irx3* enthielten, verschiedene transgene Mauslinien hergestellt. Die *Irx3*-transgenen Mäuse wurden dann mit *Ft* Mäusen gekreuzt um den Einfluß des Transgens auf den *Ft*-Phänotyp zu untersuchen.

4.4.1 *Irx3* kann mit Hilfe der Klone PAC43 und PAC44 in *Ft/Ft* Mausfibroblasten exprimiert werden.

Um in den *Irx3*-transgenen Mäusen eine mit der Expression des endogenen *Irx3* Gens vergleichbare Expression zu erreichen, sollte ein genomisches Fragment

als Transgen eingesetzt werden, das zusätzlich zu der kodierenden Sequenz auch alle regulatorischen Elemente, wie z. B. den Promotor enthält. Zum Zeitpunkt der Analyse war jedoch nichts über den *Irx3* Promotor oder andere regulatorische Elemente bekannt. Während der Kartierung des *Fused toes* Locus wurden jedoch genomische Fragmente identifiziert (PAC43, 44, 46 und 47), die zusätzlich zur Region, in der sich die codierende Sequenz des *Irx3* Gens befand, weitere 3' und 5' Sequenzen in einem Größenbereich von ca. 10 bis 100 kb beinhalten (siehe 4.2.2.5, Abbildung 11). Diese Klone wurden daraufhin bezüglich ihrer *Irx3* Expressionsaktivität analysiert. Dazu wurden je 10 µg PAC43, PAC44, PAC46 und PAC47 DNA transient in homozygote *Ft* Mausfibroblasten transfiziert, nach zweitägiger Inkubation die RNA der transfizierten Zellen isoliert und mit Hilfe einer RT-PCR auf Expression von *Irx3* hin untersucht (siehe Abbildung 20). Für die Transfektionsexperimente wurden homozygote *Ft* Mausfibroblasten verwendet, da diesen ein endogenes *Irx3* Gen fehlt und demzufolge die detektierte *Irx3* Expression nur das Resultat der Transfektion sein konnte.

Die Analyse zeigte, daß in PAC43 und PAC44 transfizierten Zellen ein *Irx3* Transkript nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 20, Seite 88). Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Amplifizierungsprodukte konnte zwischen einer Amplifizierung von transfizierter DNA (ca. 500 bp) und prozessierter RNA (116 bp) unterschieden werden. Die beiden Klone PAC43 und PAC44 konnten also prinzipiell eine *Irx3* Expression bewirken und wurden deshalb für die Generierung der transgenen Wildtyp-Mauslinien verwendet. Beide Klone sind in Abbildung 21 auf Seite 89 schematisch dargestellt.

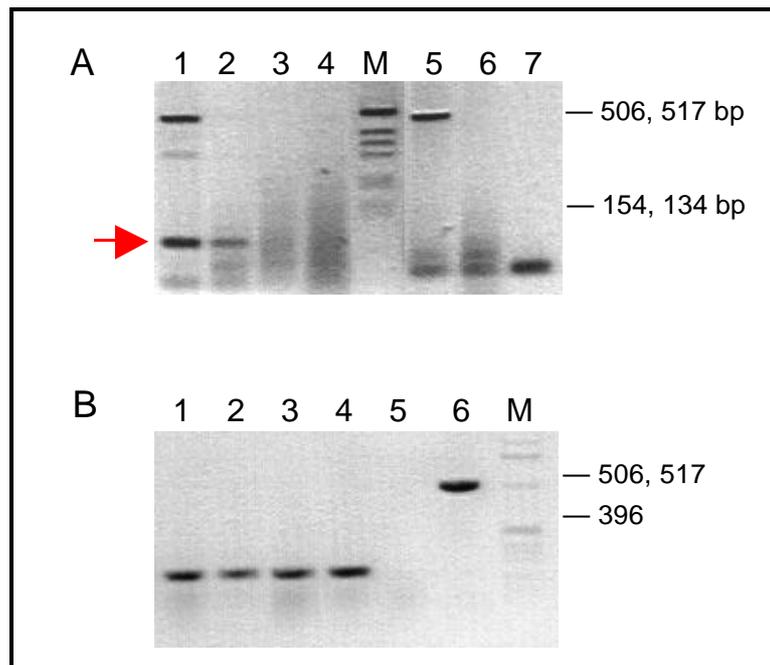


Abbildung 20: *Irx3* Expression in *Ft/Ft* Mausfibroblasten nach Transfektion von PAC 43, 44, 46 und 47. A.) Je 10 μ g PAC43 (Spur 1), PAC44 (Spur 2), PAC46 (Spur 3) und PAC47 (Spur 4) wurden transient in *Ft/Ft* Mausfibroblasten transfiziert und mittels RT-PCR auf eine *Irx3* Expression hin untersucht (Die RT Reaktion erfolgte mit einem OligodT Primer, die PCR mit den Primern *Irx3*-F2 und -B2). In Spur 5 wurde zur Kontrolle der PCR genomische *Wt* DNA und in Spur 6 von *Ft/Ft* DNA amplifiziert. Der rote Pfeil markiert die für eine *Irx3* Expression spezifische 116 bp-Bande. Die beiden ca. 500 bp großen Banden in Spur 1 und 5 repräsentieren eine *Irx3* Amplifizierung von genomischer DNA. 7: Wasserkontrolle, M (Längenstandard: 1 kb Leiter). **B.)** Amplifizierung von 250 bp HPRT Sequenzen aus der RT Reaktion der Transfektion mit PAC43 (Spur 1), PAC44 (Spur 2), PAC46 (Spur 3) und PAC47 (Spur 4) mit 3' und 5' HPRT-Primern. 5: Wasserkontrolle, 6: Amplifizierung von genomischer DNA, M (Längenstandard: 1 kb Leiter).

4.4.2 Generierung *Irx3*-transgener Mauslinien

Die genomischen Klone PAC43 und PAC44 wurden zunächst durch eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Asc* I, welches innerhalb des Klonierungsvektors pPAC4 schneidet, linearisiert und die aufgereinigten Fragmente (siehe 3.16.2) für die Mikroinjektion in befruchtete Eizellen verwendet (siehe 3.16.3). Die Anzahl der injizierten Eizellen sowie der erhaltenen transgenen Tiere ist in Tabelle 3 auf Seite 89 dargestellt.

Transgen	Anzahl injizierter Eizellen	Anzahl geborener Jungtiere	Anzahl <i>Irx3</i> -transgener Jungtiere (Anteil an geborenen Jungtieren)	untersuchte transgene Linien
PAC43	510	25	7 (28%)	Tg85, Tg89
PAC44	154	11	4 (36%)	Tg83

Tabelle 3: Resultierende Anzahl an Jungtieren nach Mikroinjektion.

Die Identifizierung transgen positiver Tiere erfolgte mit Hilfe einer PCR-Analytik. In Abbildung 21 ist eine Übersicht der für die Genotypisierung verwendeten PCR-Primerpaare dargestellt. Insgesamt wurden 11 transgene Nachkommen nach der Mikroinjektion geboren (#81 bis #91), wobei kein Tier einen auffälligen Phänotyp aufwies.

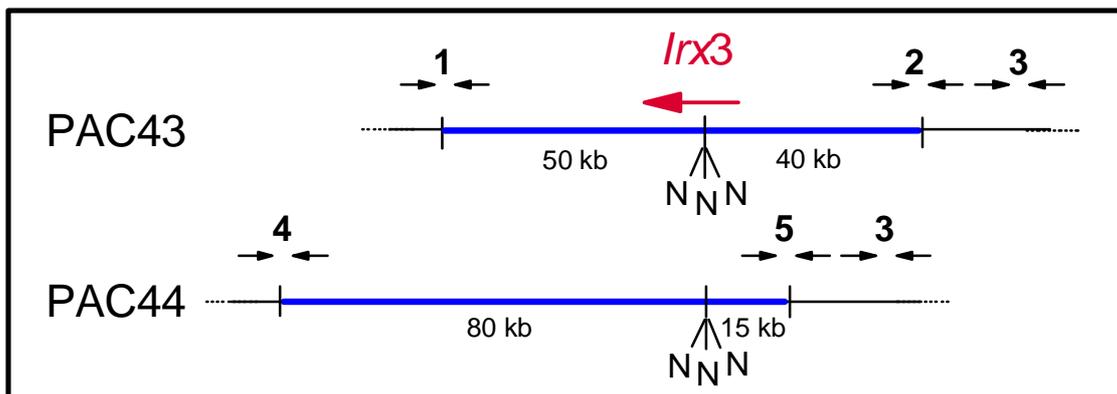


Abbildung 21: Schematische Darstellung der für die Generierung *Irx3*-transgener Mäuse verwendeten PAC43 und PAC44 Klone. Die Identifizierung der transgenen Mäuse wurde im Fall von PAC43 mit einer PCR unter Verwendung der Primerpaare 1 (T7-P1/PAC, PAC43T7-B1, PCR-Produktgröße 312 bp) und 2 (SP6-P1/PAC, PAC43SP6-B1, PCR-Produktgröße 228 bp) durchgeführt. Transgene Tiere, bei denen PAC44 injiziert wurde, konnten mit den Primerpaaren 4 (T7-P1/PAC, PAC44T7-B1, PCR-Produktgröße ca. 1,8 kb), und 5 (SP6-P1/PAC, PAC44SP6-B2, PCR-Produktgröße 291 bp) identifiziert werden. Primerpaar 3 (pPAC4-F2, pPAC4-B9, PCR-Produktgröße 313 bp) amplifizierte PAC-Vektor spezifische Sequenzen, und wurde bei beiden Konstrukten verwendet. Blau dargestellt ist der genomische Anteil der Fragmente. N (Not I Restriktionsschnittstelle).

Von den insgesamt 11 transgen positiven Tieren sollten nur diejenigen für weitere Verpaarungen verwendet werden, bei denen das Transgen auch tatsächlich eine *Irx3* Expression bewirken konnte. Für die Generierung der transgenen Mäuse wurde ein murines genomisches Fragment verwendet. Da dieses genomische

Fragment aus 129Svj Mäusen isoliert wurde, konnte zwischen einer transgenen *Irx3* Expression und der Expression des endogenen *Irx3* Gens aus dem C3H x C57BL/6 Hintergrund aufgrund eines Polymorphismus, der zuvor durch die Sequenzierung eines 420 bp PCR-Produktes, das unter Verwendung der PCR-Primer *Irx3*-F6 und *Irx3*-S1 aus dem 3' untranslatierten Bereich des *Irx3* Gens mittels PCR amplifiziert wurde, unterschieden werden. Den Nachweis des transgenspezifischen *Aci* I-Restriktionspolymorphismus zeigt Abbildung 22.

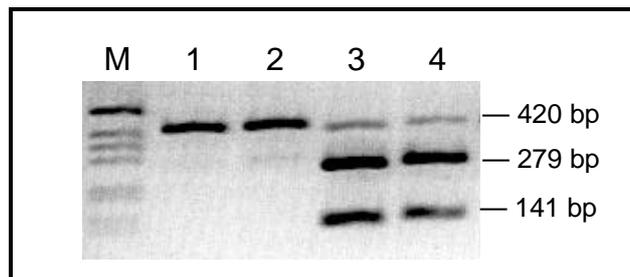


Abbildung 22: Nachweis des *Aci* I-Polymorphismus in PAC43 und PAC44. PCR-Produkte von genomischer C3H DNA (Spur 1), genomischer C57BL/6 DNA (Spur 2), PAC43 (Spur 3), PAC44 (Spur 4) nach restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Aci* I. M (Längenstandard: 1 kb Leiter).

Für die Analyse der *Irx3* Expression wurde RNA aus Schwanzgewebe der 11 transgenpositiven Tiere isoliert, da diese für weitere Zuchtzwecke benötigt wurden und ein Vorexperiment zeigte, daß *Irx3* in diesem Gewebe exprimiert wird (Daten hier nicht gezeigt). Nach RT-PCR unter Verwendung der PCR-Primer *Irx3*-F2 und *Irx3*-S1 wurde ein 510 bp großes PCR-Produkt, vom Transgen und endogenem *Irx3* Gen abstammend, amplifiziert. (Die Amplifizierung von kontaminierender genomischer DNA wäre durch ein Auftreten eines ca. 900 bp großen PCR-Produkt erkennbar gewesen.) Nur bei Anwesenheit einer vom Transgen abstammenden *Irx3* Expression wird das amplifizierte 510 bp große PCR-Produkt durch *Aci* I in zwei 369 bp und 141 bp große Fragmente gespalten (siehe Abbildung 23). In dieser Analyse wurden alle nach der Mikroinjektion transgenpositiven Tiere im Hinblick auf die Expressionsaktivität der *Irx3* Transgene hin untersucht.

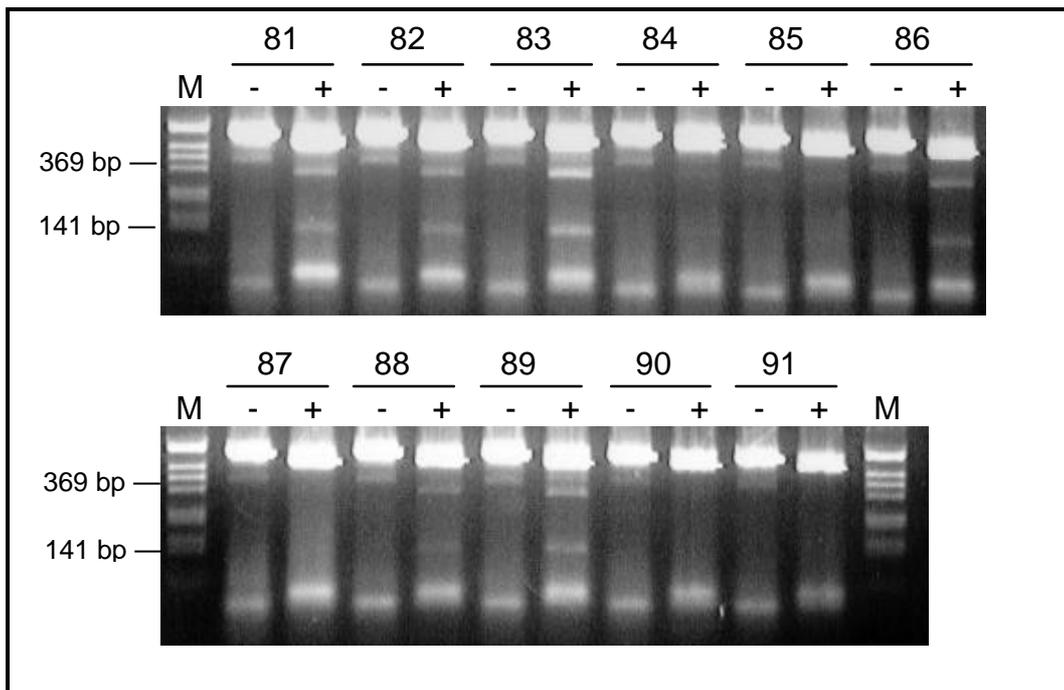


Abbildung 23: Nachweis der Transgenexpression mittels RT-PCR und restriktionsenzymatischer Spaltung mit *Aci I*. Aus den Schwänzen transgen-positiver Tiere („Founder“; Nr. 81 bis 91) wurde die RNA isoliert und durch eine RT-PCR auf *Irx3* Expression hin untersucht. Die RT-Reaktion erfolgte mit einem Oligo dT Primer, die PCR mit den Primern *Irx3*-F2 und -S1. -: ohne *Aci I* Spaltung; +: mit *Aci I* Spaltung. M (Längenstandard: 1 kb Leiter).

Die Tiere mit den Nummern 81, 82, 83, 85, 86, 88 und 89 zeigten die für das Transgen spezifischen 369 bp und 141 bp großen Fragmente, während die Tiere mit der Nummer 84, 87, 90 und 91 keine Spaltprodukte aufwiesen. Dies bedeutete, daß nicht in allen nach der Mikroinjektion transgen-positiven Tieren eine transgen-codierte *Irx3* Expression im Schwanz erfolgte, obwohl dort normalerweise das endogene *Irx3* exprimiert wird. Von den ursprünglich 10 transgenen Nachkommen nach der Mikroinjektion wurden drei Gründertiere („Founder“) ausgewählt, die die Grundlage für die Linien Tg83, Tg85 und Tg89 bildeten (siehe Tabelle 3, Seite 89), die nach Kreuzung mit heterozygoten *Ft* (Tg7) Mäusen erhalten wurden.

4.4.3 *Irx3* als Transgen beeinflusst nicht den heterozygoten *Ft* Phänotyp

Die Genotypisierung von Tieren der Linie Tg83, Tg85 und Tg89 erfolgte über eine PCR-Analytik wie in Abbildung 21 beschrieben. Die Präsenz der *Ft* Mutation wurde ebenfalls über eine PCR-Analytik unter Verwendung der Primer Wt, *Ft* und

Ft/*Wt* zur Detektion eines ca. 300 bp großen (*Ft*-Allel) bzw. 400 bp großen Produktes (Wildtyp-Allel) nachgewiesen. In Abbildung 24 ist eine solche Genotypisierung von Nachkommen der Linie Tg83 beispielhaft dargestellt.

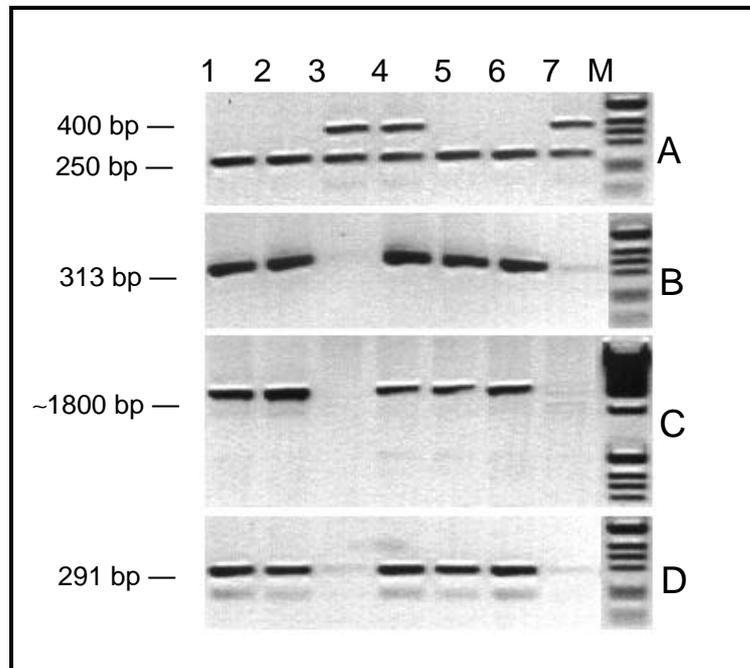


Abbildung 24: PCR-Genotypisierung der F1 Generation der Linie Tg83. Spur 1 bis 7 zeigt die Untersuchung der DNA von 7 Geschwistertieren mit den PCR-Primern A.) *Wt*, *Ft*, und *Wt/Ft*; B.) *pPAC4-F2* und *pPAC4-B9*; C.) *T7-P1/PAC* und *PAC44T7-B1*; D.) *SP6-P1/PAC* und *PAC44SP6-B2*. *M* (Längenstandard 1 kb Leiter). Spur 4 zeigt die Genotypisierung eines Nachkommen, der *Irx3*-transgen und heterozygot für die *Ft* Mutation ist und den *Ft* Phänotyp aufwies. *M* (Längenstandard: 1 kb Leiter).

Keiner der heterozygot für die *Ft* Mutation und gleichzeitig transgenen Nachkommen aller drei Linien (Tg83, Tg85 und Tg89), zeigte jemals einen phänotypischen Unterschied zu heterozygoten nicht transgenen *Ft* Tieren. Dies bedeutete, daß die *Irx3*-enthaltenen Transgene nicht in der Lage waren, den *Ft* Phänotyp heterozygoter *Ft* Mäuse zu beeinflussen.

4.4.4 Der homozygote *Ft* Phänotyp wird nicht durch die Anwesenheit der *Irx3* Transgene PAC43 und PAC44 verändert

Der homozygote *Ft* Phänotyp konnte nach entsprechenden Kreuzungen von *Irx3*-transgenen heterozygoten *Ft* Mäusen aus den drei Linien untersucht werden. Eine Übersicht der erhaltenen Nachkommen dieser Kreuzungen ist in Tabelle 4

dargestellt. Die Nachkommen wurden wie oben beschrieben mit Hilfe der PCR-Verfahren auf Anwesenheit des Transgens und der *Ft* Mutation hin analysiert.

Genotyp	Wt		<i>Ft</i> /+		<i>Ft</i> / <i>Ft</i>		Σ
	-	+	-	+	-	+	
Tg83	7	5	11	11	0	0	34
Tg85	2	3	3	2	0	0	10
Tg89	3	2	3	4	0	0	12

Tabelle 4: Anzahl der nach Kreuzung von *lrx3*-transgenen heterozygoten *Ft* Mäusen erhaltenen Genotypen.

Als Ergebnis der Kreuzungen wurden weder homozygote *Ft* Mäuse noch *lrx3*-transgene und für die *Ft* Mutation homozygote *Ft* Mäuse geboren (siehe Tabelle 4). Die Letalität des homozygoten *Fused toes* Phänotyps konnte demnach nicht durch ein *lrx3*-enthaltendes Transgen aufgehoben werden.

Die nächste offensichtliche Frage, die sich nun stellte war, ob *lrx3*-transgene homozygote *Ft* Embryonen im Gegensatz zu nicht transgenen homozygoten *Ft* Embryonen einen Unterschied in ihrer Embryonalentwicklung zeigten. Zu diesem Zweck wurden Embryonen verschiedener Alterstufen aus Kreuzungen *lrx3*-transgener heterozygoter *Ft* Tieren aller drei Linien isoliert und die Embryonen makroskopisch miteinander verglichen. Die Genotypisierung der einzelnen Embryonen erfolgte nach Präparation von embryonalem Dottersackgewebe und der oben beschriebenen PCR-Analytik. Eine Übersicht der erhaltenen Embryonen ist in Tabelle 5 dargestellt.

Alter der Embryonen in Tagen	Genotyp	Tg83	Tg85	Tg89	∑
9,5	Wt	2	2	2	6
	Wt, <i>tglrx3</i>	1	1	1	3
	<i>Ft/+</i>	6	1	1	8
	<i>Ft/+</i> , <i>tglrx3</i>	7	1	3	11
	<i>Ft/Ft</i>	0	1	0	1
	<i>Ft/Ft</i>, <i>tglrx3</i>	0	0	1	1
	Anzahl Würfe (Embryonen)	2 (16)	1 (6)	1 (7)	4 (29)
10,5	Wt	3	2	8	13
	Wt, <i>tglrx3</i>	8	5	16	29
	<i>Ft/+</i>	6	11	16	33
	<i>Ft/+</i> , <i>tglrx3</i>	12	9	22	43
	<i>Ft/Ft</i>	5	6	5	16
	<i>Ft/Ft</i>, <i>tglrx3</i>	4	4	17	25
	Anzahl Würfe (Embryonen)	5 (37)	5 (37)	10 (85)	20 (159)
11,5	Wt	1	3	0	4
	Wt, <i>tglrx3</i>	0	4	3	7
	<i>Ft/+</i>	1	3	0	4
	<i>Ft/+</i> , <i>tglrx3</i>	1	7	3	11
	<i>Ft/Ft</i>	0	2	0	2
	<i>Ft/Ft</i>, <i>tglrx3</i>	0	2	0	2
	Anzahl Würfe (Embryonen)	1 (3)	3 (20)	1 (6)	5 (29)
12,5	Wt	2	nicht bestimmt	1	3
	Wt, <i>tglrx3</i>	1	nicht bestimmt	1	2
	<i>Ft/+</i>	3	nicht bestimmt	1	4
	<i>Ft/+</i> , <i>tglrx3</i>	5	nicht bestimmt	2	7
	<i>Ft/Ft</i>	0	nicht bestimmt	1*	1
	<i>Ft/Ft</i>, <i>tglrx3</i>	0	nicht bestimmt	0	0
	Anzahl Würfe (Embryonen)	2 (11)	nicht bestimmt	1 (5)	3 (16)
13,5	Wt	1	nicht bestimmt	1	2
	Wt, <i>tglrx3</i>	2	nicht bestimmt	0	2
	<i>Ft/+</i>	2	nicht bestimmt	0	2
	<i>Ft/+</i> , <i>tglrx3</i>	6	nicht bestimmt	2	8
	<i>Ft/Ft</i>	2	nicht bestimmt	0	2
	<i>Ft/Ft</i>, <i>tglrx3</i>	0	nicht bestimmt	0	0
	Anzahl Würfe (Embryonen)	2 (13)	nicht bestimmt	1 (3)	3 (16)

* Embryo stark apoptotisch

Tabelle 5: Anzahl und Genotypen der Embryonen aus der Kreuzung *Ft/+* x *Ft/+*, *tglrx3* (36 Würfe mit 248 Embryonen).

Homozygote *Ft* Embryonen zeichnen sich durch eine Reihe von phänotypischen Veränderungen aus, die zusätzlich untereinander auch noch eine Variabilität aufweisen. In Abbildung 25 sind zur Verdeutlichung drei 10,5 Tage alte und aus einem Wurf stammende *Ft/Ft* Embryonen dargestellt. Obwohl alle drei Embryonen den gleichen Genotyp besitzen und gleich alt sind, sind allein schon hinsichtlich der Ausbildung der Kopfregion und des Herzens starke Unterschiede festzustellen. Um herauszufinden ob transgene *Ft/Ft* Embryonen einen Unterschied zu nicht transgenen Embryonen aufweisen, mußten deshalb eine größere Anzahl von Embryonen miteinander verglichen werden, um vor dem Hintergrund der Variabilität der *Ft* Mutation zusätzliche Veränderungen nachweisen zu können.

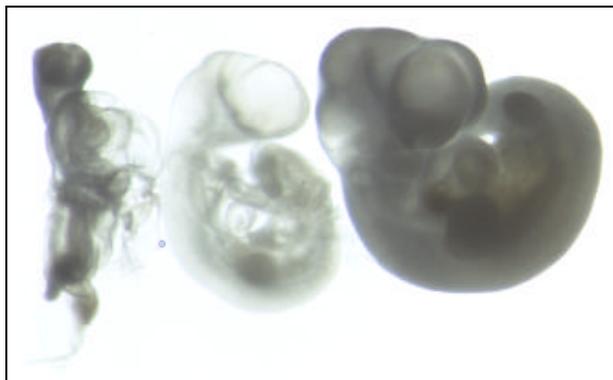


Abbildung 25: Phänotyp homozygoter *Ft* Embryonen. Die am Tag 10,5 p.c. isolierten Embryonen stammen aus einem Wurf und zeigen deutlich die Variabilität des *Ft/Ft* Phänotyps.

Bis zu dem Zeitpunkt von 10,5 Tagen können die meisten homozygoten *Ft* Embryonen überleben (siehe 2.1.1). Außerdem ist die Embryonalentwicklung bis zur frühen Organogenese so weit fortgeschritten, daß spezifische Strukturen wie z.B. Gehirn und Herz gut erkennbar sind. Daher wurden aus insgesamt 20 Würfen aller drei Linien 159 10,5 Tage alte Embryonen isoliert und genotypisiert (siehe Tabelle 5).

16 nicht transgene homozygote *Ft* Embryonen und 25 *lrx3*-transgene homozygote *Ft* Embryonen konnten miteinander verglichen werden, wobei folgende gemeinsame phänotypische Merkmale beobachtet werden konnten:

- Ein beeinträchtigt Größenwachstum im Vergleich zu *Wt* und *Ft/+* Embryonen.
- Einteilung in Prosencephalon und Mesencephalon nicht klar erkennbar.
- Ein entweder stark deformierter oder vergrößerter, teilweise ballonartig aufgeblähter Vorderhirnbereich (Prosencephalon).
- Bei vorliegender Vergrößerung des Vorderhirnbereichs keine sichtbare Einteilung in rechte und linke Hirnhälfte
- Bei Deformation des Vorderhirnbereichs zusätzliches Auftreten einer asymmetrischen Kopfform
- Keine oder nur einseitige Ausbildung der Augenanlage
- Vergrößerung des Herzpericard

Zusammenfassend zeigte der Vergleich transgener und nicht transgener 10,5 Tage alter homozygoter *Ft* Embryonen entsprechend der oben angegebenen Kriterien keine offensichtlichen Unterschiede.

Aus insgesamt 6 Würfen mit 32 Embryonen, die älter als 11,5 Tage waren, konnten keine *lrx3*-transgenen, sondern nur 3 stark apoptotische homozygote *Ft* Embryonen erhalten werden. Die Isolierung dieser älteren Embryonalstadien (11,5 bis über 13,5 Tage) konnte damit keine Verlängerung der Überlebenszeit von homozygoten *Ft* Embryonen als Folge der Transgenintegration nachweisen. Dies bedeutet, das unter makroskopischen Gesichtspunkten betrachtet, homozygote *Ft* Embryonen den gleichen Phänotyp wie *lrx3*-transgene homozygote *Ft* Embryonen zeigen und somit die *lrx3*-enthaltenen Transgenkonstrukte nicht in der Lage sind, den durch die *Ft* Mutation hervorgerufenen Phänotyp zu beeinflussen.

4.4.5 Nachweis der transgenen *lrx3* Expression in homozygoten *Ft* Embryonen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß die Präsenz der *lrx3* Transgene keinen offensichtlichen Einfluß auf den *Ft* Phänotyp hatte. Die bisher durchgeführten Analysen ließen jedoch keine Aussage über die Expression als Folge der In-

tegration der Transgene PAC43 und PAC44 zu. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, die zum einen klären sollten, ob eine *Irx3* Transgen Expression in den Mäusen nachweisbar ist und ob diese vergleichbar mit der Expression des endogenen *Irx3* ist. Ein experimenteller Ansatz zum Nachweis der Expression des Transgens war die in situ Hybridisierung ganzer Embryonen („*Whole mount*“ in situ Hybridisierung) unter Verwendung der *Irx3*-Sequenz als Sonde. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der RT-PCR ist, daß die Expression eines Gens im gesamten Organismus untersucht wird und so alle Strukturen, die das zu untersuchende Gen exprimieren, sichtbar gemacht werden können.

In Wildtyp-Embryonen wird *Irx3* am Tag 10,5 in folgenden Strukturen exprimiert (Bosse, 1997):

- entlang der anterioren-posterioren Achse des gesamten zentralen Nervensystems mit einem rostralem Limit im Diencephalon (Hypothalamus)
- im gesamten Neuroepithelium der Ohrenanlage (otic vesicle) und dem umgebenden kondensierenden Mesenchym
- in den ersten und zweiten Kiemenbögen
- in den Augenanlagen (optic vesicle) umgebenden Kopfmesenchym mit Ausdehnung in Richtung Nasengrube (siehe Abbildung 26, A und C)
- im Notochord und in geringem Ausmaß auch in den Somiten
- im lateralen Plattenmesoderm
- in den sich entwickelnden Vorder- und Hinterextremitäten, wobei ein Expressionsgradient entlang der dorsoventralen und proximodistalen Achse zu finden ist, mit einem Maximum im proximodorsalen Übergang der Extremitätenknospe (siehe Abbildung 26, B und C)

In Abbildung 26 C auf Seite 99 ist eine schematische Zusammenfassung aller Expressionsdomänen von *Irx3* am Tag 10 der Embryonalentwicklung dargestellt (nach (Bosse, 1997)). Um eine Aussage über die Expression des Transgens machen zu können, konnten jedoch nur homozygote *Ft* Embryonen verwendet werden, da bei dieser Methode nicht zwischen der transgenen und endogenen *Irx3* Expression unterschieden werden konnte. Da in homozygoten *Ft* Embryonen keine endogene *Irx3* Expression nachweisbar sein kann, können positive Signale ausschließlich auf die Expression des Transgens zurückgeführt werden. Die in situ Hybridisierungen wurden mit einer 710 bp langen, aus dem 3' Bereich des *Irx3* Gens stammenden RNA-Sonde durchgeführt.

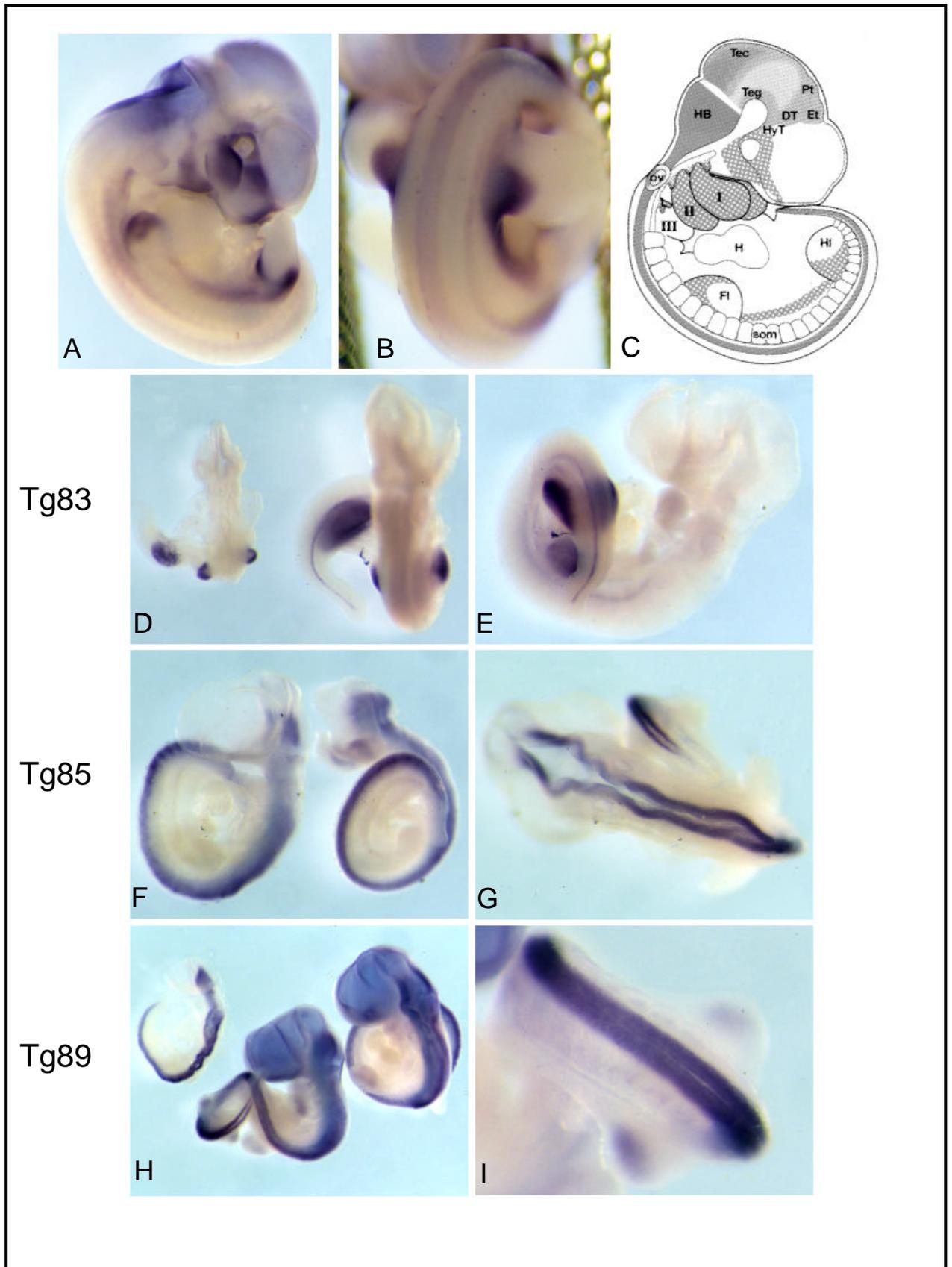


Abbildung 26 „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung von 10,5 Tage alten Embryonen unter Verwendung einer *Irx3*-spezifischen Sonde. A.) *Wt* Embryo; B.) *Wt* Embryo, vergrößerte Ansicht der Region der hinteren Extremitäten; C.) Schematische Darstellung der *Irx3* Expression am Tag 10 (nach (Bosse , 1997)); D.) und E.) *Irx3*-transgene homozygote *Ft* Embryonen der Linie Tg83; dorsale Ansicht (D); laterale Ansicht (E); F.) und G.) *Irx3*-transgene homozygote *Ft* Embryonen der Linie Tg85; laterale Ansicht (F); dorsale Ansicht (G); H.) und I.) *Irx3*-transgene homozygote *Ft* Embryonen der Linie Tg89; laterale Ansicht (H); vergrößerte Ansicht der Region der hinteren Extremitäten (I).

10,5 Tage alte transgene homozygote *Ft* Embryonen der Linie Tg83, die als Transgen PAC44 (siehe Abbildung 21 auf Seite 89) trugen, wiesen eine starke Expressionsdomäne in den sich entwickelnden Extremitäten auf (siehe Abbildung 26, D und E). Im Gegensatz zum Wildtyp (siehe Abbildung 26, B) ist jedoch die gesamte Extremitätenknospe gefärbt, wobei der anteriore Teil im Vergleich zum posterioren Bereich eine etwas stärkere Expression aufweist. Zusätzlich konnte noch eine schwache *Irx3* Expression im Rumpf bis hin zur Schwanzspitze beobachtet werden, die wahrscheinlich zum Notochord gezählt werden kann (siehe Abbildung 26, E). Außerdem konnten eine sehr schwache Expressionsdomäne in der Region des Rhombencephalons (siehe Abbildung 26, D) und in den Kiemenbögen (siehe Abbildung 26, E) detektiert werden. Alle anderen Strukturen, die normalerweise eine *Irx3* Expression aufweisen, wie z. B. die Ohrenanlagen, das laterale Plattenmesoderm und die Kopfregion, zeigten keine Expression (vergleiche Abbildung 26, C mit D und E).

Embryonen der Linien Tg85 und Tg89, welche beide das Transgen PAC43 (siehe Abbildung 21 auf Seite 89) trugen, zeigten im Gegensatz zu Embryonen der Linie Tg83 im gesamten Neuralrohr ausgehend vom Kopf bis hin zur Schwanzregion eine starke *Irx3* Expression (siehe Abbildung 26 F bis I). Die caudale Expression reichte jedoch nur bis in den Bereich des Rhombencephalons (siehe Abbildung 26 G und H) und nicht wie für den Wildtyp beschrieben über das Mesencephalon hinaus in das Diencephalon hinein. Von der Signalstärke her schien jedoch die Expression im Neuralrohr dem der Wildtypexpression zu entsprechen. Eine Expression im Notochord, konnte bei dieser makroskopischen Betrachtung nicht detektiert werden.

Während Embryonen der Linie Tg89 eine, allerdings nicht mit der Expression der Linie Tg83 bzw. des Wildtyps übereinstimmende, Expression in den Vorder- und Hinterextremitäten aufwies (siehe Abbildung 26 I), konnte in der Linie Tg85 keine Expression in den Extremitäten (siehe Abbildung 26 G) festgestellt werden. Die Linie Tg89 zeigte außerdem noch sowohl in den Kiemenbögen (siehe Abbildung 26 H) als auch in den Somiten (siehe Abbildung 26 I) eine sehr schwache Expression. Homozygote *Ft* Embryonen der Linie Tg85, in denen die Kopfreion stark deformiert war, wiesen zusätzlich in einem im Wildtyp dem Prosencephalon entsprechenden Bereich, eine *lrx3* Expressionsdomäne auf (siehe Abbildung 26 F).

In den *lrx3*-transgenen homozygoten *Ft* Embryonen aller drei Linien konnten keine weiteren vom Wildtyp her bekannten Expressionsdomänen detektiert werden. Zusammengefasst zeigten die Resultate der in situ Hybridisierungen von *lrx3* auf transgenen homozygoten *Ft* Embryonen, daß die Transgene PAC43 und PAC44 zwar in der Lage waren eine *lrx3* Expression zu bewirken, diese jedoch nicht mit der Expression im Wildtyp vergleichbar ist. Die unterschiedlichen Expressionsmuster, die in den Extremitäten und im Neuralrohr der PAC44- und PAC43-transgenen Linien beobachtet wurden, könnten ein Resultat der verschiedenen, das *lrx3* Gen flankierenden genomischen Sequenzen in den Transgenen darstellen. In der Linie Tg83, in die PAC44 als Transgen integriert wurde, ist der genomische Bereich am 5' Ende des *lrx3* Genes im Vergleich zu den Linien Tg85 und Tg89, die mit PAC43 als Transgen hergestellt wurden, etwa 25 kb kürzer. Gegen diese Hypothese spricht allerdings die unterschiedliche in den Extremitäten der Linien Tg85 und Tg89 beobachtete Expression. Es ist somit keine eindeutige Korrelation zwischen dem als Transgen verwendeten genomischen Fragment und dem resultierenden Expressionsmustern zu erkennen.

4.4.6 *Sonic hedgehog* (*Shh*) Expression in *lrx3*-transgenen und nicht transgenen homozygoten *Ft* Embryonen

Eine weitere Möglichkeit die durch die Transgenexpression potentiell verursachten molekulare Veränderungen in *Ft/Ft* Embryonen zu identifizieren, stellt die Durchführung einer in situ Hybridisierung mit molekularen Markern dar, die be-

dingt durch die *Ft* Mutation eine Veränderung in ihren Expressionsmustern aufweisen könnten. Es ist bekannt, daß in 10,5 Tage alten Wildtypembryonen *Shh* unter anderem im Notochord und in der darüberliegenden Bodenplatte des Neuralrohrs exprimiert wird (Yamada, 1993). Entsprechend konnte eine *Shh* (Echelard, 1993) Expression mit Hilfe der „Whole mount“ in situ Hybridisierung in Wildtypembryonen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27 A und B). Bei 10,5 Tage alten homozygoten *Ft* Embryonen hingegen kann man erkennen, daß in der anterioren Hälfte des Embryos in unregelmäßigen Abständen die Expression in der Bodenplatte zu fehlen scheint (siehe Abbildung 27 C und D). In einigen Bereichen fehlt zusätzlich sogar die Expression im Notochord (siehe Abbildung 27 D). Diese Beobachtungen wurden bei der Betrachtung von ganzen Embryonen gemacht, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht mit histologischen Arbeitsmethoden weiter charakterisiert werden konnten. Die Anfertigung von Vibratomschnitten der gefärbten Embryonen könnte daher noch eine genauere Analyse der Strukturen ermöglichen.

Unterstützt wird die Beobachtung, daß in einigen Bereichen die Bodenplatte des Neuralrohres fehlt und deshalb keine *Shh* Expression zu detektieren ist, von Analysen, die im Labor von T. Jessell (Center for Neurobiology and Behaviour, Columbia University, New York, U.S.A.) durchgeführt wurden. Mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen an Gewebeschnitten konnte gezeigt werden, daß in bestimmten Regionen von *Ft/Ft* Embryonen ein Fehlen der Bodenplatte vorlag (James Briscoe, persönliche Mitteilung). Ein weiteres auffälliges Merkmal, das jedoch nur für einen einzigen Fall gezeigt werden konnte, war die Aufgabelung der *Shh* exprimierenden Domäne in der Schwanzregion, (siehe Abbildung 27 E).

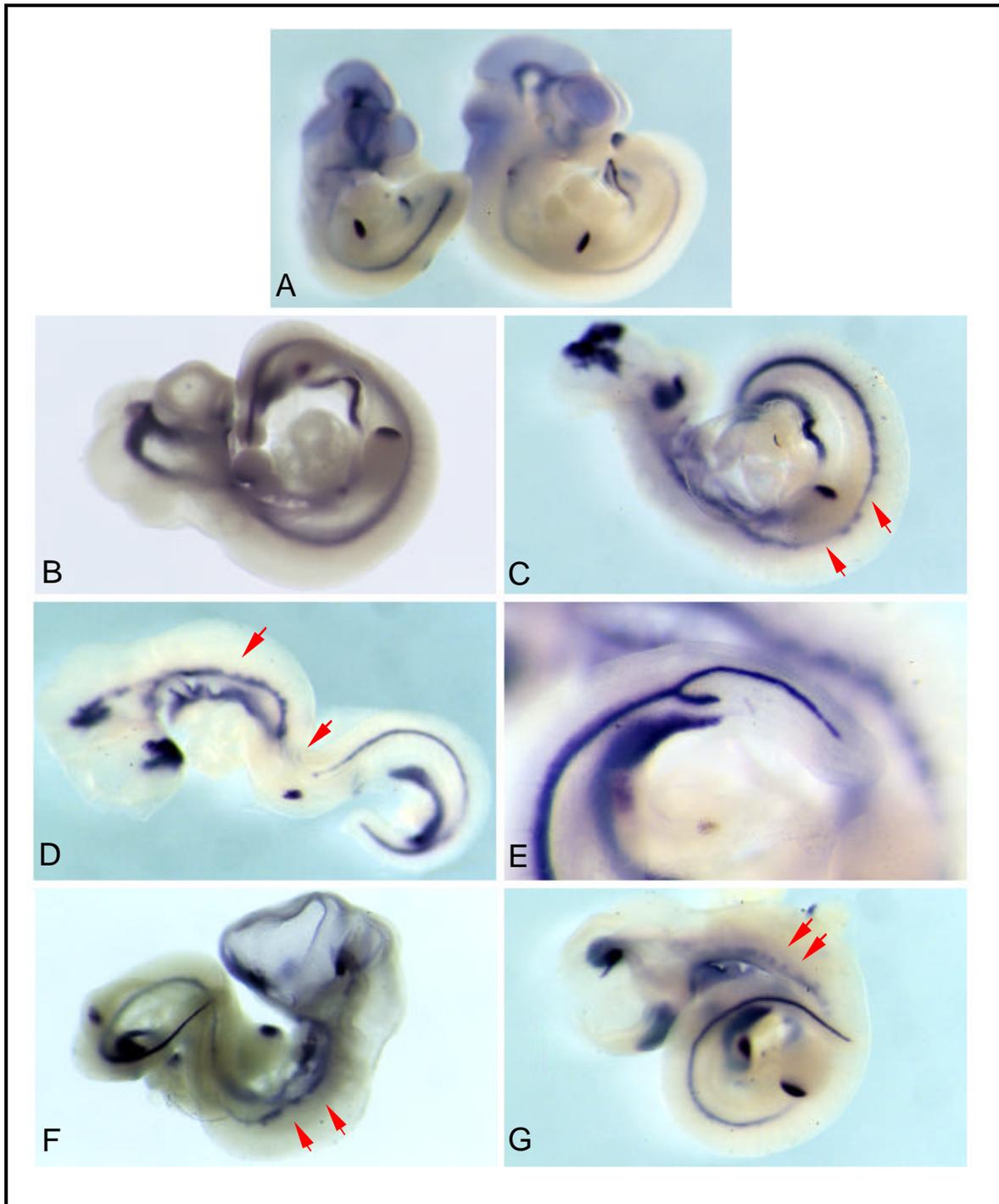


Abbildung 27: „Whole mount“ *in situ* Hybridisierung von 10,5 Tage alten Embryonen unter Verwendung einer *Shh*-spezifischen Sonde. A.) und B.) *Wt* Embryonen; C.) und D.) *Ft/Ft* Embryonen mit stark deformierter Kopfregion (C) und vergrößerter Vorderhirnregion (D); E.) Vergrößerte Ansicht der Schwanzregion eines *Ft/Ft* Embryos; F.) und G.) *Irx3*-transgene *Ft/Ft* Embryonen der Linien *Tg85* (F) und *Tg89* (G); Rote Pfeile markieren Regionen in denen eine veränderte *Shh* Expression zu sehen ist.

Um die Frage zu klären, ob die transgene *Irx3* Expression einen Einfluß auf das Expressionsmuster von *Shh* hat, wurden ebenfalls in situ Hybridisierungen unter Verwendung einer RNA-Sonde von *Shh* auf *Irx3-transgenen Ft/Ft* Embryonen durchgeführt. Wenn nämlich eine fehlende *Irx3* Expression die Ursache für die regionale Abwesenheit einer Bodenplatte im Neuralrohr wäre, sollten die *Irx3*-enthaltenen Transgene den ursprünglichen Phänotyp wieder herstellen, da in den transgenen Linien Tg85 und Tg89 eine signifikante transgene *Irx3* Expression im Neuralrohr nachgewiesen werden konnte. Die in situ Hybridisierung von *Irx3-transgenen Ft/Ft* Embryonen mit *Shh* zeigte jedoch keinen Unterschied im Vergleich mit nicht transgenen *Ft/Ft* Embryonen. Die unterbrochene *Shh* Expression im Bereich des Neuralrohrs und des Notochords konnte auch hier beobachtet werden. Die Expression von transgenem *Irx3* hat somit keinen Einfluß auf die veränderte Expressionsdomäne von *Shh* und auf die fehlende Ausbildung einer Bodenplatte im Neuralrohr von *Ft/Ft* Embryonen.

4.5 Neue Aspekte zum Phänotyp der *Fused toes* Mutante

Obwohl im Rahmen dieser Doktorarbeit keine histologische Untersuchungen zum *Fused toes* Phänotyps vorgesehen waren, wurden einige neue Erkenntnisse hinsichtlich des homozygoten *Ft* Phänotyps erhalten. Durch die Verpaarung von *Irx3-transgenen C3HxC57BL/6* Mäusen mit heterozygoten *Ft* Mäusen gelangte die *Ft* Mutation, die normalerweise in einem reinen C57BL/6-Hintergrund gehalten wird, in ein gemischtes Genom von C3H und C57BL/6 Mäusen. Als Ergebnis konnte zunächst ein etwa 14 bis 15 Tage alter homozygoter *Ft* Embryo isoliert werden, der bis zu diesem Zeitpunkt das älteste Stadium, das bisher für einen *Ft/Ft* Embryo erreicht wurde, repräsentiert. Ein auffälliges Merkmal bei diesem Embryo war eine zusätzliche Gewebestruktur an der anterioren Seite der hinteren Extremität, die wie ein zusätzlich ausgebildeter Finger gestaltet war. Um herauszufinden, ob es sich hierbei tatsächlich um einen zusätzlichen Finger handelte, wurde eine Knorpelfärbung des Embryos durchgeführt (siehe Abbildung 28, Seite 105).

Nach der Färbung zeigte sich, daß in der hinteren Extremität fünf Kondensationsregionen zu sehen waren (siehe Abbildung 28 A), jedoch keine in der zusätzlichen anterioren Struktur. Es ist daher fraglich, ob diese bei einer Weiterentwicklung des Embryos tatsächlich zu einem Finger ausgebildet werden würde. Bei Betrachtung der vorderen Extremitäten fiel auf, daß mehr als fünf Kondensationsregionen vorhanden waren (siehe Abbildung 28 B). Insgesamt konnten dort neun solcher linienartigen Bereiche identifiziert werden. Bei seitlicher Betrachtung wurde deutlich, daß sich die Kondensationsbereiche auf zwei Ebenen aufteilten, vergleichbar mit einer Duplikation aller fünf Kondensationsregionen in dorso-ventraler Richtung (siehe Abbildung 28 C). Da beide Ebenen zueinander versetzt liegen konnten bei dorsaler Betrachtung trotzdem die einzelnen Linien der Kondensation identifiziert werden. Somit konnte als Folge der Kreuzung der *Ft* Mutation in den C3H-Hintergrund ein homozygoter *Ft* Embryo isoliert werden, der die Analyse der phänotypischen Veränderungen der Extremitäten im homozygoten Zustand der Mutation in einem weit fortgeschrittenen Entwicklungsstadium ermöglichte.

Es ist bekannt, daß der genetische Hintergrund einen Einfluß auf die phänotypische Ausprägung einer Mutation haben kann (Miklos, 1996). Entsprechende Kreuzungsexperimente von heterozygoten *Ft* und NMRI-abstammenden Mäusen, die in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. J. Heymer durchgeführt wurden, zeigten, daß homozygote *Ft* Embryonen bis max. 13,5 Tage p. c und damit wesentlich länger überlebten als *Ft/Ft* Embryonen mit einem reinen C57BL/6-Hintergrund, die im Mittel am Tag 10,5 p.c. sterben (Heymer, persönliche Mitteilung). Da diese Ergebnisse nicht von unmittelbarer Relevanz für die vorliegende Dissertationsarbeit sind wurde auf eine weiterführende Diskussion dieser Daten im Diskussionsteil dieser Arbeit verzichtet.

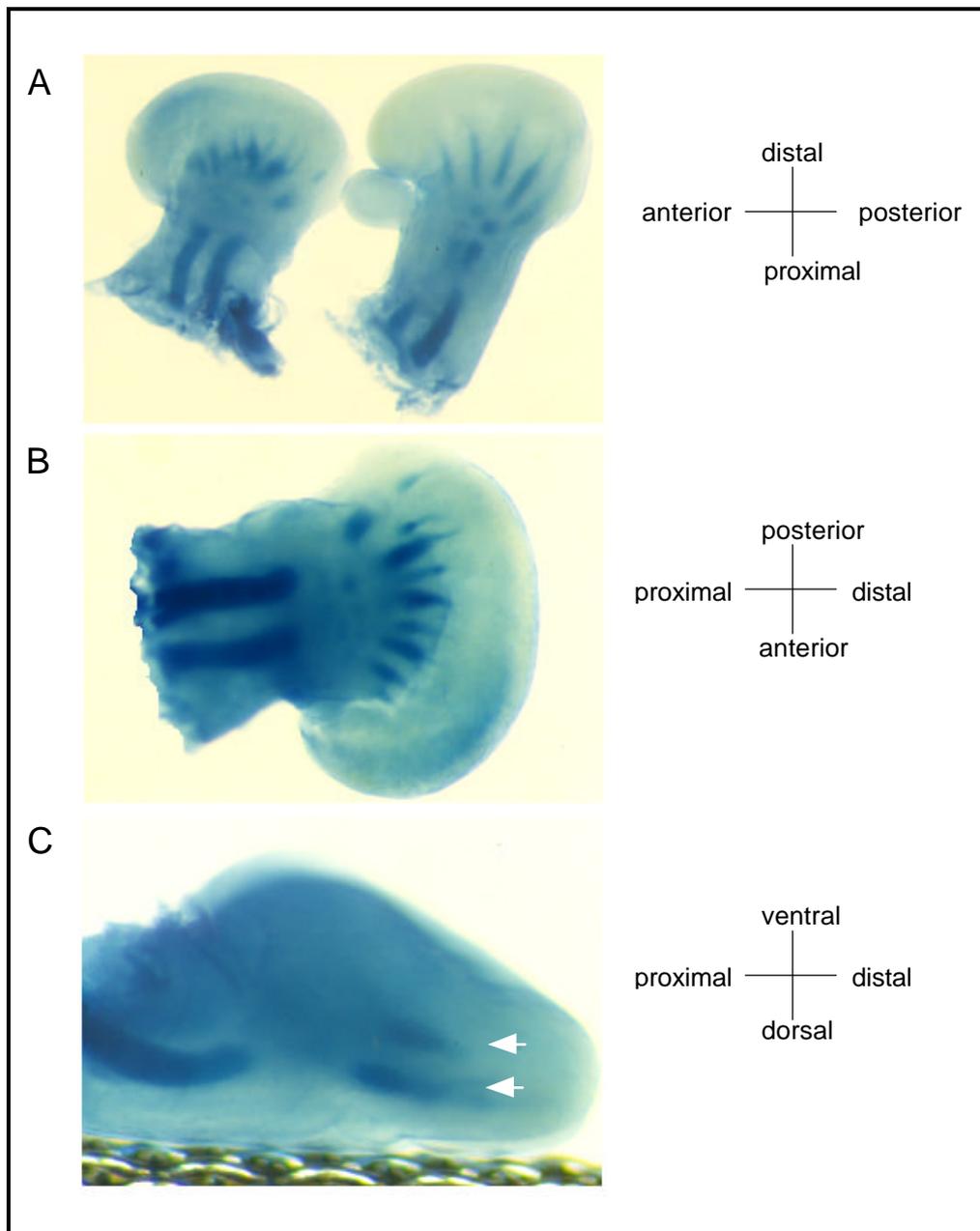


Abbildung 28: Knochen- und Knorpelfärbung der Extremitäten eines 14 bis 15 Tage alten Ft/Ft Embryos mit C3HxC57BL/6 Hintergrund. A.) Ventrale Ansicht der linken Vorder- (links) und Hinterextremität (rechts). Auffällig ist die zusätzliche Gewebestruktur an der anterior zugewandten Seite der Hinterextremität. Dorsale (B) und posteriore (C) Ansicht der linken Vorderextremität mit durch die Färbung sichtbar gewordenen Knochenkondensationen. In B ist deutlich eine Vervielfältigung der Regionen der Kondensation zu erkennen, die bei seitlicher Betrachtung der Extremität (C) in zwei verschiedenen Ebenen zu liegen scheinen.

5 Diskussion

5.1 Kartierung des *Fused toes* Locus

In der vorliegenden Arbeit sollte das Ausmaß der durch die Transgenintegration verursachten Deletion am *Ft* Locus analysiert werden.

Um eine erste Abschätzung der Größe der Ausdehnung der Deletion vornehmen zu können wurde eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Dies stellt ein gängiges Vorgehen zur groben Kartierung von Loci dar und wurde z.B. für die Loci der Mausmutationen *small eye (sey)* (van der Meer-de Jong, 1990), *Ulnaless* (Peichel, 1996) oder *nude* (Segre, 1995) beschrieben. Mit Hilfe bereits bekannter genetischer Marker, die auf Chromosom 8 lokalisiert sind, konnte die *Ft* Mutation zwischen den MIT Markern D8MIT109 und D8MIT110 kartiert werden. Die Analyse einer Reihe von benachbarten Markern in dieser Region zeigte jedoch, daß keiner von der Mutation betroffen, d.h. deletiert wurde (siehe 4.1). Die Auflösung der genetischen Karte war somit für eine präzisere Lokalisierung der *Ft* Mutation nicht hinreichend. Aus dem Kartierungsergebnis konnte somit nur geschlossen werden, daß die *Ft* Mutation einen weniger als 1 cM umfassenden Bereich abdeckt. Allerdings kann dieses Ergebnis dazu verwendet werden eine grobe Abschätzung über die physikalische Größe der *Ft* Mutation zu machen. In einer genetischen Karte werden die Abstände der Marker durch die Häufigkeit an Rekombinationsereignissen dargestellt. Die Einheit Centi-Morgan gibt dabei an, wie häufig ein Rekombinationsereignis zwischen zwei Loci stattfindet. Rekombinationsereignisse sind zwar nicht direkt an eine physikalische Größe (Anzahl der Basenpaare) gebunden, jedoch kann ein Durchschnittswert der Rekombinationsereignisse bezogen auf das gesamte Genom der Maus gebildet werden, wobei 0,2 cM etwa 400 kb entsprechen (Dietrich, 1996). Überträgt man diesen Wert auf das Ergebnis der Kartierung, so konnte die *Ft* Mutation auf nicht größer als 2 Mb abgeschätzt werden, was gut mit den Daten der nachfolgend durchgeführter physikalischen Kartierung des *Ft* Locus übereinstimmt (s.u.)

Um eine genauere Bestimmung der physikalischen Größe der Deletion durchführen zu können und die Grundvoraussetzungen zu schaffen, die am *Ft* Locus lokalisierten Gene zu identifizieren und damit die molekulare Ursache der *Ft* Mutation aufzuklären, waren „*Chromosome Walking*“-Experimente notwendig. Das „*Chromosome Walking*“ stellt einen systematischen Ansatz dar, der für vergleichbare Fragestellungen bereits erfolgreich eingesetzt wurde. Beispielsweise konnte mit Hilfe dieser Technik der Locus für die Mausmutation *inv* (*inversion of embryonic turning*), die ebenfalls eine durch insertionelle Mutagenese entstandene Deletion aufweist, kartiert werden (Mochizuki, 1998). Prinzipiell kann dabei natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß ein nicht klonierbarer DNA-Bereich die Fortsetzung des „*Chromosome Walking*“ stark verzögern bzw. jederzeit verhindern kann.

Aufgrund der in der Einleitung dargestellten spezifischen Vor- und Nachteile verschiedener DNA-Bibliotheken, wurden in dieser Arbeit ausschließlich P1, BAC und PAC DNA-Bibliotheken für die „*Chromosome Walking*“-Experimente verwendet. Außerdem zeigen viele Beispiele in der Literatur, daß diese DNA-Bibliotheken auch für die erfolgreiche Kartierung größerer genomischer Regionen eingesetzt werden konnten, wie z.B. der Erstellung eines 3,5 Mb großen Contigs auf dem humanen Chromosom 21 (Hubert, 1997) oder der Kartierung des *nude* Locus, der eine 370 kb große Region umfasst (Segre, 1995). Die in dieser Arbeit isolierten genomischen P1-Klone hatten eine durchschnittliche Insertionsgröße von etwa 85 kb, die der BAC-Klone ca. 160 kb und die der PAC-Klone etwa 140 kb (siehe 4.2.2), was gut mit den in der Literatur angegebenen Daten übereinstimmt (siehe Einleitung). Die in den P1-, BAC bzw. PAC-Klonen enthaltene genomische DNA ist, im Vergleich zu in YAC klonierter genomischer DNA, in den seltensten Fällen chimär und wesentlich stabiler gegenüber Restrukturierungsvorgängen (Sternberg, 1994); (Woo, 1994). Diese Eigenschaften sind eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der „*Chromosome Walking*“-Experimente, da bei Verwendung eines chimären Klons, d.h. einem Klon mit DNA Fragmenten aus unterschiedlichen Bereichen des Genoms, nicht mehr gewährleistet ist, daß die klonierte DNA vom gleichen Chromosom stammt. Auf diese Problematik wird im Verlauf dieser Diskussion noch näher

eingegangen. Obwohl in dieser Arbeit nicht alle Klone auf Chimerität hin untersucht wurden, wurden bei keinem der insgesamt 52 isolierten genomischen Klone derartige Ereignisse registriert. Desweiteren wurden keinerlei Klonstabilitäten, die sich z.B. durch Deletionen in den Kloninsertionen bemerkbar machen würden beobachtet. Entsprechend konnte eine durch die genomischen Klone zuvor abgeschätzte Größe von Not I Fragmenten mit Hilfe der PFGE auf genomischer DNA bestätigt werden (siehe 4.2.2.6).

Die Isolierung terminal gelegener Sonden hat sich als der zeitaufwendigste Schritt bei den „*Chromosome Walking*“-Experimenten herausgestellt. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit klar war, welches Ausmaß die in der *Ft* Mutation deletierte Region besitzt und wieviele einzelne „*Walking*“-Schritte demnach durchgeführt werden mußten, wurden verschiedene Methoden zur Isolierung von Sonden auf ihre Funktionalität und Effizienz hin getestet. Verschiedene Methoden wurden speziell für diese Fragestellung entwickelt (Übersicht siehe (Silverman, 1993)). Da die Erfolgsaussichten der einzelnen Methoden nicht vorhersagbar waren, wurden die verschiedenen Verfahren parallel ausgeführt.

Eine der verwendeten Methoden war das „*Plasmid Rescue*“ (Burke, 1991), bei dem der zu untersuchende Klon mit einem Restriktionsenzym gespalten und durch eine anschließend Religation des Vektors die terminalen Fragmente zusammgeführt werden. Auf diese Weise wurden 3 von insgesamt 44 Sonden isoliert (siehe 4.2.1). Der Nachteil dieser Methode ist, daß hierfür nur wenige Restriktionsenzyme verwendet werden können, da diese keine Erkennungssequenz im Vektor aufweisen dürfen. Außerdem können als Ergebnis relativ große Sonden erhalten werden, die als Konsequenz mit entsprechender erhöhter Wahrscheinlichkeit größere, relative repetitive Anteile beinhalten können.

Eine weitere Methode zur Sondenisolierung ist die „*shotgun*“-Subklonierung aller nach einer Restriktionsspaltung erhaltenen Fragmente eines genomischen Klons. Daran anschließend muß jedoch eine Koloniehybridisierung mit einer vektorspezifischen Sonde durchgeführt werden, um so die klonierten Fragmente aus dem terminal gelegenen Bereich identifizieren zu können. Mit dieser vergleichsweise

zeitaufwendigen Methode wurden insgesamt nur 5 Sonden aus den genomischen Klonen isoliert (siehe 4.2.2.5).

Vergleichsweise schneller hatte ein PCR-basiertes Verfahren zum Erfolg geführt. Bei der Suppressions-PCR werden gezielt terminal gelegene Fragmente mit Hilfe von speziellen Adaptoren amplifiziert (siehe 4.2.1, (Siebert, 1995)). Der Vorteil dieser Methode ist, daß nur eine relativ geringe Menge an P1, BAC oder PAC Plasmid-DNA benötigt wird und günstigenfalls innerhalb eines Tages ein PCR-Produkt erhalten werden kann, das sofort als Sonde einsetzbar ist. In der Regel wurden diese PCR-Produkte jedoch noch sequenziert um bereits im Vorfeld repetitive Sequenzen ausschließen zu können. Im Vergleich zu den vorher beschriebenen Methoden wurde ein erheblich größerer Anteil der isolierten Sonden, d.h. 11 von 44 (25%) insgesamt isolierten Sonden, in relativ kurzer Zeit identifiziert (siehe 4.2.2.5).

Die einfachste Methode zu einer terminalen Sonde zu gelangen, war jedoch die direkte Ansequenzierung der genomischen Klone. Unter Verwendung der erhaltenen Sequenz wurden Primerpaare ausgewählt, die zum einen für die Amplifizierung einer Sonde verwendet und zum anderen in einer PCR-Analyse für den Deletionsnachweis eingesetzt werden konnten. Die erhaltenen Ergebnisse mußten jedoch immer durch eine Southern Blot Analyse nachträglich verifiziert werden, um unspezifische Amplifizierungsprodukte ausschließen zu können. Vergleichsweise nachteilig an dem Sequenzierungsverfahren ist der größere Bedarf an zu isolierender Plasmid-DNA. Ferner zeigte es sich, daß die Erfolgsaussichten dieses Ansatzes im Vorfeld nicht abgeschätzt werden können, da selbst spezialisierte Sequenzierungslabore nicht jede Klonsequenzierung erfolgreich ausführen konnten. Die Gründe hierfür sind derzeit nicht klar. Mit 16 von insgesamt 44 Sonden (36%) stellten die durch direkte Sequenzierung erhaltenen Sonden den größten Anteil dar (siehe 4.2.2.5). Als das effizienteste Vorgehen stellte sich die parallele Durchführung von direkter Sequenzierung der genomischen Klone und der Isolierung terminaler Fragmente mit Hilfe der Suppressions-PCR dar. Auf diese Weise wurden 61% der insgesamt identifizierten Sonden isoliert.

Durch die begleitend zu den Isolierungen terminaler Sonden durchgeführte Identifizierung der am *Fused toes* Locus lokalisierten Gene konnte das „*Chromosome Walking*“ zusätzlich beschleunigt werden. Zum einen eigneten sich die aus den Genen isolierten Sonden sehr gut für die Hybridisierungen zur Identifizierung von Klonen aus den genomischen Bibliotheken, da sie wenig repetitive Anteile enthielten. Zum anderen konnten mit den Gensequenzen zum Teil größere genomische Regionen in einem Schritt überwunden werden. So konnte z. B. mit der cDNA-Sequenz von *Fto* über 300 kb an genomischer DNA abgedeckt werden (siehe Abbildung 11). Um die Kontinuität des Contigs aufrechtzuerhalten, mußten in solchen Fällen trotzdem, wie oben beschrieben, terminale Sonden aus den einzelnen genomischen Klonen isoliert werden, um die Überlappung der Klone nachweisen zu können.

Eine der zentralen Fragen, die sich nach jeder Isolierung neuer genomischer Klone stellte war, ob die in der *Ft* Mutation deletierte Region durch den bis dahin isolierten Contig abgedeckt war, oder ob ein weiterer „*Walking*“-Schritt durchgeführt werden mußte. Deshalb mußte der Status einer jeden terminalen Sonde im Bezug zur *Ft* Mutation mit Hilfe von Southern Blot Analysen ermittelt werden. Dabei zeigte ein Ausbleiben eines Hybridisierungssignals auf homozygoter *Ft* DNA an, daß die Deletion über diesen klonierten Bereich hinaus ging und weitere überlappende Klone isoliert werden mußten.

Wie bereits erwähnt, zeigte ein positives Hybridisierungssignal auf homozygoter *Ft* DNA, daß die verwendete Sonde aus einem nicht mehr in der *Ft* Mutation deletierten DNA Bereich stammen mußte. Ein derartiges positives Ergebnis wurde mit einer terminalen Sonde (Sonde 47) aus dem genomischen Klon PAC93 erhalten (siehe Abbildung 9). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird die Möglichkeit, daß ein genomischer Klon chimär ist, d.h. DNA-Fragmente aus verschiedenen genomischen Regionen enthält, in der Literatur mit ca. 5% angegeben. Entsprechen kann die Möglichkeit, daß PAC93 einen chimären Klon repräsentiert und damit das erhaltene positive Hybridisierungssignal auf homozygoter *Ft* DNA auf eine nicht vom *Ft* Locus abstammende Sonde zurückzuführen sei, nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Im Widerspruch zu dieser Interpretation

der Daten zeigen weitere terminale Sonden (Sonde 44 und 45, siehe Abbildung 11), aus den mit PAC93 einen Cluster bildenden Klonen (PAC94, PAC96, siehe Abbildung 11), ebenfalls positive Hybridisierungssignale auf homozygoter *Ft* DNA (siehe Abbildung 10). Somit erscheint es als ausgesprochen unwahrscheinlich, daß gleichzeitig drei genomische Klone aus der gleichen DNA Region chimär sind. Dies gilt insbesondere wenn man berücksichtigt, daß Chimärisierungen in der Regel als Zufallsereignisse aus der Koligation von DNA-Insertionen *in vitro* oder durch Rekombinationen zwischen zwei DNA-Molekülen, die in dieselbe Bakterienzelle eingeführt wurden, resultieren (Meese, 1995). Geht man demnach von statistisch unabhängigen Ereignissen aus, so läßt sich unter Verwendung der oben beschriebenen Chimärisierungsraten von ca. 5% für PAC-Klone eine Wahrscheinlichkeit von $(0,05)^3 = 1,25 \%$ für das gleichzeitige Auftreten von 3 chimären PAC-Klonen berechnen. Desweiteren wurden Kontrollhybridisierungen durchgeführt, die den Genotyp der in den Southern Blot Analysen verwendeten genomischen DNA eindeutigen determinierten (siehe Abbildung 10), so daß ein erhaltenes Hybridisierungssignal aufgrund genotypisch nicht korrekt zugeordneter genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte.

Ein weiteres Experiment, welches die vorliegenden Ergebnisse unterstützen würde, wäre der Nachweis eines für die *Ft* Mutation spezifischen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus unter Verwendung von Sonden, die außerhalb der durch die *Ft* Mutation deletierten Region liegen. Dieses Experiment konnte aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht zu Ende geführt werden.

Zusammengefaßt zeigen die durchgeführten Experimente mit hoher Wahrscheinlichkeit, daß mit insgesamt 52 zusammenhängenden genomischen Klonen aus P1, PAC und BAC DNA-Bibliotheken, die insgesamt etwa einen 1,6 Mb großen Bereich genomischer DNA überspannen, die gesamte aus der *Ft* Mutation resultierende deletierte DNA-Region abgedeckt werden konnte. Der überwiegende Teil der Deletionen, die in der Literatur als Resultat einer insertionellen Mutagenese beschrieben wurden, weist Deletionen in der Größenordnung von wenigen Kilobasen auf, wie z.B. die Mutation *Hb58*, mit einer genomischen Deletion von nur 2 bis 3 kb Größe (Radice, 1991); (Lee, 1992) oder die transgene Linie CAT40 (Karls, 1992), bei der eine 80 kb große genomische Deletion als Folge der Inte-

gration des CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) Gens erfolgte. Die *Ft* Mutation stellt damit ein vergleichsweise seltenes Beispiel für eine ungewöhnlich große durch insertionelle Mutagenese entstandene Deletion genomischer DNA dar.

5.2 Genidentifizierung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung am *Fused toes* Locus lokalisierter Gene. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es eine Reihe von Methoden um Gene in genomischen Fragmenten zu identifizieren, dazu zählt z.B. die „*cDNA Selection*“-Technik. Obwohl sich in der Literatur viele Beispiele für Gene, die mit Hilfe der „*cDNA Selection*“-Technik identifiziert und kloniert werden konnten, wiederfinden (siehe z.B. (Zhao, 1997); (Guimera, 1997); (Akiyama, 1997); (Goldwurm, 1997); (Trachtulec, 1997)), konnte in dieser Arbeit mit dieser Methode innerhalb des genomischen Klons MB2 kein Gen identifiziert werden. Die Verwendung der in der Einleitung beschriebenen „*Exon Trapping*“-Technik in dieser Arbeit war dagegen auch im direkten Vergleich erfolgreicher. Diese Technik wurde bereits für vergleichbare Fragestellungen erfolgreich eingesetzt. So führte diese Methode z.B. zu der Identifizierung des *hairless* Gens, das für den Phänotyp der ebenfalls durch insertionelle Mutagenese entstandenen *hairless* Mausmutation verantwortlich ist (Cachon-Gonzalez, 1994). In dieser Arbeit konnte zunächst aus dem genomischen Klon RLDB-5 das Exon 5/144 des *Ft1* Gens isoliert werden, das zu einem bis dahin unbekanntem Transkript, als *Ft1c* bezeichnet, zugeordnet werden konnte (siehe 4.3.1). Die Untersuchung des bereits unter Verwendung der „*cDNA Selection*“-Technik erfolglos analysierten genomischen Klons MB2 mit Hilfe der „*Exon Trapping*“-Technik führte zu der Identifizierung eines bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntem Gens, welches als *Ft2* bezeichnet wurde. Wie in der Einleitung erwähnt, stehen jedoch noch weitere, in dieser Arbeit nicht angewendete Möglichkeiten für die Genidentifizierung, wie z.B. die Hybridisierung von Northern-Blots und cDNA-Bibliotheken mit den isolierten terminalen Sonden, zur Verfügung. Auf diese Weise wurde z.B. das in der *inv* Mutation deletierte *inversin* Gen detektiert, dessen Funktion bei der Ausbildung der Rechts-links-Asymmetrie eine Rolle spielt (Morgan, 1998). Eine Erweiterung

dieser Methode stellt der Einsatz der genomischen Contigklone als Hybridisierungs sonden dar. Bibliotheken, die ein weites Spektrum an Geweben und Entwicklungsstadien abdecken sind für diese Experimente ideal. Dabei bietet sich die IMAGE cDNA-Bibliothek (Soares, 1994) an, die im Rahmen des Humanen Genom Projekt produziert und zu Verfügung gestellt wird, da sie cDNA Klone aus einer Reihe von verschiedenen Geweben enthält. Außerdem ist diese Bibliothek allen Forschern zugänglich und die erhaltenen Daten zu den einzelnen Klonen werden in einer Datenbank erfasst, so daß bei der Identifizierung eines positiven Klons eventuell funktionelle Informationen bereits zu Verfügung stehen. Diese Verfahren stellen somit eine methodische Alternative dar, die in Ergänzung zu den bereits durchgeführten Untersuchungen der genomischen Contigklone zukünftig verwendet werden können, um zu vermeiden, daß möglicherweise bisher nicht identifizierte Gene im Contig unerkant bleiben. Wie eingangs beschrieben, beinhalten die Genomprojekte nicht nur die Sequenzierung und die oben erwähnte Herstellung von Bibliotheken, sondern unter anderem auch die Erstellung physikalischer Genomkarten. Mit Hilfe der 1998 herausgegebenen Genomkarte des Menschen in dem eine Reihe von EST-Klonen („Expressed Sequence Tags“) kartiert wurden (Deloukas, 1998) war es möglich, das am *Fused toes* Lokus lokalisierte und bereits bekannte *Irx3* Gen zu identifizieren (siehe 4.3.3). Die täglich wachsende Sammlung von Sequenzdaten in den Datenbanken erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, daß auch am *Fused toes* Lokus auf Chromosom 8 cDNA-Sequenzen kartiert werden, die durch die Mutation betroffen sind. Weiterhin bietet die vollständige Sequenzierung des humanem Genoms, die in wenigen Jahren noch vor der Sequenzierung des Mausgenoms abgeschlossen sein wird, die Möglichkeit, die zu der murinen Region von Chromosom 8 homologe humane DNA-Sequenz verwenden zu können, um mit Hilfe computerbasierter Analysen Hinweise auf die Präsenz von Genen am *Fused toes* Lokus zu erhalten.

Die Vorgehensweise mit der Gene am *Fused toes* Lokus in dieser Arbeit identifiziert wurden, wurde bereits in der Literatur für eine vergleichbare Untersuchung einer Mausmutation beschrieben. So konnte z.B. nach der physikalischen Kartierung der high-growth Mutation, die eine 500 kb große Deletion genomischer

DNA beinhaltet, ein Contig aus YAC und BAC-Klonen mit den oben erwähnten Methoden analysiert und auf diese Weise das für die Ausprägung des Phänotyps wahrscheinlich verantwortliche Kandidatengen *Raidd/Cradd* identifiziert werden (Horvat, 1998). Desweiteren wurden die für die die Mausmutationen *inversus viscerum* und *legless* verantwortlichen Gene in methodisch vergleichbarer Weise identifiziert (Supp, 1997); (Morgan, 1998); (Mochizuki, 1998).

5.2.1 Identifizierung eines neuen Transkripts von *Ft1*

Wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt wurde, konnte ein Exon isoliert werden, das offenbar eine neue Spleißvariante des *Ft1* Gens darstellt (siehe 4.3.1). In einer früheren Dissertationsarbeit dieser Arbeitsgruppe wurde die Funktion des *Ft1* Gens bereits näher untersucht, in dem unter anderem eine gezielte Inaktivierung des *Ft1* Gens durchgeführt wurde (siehe 2.1.2 und (Lesche, 1997). Dabei wurde festgestellt, daß die Inaktivierung von *Ft1* nicht in einem *Ft* ähnlichen Phänotyp resultiert. Allerdings kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, daß die Deletion von *Ft1* in Kombination mit anderen noch nicht identifizierten Gene zu einem *Ft* Phänotyp führen würde.

Die Frage, die sich nach der Identifizierung der alternativen Spleißvariante stellt ist, ob die Ausbildung des Transkript von *Ft1* einen weiteren funktionellen Aspekt in Hinsicht auf den Phänotyp der *Ft* Mutante liefern könnte. Bei der Inaktivierung von *Ft1* konnte gezeigt werden, daß die eingefügte Mutation eine tatsächliche Nullmutation dieses Gens darstellt und kein *Ft1* Transkript detektiert werden kann. *Ft1c* unterscheidet sich nur im 5' UTR von den bereits bekannten anderen Transkripten, *Ft1a* und *Ft1b*. Für den Nachweis der nichtvorhandenen Expression von *Ft1* in den *Ft1*-negativen Mäusen wurde für Northern-Blot Analysen eine Sonde verwendet, die von allen drei Transkripten gemeinsam genutzte Sequenzen enthielt. Da mit dieser Sonde keine Transkripte detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß zusätzlich zu *Ft1a* und *Ft1b*, auch *Ft1c* in *Ft1* (-/-) Mäusen nicht exprimiert wird. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, daß eine weitere Analyse von *Ft1c* neue funktionelle Aspekte bezüglich der *Ft* Mutation beiträgt.

5.2.2 *Ft2*: Identifizierung eines neuen Gens am *Fused toes* Lokus

Die Untersuchung eines weiteren genomischen Klons mit Hilfe der „*Exon Trapping*“-Technik führte zu der Identifizierung eines bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes Gens, welches als *Ft2* bezeichnet wurde (siehe 4.3.2). Dieses Gen codiert für ein etwa 6 kb großes Transkript, von dem bisher 3,8 kb kloniert und sequenziert wurden (siehe Abbildung 19). Da die Klonierung der etwa 2 kb großen am 5' Ende lokalisierten Sequenz noch aussteht, kann zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch keine Aussage über die Sequenz und Struktur des potentiellen *Ft2* Proteins gemacht werden. Sequenzvergleiche mit Eintragungen der Datenbank GenBank zeigten auf Nukleinsäureebene keine Homologien zu bereits bekannten Genen. Desweiteren konnten bislang noch keine weiteren cDNA Klone, die weitere Sequenzen in Richtung des Transkriptionsstarts beeinhalteten, identifiziert werden.

Mit den bisher erhaltenen Sequenzen konnte zwar ein etwa 2,5 kb großer ORF gebildet werden (siehe 7.2, in rot dargestellt), allerdings noch kein für die Expression des potentiellen *Ft2* Proteins benötigter Translationsstart identifiziert werden. Bei dem Vergleich der potentiellen Proteinsequenz von *Ft2* mit der Motivdatenbank PROSITE (www.expasy.hcuge.ch/sprot/prosite.html), die eine umfangreiche Sammlung von Proteinmustern enthält, wurden Phosphorylierungsstellen für Caseinkinase II, Proteinkinase C und Tyrosinkinase detektiert. Da diese Sequenzmuster jedoch sehr kurz sind ist die Wahrscheinlichkeit vergleichsweise hoch, daß möglicherweise nur zufällig in der potentiellen *Ft2* Proteinsequenz gefunden werden (Alphey, 1998). Auf eine weiterführende Diskussion dieses Befundes wird daher verzichtet. Ein durch Sequenzvergleiche detektiertes weiteres Sequenzmotiv war das sogenannte Leuzinzippermotiv (siehe 7.2, 326bp bis 391bp; 482bp bis 447bp). Dieses ursprünglich im Gcn4-Protein aus Hefe identifizierte Motiv (Ellenberger, 1992) findet sich in einer großen Gruppe von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren wieder. Charakteristisch für dieses Motiv, welches in den meisten Fällen wichtig für eine Homo- oder Heterodimerisierung der Proteine ist, ist die Präsenz der Aminosäure Leucin, die an jeder siebten Sequenzposition in einem bestimmten Abschnitt des Proteins auftritt (Lodish, 1995). Sollte das potentielle *Ft2* Protein tatsächlich ein

Leucizippersequenzmotiv aufweisen, was erst durch die Vervollständigung der cDNA Sequenz nachgewiesen werden kann, könnte dieses Protein demnach einen Transkriptionsfaktor darstellen. Zur Klärung dieser Vermutung sind jedoch noch weitere Experimente zur Aufklärung von Struktur und Funktion des potentiellen Ft2 Proteins erforderlich.

5.3 Funktionelle Analyse des *Irx3* Gens durch Transgen- „Rescue“

Eines der am *Fused toes* Locus lokalisierten Gene, das im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert wurde, war das *Irx3* Gen.

Irx3 gehört zur Gruppe der sogenannten *Iroquois* Gene, die zuerst in *Drosophila* nachgewiesen werden konnten. Durch die Analyse der in *Drosophila* auftretenden *Iroquois* Mutation, bei der es nicht zur Ausbildung der sensorischen Organe („bristles“) am lateralem Notum kommt (Leyns, 1996), konnten drei in einem Gencluster vorliegende Gene, *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) und *mirror* (*mirr*), identifiziert werden, die zusammen den „*Iroquois-complex*“ (*Iro-C*) bilden (Gomez-Skarmeta, 1996); (McNeill, 1997). Alle drei Gene sind eng miteinander verwandt und codieren für Transkriptionsfaktoren der „*TALE superclass of homeobox genes*“ (Burglin, 1997). Die Gene des *Iro-C* werden als „prepattern“ Gene bezeichnet, da für *ara* und *caup* gezeigt werden konnte, daß sie an der positiven Regulation eines weiteren Genclusters, dem „*achaete-scute gen complex*“ (*AS-C*) beteiligt sind, indem sie direkt an sogenannte „*Enhancer*“ Sequenzen dieses Komplexes binden (Gomez-Skarmeta, 1996). Die Gene des *AS-C* sind proneurale Gene, die während der Entwicklung der sensorischen Organe in *Drosophila* ektodermalen Zellen die Fähigkeit verleihen, sich zu neuronalen Elementen zu entwickeln (Campuzano, 1992). Die Gene des *Iro-C* in *Drosophila* sind jedoch nicht nur für die Ausbildung der sensorischen Organe wichtig (Grillenzoni, 1998); (Kehl, 1998), sondern zeigen ebenfalls eine Beteiligung bei der Spezifizierung der Körperwand- („*body wall*“) und Flügelidentität (Diez del Corral, 1999); (Gomez-Skarmeta, 1996), sowie bei der Ausbildung der Kompartimente während der Augenentwicklung (Cavodeassi, 1999).

Homologe des *Iro-C* konnten auch in höheren Organismen entdeckt werden, wie z. B. im Zebrafisch (*Ziro3*), im Krallenfrosch *Xenopus laevis* (*Xiro1*, *Xiro2*, *Xir3*), im Huhn (*clrx2*, *clrx4*) und im Menschen (IRX1, IRX2a, IRX2b, IRX3, IRX4, IRX5, IRX6) (Tan, 1999); (Gomez-Skarmeta, 1998); (Bellefroid, 1998); (Goriely, 1999); (Bao, 1999); (Bosse, 1997). Über die Funktion der *Iroquois* Gene weiß man noch relativ wenig. Wie in *Drosophila* werden diese in *Xenopus* in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und sind darüberhinaus in der Lage, die für die neurale Entwicklung notwendigen proneuralen Gene anzuschalten (Bellefroid, 1998). Im Huhn konnte eine weitere Funktion von *Iroquois* Genen gezeigt werden. Während der Entwicklung des Herzens reguliert eine ventrikelspezifische Expression von *Irx4* die Expression von Myosinisoformen, die für eine korrekte Ausbildung des Herzens notwendig sind (Bao, 1999).

In der Maus wurden bis jetzt sechs verschiedene *Iroquois* Gene (*Irx1* bis *Irx6*) identifiziert (Bosse, 1997); (Bruneau, 1999); (Cohen, 2000); (Peters, zur Publikation eingereicht). Die murinen *Iroquois* Gene liegen in zwei getrennten Genclustern vor, wobei sich ein Cluster mit *Irx3*, *Irx5* und *Irx6* am *Fused toes* Locus auf Chromosom 8 befindet, sowie ein anderer Cluster mit *Irx1*, *Irx2* und *Irx4* auf Chromosom 13 lokalisiert ist (Peters, zur Publikation eingereicht). Zusätzlich zu der Clusterbildung lassen sich die *Iroquois* Gene außerdem in drei verschiedene paraloge Gruppen eingeteilt, wobei eine Gruppe durch *Irx1* und *Irx3*, die zweite durch *Irx2* und *Irx5* und eine weitere von *Irx4* und *Irx6* gebildet werden (Peters, zur Publikation eingereicht).

Eine funktionelle Analyse, wie z. B. eine gezielte Inaktivierung eines der *Iroquois* Gene in der Maus wurde noch für keines der Gene beschrieben. Die *Fused toes* Mutante stellt somit das erste Modell für eine „*loss-of-function*“ Mutation der *Iroquois* Gene dar, wobei der gesamte Gencluster auf Chromosom 8 inaktiviert wurde. Um herauszufinden, welche Rolle nun das *Irx3* Gen bei der Ausprägung des *Ft* Phänotyps spielt, wurde in dieser Arbeit ein sogenanntes „*Rescue*“-Experiment durchgeführt, in dem zunächst *Irx3*-transgene Mäuse generiert und diese dann mit *Ft* Mäusen gekreuzt wurden, um so das *Irx3* Gen in die *Ft* Mutante zurückzubringen (siehe 4.4). Dabei wurden für die Herstellung der transgenen Li-

nien (Tg83, Tg85 und Tg89) bestimmte, in *Ft/Ft* Fibroblasten expressionskompetente genomische Fragmente, die in PAC-Vektoren inkloniert vorlagen (PAC43 und PAC44), verwendet (siehe Abbildung 21). In der Literatur sind Untersuchungen beschrieben, in denen BAC- oder auch PAC- Klone erfolgreich für solche „Rescue“-Experimente eingesetzt werden konnten. So konnte z.B. durch ein BAC-Transgen, welches das für den zirkadianischen Rhythmus verantwortliche *clock* Gen enthielt, die Veränderung der geregelten Tages- und Nachtaktivität von Mäusen, die eine mutiertes *clock* Gen trugen, wieder normalisiert werden (Antoch, 1997). In einem weiteren Fall konnte ein BAC-Transgen, welches das *Myo15* Gen enthielt, den Phänotyp der *shaker-2* Mausmutation, die durch das Auftreten von Taubheit und sogenanntem „*cycling behavior*“ gekennzeichnet ist, wieder aufheben (Probst, 1998). Da die klonierten genomischen Fragmente relativ groß sind steigt die Wahrscheinlichkeit, daß alle regulatorischen Elemente für eine korrekte Genexpression im Fragment enthalten sind. Die Expression des Transgen konnte allerdings in keiner der drei transgenen Linien eine Veränderung des heterozygoten *Ft* Phänotyps bewirken, noch die Letalität des homozygoten *Ft* Phänotyps aufheben. Bei makroskopischen Vergleichen von *lrx3*-transgenen und nicht transgenen homozygoten *Ft* Embryonen konnten außerdem keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden.

Eine wesentliches Problem, das bei einer derartigen Analyse auftritt, betrifft die Frage, ob mit Hilfe der Transgene eine zum Wildtyp vergleichbare *lrx3* Expression erzeugt werden konnte. In situ Hybridisierungsexperimente auf homozygoten *Ft* Embryonen, die keine endogene *lrx3* Expression aufweisen, zeigten, daß die verwendeten Transgene PAC43 und PAC44 zwar eine *lrx3* Expression bewirken, jedoch im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes *lrx3* Expressionsmuster beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 26). Sogar innerhalb der einzelnen transgenen Linien konnten Expressionsunterschiede festgestellt werden, die nicht auf die Verwendung der verschiedenen Transgene zurückgeführt werden konnten. Demnach konnte kein zum endogenen *lrx3* Gen vergleichbare transgene *lrx3* Expression erreicht werden.

Ein Grund dafür, daß keine Veränderungen des *Ft* Phänotyps in Anwesenheit der Transgene zu beobachten sind, könnte in der Wahl der verwendeten genomischen Fragmente für die Herstellung der transgenen Linien liegen. Ein auf den Transgenen fehlendes „*Enhancer*“ Element könnte dazu führen, das *Irx3* nicht bzw. nur in unzureichender Stärke in den Zelltypen exprimiert wird, in denen dieses Gen essentiell benötigt wird. So wird *Irx3* im Wildtyp in verschiedenen Bereichen des Kopfes exprimiert, die wiederum in homozygoten *Ft* Embryonen verändert sind. Davon betroffen ist z.B. das Kopfmesenchym um die Augenanlagen mit Ausdehnung in Richtung Nasengrube (siehe Abbildung 26, A und C, (Bosse, 1997)) Hingegen konnte in *Irx3*-transgenen homozygoten *Ft* Embryonen keine bzw. nur sehr geringe *Irx3* Expression im Kopfbereich beobachtet werden (siehe Abbildung 26). Wäre *Irx3* tatsächlich verantwortlich für die korrekte Ausbildung der Kopfregion, so könnte in den *Irx3*-transgenen Embryonen durch die fehlende bzw. unzureichende Expression des Transgens in der Kopfregion der Wildtyp-Phänotyp nicht wieder hergestellt werden. Durch die Verwendung eines Transgens, welches einen größeren genomischen Bereich überspannen würde, wie das z.B. für PAC47 der Fall ist (siehe Abbildung 11), könnte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, daß alle für eine korrekte Expression notwendigen regulatorischen Elemente innerhalb dieses Fragments enthalten sind. Mit zunehmender Größe der Transgene wächst allerdings die Wahrscheinlichkeit an, daß zusätzlich zu *Irx3* ein weiteres Gen enthalten ist und damit Einfluß auf den *Ft* Phänotyp nehmen könnte. Bei einem erfolgreichen „*Rescue*“ könnte dann keine Zuordnung von Gen und Funktion vorgenommen werden.

Eine weitere Erklärung für eine vom Wildtyp abweichende transgene *Irx3* Expression ist die Tatsache, daß *Irx3* Teil eines Genclusters ist, der wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt sogar in duplizierter Form vorliegt. Wie man bei den Hox Genen, einer Gruppe von Homeoboxgenen, die ebenfalls in mehreren Gencluster vorliegen, herausgefunden hat, besteht ein Zusammenhang zwischen der korrekten Expression dieser Gene und ihrer Anordnung im Gencluster (Für einen Übersichtsartikel siehe (Krumlauf, 1994)). Dieses könnte bei der Expression von *Irx3* ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Ein „*Rescue*“ des *Ft*

Phänotyps, durchgeführt mit einem zufällig in das Genom integrierten *Irx3* Transgen, wäre in so einem Fall nicht zu erwarten, da die korrekte Expression des Gens auch von dessen Lage im Genverband beeinflusst werden könnte.

Im Gegensatz zu einer *Irx3*-Fehlexpression könnte eine zu schwache *Irx3*-Expression durch eine Erhöhung der Kopienzahl ausgeglichen werden. Es ist bekannt, daß in vielen Fällen die Expression von Transgenen bei gleicher Kopienzahl relativ schwächer im Vergleich zum endogenen Gen ist. Wäre also eine zu geringe *Irx3*-Expression die Ursache für den unveränderten *Ft* Phänotyp in *Irx3*-transgenen Mäusen, so konnte durch Kreuzung der transgenen Tiere die Kopienzahl erhöht werden. Ein derartiges Vorgehen wäre, um den Einfluß des Transgen auf den homozygoten *Ft*-Phänotyp zu untersuchen, jedoch vergleichsweise aufwendig, da die Wahrscheinlichkeit einen doppelt *Irx3*-transgenen und homozygoten *Ft* Embryo zu erhalten nur noch $1/16$ beträgt.

Wenn die Inaktivierung von *Irx3* in der *Ft* Mutante keine Auswirkung auf den *Ft* Phänotyp hätte, sollten *Irx3*-transgene *Ft* Tiere keine Veränderung in der Ausprägung des *Ft* Phänotyps zeigen. Entsprechend wäre der erfolgreiche Gen-„Rescue“ von *Irx3* ohne phänotypischen Effekt. Einen Ausgleich des *Irx3*-Expressionsverlusts in der *Ft* Mutante könnte durch ein anderes Gen, so z.B. durch das zu *Irx3* paraloge *Irx1* Gen bewirkt werden. Dies ist jedoch als relativ unwahrscheinlich anzusehen, da die Expressionsmuster von *Irx1* und *Irx3* unterschiedlich sind (Bosse, 1997). Klärung könnte hier eine gezielte Inaktivierung von *Irx3* durch ein sogenanntes „knock out“-Experiment bringen. Würde man in diesem Fall keinen Phänotyp erhalten, so würde dies der oben beschriebenen Hypothese, nach der *Irx3* möglicherweise keine Auswirkung auf den *Ft* Phänotyp hat, entsprechen.

Ein nur im experimentellen Sinne, d.h. ohne detektierbare phänotypische Veränderungen verlaufendes erfolgreiches „Rescue“-Experiment wäre ebenfalls gegeben, wenn *Irx3* zwar an der Ausbildung des homozygoten *Ft* Phänotyps beteiligt ist, jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt. Dies würde bedeuten, daß die Lethalität des *Ft/Ft* Phänotyps erst überwunden werden müßte, um den positiven Einfluß der *Irx3*-Transgene sichtbar machen zu können. Gegen diese Hypothese

spricht allerdings die beobachtete relativ frühe Expression von *Irx3*, die schon ab Tag 7,5 in der anterioren Region des Embryos nachgewiesen werden kann (Bosse, 1997). Diese läßt vermuten, daß *Irx3* schon sehr früh eine Funktion in der Embryogenese einnimmt.

Zusammenfassend scheint es notwendig zu sein, zusätzlich zu dem durchgeführten „*Rescue*“-Experiment eine Inaktivierung dieses Gens, d. h ein „*knock out*“-Experiment durchzuführen, um so zusätzliche Evidenzen zur Funktion des *Irx3* Gens im Zusammenhang mit der *Ft* Mutation erhalten zu können.

Der Vorteil dieses „*Rescue*“-Experimentes gegenüber der Inaktivierungsstrategie lag auch in der Verfügbarkeit der durch die „*Chromosome Walking*“-Experimente erhaltenen Transgene, die daher umgehend zu einer vergleichsweise schnellen Generierung der transgenen Mäuse verwendet werden konnten. Bei einer gezielten Inaktivierung hätten zunächst umfangreiche Vorarbeiten, wie z.B. die Aufklärung der genomischen Organisation des zu untersuchenden Gens, die Klonierung des Inaktivierungsvektors sowie der Generierung mehrerer ES Zellklone mit der gewünschten homologen Rekombination, durchgeführt werden müssen, bevor die eigentliche Generierung und Untersuchung der erhaltenen Tiere hätte begonnen werden können. Zudem kann auch bei einer Inaktivierungsstrategie nicht immer ein schlüssiges Ergebnis erhalten werden, da z.B. bei über 2/3 der in der Maus vorhandenen Gene bei einer „*loss-of-function*“ Mutation kein vom Wildtyp abweichendes Phänotyp zu erwarten ist (Miklos, 1996). Somit hätte auch eine wesentlich zeitaufwendigere Analyse des *Irx3* Gens mit Hilfe einer „*loss-of-function*“ Strategie keineswegs a priori den Erhalt eines interpretierfähigen Ergebnisses gewährleisten können.

5.3.1 Einfluß der *Irx3* Transgene auf die *Shh* Expression in *Ft/Ft* Embryonen

Obwohl bei makroskopischer Betrachtung von *Irx3*-transgenen und nicht transgenen *Ft/Ft* Embryonen keine Unterschiede festgestellt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß auf molekularer Ebene Veränderungen des *Ft* Phänotyps durch die Expression der Transgene stattgefunden haben. Molekulare Marker, die durch die *Ft* Mutation in ihrer Expression beeinflusst werden, könnten daher erste Hinweise auf die Strukturen liefern, in denen eine transgene *Irx3* Expression eine

Veränderung in Richtung des Wildtyps bewirkt haben könnte. Ein solcher Marker stellt das *Shh* Gen (Echelard, 1993) dar, das in 10,5 Tage alten Wildtyp Embryonen unter anderem in der Bodenplatte des Neuralrohrs und dem darunterliegenden Notochord exprimiert wird (siehe Abbildung 27, A und B, (Yamada, 1993); (Ericson, 1996)). In homozygoten *Ft* Embryonen können Unterbrechungen dieser Expressionsdomänen in unregelmäßigen Abständen beobachtet werden (siehe Abbildung 27, C und D). Bis zur Beendigung der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese veränderte Expression durch eine Runterregulierung des *Shh* Gens oder durch das Fehlen der exprimierenden Zelltypen entstand, da nähere histologische Untersuchungen dieser Embryonen noch ausstehen. Ein durch das Fehlen der Bodenplatte des Neuralrohrs bedingter Expressionsverlust wird allerdings durch immunhistologische Befunde an Gewebeschnitten von *Ft/Ft* Embryonen unterstützt, die von Dr. James Briscoe (Center for Neurobiology and Behavior, Columbia University, New York, U.S.A.) erhalten wurden. *Shh* stellt somit den ersten molekularen Marker dar, der für die Untersuchungen der *Irx3*-transgenen *Ft/Ft* Embryonen herangezogen werden kann, da zum einen dieses Gen in einem durch die *Ft* Mutation veränderten Gewebe exprimiert wird, nämlich dem Neuralrohr, und zum anderen dieses Gewebe auch eine Transgenexpression aufweist. Die Untersuchung *Irx3*-transgener *Ft/Ft* Embryonen mit einer für das *Shh* Gen spezifischen Sonde zeigte jedoch keine Veränderung des *Ft* spezifischen Expressionsmusters, d.h. die Präsenz der *Irx3* Transgene konnte keine 'Normalisierung' der *Shh* Expression in *Ft/Ft* Embryonen bewirken (siehe Abbildung 27, F und G).

Ein Vergleich der Expressionsdomänen von *Shh* und *Irx3* im Wildtyp zeigt, daß *Shh* in der ventralen Region des Neuralrohres, nämlich der Bodenplatte exprimiert wird (Yamada, 1993); (Ericson, 1996), wohingegen *Irx3* eine mehr dorsal gelegenen Expressionsdomäne aufweist (Bosse, 1997). Beide Expressionsbereiche überlappen nicht. Daher ist es prinzipiell möglich, daß kein Zusammenhang zwischen der veränderten *Shh* Expression und dem Funktionsverlust von *Irx3* in *Ft/Ft* Embryonen besteht. Der *Irx3* Transgen-„Rescue“ hätte demnach, selbst in Anbetracht einer mit der endogenen *Irx3* Expression vergleichbaren transgenen *Irx3* Expression, auch keine Auswirkung auf den in

diesem Gewebe auftretenden *Ft* Phänotyp. Auch in diesem Fall könnte eine gezielte Inaktivierung des *lrx3* Gens aufklären, ob und welche Funktion diese Gen bei der Ausbildung des Neuralrohrs im Wildtyp einnimmt und was der Funktionsverlust von *lrx3* in der *Fused toes* Mutante im Bezug auf die Neuralrohrentwicklung bewirkt hat.

5.4 Fazit der Arbeit und Zukunftsperspektiven

Die Klonierung und Kartierung der gesamten genomischen DNA am *Fused toes* Locus stellt die Voraussetzung dar, eine vollständige Charakterisierung der *Ft* Mutation durchführen zu können. Mit Hilfe der genomischen Fragmente können zum einen die Gene identifiziert werden, die bislang noch unentdeckt geblieben sind. Desweiteren können auch solche Gene, deren kodierende Sequenzen zwar nicht deletiert wurden, von denen jedoch wichtige regulatorische Elemente, wie z.B. eine Promotorregion als Folge der *Ft* Mutation in ihrer Funktion beeinträchtigt wurden, analysiert werden. Aufgrund der in der Einleitung beschriebenen Auswirkungen der *Ft* Mutation auf eine Reihe von verschiedenen entwicklungsbiologisch relevanten Vorgängen, wurde schon zu Beginn der Arbeit vermutet, daß bei der *Ft* Mutation die Funktion mehrerer Gene beeinträchtigt ist. Diese Vermutung wird durch die Kartierung und Identifizierung von zum gegenwärtigen Zeitpunkt bereits sechs verschiedenen Genen am *Ft* Locus weiterhin unterstützt. Unabhängig davon ob der *Ft* Phänotyp das Resultat eines singulären oder multiplen Gendefekts darstellt, wird es notwendig sein sukzessiv jedes einzelne Gen funktionell zu analysieren. Dies kann z.B. durch gezielte Inaktivierungen der Kandidatengene auf der Grundlage der in dieser Arbeit isolierten genomischen Fragmente am *Ft* Locus durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde bereits mit der funktionellen Charakterisierung eines dieser Gene, dem *lrx3* Gen, begonnen. Die Analyse des dazu durchgeführten „Rescue“-Experiment zeigte jedoch, daß die Interpretation der erhaltenen Daten ohne zusätzliche Informationen, wie sie z.B. aus der gezielten Inaktivierung des *lrx3* Gens gewonnen werden könnten, erschwert ist.

Geht man hingegen von einem Multigendefekt aus, sollte bei der Durchführung der Inaktivierungsstrategie der einzelnen Gene berücksichtigt werden, daß durch die enge Kopplung der am *Ft* Locus lokalisierten Gene, eine Kombinatorik der inaktivierten Gene nicht durch einfache Kreuzungsexperimente durchgeführt werden kann. Mit Hilfe geeigneter molekulargenetischer Methoden, wie z.B. dem Cre/loxP-System (Gu, 1993), das in der Einleitung bereits beschrieben wurde, können gezielt im Genom Deletionen eingeführt werden, mit Hilfe derer es möglich sein sollte die Regionen, und damit auch die entsprechenden Gene, am *Fused toes* Locus zu identifizieren, die bei der Ausprägung des *Ft* Phänotyps eine mehr oder weniger wichtige Rolle spielen. Obwohl die Analyse der *Ft* Mutation sich als sehr umfangreich gestalten wird, liefert sie mit großer Wahrscheinlichkeit neue Erkenntnisse, die zur Aufklärung entwicklungsbiologisch relevanter Prozesse beitragen können.

6 Literatur

Akiyama, N., Sasaki, H., Ishizuka, T., Kishi, T., Sakamoto, H., Onda, M., Hirai, H., Yazaki, Y., Sugimura, T., and Terada, M. (1997). Isolation of a candidate gene, CAB1, for cholesterol transport to mitochondria from the c-ERBB-2 amplicon by a modified cDNA selection method. *Cancer Res* 57, 3548-53.

Alphey, L. (1998). DNA-Sequenzierung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-402.

Antoch, M. P., Song, E. J., Chang, A. M., Vitaterna, M. H., Zhao, Y., Wilsbacher, L. D., Sangoram, A. M., King, D. P., Pinto, L. H., and Takahashi, J. S. (1997). Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 89, 655-67.

Auch, D., and Reth, M. (1990). Exon trap cloning: using PCR to rapidly detect and clone exons from genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Res* 18, 6743-4.

Ausmeier, K. (1997). Charakterisierung der Deletion in der Fused toes Mausmutante. Diplomarbeit, Universität Hannover.

Bao, Z. Z., Bruneau, B. G., Seidman, J. G., Seidman, C. E., and Cepko, C. L. (1999). Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science* 283, 1161-4.

Bellefroid, E. J., Kobbe, A., Gruss, P., Pieler, T., Gurdon, J. B., and Papalopulu, N. (1998). Xiro3 encodes a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois genes and functions in neural specification. *Embo J* 17, 191-203.

Bender, W., Spierer, P., and Hogness, D. S. (1983). Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the *bithorax* complex in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 168, 17-33.

Bialek, P., Chan, C. T., and Yee, S. P. (2000). Characterization of a novel insertional mouse mutation, *kkt*: A closely linked modifier of *Pax1*. *Dev Biol* 218, 354-66.

Bird, A. (1995). Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends in Genetics* 11, 94-99.

Bosse, A., Zulch, A., Becker, M. B., Torres, M., Gomez-Skarmeta, J. L., Modolell, J., and Gruss, P. (1997). Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech Dev* 69, 169-81.

Bruneau, B. G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C. J., Seidman, J. G., and Seidman, C. E. (1999). Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* 211, 100-8.

Buckler, A. J., Chang, D. D., Graw, S. L., Brook, J. D., Haber, D. A., Sharp, P. A., and Housman, D. E. (1991). Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4005-9.

Burglin, T. R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* 25, 4173-80.

Burke, D. T. (1991). The role of yeast artificial chromosome clones in generating genome maps. *Curr Opin Genet Dev* 1, 69-74.

Burke, D. T., Carle, G. F., and Olson, M. V. (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236, 806-12.

Cachon-Gonzalez, M. B., Fenner, S., Coffin, J. M., Moran, C., Best, S., and Stoye, J. P. (1994). Structure and expression of the hairless gene of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7717-21.

Campuzano, S., and Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* 8, 202-8.

Cavodeassi, F., Diez Del Corral, R., Campuzano, S., and Dominguez, M. (1999). Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development* 126, 4933-42.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.

Church, D. M., Stotler, C. J., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Trofatter, J. A., and Buckler, A. J. (1994). Isolation of genes from complex sources of mammalian genomic DNA using exon amplification. *Nat Genet* 6, 98-105.

Cohen, D. R., Cheng, C. W., Cheng, S. H., and Hui, C. (2000). Expression of two novel mouse Iroquois homeobox genes during neurogenesis. *Mech Dev* 91, 317-321.

Collins, F. S. (1992). Positional cloning: let's not call it reverse anymore (news). *Nat Genet* 1, 3-6.

Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Eppig, J. T., Maltais, L. J., Miller, J. C., Dietrich, W. F., Weaver, A., Lincoln, S. E., Steen, R. G., and et al. (1993). A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects (see comments). *Science* 262, 57-66.

Deloukas, P., Schuler, G. D., Gyapay, G., Beasley, E. M., Soderlund, C., Rodriguez-Tome, P., Hui, L., Matisse, T. C., McKusick, K. B., Beckmann, J. S., Bentolila, S., Bihoreau, M., Birren, B. B., Browne, J., Butler, A., Castle, A. B., Chiannikulchai, N., Clee, C., Day, P. J., Dehejia, A., Dibling, T., Drouot, N., Duprat, S., Fizames, C., Bentley, D. R., and et al. (1998). A physical map of 30,000 human genes. *Science* 282, 744-6.

Dietrich, W. F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M. A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M. J., Ingalls, K. A., TJ, O. C., and et al. (1996). A comprehensive genetic map of the mouse genome (published erratum appears in *Nature* 1996 May 9;381(6578):172). *Nature* 380, 149-52.

Diez del Corral, R., Aroca, P., JL, G. m.-S., Cavodeassi, F., and Modolell, J. (1999). The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*. *Genes Dev* 13, 1754-61.

Dolle, P., Dierich, A., LeMeur, M., Schimmang, T., Schuhbaur, B., Chambon, P., and Duboule, D. (1993). Disruption of the *Hoxd-13* gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* 75, 431-41.

Doolittle, D. P., Davisson, J. N., Guidi, J. N., and Green, M. C. (1996). Catalog of mutant genes and polymorphic loci. In *Genetic variants and strains of the laboratory mouse* (ed M.F. Lyon, S. Rastan and S.D.M. Brown) Oxford University Press, Oxford, UK 3rd ed., 17-854.

Duyk, G. M., Kim, S. W., Myers, R. M., and Cox, D. R. (1990). Exon trapping: a genetic screen to identify candidate transcribed sequences in cloned mammalian genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8995-9.

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-30.

Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K., and Harrison, S. C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71, 1223-37.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., and Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661-73.

Francis, F., Zehetner, G., Hoglund, M., and Lehrach, H. (1994). Construction and preliminary analysis of the ICRF human P1 library. *Genet Anal Tech Appl* 11, 148-57.

Goldwurm, S., Menzies, M. L., Banyer, J. L., Powell, L. W., and Jazwinska, E. C. (1997). Identification of a novel Krueppel-related zinc finger gene (ZNF184) mapping to 6p21.3. *Genomics* 40, 486-9.

Gomez-Skarmeta, J. L., del Corral, R. D., de la Calle-Mustienes, E., Ferre-Marco, D., and Modolell, J. (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85, 95-105.

Gomez-Skarmeta, J. L., Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J., and Mayor, R. (1998). Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *Embo J* 17, 181-90.

Gomez-Skarmeta, J. L., and Modolell, J. (1996). *araucan* and *caupolican* provide a link between compartment subdivisions and patterning of sensory organs and veins in the *Drosophila* wing. *Genes Dev* 10, 2935-45.

Goriely, A., Diez del Corral, R., and Storey, K. G. (1999). *c-irx2* expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo (In Process Citation). *Mech Dev* 87, 203-6.

Grillenzoni, N., van Helden, J., Dambly-Chaudiere, C., and Ghysen, A. (1998). The *iroquois* complex controls the somatotopy of *Drosophila notum* mechanosensory projections. *Development* 125, 3563-9.

Gu, H., Zou, Y. R., and Rajewsky, K. (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155-64.

Guimera, J., Pucharcos, C., Domenech, A., Casas, C., Solans, A., Gallardo, T., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M. (1997). Cosmid contig and transcriptional map of three regions of human chromosome 21q22: identification of 37 novel transcripts by direct selection. *Genomics* 45, 59-67.

Hamaguchi, M., Sakamoto, H., Tsuruta, H., Sasaki, H., Muto, T., Sugimura, T., and Terada, M. (1992). Establishment of a highly sensitive and specific exon-trapping system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9779-83.

Heymer, J., Kuehn, M., and Ruther, U. (1997). The expression pattern of *nodal* and *lefty* in the mouse mutant *Ft* suggests a function in the establishment of handedness. *Mech Dev* 66, 5-11.

Heymer, J., and Ruther, U. (1999). Syndactyly of *Ft/+* mice correlates with an imbalance in *bmp4* and *fgf8* expression (In Process Citation). *Mech Dev* 88, 173-81.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., and Lacy, E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo-A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Horvat, S., and Medrano, J. F. (1998). A 500-kb YAC and BAC contig encompassing the high-growth deletion in mouse chromosome 10 and identification of the murine *Raidd/Cradd* gene in the candidate region. *Genomics* 54, 159-64.

Hubert, R. S., Mitchell, S., Chen, X. N., Ekmekji, K., Gadomski, C., Sun, Z., Noya, D., Kim, U. J., Chen, C., Shizuya, H., Simon, M., de Jong, P. J., and Korenberg, J. R. (1997). BAC and PAC contigs covering 3.5 Mb of the Down syndrome congenital heart disease region between D21S55 and MX1 on chromosome 21. *Genomics* 41, 218-26.

Ingham, P. W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila* (published erratum appears in *Nature* 1988 Oct 20;335(6192):744). *Nature* 335, 25-34.

Ioannou, P. A., Amemiya, C. T., Garnes, J., Kroisel, P. M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M. A., and de Jong, P. J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* 6, 84-9.

Jolly, D. J., Esty, A. C., Bernard, H. U., and Friedmann, T. (1982). Isolation of a genomic clone partially encoding human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5038-41.

Joyner, A. L. (1993). *Gene targeting-A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, NY.

Karls, U., Muller, U., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Harbers, K. (1992). Structure, expression, and chromosome location of the gene for the beta subunit of brain-specific Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II identified by transgene integration in an embryonic lethal mouse mutant. *Mol Cell Biol* 12, 3644-52.

Kehl, B. T., Cho, K. O., and Choi, K. W. (1998). *mirror*, a *Drosophila* homeobox gene in the Iroquois complex, is required for sensory organ and alula formation. *Development* 125, 1217-27.

Kern, S., and Hampton, G. M. (1997). Direct hybridization of large-insert genomic clones on high-density gridded cDNA filter arrays. *Biotechniques* 23, 120-4.

Korn, B., Sedlacek, Z., Manca, A., Kioschis, P., Konecki, D., Lehrach, H., and Poustka, A. (1992). A strategy for the selection of transcribed sequences in the Xq28 region. *Hum Mol Genet* 1, 235-42.

Kouprina, N., Eldarov, M., Moyzis, R., Resnick, M., and Larionov, V. (1994). A model system to assess the integrity of mammalian YACs during transformation and propagation in yeast. *Genomics* 21, 7-17.

Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.

Lamb, B. A., Bardel, K. A., Kulnane, L. S., Anderson, J. J., Holtz, G., Wagner, S. L., Sisodia, S. S., and Hoeger, E. J. (1999). Amyloid production and deposition in mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 yeast artificial chromosome transgenic mice. *Nat Neurosci* 2, 695-7.

Lee, J. J., Radice, G., Perkins, C. P., and Costantini, F. (1992). Identification and characterization of a novel, evolutionarily conserved gene disrupted by the murine H beta 58 embryonic lethal transgene insertion. *Development* 115, 277-88.

Lesche, R. (1997). Molekulare und funktionelle Analyse des Ft1-Gens in der Maus. Dissertation, Universität Hannover.

Lesche, R., Peetz, A., van der Hoeven, F., and Ruther, U. (1997). Ft1, a novel gene related to ubiquitin-conjugating enzymes, is deleted in the Fused toes mouse mutation. *Mamm Genome* 8, 879-83.

Lewin, B. (1994). *Genes* V, 5. Auflage. Oxford University Press, Oxford, UK.

Leyns, L., Gomez-Skarmeta, J. L., and Dambly-Chaudiere, C. (1996). iroquois: a prepatter gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech Dev* 59, 63-72.

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995). *Molecular Cell Biology*, 3. Auflage. Scientific American Books, Oxford, UK.

Lovett, M., Kere, J., and Hinton, L. M. (1991). Direct selection: a method for the isolation of cDNAs encoded by large genomic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9628-32.

Mandel, M., and Higa, A. (1992). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. 1970 (classical article). *Biotechnology* 24, 198-201.

Matsuura, S., Tauchi, H., Nakamura, A., Kondo, N., Sakamoto, S., Endo, S., Smeets, D., Solder, B., Belohradsky, B. H., Der Kaloustian, V. M., Oshimura, M., Isomura, M., Nakamura, Y., and Komatsu, K. (1998). Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nat Genet* 19, 179-81.

McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J., and Simon, M. A. (1997). *mirror* encodes a novel Pbx-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev* 11, 1073-82.

Medberry, S. L., Dale, E., Qin, M., and Ow, D. W. (1995). Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-lox site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 23, 485-90.

Meese, E., and Menzel, A. (1995). *Genisolierung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Miklos, G. L., and Rubin, G. M. (1996). The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell* 86, 521-9.

Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., Overbeek, P. A., Hamada, H., and Yokoyama, T. (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 395, 177-81.

Monaco, A. P., and Larin, Z. (1994). YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends in Biotechnology* 12, 280-286.

Morgan, D., Turnpenny, L., Goodship, J., Dai, W., Majumder, K., Matthews, L., Gardner, A., Schuster, G., Vien, L., Harrison, W., Elder, F. F., Penman-Splitt, M., Overbeek, P., and Strachan, T. (1998). *Inversin*, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the *inv* mouse (published erratum appears in *Nat Genet* 1998 Nov;20(3):312). *Nat Genet* 20, 149-56.

Nehls, M., Pfeifer, D., Micklem, G., Schmoor, C., and Boehm, T. (1994). The sequence complexity of exons trapped from the mouse genome. *Curr Biol* 4, 983-9.

Nelson, M., Raschke, E., and McClelland, M. (1993). Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 21, 3139-54.

Nusbaum, C., Slonim, D. K., Harris, K. L., Birren, B. W., Steen, R. G., Stein, L. D., Miller, J., Dietrich, W. F., Nahf, R., Wang, V., Merport, O., Castle, A. B., Husain, Z., Farino, G., Gray, D., Anderson, M. O., Devine, R., Horton, L. T., Jr., Ye, W., Wu, X., Kouyoumjian, V., Zemsteva, I. S., Wu, Y., Collymore, A. J., Courtney, D.

F., and et al. (1999). A YAC-based physical map of the mouse genome. *Nat Genet* 22, 388-93.

Olson, M., Hood, L., Cantor, C., and Botstein, D. (1989). A common language for physical mapping of the human genome (see comments). *Science* 245, 1434-5.

Pavlova, M. N., Clark, A. M., and Gossler, A. (1998). High-resolution mapping of the truncate (tc) locus on mouse chromosome 6. *Mamm Genome* 9, 843-5.

Peetz, A. (1997). Molekulare Analyse der Fused toes Mausmutante unter besonderer Berücksichtigung des p130-Gens. Dissertation, Universität Bremen.

Peichel, C. L., Abbott, C. M., and Vogt, T. F. (1996). Genetic and physical mapping of the mouse *Ulnaless* locus. *Genetics* 144, 1757-67.

Perry, W. L. r., Vasicek, T. J., Lee, J. J., Rossi, J. M., Zeng, L., Zhang, T., Tilghman, S. M., and Costantini, F. (1995). Phenotypic and molecular analysis of a transgenic insertional allele of the mouse *Fused* locus. *Genetics* 141, 321-32.

Peters, T., Ausmeier, K., and Ruther, U. (1999). Cloning of *fatso* (*Fto*), a novel gene deleted by the fused toes (*Ft*) mouse mutation (In Process Citation). *Mamm Genome* 10, 983-6.

Peters, T., Dildrop, R., Ausmeier, K., and Ruther, U. (zur Publikation eingereicht). Organization of mouse *lrx* homeobox genes in two clusters suggest a conserved regulation and function in vertebrate development.

Pierce, J. C., Sauer, B., and Sternberg, N. (1992). A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: improved cloning efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2056-60.

Primrose, S. B. (1996). *Genomanalyse*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Probst, F. J., Fridell, R. A., Raphael, Y., Saunders, T. L., Wang, A., Liang, Y., Morell, R. J., Touchman, J. W., Lyons, R. H., Noben-Trauth, K., Friedman, T. B., and Camper, S. A. (1998). Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* 280, 1444-7.

Radice, G., Lee, J. J., and Costantini, F. (1991). H beta 58, an insertional mutation affecting early postimplantation development of the mouse embryo. *Development* 111, 801-11.

Rijkers, T., Peetz, A., and Ruther, U. (1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res* 3, 203-15.

Roberts, R. J., and Macelis, D. (1993). REBASE--restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Res* 21, 3125-37.

Schedl, A., Larin, Z., Montoliu, L., Thies, E., Kelsey, G., Lehrach, H., and Schutz, G. (1993). A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection. *Nucleic Acids Res* 21, 4783-7.

Segre, J. A., Nemhauser, J. L., Taylor, B. A., Nadeau, J. H., and Lander, E. S. (1995). Positional cloning of the nude locus: genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat. *Genomics* 28, 549-59.

Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992). 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* 89, 8794-7.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., and Lukyanov, S. A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23, 1087-8.

Silverman, G. A. (1993). Isolating vector-insert junctions from yeast artificial chromosomes. *PCR Methods Appl* 3, 141-50.

Smith, A. J., De Sousa, M. A., Kwabi-Addo, B., Heppell-Parton, A., Impey, H., and Rabbitts, P. (1995). A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination (published erratum appears in *Nat Genet* 1996 Jan;12(1):110). *Nat Genet* 9, 376-85.

Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Jelene, P., Su, L., Lawton, L., and Efstratiadis, A. (1994). Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9228-32.

Sternberg, N. (1990). Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 103-7.

Sternberg, N. (1994). The P1 cloning system: past and future. *Mamm Genome* 5, 397-404.

Supp, D. M., Witte, D. P., Potter, S. S., and Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* 389, 963-6.

Tan, J. T., Korzh, V., and Gong, Z. (1999). Expression of a zebrafish iroquois homeobox gene, *ziro3*, in the midline axial structures and central nervous system (In Process Citation). *Mech Dev* 87, 165-8.

Trachtulec, Z., Mnukova-Fajdelova, M., Hamvas, R. M. J., Gregorova, S., Mayer, W. E., Lehrach, H. R., Vincek, V., Forejt, J., and Klein, J. (1997). Isolation of candidate hybrid sterility 1 genes by cDNA selection in a 1.1 megabase pair region on mouse chromosome 17. *Mamm Genome* 8, 312-6.

Uberbacher, E. C., Xu, Y., and Mural, R. J. (1996). Discovering and understanding genes in human DNA sequence using GRAIL. *Methods Enzymol* 266, 259-81.

van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M. G., Kyewski, B., and Ruther, U. (1994). Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant *Fused toes* (*Ft*). *Development* 120, 2601-7.

van der Meer-de Jong, R., Dickinson, M. E., Woychik, R. P., Stubbs, L., Hetherington, C., and Hogan, B. L. (1990). Location of the gene involving the small eye mutation on mouse chromosome 2 suggests homology with human aniridia 2 (*AN2*). *Genomics* 7, 270-5.

van der Zee, S. P. M., Schreflen, E. D. A. M., and Monnens, L. A. H. (1968). Megaloblastic anaemia in the Lesch-Nyhan syndrome. *Lancet*, 1427 only.

Volkmann, A., Doffinger, R., Ruther, U., and Kyewski, B. A. (1996). Insertional mutagenesis affecting programmed cell death leads to thymic hyperplasia and altered thymopoiesis. *J Immunol* 156, 136-45.

Wilkinson, D. G., and Nieto, M. A. (1993). Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* 225, 361-73.

Woo, S. S., Jiang, J., Gill, B. S., Paterson, A. H., and Wing, R. A. (1994). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res* 22, 4922-31.

Woychik, R. P., and Alagramam, K. (1998). Insertional mutagenesis in transgenic mice generated by the pronuclear microinjection procedure. *Int J Dev Biol* 42, 1009-17.

Yamada, T., Pfaff, S. L., Edlund, T., and Jessell, T. M. (1993). Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* 73, 673-86.

Zhao, X. P., and Elder, J. T. (1997). Positional cloning of novel skin-specific genes from the human epidermal differentiation complex. *Genomics* 45, 250-8.

7 Anhang

7.1 Oligonukleotide

Exon 2/2-F1	TTC ACC GTG GTC AGT GAT CCT C
Exon 2/2-B8	TCC TTT CTG AAA CAG GTC AGC AAG
Exon 1/25-F1	GGA TAA AGA AAA CAA CCC AGC GG
Exon 1/25-B1	TGA GGC AGT TCT CGC CTT TG
Exon 5/144-F1	TGA TGG CGG TGT CTT GGA AG
Exon 5/144-B8	CTT TGA GGT TGT CTG TAA GGC TCT G
C153'-B1	TTA AGT TGG TGC CAA GTC TCC TTC
<i>Ft2</i> -F1	GGA TGA AGC AGA AAC TGT ACA ACC C
<i>Ft2</i> -B1	CCT TTC TGA AAA CCT CAC CGA GTG
<i>lrx3</i> -F2	TCG CTG TAG TGC CTT GGA AGT
<i>lrx3</i> -B2	CGA GGA GAG AGC TGA TAA GAC CAG
<i>lrx3</i> -S1	CAA AAG TGG CAA CAG CTC
<i>lrx3</i> -F6	TGG TCT TAT CAG CTC TCT CCT CGT C
<i>lrx3</i> -F1	CCC TAT CCA ATG TGC TTT CAT CAG
<i>lrx3</i> -B1	GGC TGT CCT TCA GCT CAT ACT GAG
<i>lrx5</i> -F1	TTC TCT TAC GTG GGC TCT C
<i>lrx5</i> -B2	TTG AGA GTG GCT GTA GCG TC
<i>lrx6</i> -F1	TTT GGA CAC CCG TAT GGC AG
<i>lrx6</i> -B1	TTT CGC AGC AAG TGG CAC TG
BH600-F3	CTT CAG GAA GGA CTT GAG GCA AAT G
BH600-B8	AGA CGC TAC AGA TGT CTG ATC CCT G
MB9T7-BAC	TAG CTC TTC TGC CTA GAA GCC TTG TGC CCC GGG GAA G
PAC8SP6-F1	TGA CCG TTG GCT CAT TCT CCA G
PAC8SP6-B10	TCC TTT CTC CAT CCC TGA AAC AC
PAC8T7-F1	TCT TGC CCT TCT TCC CCA TC
PAC8T7-B3	TCT GGT CAC TGT AGT GCT CAA ACA C
PAC41SP6-F3	GGC TTT GAC TCA GAT CCA ACA CCC ATT AAC
PAC41SP6-B1	GCT CAC CTC ACG TCT TAC TTA TGG TC
PAC41T7-F1	CCT CCA AGA ACG GAA ATG GTC C
PAC41T7-B1	CCT TTG TGA ATG GCA CAT GCT C
MB10-F1	AGC AAC ACT AAT CCC AGC AAA G
MB10-B4	TGG ATG GCT GAA TTT GAC ACA G
MB10-F3	GGC ATA CAT ACT CAA AAG GGT CTG G
MB10-B3	CTG CAA GGG GTG AAT CCT GTA G
PAC43SP6-F2	TGC TGT TGG AGT GTG AGA GCA G
PAC43SP6-B5	ATT CTG ACA GGC AGA GGA GCT G
PAC43T7-F1	GGA GGG GGA AAC ATC TTA CGA AC

PAC43T7-B1	TGT CCA GAG TGG TCC TCT ACC TTC
PAC44SP6-F1	AAC AGG AGA ATG GCA GGC TTG
PAC44SP6-B8	GGC AAC ACA AAA CGG CTG TG
PAC44T7-F7	GGA ACT TCT AGG AAA CAG CAA GAG G
PAC44T7-B1	CAA AGG ACT CCA AAT TGG CTT CTG
PAC47T7-F1	AGA TTG TAA AAG CCA CAC CCT GAC
PAC47T7-B5	CGT GTT TAG AGC TGA CCA TCT GG
PAC55T7-F5	ATC CAC GTC AGC ACC TCA TCT GAG
PAC55T7-B4	ACC AGT TGC CTC TTA CAT TCT TC
PAC82SP6-F1	TTG GAG CCC AGA GCT AAT GCA G
PAC82SP6-B15	TCA ATG AAG CAG ATG TGA CCT CAG
PAC82T7-F1	TGA TGC TTT AGA GCG AGG ATG G
PAC82T7-B2	TGC TAG AAT GGT TGG TGT TCA CAG
PAC71T7-F4	AAA CAC TGC CCA CAA ACC ACC C
PAC71T7-B2	GCC ACA TGG TCT TGA TCT TGA CTG
PAC93SP6-F1	GCA ATT TTC TTG CTC ATC CAT CCC
PAC93SP6-B6	TTC CAA CAC ACA AAT CCT TGG G
PAC93T7-F1	TCC ATG CAG AAG CAA GTG GG
PAC93T7-B1	GAG AGT AAT TGG AGC AAG CTG GAC
PAC94SP6-F5	CCA CAG AAT GTA ACA AAC CTA GCC C
PAC94SP6-B3	TTG CCC AAC TGC CTC TTA TCA G
PAC95SP6-F1	GGA GGT GAC AGC TTG GGT TAA AG
PAC95SP6-B3	GGA TTG TGT CTG GCT TGA GTC TG
PAC96T7-F1	ATG TGC TTG GAT ACT CCT GGG G
PAC96T7-B2	GAG GGA CTG AAG AAA TGA CTC GG
PAC33SP6-F5	TAA AGC TAC CAG GAC AGG GCA TGG
PAC33SP6-B2	ACA GAC AGG ATG GTC AGC GAT C
PAC33T7-F1	CAG ATG GAG TTC TCT CTG TGC TTG
PAC33T7-B2	TCG ATA GTC TGC CAC TTC CCA TCC
PAC1SP6-F2	GAT AGA AAG GTT CAT AAC GCC CTG
PAC1SP6-B10	GCA GGA CTG AGT TGG TCA CAT GAG
PAC1T7-F1	ATA ACA GCC TTC AAG TAG CTT GCC
PAC1T7-B4	AAT CCT TCA GCC TCT AAG GAG GAG
PAC43T7-B1	TGT CCA GAG TGG TCC TCT ACC TTC
PAC43SP6-B1	CTG TGG ATC ATT TCT GCC CAT C
PAC44T7-B1	CAA AGG ACT CCA AAT TGG CTT CTG
PAC44SP6-B2	GCT CAG AAT GGA TTA GAT GGA GCA G
T7-P1/PAC	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA
SP6-P1/PAC	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG G
pPAC4-F2	ATT CGG GAG GAT CGA AAC GG
pPAC4-B9	CAC ACA TCA AGT CCT TTT GCA GAC
<i>Ft/Wt</i>	CTG AAA GGT TGT ACT GAG CC
<i>Ft</i>	GTC CTT TCT CCA TGG GTA TG

Wt	GTG GAA CCC TTC TGT ACA TG
T7-universal	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
SP6-universal	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA
HPRT-3'	GCT GGT GAA AAG GAC CTC T
HPRT-5'	CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC
AP1	GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
AP2	AAT AGG GCT CGA GCG GC
Adaptor-lang	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT
Adaptor-kurz	H ₂ N-CCC GTC CA
PCR Anchor-T7-P1/PAC	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA
PCR Anchor-SP6-P1/PAC	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CAT TTA GGT GAC ACT ATA GAA GG
PCR Anchor	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C
D8Mit109-R	CCG TAG GCA TCT ACC CAC AT
D8Mit109-L	AGC CCC CTG TTT TGT TTT G
D8Mit348-R	ATG CAC AGA GAC AAT ACA AAC ACA
D8Mit348-L	AAT TAT GCT CAC TCT CGG CA
D8Mit366-R	GAC CAC AGC CTA CAA GCC AT
D8Mit366-L	TGC TCC TGT AGA GGA CCC TG
D8Mit15-R	AAG CTT ACG GTT TAA TCC CC
D8Mit15-L	AGC TGA ATT TGA GCT AGT CG
D8Mit32-R	AAG CAA TGA CCT CAA GAC TTC C
D8Mit32-L	GTT AGG CTT GAA GCA CAC AGC
D8Mit33-R	TTA TTC TGC CTC AAC ACC ACC
D8Mit33-L	TTT GAG CAA AGG ACT TGC CT
D8Mit164-R	TCC TGT CTC CAC AGA CAT GTG
D8Mit164-L	TAA CTG CAA AGA GGG TAG TGA GC
D8Mit182-R	CAG GGA ACA TCT TAT CAC TGA CC
D8Mit182-L	GAC CAA GAG GGG AGA GTG TG
D8Mit210-R	TTG CAG GTA TAT GTA TCC ATG ACC
D8Mit210-L	CAA TCA CCA AAG GCA CAT AGG
D8Mit241-R	GTT AGA CAT GTG GTC AAG CCT
D8Mit241-L	TCC TGT CTC CAC AGA CAT GTG
D8Mit311-R	GTG GCA AGG GGG TTA GAA AT
D8Mit311-L	CAT AGG GAC CCA TAC ATG TGG
D8Mit312-R	GTT GGT CTG GTC TCT CAG TGC
D8Mit312-L	ATT GAG ACT TGA GAC TGT CTT TAA ACA
D8Mit349-R	GGT GTA TAG GTG ACT ATG AGG TCT ACA
D8Mit349-L	AAC CAG AGA CAG GGC AAA GA
D8Mit11-R	CTT AAT CAG CAA TCC TTG ACA CC
D8Mit11-L	GCA GCA GTG GTA GCA AAT AGC
D8Mit183-R	TCT TTG AAC TGG CTA TAA TCA CTC A

D8Mit183-L TCT CAA ATA ACT ATC AAC TCT TAG GGG
 D8Mit351-R CCC TTA TTG GTT ACT GAA CCT CC
 D8Mit351-L AGG CGA GAA ACC AGA AAA CA
 D8Mit211-R TAC CCA CAA ACC TGT ATT TAA ATT AA
 D8Mit211-L CAG AAC ACT GTC CTG AAA AGT CC
 D8Mit110-R TGC TTT CCC GGA GAA GAG TA
 D8Mit110-L CTG TTT AAC GCC AAG AAG AGG

7.2 Partielle cDNA-Sequenz von *Ft2*

GGATGAAGCA CCTACTTCGT G * S D E A M K Q	GAAACTGTAC CTTTGACATG R N C T E T V K L Y	AACCCACGCT TTGGGTGCGA T H A Q P T L N P R	CACAAAATAC GTGTTTTATG H K I S T K Y S Q N T	AGCAATAGTT TCGTTATCAA Q Q * F S N S A I V	TACTTGAAGA ATGAACTTCT L * R L L E E Y L K	60
AGCCAGAGGA TCGGTCTCCT S Q R A R G K P E E	GAAATAAGAA CTTTATTCTT R N K K E I R K * E	ATTTGGAAAA TAAACCTTTT F G K N L E N I W K	CGTTATTTCAG GCAATAAGTC R Y S V I Q T L F S	TCACAGAGAG AGTGTCTCTC V T E R S Q R H R E	GCCAGATAGA CGGTCTATCT P D R G Q I E A R *	120
AGAGTTAGAG TCTCAATCTC R V R E L E K S * S	CACTTGGCAG GTGAACCGTC A L G R H L A T W Q	AGATCCTGAA TCTAGGACTT D P E E I L K R S *	AACTCAGTTG TTGAGTCAAC N S V T Q L K L S *	AAGAGAAAAG TTCTCTTTTC E E K R K R K R E K	AAAATGAAAT TTTTACTTTA K * N E N E I K M K	180
CGAGCTATCT GCTCGATAGA R A I E L S S S Y L	CTTCTTCAGC GAAGAAGTCG S S S A L L Q F F S	TTCGAGAACA AAGCTCTTGT S R T L R E Q F E N	GCAGGCTACA CGTCCGATGT A G Y Q A T S R L Q	GATCAGAGGT CTAGTCTCCA R S E V D Q R I R G	CAAATATTCG GTTTATAAGC C S F S N I R Q I F	240
GGACAATGTA CCTGTTACAT G Q C D N V G T M *	GAAACGATTA CTTTGCTAAT R N D * E T I K R L	AGCTTCATAA TCGAAGTATT A S * K L H K S F I	ACAACCAGTG TGTTGGTCCAC T T S Q P V N N Q W	GAGAAAAGCA CTCTTTTCGT G E K Q E K S R K A	ATGCTCTTTC TACGAGAAAG C S F N A L S M L F	320
AGTCATAGAA TCAGTATCTT S H R V I E Q S * K	GGAAAATTTA CCTTTTAAAT R K I Y G K F E N L	TTCAGCTTCA AAGTCGAAGT S A S I Q L Q F S F	AGAGAAGCAA TCTCTTCGTT R E A E K Q K R S K	AGAACACTCA TCTTGTGAGT K N T Q R T L E H S	GGATCAGCCA CCTAGTCGGT D Q P R I S H G S A	360
TGATGCCTTG ACTACGGAAC * C L D A L M M P *	ATGGCCAATG TACCGGTTAC D G Q W M A N W P M	GAGATGAGCT CTCTACTCGA R * A G D E L E M S	GAACAAGCAG CTTGTTTCGTC E Q A N K Q * T S S	CTTAAGGAGC GAATTCCTCG A * G A L K E L R S	AGCGTCTGAA TCGCAGACTT A S E Q R L K S V *	420
GTGCTGCAGC CACGACGTCG V L Q C Q S S A A A	CTTGAGAAGC GAACTCTTCG P * E A L E K L R S	AGCTGCACTC TCGACGTGAG A A L Q L H S S C T	GGTGAGGTTT CCACTCCAAA G E V V R F R * G F	TCAGAAAGGA AGTCTTTCCT F R K E S E R Q K G	GAGTAGAGGA CTCATCTCCT S R G E R V E E E * R	480
GCTGCAGGAT CGACGTCCTA A A G L Q D S C R I	AGAATTAATG TCTTAATTAC * N * * R I N E L M	ATTTAGAAAA TAAATCTTTT F R K D L E K I * K	GGAGCGGGAA CCTCGCCCTT G A G E R E R S G N	CTATTAAAGG GATAATTTCC T I K G L L K Y * R	AAAACTATGA TTTTGATACT K L * E N Y D K T M	540
TAAACTTTAT ATTTGAAATA	AACAGCGCCT TTGTCGCGGA	TCAGTGCTGC AGTCACGACG	CCATGAAGAG GGTACTTCTC	CAGTGGAAGT GTCACCTTCA	TAAAGGAGCA ATTTCTCCTG	600

* T L K L Y I N F I	* Q R L N S A T A P	Q C C F S A A S V L	P * R H E E P M K S	A V E V Q W K S G S	K G A L K E Q * R S	
GCAGATGAAA CGTCTACTTT A D E Q M K S R * K AACCGAAGTC TTGGCTTCAG N R S T E V K P K S	GTGCAGATTG CACGTCTAAC S A D C V Q I C R L CTTGACAAAC GAACTGTTTG P * Q T L D K L T N	CTCAGCTCGA GAGTCGAGCT S A R A Q L E L S S TAAAGACTGA ATTTCTGACT K D * L K T E * R L	AACTGCCTTA TTGACGGAAT N C L T A L K L P * AAGAGACCAA TTCTCTGGTT K R P R D Q K E T K	AAATCTGATC TTTAGACTAG K I * S K S D N L I AATGAGAAAC TTACTCTTTG K * E T N E K M R N	TTACAGACAA AATGTCTGTT L Y R Q L T D K L Q T TGTTCAAGA ACCAAGTTCT G S R L V Q E W F K	660
GAATAGAGAT CTTATCTCTA E * R N R D R I E I	CTACAGCTGC GATGTCGACG S T A A L Q L Y S C	AGTGTCTGCA TCACAGACGT V S A Q C L Q S V C	GCAAAAGCAG CGTTTTTCGTC A K A S Q K Q S K S S	CGGCTGCATG GCCGACGTAC A A A * R L H G C M	AGCTTCAGAG TCGAAGTCTC A S E E L Q S S F R	780
CCGCCTGAAG GGCGGACTTC P P E R A L * K A L * S	TTCTTCAACC AAGAAGTTGG V L Q P F F N S S T	AGGAGAGTGA TCCTCTCACT G E * Q E S D R R V	CATCAATGCT GTAGTTACGA H Q C I N A T S M L	GATGACCTCA CTACTGGAGT * * P Q D D L M T S	GTGAAGCACT CACTTCGTGA * S T S E A L V K H	840
CCTGCTTATA GGACGAATAT P A Y L L I S C L	AAGGCTCAAA TTCCGAGTTT K G S K K A Q * R L	AAGAACAAA TTCTTGTTTT R T K K E Q K K K N K	AAATGGAGAT TTTACCTCTA K W R N G D K M E	CTTTCATTTT GAAAGTAAAA S F I F L S F I F H	TAGAAAAAGT ATCTTTTCA R K S L E K V F * K K	900
GGACAGCAAA CCTGTGTTTT G Q Q D S K W T A K	ATCAATAAAG TAGTTATTTT N Q * R I N K S I K	ATCTAGACCG TAGATCTGGC S R P D L D R I * T	ATCCATGAAA TAGTACTTTT I H E S M K D P * K	GAGCTTCAAG CTCGAAGTTC R A S S E L Q S F K	CAACTCATGC GTTAGTACG N S C A T H A Q L M	960
AGAAACAGTA TCTTTGTCAT R N S E T V Q K Q Y	CAAGAACTTG GTTCTTGAAC T R T * Q E L K N L	AAAAGACAAG TTTTCTGTTT K D K E K T R K R Q	AAATATGCTA TTTATAACGAT K Y A N M L E I C *	ATTATGCAAC TAATACGTTG N Y A T I M Q L C N	ATAAAAATAAA TATTTTATTT * N K H K I N I K *	1020
TAAAGACTAT ATTTCTGATA * R L K D Y I K T I	CAGATGGAAG GTCTACCTTC S D G S Q M E R W K	TTGAAACAGT AACTTTGTCA * N S V E T V L K Q	GACTCAGAAA CTGAGTCTTT D S E T Q K * L R K	ATGGAAAATT TACCTTTTAA N G K F M E N W K I	TGCAACAAGA ACGTTGTTCT A T R L Q Q D C N K	1080
TTATGAACTC AAACTTGAG L * T Y E L I M N S	AAAGTGGAAC TTTACCTTG Q S G T K V E K W N	AATATGTTCA TTATACAAGT I C S Q Y V H N M F	TCTTCTCGAT AGAAGAGCTA S S R L L D I F S I	ATCAGGGCTG TAGTCCCAGC Y Q G C I R A S G L	CACGCATCCA GTGCGTAGGT T H P A R I Q H A S	1140
AAAGCTTGAA TTTTCGAATT K A * K L E K S L K	GCCCAGTTAA CGGGTCAATT S P V K A Q L P S *	AGGATATTGC TCCTATAACG G Y C K D I A R I L	CTATGGCACT GATACCGTGA L W H Y G T P M A L	AAGCAGTACA TTCGTCTATGT * A V Q K Q Y S S T	AATTTAAACC TTAAATTTGG I * T K F K P N L N	1200
AGAAATCATG TCTTTAGTAC R N H E I M Q K S C	CCAGATGACT GGTCTACTGA A R * L P D D Q M T	CAGTTGATGA GTCAACTACT S * * S V D E Q L M	ATTTGATGAA TAAACTACTT I * * F D E N L M K	ACCATCCACC TGGTAGGTGG N H P P T I H P S T	TAGAACGAGG ATCTTGCTCC R E T R L E R G * N E	1260
AGAAAATCTC TCTTTTAGAG R K S E N L E K I S	TTTGAAATCC AAACTTTAGG L * N P F E I L K S	ACATCAACAA TGTAGTTGTT H Q Q H I N Q T S T	AGTCACCTTT TCAGTGGAAA S H L V T F K S P F	TCTTCTGAAG AGAAGACTTC F F * S S S E L L K	TCCTTCGGGC AGGAAGCCCG P S G V L R A S F G	1320
ATCTGGTGAT	AAAGAACTTG	TCACTTTCTG	TACCTACGCT	TTCTATGACT	TTGAACTGCA	1380

TAGACCACTA I W * S G D H L V I	TTTCTTGAAC * R T C K E L K N L	AGTGAAAGAC H F L V T F C S L S	ATGGATGCGA Y L R T P Y A V P T L	AAGATACTGA F L * L F Y D S M T	AACCTTGACGT * T A F E L Q L N C	
GACTACTCCC CTGATGAGGG D Y S R L L P	ATAGTGCAGAG TATCACGCTC H S A R * C E	GCCTTTACCC CGGAAATGGG P L P G L Y P	GGAGTATAAC CCTCATATTG G V * E Y N R S I T	TTCACTTCTC AAGTGAAGAG L H F S F T S S L L	AGTATCTGGT TCATAGACCA V S G Q Y L V S I W	1440
CCACGTCAAT GGTGCAGTTA P R Q H V N	GACTTATTTT CTGAATAAAA * L I F D L F	TGCAGTACAT ACGTCATGTA A V H L Q Y I	TCAGAAGAAC AGTCTTCTTG S E E Q K N	ACTGTCACGC TGACAGTGGC H C H A T V T	TGGAGCTCCA ACCTCGAGGT G A P L E L H	1500
S T S M CCAAGCCCAC GGTTCGGGTG P S P Q A H T K P T	AGCACAGATT TCGTGTCTAA Q H R L S T D A Q I	ACGAAACAAT TGCTTTGTTA R N N Y E T I	TGCAGRCGT TGCAGCGTGT ACGTCGCACA C S V A A C L Q R V	CAGTTGAGAT GTCAACTCTA S V E I Q L R S * D	TCCATGAGAT AGGTACTCTA P * D F H E I S M E R	1560
TCTAGAAAAA AGATCTTTTT S R K F * K K	AGTGGTAGAA TCACCATCTT K W * N S G R V V E	TTTTTTGCAC AAAAAACGTG F L H I F C T	AACAAGCTTA TTGTTCTGAAT N K L T S L Q Q A *	GTTGGAACTA CAACCTTGAT S W N * V G T L E L	AAGGAGACAT TTCCTCTGTA R R H K R D I K E T	1620
CCCAAATTTT GGGTTTAAAA P K F S Q N I L	GGCACAGTAG CCGTGTCAATC W H S R G T V A Q *	AATACTGGTT TTATGACCAA I L V E Y W F N T G	CCGATTAAGA GGCTAATTCT P I K R L R S D * E	GTTCCCATGG CAAGGGTACC S S H G V P M F P W	ATCAAGCTAT TAGTTCGATA S S Y D Q A I I K L	1680
TCGACTTTAT AGCTGAAATA S T L F D F I	CGTGAGCGGG GCACTCGCCC S * A G R E R V S G	CAAAGGCATT GTTCCGTAA K G I A K A L Q R H	AGGATACATA TCCTATGTAT R I H G Y I * D T *	ACATCAAGTT TGTAGTTCAA N I K F T S S H Q V	TTAAGAAGCC AATTCTTCGG * E A F K K P L R S	1740
AGAGAAAATG TCTCTTTTAC R E N Q R K C	CAATTGTCTGA GTTAACAGCT A I V E Q L S R N C R	GTCAGCAAGC CAGTCGTTCCG S A S S Q Q A V S K	AGCCACAAC TCGGTGTGTA S H N A T T Q P Q L	GCTCAGATCA CGAGTCTAGT C S D Q A Q I L R S	GCCCAGCAGA CGGGTCGTCT P S R S P A E A Q Q	1800
GTCCACAGAC CAGGTGTCTG V H R S T D S P Q T	GGCAACTTGA CCGTTGAACT R Q L E G N L A T *	ATGAACTTCA TACTTGAAGT * T S N E L H M N F	TGTTACAGTA ACAATGTGAT C Y S V T V M L Q *	AGATGCTGCA TCTACGACGT K M L H R C C D A A	CCGGCCTCCA GGCCGGAGGT R P P T G L Q P A S	1860
GTCCCGAGCG CAGGGCTCGC V P S S R A S P E R	AGCTACCTGC TCGATGGACG E L P A S Y L A T C	AGCCACACGC TCGGTGTGCG A T R Q P H A S H T	ATATGTGGTA TATACACCAT I C G Y V V H M W Y	TACAAGTTTT ATGTTCAAAA I Q V F Y K F T S F	TTGATTTTCC AACTAAAAGG * F S F D F P L I F	1920
AGACCATGAT TCTGTACTA R P * D H D Q T M I	ACCGCCATCG TGGCGGTAGC Y R H R T A I P P S	TTCCCAGTAG AAGGGTCATC S Q * V P S S F P V	CAATGACCCA GTTACTGGGT Q * P N D P A M T H	CAGTTTGATG GTCAAACCTAC T V * * Q F D S L M	ACCACATGTG TGGTGTACAC P H V D H M C T T C	1980
TTTCCCAGTG AAAGGGTAC F P S F P V V S Q C	CCGATGAATA GGCTACTTAT A D E Y P M N R * I	TGGATTTGGA ACCTAAACCT G F G M D L D W I W	TCGCTACCTT AGCGATGGAA S L P R Y L I A T L	AAGTCAGAGT TTCAGTCTCA * V R V K S E S Q S	CTGGGGGAGG GACCCCTCC W G R S G G G L G E	2040
CCGCTCGCGA GGCGAGCGCT P L A R S R A A R D	TCTAGAAGGA AGATCTTCTC I * K D S R R L E G	CGCGTGGGGT CGGCACCCCA A W G T R G V R V G	TTTTGATGAT AAAACCTACTA F * * F D D F L M I	AGTGATACCC TCACTATGGG * * Y P S D T V I P	AGGAGAATAT TCCTCTTATA G E Y Q E N I R R I	2100

TTACATGGGA AATGTACCCT L H G Y M G F T W E	AAAGTCAATG TTTCAGTTAC K S Q C K V N K S M	TGCCTCTGAT ACGGAGACTA A S D V P L I C L *	TTCCCTGGCA AAGGGACCGT F P G S L A F P W H	CATGACAAGT GTACTGTTCA T * Q V H D K M T S	GTATCTCAGG CATAGAGTCC Y L R C I S G V S Q	2160
AATATTTGAG TTATAAACCTC N I * I F E E Y L S	TTGATGGATA AACTACCTAT V D G * L M D * W I	AGGAAAAGCA TCCTTTTCGT G K A K E K H R K S	TGCTGCAGGA ACGACGTCCT C C R A A G M L Q E	ACTATCCAAG TGATAGGTTT N Y P S T I Q L S K	TTATATTGAA AATATAACTT Y I E V I L K L Y *	2220
ATGGAAATTC TACCTTTAAG M E I W K F N G N S	ACCTACCTTC TGGATGGAAG H L P S T Y L P T F	CACCAAGTGG GTGGTTCACC T K W P P S G H Q V	ATCAATAACT TAGTTATTGA I N N S I T D Q * L	ACTGAAGACC TGACTTCTGG Y * R P T E D L K T	TTGGAAAGTT AACCTTTCAA W K V L G K F L E S	2280
CGTTTTGCAGA GCAAACGTCT R L Q V C R S F A E ATCAGTTGTA TAGTCAACAT I S C S V V H Q L *	GAAGAGCCAG CTTCTCGGTC R R A R E E P K S Q GCACAAAAC CGTGGTTTTG S T K T A P K H Q N	AGGCTGTTCA TCCGACAAGT G C S E A V Q R L F CTAAACCAAG GATTGGTTT * T K P K P R L N Q	GAGACTACCT CTCTGATGGA E R T R D Y L ACAACGTTTA TGTTGCAAAT T T F Q R L D N V *	CCAAAGTCCT GGTTTCAGGA S K V L P K S Q S P ACATTTGTGG TGTAACACC N I C G T F V H L W	CAGATGTTAC GTCTACAATG R C Y S D V T Q M L ACAAAAAGGT TGTTTTTCCA D K K G T K R	2340
CTCTTTTGCA GAGAAAACGT L F C S F A S L L Q	GATACCATAT CTATGGTATA R Y H I D T I I P Y	CACACCCGAG GTGTGGGCTC T P E S H P S H T R	TCCCGAGACT AGGGCTCTGA S R D P E T V P R L	TCTCCTCCCC AGAGGAGGGG F S S P S P P L L P	CTAAAGATAT GATTTTCTATA * R Y P K D I L K I	2460
AAAAGACAGT TTTTCTGTCA K R D K Q S * K T V	TCTCCAGAAG AGAGGTCTTC F S R S S P E L Q K	TGGGACCAA ACCCTGGTTT G T K V G P K W D Q	ACCAGAAAAT TGGTCTTTTA T R K P E N N Q K M	GGTCTGTCAG CCAGACAGTC W S V S G L S V C Q	CTGTTGGGAT GACAACCCTA C W D A V G I L L G	2520
CCTTCCAAGN GGAAGTTICN P S K L P X S F Q X	AAAGCGGTGT TTTTGCCACA X S G V K A V K R C	GGCTAAGGTA CCGATTCCAT A K V W L R * G * G	GAAGAAAATG CTTCTTTTAC E E N K K M R R K C	TGGGGGAAAT ACCCCTTTTA V G E M W G K G G N	GCAACAAGGG CGTTGTTCCT Q Q G C N K G A T R	2580
AAAGAAGACG TTTCTTCTGC K E D K R T E K R R	ACATCTCTTT TGTAGAGAAA D I S F T S L H L F	CTTATCTGAG GAATAGACTC L S E S Y L R L I *	GGCCAGCTTG CCGGTCGAAC G Q L A S L G P A C	CCTCAGGAAG GGAGTCCTTC A S G S P Q E L R K	TGTGGCTTCC ACACCGAAGG V A S W L P C G F	2640
TCTGAAGATG AGACTTCTAC S E D L K M L * R *	AAACAGAAAT TTTGTCTTTA E T E I K Q K N R N	AACTGAAGAA TTGACTTCTT T E E * L K N N * R	TTGGAACCAG AACCTTGGTC L E P W N Q I G T R	AAGATGAAGA TTCTACTTCT E D E D K M K R * R	CAGATCAGCT GTCTAGTCGA R S A T D Q L Q I S	2700
TCAGACAGTG AGTCTGTCAC S D S Q T V F R Q *	ATGACTGTAT TACTGACATA D D C I M T V * L Y	CATTCCAAGT GTAAGGTTCA I P S S F Q V H S K	TCTGTCTCCA AGACAGAGGT S V S L S P F C L H	CAAATACCAA GTTTATGGTT T N T K Q I P K Y Q	ACAGCCATCA TGTCGGTAGT Q P S N S H Q T A I	2760
GAAGAAATTC CTTCTTTAAG E E I K K F R R N S	GGATTGAGAT CCTAACTCTA R I E I G L R D * D	CATAGCTCTG GTATCGAGAC I A L S * L * H S S	AACCTTAATG TTGGAATTAC N L N L L M E P * *	ATTCTCAAAT TAAGAGTTTA D S Q I I L K F S N	AACCAGGGAG TTGGTCCCTC T R E * P G R N Q G	2820
GATACTATTC CTATGATAAG D T I I L F G Y Y S	AGCGACTCTT TCGCTGAGAA Q R L F S D S A T L	CATTGAGTGC GTAACCTCAG I E C L S A H * V	CGGTTCTACA GCCAAGATGT R F Y G S T P V L Q	GTCTTCCCGC CAGAAGGGCG S L P A V F P S S R	TGAGGAGACT ACTCCTCTGA E E T L R R L * G D	2880

CCTATGTCCC GGATACAGGG P M S L C P S Y V P	TGCCCAAACC ACGGGTTTTGG L P K P C P N A Q T	CCAGAGTGGGA GGTCTCACCT Q S G P R V D P E W	CAGTGGGTCT GTCACCCAGA Q W V S G S T V G L	ACTATAACTA TGATATTGAT Y Y N Y T I T L * L	TTCCAATGTG AAGGTTACAC S N V I P M * F Q C	2940
ATCTACCTGG TAGATGGACC I Y L S T W D L P G	ATAAAGAAAA TATTTCTTTT D K E N I K E * R K	CAACCCAGCG GTTGGGTGCG T N P A T T Q R Q P S	GTAGAGACAT CATCTCTGTA V E T * R H G R D I	CTTAAAAGCC GAATTTTCGG S * K P L K S L K A	ATACTGCAAAA TATGACGTTT Y C K H T A K I L Q	3000
GGCGAGAACT CCGCTCTTGA G E N A R T R R E L	GCCTCACAGA CGGAGTGTCT C L T E A S Q P H R	AGTGTGCGCT TCACACGCGA V C A K C A L S V R	TCACCGTGGT AGTGGCACCA S P W H R G F T V V	CAGTGATCCT GTCACTAGGA S V I L Q * S S D P	CCNGAGGACG GGNCTCCTGC X R T S X G R P E D	3060
AGCAGGACCT TCGTCTGGA S R T A G P E Q D L	AGAATGTGAG TCTTACACTC * N V R R M * E C E	GACATTGGGG CTGTAACCCC T L G T L W D I G	TTGCCCATGT AACGGGTACA L P M C P C V A H V	TGACCTTGCT ACTGGAACGA L T L L * P C D L A	GACCTGTTTC CTGGACAAAG T C F * P V S D L F	3120
AGAAAGGAAG TCTTTCCTTC R K E E R K Q E R G R GCACCATCGG CGTGTAGCC A P S H H R G T I G	AGACATCATA TCTGTAGTAT E T S * R H H D I H I CAAACCTGAAG GTTTGACTTC A N * R Q T E K L K	GAGCAAGATA CTCGTTCCTAT S K I R A R Y E Q D GTGACTGTGG CACTGACACC * L W G D C G V T V	TCGATGTTCT AGCTACAAGA S M F I R C S I D V L AAGCACTTCA TTCGTGAAGT K H F S T S E A L H	CGATGCCCGA GCTACGGGCT S M P E R C P D A R TGCCNTACGG ACGGNATGCC M P Y G C X T A X R	ACAGACGGTG TGTCTGCCAC Q T V N R R W T D G TCTGTCTACG AGACAGATGC L S T V C L R S V Y	3180
AGCAAAATAG TCGTTTATC S K I A K * E Q N R	AAAGGACTTG TTTCCTGAAC E R T W K G L K D L	GAGGCCTGAA CTCCGGACTT R P E G G L K E A *	AGAACCTGTT TCTTGACAA R T C E P V K N L F	CCAGAGGCAG GGTCTCCGTC S R G S P E A Q R Q	CCGCTTTTAA GGCGAAAATT R F * A A F K P L L	3300
GAAAATGCTC CTTTTACGAG E N A K M L R K C S	GCATGAAAGC CGTACTTTCC R M K A A * K H E S	TCAAGGATGA AGTTCCTACT Q G * L K D E S R M	GATTTTGGAGT CTAAAACCTCA D F E I L S R F * V	AATCACTCTG TTAGTGAGAC * S L * N H S I T L	ATGTGTGTAA TACACATTT C V * D V C N M C V	3360
TCTATAATTC AGATATTAAG S I I L * F I Y N S	ATCGGTTGCT TAGCCAACGA H R L L I G C S V A	GGGAGGGAGC CCCTCCCTCG G G S W E G A G R E	GCCTGGGTTT CGGACCCAAA A W V P G F R L G L	AGACTTGAAT TCTGAACTTA * T * M R L E D L N	GTTCAAGTTT CAAGTTCAAAA F K F C S S F V Q V	3420
TGTATAGGTT ACATATCCAA C I G V * V L Y R F	TTGTGTTTTGT AACACAAACA F V F V L C L C V C	TTATTTTTCT AATAAAAAGA Y F S F I F L L F F	ATCCAATCCT TAGGTTAGGA I Q S S N P Y P I L	CCCCATGACT GGGTTACTGA S P * L P H D P M T	GCCACCCCAT CGGTGGGGTA P P H C H P I A T P	3480
AGGACTTCAG TCCTGAAGTC R T S G L Q * D F S	TGCTCCTAAG ACGAGGATTC V L L S C S * A P K	TGGGCTACCT ACCCGATGGA G L P V G Y L W A T	TATCAATAAT ATAGTTATTA Y Q * I N N L S I I	TTATAGCAAC AATATCGTTG F I A T L * Q Y S N	ATGATAGCAT TACTATCGTA * * H H D S M M I A	3540
GAAGCATCTA CTTCGTAGAT E A S K H L * S I Y	TTTGCAATTTG AAACGTAAAC I C I C F A F L H L	CCACATTTTC GGTGTAAGAAG A H I F A T F S P H F	TTATGAAGAA AATACTTCTT L * R Y E E L M K N	CTAGGAGTAG GATCCTCATC T R S S L G V * E *	TTCCCATTTT AAGGGTAAAA S H F V P I F F P F	3600
TATTTTTTCAT ATAAAAAGTA Y F S I F H	AAGTAAAAGC TTCATTTTCG * V K A K * K	CTAAAATCTT GATTTTAGAA * N L P K I L	AGGAAACCAA TCCTTTGGTT R K P G N Q	TGAAAAAGAA ACTTTTTCTT M K K K * K R	ATGCTTTTTTA TACGAAAAAT C F L N A F Y	3660

L F F I S K S L K S * E T N E K E M L F					
TGTTATCCCT AATTGTCCCA CTAATGGAA CGCCTCTGAT TAGCCTCATT AAGACTTTTA 3720					
ACAATAGGGA TTAACAGGGT GATTACCTT GCGGAGACTA ATCGGAGTAA TTCTGAAAAT					
C Y P * L S H * M E R L * L A S L R L L					
V I P N C P T K W N A S D * P H * D F Y					
M L S L I V P L N G T P L I S L I K T F					
TACTGTGAAG ATTTTATTAG AAGCAATATA TGAAAATTAC TTGGATTAAT GTGTTAATCT 3780					
ATGACACTTC TAAAATAATC TTCGTTATAT ACTTTTAATG AACCTAATTA CACAATTAGA					
Y C E D F I R S N I * K L L G L M C * S					
I T V K I L L * E A I Y E N Y L D * C V N L					
I L * R F Y * K Q Y M K I T W I N V L I					
CCCTCTTTAA AATGCTAATA TCTACTTTAT GCACATTAAA GCTCAGTATG CATTTCCTTT 3840					
GGGAGAAATT TTACGATTAT AGATGAAATA CGTGTAATTT CGAGTCATAC GTAAAAGAAA					
P S L K C * Y L L Y A H * S S V C I F F					
P L * N A N I Y F M H I K A Q Y A F S L					
S L F K M L I S T L C T L K L S M H F L					
GATGCATACA GTTTCTATCA ATTAAATATA AAGAAGGAGA CTTGGCACCA ACTT					
CTACGTATGT CAAAGATAGT TAATTTATAT TTCTTCCTCT GAACCGTGGT TGAA					
D A Y S F Y Q L N I K K E T W H Q L					
* M H T V S I N * I * R R R L G T N					
* C I Q F L S I K Y K E G D L A P T					

* Stopkodon; rot: längster ORF („Open Reading Frame“)

7.3 Identitätsnummern der P1-, BAC- und PAC-Klone

MB1	FBAC-4432/47G4	(Genome Systems Inc.)
MB2	FBAC-4432/15514	(Genome Systems Inc.)
MB3	FBAC-4432/24I23	(Genome Systems Inc.)
MB4	FBAC-4432/14M2	(Genome Systems Inc.)
MB6	FBAC-4432/37K2	(Genome Systems Inc.)
MB7	FBAC-4432/15M17	(Genome Systems Inc.)
MB9	FBAC-4432/63L6	(Genome Systems Inc.)
MB10	FBAC-4432/179D9	(Genome Systems Inc.)
PAC1	RPCIP711 F0473Q3	(RZPD clone ID)
PAC8	RPCIP711 E19309Q3	(RZPD clone ID)
PAC33	RPCIP711 L12425Q3	(RZPD clone ID)
PAC41	RPCIP711 L02655Q2	(RZPD clone ID)
PAC43	RPCIP711 L13536Q2	(RZPD clone ID)
PAC44	RPCIP711 N07220Q2	(RZPD clone ID)
PAC46	RPCIP711 J08277Q2	(RZPD clone ID)
PAC47	RPCIP711 C20596Q2	(RZPD clone ID)
PAC49	RPCIP711 K19171Q2	(RZPD clone ID)
PAC50	RPCIP711 A10357Q2	(RZPD clone ID)
PAC51	RPCIP711 D03523Q2	(RZPD clone ID)
PAC53	RPCIP711 O06181Q2	(RZPD clone ID)
PAC55	RPCIP711 E05183Q2	(RZPD clone ID)
PAC56	RPCIP711 P11418Q2	(RZPD clone ID)
PAC60	RPCIP711 D23474Q2	(RZPD clone ID)
PAC61	RPCIP711 G20437Q2	(RZPD clone ID)
PAC63	RPCIP711 J19524Q2	(RZPD clone ID)
PAC71	RPCIP711 C24491Q2	(RZPD clone ID)
PAC73	RPCIP711 G23488Q2	(RZPD clone ID)
PAC76	RPCIP711 C05191Q2	(RZPD clone ID)
PAC77	RPCIP711 P2487Q2	(RZPD clone ID)
PAC78	RPCIP711 K05540Q2	(RZPD clone ID)
PAC79	RPCIP711 O20237Q2	(RZPD clone ID)
PAC81	RPCIP711 H1436Q2	(RZPD clone ID)
PAC82	RPCIP711 K1857Q2	(RZPD clone ID)
PAC84	RPCIP711 G19282Q2	(RZPD clone ID)
PAC85	RPCIP711 B06254Q2	(RZPD clone ID)
PAC86	RPCIP711 I1164Q2	(RZPD clone ID)
PAC87	RPCIP711 D0127Q2	(RZPD clone ID)
PAC89	RPCIP711 M16446Q2	(RZPD clone ID)
PAC90	RPCIP711 P03479Q2	(RZPD clone ID)
PAC93	RPCIP711 F11670Q2	(RZPD clone ID)
PAC94	RPCIP711 H12642Q2	(RZPD clone ID)
PAC95	RPCIP711 G12642Q2	(RZPD clone ID)
PAC96	RPCIP711 H05580Q2	(RZPD clone ID)
PAC97	RPCIP711 H0183Q2	(RZPD clone ID)
PAC98	RPCIP711 D2216Q2	(RZPD clone ID)
PAC100	RPCIP711 A0441Q2	(RZPD clone ID)
PAC101	RPCIP711 J07355Q2	(RZPD clone ID)
PAC104	RPCIP711 L0983Q2	(RZPD clone ID)
RLDB-5	ICRFP703 E15300QD2	(RZPD clone ID)
RLDB-20	ICRFP703 C04316QD2	(RZPD clone ID)
RLDB-21	ICRFP703 K23214	(RZPD clone ID)

7.4 Abkürzungen

%	Prozent
μ	Mikro- (10^{-6})
°C	Grad Celsius
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop der Atommasse 32
A	Adenin
AER	„ <i>Apical Ectodermal Ridge</i> “
BAC	" <i>Bacterial Artificial Chromosome</i> ", künstliches Bakterienchromosom
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl_2	Kalziumchlorid
cDNA	" <i>copy</i> " DNA
cM	Centi-Morgan
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratcentimeter
cpm	gemessener radioaktiver Zerfall pro Minute
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	„ <i>Expressed Sequence Tags</i> “
et al.	et alteri (und andere)
FCS	fötales Kälberserum
<i>Ft</i>	Fused toes

g	Gramm
G	Guanin
GTE	Glucoese-Tris-EDTA
hCG	" <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> "
HCl	Salzsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo- (10^3)
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare (10^3)
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
konz.	konzentrierte(r)
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Milli- (10^{-3})
M	Molar (mol/l)
max.	maximal
Mb	Megabasenpaare (10^6)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	Mindestens
mol	Mol ($6,023 \times 10^{23}$ Moleküle)
MOPS	" <i>3-(N-Morpholino)propansulfonic acid</i> "
mRNA	„ <i>Messenger</i> “ RNA
n	Nano- (10^{-9})
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte, Extinktion
p	Piko- (10^{-12})
p. c.	post coitum
P1	Bezeichnung eines Bakteriophagen
PAC	" <i>P1- derived Artificial Chromosome</i> "
PBS	„ <i>Phosphat Buffert Saline</i> “
PCR	„ <i>Polymerase Chain Reaktion</i> “, Polymerase Ketten Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PIPES	Piperazin-1,4,bis-(2-ethansulfonsäure)
PMS	" <i>Pregnant Mare's Serum</i> "
PMSF	" <i>Phenylmethylsulfonyl Fluorid</i> "

RACE	„ <i>Rapid Amplifikation of cDNA Ends</i> “
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RZPD	Resourcen Zentrum/ Primär Datenbank
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SSC	„ <i>Standard Saline Citrat</i> “
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galctopyranosid
YAC	„ <i>Yeast Artificial Chromosome</i> “, künstliches Hefechromosom
z. B.	zum Beispiel
ZPA	„ <i>Zone of Polarizing Activity</i> “

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther möchte ich mich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die stets hilfsbereite wissenschaftliche Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Achim Gossler möchte ich mich für die Übernahme des Korreferates bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Lüscher und Prof. Dr. Achim Gossler für die Unterstützung meiner Tätigkeiten am Institut für Molekularbiologie im letzten Jahr dieser Arbeit.

Bei Natascha Schröder und Joachim Heymer bedanke ich mich für die Hilfestellung bei der Herstellung der transgenen Mäuse.

Anja Krippner, Sabine Rottmann und Ralf Cordes danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Den Mitgliedern des Instituts für Molekularbiologie danke ich für das nette Arbeitsklima in der Abteilung.

Meinen Großeltern möchte ich an dieser Stelle ganz herzlichst für die kontinuierliche und jahrelange Unterstützung danken.

Außerdem möchte ich Jürgen danken für seine Hilfsbereitschaft während der nervenaufreibenden Zeit während der Anfertigung der Doktorarbeit.

Lebenslauf

Name: Katrin Ausmeier

Anschrift: Dörnbergstr.10
30161 Hannover

geboren: 15.08.1968 in Göttingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

1975-1979 Pestalozzischule (Hameln) und Grundschule am Lindener Markt (Hannover)

1979-1981 Orientierungsstufe Badenstedt (Hannover)

1981-1985 Humboldtschule (Hannover)

1985-1988 Gymnasium Langenhagen (Langenhagen)

19.05.1988: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

1989-1991 Ausbildung zur staatlich geprüften chemisch-technischen Assistentin an der Berufsbildenden Schule 22 (Hannover)

1991 Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Hannover

1993 Diplom-Biologie Vorprüfung Teil I und II

1996 Diplom-Biologie Hauptprüfung

Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover

21.04.1997: Abschluß des Studiums als Diplom-Biologin

1997- 2000 Promotion am gleichen Institut unter der Leitung von Prof. Ulrich Rüter

03.04.2000 Abgabe der Promotionsarbeit

24.11.2000 Tag der mündlichen Prüfung