

Mutationsanalyse von Kandidatengenen für die neurologische Mutation *wobbler* der Maus

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (rer. nat.)

Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

vorgelegt von Sonja Fuchs
aus Oelde

Dezember 2001

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Die neurologische Mutation <i>wobbler</i> (<i>wr</i>) der Maus	2
2.1.1 Genetik von Motoneuronenerkrankungen.....	3
2.2 Vergleichende Genomik	4
2.2.1 Vergleichende Genomik bei Maus und Mensch.....	4
2.2.2 Das humane Genomprojekt	5
2.2.3 Genomprojekt bei der Maus.....	6
2.2.4 Funktionelle Genomik bei der Maus	7
2.3 Positionsklonierung des <i>wobbler</i> Gens	8
2.3.1 Chromosomale Lokalisation des <i>wobbler</i> Gens.....	9
2.3.2 Erstellung einer physikalischen Karte der <i>wobbler</i> -Region	9
2.3.3 Einengung des Kandidatengenbereichs	10
2.3.4 Ausschluß von Kandidatengenen	10
2.3.5 Stand der Positionsklonierung am Beginn dieser Arbeit	11
2.4 Ziele dieser Arbeit	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Material	13
3.1.1 Bakterienstämme	13
3.1.2 Maus-Stämme	13
3.1.3 ES-Zelllinie	13
3.1.4 DNA-Proben	13
3.1.5 YAC-Banken	14
3.1.5.1 Maus-YAC-Banken	14
3.1.5.2 Humane YAC-Banken.....	14
3.1.6 Maus BAC-Banken	15
3.1.7 Bestrahlungshybridzellen.....	15
3.1.8 Oligonukleotide	16
3.1.9 Enzyme.....	20
3.1.10 Verwendete Bausätze (Kits)	20
3.1.11 Fragmentlängenstandards	21
3.1.12 Verwendete Datenbanken und Programme.....	21

3.2 DNA-Methoden.....	24
3.2.1 DNA-Präparation	24
3.2.1.1 Plasmidisolierung aus Bakterien mittels <i>Easy Prep</i>	24
3.2.1.2 Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse	24
3.2.1.3 „Midi“ und „Maxi“ Präparationen von Plasmid-DNA mit dem Nucleobond Kit	25
3.2.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen	25
3.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	26
3.2.2.1 DNA-Minigele.....	26
3.2.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	26
3.2.3 Southern Blotting (Transfer von DNA auf Nylonmembranen)	26
3.2.4 Radioaktive Hybridisierung	27
3.2.5 Herstellung von radioaktiv markierten DNA Sonden.....	28
3.2.5.1 „Random primed“ Methode	28
3.2.5.2 5'-Markierung von Oligonukleotiden	28
3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR).....	29
3.2.6.1 Standard-PCR-Reaktionen	29
3.2.6.2 PCR-Reaktionen mittels „Proof reading DNA Polymerasen“	29
3.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten.....	30
3.2.7.1 Klassische Klonierung.....	30
3.2.7.2 Klonierung von PCR Produkten mit TOPO Cloning Kits	32
3.2.8 Identifikation von positiven Klonen.....	33
3.2.8.1 Kolonie-PCR	33
3.2.8.2 Eckhardt-Lyse	33
3.3 RNA-Methoden.....	34
3.3.1 RNA-Isolierung aus Geweben (Chomczynski and Sacchi, 1987)	34
3.3.2 Präparation von mRNA mittels magnetischer Kügelchen (Dynabeads)....	34
3.3.3 RNA-Minigele.....	35
3.3.4 Große, denaturierende RNA-Gele	35
3.3.5 Northern Blotting (RNA-Transfer auf Nylonmembranen)	36
3.3.6 Reverse Transkription mit dem Omniscript RT-Kit.....	36
3.4 Sequenzierung von PCR-Produkten und BAC-Enden.....	36
3.5 Berechnung genetischer Abstände	37
4 Ergebnisse	38

4.1 Kartierung von Kandidatengenenen	38
4.1.1 Anonyme cDNA <i>Homoloc-13</i>	38
4.1.2 Anonyme cDNA <i>Kiaa0903</i>	39
4.1.3 Die distale Lücke: Anonyme cDNA <i>Murr1</i> und das Gen für die Chaperonin Delta-Untereinheit <i>Cct4</i>	40
4.1.4 Kartierung des Gens Exportin1 (<i>Xpo1</i>)	42
4.1.5 Kartierung des Gens Peroxisomales Membranprotein (<i>Pex13</i>).....	43
4.1.6 Kartierung der cDNA <i>Hspc159</i>	44
4.1.7 Kartierung des Gens <i>Endozepine-like Peptide (Elp)</i>	44
4.1.8 <i>Px19</i>	45
4.1.9 Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse	46
4.2 Detektion von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen zwischen den Maus-Stämmen C57BL/6J und Cast/Ei.....	47
4.2.1 Detektion eines RFLP in einem Intron von <i>Kiaa0903</i>	47
4.2.2 Detektion eines RFLP im ersten Intron von <i>Peli1</i>	48
4.2.3 Detektion eines RFLP in einem Intron der cDNA <i>Murr1</i>	48
4.2.4 Detektion von Rekombinationen mit Hilfe des RFLP im Intron von <i>Murr1</i>	48
4.3 Charakterisierung der Kandidatengene.....	50
4.3.1 Das Gen für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase <i>Mor2</i>	50
4.3.1.1 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens <i>Mor2</i>	50
4.3.2. Das Gen für das Homöoboxprotein <i>Otx1</i>	52
4.3.2.1 cDNA und Exon-Intron Struktur	52
4.3.2.2 Expressionsanalyse des <i>Otx1</i> -Gens.....	53
4.3.2.3 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens <i>Otx1</i>	53
4.3.3. Anonyme cDNA <i>Homoloc-13</i>	56
4.3.3.1 Etablierung der cDNA- und Proteinsequenz	56
4.3.3.2 Gen-Struktur bei Maus und Mensch	56
4.3.3.2 Expressionsanalyse der cDNA <i>Homoloc-13</i>	57
4.3.3.3 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region der anonymen cDNA <i>Homoloc-13</i>	58
4.3.4 Anonyme cDNA <i>Kiaa0903</i>	61
4.3.4.1 Etablierung der cDNA- und Proteinsequenz bei der Maus.....	61

4.3.4.2 Sequenz-Vergleich zwischen Maus und Mensch.....	62
4.3.4.3 Alternatives Spleißen der cDNA <i>Kiaa0903</i>	63
4.3.4.4 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region der anonymen cDNA <i>Kiaa0903</i>	66
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Analyse der Kandidatengene	67
4.5 Konstruktion eines <i>targeting</i> Vektors für das erste Exon des <i>pel1</i> -Gens.....	68
4.5.1 Subklonierung der β -actin-Neomycinresistenzkassette	68
4.5.2 Klonierung der genomischen Fragmente, die das erste Exon des <i>pel1</i> - Gens flankieren.....	69
4.5.3 Klonierung des 5'-Fragments in den pBSNeo.....	70
4.5.4 Umklonierung des 3'-Fragments in den pBS	71
4.5.5 Klonierung des Neo5'-Fragments in den pBS3'Fragment.....	71
4.5.6 Homologe Rekombination in ES-Zellen	72
4.5.7 Detektion der homologen Rekombination in ES-Zellen	72
4.5.8 Herstellung von Aggregationschimären	74
5 Diskussion	76
5.1 Konservierte Regionen auf dem humanen Chromosom 2p14-15 und dem proximalen Maus Chromosom 11.....	76
5.1.1 Neue Kartierungen bekräftigen die Inversion zwischen Maus und Mensch	76
5.1.2 Integration von Genen	77
5.1.3 Die <i>wr</i> -kritische Region.....	78
5.1.3.1 Einengung der <i>wr</i> -kritischen Region	78
5.1.3.2 Kandidatengene in der <i>wr</i> -kritischen Region	78
5.1.3.3 <i>wr</i> -kritische Region = Inversionsbereich zwischen Maus und Mensch	79
5.2 Ausschluß von Kandidatengenen über Kartierung.....	79
5.3 Betrachtungen zu den Kandidatengenen	79
5.2.1 Die cytoplasmatische Malatdehydrogenase <i>Mor2</i>	79
5.2.2 Das Homöobox-Gen <i>Otx1</i>	80
5.2.3 Die anonyme cDNA <i>Homoloc-13</i>	80
5.2.4 Die anonyme cDNA <i>Kiaa0903</i>	81
5.2.5 <i>Targeting</i> des <i>Pel1</i> -Gens	82
5.5 <i>wobbler</i> – die (un-)mögliche Positonsklonierung?.....	84
5.5.1 Ist ein regulatorisches Element betroffen?.....	84

5.5.2 Liegt eine Inversion der <i>wr</i> -Region vor?	84
5.6 Ausblick.....	85
6 Literaturverzeichnis.....	88
7 Anhang	100
7.1 In dieser Arbeit verwendete BACs.....	100
7.1.1 In dieser Arbeit ermittelte nicht-repetitive BAC-Endsequenzen	101
7.2 Vergleichende Sequenzierungen der Kandidatengene	106
7.2.1. <i>Mor2</i>	106
7.2.1.1 Gesamtsequenz mit Primer-Positionen.....	106
7.2.1.2 Sequenzdaten von WT und WR	106
7.2.2 <i>Otx1</i>	108
7.2.3 <i>Homoloc-13</i>	111
7.2.3.1 Sequenzierungen des cDNA-Klons AI891998	111
7.2.3.2 Sequenzierungen des cDNA-Klons AA823259.....	111
7.2.3.3 vergleichende Sequenzierungen von WT und WR	112
7.2.4 <i>Kiaa0903</i>	114
7.2.4.2 vergleichende Sequenzierungen bei WT und WR	116
7.2.4.3 Alignments der cDNA-Fragmente von WT und WR.....	120
7.2.4.4 Sequenzierungen der alternativ gespleißten Exons.....	128
7.3 Sequenzierungen während der Konstruktion des <i>pli1 targeting</i> Vektors	131
7.3.1 Sequenz der Neomycin-Resistenzkassette (β -actin-NEO)	131
7.3.2 5' Fragment: <i>pli1</i> 5'a – <i>pli1</i> 5'b.....	131
7.3.3 3' Fragment: <i>Pli1</i> intron d – <i>pli1</i> intron e	133
7.3.4 Ansequenzierung der pBSNeo Klone mit M13rev.....	134
7.3.5 Ansequenzierung der pBSNeo5'Fragment Klone mit M13 uni:.....	134
7.3.6 Ansequenzierung der k.o.-Klone.....	135
7.4 Abkürzungen	136
7.5 Bezugsquellen für Chemikalien	137
7.6 Bezugsquellen für Materialien und Geräte	137

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die autosomal rezessive Mutation *wobbler* (Gensymbol *wr*, Phänotyp WR) der Maus führt zur Degeneration von Motoneuronen in Hirnstamm und Rückenmark und löst so eine Muskelatrophie aus. WR-Männchen zeigen außerdem einen Spermio-genese-defekt.

Die *wr*-Mutation wurde auf dem proximalen Chromosom 11 in einem Bereich konservierter Syntänie zum humanen Chromosom 2p13-15 lokalisiert. In der Positionsklonierung des *wr*-Gens wurden physikalische Karten der Regionen bei Maus und Mensch erstellt. Dort konnten die Gene für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase *Mor2* und das Homöobox-Protein *Otx1* kartiert werden. Durch die Übertragung von Genen bzw. Genbruchstücken vom humanen Chromosom 2p13-15 auf die Maus-Karte wurden weitere Kandidatengene identifiziert: die Gene für ein Tumorantigen *Hcc8*, die Uridin-Diphosphoglucose-Pyrophosphorylase *Ugp2*, und das *Drosophila* Pellino-Homolog *Peli1* und außerdem die anonymen cDNAs *Kiaa0903* und *hEST13*. *Hcc8*, *Ugp2* und *Peli1* wurden als Kandidaten für die *wr*-Mutation ausgeschlossen.

In dieser Arbeit wurde die physikalische Karte der Region verbessert. Es konnten neue Kandidatengene kartiert und gleichzeitig für die *wr*-Mutation ausgeschlossen werden: die anonymen cDNAs *Hspc159* und *Murr1*, und die Gene für das *Endozepine-like peptide* *Elp*, das peroxisomale Protein *Pex13* und das Exportin1 *Xpo1*. Durch die Detektion von Rekombinationen in einem Intron von *Murr1* wurde der *wr*-kritische Bereich um 2,15 cM verkleinert.

Für das *Otx1*-Gen konnte die genomische Sequenz und für die cDNAs *Homoloc-13* und *Kiaa0903* die cDNA-Sequenz erstellt werden. Die vergleichende Sequenzierung der kodierenden Regionen von *Mor2*, *Otx1*, *Homoloc-13* und *Kiaa0903* ergab keinen Unterschied zwischen WT und WR; auch in der Expression dieser Gene bzw. cDNAs konnte keine Veränderung gefunden werden, so daß sie als Kandidaten für *wobbler* ausscheiden.

Nach der in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalyse sind keine weiteren Kandidatengene für die *wr*-Mutation mehr vorhanden, so daß nun Mutationen in nicht-kodierenden Bereichen, die regulatorische Funktion haben könnten, gesucht werden müssen.

2 EINLEITUNG

2.1 Die neurologische Mutation *wobbler* (*wr*) der Maus

Die *wr*-Mutation der Maus ist spontan im C57BL/FA Inzuchtstamm (Falconer, 1956) aufgetreten und folgt einem autosomal rezessiven Erbgang.

WR-Mäuse zeigen eine ausgeprägte Atrophie der vorderen Extremitäten, weisen einen wackeligen Gang („*wobbly gait*“) auf und außerdem ist ein Tremor des Kopfes zu beobachten. Der stark progressive Krankheitsverlauf beginnt in der 3. bis 4. postnatalen Woche und die meisten Tiere sterben innerhalb des ersten Jahres. Die betroffenen Tiere sind kleiner und leichter als gesunde Wurfgeschwister. Die *wr*-Mutation ist pleiotrop, sie bewirkt zusätzlich zum neurologischen Phänotyp einen Spermiogenesedefekt, wodurch *wr*-Männchen steril sind. Die *wr*-Spermien bleiben im Rundkopfstadium stehen, das typische Abflachen des Nukleus findet nicht statt. Außerdem wird kein intaktes Akrosom gebildet (Heimann et al., 1991).

Die Muskelatrophie wird durch die Degeneration von Motoneuronen ausgelöst. Histologisch zeigt sich eine Vakuolisierung der Motoneuronen in den Vorderhörnern des cervicalen und thorakalen Rückenmarks und im Hirnstamm (Duchen and Strich, 1968). Dabei wird das Sterben der Motoneuronen von einer Proliferation der Astrocyten (Astrogliose) im Rückenmark begleitet (Laage et al., 1988).

Neuere Untersuchungen an frühdiagnostizierten *wr*-Mäusen zeigen, daß dem Motoneuronentod eine Neurodegeneration im Thalamus, Cerebellum und Hirnstamm ab Tag 13 p.n. vorausgeht (Rathke-Hartlieb et al., 1999). Ab Tag 23 p.n. kommt es bei *wr*-Mäusen zu einer Mikroglia-Aktivierung, die im Verlauf der Krankheit zunimmt.

Die gewebeautonome Wirkung des *wr*-Gens konnte durch Aggregationschimären demonstriert werden (Augustin et al., 1997). In den chimären Testes trat ein Mosaik von gesunden und kranken Spermien auf; Nachkommen entstanden aber nur aus den gesunden Spermien, was zeigt, daß die Keimzellen primär betroffen sind.

Trotz eingehender histologischer und biochemischer Befunde ist die molekulare Ursache für *wobbler* bis heute nicht identifiziert.

2.1.1 Genetik von Motoneuronenerkrankungen

Die *wobbler* Maus wird in vielen Untersuchungen als Modell für menschliche Erkrankungen, wie spinale Muskelatrophie (SMA) und amyotrophe Lateralsklerose (ALS) benutzt (Pioro und Mitsumoto, 1995; Green und Tolwani, 1999). Bei einigen Erkrankungen bzw. Maus-Modellen mit Motoneuronendegeneration, die hier kurz vorgestellt werden sollen, konnte eine Mutation gefunden werden. Dabei sind sehr unterschiedliche Gene betroffen, so daß der Mechanismus, der zum Motoneurontod führt, unentdeckt bleibt (Newbery und Abbott, 2001).

Beim Menschen konnte der Gendefekt für die SMAs I bis III identifiziert werden. Obwohl diese drei Formen unterschiedlich schwere Krankheitsbilder aufweisen, ist immer das survival of motoneurons (SMN1) Gen betroffen (Lefebvre et al., 1995). Das SMN1-Protein ist in allen Geweben zu finden, jedoch in besonders hoher Menge in Motoneuronen (Liu and Dreyfuss, 1996). Es konnte nachgewiesen werden, daß es Komplexe mit mehreren kleinen nukleären Ribonukleoproteinen (snRNPs) (Pellizzoni et al., 1998) bildet und somit eine Rolle beim RNA-Splicen spielt.

In ca. 20% der familiären Fälle von ALS ist das Gen für die Cu/Zn Superoxid-Dismutase (SOD1) betroffen (Robberecht, 2000). Auch hierbei handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Gen; der Mechanismus, der zur selektiven Schädigung von Motoneuronen führt, ist unbekannt; man vermutet, daß oxidativer Streß eine Rolle dabei spielen könnte (Dredge et al., 2001).

Für zwei klassische Maus-Modelle von ALS konnte der genetische Defekt aufgeklärt werden: *neuromuscular disease (nmd)* und *wasted (wst)*.

In den zwei Allelen der *nmd* Maus wurden Mutationen im Gen für eine ubiquitär exprimierte DNA-Helikase und ATPase gefunden (Cox et al., 1998).

In der *wst* Maus ist das Gen für den Translation-Elongationsfaktor 1A-2 (eEF1A-2), der nur in terminal differenzierten Zellen von ZNS, Herz und Skelettmuskel exprimiert ist, betroffen (Chambers et al., 1998). Für den Translation-Elongationsfaktor 1A-1 konnte gezeigt werden, daß er mit dem Transkriptionsfaktor ZPR1 interagiert, der wiederum mit SMN1 interagiert. Wenn auch für eEF1A-2 eine Interaktion mit diesem Komplex gezeigt werden könnte, wäre ein molekulares Bindeglied in der Kaskade, die zum Motoneurontod führt, identifiziert (Newbery und Abbott, 2001).

2. 2 Vergleichende Genomik

Die vergleichende Genomik beruht auf der Beobachtung, daß Gene, die in einem Organismus gekoppelt sind, auch in anderen Organismen Kopplung aufweisen (Nadeau und Sankoff, 1998).

Während der Evolution werden Kopplungen durch Chromosomenumstrukturierungen (z.B. Translokationen) unterbrochen. Je weiter entfernt verwandt zwei betrachtete Spezies sind, desto mehr Umordnungen haben sich angesammelt und die Wahrscheinlichkeit für einen Kopplungsbruch steigt. Eng verwandte Arten haben also längere konservierte Regionen als weiter entfernte.

Konservierte Regionen sind durch die homologen Gene definiert. Dabei spricht man von konservierter Syntänie, wenn mindestens zwei Paare von Homologen auf demselben Chromosom in der jeweiligen Spezies lokalisiert sind. Wenn die Gene auch in derselben Reihenfolge vorliegen, spricht man von konservierter Kopplung (Nadeau und Sankoff, 1998) oder man sagt, die Gene liegen in einem konservierten Segment. Die homologen Sequenzabschnitte in verschiedenen Spezies lassen sich z.B. *mit chromosome painting* sichtbar machen (Scherthan et al., 1994).

2.2.1 Vergleichende Genomik bei Maus und Mensch

Mus musculus und *Homo sapiens* sind die am besten genetisch charakterisierten Organismen unter den Wirbeltieren. Die Anzahl der konservierten Regionen wird auf 180 geschätzt (Lander et al., 2001). Die syntänen Regionen sind in der Mensch/Maus-Homologie-Karte (*human/mouse homology map*) des NCBI (*National Center for Biology and Information*) zusammengefasst (s. Abb. 2.1). Häufig erlaubt die chromosomale Lokalisierung eines humanen Gens, Vorhersagen über die Position des Homologen in der konservierten Region bei der Maus. Praktische Anwendung findet dieses Prinzip z.B. bei der Identifikation von „Krankheitsgenen“ während einer Positionsklonierung. Allerdings wird der Vergleich der Genkarten dadurch erschwert, daß bei Maus und Mensch unterschiedliche Kartierungsmethoden (genetische Kartierung vs. cytogenetische) vorherrschen, wobei auch die Auflösung unterschiedlich ist. Außerdem deuten neuere Daten darauf hin, daß in den meisten Fällen die konservierte Syntänie durch z.B. Insertionen oder Inversionen unterbrochen wurde und lange über mehrere Megabasen konservierte Regionen eher die Ausnahme als die Regel sind (Carver und Stubbs, 1997).

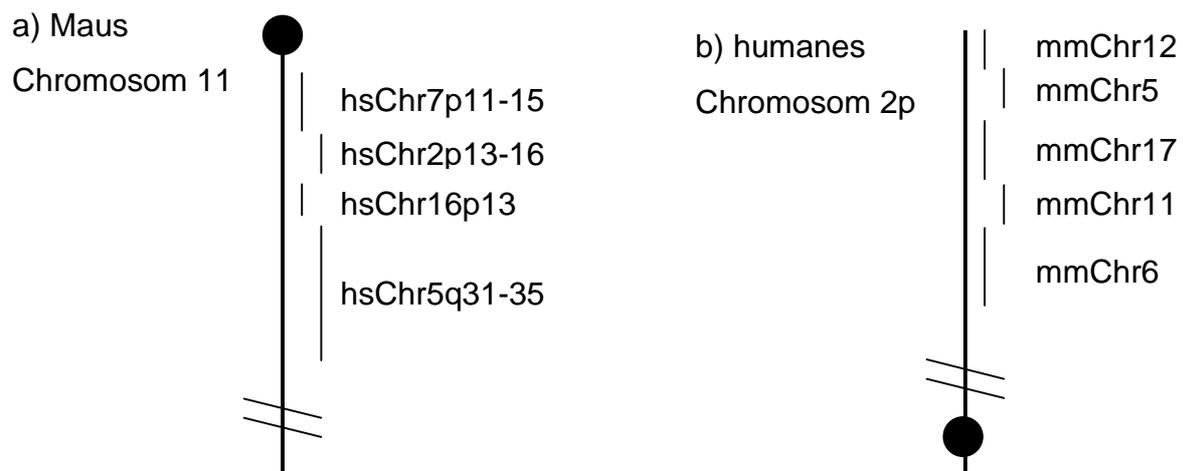


Abb. 2.1: Darstellung der zwischen Maus und Mensch konservierten Regionen, entnommen aus der *human/mouse homology map*.

a) auf dem Maus Chromosom (mmChr)11

b) auf dem menschlichen Chromosom (hsChr) 2p,

2.2.2 Das humane Genomprojekt

Das humane Genomprojekt gipfelte im Februar 2001 in der Veröffentlichung der sogenannten *draft* Sequenz, wodurch die humane Genomsequenz mit automatischen Annotierungen von Genen, ESTs, Genvorhersagen, Mikrosatelliten, u.a. für jeden abrufbar geworden ist. Im Gegensatz zu den „fertigen“ Sequenzen (*finished sequence*, Fehlerrate von 10^{-4} , nur minimale Lücken) der Chromosomen 21 und 22 gibt es in der *draft* Sequenz noch größere Lücken und Unsicherheiten in der Anordnung. Das NCBI, der *Ensembl*-Browser, der aus der Zusammenarbeit des Europäischen Bioinformatik Instituts und des Sanger-Centers hervorgegangen ist, und der *golden path*-Browser der Universität von Santa Cruz (Kalifornien) bieten Zugang zu den Sequenz-informationen. Man kann z.B. nach einzelnen Genen suchen oder sich den Inhalt eines bestimmten chromosomalen Abschnitts anzeigen lassen. Dabei kann es zu Diskrepanzen zwischen den Anbietern kommen, was aber lediglich die *draft* Natur der Sequenz widerspiegelt.

Für die Verwirklichung der „Mondlandung der Biologie“ war aber mehr vonnöten als die Ausweitung der Sequenzierkapazitäten. Einer der Meilensteine des Genomprojekts war, eine physikalische Karte des humanen Genoms mit 30.000 Markern anzulegen (Watson, 1990). Bei einer Größe des humanen Genoms von 3×10^9 bp ergibt das einen mittleren Abstand der Marker (= Auflösung) von 100 kb.

Durch die Entwicklung der STSs (*sequence tagged sites*) standen solche Marker zur Verfügung (Olson et al., 1989). STSs sind einmalig im Genom vorkommende Abschnitte mit bekannter Sequenz, die durch eine PCR-Reaktion darstellbar sind. Dabei werden sowohl genomische als auch exprimierte Sequenzen benutzt. Letztere erhält man durch das Ansequenzieren von cDNA-Klonen. Diese sogenannten *expressed sequence tags* (ESTs) stellen also Teile von Genen dar.

Die vorhandenen Marker wurden zunächst dadurch im Genom lokalisiert, daß man sie auf künstlichen Hefechromosomen (*yeast artificial chromosomes*, YACs) testete. YACs sind die größten genomischen Klone mit Insertgrößen von bis zu 1 Mb (Monaco und Larin, 1994). Die YACs konnten durch Feststellung gemeinsamer Marker zu Contigs geordnet werden, die das humane Genom abdeckten.

Die Menge der vorhandenen Marker reichte aber nicht aus, so daß neue STS generiert wurden und vor allem auch zahlreiche cDNA-Sequenzierungsprojekte ins Leben gerufen wurden. Über die Weiterentwicklung der Kartierung mit Bestrahlungshybridzellen (RH-Kartierung, RH = *Radiation Hybrids*) (Cox et al., 1990) konnten diese neuen STS im Genom verankert werden. Für die RH-Kartierung werden somatische Zellhybride aus Hamster- und menschlichen Zellen hergestellt. Bei Bestrahlung menschlicher Zellen entstehen Chromosomenbrüche. Fusioniert man diese Zellen mit einer Hamsterzelllinie integrieren einzelne humane Chromosomenfragmente in das Hamstergenom. Mit Hilfe von Mikrosatelliten wird der Gehalt an menschlicher DNA in den Hamsterzellen ermittelt. Dann wählt man einige Zellen aus (ca.100), die das gesamte humane Genom repräsentieren. Das Einzige, was für die Lokalisation eines Gens benötigt wird, ist ein PCR-Test, der zwischen menschlicher und Hamster-DNA unterscheidet.

Durch die RH-Kartierung der vielen neu gewonnen ESTs entstand so eine Transkriptkarte des humanen Genoms (*Genemap99*) (Deloukas et al., 1998).

2.2.3 Genomprojekt bei der Maus

Die Mausgenetik wurde durch ihre Möglichkeit, Modelle für menschliche Krankheiten zu liefern, stark vorangetrieben, so daß 1998 ein Aktionsplan für die Maus-Genomik (Battey et al., 1999) entworfen wurde, der u.a. die Produktion einer *draft* Sequenz des Maus-Genoms vorsah. Das sequenzierte Maus-Genom sollte auch als wichtiges Hilfsmittel für die Analyse und Annotation des humanen Genoms (Denny und Justice, 2000) dienen.

Als Referenzstamm für die Sequenzierung des Maus-Genoms wählte man C57BL/6J. Die Genome von anderen Inzuchtstämmen sollen folgen, wodurch eine große Anzahl von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms* = SNPs) zur Verfügung stehen wird. Erste Untersuchungen zeigen, daß zwischen unterschiedlichen Inzuchtstämmen alle Tausend bp ein SNP vorkommt (Lindblad-Toh et al., 2000).

Im Jahre 1999 wurde mit der Erstellung einer physikalischen Karte begonnen: ca. 300.000 BACs der RCPI23 BAC-Bank (Osoegawa et al., 2000) wurden durch Fingerprinting charakterisiert und zu ca. 600 contigs zusammengefasst, die über RH-Marker den einzelnen Chromosomen zugeordnet wurden. Für die Sequenzierung werden BACs teils zufällig, teils aus bestimmten Regionen ausgewählt. Gleichzeitig wird das gesamte Genom nochmals in einer niedrigeren Abdeckung mit der Schrotschußmethode (*whole-genome shot gun sequencing*) erfasst; dazu wird die genomische DNA zufallsbedingt fragmentiert und in Plasmidvektoren kloniert.

Seit März 2001 sind alle Rohdaten mit Blast durchsuchbar. Im Moment arbeitet man an der Assemblierung der fünf- bis sechsfachen Abdeckung des Genoms. Eine *draft* Sequenz ist allerdings erst ab Mitte 2002 zu erwarten (Frankel, 2001).

2.2.4 Funktionelle Genomik bei der Maus

Im Rahmen des Aktionsplan zur Mausgenomik war nicht nur die Entschlüsselung der Genomsequenz vorgesehen, sondern gleichzeitig sollte die Analyse der Genfunktionen beschleunigt werden (Battey et al., 1999). Dies wird mit dem Schlagwort der funktionellen Genomik (*functional genomics*) umschrieben und beinhaltet u.a. die Herstellung neuer Maus-Mutanten, deren Phänotypisierung und der Entwicklung von adäquaten Möglichkeiten, wertvolle Stämme zu sichern, wie z.B. Kryokonservierung von Spermien (Marschall und Hrabe de Angelis, 1999). In der ENU-Mutagenese (ENU= Ethyl-Nitroso-Harnstoff) werden Punktmutationen induziert und zufallsbedingt neue Allele generiert, so daß im Idealfall allelische Serien eines Gens analysiert werden können. Andererseits erfolgt die gezielte Deletion chromosomaler Bereiche. Solche Deletionsmäuse sind u.a. besonders für die Identifikation von rezessiven Allelen geeignet.

Außerdem gehört zur funktionellen Genomik die sogenannte Transkriptom- bzw. Proteomforschung, in der versucht wird, alle Transkripte bzw. Proteine eines Organismus zu identifizieren.

Um die Funktion eines einzelnen Gens im lebenden Organismus zu analysieren, eignet sich besonders eine Ausschaltung des Gens, ein sogenannter *knock-out* (k.o.). Dazu wird ein spezieller Vektor (*targeting* Vektor) konstruiert, der das zu analysierende Gen in mutierter Form trägt. Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wird dann das normale Allel durch das mutierte ausgetauscht. Da die homologe Rekombination ein seltenes Ereignis ist, muß der Vektor außerdem einen Selektionsmarker enthalten. Es bietet sich an, den Selektionsmarker gleichzeitig dafür zu verwenden, die Sequenz des Gens in gewünschter Weise zu unterbrechen. Als Konkurrenzreaktion zur homologen Rekombination erfolgt die zufällige Integration des Vektors. Allerdings integrieren hierbei auch alle Vektorbestandteile, so daß man eine Möglichkeit hat, beide Fälle zu unterscheiden. Damit es in einem detektierbaren Ausmaß zur homologen Rekombination kommt, muß isogenische DNA für den Vektor verwendet werden und die dem Gen homologen Bereiche sollten mindestens 5 kb lang sein (Hasty et al., 1991; Deng und Capecchi, 1992).

2.3 Positionsklonierung des *wobbler* Gens

Bei einer Positionsklonierung wird nur noch der mit dem Phänotyp segregierende chromosomale Locus betrachtet. Dazu führt man mit Hilfe polymorpher Marker, z.B. Mikrosatelliten, Stammbaumanalysen beim Menschen oder Kreuzungen bei der Maus durch. Mikrosatelliten sind zeh- bis 50-fache Wiederholungen kurzer Sequenzmotive; durch die Kenntnis der flankierenden Bereiche sind sie durch eine PCR-Reaktion darstellbar. Durch das MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) wurde eine große Anzahl von zwischen verschiedenen Mausstämmen polymorphen Mikrosatelliten-Markern generiert (Dietrich et al., 1994).

Ist der chromosomale Locus genügend eingeeengt, erfolgt als zweiter Schritt einer klassischen Positionsklonierung die Erstellung einer physikalischen Karte der betroffenen Region. Auf einer physikalischen Karte lassen sich Kandidatengene ohne vorhandenen Polymorphismus kartieren und sie ist wesentlich genauer als eine genetische Karte, wobei die Auflösung von der Größe der verwendeten genomischen Klone abhängt. Mit Hilfe von Ankermarkern werden diese genomischen Klone identifiziert, wobei das Ziel, die komplette Abdeckung des Kandidatengenbereichs mit sich überlappenden Klonen, ein sogenanntes „Contig“ ist. Dafür ist es oftmals

notwendig, weitere Marker von diesen Klonen zu gewinnen, damit das Contig ausgeweitet werden kann und um Überlappungen festzustellen.

2.3.1 Chromosomale Lokalisation des *wobbler* Gens

Mittels einer Interspezies-Rückkreuzung zwischen *Mus musculus* C57BL/6J (*wr/+*) und *Mus spretus* konnte das *wr*-Gen auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus kartiert werden (Kaupmann et al., 1992). Das *wr*-Gen wies enge Kopplung zum Erythroblastosis Onkogen *ErbB* und zum Reticuloendotheliosis Onkogen *Rel* auf. Außerdem konnte durch Segregationsstudien eine Kopplung zum *Rab1*-Gen, das für ein GTP-bindendes Protein aus der ras-Superfamilie kodiert, und zu *Glns-ps1*, einem intronlosen Pseudogen für eine Glutaminsynthetase, gezeigt werden (Wichmann et al., 1992).

2.3.2 Erstellung einer physikalischen Karte der *wobbler*-Region

Der *wr*-kritische Bereich wurde mit Hilfe von weiteren Rückkreuzungen auf $1,2 \pm 0,9$ cM zwischen den Mikrosatelliten *D11Mit19* und *D11Mit79* (Wedemeyer, 1995) (Korthaus et al., 1997) eingeengt. *Rab1a* und *Glns-ps* dienten als Ankermarker für die Erstellung eines YAC-Contigs (Wedemeyer et al., 1996). Außerdem wurden für die Suche nach weiteren YACs die Mikrosatelliten *D11Mit79*, *D11Mit343*, *D11Mit19*, *D11Mit294*, *D11Mit81* und *D11Mit152* verwendet. Das Gen für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase *Mor2* und Homöobox Gen *Otx1*, die beide auf das proximale Maus-Chromosom 11 kartiert werden konnten (Korthaus et al., 1996, DeGregorio et al., 1996) stellten weitere Marker für die YAC-Suche dar.

Nach der Kartierung von RAB1a auf dem humanen Chromosom 2p im syntänen Bereich zum proximalen Maus Chromosom 11 wurde ein humanes YAC-Contig erstellt (Wedemeyer et al., 1996). Von einem RAB1a tragenden YAC wurde die AHY1.1 genannte Sequenz ermittelt und durch RH-Kartierung in die Nähe des Mikrosatelliten D2S2090 lokalisiert. Durch diesen Mikrosatelliten konnte auf die Datenbank des Whitehead Institute mit humanen YAC-Contigs zugegriffen werden. Aus dem Contig WC-210 wurden 9 YACs so ausgewählt, daß sie den *wobbler*-homologen Bereich beim Menschen abdecken (Resch, 1997; Resch et al., 1998).

Außerdem wurde mit der Erstellung eines Maus-BAC-Contigs begonnen, da BACs im Gegensatz zu YACs einfacher zu handhaben und zu isolieren sind und so weitere

Möglichkeiten zur Kandidatengenanalyse, wie Konstruktion von *targeting* Vektoren oder Herstellung von BAC-Transgenen, bieten. Durch die kleinere Insertgröße müssen für die Suche nach BACs viel mehr Marker verwendet werden. Da diese an vielen Stellen nicht vorhanden waren, konnte keine lückenlose Abdeckung des Kandidatengenbereichs erreicht werden.

2.3.3 Einengung des Kandidatengenbereichs

Mit Hilfe einer Intraspezies-Rückkreuzung zwischen *Mus musculus* C57BL/6J-*wr* und *Mus musculus castaneus* (Cast/Ei) konnte der Mikrosatellit *D11Mit343* als neuer proximaler Rekombinationsbruchpunkt identifiziert werden (Schmidt, 1997). Sowohl die Detektion eines Polymorphismus zwischen C57BL/6J und C57BL/6J-*wr* im eng mit dem *wr*-Locus gekoppelten Gen für die Chaperonin-Delta-Untereinheit (*Cct4*) (Rathke-Hartlieb et al., 1999) als auch die Entwicklung des sogenannten F2-F3-Rekombinationsscreenings (Schmitt-John et al., 1998) stellten Verbesserungen der Kreuzungsstrategie dar. Aufwendige Rückkreuzungen zur Bestimmung des Allel-Status können mit der *Cct4*-Diagnostik vermieden werden. Durch die Verpaarung heterozygoter F1-Tiere (C57BL/6J-*wr*/ Cast) ist im F2-F3-Rekombinationsscreening die Anzahl der informativen Meiosen im Vergleich zu einer einfachen Rückkreuzung verdoppelt. Die F2-Tiere werden auf ihren Allelstatus in der *wr*-Region geprüft, wobei alle Rekombinanten mit *wr*-Phänotyp direkt informativ sind. Die gesunden Rekombinanten werden mit heterozygoten F1- oder F2-Tieren weiterverpaart und die F3 dann auf das Vorkommen des *wr*-Phänotyps hin untersucht. So können alle F2-Tiere ausgewertet werden und nicht nur das erkrankte Mendel'sche Viertel.

Mit Hilfe diese Strategie konnte der Kandidatengenbereich nochmals eingeschränkt werden mit dem BAC-Ende 147n22rev als neuem proximalen Marker (Ulbrich, 2000).

2.3.4 Ausschluß von Kandidatengenen

Einige Kandidatengene, die auf Chromosom 11 kartiert worden waren, konnten durch die physikalische Kartierung ausgeschlossen werden, so z.B. *Meis1*, ein Homöoboxgen, das proximal zu *D11Mit79* liegt (Lengeling, 1997), ebenso *Spnb-2*, das Gen für eine hirnspezifische β -Spektrin-Isoform und das Gen für die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase *Ddc* (Lengeling et al., 1994).

Mor2 und *Otx1* liegen beide innerhalb der Kandidatengenregion. Für *Mor2* konnte kein Unterschied in der Enzymaktivität zwischen Wildtyp und *wobbler* (Korthaus et al., 1996) festgestellt werden. Das *Otx1*-Gen ist bislang nicht ausgeschlossen, der Phänotyp der *Otx1*^{-/-} Maus entspricht allerdings nicht dem *wobbler*-Phänotyp (Acampora et al., 1996).

Die beiden humanen neuromuskulären Krankheiten Miyoshi Myopathie (MM) und Gliedergürteldystrophie Typ 2B (limb girdle muscular dystrophy type 2B, LGMD2B) konnten als *wobbler*-Homologe ausgeschlossen werden, da sie sich in einem Bereich des humanen Chromosoms 2p befinden, der homolog zum Maus Chromosom 6 ist (Korthaus et al., 1997). Inzwischen konnte gezeigt werden, daß beide Krankheiten durch Mutationen im Dysferlin-Gen ausgelöst werden (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998).

2.3.5 Stand der Positionsklonierung am Beginn dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit wurden einige BACs aus dem *wr*-kritischen Bereich ausgewählt und in einer Kooperation mit dem Institut für molekulare Biotechnologie (IMB) in Jena sequenziert. Das Maus-BAC/YAC-Contig weist im distalen Kandidatengenbereich zwischen *Peli1* und *D11Mit19* eine große, schwer abschätzbare Lücke auf, die einige Gene, die auf dem humanen YAC-Contig kartiert wurden, enthält (s. Abb. 2.2). Die Abdeckung der gesamten Region mit BACs ist lückenhaft.

Die syntänen Regionen auf Maus Chromosom 11 und dem humanen Chromosom 2p14-15 sind so weit charakterisiert, daß man annehmen kann, daß die Genreihenfolge durch eine Inversion zwischen Maus und Mensch unterbrochen ist (s. Abb 2.2). In ihrer Doktorarbeit konnte K. Resch humane ESTs aus dem Bereich konservierter Syntanie auf das Maus-Contig übertragen. Im weiteren Verlauf wurden einige dieser ESTs als neue Kandidatengene identifiziert: das Drosophila Pellino-Homolog *Peli1*, die Uridin-Diphosphoglucose-Pyrophosphorylase *Ugp2*, das Tumorantigen *Hcc8* und die anonymen cDNAs *Kiaa0903* und *mEST13*. In der cDNA-Sequenz und in der Expression von *Peli1*, *Ugp2* und *Hcc8* konnte kein Unterschied zwischen WT und WR festgestellt werden (Resch, 2000).

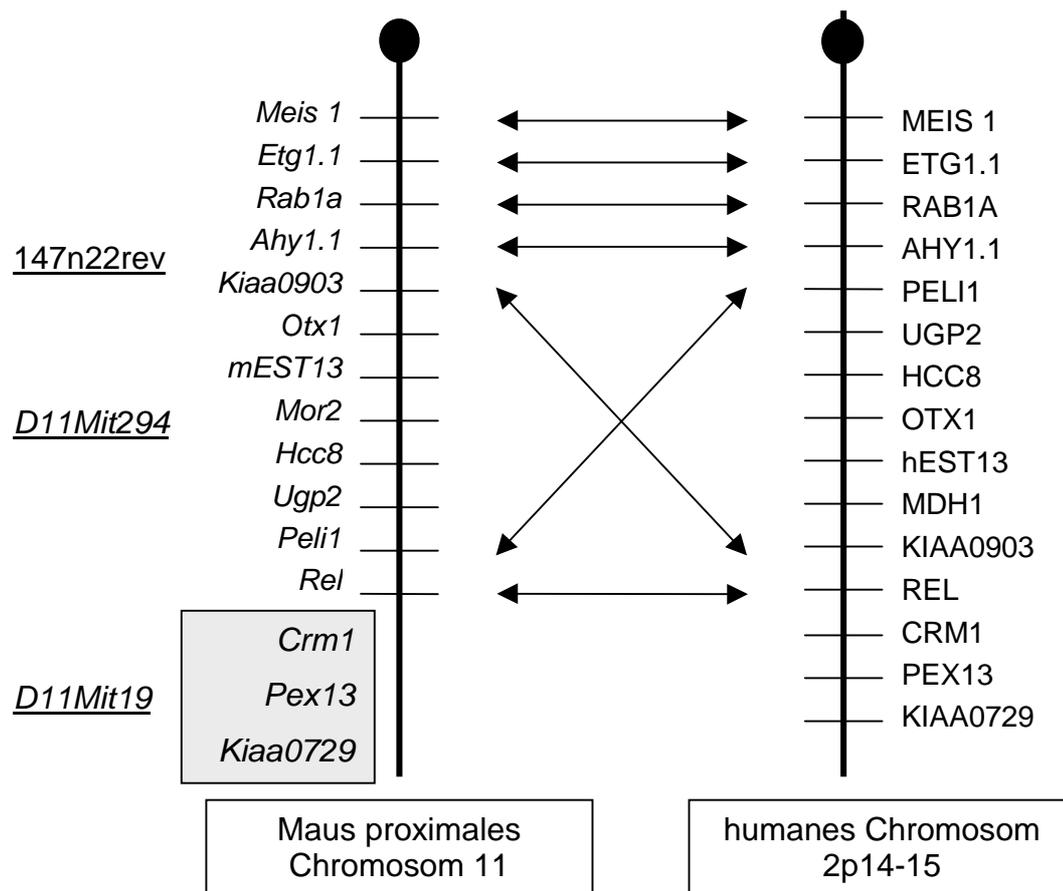


Abb. 2.2: Darstellung eines Teils der syntänen Bereiche aus dem proximalen Maus-Chromosom 11 und dem humanen Chromosom 2p14-15.

Die Gene, die nicht auf dem Maus-Contig kartiert werden konnten, sind in einem Kasten dargestellt. Die Genreihenfolge ist von *Meis 1*/MEIS1 bis *Ahy1.1*/AHY1.1 zwischen Maus und Mensch identisch und scheint sich mit *Rel*/REL fortzusetzen.

2.4 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen Kandidatengene für die *wr*-Mutation auf molekularer Ebene analysiert werden, um Unterschiede in deren kodierender Sequenz oder Expression zu finden. Für das *Peli1*-Gen soll außerdem ein *targeting* Vektor konstruiert werden, um die Funktionsanalyse des Gens voranzutreiben. Gleichzeitig soll versucht werden, die physikalische Karte der *wr*-Region besonders in der distalen Region zu verbessern, so daß weitere Kandidatengene vom humanen auf das Maus-Contig übertragen werden können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

E.coli INV α F' (TA Cloning Kit Instruction Manual, Invitrogen Corp., San Diego, CA):

F', *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (*r_k*⁻, *m_k*⁺), *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169 λ ⁻

E.coli DH10B (Wirtsstamm der BAC-Banken):

F', *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *endA1*, *recA1*, *deoR*, Δ (*ara*, *leu*)7697, *araD139*, *galJ*, *galK*, *nupG*, *rpsL*, λ ⁻

E.coli XL1-Blue: *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*(*r_k*⁻*m_k*⁺), *lac*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, F'[*proAB*, *lac^qZ* Δ M15, Tn10]

3.1.2 Maus-Stämme

***Mus musculus* C57BL/6J**: Labor-Inzuchtstamm, ursprünglich am Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA etabliert.

***Mus musculus* C57BL/6J-wr**: Labor-Inzuchtstamm, der die *wr*-Mutation trägt

Mus musculus castaneus: Labor-Inzuchtstamm

3.1.3 ES-Zelllinie

R1:[(129/Sv x 129/J)F1], A^W, Tyr^{c-ch/+}Tyr^c, p/+^p

3.1.4 DNA-Proben

Die DNA der YACs wurden von D. Korthaus und K. Resch hergestellt.

Maus-DNA wurde von Melanie Ronsiek präpariert, humane DNA wurde von H. Jockusch zur Verfügung gestellt.

3.1.5 YAC-Banken

3.1.5.1 Maus-YAC-Banken

Der Großteil der verwendeten YACs stammt aus einer YAC-Bank des Whitehead Institute for Biomedical Research (MIT, Cambridge, Massachusetts, USA) und wurde aus genomischer DNA weiblicher C57BL/6J-Mäuse hergestellt (Kusuki et al., 1993). Zwei der YACs stammen aus einer YAC-Bank des Imperial Cancer Research Fund (ICRF; Meier-Ewert, nicht publiziert).

Tab. 3.1: Maus YACs mit offizieller und Laborbezeichnung

Laborbezeichnung	Offizielle Bezeichnung	Herkunft
Y1	ymWIBR168H4	MIT
Y2	903H082	ICRF
Y3	903A0745	ICRF
343a	ymWIBR149H6	MIT
Otx1a	ymWIBR35F3	MIT
M3	ymWIBR72F3	MIT
294b	ymWIBR56B5	MIT
M2	ymWIBR16H2	MIT
M1	ymWIBR140G1	MIT
294a	ymWIBR195A3	MIT
19a	ymWIBR166G2	MIT
81a	ymWIBR67F10	MIT
81b	ymWIBR190C10	MIT
81c	ymWIBR385F6	MIT
9	ymWIBR319G14	MIT

3.1.5.2 Humane YAC-Banken

Die 2 YACs vom ICRF wurden aus einer humanen Lymphoblastoid-Zelllinie hergestellt (Larin et al., 1991). Bei den anderen YACs handelt es sich um CEPH-Mega-YACs, die ebenfalls aus einer männlichen, humanen Lymphoblastoid-Zelllinie hergestellt wurden (Albertsen et al., 1990). Diese Bank deckt das Genom etwa achtfach ab und die YACs haben eine durchschnittliche Insertgröße von 1 Mb (Chumakov et al., 1995). Diese YACs wurden vom RZPD bezogen. Die YAC-Bezeichnungen wurden aus der Datenbank des Whitehead Institute aus dem Contig WC-210 entnommen.

Tab. 3.2: humane YACs mit offizieller und Laborbezeichnung

Laborbezeichnungen	Offizielle Bezeichnung	Herkunft
A3	CEPHy904A03871	RZPD
C10	CEPHy904C10885	RZPD
D12	CEPHy904D12797	RZPD
E1	CEPHy904E01923	RZPD
F6	CEPHy904F06956	RZPD
F7	CEPHy904F07744	RZPD
G12	CEPHy904G12789	RZPD
G9	CEPHy904G09927	RZPD
HY1	ICRFy900F0982	ICRF
HY4	ICRFy900A0894	ICRF

3.1.6 Maus BAC-Banken

Die verwendete BAC-Bank „DOWN TO THE WELL Mouse ES BAC“ (DTTW, FBAC-4432.1) von Incyte Genomics, Palo Alto, USA, ist aus partiell mit *HindIII* geschnittener DNA von RW4 Zellen (Stamm 129/SvJ) hergestellt. Die DNA-Fragmente sind im pBeloBAC11 kloniert, wobei die durchschnittliche Insertgröße 120 kb beträgt. Diese BAC-Bank wurde per PCR durchsucht.

Außerdem konnte die RCPI-23 BAC-Bank (Osoegawa et al., 2000) (BACPAC Resources, USA) des Instituts für molekulare Biotechnologie (Jena) genutzt werden. Bei dieser Bank wurde partiell mit *EcoRI* geschnittene DNA von C57BL/6J Mäusen in den Vektor pBAC3.6 kloniert. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt 197 kb und Genom ist 11,2-fach repräsentiert. Diese Bank wurde mittels Filterhybridisierungen durchsucht.

Eine Tabelle der in dieser Arbeit verwendeten BACs befindet sich im Anhang.

3.1.7 Bestrahlungshybridzellen

Für die Genkartierung bei der Maus wurde das T31 Mouse/Hamster Radiation Hybrid Panel von Research Genetics, Huntsville, Alabama, USA verwendet. Dieses System besteht aus 100 unabhängigen Zelllinien, die theoretische Auflösung ist ca. 380 kb (Flaherty und Herron, 1998). Die Integration von Chromosomenbruchstücken der Maus in das Genom der Hamsterzellen wurde erreicht, indem die Maus-Zellen

(embryonale Stammzellen des Stamms 129aa) mit 3.000 rad bestrahlt und anschließend mit Thymidinkinase-defizienten Hamsterzellen fusioniert wurden.

Die Kartierung wird mittels PCR durchgeführt, es wurden 12,5 µl Ansätze verwendet und 25 ng Hybridzell-DNA eingesetzt. Hierbei ist zu beachten, daß der zu kartierende Marker ein zwischen Maus- und Hamster-DNA unterscheidbares Signal liefert. Ein positives Signal wird mit „1“ bewertet, ein negatives mit „0“ und zweifelhafte Signale mit „2“. Die ermittelten Daten werden dem Jackson Laboratory mitgeteilt, wo die chromosomale Lokalisation ermittelt wird. Die Kopplung des untersuchten Markers wird mit einem LOD-score belegt, der der Logarithmus der Wahrscheinlichkeit (Log of Odds) ist. Ein LOD-score von 4,0 besagt, daß dieser Marker mit einer Wahrscheinlichkeit von 10.000:1 mit einem anderen Marker gekoppelt ist. Die Position auf der RH-Karte wird in centi-Ray abhängig von der applizierten Strahlung n rad (cR_n rad) angegeben, für das Maus-Panel ist die Einheit somit cR_{3000} .

3.1.8 Oligonukleotide

Kiaa0903	5'>3'	3'>5'	T _A (°C)	5'>3' Sequenz	Referenz
M903 1	x		64	GCATTTCTGTCAATTACTGAGTTG	
M903 2		x	64	GAATGTGCTACAAGATTTCCTTAGC	
M903 3	x		64	GCTATACTAACATTATTGCTACATG	
M903 4		x	64	CATGCAATAGGACACAAAACATTG	
M903 5	x		64	CTGTGTATCTCAGGCTCTTTAC	
M903 6		x	66	CCTGAGTATGTGTAGCGCTTGG	
M903 7	x		64	GTAACCGCCCGAAAATACAATTC	
M903 8		x	66	GAATTATCAGCAATCATGAAACCAC	
M903 9	x		64	CCTTCCTGTTTGTTCGTTAAC	
M903 10		x	64	GCTCAATTTGCCAAAACCTGTTTAC	
M903 11	x		64	GTGTCACATAACACTGCTCTTTG	
M903 12		x	66	CTAAACCCCAAAGAAGGCCCTG	
M903 13	x		66	CAGTTATGACTCCTAAAATCAATGG	
M903 14		x	64	CTTTCTTACCTTCAATGGCTAGC	
M903 15	x		66	GGAAACTGGATTAGGCGGGAAG	
M903 16		x	64	CAGTGGTTTCCCCTAGACCAC	
M903 17	x		66	GTCTTTCCTGTTTGTCTAACATCC	
M903 18		x	64	GCAAGGAAATAAATTGCAGCAGG	
903 Ex2	x		62	GCAAGATGAAGAGAGACGTCG	
903 Ex5a			62	GTCTGTTCTCAATATATTGGCTG	
903 Ex5b	x		60	GCAACAGAACGTTTCAGAAATC	
903 Ex9a		x	64	CTTCAATGGCTAGCATGGCCC	
903 Ex9b	x		60	GAGCATGACTTAGAACGAAGG	
903 Ex11b	x		60	GAAATCCTGTGAAGTAAATTTGC	
903 Ex11c	x		62	CTGTGTTCCATTTGCCAGTGG	
903 Ex11d		x	60	GCCATCCTCTGAGGAGAGC	
903 Ex11e		x	60	GTAAGAAAGTTTCTGCTTTTATTG	

	5'>3'	3'>5'	T _A (°C)	5'>3' Sequenz	Referenz
kiaa903.1	x		66	CATGCTTCCCTGAGGCAGACG	K. Resch
kiaa903.2		x	62	CTCCACCTCCTACAACAAAGC	K. Resch
kiaaex11.a		x	58	GTTTCAGATTCTCATCCCATC	
903 5'c	x		58	GATCTCTCTACTTCTCCAAAG	
903 5'd		x	58	TCTTGAGGATTGAGAGACTTG	
903 5'e	x		58	CGATACCAAGTCCTGTTCTG	
903 5'f		x	58	CTTCAGATCGCTGAGTTCAG	
903 5'g	x		62	GACAGACACAAACAGTTCTGTG	
903 5'h		x	60	CGTGAAGTCTGTGTCTCTGTT	
903 5'i	x		60	ATCACAAAGCCAAATGTATCCTC	
903 5'j	x		60	CAGCTAAATCAGCCAGTTCCT	
903 5'k		x	60	CTGAGTCAGGATCTCCAAATG	
903 5'l	x		62	CAAATGTGCCCTCAGCTAAATC	
903 5'm		x	62	GAGGATTCAGAGACTTGTAGTC	
903 5'n	x		62	CATGGTGATGTCTCCATGAGG	
903 5'o			62	CTGCTCCAGTGTCTTGACTGA	
903 5'p	x		62	CTGGCAACCTGGAATAAAAAATC	
903 5'r		x	62	GGTTGCCATTTCTTTGTACATTC	
903 5's	x		58	CTCAGAAGAACCAATCACTGA	
903 5't	x		62	GAGCTGTATTAAGGGTTGCAG	
903 5'u		x	62	GTTCTTCAGAGGAAGTGGCTG	
903 5'v	x		62	CAGTTGAATGCTCTGAGCAGC	
903 5'w		x	60	AAGGGATTACAGCTGTTATTATAA	
903 5'x		x	62	TGACAAGATTGTTTAAAGTCTTCC	
903 5'y	x		62	GAGCAAGCGAGTTGTGCTAAG	
903 5'z		x	60	CACAAACTGGAAGTGGATGC	
903 5'1		x	60	CCAGTTCCTCTTCACTCTTTG	
903 5'2		x	60	AGCATCTCTTCTTGCTTGCTC	
903 Intron5	x		62	GATACCAGCATGCTTCTACAGC	
903 Intron6		x	64	CAGCTAAGCAGACAGAAGTCAG	
903 Intron7	x		62	ATAGAGGATATCATATGCTGTTAG	
903 Intron8		x	62	GTGTTTCCTGAAGTACTACATG	
903 Intron14	x		64	CTTTGGAATTGAAGACAAAGAGTG	
903 Intron15		x	64	CAAGGGCATAAGACATAAAAAGAG	
Homoloc-13					
MEST13.1		x	62	GGAGTTGACAGCTAAGTGACG	
MEST13.2	x		62	GCTTCTCTTACAGACAGTTTC	
MEST13.4		x	62	TGCTCTTCCATTTGCTCAGC	
MEST13.5	x		64	CGTGATTATCCTTGGACACTC	
MEST13.6		x	64	GTTACCATGCTCTGTTGCTG	
MEST13.7	x		64	GTAATATGACAAGAAAGATCC	
MEST13.8	x		60	GTTATGCACTGACTCTTCAGG	
MEST13.9		x	60	GAGGGTCACTTATGCAATGCT	
MEST13.10	x		58	TCTCAGAATGGTTCACTTTGG	
MEST13.11	x		64	GCTCTCATGCCTGAAGGAG	
MEST13.12	x		66	TGGCTCCTCCTGTTGTTTTC	
MEST13.13		x	66	ATCTCTTGTACCTGAGCAGG	
MEST13.14	x		64	CAAGACCACTTCTGGATACAAC	
MEST13.15		x	62	AATTGCCCATCTGCTTGAAGG	
MEST13.16	x		64	CTCTTCAGTAATTCTCTATGAAG	
MEST13.17	x		66	CACTGTTGGCCTACTGAC	
MEST13.18	x		64	GAGCGCTCTCCAGACCAAG	

	5'>3'	3'>5'	T _A (°C)	5'>3' Sequenz	Referenz
71m17 for b		x	58	TAGGCCTTCATTGATAAGCTG	
71m17 for c		x	58	GTAGCACACCCAAAGGTCC	
71m17 for d	x		58	GCTTATCAATGAAGGCCTAAG	
Mor2					
mor2 a	x		68	GCTGAAGGGAGAGTTCATCACG	D. Korthaus
mor2 b		x	68	CAGCAGCACCACGCTGTTGCAC	D. Korthaus
mor2 c	x		68	GGTGTAACCGCTGATGATGTAAG	D. Korthaus
mor2 d		x	68	CACGACAGGGAGTGAGTAGAGC	D. Korthaus
mor2 e	x		60	GAACCAATCAGAGTCCTTGTG	
mor2 f		x	60	CACAGTCTTGCAGTTCCATC	
mor2 g	x		68	GGTCATTGTTGTGGGAAACCC	
mor2 h		x	62	GATCGATGGCGCTGACTTGG	
mor2 5'	x		58	GCTGTAGAGGTGACCTGA	
mor2 3'		x	64	GCACTAACAACATGATAGACTTTG	
Otx1					
Otx1.2	x		62	TGAAGGACTTCGCAGTGGGA	
Otx1.3	x		64	GGTCAAGAAGAAGTCGTCTCC	
Otx1.7		x	64	GGAGACTTCTTCTTGACC	
Otx1.8	x		64	GCGCCGGCATCCGTATCAG	
Otx Ex1	x		64	CTGCACCCCTCCGTGGGC	
Otx Ex2		x	64	GCTGCTTCCGCGGGGTGG	
Otx Ex2a	x		66	CTAGCACCAAGTCCTTGTGGTC	
Otx Ex2b		x	64	CATCAGACAGAATAGGCCAG	
Otx Int2c	x		62	GGATTGAGAGCTTCCCGAG	
Otx Int1a		x	60	TCAAACGTAGAGGATGGAATC	
Otx.231 a	x		62	GCCTTTGCCTTGGCTTTTCC	DeGregorio, 1996
Otx.231 b		x		CTTCAAGTCTTTCTGGACAGC	
Otx.555a	x		62	AATGATGTGGCCAGTGAGCC	Acampora, 1996
Otx.555b		x		TCCCCTGCGAAGTCCTTCA	
Pli1					
pli1 intron a	x		60	TATGCCATCCTTGTAAGCATT	
pli1 intron b	x		62	ACATGGATTCATATTCTGGTTGC	
pli1 intron c		x	60	GAATGGGAGAGAACATGCAAT	
pli1 intron d	x		66	CTCTGCATGATGAAACAGAACTG	
pli1 intron e		x	64	GATTACTACTGCTAACGCTTAGC	
pli1 5' a	x		62	GTGACTTGTCCCTCCAGAAGC	
pli1 5' b		x	62	CTGGAAATATGAACTAGTACAGAC	
pli1 b		x	61	CTTCACCCCATTTGCCTTAGG	K. Resch
pli1 5' c	x		64	GATCTTGTGGTTTCTTATGAGAC	
pli1 5' d		x	64	CAAGGATGAGTCAATTCCACA	

BAC-Enden	T _A (°C)	5'>3' Sequenz	Produktgröße (bp)	Referenz
192h3 for a	60	CATGCAAGCTTCCTTAAGGTC	320	
192h3 for b		CAGACACTCTTGCTACTTTGG		
192h3 rev a	60	GTAGGTACAGAGTGGAACTC	350	
192h3 rev b		ACTGCACTAAAGGGATCGTCA		
95i23 rev a	60	AGTAGCATGTGACATTCCAGTT	310	
95i23 rev b		GTAATAACAGTGATCTGCTAC		
112b18 T7a	62	GTAACCTCAACAGGAGCCAGG	240	
112b18 T7b		GCACAGCTGTCTGTAATTTTCAG		

	T _A (°C)	5'>3' Sequenz	Produktgröße (bp)	Referenz
177I23 uni a	62	GTCCTCCAAGTTGCAACCGTC	300	
177I23 uni b		GTCGACTCTGACCAAATCGTG		
201I21 uni a	60	CATTTCTATATGGCCATCAAC	205	
201I21 uni b		CTAGGGACTGTCTATTAGTGTA		
201I21 rev a	58	CATTTCAAAAATGCATTTGACTC	210	
201I21 rev b		ATCATGGAAACAGCACTGAGT		
126p12 uni a	62	TCATATAACTGCAAGTAACTCAGT	240	
126p12 uni b		GTCAGAATTTGTTAGTACTATTC		
126p12 rev a	64	CTGAACTTAATACTTGCACGTAAG	280	
126p12 rev b		CTATATGAATTATCCACTCGTCCA		
165I14 rev a	58	GTGACACTATAGAATACTCAAG	340	
165I14 rev b		ACCTGTCCAGCAGCCATG		
71m17 for a	60	GCAGACAGATATTCTTATGGG	410	
71m17 for b		TAGGCCTTCATTGATAAGCTG		
71m17 rev a	60	CAGTATCGTGTTTCATAAGTGG	320	
71m17 rev b		CCCAAAGAGAATTTCTACAAAGC		
220e4 for a	58	GTGCACAAATTC AAGTGCACA	490	
220e4 for b		TCTACTACAATATGAGAAGCAC		
203o19 for a	60	CACATGATGAAGAATCCTTTCC	490	
203o19 for b		CCACTTGCAAACACTTCACAG		
115n4 rev a	62	GTGGATCTGAAATGTGCTTCTC	440	
115n4 rev b		GTCTTGCATAAGAGCTAAGTGAG		
115n4 uni a	58	TCTAGAGTCGACCTGCAGG	80	
115n4 uni b		CCATTTGGCTTCTTGTGAATG		
73f6 uni a	62	GACCTGCAGGCATGCAAGCT	410	
73f6 uni b		CAGAGACTGTCTGCCTTATCC		
73f6 rev a	60	TGTGGGATAGAACACACATGC	340	
73f6 rev b		ATGCTCCAAGCATTGTGTCTC		
209f21 uni a	60	CAGTCAGAACTCTGCAGGAG	280	
209f21 uni b		TCCATATGGCAGAGTAGCAAC		
209f21 rev a	58	TGTCCATACAGATGAGTACCA	370	
209f21 rev b		GTTCTGGGACTTGCTTTTGG		
Gene Chr11				
m61 a	58	AGTACAATGCTCAAGCAACAAC	204	K. Resch
m61 b		GTTCACCTGCCACAAACATG		K. Resch
CRM1 a	60	GATGAGGGAATGCAGATTTAAG	300	
CRM1 b		TTCAGCATATTTTCTCTGTTGTAA		
IB3607 a	62	GCAATGGCTACATTGGTCATAC	322	K. Resch
IB3607 b		GTCAGCTTTGCCATASCTGACG		K. Resch
Hspc159 a	58	TGGCATGAGACCAGGCAAGA	824	
Hspc159 b		TGAATGGAAAGTAAGGGATTGC		
HSPC159 c	62	GTGAGTACCCACGTTTCCGAG	220	
HSPC159 d		GTCTCCAGATCTTGCTAGGACA		
Murr1 a	60	TGTCAGAGGTAGAAGAGAGTAT	205	
Murr1 b		CTTTCATGCATGTATACAATGTC		
Murr1 c	60	CTACAGACCCACAGCTTCCA		
Murr1 d	68	ACCATGGGTGGCAAGTCCCTGA		
Murr1 e	56	ACAAGGGTCTCACCACATT		
hMurr1 a	64	GGATCATGGACACCTTGTTTC	164	
hMurr1 b		AGGAATCTGAATTTCTGTGTTTGG		
ELP a	64	CTCCAACAAGCTCGCAGCGTC		

	T _A (°C)	5'>3' Sequenz	Produktgröße (bp)	Referenz
ELP b	64	CTGGGAAGACTATTAATGCCAG		
ELP c	62	GAAGCATTGCCTCTGGTATAC		
ELP d	62	CACTTTAGCAATGTAGATCCTC		
hELP a	62	ATGTGCCAAGTGGAGTTTGAG	200	
hELP b		GTTCACATTCCATGCCTCCTA		
Cct4d a	60	TCAGAATAAAGATGATGCCATGGG	400	V. Schmidt
Cct4d b		TCATCGATTTTCAGAATGCTCCGC		
Sonden				
193h3 for a	60	CATGCAAGCTTCCTTAAGGTC		
192h3 for b	60	CAGACACTCTTGCTACTTTGG		
192h3 rev a	60	GTAGGTACAGAGTGGAAACTC		
193h3 rev b	60	ACTGCACTAAAGGGATCGTCA		
124I2 rev 1	58	GTCTCTGGCAAGTCCATCC		
124I2 rev 2	62	GCTAACAGGTGTCCGGTGAATG		
45m7 for a	62	AGTCAAGGACACTCCTGAGTG		
45m7 for 2	60	CTGCTTGTAACCAACCTGAAG		

3.1.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Pwo</i> DNA Polymerase	Roche, Mannheim
DNA-Polymerase I large fragment (Klenow-Enzym)	Boehringer Mannheim
T4 DNA Ligase	Gibco BRL, Eggenstein
Verschiedene Restriktionsenzyme	Gibco BRL, Eggenstein
RNase A	Boehringer Mannheim
Lysozym	Boehringer Mannheim
RNasin	Promega, Madison, USA

3.1.10 Verwendete Bausätze (Kits)

Kit	Hersteller
Nucleobond AX Kit	Macherey und Nagel, Düren
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA
TA-Cloning-Kit	Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Dynabeads mRNA Purification Kit	Dynal, Oslo, Norwegen
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden

3.1.11 Fragmentlängenstandards

Marker	Fragmentlängen	bezogen von
GeneRuler 100bp Ladder	80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 (bp)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
ϕ X174- <i>HaeIII</i> -Restriktionsfragmente	118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 (bp)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>ladder Mix</i>	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 (bp)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>lambda ladder</i>	1018, 970, 921, 873, 824, 776, 727, 679, 630, 582, 533, 485, 436, 388, 339, 291, 242, 194, 145, 97, 48 (kb)	New England Biolabs, Frankfurt a. Main
<i>low-range PFGE ladder</i>	194, 145, 97, 48, 23, 9, 6, 4, 2,3, 2, 0,56, 013 (kb)	New England Biolabs, Frankfurt a. Main

3.1.12 Verwendete Datenbanken und Programme

Die humane Genomsequenz kann sowohl auf dem *golden path* Browser der Universität Santa Cruz (Kalifornien) <http://genome.ucsc.edu/index.html>, als auch auf dem Ensembl-Browser <http://www.ensembl.org/>, als auch beim NCBI unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/> abgerufen werden.

Rummage Server:

<http://gen100.imb-jena.de/rummage/server/wobbler/>

Auf dem Rummage Server des IMB Jena sind passwortgeschützt die Daten der sequenzierten BACs abgelegt.

BCM search launcher:

<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>

Der „BCM (Baylor College of Medicine) search launcher“ (Smith et al., 1996) bietet zahlreiche Werkzeuge zum Bearbeiten und Vergleichen von DNA- und Proteinsequenzen an.

Jackson Laboratory:

<http://www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/rhsubmit.html>

Unter dieser Adresse werden die durch das T31 Mouse/Hamster-RH-Panel gewonnenen Daten eingegeben. Die ausgewerteten Daten erhält man sofort oder ein wenig später per e-mail.

Pfam-Proteindatenbank am Sanger Center:

<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam>

In der Pfam-Datenbank (*Protein families database of alignments and HMMs*) finden sich u.a. Beschreibungen zu einzelnen konservierten Proteindomänen.

NCBI Homepage:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Auf der Homepage des National Center for Biology and Information (NCBI) finden sich zahlreiche links zu Programmen und Datenbanken. Die am häufigsten verwendeten sind im Folgenden aufgeführt:

ORF-Finder:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>

Mit dem Programm ORF-Finder kann man sich offene Leseraster in allen 6 Leserahmen anzeigen lassen und die vorhergesagte Proteinsequenz im FASTA Format herunterladen.

ePCR:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/epcr.cgi>

Mit der elektronischen PCR (ePCR) kann man genomische DNA-Sequenzen auf Marker untersuchen, die Hinweis auf die Lokalisation im Genom geben.

Human-Mouse Homology Map:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Homology/>

In dieser Homologie-Karte von Mensch und Maus sind die homologen Chromosomenabschnitte mit den orthologen Genen der beiden Spezies gegenübergestellt. Dabei stehen allerdings bei der Maus zur Zeit nur die genetisch kartierten Gene zur Verfügung, auf der humanen Seite kann man direkt auf die Daten des humanen Genomprojekts zugreifen.

NCBI mouse genome resources:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/M_musculus.html

Unter *mouse genome resources* kann man alle zur Zeit verfügbaren Daten des Mausgenomsequenzierungsprojekts abrufen, z.B. die fertig sequenzierten BACs aber auch die Rohdaten als „trace files“.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, (Altschul et al., 1990):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>

Mit dem Programm Blast wurden neue Sequenzen auf Ähnlichkeiten zu schon bekannten Sequenzen überprüft. Man kann Nukleotidsequenzen untereinander (Blastn), Nukleotidsequenzen mit Proteinsequenzen (Blastx) oder auch translatierte Sequenzen mit Proteinsequenzen (tblastx) vergleichen.

Dabei stehen eine Reihe von unterschiedlichen Datenbanken zur Verfügung:

nr (non-redundant genbank) umfaßt alle bekannten Gene und auch komplett sequenzierte BACs.

EST (*expressed sequence tag*) enthält exprimierte Sequenzen in Form von Endsequenzen von cDNA Klonen.

htgs (high throughput genome sequence) enthält unvollständige BAC-Sequenzen aus den Genomsequenzierprojekten von Mensch, Maus, Ratte.

mmtrace (*Mus musculus* trace files) enthält Rohdaten aus dem Genomsequenzierungsprogramm der Maus.

Mit Blast 2 kann man zwei ausgewählte Sequenzen miteinander alignieren.

3.2 DNA-Methoden

3.2.1 DNA-Präparation

3.2.1.1 Plasmidisolierung aus Bakterien mittels *Easy Prep*

Diese Präparationsmethode dient der schnellen Plasmidisolierung aus Bakterien, was bei Überprüfung zahlreicher Klone von Vorteil ist. Sie ist allerdings nur bei *endA⁻* Stämmen durchführbar, da die Endonuklease A durch einfaches Erhitzen nicht inaktiviert wird.

Man überführt 1,5 ml einer Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß und pelletiert die Bakterien durch eine einminütige Zentrifugation bei 13.000 U/min. Anschließend resuspendiert man das Sediment in 50 µl Lysis-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 15 % Sucrose (w/v), 2 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml RNase A, 0,1 mg/ml BSA). Eine 30-sekündige Inkubation bei 100°C führt zur Lyse der Bakterien. Danach überführt man die Proben für 1 min auf Eis und zentrifugiert anschließend für 20 min bei 13.000 U/min. Vom Überstand werden 6 µl für eine Testspaltung eingesetzt.

3.2.1.2 Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse

Diese Plasmidisolierungsmethode wurde zur Präparation von *high copy number* Plasmiden aus cDNA-Klonen und zur Präparation von BACs, die sich wie *low copy number* Plasmide verhalten, genutzt.

In Klammern sind die Mengen für die Isolierung von *low copy* Plasmiden angegeben. Man überführt 3 (8) ml einer Übernachtskultur in Greiner Röhrchen und zentrifugiert 5 min bei 4.000 rpm und 4°C im SS34 Rotor der Kühlzentrifuge. Nachdem man den Überstand vollständig abgesaugt hat, wird das Sediment in 100 (300) µl eiskalter Lösung 1 (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Man überführt die Suspension in ein Eppendorfgefäß. Anschließend fügt man 200 (300) µl Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) hinzu und invertiert rasch 5- bis 9mal. Nach einer 10-minütigen Lagerung auf Eis werden 150 (300) µl eiskalte Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt) hinzugefügt und erneut 7- bis 9mal invertiert. Nach 5-minütiger Lagerung auf Eis erfolgt eine 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4.000 rpm. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Entfernung von Proteinkontaminationen

wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu gibt man 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) hinzu, vortext und zentrifugiert 2 min bei 12.000 g. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der DNA gibt man 2 Volumen EtOH (RT) oder 1 Volumen Isopropanol hinzu und läßt die Probe 2 min bei RT stehen. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 12.000 g wird die DNA sedimentiert, der Überstand wird verworfen. Man wäscht das Sediment mit 70% EtOH und trocknet es für mindestens 10 min an der Luft. Anschließend kann die DNA in 50 (30) µl Tris pH 8 mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen werden. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

3.2.1.3 „Midi“ und „Maxi“ Präparationen von Plasmid-DNA mit dem Nucleobond Kit

Um große Mengen (100-500 µg) DNA zu erhalten, hat sich das Nucleobond AX Kit (Macherey und Nagel, Düren) bewährt, da sich gezeigt hat, daß diese Präparationen nur einen geringen Anteil von chromosomaler, bakterieller DNA als Verunreinigung enthalten. Nach einer modifizierten alkalischen Lyse wird das Lysat gefiltert und dann auf eine Ionenaustauscher Silikatmatrix gegeben, die unter bestimmten pH-Bedingungen die Plasmid-DNA bindet. Nach mehreren Waschschritten kann bei erhöhtem pH-Wert die Plasmid-DNA eluiert werden. Die Fällung erfolgt mit 0,7 Volumen Isopropanol und die Sedimentation für eine halbe Stunde bei 13.000 g. Das Sediment wird einmal mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und dann in 100 bis 200 µl Tris-Cl (pH 8,0) oder H₂O aufgenommen.

3.2.1.4 Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen

Die Zellen werden trypsinisiert und pelletiert. Die Zellen einer 60 mm Schale werden in 3,5 ml Lysis Puffer (60 µl Proteinase K, 7 µl RNase A) resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgt nach Zugabe von 7 ml EtOH (100%, -20°C) und 100 µl 5 M NaCl für 30 min bei Raumtemperatur. Es folgt eine 15-minütige Zentrifugation bei 10.000 g, um die DNA zu sedimentieren. Das Sediment wird einmal mit 70% EtOH gewaschen, dann luftgetrocknet und in 150 µl Tris-Cl (pH 8,0) aufgenommen.

3.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

3.2.2.1 DNA-Minigele

DNA-Minigele wurden für die Auftrennung von PCR-Produkten, gespaltener Plasmid-DNA und aufgereinigten DNA-Fragmenten verwendet. Als Standardlaufpuffer wurde 1 x TBE (0,0089 M Tris/HCl pH 8,0, 0,089 M Borsäure, 20 mM EDTA) verwendet. Die Proben wurden in 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) aufgenommen, und in einer Spur ein geeigneter Längenstandard mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bei 10V/cm. Anschließend wurde das Gel im Ethidiumbromidbad (1µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TBE) gefärbt und unter UV-Licht von 302 nm auf einer Geldokumentationsanlage (Digitalkamera mit Thermoprinter) fotografiert.

3.2.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Zur Größenbestimmung von BACs wurde die PFGE eingesetzt. Dabei wird die Auftrennung besonders großer DNA-Fragmente durch das Anlegen wechselnder elektrischer Felder erleichtert. Für ein Gel werden 100 ml einer 1%-igen „fast lane“ Agarose (in 0,5 x TBE) benötigt. Als Laufpuffer wird ebenfalls 0,5 x TBE verwendet, welches durch eine Kühlung auf einer Temperatur von 14°C gehalten wird. Für eine optimale Auftrennung im Bereich von 3 bis 250 kb wurden mit Hilfe des Programm „Chef Mapper“ folgende Parameter bestimmt: Runtime: 8,3 h; Initial: 0,2 s; Final: 21,8 s; Gradient: 6 V/cm. Als Größenstandards dienten *lamda ladder* und *low range PFGE Marker*.

3.2.3 Southern Blotting (Transfer von DNA auf Nylonmembranen)

Für alle Blottingverfahren wurde die Nylonmembran Biodyne B (Pall, Portsmouth, England) mit Lochgröße 0,45 µm verwendet. Durch die positiv geladene Oberfläche ist sie besonders für den Transfer bzw. die Retention von Nukleinsäuren geeignet. Bei dieser Methode nach Sambrook et al. (1989) erfolgt zunächst eine partielle Depurinierung der DNA-Fragmente durch Inkubation in 2 Gelvolumen 0,25 N HCl (10 min für Minigele, 20 min für große Gele). Dieses induziert Strangbrüche und erleichtert somit den späteren Transfer. Man spült das Gel zweimal mit Wasser, um überschüssige Säure zu entfernen. Anschließend erfolgt ein 30-minütiger Denaturierungsschritt in ebenfalls 2 Gelvolumen 0,5 N NaOH und 1,5 M NaCl.

Standardmäßig wurde ein Kapillarblot durchgeführt. Man füllt eine Schale zur Hälfte mit 20 x SSC, legt eine Glasplatte quer darüber, auf die man eine Flüssigkeitsbrücke aus 3MM-Whatman-Papier ausrollt. Die linke obere Ecke des frisch denaturierten Gels wird zur Markierung abgeschnitten, außerdem werden die Taschen mit einem scharfen Skalpell entfernt. Man positioniert das Gel umgekehrt auf der Flüssigkeitsbrücke und legt ein Stück Nylonmembran in der Größe des Gels luftblasenfrei darauf. Anschließend werden noch 3 Lagen 3MM-Whatmanpapier und ein ca. 10 cm hoher Stapel saugfähigem Papier aufgelegt. Darauf gibt man eine Glasplatte und ein ca. 300 g schweres Gewicht. Der Transfer erfolgt über Nacht. Die getrocknete Membran wird anschließend für 30-60 min bei 80°C gebacken. Die Membran kann trocken in einer Tasche aus 3MM-Whatmann-Papier bei RT aufbewahrt werden.

3.2.4 Radioaktive Hybridisierung

Die Nylonmembranen werden zunächst in 2 x SSC angefeuchtet und mit Hilfe einer Pipette in eine Hybridisierungsröhre eingerollt. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgt eine Prähybridisierung für mindestens 30 min bei 65°C. Dazu wurden pro Filter 10 ml Church-Lösung (7% (w/v) SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 0,5 M NaHPO₄, pH 7,2) verwendet.

Die radioaktiv markierte Sonde wird aufgereinigt und dann denaturiert (100°C für 10 min und 5 min auf Eis), kurz anzentrifugiert und zum Prähybridisierungsansatz hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgt bei 65°C über Nacht.

Unspezifisch gebundene Fragmente werden durch Waschschriffe in aufsteigender Stringenz entfernt. Zwischen den einzelnen Waschschriffen wird die verbleibende Radioaktivität auf den Filtern mit dem Geigerzähler kontrolliert. Zunächst werden die Filter zweimal für 10 min bei RT in 2 x SSC/0,1 % SDS geschüttelt. Anschließend erfolgen die Waschschriffe mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei steigender Temperatur (42°C, 54°C, 65°C). Dann wird ein Röntgenfilm aufgelegt und die Autoradiographie erfolgt für 1 bis 14 Tage bei -70°C.

Vor der erneuten Verwendung von Blots muß die alte Sonde entfernt werden. Dazu gibt man 3 Mal kochendes 0,1 % SDS auf die Filter und schüttelt für je 10 min. Anschließend werden die Membranen in 2 x SSC gespült und können dann getrocknet, in einer Filterpapiertasche, oder feucht, in Haushaltsfolie eingeschlagen, aufbewahrt werden.

3.2.5 Herstellung von radioaktiv markierten DNA Sonden

3.2.5.1 „Random primed“ Methode

Bei der „random primed“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) werden mit ^{32}P markierte Nukleotide während einer nicht-zyklischen Polymerisationsreaktion, bei der ein Hexanukleotidgemisch zufälliger Sequenz als Primer verwendet wird, in den neu entstehenden DNA-Strang eingebaut. Für höchste spezifische Aktivitäten werden 25 bis 100 ng DNA eingesetzt. Die nicht-markierte DNA bleibt im Markierungsansatz zurück und kompetitiert in der Hybridisierung die radioaktiv markierten Fragmente. Die zu markierende DNA wurde entweder durch Restriktionsspaltung des jeweiligen Plasmids und Gelextraktion oder durch eine PCR-Reaktion mit anschließender Aufreinigung gewonnen.

Die DNA wird durch 10 min Erhitzen auf 100°C und schnelles Abkühlen auf Eis denaturiert. Man pipettiert 3 µl CTG-Mix (je 0,5 mM dCTP, dTTP, dGTP) in den Ansatz und gibt dann 2 µl Hexanukleotide-Mix in 10x Klenow-Puffer zu. Anschließend gibt man 1 µl Klenow-Polymerase (2 U, Boehringer Mannheim) zu. Nach Zugabe von 5 µl α -[^{32}P]dATP (spezifische Aktivität 800 Ci/mmol) wird der Ansatz für 30 bis 60 min bei 37°C inkubiert.

3.2.5.2 5'-Markierung von Oligonukleotiden

Die verwendeten Oligonukleotide sollten einen GC-Gehalt von ca. 50% besitzen und auch ungefähr gleich lang sein. Es wurden Oligonukleotide der Länge 21 benutzt.

Ein 12,5 µl Ansatz für ein Oligonukleotid ergibt sich wie folgt:

- 6,0 µl H₂O
- 2,5 µl 5 x Puffer (Boehringer Mannheim)
- 1,0 µl Oligonukleotid (10 pmol/ µl)
- 2,5 µl γ -dATP³² (10 mCi/ ml)
- 0,5 µl T4 Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim)

Der Ansatz wird für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend aufgereinigt. Die spezifische Aktivität wird im Szintillationszähler bestimmt.

Anders als bei Verwendung doppelsträngiger DNA müssen Oligonukleotidsonden nicht denaturiert werden. Abweichend zu 3.2.4. erfolgt die Hybridisierung bei 49°C über Nacht. Die Waschschrte erfolgen mit 6 x SSC, 2 x SSC / 0,05% SDS, 1 x SSC / 0,1 % SDS für je 15 min bei 49°C.

3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR)

In der PCR wird mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase ein gewünschter DNA-Abschnitt *in vitro* amplifiziert. Zu dem gewünschten DNA-Abschnitt muß in jeder Richtung ein Stück flankierende Sequenz bekannt sein, so daß man zwei Oligonukleotide (= Primer) entwerfen kann. Die Primer sind komplementär zu der bekannten Sequenz und dienen als Startermoleküle, da sie ein freies 3'-OH-Ende besitzen, daß von der Polymerase benötigt wird. In der zyklischen Reaktion wird die Matrizen-DNA in die Einzelstränge aufgetrennt, danach findet bei einer primerspezifischen (nach 2 + 4 Regel, für jedes A oder T 2°C, für jedes G oder C 4°C berechnen) Temperatur die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA (*Annealing*) statt, im Polymerisations-Schritt erfolgt dann ausgehend von den Primern die eigentliche Amplifikation.

3.2.6.1 Standard-PCR-Reaktionen

Alle Standard-PCR-Reaktionen wurden mit dem Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Ein 20 µl-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 10 µl Master Mix (enthält 0,5 U Taq DNA-Polymerase, 1 x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und dNTPs, je 200 µM)
- 0,4 µl Primer a (50 pmol/µl),
- 0,4 µl Primer b (50 pmol/µl),
- 7,2 µl H₂O,
- 2 µl DNA (100 ng/µl).

Man pipettiert alle Komponenten zusammen und gibt die DNA nach Möglichkeit als letztes hinzu, um Kreuzkontaminationen zu verhindern.

Im Thermocycler wird dann folgendes Temperaturprofil durchlaufen:

	94°C 5 min
35x	{ 94°C 30 s
	{ 58-68°C 30 s
	{ 72°C 60 s pro 1000 bp
	72°C 5 min
	10°C Pause

3.2.6.2 PCR-Reaktionen mittels „Proof reading DNA Polymerasen“

Taq DNA Polymerasen weisen eine erhebliche Fehlerquote (2×10^{-4} / Base) auf. Mit DNA Polymerasen, die eine 3'-5' Exopolymerase Aktivität (= proof reading Aktivität)

aufweisen, kann eine zehnfache Verbesserung der Genauigkeit erreicht werden. In dieser Arbeit wurde die Pwo DNA Polymerase verwendet.

Um unspezifische Polymerisationsreaktionen während des Pipettierens zu vermeiden, wurden zwei getrennte Mastermixe auf Eis zubereitet:

Mastermix 1:

4 µl dNTPs (10 mM)

0,6 µl Primer a (50 pmol/µl)

0,6 µl Primer b (50 pmol/µl)

14,8 µl H₂O

5 µl BAC-DNA

Mastermix 2:

5 µl 10 x Puffer (100 mM Tris, pH 8,85, 250

mM KCl, 50 mM (NH₄)SO₄, 20 mM MgSO₄)

19,5 µl H₂O

0,5 µl Pwo DNA Polymerase

Die beiden Mastermixe wurden auf Eis vereinigt und sofort danach wurde die Reaktion gestartet:

94°C 2 min

10x { 94°C 15 s
58-68°C 30 s
72°C 120 s

20x { 94°C 15 s
58-68°C 30 s
72°C 120 s + 5 s / Zyklus

72°C 7 min

10°C Pause

3.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.2.7.1 Klassische Klonierung

a) Herstellung und Aufreinigung der zu klonierenden DNA-Fragmente

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden entweder durch eine PCR-Reaktion (s. 3.2.6.2) oder durch Restriktionsverdau aus entsprechenden Plasmiden gewonnen. Dazu wurde die Plasmid-DNA mit dem gewünschten Enzym und 0,1 Volumen des jeweiligen 10 x React Puffers für min. 1 h bei der erforderlichen Temperatur inkubiert. Entstanden bei der Linearisierung eines Vektors kompatible Enden, so wurden diese durch Zugabe von 1 µl SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern.

Die DNA-Fragmente wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gelextraktionskits aufgereinigt. Dazu gibt man 3 Gelvolumen des Puffers QG zu dem Agaroseblöckchen und löst es für 10 min bei 50°C. Diese Lösung wird auf eine Säule gegeben und für 30 sec zentrifugiert. Man wäscht ein Mal mit Puffer QG um sämtliche Agarosereste zu entfernen und ein Mal mit Puffer PE. Die Säule wird durch eine einminütige Zentrifugation getrocknet und die DNA kann dann durch Zugabe von 30 oder 50 µl Elutionspuffer (Tris-HCl, pH 8,0) eluiert werden. Ein Aliquot der aufgereinigten DNA-Fragmente wurde zur Mengenabschätzung zusammen mit einer bekannten Menge eines geeigneten Fragmentlängenstandards auf einem Agarosegel aufgetrennt.

b) Ligation

DNA Fragmente mit komplementären Enden können mit Hilfe der T4 DNA Ligase zusammengefügt werden. Es wurde ein molares Insert:Vektor Verhältnis von ca. 3:1 benutzt, z.B. 150 ng Insert, 50 ng Vektor, wenn die beiden Fragmente ungefähr gleich groß waren. Die DNA wurde in 16 µl H₂O aufgenommen, es wurden 4 µl 5x Ligase Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v) Polyethylenglycol-8000) und 0,1 µl T4 DNA Ligase hinzugefügt. Meist erfolgte die Reaktion bei 16°C über Nacht, alternativ auch 1 h bei RT.

c) Herstellung von elektrokompenten Zellen (XL1-Blue)

Zunächst wird aus der Glyzerinkultur ein Einzelklonausstrich auf einer LB-Tetracyclinplatte vorgenommen. Am folgenden Tag wird aus einem Einzelklon eine Übernachtskultur (3 ml) ohne Antibiotikum angelegt. Diese überimpft man am nächsten Tag in 250 ml LB-Medium wiederum ohne Antibiotikum und läßt diese bis zu einer optischen Dichte (bei 580 nm) von ca. 0,5 (ca. 3-4 h) weiterwachsen.

Bei der Ernte der Zellen kommt es darauf an, diese in eine möglichst salzfreie Lösung zu überführen. Daher müssen alle Waschschrte mit großer Sorgfalt ausgeführt werden. Von nun an sind alle Schritte bei 4°C auszuführen. (Materialien vorher abkühlen!). Die Kultur wird im GS3-Rotor für 15 min bei 6000 rpm geerntet. Man gießt den Überstand ab und zieht auch den Rücklauf vollständig ab. Der Becher wird zweimal mit ca. 20 ml H₂O_{bidest} Ausgewaschen, ohne das Sediment zu lösen. Dann nimmt man das Pellet in 5 ml H₂O_{bidest} auf und füllt mit H₂O_{bidest} auf 250 ml auf. Es folgt eine Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm. Der Überstand muß sofort abgossen werden und das Zellpellet im Rücklauf resuspendiert werden. Man

verteilt die Zellsuspension auf zwei 40 ml-Zentrifugenbecher und fügt jeweils 25 ml 15%-igem Glycerin hinzu. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm im SS34- Rotor zieht man den Überstand vollständig ab und nimmt das Pellet in 1 bis 1,5 ml 15%-igem Glyzerin auf. Danach werden die Zellen in 60 µl-Portionen schockgefroren.

d) Transformation durch Elektroporation

Ein Aliquot kompetenter Zellen (60 µl, s.o.) wird auf Eis aufgetaut. Die Elektroporationsküvetten und der Ligationsansatz sind auf Eis vorzukühlen. Die Pulsereinstellungen für 0,2 cm Küvetten sind: 25 µF, 400 Ω, 2,5 kV. Man gibt 1 bis 2 µl des Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen, läßt die Suspension 1 min auf Eis stehen. Nach dem Elektropuls gibt man rasch 1 ml SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) in die Elektroporationsküvette. Die Zellen werden in ein Eppi überführt und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dann plattiert man unterschiedliche Volumina auf Selektionsmedium aus.

3.2.7.2 Klonierung von PCR Produkten mit TOPO Cloning Kits

Mit dem TOPO TA Cloning Kit können PCR Produkte, die aufgrund der terminalen Transferaseaktivität der DNA-Polymerase einen A-Überhang besitzen, kloniert werden. Für PCR Produkte, die mit einer proof reading DNA Polymerase hergestellt wurden und keinen A-Überhang besitzen, wurde das Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit benutzt. Die beiden Protokolle sind identisch.

Für die Ligation gibt man 0,5 bis 2 µl des PCR-Produkts mit 1 µl pCR-TOPO Vektor, 1 µl einer Salzlösung und sterilem Wasser zu einem Endvolumen von 5 µl zusammen. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur fährt man mit der chemischen Transformationsreaktion fort. Dazu mischt man 2 µl des Ligationsansatzes und ein Aliquot kompetenter Zellen vorsichtig mit einer Pipettenspitze und inkubiert für 5 min auf Eis. Danach führt man einen Hitzeschock bei 42°C für 30 sec aus und bringt die Zellen sofort wieder auf Eis. Anschließend fügt man 250 µl SOC-Medium hinzu und schüttelt für 30 min bei 37°C. 50-100 µl des Transformationsansatzes werden auf LB-Agar mit 150 µg/ml Ampicillin (10 g NaCl, 5 g Hefeextract, 10 g Pepton auf 1 l) und X-Gal (5-Brom-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galaktosid) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C angezogen. Eine erfolgreiche

Klonierung zeigt sich durch weiße Bakterienkolonien. Diese tragen das ligierte Fragment in ihrem Gen für die β -Galaktosidase und können somit das Substrat X-Gal nicht zu dem blauen 5-Brom-4-Chlor-Indigo umsetzen.

3.2.8 Identifikation von positiven Klonen

3.2.8.1 Kolonie-PCR

Mit einer Kolonie-PCR kann man Einzelklone eines Übernacht-Ausstrichs mit spezifischen Primern auf das Vorhandensein eines bestimmten Inserts überprüfen; oder man kann unter Verwendung von Vektorprimern die Größe des Inserts bestimmen.

Man geht genauso vor wie bei der Standard-PCR, nur daß der erste Denaturierungsschritt von 94°C auf 15 min verlängert wird, um die Zellen aufzuschließen. Statt der DNA wird die entsprechende Menge H₂O hinzugegeben. Dann nimmt man z.B. mit einer gelben Spitze einen Einzelklon auf und taucht ihn unter Rühren für einige Sekunden in den PCR-Ansatz.

3.2.8.2 Eckhardt-Lyse

Man streicht die zu analysierenden Einzelklone noch einmal in mehreren kurzen Strichen aus und läßt über Nacht anwachsen.

Für das Gel kocht man 0,8 Agarose in 100 ml 1 x TBE auf. Nachdem die Agarose auf 60°C abgekühlt ist, fügt man 2 ml 10% SDS hinzu und gießt dann das Gel. Zur Vorbereitung der Proben legt man in jedes well einer 96er-Schale 6 μ l TE-Puffer und 4 μ l Probenpuffer vor. Danach nimmt man mit einer sterilen gelben Spitze die Bakterien von der Platte auf und resuspendiert sie in TE- und Probenpuffer. Danach gibt man 20 μ l Eckhardt-Lysispuffer (8% Sucrose, 2% Ficoll, 50 mM Tris pH8, 20 mM EDTA pH8, 2 mg/ml RNase A, 2 mg/ml Lysozym) hinzu und trägt 25 bis 30 μ l aufs Gel auf. Man läßt das Gel zunächst für 30 min bei 1V/cm und dann für 1 bis 2 h bei 5 V/cm laufen. Danach wässert man das Gel für 45 min, um das SDS auszuwaschen und färbt dann in EtBr.

3.3 RNA-Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung aus Geweben (Chomczynski and Sacchi, 1987)

Man verwendet frisches oder schockgefrorenes Gewebe (200 bis 400 mg) und versetzt es mit 1 ml/100 mg Gewebe Denaturierungslösung (4M Guanidinium-Thiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7,0, 0,5% Na-Sarcosyl (v/v), 0,1 M β -Mercaptoethanol). Danach wird die Probe für 1 min im Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert und auf Eis gelagert. Man gibt 1 ml/100 mg Gewebe wassergesättigtes Phenol, 200 μ l/100 mg Gewebe CHCl_3 /Isoamylalkohol (49:1) und 100 μ l/100 mg Gewebe 2 M Na-Acetat pH 4 hinzu und schüttelt die Probe kräftig. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10.000 U/min in der Kühlzentrifuge (4°C) wird die obere, wäßrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Greiner-Röhrchen überführt. Zur Fällung versetzt man die Probe mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol und inkubiert für 15 min bei -70°C. Anschließend erfolgt die Sedimentation der RNA unter gleichen Bedingungen. Man dekantiert den Überstand und resuspendiert das Sediment in 2 ml Denaturierungslösung und verteilt die Probe auf drei Eppendorfgefäße. Nach Zugabe von 700 μ l eiskaltem Isopropanol pro Eppendorfgefäß und 15-minütiger Fällung bei -70°C erfolgt eine Zentrifugation bei 13.000 U/min in der Eppendorfszentrifuge (RT). Anschließend wird das Sediment mit 500 μ l 70 % EtOH gewaschen, der Überstand vollständig abgesaugt und das Sediment luftgetrocknet. Dann können die Proben in 200 μ l DEPC-H₂O aufgenommen und in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei 65°C für ca. 10 min gelöst werden.

3.3.2 Präparation von mRNA mittels magnetischer Kügelchen (Dynabeads)

Für die Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde das Dynabeads mRNA Purification Kit (Dyna, Oslo, Schweden) verwendet. Die Hauptkomponente des Kits sind superparamagnetische Polystyrol-Kügelchen, die 25-er Ketten von Desoxythymidin auf ihrer Oberfläche tragen. Während der Aufreinigung wird die Basenpaarung zwischen dem polyA der mRNA und der oligo dT-Kette der Kügelchen begünstigt, nicht gebundene tRNA und rRNA kann abgewaschen werden. Die Elution erfolgt in einer salzfreien Lösung, in der die dT:dA Hybride destabilisiert werden.

Für die Aufreinigung werden 75 µg RNA in 100 µl H₂O aufgenommen und für 2 min bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. In der Zwischenzeit gibt man 200 µl (entspricht 1 mg) der resuspendierten Dynabeads in ein Eppendorfreaktionsgefäß in dem Magnetständer, nimmt nach 30 s den Überstand ab und wäscht einmal mit 100 µl Binding Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA) und nimmt die Dynabeads in 100 µl Binding Buffer auf. Dann gibt man die denaturierte RNA zu den Dynabeads und führt das Annealing für 5 min bei RT in einem Schüttler aus. Danach trennt man mit Hilfe des magnetischen Ständers den Puffer ab und wäscht zwei Mal mit Washing Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M LiCl, 1 mM EDTA). Zur Elution gibt man 10 bis 20 µl Elution Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5) hinzu und inkubiert für 2 min bei 65°C.

3.3.3 RNA-Minigele

Um die Qualität isolierter RNA abzuschätzen werden RNA-Minigele angefertigt. Die Gelkammern werden zur RNase-Dekontamination für eine halbe Stunde mit 3% H₂O₂ behandelt und danach kurz in DEPC-H₂O gespült. Für ein 1%-iges Gel werden 0,3 g Agarose in 3 ml 10 x MOPS-Puffer (0,2 M 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure pH 7,0, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH 7,0) und 27 ml DEPC-H₂O eingewogen und unter Aufkochen gelöst. Nach der Erstarrung von 30 min wird das Gel mit 1 x MOPS überschichtet.

Die RNA-Proben werden folgendermaßen vorbereitet: 1 bis 2 µg RNA in 9 µl RNA-Probenpuffer (50% Formamid, 10% 10 x MOPS, 0,45% Formaldehyd, 7% Glycerin, 0,5% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Es wird 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei 65°C denaturiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wird die Probe sofort auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt bei 10 V/cm solange bis die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreicht hat. Nach dem Lauf kann das Gel direkt dokumentiert werden.

3.3.4 Große, denaturierende RNA-Gele

Für ein großes RNA-Gel werden 1,25 g Agarose in 12,5 ml 10 x MOPS und 108,8 ml DEPC-H₂O eingewogen und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 50°C gibt man 6,38 ml Formaldehyd hinzu.

Man lyophilisiert 10-20 µg RNA, nimmt die Probe in 20 µl RNA-Probenpuffer auf und gibt 2 µl EtBr (1 mg/ml) zu. Nach 15-30-minütiger Denaturierung bei 65°C und 5-minütiger Inkubation auf Eis trägt man die Probe direkt auf das Gel auf. Der Gellauf erfolgt bei 70 V für 4 h.

3.3.5 Northern Blotting (RNA-Transfer auf Nylonmembranen)

Für das Northern Blotting wurde ein Kapillarblot-Verfahren durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel für eine halbe Stunde in RNase-freiem Wasser gespült und danach der Blot wie unter 3.2.3 beschrieben aufgebaut. Nach dem Transfer über Nacht erfolgte die Fixierung für eine halbe Stunde bei 80°C.

3.3.6 Reverse Transkription mit dem Omniscript RT-Kit

Bei der reversen Transkription (RT) gewinnt man mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (= reverse Transkriptase) aus RNA copy-DNA (cDNA). Diese kann in einer nachfolgenden PCR auf bestimmte Transkripte näher untersucht werden.

Für die RT wurde das Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Für eine Reaktion nimmt man 1 bis 2 µg Gesamt-RNA oder 100 ng mRNA in 10 µl DEPC-H₂O und gibt 10 µl des folgenden Mastermixes hinzu:

- 1 µl Rnasin, 1:4 verdünnt (Promega)
- 0,5 µl polyT-Primer (0,5 µg / µl)
- 2 µl RT-Puffer
- 2 µl dNTPs (5 µM)
- 1 µl Omniscript
- 3,5 µl DEPC-H₂O, zugefügt.

Danach erfolgt eine Inkubation bei 37°C für 60 bis 90 min.

In der PCR wurde in der Regel 1 µl des RT-Reaktionsgemisches eingesetzt.

3.4 Sequenzierung von PCR-Produkten und BAC-Enden

Mit der Sequenzierung von PCR-Produkten und BAC-Enden wurde entweder der hausinterne Sequenzierservice des IIT oder die Firma MWG-Biotech (Ebersbach) beauftragt.

3.5 Berechnung genetischer Abstände

Der Abstand zweier Loci ergibt sich aus der Rekombinationshäufigkeit c , die man aus dem Quotienten der Anzahl der detektierten Rekombinationsereignisse und der betrachteten Meiosen berechnet. Bei einer Rekombination unter 100 Meiosen ist die Rekombinationsrate als 1 cM definiert. 1 cM entspricht bei der Maus ca. 1Mb. Die Standardabweichung S_c ist die Wurzel aus der Varianz der Rekombinationshäufigkeit c geteilt durch die Anzahl der Meiosen n :

$$S_c = \sqrt{c(1-c)/n}.$$

4 ERGEBNISSE

In den ersten beiden Teilen dieser Arbeit werden die Ergebnisse zur physikalischen und genetischen Kartierung von Genen auf dem proximalen Maus Chromosom 11 und dem humanen Chromosom 2p14-15 vorgestellt. Nähere Erläuterungen zu den Kandidatengenen folgen im dritten Abschnitt, wo die Ergebnisse zur Expression und vergleichenden Sequenzierung dargelegt werden.

4.1 Kartierung von Kandidatengenen

4.1.1 Anonyme cDNA *Homoloc-13*

Die anonyme cDNA *Homoloc-13* ging aus dem Maus-EST13 hervor, der wiederum homolog zum humanen EST13 (hEST13) ist. hEST13 wurde von K. Resch (Resch, 2000) auf den humanen YACs A3 und C10 kartiert.

Das 5'-Ende von *Homoloc-13* konnte mit den Primern MEST13.4/MEST13.5 auf den Maus-YACs *Otx1a*, M1 und M2 kartiert werden. Da mit denselben Primern auf den vorhandenen BACs kein Signal erhalten wurde, ließ dies auf eine Lücke im BAC-Contig zwischen *Otx1* und *Mor2* schließen. Die Signale des BAC-Endes 123j24uni auf den zwei BACs 48h20 und 219p17 im distalen Teil des Contigs mußten falsch positiv sein.

Das Durchsuchen der „DTTW“ BAC-Bank mit den o.g. Primern ergab 5 positive BACs: 45m7, 71m17, 193f23, 203o19 und 220e4. Über Endsequenzierungen wurden neue Marker generiert, mit Hilfe derer die neuen BACs an den distalen Teil des vorhandenen Contigs angegliedert werden konnten: 203o19for, 71m17rev, 71m17for, 220e4for. Eine Überlappung mit dem proximalen Teil des Contigs existierte nicht. Beim erneuten Durchsuchen der BAC-Bank mit den am 3'-Ende der *Homoloc-13* cDNA gelegenen Primern MEST13.9/MEST13.10 wurden folgende BACs identifiziert: 4o23, 178p10, 200m2 und 208p2. Über STS/EST-Kartierungen konnte die Überlappung der BACs 178p10 und 208p2 mit dem distalen Teil des Contigs demonstriert werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die cDNA *Homoloc-13* zwischen *Otx1* und *Mor2* kartiert und das BAC-Contig an dieser Stelle geschlossen wurde. Das Contig wird an dieser Stelle durch die cDNA-Sequenz überbrückt, da für die BACs

des 3'- und 5'-Bereichs der cDNA *Homoloc-13* keine Überlappung gezeigt werden konnte (s. Abb. 4.1).

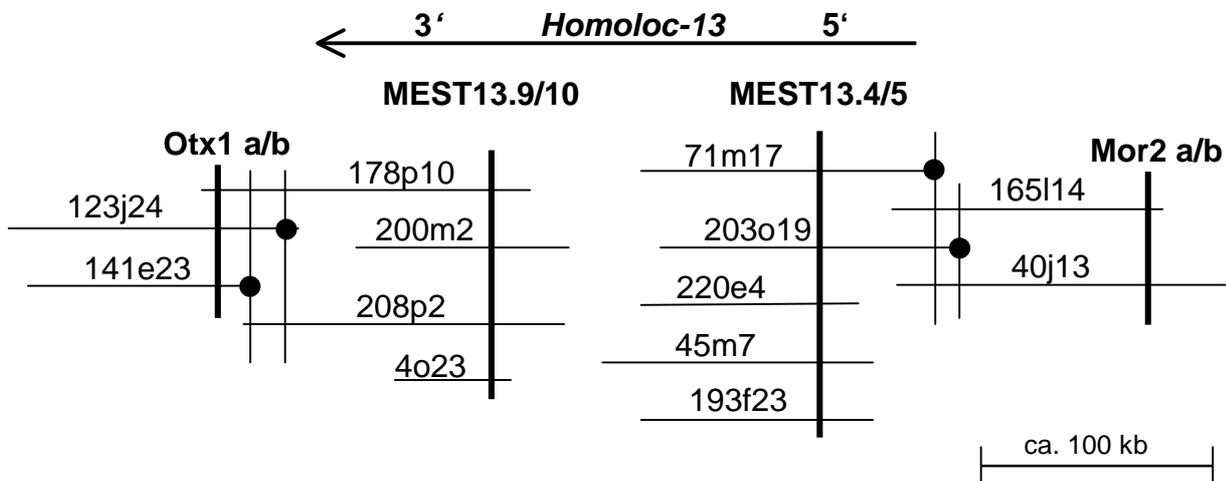


Abb. 4.1: Darstellung des BAC-Contigs im Bereich von *Homoloc-13*
 Jeder Kreuzungspunkt zwischen 2 Linien stellt eine positive Kartierung dar, wobei BAC-Enden durch Punkte symbolisiert sind und die fett gedruckten Linien für die STS-Kartierung eines Gens stehen.

4.1.2 Anonyme cDNA *Kiaa0903*

Das 3'-Ende von *Kiaa0903* wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit mit den Primern A6-300a/b auf den BACs 123j24 und 141e23 kartiert und ebenfalls unabhängig von Karin Resch als humaner EST95. Die Sequenzierung des BACs 123j24 zeigte, daß nur ein Teil der cDNA auf dem BAC vorhanden ist. Der BAC 123j24 stellte auch das proximale Ende des *wr*-kritischen Bereichs dar, es war also keine Überlappung mit den BACs des rekombinanten Bereichs vorhanden.

K. Resch konnte mit dem BAC-Ende 123j24rev neue BACs identifizieren, die auch einen Teil der *Kiaa0903* cDNA (903 5'd/e) tragen: 109l12, 230a12, 150h22, 126p18. Mit den weiter 5' auf der *Kiaa0903* cDNA lokalisierten Primern 9035'j/k wurden die BACs 1d15, 76l14, 126p12 und 238h8 gefunden. Der BAC 209f21 stammt aus einer Suche mit dem BAC-Ende 126p12rev. Mit den am 5'-Ende gelegenen Primern 9035'n/r konnten die BACs 165d7 und 180e24 identifiziert werden, die allerdings keine weiteren Marker tragen. Mit dem BAC-Endemarker 147n22rev wurden die BACs 95i23, 177l23, 227l1 und 238o5 identifiziert.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die gesamte cDNA *Kiaa0903* nun von BACs abgedeckt ist. Dazu sind minimal vier BACs notwendig, bei einer durchschnittlichen Größe von 100 kb ergibt das eine genomische Größe des

Kiaa0903-Gens von 400 kb. Alle *Kiaa0903*-positiven BACs sind in das Contig integriert und mit 209f21 wurde ein BAC gefunden wurde, der das echte Ende des *wr*-kritischen Bereichs darstellt. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich in Abb. 4.2.

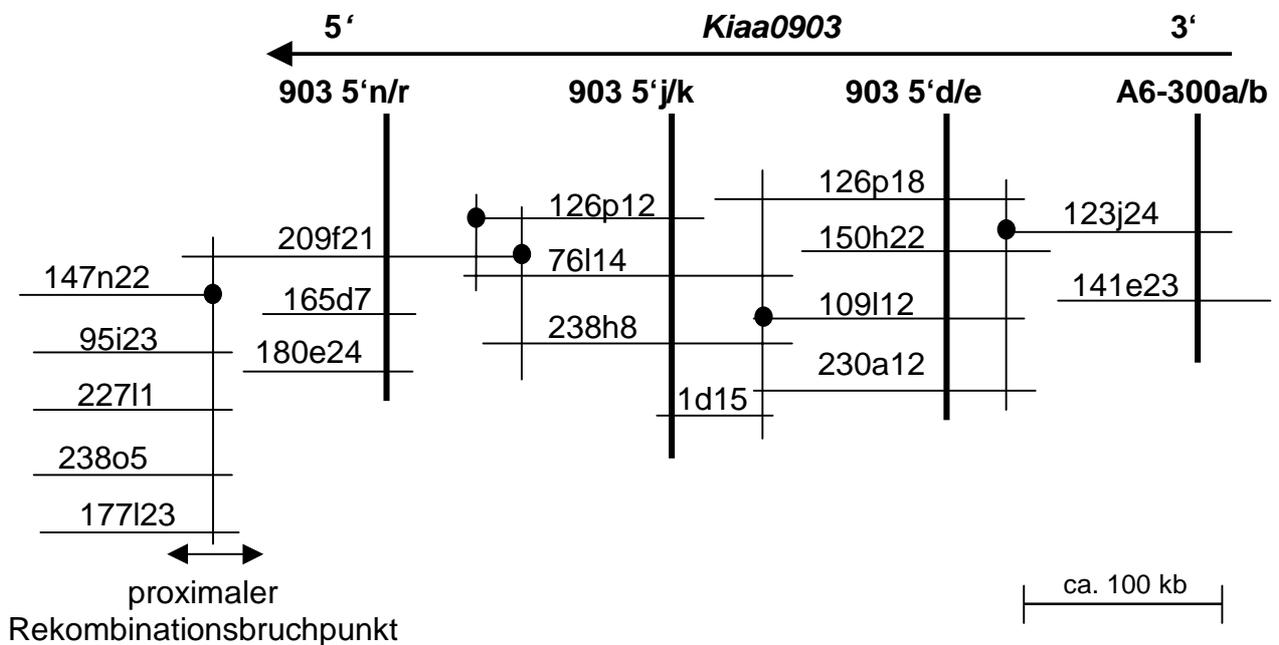


Abb. 4.2: Darstellung des BAC-Contigs im Bereich von *Kiaa0903*

Jeder Kreuzungspunkt zwischen 2 Linien stellt eine positive Kartierung dar, wobei BAC-Enden durch Punkte symbolisiert sind und die fett gedruckten Linien für die STS-Kartierung eines Gens stehen.

4.1.3 Die distale Lücke: Anonyme cDNA *Murr1* und das Gen für die Chaperonin Delta-Untereinheit *Cct4*

Am Beginn dieser Arbeit war der distale Kandidatengenbereich zwischen *Peli1* und *D11Mit19* weder von BACs noch von YACs abgedeckt. Mit *Peli1* ließ sich das Contig nicht ausweiten, denn bei der Suche mit allen zur Verfügung stehenden Enden der *Peli1*-BACs wurden nur die schon bekannten BACs wiedergefunden. Die Schwierigkeit bestand darin, einen geeigneten Marker in der Region zu finden, der möglichst auch in das Contig integrierbar sein sollte. Es standen zwar einige humane Gene zur Verfügung, aber es war nicht klar, wie die Homologen der Maus zum *D11Mit19* liegen. Bei *Murr1* gab es mehrere Hinweise auf die Lokalisation: *Murr1* wurde zusammen mit *Cct4* auf einem YAC kartiert (Nabetani et al., 1997) und von *Cct4* war bekannt, daß es eng gekoppelt aber nicht identisch mit der *wr*-Mutation ist (Schmidt, 1997). Mit Veröffentlichung der humanen Genomsequenz konnte

außerdem festgestellt werden, daß die beiden cDNAs KIAA0903 und MURR1 direkt benachbart sind. Aufgrund der Inversion zwischen Mensch und Maus, konnte man annehmen, daß bei der Maus *Murr1* benachbart zu *Peli1* ist.

Die Lokalisation der humanen cDNA MURR1 erbrachte den YAC G9 im distalen Teil des Contigs (s. Abb. 4.3). Damit kartiert MURR1 auf dem gleichen YAC wie XPO1, PEX13 und CCT4.

Abb. 4.3: Kartierung von MURR1 mit den Primern hMurr1a/b auf dem humanen YAC G9



Wie erwartet war *Murr1* weder auf Maus-YACs oder -BACs zu finden. Die Kartierung mit Bestrahlungshybridzellen zeigte, daß *Murr1* zwischen *D11Mit294* und *D11Mit340* (LOD-score 12,4) lokalisiert ist, wobei sich der *D11Mit340* in der Nähe des *D11Mit19* befindet.

Sie erbrachte folgenden Zahlenvektor:

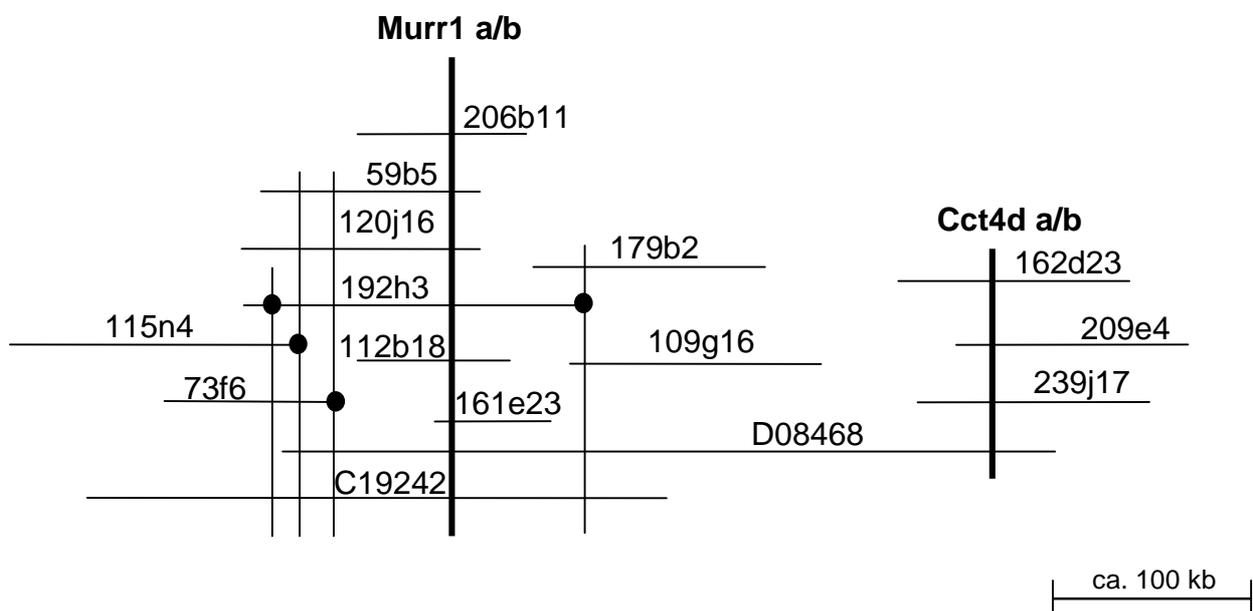
```
00000 01011 00011 01110 00000 10001 00100 01020 10001 00000 01001 10000
00100 01001 10011 11101 20000 00000 01000 01000.
```

Nun wurden mit den Markern *Murr1 a/b*, *192h3rev a/b*, *192h3uni a/b* und *Cct4d a/b* BACs gesucht, um distal zu *Peli1* ein BAC-Contig aufzubauen. Da mit den *Murr1*-positiven BACs weder eine Überlappung zu den *Peli1*-tragenden noch zu den *Cct4*-tragenden BACs nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich die RCPI23 BAC-Bank des IMB Jena durchsucht. Diese BAC-Bank wurde unter Verwendung eines anderen Restriktionsenzym generiert und besteht außerdem aus besonders großen Klonen, so daß sich hier eine neue Chance bot, die Lücke zu schließen. Für die Hybridisierung wurden Oligonukleotid-Proben der folgenden BAC-Enden verwendet: *192h3rev*, *192h3for*, *45m7for* und *124l2rev*. Hierbei ist es gelungen, den BAC *D08468* zu finden, der sowohl *Murr1* als auch *Cct4* trägt. Allerdings konnte kein BAC identifiziert werden, der die Lücke zu *Peli1* überbrückt.

In Tab. 4.1 sind alle gefundenen BACs aufgelistet und in Abb. 4.4 ist das BAC-Contig um die beiden Gene *Murr1* und *Cct4* schematisch dargestellt.

Tab. 4.1: neue BACs des Contigs mit *Murr1* und *Cct4*

Marker	identifizierte BACs
Murr1 a/b	59b5, 112b18, 120j16, 161e23, 192h3, 206b11
192h3rev a/b	109g16, 179b2
192h3uni a/b	73f6, 115n4
Cct4d a/b	162d23, 209e4, 239j17
192h3rev a/b	C19242, D08468
192h3uni a/b	C19242
124l2rev a/b	F1575, O1193, L19146, J12167, E08327, B2331, A1844, L19146, N13161
45m7uni a/b	F1575, O1193, L19146, J12167, E08327

Abb. 4.4: Darstellung des BAC-Contigs um die beiden Gene *Murr1* und *Cct4*.

Jeder Kreuzungspunkt zwischen 2 Linien stellt eine positive Kartierung dar, wobei BAC-Enden durch Punkte symbolisiert sind und die fett gedruckten Linien für die STS-Kartierung eines Gens stehen. Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur eine Auswahl der BAC-End-Marker dargestellt.

4.1.4 Kartierung des Gens Exportin1 (*Xpo1*)

Das Gen XPO1 wurde von K. Resch als hEST12 auf dem humanen YAC G9 kartiert, die Lokalisation des murinen *Xpo1* Gens war jedoch unklar, da es weder auf YACs noch auf BACs der Maus zu finden war.

Für die Kartierung mit Bestrahlungshybridzellen wurden die Primer CRM1 a/b in zwischen Maus und Mensch unähnliche Bereiche gelegt (s. Abb. 4.5). Bei der Maus

wurde das erwartete Signal von 300 bp detektiert, während auf Hamster-DNA kein Signal auftrat.

```

              CRM1 a →
296      tcttgtaggatgaggggaatgcagatttaagggagattagccacatagtcttgaataaacatt 355
          |||||  |||||  ||  ||  |||||  |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||
109623   tcttgtaggtgaggggaaggccgacttaaggagattagccacatattcctgaagaaagatt 109682

356      tggttgttaactggatttccaggatttagtgggtgacttatttttcccttcttcaacccaaa 415
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
109683   tggttgttaactggatttccaggatttaatgatgtacttatttttcccttcttcaacccaaa 109742

416      ttaaacatatatgcaagaattgatgcatgcattgtagacctg 458
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
109743   ttaaacatatatgcaagaattgatgcatgcattgttaaacctg 109785

              ← CRM1 b
458      gcagtatgtgaagtgtctgtttacaacagagaaaatatgctgaaagaatatcacaaaaataa 517
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
110202   gcagtatgtgaagtgtctgtcacacaacagaaaagatatgctggagaatatcacaaaaataa 110261

```

Abb. 4.5: Partielles Alignment eines Maus cDNA Klons (oben, Acc.-Nr. AA792873.1) und eines humanen BACs (unten, Acc.-Nr. AC016727). Die Primer sind fett gedruckt.

Es ergab sich folgender Zahlenvektor:

00001 11010 00010 01111 00000 00001 00100 11010 10001 00000 01001 10001
10100 01001 10011 11101 11001 10000 01000 01001.

Die Daten wurden an das Jackson Laboratory übermittelt und die Berechnung zeigte, daß *Xpo1* zwischen den Mikrosatellitenmarkern *D11Mit340* und *D11Mit152* lokalisiert ist. Die Kopplung zum *D11Mit152* hat einen LOD-score von 18,9. Durch die RH-Kartierung wurde *Xpo1* also außerhalb der Kandidatengenregion lokalisiert.

4.1.5 Kartierung des Gens Peroxisomales Membranprotein (*Pex13*)

Das Gen PEX13 ist von K. Resch als hEST61 auf dem humanen YAC G9 kartiert worden, die Lokalisation des homologen *Pex13* blieb jedoch unklar, da es auf dem Maus-Contig nicht zu finden war.

Die RH-Kartierung des Gens *Pex13* mit den Primern m61a/b ergab folgenden Zahlenvektor:

00001 01011 00110 01101 00000 00021 00102 11110 10001 01100 01001 10001
10100 01001 10011 11101 01000 00000 01000 00001.

Die Daten wurden an das Jackson Laboratory übermittelt und die Berechnung zeigte, daß *Pex13* zwischen den Mikrosatellitenmarkern *D11Mit340* (LOD-score 15,6) und

D11Mit152 (LOD-score 12,2) lokalisiert ist. Damit wurde auch *Pex13* durch RH-Kartierung außerhalb der Kandidatengenregion lokalisiert.

4.1.6 Kartierung der cDNA *Hspc159*

Die humane cDNA HSPC159 (Acc.-Nr. AF161508) wurde aus CD34-positiven hematopoietischen Stammzellen kloniert (Zhang et al., 2000). Im Zuge des humanen Genomprojekts wurde HSPC159 in die *wr*-homologe Region kartiert.

HSPC159 konnte daraufhin im proximalen Teil des humanen YAC-Contigs (YAC G12) lokalisiert werden (s. Abb. 4.6 b). Die murine cDNA *Hspc159* wurde auf dem YAC 343a und auf den BACs 147n22, 135b4, 61h18, 66e5 und 1c2 kartiert (s. Abb. 4.6 a) und liegt damit proximal angrenzend, aber außerhalb der *wr*-Region.

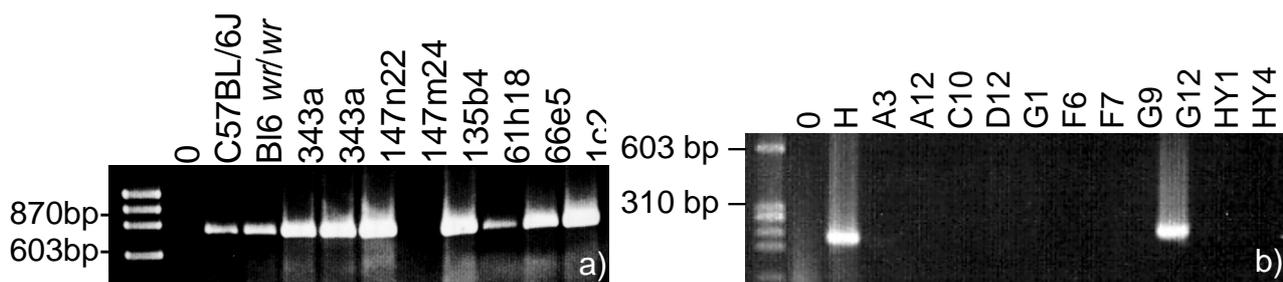


Abb. 4.6: Kartierung von *Hspc159*/*HSPC159* bei Maus und Mensch
 a) positive Signale auf dem Maus-YAC 343a und mehreren BACs mit dem Primerpaar *Hspc159* a/b
 b) positives Signal auf dem humanen YAC G12 mit dem Primerpaar *HSPC159* c/d
 0= Negativ-Kontrolle, H= humane DNA

4.1.7 Kartierung des Gens *Endozepine-like Peptide (Elp)*

Das Gen *Elp* kodiert für eine testis-spezifische Isoform des Acyl-CoA-Bindeproteins und wird bei der Maus in den späten Stadien der Spermienentwicklung exprimiert (Valentin et al., 2000).

Das humane ELP Gen wurde im Zuge des humanen Genomprojekts im *golden path* in der *wr*-homologen Region in der Nähe von OTX1 lokalisiert.

Bei der Kartierung auf dem humanen YAC-Contig zeigten die YACs A3 und C10 positive Signale. Das Maus *Elp*-Gen sollte damit mitten in der Kandidatengenregion liegen, es konnte aber weder auf YACs noch auf BACs gefunden werden. Die RH-Kartierung zeigte, daß das murine *Elp* zwischen den Mikrosatellitenmarkern *D11Mit7*

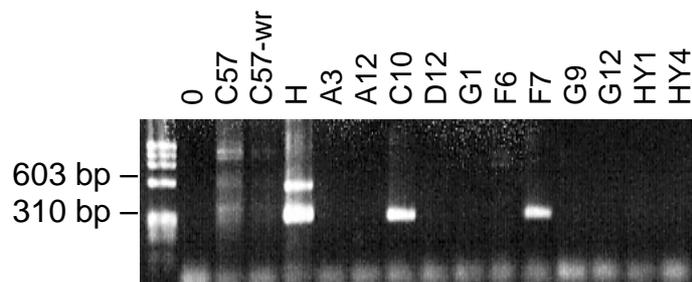
(LOD-score 12,6) und *D11Mit245* bei 44 cM lokalisiert ist. Damit liegt es weit entfernt von *wr*-kritischen Region in einer Bereich, der syntän zum humanen Chromosom 17 ist.

Zahlenvektor: 00100 00011 00101 00001 00000 00001 00000 00010 00110 00000
00000 00000 00000 01010 00100 01000 00100 00000 01100 00001

4.1.8 *Px19*

Die humane cDNA *px-19-like protein* (PX19) wurde bei der Suche mit BAC-Sequenzen in der EST-Datenbank gefunden. Sie konnte auf dem humanen YAC-Contig in die Nähe von MDH1 kartiert werden (s. Abb. 4.7), allerdings konnte auf Maus-DNA kein Signal erhalten werden.

Abb. 4.7: Kartierung von PX19 auf den humanen YACs C10 und F7
0= Negativ-Kontrolle,
H= humane DNA



Erstmals beschrieben wurde PX19 im Hühnchen, als cDNA-Klon, der für ein Protein mit einem LEA (*late embryogenesis abundant*)-Motiv kodiert (Niu et al., 1996). Im Hühnchen-Embryo konnte die Expression in den sich entwickelnden Blutzellen nachgewiesen werden.

Bei einer Suche im humanen Genom wurden mehrere intronlose Kopien detektiert, z.B. auf den Chromosomen 1, 2, 6 und 8. Auch bei der Maus konnten zwei Kopien auf den Chromosomen 1 und 4 gefunden werden, allerdings keine auf Chromosom 11, obwohl dieser Bereich von BAC-Sequenzen abgedeckt ist. Damit scheidet *Px19* als Kandidatengen für die *wr*-Mutation aus. Die PX19-Kopie auf Chromosom 2 ist nicht identisch mit der PX19-cDNA-Sequenz (97% Identität), enthält aber einen offenen Leserahmen, der für ein Protein von fast identischer Größe kodiert (218 vs. 219 aa). Im Vergleich zur PX19-cDNA ist die genomische Sequenz trunziert: der 3'-UTR fehlt größtenteils, es ist aber ein polyA vorhanden. Es konnte außerdem kein humaner EST gefunden werden, der zu der Chromosom 2-Kopie paßt. Zusammen

genommen könnte dies bedeuten, daß es sich bei PX19 auf Chromosom 2 um ein Pseudogen handelt, welches durch die Integration eines alternativ polyadenylierten Transkripts entstanden ist.

4.1.9 Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse

In Abb. 4.8 sind die Kartierungsergebnisse zusammenfassend dargestellt. Die Gene *Xpo1*, *Pex13* und *Elp* und die cDNA *Murr1* wurden RH-kartiert. Für die cDNAs *Kiaa0903*, *Homoloc-13*, *Murr1* und für das Gen *Cct4* wurden BAC-Contigs erstellt und die cDNA *Hspc159* konnte physikalisch kartiert werden. Die *wr*-kritische Region ist durch die rekombinanten Marker *147n22rev* und *D11Mit19* definiert, so daß die Gene *Hspc159*, *Xpo1*, *Pex13* und *Elp* aufgrund ihrer Kartierung als Kandidaten für die *wr*-Mutation ausscheiden.

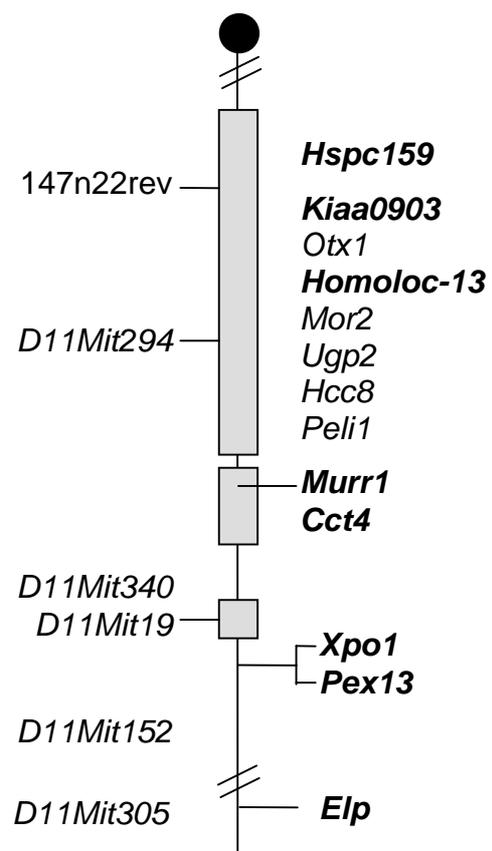
Abb. 4.8: Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse:

Die in dieser Arbeit kartierten Gene sind fett hervorgehoben.

Die grauen Rechtecke stellen die BAC-Contigs auf dem proximalen Maus Chromosom 11 dar.

Auf der linken Seite ist die Lage der Mikrosatelliten und des rekombinanten Markers *147n22rev* angedeutet, ein Strich ausgehend vom Markersymbol bedeutet, daß er physikalisch kartiert ist.

Auf der rechten Seite ist die Lage der Gene dargestellt, wobei ein Strich die RH-Kartierung darstellen soll.



Maus Chromosom 11

4.2 Detektion von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen zwischen den Maus-Stämmen C57BL/6J und Cast/Ei

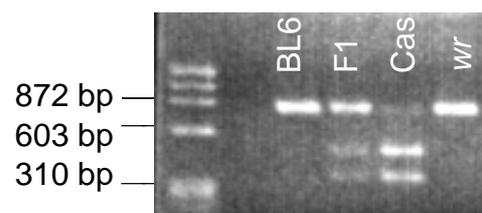
Im folgenden Abschnitt wird die Detektion von drei Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs) zwischen den Maus-Stämmen C57BL/6J und Cast/Ei und die Segregationsanalyse der Loci beschrieben. Das Ziel dabei war, Rekombinationen zu finden, die die *wr*-kritische Region verkleinern.

Am Beginn dieser Arbeit wurde der rekombinante Marker 147n22rev von M. Ulbrich in seiner Diplomarbeit im Abstand von 0,16 cM +/- 0,11 cM zum *D11Mit294* kartiert. Distal lag der Mikrosatellit *D11Mit19* mit einem Abstand zum *D11Mit294* von 0,95 cM +/- 0,8 cM vor. Eine weitere Einengung der *wr*-kritischen Region im distalen Bereich wurde durch die Lücke im Contig bzw. die fehlenden polymorphen Marker verhindert. Durch die Kartierung von *Murr1* bestand nun die Möglichkeit, einen neuen polymorphen Marker in der Region zu etablieren. Durch das von M. Ulbrich und M. Ronsiek durchgeführte F2-F3-Rekombinationsscreening steht DNA von 38 Tieren mit Rekombinationen zum *D11Mit19* zur Verfügung, die auf den Allelstatus am *Murr1*-Locus getestet werden konnte.

4.2.1 Detektion eines RFLP in einem Intron von *Kiaa0903*

Mit den Primern 9035'd/e wurde ein 780 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *Pst*I zeigte sich, daß C57BL/6J-DNA keine Schnittstelle besitzt. Castaneus-DNA wird in zwei Fragmente von ca. 430 bp und 350 bp geschnitten (s. Abb. 4.9). In der Segregationsanalyse des 9035'd/e Amplifikats konnte kein Unterschied zum Mikrosatelliten *D11Mit294* festgestellt werden.

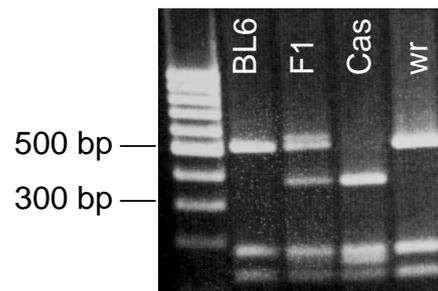
Abb. 4.9: *Pst*I-Spaltung des 9035'd/e PCR-Produkts
BL6 = C57BL/6J DNA, F1 = DNA eines
heterozygoten Tieres, Cas = Castaneus-DNA



4.2.2 Detektion eines RFLP im ersten Intron von *Peli1*

Mit den Primern pli1b/pli1intronb wurde ein 812 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *RsaI* entstehen bei C57BL/6J drei Fragmente von 122 bp, 173 bp und 517 bp Länge. Bei Castaneus-DNA besitzt das 517 bp Fragment eine zusätzliche Schnittstelle, so daß es in zwei Fragmente von ca. 375 bp und 160 bp zerfällt (s. Abb. 4.10). Die Allelverteilung am *Peli1*-Locus entsprach in Fällen der am Mikrosatelliten *D11Mit294*.

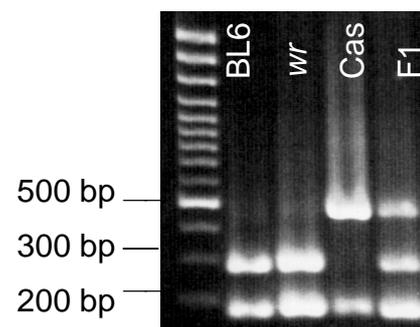
Abb. 4.10: *RsaI*-Spaltung des pli1b/pli1intronb PCR-Produkts
BL6 = C57BL/6J DNA, F1 = DNA eines heterozygoten Tieres, Cas = Castaneus-DNA



4.2.3 Detektion eines RFLP in einem Intron der cDNA *Murr1*

Mit den Primern Murr1d/e wurde ein ca. 630 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *HaeIII* entstehen bei C57BL/6J-DNA drei Fragmente von ca. 170 bp, 180 bp und 280 bp Länge, bei Castaneus-DNA ist eine Schnittstelle weniger vorhanden, so daß ein 450 bp und ein 180 bp Fragment entstehen (s. Abb. 4.11).

Abb. 4.11: *HaeIII*-Spaltung des Murr1d/e PCR-Produkts
BL6 = C57BL/6J-DNA, F1 = DNA eines heterozygoten Tieres, Cas = Castaneus-DNA



4.2.4 Detektion von Rekombinationen mit Hilfe des RFLP im Intron von *Murr1*

Alle 38 Tiere, die eine Rekombination zum *D11Mit19* zeigten, wurden auf ihren Allelstatus im Intron von *Murr1* getestet. Es wurden drei Wildtypen gefunden, die einen homozygot C57BL/6J Allelstatus hatten. Außerdem wurde ein WT gefunden,

der heterozygot am *Murr1*-Locus war, aber keine WR-Nachkommen hervorbrachte. Damit scheidet *Murr1* als Kandidat für die *wr*-Mutation aus.

Den vier Rekombinationsereignissen liegen 1577 getestete Meiosen zu Grunde. Der genetische Abstand zwischen dem Mikrosatelliten *D11Mit294* und *Murr1* beträgt demnach $0,25 \text{ cM} \pm 0,12 \text{ cM}$. Im Vergleich zum *D11Mit19* mit einem Abstand von $2,4 \text{ cM} \pm 0,38 \text{ cM}$ zum *D11Mit294* konnte der Kandidatengenbereich um $2,15 \text{ cM}$ verkleinert werden. Die neue *wr*-kritische Region ist in Abb. 4.12 dargestellt.

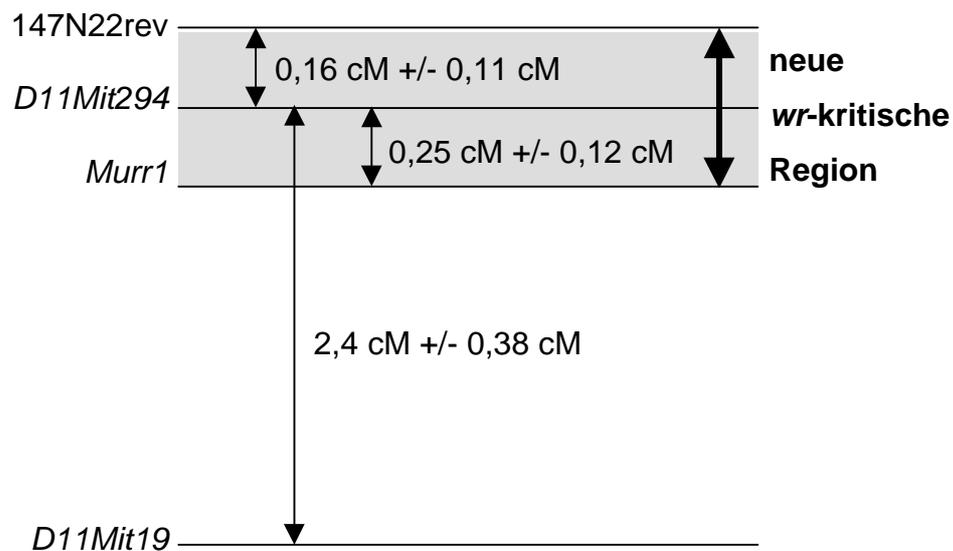


Abb. 4.12: Zusammenfassende Darstellung der alten und neuen *wr*-kritischen Region. Erklärungen im Text; die Abstände sind nicht proportional dargestellt.

4.3 Charakterisierung der Kandidatengene

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu der Kandidatengenanalyse vorgestellt. Dazu wird in den einzelnen Abschnitten zunächst kurz erklärt, welche Daten zu Beginn der Arbeit vorhanden waren. Dann folgt die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Kandidatengene mit vergleichenden Sequenzdaten und Expressionsanalyse. Bei der Amplifikation von RT-PCR-Produkten für die direkte Sequenzierung wurde stets Testis-cDNA verwendet, da ein mutiertes Transkript in diesem betroffenen Gewebe vorkommen sollte.

4.3.1 Das Gen für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase *Mor2*

Das Gen für die cytoplasmatische Malatdehydrogenase *Mor2* wurde von D. Korthaus in der *wr*-Region lokalisiert (Korthaus, 1996). In Enzymtests konnte kein Unterschied in der Protein-Aktivität zwischen WT und WR festgestellt werden (Korthaus et al., 1996). Die cDNA-Sequenz und die Exon-Intron Struktur sind bekannt (Joh et al., 1987; Setoyama et al., 1988).

4.3.1.1 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens *Mor2*

Die kodierende Region des Gens *Mor2* wurde in fünf überlappenden Fragmenten amplifiziert und direkt sequenziert (Sequenzen s. Anhang). Die Primerkombinationen mit denen die cDNA Fragmente erzeugt wurden, sowie die Sequenzierprimer sind in Tab. 4.2 zusammengefaßt.

Die dann folgenden Sequenzalignments zwischen WT und WR zeigen, daß die Sequenzen zu 100% identisch sind. Der Überlappungsbereich der Fragmente ist schattiert dargestellt; Start- und Stopcodon sind fett gedruckt.

Tab. 4.2: cDNA-Fragmente und Sequenzierprimer für die vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des *Mor2*-Gens

	cDNA-Fragment	Sequenzierprimer
1.)	mor2 5'/ mor2 f	mor2 f
2.)	mor2 e/ mor2 h	mor2 h, mor2 e
3.)	mor2 g/ mor2 b	mor2 b
4.)	mor2 c/ mor2 Int8b	mor2 c, mor2 Int8b
5.)	mor2 int8a/ mor2 3'	mor2 3'

```

WT : 1      gctgtagaggtgacctgactgctggagactgccttttgaggtgcagagatcggccttgc 60
           |||
WR : 1      gctgtagaggtgacctgactgctggagactgccttttgaggtgcagagatcggccttgc 60

           Fragment 1
WT : 61      agtttgcaataatgtctgaaccaatcagagtccttgtgactggagcagctggtcaaattg 120
           |||
WR : 61      agtttgcaataatgtctgaaccaatcagagtccttgtgactggagcagctggtcaaattg 120

WT : 121     catattcactggtgtacagtattggaaatggatctgtctttgggaaagaccagccatca 180
           |||
WR : 121     catattcactggtgtacagtattggaaatggatctgtctttgggaaagaccagccatca 180

WT : 181     ttcttgtgctggttggacatcacccccatgatgggtgttctggacggtgtcctgatggaac 240
           |||
WR : 181     ttcttgtgctggttggacatcacccccatgatgggtgttctggacggtgtcctgatggaac 240

WT : 241     tgcaagactgtgcccttccccttctgcaggatgtcattgcaacggacaaagaagagattg 300
           |||
WR : 241     tgcaagactgtgcccttccccttctgcaggatgtcattgcaacggacaaagaagagattg 300

           Fragment 2
WT : 301     ccttcaaagacctggatgtggctgtcctagtgggctccatgccaagaagggaaaggcatgg 360
           |||
WR : 301     ccttcaaagacctggatgtggctgtcctagtgggctccatgccaagaagggaaaggcatgg 360

WT : 361     agaggaaggacctactgaaagccaatgtgaaaatcttcaaatcccagggcacagccttgg 420
           |||
WR : 361     agaggaaggacctactgaaagccaatgtgaaaatcttcaaatcccagggcacagccttgg 420

WT : 421     agaaatacgccaagaaatcagttaaggtcattgttgggaaaccagccaatacgaact 480
           |||
WR : 421     agaaatacgccaagaaatcagttaaggtcattgttgggaaaccagccaatacgaact 480

WT : 481     gcctgacagcctccaagtcagcgcacatcgatccccaaggagaatttcagttgctgactc 540
           |||
WR : 481     gcctgacagcctccaagtcagcgcacatcgatccccaaggagaatttcagttgctgactc 540

           Fragment 3
WT : 541     gcttggaccacaaccgagcaaaatctcaaattgctcttaaactcgggtgtaaccgctgatg 600
           |||
WR : 541     gcttggaccacaaccgagcaaaatctcaaattgctcttaaactcgggtgtaaccgctgatg 600

WT : 601     atgtaaagaatgtcattatctggggaaatcattcatcgaccagatccagatgtcaatc 660
           |||
WR : 601     atgtaaagaatgtcattatctggggaaatcattcatcgaccagatccagatgtcaatc 660

WT : 661     atgccaaggtgaaactgcaaggaaaggaagtcggtgtgtatgaagccctgaaagacgaca 720
           |||
WR : 661     atgccaaggtgaaactgcaaggaaaggaagtcggtgtgtatgaagccctgaaagacgaca 720

WT : 721     gctggctgaagggagagttcatcacgaactgtgcaacagcgtggtgctgctgtcatcaagg 780
           |||
WR : 721     gctggctgaagggagagttcatcacgaactgtgcaacagcgtggtgctgctgtcatcaagg 780

WT : 781     ctcggaagctgtccagtgcaatgtctgctgcaagccatcgagaccacatcagagaca 840
           |||
WR : 781     ctcggaagctgtccagtgcaatgtctgctgcaagccatcgagaccacatcagagaca 840

           Fragment 4
WT : 841     tctggtttggaaacccagagggagagttcgtgtcgatgggtgttatctctgatggcaact 900
           |||
WR : 841     tctggtttggaaacccagagggagagttcgtgtcgatgggtgttatctctgatggcaact 900

WT : 901     cctatggtgtccctgatgacctgctctactcattccctgtcgtgatcaagaataagacct 960
           |||
WR : 901     cctatggtgtccctgatgacctgctctactcattccctgtcgtgatcaagaataagacct 960

```

```

WT : 961  ggaagtttggtgaaggcctccccattaatgacttctcccgtgaaaagatggacctgacag 1020
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WR : 961  ggaagtttggtgaaggcctccccattaatgacttctcccgtgaaaagatggacctgacag 1020
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
                                     Fragment 5
WT : 1021  caaaggagctgaccgaggaaaaggagaccgcttttgagtttctctcctctgcgtgactag 1080
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WR : 1021  caaaggagctgaccgaggaaaaggagaccgcttttgagtttctctcctctgcgtgactag 1080
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WT : 1081  acactcgttttgacatcagcagacagccgaaggctgaggaatcaaaatgtcgtctttgag 1140
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WR : 1081  acactcgttttgacatcagcagacagccgaaggctgaggaatcaaaatgtcgtctttgag 1140
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WT : 1141  cctagtaccaaacagtaataatgctacattcaaattgtgaacagcaaaatattactaaac 1200
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
WR : 1141  cctagtaccaaacagtaataatgctacattcaaattgtgaacagcaaaatattactaaac 1200
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WT : 1201  tagtgtgtgctttatga 1217
          ||||||||||||||||
WR : 1201  tagtgtgtgctttatga 1217
  
```

4.3.2. Das Gen für das Homöoboxprotein *Otx1*

Das Gen *Otx1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in der Gehirnentwicklung eine Rolle spielt. Die Proteinsequenz ist veröffentlicht worden (Simeone et al., 1993), von der cDNA-Sequenz standen nur 2 Fragmente aus dem 5' und 3' UTR zur Verfügung (Acampora et al., 1996; DeGregorio et al., 1996). In den EST Datenbanken ist das *Otx1*-Gen kaum vertreten.

4.3.2.1 cDNA und Exon-Intron Struktur

Die Analyse der Sequenzdaten des BACs 123j24 ergab die genomische und cDNA Sequenz des *Otx1*-Gens. Die genomische Sequenz wurde unter der Acc.-Nr. AF424700 veröffentlicht. Das *Otx1*-Gen ist ein kleines Gen mit einem kodierenden Bereich von 1065 bp, der sich auf drei Exons verteilt (s. Abb. 4.13). Die Homöobox wird fast vollständig von Exon 2 kodiert, ein kleiner Teil befindet sich in Exon 3.

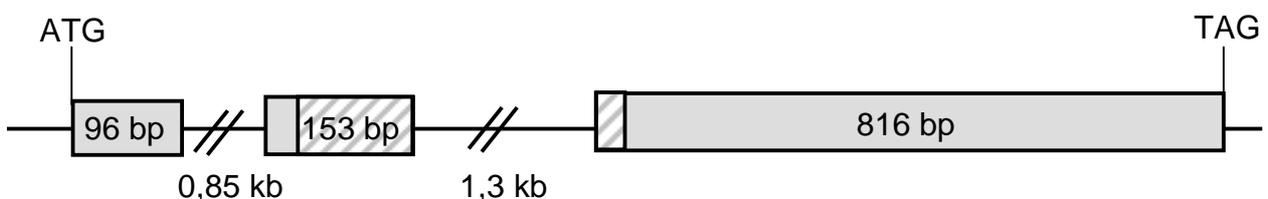
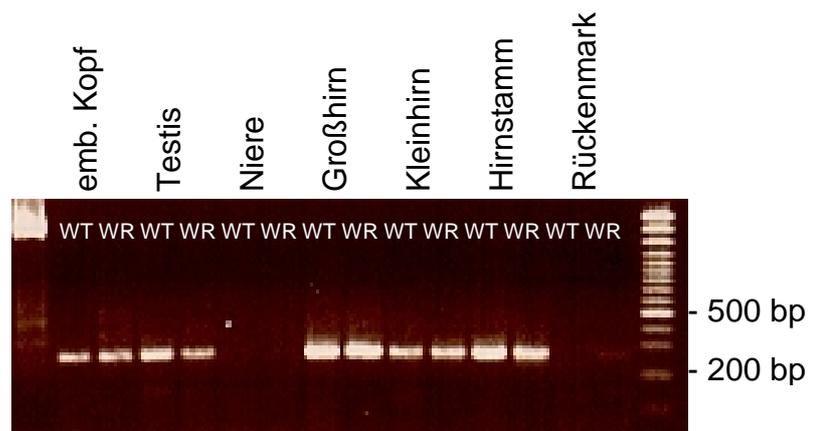


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der genomischen Struktur der kodierenden Region des *Otx1*-Gens. Die Homöobox ist schraffiert hervorgehoben.

4.3.2.2 Expressionsanalyse des *Otx1*-Gens

In den Geweben Testis, Großhirn, Hirnstamm und Kleinhirn konnte eine Expression nachgewiesen werden, wobei kein Unterschied zwischen WR und WT festzustellen war (s. Abb. 4.14). Die Expression im Rückenmark ist sehr schwach. In den anderen Geweben ist sie mit der im embryonalen Kopf (Tag 13) zu vergleichen. Für die Expressionsanalyse wurden Primer aus dem ersten und dritten Exon verwendet, die ein 269 bp cDNA-Fragment, aber ein 2,2 kb genomisches Fragment amplifizieren.

Abb. 4.14:
Expressionsanalyse des
Otx1 Gens:
RT-PCR mit den Primern
Otx1.2/Otx1.7



4.3.2.3 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des Gens *Otx1*

Die drei Exons des *Otx1*-Gens wurden mit intronständigen Primern amplifiziert und direkt sequenziert (Sequenzen s. Anhang). Dabei wurde kein Sequenzunterschied zwischen WT und WR festgestellt. In Tab. 4.3 sind die PCR-Fragmente mit den Sequenzierprimern angegeben und in den folgenden Sequenzalignments sind die Exons fett hervorgehoben.

Tab. 4.3: PCR-Fragmente und Sequenzierprimer für die vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region des *Otx1*-Gens

	PCR Fragment	Sequenzierprimer
1.) Exon 1	Otx1.555a/Otx1.Int1a	Otx1.2, Otx1.Int1a
2.) Exon 2	Otx1.Ex2a/Otx1.Ex2b	Otx1.Ex2a, Otx1.Ex2b
3.) Exon 3	Otx1.Int2c/Otx1.231b	Otx1.Int2c, Otx1.7, Otx1.8, Otx1.3, Otx1.231b

Exon 1:

WT : 1 ctaaaagaggaaggaacgatgtgggaaaagtttactttcctgagaagctgtgtagctgcc 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 131 ctaaaagaggaaggaacgatgtgggaaaagtttactttcctgagaagctgtgtagctgcc 190
 WT : 61 gagctaaaggagaagacgtttctcggattgcctgctgtgagcttccctagcacgcgcccc 120
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 191 gagctaaaggagaagacgtttctcggattgcctgctgtgagcttccctagcacgcgcccc 250
 WT : 121 tccccattcaaggattagaggagctgaaagccaaactgactgcggggtgaaggtttccatg 180
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 251 tccccattcaaggattagaggagctgaaagccaaactgactgcggggtgaaggtttccatg 310
 WT : 181 tgtctgctgtctccntaggccaggccccccagaagcaacagcttgaaggacttgcagtg 240
 |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 311 tgtctgctgtctccctaggccaggccccccagaagcaacagcttgaaggacttgcagtg 370
 WT : 241 gagccctgaactgctcctggcctcaggccccctggatccgctcggggcacctccaccggc 300
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 371 gagccctgaactgctcctggcctcaggccccctggatccgctcggggcacctccaccggc 430
 WT : 301 **tgtagcatgatgtcttacctcaacaacccccatacggcatgaacgggctgggcctagc** 360
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 431 **tgtagcatgatgtcttacctcaacaacccccatacggcatgaacgggctgggcctagc** 490
 WT : 361 **tgccctgcatggacctcctgcacccctccgtgggctaccctggtgagcagtgccctc** 420
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 491 **tgccctgcatggacctcctgcacccctccgtgggctaccctggtgagcagtgccctc** 550
 WT : 421 tgcccctaccctcaaacctctgtaaatattgggggattccatcctctacagtttga 476
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 551 tgcccctaccctcaaacctctgtaaatattgggggattccatcctctacagtttga 606

Exon 2:

WT : 1 ctagcaccagtccttgtgggtccaccgctgactccaggcgctctcgcatgtcccctcagcc 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 1 ctagcaccagtccttgtgggtccaccgctgactccaggcgctctcgcatgtcccctcagcc 60
 WT : 61 **accccgcggaagcagcgacgggagcgcaccaccttcacgcgctcacagctggacgtgctc** 120
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 61 **accccgcggaagcagcgacgggagcgcaccaccttcacgcgctcacagctggacgtgctc** 120
 WT : 121 **gaggcgctgttcgcaaagactcgctaccagacatcttcatgcgcgaggaggtggcactc** 180
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 121 **gaggcgctgttcgcaaagactcgctaccagacatcttcatgcgcgaggaggtggcactc** 180
 WT : 181 **aagatcaacctgccagagtccagagtccagggtgcgcgctcctggggctctaggggtaggg** 240
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 181 **aagatcaacctgccagagtccagagtccagggtgcgcgctcctggggctctaggggtaggg** 240
 WT : 241 tagggacgcaggaaccggctctggaaagatctggcctaggctgtctgatg 289
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 241 tagggacgcaggaaccggctctggaaagatctggcctaggctgtctgatg 289

Exon 3:

WT : 1 tagctccactagccagccccctgatccccctctccttcaccctgctcactgtaggtttgg 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 1 tagctccactagccagccccctgatccccctctccttcaccctgctcactgtaggtttgg 60

4.3.3. Anonyme cDNA *Homoloc-13*

Die anonyme cDNA *Homoloc-13*, deren cDNA-Sequenz in dieser Arbeit etabliert wurde, ist homolog zum humanen cDNA-Klon LOC51057 (Acc.-Nr. NM_015910), der für ein hypothetisches Protein kodiert. Unter NM_015910 findet man nur den kodierenden Teil der cDNA, diese Acc.-Nr. ersetzte die Acc.-Nr. AF131737, unter der noch zusätzliche Sequenzen im 5'- und 3'-UTR zu finden waren. Der humane cDNA-Klon wurde aus kindlichem Hirngewebe isoliert. Es gibt weder für das humane noch das Mausprotein experimentelle Hinweise auf seine Funktion.

4.3.3.1 Etablierung der cDNA- und Proteinsequenz

Zur Suche nach relevanten Mausequenzen wurde der humane cDNA-Klon AF131737 verwendet. Die Maus-ESTs A1891998 und AA823259 wurden vom RZPD bezogen und sequenziert (Sequenzen s. Anhang). Daraus wurde eine 2151 bp lange cDNA assembliert, die durch Amplifikation von überlappenden cDNA-Fragmenten gesichert ist. Diese cDNA besitzt einen offenen Leserahmen von 1929 bp und kodiert somit für ein Protein von 643 aa Länge. Es konnten keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteindomänen festgestellt werden. Die cDNA-Sequenz wurde unter der Acc.-Nr. AF424701 als *Homoloc-13* veröffentlicht.

4.3.3.2 Gen-Struktur bei Maus und Mensch

Die Exons der murinen cDNA konnten über eine Suche in den Rohdaten des Mausgenomprojekts unter Anwendung der Spleiß-Konsensus-Regel (Breathnach und Chambon, 1981) identifiziert werden. Auch für den Menschen wurden die Exons über eine Suche im humanen Genom bestimmt. Der Vergleich zwischen Maus und Mensch zeigt, daß die humane cDNA LOC51057 um vier Exons kürzer ist (s. Tab. 4.4). Entweder handelt es sich bei dem humanen Klon um ein trunkiertes Transkript oder es gibt mehrere unterschiedlich lange LOC51057-Spleißvarianten. Dafür spricht, daß Ende 2001 eine weitere LOC51057-cDNA (Acc.-Nr. AK055030) veröffentlicht wurde, die am 5'-Ende länger ist und einen anderen 3'-UTR aufweist.

Bei der Maus-cDNA befindet sich das ATG-Startcodon in Exon 4, was darauf hindeuten kann, daß auch diese cDNA nicht vollständig ist oder daß es mehrere Introns im 5'-UTR gibt. Bislang sind allerdings keine Maus-Sequenzen in der Verlängerung des 5'-Endes erhältlich, so daß man diese Frage nicht eindeutig beantworten kann.

Tab. 4.4: Exonlängen beim Menschen und bei der Maus in bp

Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Maus	20	51	71	60	115	134	192	610	189	124	64	103	163	104	29	162
Mensch					22	134	192	610	189	124	64	103	163	80	32	51

4.3.3.2 Expressionsanalyse der cDNA *Homoloc-13*

Die cDNA *Homoloc-13* ließ sich in allen untersuchten Geweben per RT-PCR nachweisen (s. Abb. 4.15). In den untersuchten Geweben Testis, Hirnstamm und Muskel wurde in der RT-PCR zwischen WT und WR kein Expressionsunterschied gefunden (s. Abb. 4.16). In diesen Geweben konnte auch über einen Northern-Blot gezeigt werden, daß die Transkriptgröße und -Menge zwischen WT und WR identisch ist (s. Abb. 4.17).

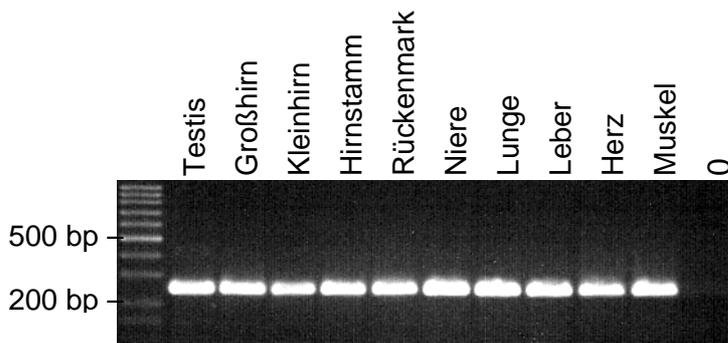


Abb. 4.15: RT-PCR der cDNA *Homoloc-13* in verschiedenen WT-Geweben
0 = Nullprobe

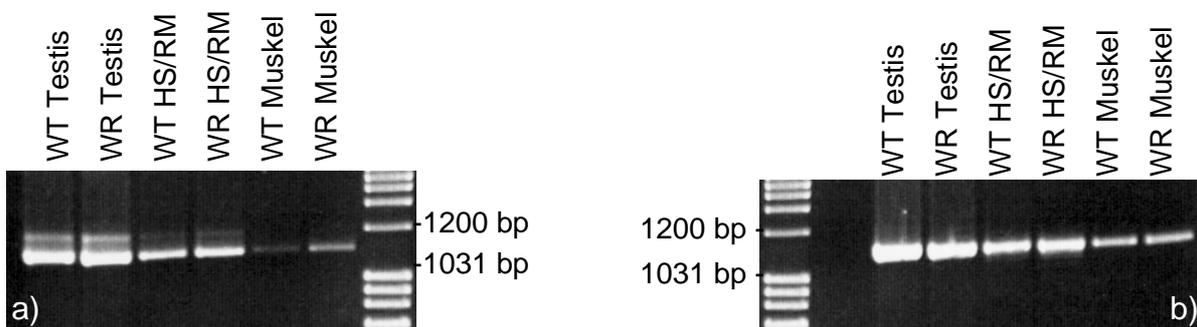


Abb. 4.16: RT-PCR der *Homoloc-13* cDNA bei WT und WR
HS/RM = Hirnstamm und Rückenmark

a) Amplifikation des 3'-Teils der *Homoloc-13* cDNA bei WT und WR mit den Primern MEST13.7/71m17forc

b) Amplifikation des 5'-Teils der *Homoloc-13* cDNA bei WT und WT mit den Primern MEST13.9/71m17forb

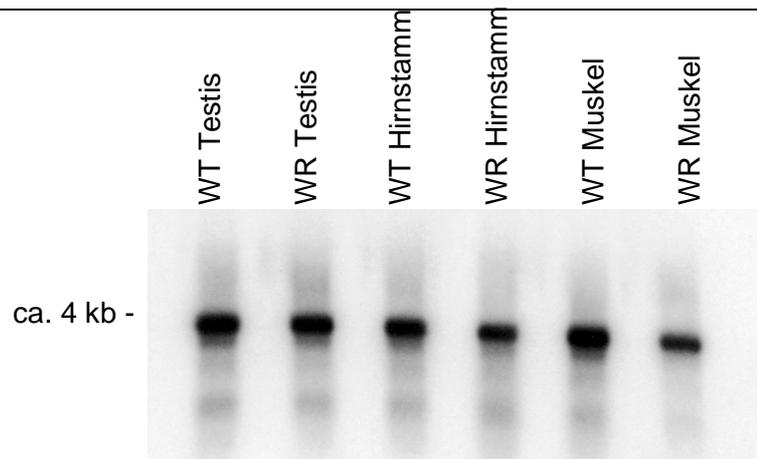


Abb. 4.17: mRNA-Northern Blot hybridisiert mit einer über PCR mit den Primern MEST13.2/71m17for generierten Sonde, die im 3' Bereich der cDNA lokalisiert ist.

4.3.3.3 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region der anonymen cDNA *Homoloc-13*

Die kodierende Region der cDNA *Homoloc-13* wurde in sechs überlappenden Fragmenten amplifiziert und direkt sequenziert. Die Primerkombinationen mit denen die cDNA-Fragmente erzeugt wurden, sowie die Sequenzierprimer sind in Tab. 4.5 zusammengefaßt. Die folgenden Sequenzalignments zwischen WT und WR zeigen, daß die Sequenzen zu 100% identisch sind. Der Überlappungsbereich der Fragmente ist schattiert dargestellt; Start- und Stopcodon sind fett gedruckt.

Tab. 4.5: cDNA-Fragmente und Sequenzierprimer für die vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region von *Homoloc-13*

	cDNA-Fragment	Sequenzierprimer
1.)	MEST13.1/ MEST13.7	MEST13.1, MEST13.7
2.)	MEST13.2/ 71m17for b	71m17for b, MEST13.2
3.)	MEST13.16/ 71m17for c	71m17for c
4.)	MEST13.12/ MEST13.13	MEST13.12
5.)	MEST13.14/ MEST13.15	MEST13.14
6.)	MEST13.9/ MEST13.11	MEST13.9

```

WT : 1   ccgtgtgtgctgagcaaatggaagagcaatacatctgccagctcctgtttggttcaggt 60
        |||
WR : 1   ccgtgtgtgctgagcaaatggaagagcaatacatctgccagctcctgtttggttcaggt 60
        |||
        Fragment 1
WT : 61   gtgctgggtgtccctaagtctttctgggcctcagctggagaaagtggtgattgacagaagc 120
        |||
WR : 61   gtgctgggtgtccctaagtctttctgggcctcagctggagaaagtggtgattgacagaagc 120
WT : 121  ctggtggggaagctcatctcagacaccatcagtgatgctctccttacagacagtttcatc 180
        |||
WR : 121  ctggtggggaagctcatctcagacaccatcagtgatgctctccttacagacagtttcatc 180
  
```

```

WT : 181 atcttatcatttctggcacaaaacaaactatgttttattcagtttacaaagaaaatggat 240
      |||
WR : 181 atcttatcatttctggcacaaaacaaactatgttttattcagtttacaaagaaaatggat 240

WT : 241 tctcttgatggaaacaagaggctggagaaactctcagccttgaccttaagatttcctat 300
      |||
WR : 241 tctcttgatggaaacaagaggctggagaaactctcagccttgaccttaagatttcctat 300

WT : 301 tatgacatacctggcccagccaacaggacaatagatcgtcacttagctgtcaactccact 360
      |||
WR : 301 tatgacatacctggcccagccaacaggacaatagatcgtcacttagctgtcaactccact 360

WT : 361 caggatctagttgtttgggtggcgcgctggcagtgatgatggttggccttggactcca 420
      |||
WR : 361 caggatctagttgtttgggtggcgcgctggcagtgatgatggttggccttggactcca 420
      Fragment 2
WT : 421 gtttcttctgagaaggacagagccaatatgctggtgctgggctttactcaaggaggattg 480
      |||
WR : 421 gtttcttctgagaaggacagagccaatatgctggtgctgggctttactcaaggaggattg 480

WT : 481 gaggttctaagttttgttcgcacagaatggagtcccctggatggtcacttcggcaccaaaa 540
      |||
WR : 481 gaggttctaagttttgttcgcacagaatggagtcccctggatggtcacttcggcaccaaaa 540

WT : 541 caaccttatcaggtgttcacagtggagtgctccgtcagtgtagacaaggagcccatggct 600
      |||
WR : 541 caaccttatcaggtgttcacagtggagtgctccgtcagtgtagacaaggagcccatggct 600

WT : 601 gacagctgtatttatgaatctgtccggaacaaactccactgctgtcagttaccagaata 660
      |||
WR : 601 gacagctgtatttatgaatctgtccggaacaaactccactgctgtcagttaccagaata 660

WT : 661 ccactaagatcgaaggccatcagctgctgcaggaactctacggaagacaaactgatcgtg 720
      |||
WR : 661 ccactaagatcgaaggccatcagctgctgcaggaactctacggaagacaaactgatcgtg 720

WT : 721 ggctgtgaagactcttcagtaattctctatgaagctcacctgggtgtgactctcctggcc 780
      |||
WR : 721 ggctgtgaagactcttcagtaattctctatgaagctcacctgggtgtgactctcctggcc 780

WT : 781 caggctgaacttaggccttcattgataagctgccacccaagtggcgccattcttctggtt 840
      |||
WR : 781 caggctgaacttaggccttcattgataagctgccacccaagtggcgccattcttctggtt 840

WT : 841 ggcagcaaccaaggggagctacaaattttgatattgctctgtcccctatcaacatccag 900
      |||
WR : 841 ggcagcaaccaaggggagctacaaattttgatattgctctgtcccctatcaacatccag 900
      Fragment 3
WT : 901 ctcttggcagaagattactcaccgaaggagactctgcaattcaagaagttctttgatggt 960
      |||
WR : 901 ctcttggcagaagattactcaccgaaggagactctgcaattcaagaagttctttgatggt 960

WT : 961 tcaagcagctcttgtctcaaatgcagtgatggctcctcctgcttggtttccagaagccta 1020
      |||
WR : 961 tcaagcagctcttgtctcaaatgcagtgatggctcctcctgcttggtttccagaagccta 1020

WT : 1021 aaagaggagaaaatctgtgatcttctcttctcaggttcaacaaaggaccttgggtgtgc 1080
      |||
WR : 1021 aaagaggagaaaatctgtgatcttctcttctcaggttcaacaaaggaccttgggtgtgc 1080
WT : 1081 tactgtttaaacttggcatcctcacacgaggacaactgggctggttagacctcatcttac 1140
      |||
WR : 1081 tactgtttaaacttggcatcctcacacgaggacaactgggctggttagacctcatcttac 1140

```

Fragment 4

WT : 1141 agtacattcactacagtgaggtatatgagggccatcagcatcctgcgagcatggactggg 1200
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1141 agtacattcactacagtgaggtatatgagggccatcagcatcctgcgagcatggactggg 1200

WT : 1201 acaccctgggcccagcagtggttgatcggcatgggcaccatcgtgaaccatcttcttagac 1260
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1201 acaccctgggcccagcagtggttgatcggcatgggcaccatcgtgaaccatcttcttagac 1260

WT : 1261 agaggctcacaccagagagagaagcacagcttgaggcgagccttggaaccttctatgctc 1320
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1261 agaggctcacaccagagagagaagcacagcttgaggcgagccttggaaccttctatgctc 1320

WT : 1321 caacaagaccacttctggatacaactatthttggaaatatagagagccagtcagcaagtatg 1380
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1321 caacaagaccacttctggatacaactatthttggaaatatagagagccagtcagcaagtatg 1380

WT : 1381 ccaggaggctcttccaccacctgctcaggtacaagagatttgaaaaggccttcttcttag 1440
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1381 ccaggaggctcttccaccacctgctcaggtacaagagatttgaaaaggccttcttcttag 1440

WT : 1441 ctggtgacattggagctcgtgacctgttcatggacattcattaccttgctctagatatgg 1500
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1441 ctggtgacattggagctcgtgacctgttcatggacattcattaccttgctctagatatgg 1500

Fragment 5

WT : 1501 gtgaactggcactggctgaagtggcaagaagaagggcgcatgatattgatggtgagtcag 1560
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1501 gtgaactggcactggctgaagtggcaagaagaagggcgcatgatattgatggtgagtcag 1560

WT : 1561 tatcctctggagtcgagctcctggggcccttggacagagaagagacatgctgaatgaaggtt 1620
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1561 tatcctctggagtcgagctcctggggcccttggacagagaagagacatgctgaatgaaggtt 1620

WT : 1621 ttgccagctcagctctcatgcctgaaggagaaaacaagtttccaggccttcttcttcca 1680
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1621 ttgccagctcagctctcatgcctgaaggagaaaacaagtttccaggccttcttcttcca 1680

WT : 1681 ttggttcaacacacatgcaaactcttcaacagaaaataccaaatggcccttcaagcagat 1740
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1681 ttggttcaacacacatgcaaactcttcaacagaaaataccaaatggcccttcaagcagat 1740

WT : 1741 gggcaattgagagaaggactgaggaagaagaggaggaggaggaggaggaggaggaggagt 1800
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1741 gggcaattgagagaaggactgaggaagaagaggaggaggaggaggaggaggaggaggagt 1800

WT : 1801 tatgcaactgactcttcaggggcccaccacctggaatgcagaaggagaactgaaagaagacc 1860
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1801 tatgcaactgactcttcaggggcccaccacctggaatgcagaaggagaactgaaagaagacc 1860

Fragment 6

WT : 1861 aaaggaaacaggacattggagatggttggttctctcagaatggttcactttggtttggtgt 1920
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1861 aaaggaaacaggacattggagatggttggttctctcagaatggttcactttggtttggtgt 1920

WT : 1921 aatcatccgaaacacaaaaagaaagctgcccttttcatttcttttctattgacctgat 1980
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1921 aatcatccgaaacacaaaaagaaagctgcccttttcatttcttttctattgacctgat 1980

WT : 1981 caataaaaaatctttcacgtgtggatthttaaatagaaggaaagatagtagta 2030
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

WR : 1981 caataaaaaatctttcacgtgtggatthttaaatagaaggaaagatagtagta 2030

4.3.4 Anonyme cDNA *Kiaa0903*

Die humane cDNA KIAA0903 stammt aus einem cDNA-Projekt für besonders lange cDNAs (Nagase et al., 1998) und wurde aus adultem Gehirngewebe isoliert. Allerdings ist nur ein ca. 3,8 kb langes, trunkiertes Fragment (Acc.-Nr. AB020710) kloniert worden. Im Jahr 2000 wurde eine längere humane cDNA-Sequenz von 4,9 kb veröffentlicht (Acc.-Nr. AX030068). Die vorhergesagte KIAA0903-Proteinsequenz enthält einen Sequenzabschnitt mit schwacher Homologie zu einer Calponin-Homologiedomäne (CH-Domäne) und außerdem eine CAAX Box (Kikuno R.). Bei der Maus waren nur wenige EST-Daten verfügbar.

4.3.4.1 Etablierung der cDNA- und Proteinsequenz bei der Maus

Durch die Sequenzierung des BACs 123j24 waren die letzten 10 Exons der *Kiaa0903*-cDNA bekannt. Bei der Suche nach Maus-Sequenzen im weiter 5' gelegenen Teil der cDNA, wurde der Klon AW494018 gefunden. Er wurde vom RZPD bezogen und sequenziert. Allerdings war das 5'-Ende der cDNA nicht von diesem Klon abgedeckt und es konnten keine weiteren ESTs gefunden werden. Beim Ausprobieren mehrerer Primer, die anhand der humanen Sequenz generiert worden waren, zeigten sich einige Signale in erwarteter Größe auch bei der Maus. Insgesamt wurde eine 4820 bp lange cDNA Sequenz assembliert und unter der Acc.-Nr. AF4246987 veröffentlicht. Im ersten Exon ist ein ATG-Startcodon lokalisiert und die cDNA kodiert für ein Protein von 1207 aa. Das Maus-Protein enthält ebenso wie das humane eine CAAX-Box am Carboxyterminus und eine CH-Domäne.

Bei einer Suche in den Rohdaten des Maus-Genoms wurden weitere Sequenzinformationen im 5'-Bereich gefunden. Da aber kein zusätzlicher offener Leserahmen auftritt, kann man annehmen, daß die cDNA in ihrer vollen Länge erfaßt wurde.

Ebenfalls durch eine Suche in den Rohdaten des Mausgenoms konnten unter Anwendung der Spleiß-Konsensus-Regel (Breathnach und Chambon, 1981) die einzelnen Exons der cDNA bestimmt werden (s. Abb. 4.18 und Tab. 4.6).

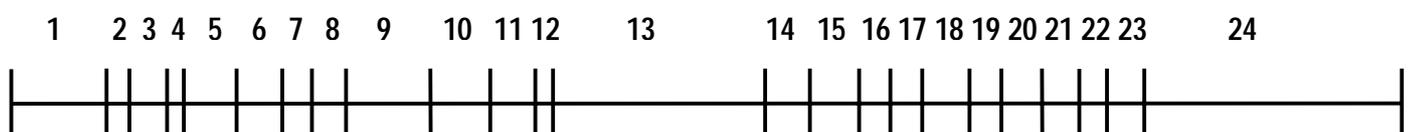


Abb. 4.18: schematische Darstellung der Exon-Längen der *Kiaa0903*-cDNA bei der Maus

4.3.4.2 Sequenz-Vergleich zwischen Maus und Mensch

Der Vergleich der hier etablierten murinen cDNA mit der humanen cDNA erbrachte eine Sequenzidentität von 88%. In der humanen Sequenz fehlt allerdings das dem Exon 7 der Maus homologe Exon. Eine Suche im humanen Genom zeigt, daß dieses Exon in der genomischen Sequenz des KIAA0903 Gens vorhanden ist (s. Abb 4.19). Die humane cDNA AX030068 stellt also eine Spleißvariante der KIAA0903-cDNA ohne Exon 7 dar. Auch für das Maus-Exon 7 konnte alternatives Spleißen gezeigt werden (s. 4.2.4.3).

```

Maus   : aaattgtaaaccagttgaatgctctgagcagcttagatgaagatcaagatgactgcataa
          |||
Mensch: aaattgtaaaccagttgaatgctctgagcagcttagatgaagatcaagatgactgcataa

Maus   : agcaagcaaatgtgccctcagctaaatcagccagttcctctgaag
          |||
Mensch: agcaagcaaatatgctgctcagctaaatcagccagttcctctgaag

```

Abb. 4.19: Alignment des murinen und humanen Exons 7: das humane Exon 7 wurde auf dem KIAA0903-positiven Contig NT_005056.6 gefunden.

Die einzelnen Exons beim Menschen wurden durch eine Suche im humanen Genom unter Anwendung der Spleiß-Konsensus Regel (Breathnach und Chambon, 1981) bestimmt. Der Vergleich der Exonlängen beim Menschen und bei der Maus zeigt, daß diese stark konserviert sind: bei 2 Exons gibt es einen Unterschied von 2 bzw. 3 bp und bei zwei weiteren Exons einen Unterschied von 21 bzw. 31 bp (s. Tab. 4.6). Das humane Protein ist 1196 aa lang und zeigt eine Sequenzidentität zum Maus-Protein von 83% und eine Sequenzähnlichkeit von 86%.

Tab. 4.6: Exon-Längen bei Maus und Mensch, angegeben in bp

Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Maus	351	58	96	54	182	140	106	123	238	218	181	49
Mensch	401	58	96	54	182	140	106	123	241	187	179	49
Exon	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Maus	882	144	148	108	125	139	107	124	100	74	115	1043
Mensch	903	144	148	108	125	139	107	124	100	74	115	1075

4.3.4.3 Alternatives Spleißen der cDNA *Kiaa0903*

In insgesamt drei Fällen, die im Folgenden näher charakterisiert werden, konnte für die cDNA *Kiaa0903* alternatives Spleißen nachgewiesen werden.

Bei der Amplifikation von RT-PCR-Produkten aus Testis-cDNA war es in einigen Fällen nicht möglich, ein eindeutiges Signal zu erhalten. Bei den Primerkombination 9035'p/k, 9035'l/m und 903Ex2/Ex5b traten immer zwei Banden auf (s. Abb. 4.20-22). Die Fragmente wurden zur weiteren Analyse kloniert und sequenziert. Es zeigte sich, daß es sich um verschiedene Isoformen der cDNA *Kiaa0903* handelte.

Das Exon 7 ist nur im längeren cDNA-Fragment der Primerkombination 9035'p/k enthalten, während es im kürzeren Fragment komplett fehlt (s. Abb. 4.20). Die längere Form des cDNA-Fragments 903Ex2/Ex5a enthält das Exon 16, die kürzere nicht (s. Abb. 4.22). Im Falle der beiden 9035'l/m cDNA-Fragmente werden genau die ersten 75 bp des Exons 9 alternativ gespleißt (s. Abb. 4.21).

Klon 1	378	CATTGGCAATTTAGATGATTTCTGAAGAAGATAATGAGGATGATGACGAGAACCGTGTGAA
Klon 12	539	CATTGGCAATTTAGATGATTTCTGAAGAAGATAATGAGGATGATGACGAGAACCGTGTGAA
Exon 6		
Klon 1	438	CCAAGAGGAGAAGGCGGCAAAAATTACAG-----
Klon 12	599	CCAAGAGGAGAAGGCGGCAAAAATTACAGAAATTGTAAACCAGTTGAATGCTCTGAGCAG
Exon 7		
Klon 1	469	-----
Klon 12	659	CTTAGATGAAGATCAAGATGACTGCATAAAGCAAGCAAATGTGCCCTCAGCTAAATCAGC
Exon 8		
Klon 1	469	-----AACTTATAAACACACTTAACTTTTTGGATGAAGCACAAAAGGACTT
Klon 12	719	CAGTTCCTCTGAAGAACTTATAAACACACTTAACTTTTTGGATGAAGCACAAAAGGACTT
Exon 8		
Klon 1	513	GGCCACTGTGAATACCAATCCATTTGATGAACCTGATGTAACAGAATTAATCCATTTGG
Klon 12	779	GGCCACTGTGAATACCAATCCATTTGATGAACCTGATGTAACAGAATTAATCCATTTGG

Abb. 4.20: Partielles Alignment von zwei 9035'p/k cDNA-Klonen, die senkrechten Linien geben die Exon-Exon Grenzen an.

Exon 8

Klon 28 TAAACACACTTAACTTTTTGGATGAAGCACAAAAGGATCTTGGCCACTGTGAATACCAAT
 Klon 29 TAAACACACTTAACTTTTTGGATGAAGCACAAAAGGACTTTGGCCACTGTGAATACCAAT

Klon 28 CCATTTGATGAACCTGATGTAACAGAATTAATCCATTTGGAGATCCTGACTCAGAAGAA
 Klon 29 CCATTTGATGAACCTGATGTAACAGAATTAATCCATTTGGAGATCCTGACTCAGAAG--

Exon 9

Klon 28 CCAATCACTGAAACAACCTTCACCTAAAAACCAGAAGAATCTTTTTATAATAACAGCTGTA
 Klon 29 -----

Klon 28 ATCCCTTTAAAGGTGTACAGACTCCACAGTATTTGAACCCATTTGATGAACCAGAAACTT
 Klon 29 -----GTGTACAGACTCCACAGTATTTGAACCCATTTGATGAACCAGAAACTT

Klon 28 TTGTAATGATAAAGGATTCTCCACCCCAGTCTACACGAAGAAAAAACCTAAGACCTGTAG
 Klon 29 TTGTAATGATAAAGGATTCTCCACCCCAGTCTACACGAAGAAAAAACCTAAGACCTGTAG

Exon 10

Klon 28 ACATGAGCAAGTACCTCTATGCTGATAGTTCAAAGAGTGAAGAGGAACTGGATGAATCAA
 Klon 29 ACATGAGCAAGTACCTCTATGCTGATAGTTCAAAGAGTGAAGAGGAACTGGATGAATCAA

Abb. 4.21: Partielles Alignment von zwei cDNA-Klonen der Primerkombination 9035'l/m, die senkrechten Linien geben die Exon-Exon Grenzen an.

Exon 15

Klon 1 44 TTGAAAGAAAGGTCAAAGGCATCTGGAGA-----
 BAC 123j24 121 TTGAAAGAAAGGTCAAAGGCATCTGGAGATGAAAATGATAATATTGAGATAGATACTAAC

Exon 16

Klon 1 73 -----
 BAC 123j24 181 GAAGAGATTCTGAAGGCTTTGTTGTAGGAGGTGGAGATGAACTTACTAATATAGAAAAGT

Exon 17

Klon 1 73 -----GCAGAATAGTAAGGTGGTGGACTTGAGGCTGAAGAAGCTATTA
 BAC 123j24 241 GACCTTGATAATCCCGAGCAGAATAGTAAGGTGGTGGACTTGAGGCTGAAGAAGCTATTA

Abb. 4.22: Partielles Alignment eines cDNA-Klons der Primerkombination 903Ex2/Ex5a und der 123j24 BAC-Sequenz, die senkrechten Linien geben die Exon-Exon Grenzen an.

4.3.4.3 Expressionsanalyse

Die cDNA *Kiaa0903* ließ sich in allen untersuchten Geweben (Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm, Rückenmark, Testis, Muskel, Herz, Lunge, Leber, Niere) über RT-PCR nachweisen. Dabei war die Expression bei WT und WR gleich stark.

Die alternativ gespleißten Exons (s. 4.3.2.3) wurden auf eine gewebsspezifische Expression hin untersucht. Dabei traten in allen Geweben jeweils beide Isoformen auf. Für die beiden längeren Spleißvarianten, die das Exon 7 bzw. 16 enthalten, gilt

jedoch, daß sie bevorzugt im Nervensystem gebildet werden, die kürzeren Spleißformen kommen hier nur als Nebenprodukt vor. In den anderen Geweben überwiegen die kürzeren Spleißformen. Im Testis gibt es bei den Spleißvarianten von Exon 7 keinen Unterschied (s. Abb. 4.22b und 4.23b). Im Falle von Exon 9 konnte kein großer Unterschied in der Gewebsverteilung der Isoformen festgestellt werden. Bei allen alternativen Spleißvarianten konnte kein Unterschied in der Verteilung zwischen WT und WR gefunden werden (s. Abb. 4.22a, 4.23a und 4.24).

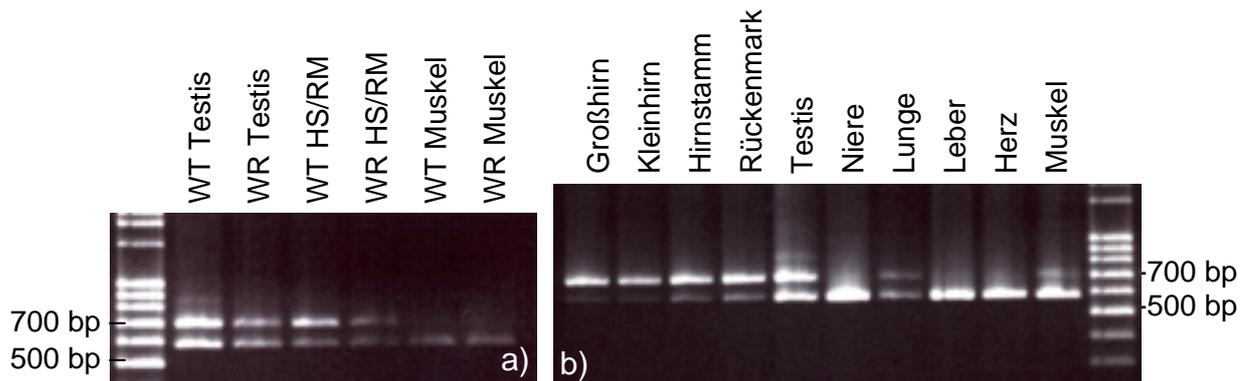


Abb. 4.22: Spleißvarianten von Kiaa0903 mit und ohne Exon 7

a) Expression des cDNA-Fragments 9035'p/k bei WT und WR

b) Expression des cDNA-Fragments 9035'p/k in verschiedenen WT-Geweben

Das größere Fragment stellt die Spleißvariante mit Exon 16 dar, welches im kleineren Fragment fehlt.
HS/RM = Hirnstamm und Rückenmark

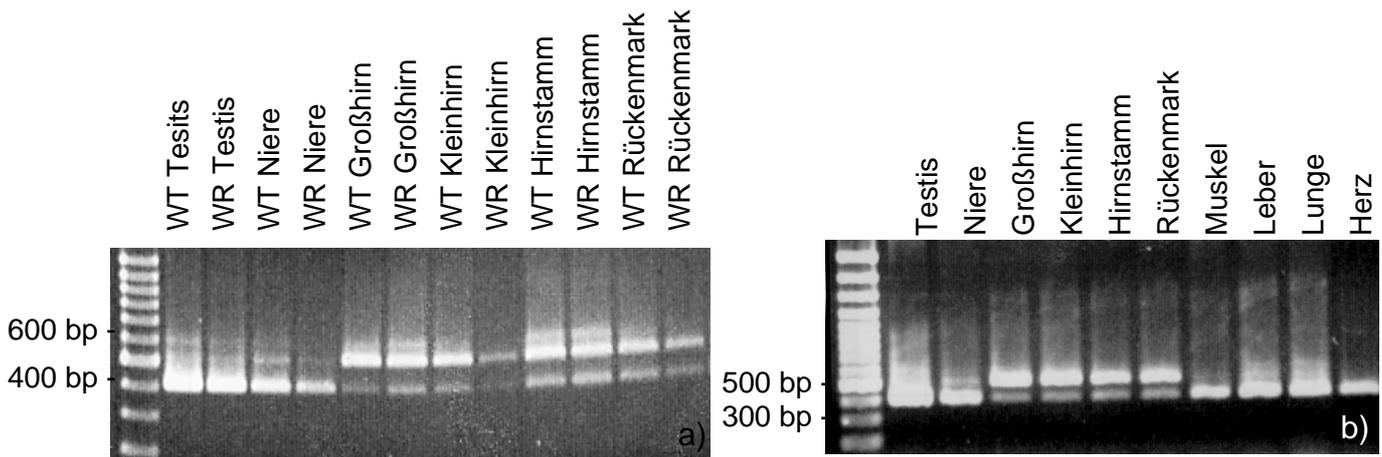


Abb. 4.23: Spleißvarianten von Kiaa0903 mit und ohne Exon 16

a) Expression des cDNA-Fragments 903Ex2/Ex5a bei WT und WR

b) Expression des cDNA-Fragments 903Ex2/Ex5a in verschiedenen WT-Geweben

Das größere Fragment stellt die Spleißvariante mit Exon 16 dar, welches im kleineren Fragment fehlt.

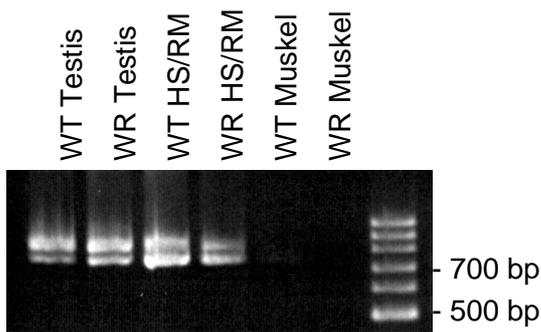


Abb. 4.24: Spleißvarianten von *Kiaa0903* Exon 9
 Expression des cDNA-Fragments 9035'l/m bei WT und WR.
 Das größere Fragment stellt die Spleißvariante mit Exon 9 dar, welches im kleineren Fragment fehlt.
 Die Expression im Muskel ist sehr schwach.
 HS/RM = Hirnstamm und Rückenmark

4.3.4.4 Vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region der anonymen cDNA *Kiaa0903*

Die kodierende Region der cDNA *Kiaa0903* wurde in zehn RT-PCR-Fragmenten amplifiziert. Die Primerkombinationen für die cDNA-Fragmente sowie die Sequenzierprimer sind in Tab. 4.7 angegeben.

Für die vergleichende Sequenzierung der alternativ gespleißten cDNA-Fragmente 9035'p/k und 9035'l/m wurden die RT-PCR-Produkte kloniert und je drei Klone bei WT und WR sequenziert. Die alternativen Exons 7, 9 und 16 wurden noch einmal mit intronständigen Primern amplifiziert und sequenziert, um die Spleißstellen zu verifizieren (alle Sequenzen und Alignments s. Anhang).

In allen Sequenzierungen wurde kein Unterschied zwischen der WT- und der WR-Sequenz festgestellt.

Tab. 4.7: cDNA-Fragmente und Sequenzierprimer für die vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region von *Kiaa0903*

	cDNA Fragment	Sequenzierprimer
1.)	9035'y/z	a) 9035'y, b) 9035'z
2.)	9035'n/r	9035'n
3.)	9035's/m	9035's
4.)	9035'c/h	a)9035'c, b) 9035'h
5.)	903 5'i/Ex5a	a) 903 Ex5a, b) 903 5'i
6.)	903Ex2/Ex5b	a) 903Ex2, b) 903Ex5b
7.)	903Ex5/Ex11	Ex11
8.)	903Ex9b/kiaaEx11a	a) 903Ex9b, b) kiaaEx11a

9.)	903Ex11b/d	903Ex11d
10.)	903Ex11c/e	a) 903Ex11c, b) 903Ex11e

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Analyse der Kandidatengene

Insgesamt wurden drei neue cDNA-Sequenzen etabliert: die für das Homöobox-Protein *Otx1* und für die beiden anonymen cDNAs *Kiaa0903* und *Homoloc-13*. In allen hier untersuchten Genen wurde kein Unterschied in der kodierenden Sequenz oder Expression zwischen WT und WR gefunden.

4.5 Konstruktion eines *targeting* Vektors für das erste Exon des *Peli1*-Gens

Das *Peli1*-Gen ist von K. Resch in ihrer Doktorarbeit als das *Drosophila* Pellino-Homolog identifiziert worden. Sie konnte die beiden Isogene Pellino 1 und 2 sowohl bei der Maus als auch beim Menschen kartieren (Resch et al., 2000).

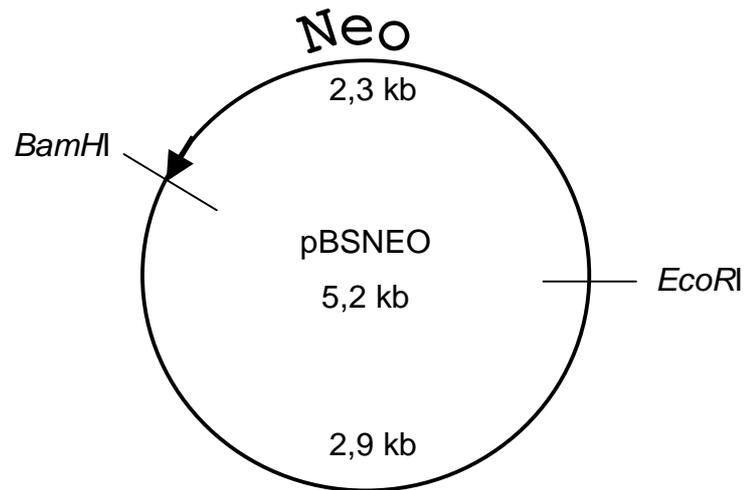
Das Pellino-Protein ist Bestandteil des Toll-Signalwegs vom Extrazellulärraum in den Zellkern, der mit dem Interleukin-1-Signalweg bei Säugern homologisiert wird (Karin und Hunter, 1995). Bei der Fruchtfliege spielt diese Signalkaskade während der Embryonalentwicklung und der Abwehrreaktion gegen pathogene Pilze eine Rolle, bei Säugern in der angeborenen Immunantwort und bei inflammatorischen Prozessen (Wilson et al., 1997).

Bei der Untersuchung des Kandidatengens *Peli1* konnte kein Unterschied in der kodierenden Sequenz und in der Expression nachgewiesen werden (Resch, 2000). Die Generierung von *Peli1*-k.o. Mäusen soll weiteren Aufschluß über den Status als Kandidatengens bringen. In den folgenden Abschnitten wird die Konstruktion eines *targeting* Vektors für das erste Exon des *Peli1*-Gens beschrieben. Dann folgen die Ergebnisse zur homologen Rekombination in ES-Zellen und Herstellung von Aggregationschimären.

4.5.1 Subklonierung der β -actin-Neomycinresistenzkassette

Die β -actin-Neomycinresistenzkassette wurde aus dem pBAN/TK BamCass Vektor mittels einer Doppelrestriktion von *EcoRI* und *BamHI* ausgeschnitten und über dieselben Schnittstellen in den pBluescript (pBS) kloniert. Von 22 erhaltenen Klonen wurden 3 durch Sequenzierung mit dem Vektorprimer M13rev auf das richtige Insert überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß alle 3 Klone des pBSNeo die β -actin-Neomycinresistenzkassette in 3'→5' Orientierung tragen (s. Abb. 4.25).

Abb. 4.25: Neomycin-Resistenzkassette kloniert in den pBS



4.5.2 Klonierung der genomischen Fragmente, die das erste Exon des *pli1*-Gens flankieren

Die genomische Sequenz des *pli1*-Gens stand durch die Sequenzierung des BACs 124I2 zur Verfügung. Ein ca. 10 kb großes Fragment, welches das erste Exon enthält, wurde zunächst auf repetitive Sequenzen und Restriktionsschnittstellen überprüft, um dann die PCR-Primer zu generieren.

Zur Amplifikation des 5'-Fragments wurden die Primer *pli15'a* und *pli15'b* derart ausgewählt, daß sich ein 4422 bp großes PCR-Produkt ergibt (Sequenz s. Anhang) und das Fragment folgende Restriktionsschnittstellen nicht aufweist: *EcoRI*, *HindIII*, *PvuI* und *PvuII*. Dagegen besitzt es eine *BamHI*-Schnittstelle an Position 124 (s. Abb. 4.26).

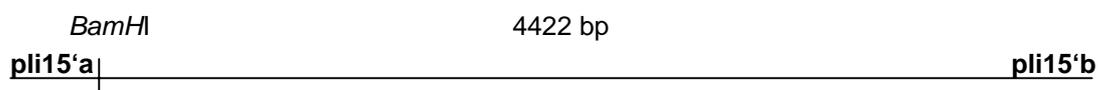


Abb. 4.26: genomisches 5'-Fragment mit Angabe der Primer und der relevanten Schnittstellen

Zur Amplifikation des 3'-Fragments wurden die Primer *pli1intron d* und *pli1intron e* so generiert, daß ein 2625 bp großes PCR-Produkt entsteht (Sequenz s. Anhang). Das Fragment weist folgende Restriktionsschnittstellen nicht auf: *EcoRI*, *HindIII* und *PvuI*. Allerdings besitzt es eine *BamHI*-Schnittstelle an Position 690 (s. Abb. 4.27).

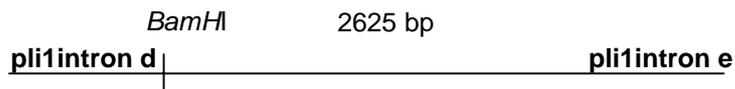


Abb. 4.27: genomisches 3'-Fragment mit Angabe der Primer und der relevanten Schnittstellen

Die beiden Fragmente wurden mit der *Pwo* Polymerase von Roche (Mannheim) amplifiziert und in den pCR4Blunt-TOPO kloniert. Die Identität und Orientierung der Inserts wurden durch Ansequenzieren mit den M13rev und M13uni Primern überprüft (Sequenzen s. Anhang).

4.5.3 Klonierung des 5'-Fragments in den pBSNeo

Das 5'-Fragment wurde mittels der flankierenden *EcoRI*-Schnittstellen aus dem pCR4Blunt-TOPO ausgeschnitten und in den pBSNeo ligiert. 63 erhaltene Klone wurden mittels Eckhardt-Lysen überprüft und 6 Plasmide, die die richtige Größe aufwiesen, wurden mit dem Vektorprimer M13uni ansequenziert. Bei 4 Plasmiden war die Sequenzierung erfolgreich (Sequenzen s. Anhang) und zeigte, daß das gewünschte Fragment in den Klonen 2, 3 und 5 in 5'→3' und im Klon 6 in 3'→5' Richtung hinter die Neomycinresistenzkassette kloniert worden war (= pBSNeo5'-Fragment) (s. Abb. 4.28).

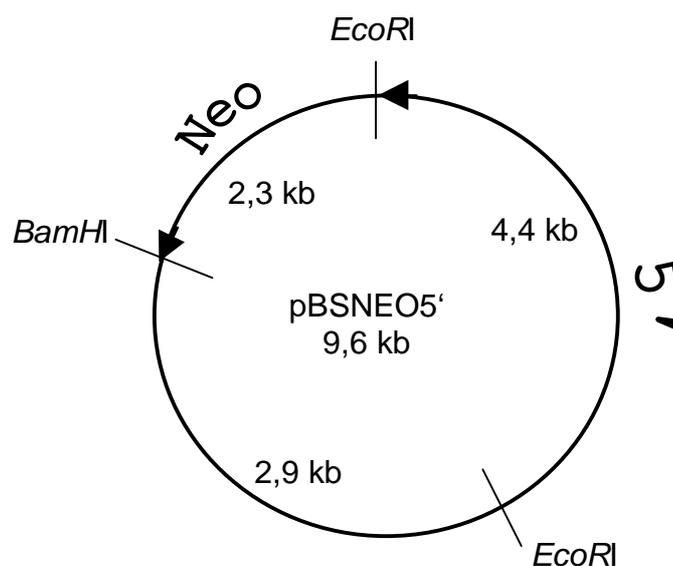
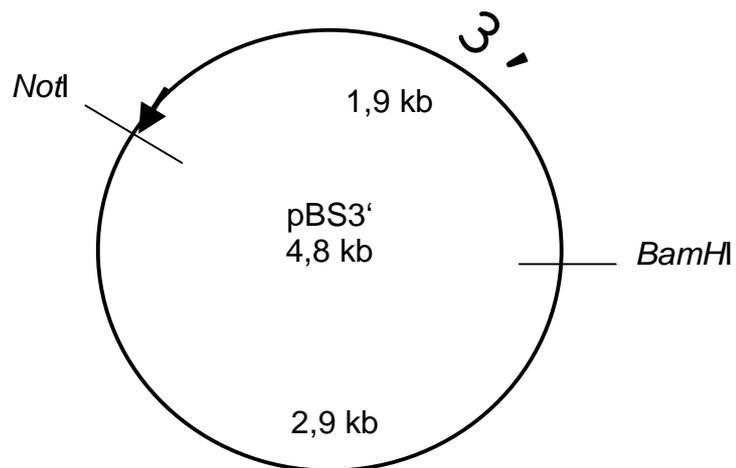


Abb. 4.28: Das genomische 5'-Fragment ist in den pBSNEO kloniert worden.

4.5.4 Umklonierung des 3'-Fragments in den pBS

Da der pCR4Blunt-TOPO keine passenden Schnittstellen besaß, wurde das 3'-Fragment mittels einer Doppelrestriktion von *NotI* und *BamHI* ausgeschnitten und in den pBS kloniert. Dazu wurde die interne *BamHI*-Schnittstelle benutzt, wodurch sich das 3'-Fragment um 690 bp auf 1935 bp verkürzte. Im erhaltenen Plasmid pBS3'-Fragment liegt das 3'-Fragment nun in 3'→5' Richtung vor (Abb. 4.29).

Abb. 4.29: Umklonierung des 3'-Fragments in den pBS

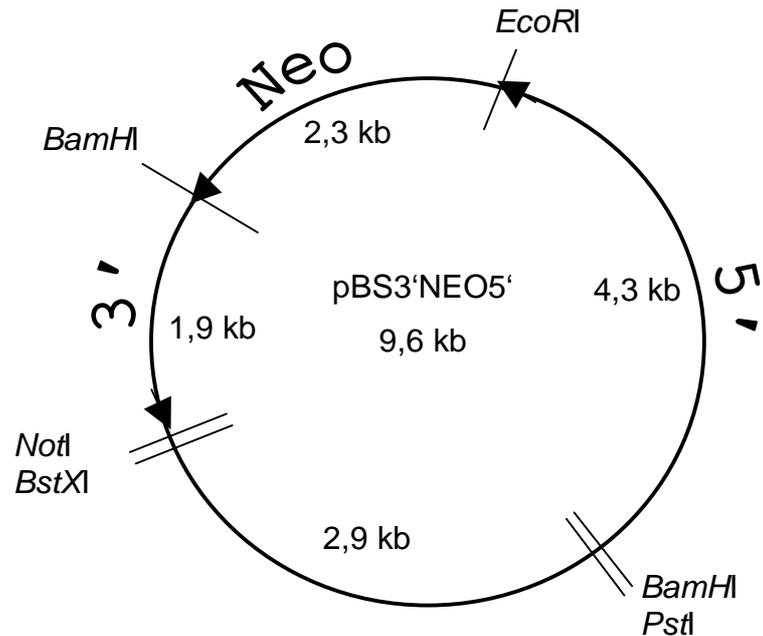


4.5.5 Klonierung des Neo5'-Fragments in den pBS3'-Fragment

Das Neo5'-Fragment wurde mittels *BamHI* aus Klon 6 in den pBS3'-Fragment kloniert. Dazu wurde die interne *BamHI*-Schnittstelle benutzt, wodurch sich das 5'-Fragment um 124 bp auf 4298 bp verkürzte.

Von 67 per Eckhardt-Lyse getesteten Klonen zeigten 9 ein Plasmid in entsprechender Größe. Bei Testspaltungen mit *BamHI* und *EcoRI* zeigten 5 Klone das erwartete Restriktionsmuster und wurden ansequenziert. Bei 2 Klonen war das Fragment in der gewünschten Orientierung einkloniert worden (s. Abb 4.30). Der *targeting* Vektor enthält eine singuläre *BstXI*-Schnittstelle, die zur Linearisierung verwendet wurde. Im Vektor ersetzt die 2,3 kb große NEO-Kassette nun die 1,4 kb um das erste Exon.

Abb. 4.30: *targeting* Vektor für das erste Exon des *Peli1*-Gens



4.5.6 Homologe Rekombination in ES-Zellen

Die homologe Rekombination in ES-Zellen sowie die Herstellung von Aggregationschimären wurde im Rahmen des Serviceprojekts des SFB 549 (Teilprojekt Z3) von Volker Schmidt und Sandra Heising durchgeführt.

Der linearisierte *targeting* Vektor (30 µg) wurde in einer 1 µg/µl Konzentration für die Transfektion der ES-Zellen vorbereitet. Das Anziehen der R1-ES-Zellen erfolgte auf bestrahlten NEO^R feeder-Zellen. Für eine Elektroporation wurden 1 x 10⁷ Zellen in 1 ml PBS eingesetzt. Die Selektion begann am Tag nach der Elektroporation: für fünf bis sieben Tage wurde dem Medium Geneticin (G418) zugesetzt. Die gewachsenen Klone wurden in 96er-well Schalen gepickt. Nach einer Woche wurden die Klone auf eine Master- und eine DNA-Platte aufgeteilt. Die Master-Platte wurde bei -80°C gelagert. Für die DNA-Präparation wurden die Klone der DNA-Platte noch eine Woche weiter kultiviert.

4.5.7 Detektion der homologen Rekombination in ES-Zellen

Die Detektion der homologen Rekombination erfolgte durch Southern Hybridisierung. Das rekombinierte Allel läßt sich im 3'-Bereich durch Restriktion mit *PstI* von der WT-Situation unterscheiden. In der WT-Sequenz befinden sich zwei *PstI* Schnittstellen, eine ca. 2 kb vor und eine ca. 4 kb hinter dem ersten Exon, so daß ein ca. 6 kb großes Fragment entsteht. Durch Einfügen der NEO-Kassette an Stelle des ersten

Exons, stehen weitere *PstI* Schnittstellen zur Verfügung, so daß im Falle der homologen Rekombination ein ca. 4,5 kb großes Fragment entsteht. Als Sonde diente ein 812 bp großes Fragment (*pli1* intron/ *pli1* b) aus dem ersten Intron, außerhalb der klonierten Sequenz, so daß nur homologe Rekombinationsereignisse und die WT-Situation nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 4.31).

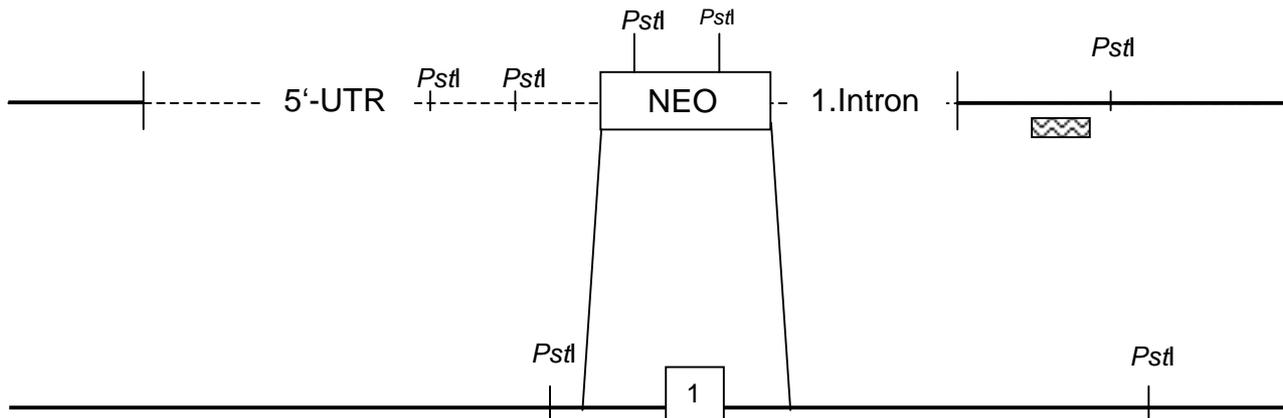


Abb. 4.31: Darstellung der Verteilung der *PstI*-Schnittstellen vor (unten) und nach (oben) der homologen Rekombination
 ☒ = Sonde

Es wurden drei positive Klone identifiziert, die dann aufgetaut und wieder angezogen wurden und dann mit einer weiteren Sonde auf die homologe Rekombination des 5' Bereichs getestet wurden.

Bei der Restriktion mit *SspI* entsteht in der WT-Situation ein 1,9 kb großes Fragment. Da eine der Schnittstellen im ausgeschalteten Fragment lokalisiert ist, ist diese im rekombinierten Allel nicht mehr vorhanden. Auch im Vektor sind keine weiteren *SspI*-Schnittstellen vorhanden, so daß ein 7,4 kb großes Fragment entsteht. Als Sonde diente ein 806 bp großes Fragment (*pli1* 5'c/d) im 5' Bereich der klonierten genomischen Sequenz. Mit einer derartigen Sonde ist es nicht möglich zwischen homologer und nicht-homologer Rekombination zu unterscheiden, doch da alle weiteren vorhandenen Sequenzen vor dem 5'-Fragment repetitiv sind, war es nicht möglich, eine Sonde außerhalb des klonierten 5'-Bereichs zu generieren (s. Abb. 4.32). Alle drei Klone zeigten das erwartete Signal bei 7,4 kb.

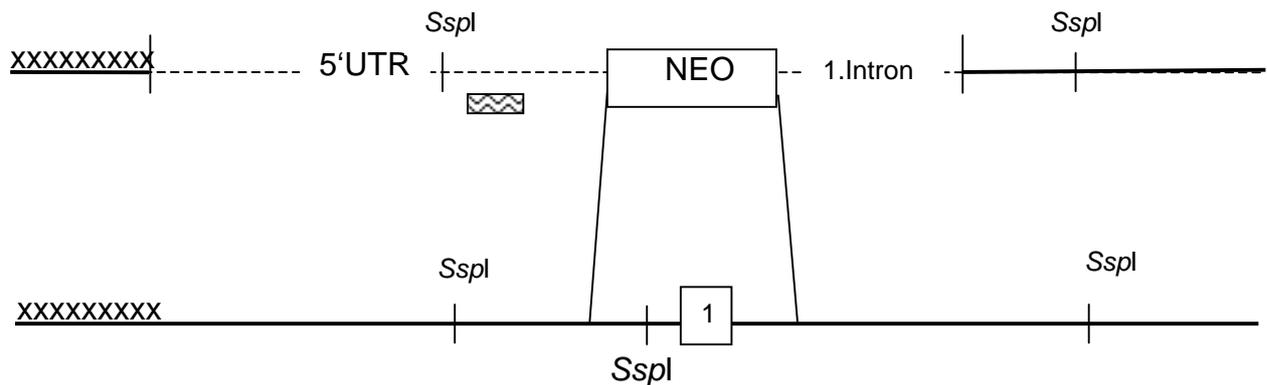


Abb. 4.32: Darstellung der Verteilung der Sspl-Schnittstellen vor (unten) und nach (oben) der homologen Rekombination, xxxxxxxx = repetitive Sequenzen,  = Sonde

4.5.8 Herstellung von Aggregationschimären

Die doppelt getesteten Klone wurden aufgetaut wieder angezogen. Für die Herstellung von Aggregationschimären wurden „Klumpen“ (ca. 10-15 Zellen) eines ES-Zell Klons zusammen mit 8-Zell Embryos aus CD1-Mäusen über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Embryonen, die sich weiter zur Blastocyste entwickelt hatten, wurden per Uterustransfer in Leihmütter eingebracht. Bei drei Würfen mit insgesamt 15 Nachkommen wurden 2 chimäre Tiere geboren. Es handelt sich um ein Weibchen und ein Männchen, die an den dunklen Flecken im Fell zu erkennen sind (s. Abb 4.33). Sie tragen allerdings nur einen sehr geringen Prozentsatz (unter 1%) dunklen Fells.



Abb. 4.33: das chimäre Männchen (links) und das chimäre Weibchen (rechts)

Bereiche des Fells, die aus der ES-Zelllinie stammen, prägen die dunkle Farbe aus im Gegensatz zur weißen Fellfarbe der Spender-Mäuse (CD1). Die verwendete ES-Zelllinie R1 trägt am Albino-Locus ein WT- und ein Chinchilla-Allel ($Tyr^{c-ch}/+^{Tyr-c}$), wobei das WT-Allel dominant ist und zur dunklen Fellfarbe bei den Chimären führt.

Waren ES-Zellen keimbahngängig, so entstehen aus ihnen Keimzellen, die entweder das WT- oder das Chinchilla-Allel tragen und so in einer Rückkreuzung mit CD1 entweder dunkle oder beige Nachkommen erzeugen würden. Dabei wird aber nur in 50% der Fälle das mutierte Allel weitergegeben. In den bis jetzt durchgeführten Verpaarungen (3 beim Weibchen, 6 beim Männchen) konnte keine Keimbahngängigkeit des 129-Allels festgestellt werden: alle Nachkommen waren weiß.

5 DISKUSSION

5.1 Konservierte Regionen auf dem humanen Chromosom 2p14-15 und dem proximalen Maus Chromosom 11

Seit dem letzten gemeinsamen Vorfahr von Maus und Mensch vor ca. 80 Millionen Jahren sind durch Translokationen die Chromosomen umorganisiert worden. Es hat allerdings keine vollständige Durchmischung stattgefunden, sondern es blieben die syntänen Regionen bestehen. Innerhalb der syntänen Region auf dem humanen Chromosom 2p14-15 und dem proximalen Maus Chromosom 11 ist die Genreihenfolge bis auf eine Inversion hoch konserviert. Auch die Orientierung und die genomische Struktur der Gene ist erhalten geblieben. Der Bereich zwischen *Kiaa0903* und *Peli1* ist zwischen Maus und Mensch invertiert (Resch, 2000), so daß der syntäne Bereich in drei konservierte Regionen, in denen die Genreihenfolge zwischen Maus und Mensch identisch ist, zerfällt.

5.1.1 Neue Kartierungen bekräftigen die Inversion zwischen Maus und Mensch

Bei der Feststellung der Inversion war im distalen Bereich des Maus-Contigs mit *Rel/REL* nur ein Marker bei Maus und Mensch vorhanden. Die Gene *XPO1*, *PEX13* und *CCT4* waren zwar beim Menschen auf dem YAC G9 kartiert worden, die Position bei der Maus war jedoch unklar (Resch, 2000). In dieser Arbeit konnten die Maus-Homologen *Xpo1*, *Pex13* und *Cct4* in der distalen konservierten Region kartiert werden. Mit *Murr1/MURR1* wurde ein neues Marker-Paar bei Mensch und Maus etabliert. Auch in der proximalen Region konnte mit *Hspc159/HSPC159* ein neues Marker-Paar gewonnen werden, das den Abschluß des proximalen konservierten Segments bildet. Durch die neu gewonnenen Marker wurden die Karten der homologen Regionen verfeinert und die Inversion zwischen Maus und Mensch konnte bekräftigt werden.

In Abb. 5.1 findet sich eine Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse bei Maus und Mensch, wobei die neu gewonnenen Marker fett dargestellt sind.

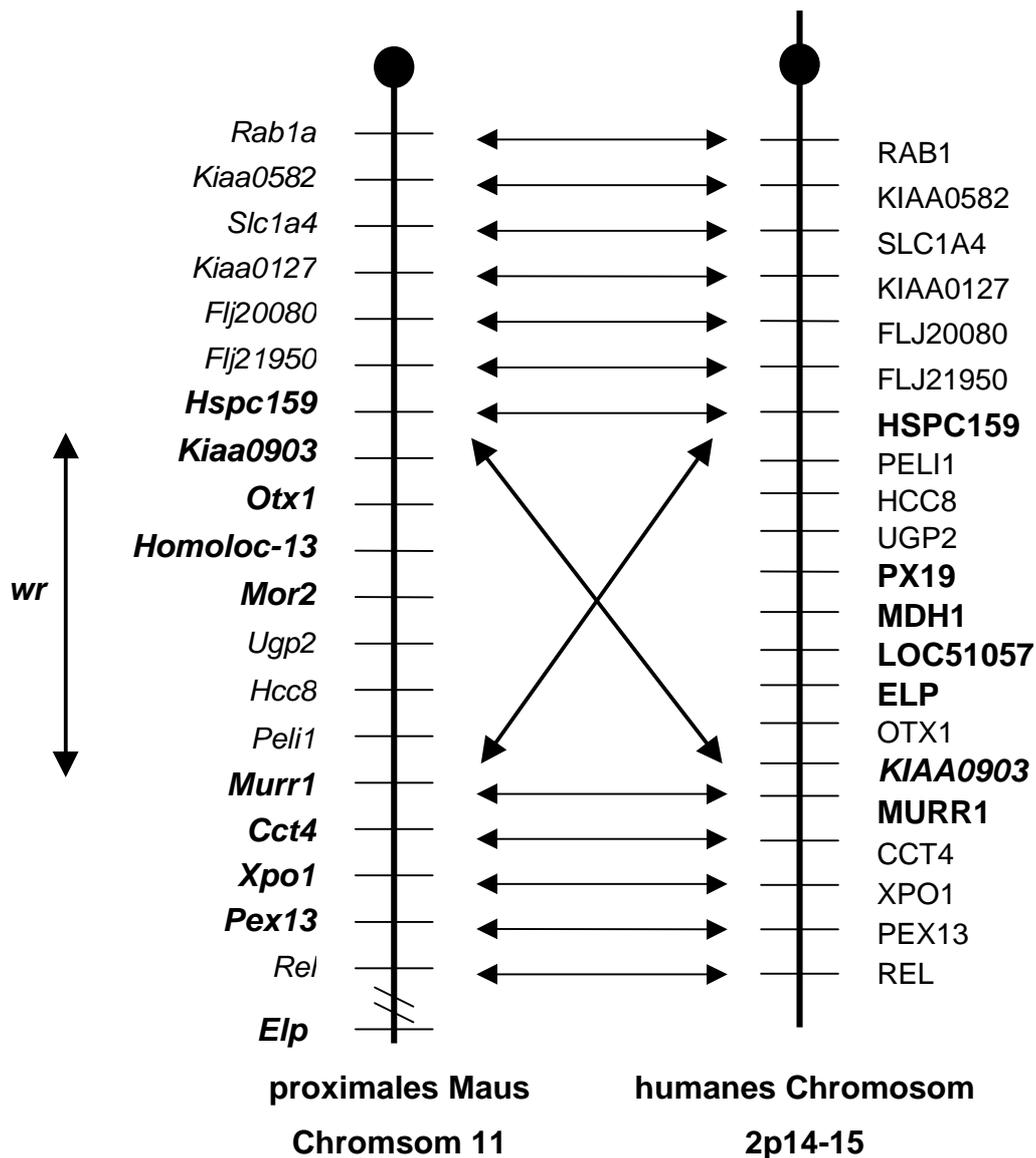


Abb. 5.1: Darstellung der konservierten Regionen auf dem humanen Chromosom 2p14-15 und dem proximalen Maus Chromosom 11. Die in dieser Arbeit bearbeiteten Marker sind fett hervorgehoben.

5.1.2 Integration von Genen

Durch die Kartierung der beiden Gene PX19 und ELP (*Endozepine-like Peptide*) konnte gezeigt werden, daß der Geninhalt der konservierten Region nach der evolutionären Trennung von Maus und Mensch vor 80 Millionen Jahren durch die Insertion von Genen verändert wurde. Das zeigt außerdem, daß es sich bei PX19/*px19* und ELP/*Elp* nicht um Homologe handelt, sondern daß sie in den jeweiligen Spezies unabhängig voneinander entstanden sind.

Bei PX19 auf Chromosom 2 handelt es sich wahrscheinlich um ein Pseudogen, wie die genomische Sequenz und die fehlenden cDNA-Klone zeigen.

ELP ist beim Menschen ein Pseudogen: es trägt Leserastermutationen und die Expression ist fast vollständig unterdrückt (Ivell et al., 2000). Bei der Maus ist die Evolution anders verlaufen: *Elp* ist ein funktionelles Gen. Es besitzt zwar nur ein Intron im 5'-UTR und ist wahrscheinlich durch Retrotransposition entstanden; durch das Akquirieren eines starken Testis-spezifischen Promotors spielt es nun eine wichtige Rolle bei der Spermienentwicklung (Valentin et al., 2000).

5.1.3 Die *wr*-kritische Region

5.1.3.1 Einengung der *wr*-kritischen Region

Zu Beginn dieser Arbeit war die *wr*-kritische Region durch die beiden rekombinanten Marker *D11Mit19* distal und *147n22rev* proximal definiert. Durch die Detektion von Rekombinationen in einem Intron von *Murr1* konnte der Kandidatengenbereich um 2,15 cM verkleinert werden. Übertragen auf die physikalische Karte bedeutet dies, daß die distale Lücke erheblich verkleinert wurde. Um den neuen distalen Rekombinationsbruchpunkt *Murr1* wurde ein Contig etabliert, welches auch *Cct4* umfaßt. Der Bereich zwischen *Peli1* und *Murr1* konnte allerdings trotz Suche in zwei verschiedenen BAC-Banken nicht abgedeckt werden. Diese Tatsache könnte auf das Vorhandensein von schwer klonierbaren, repetitiven Sequenzen hinweisen.

Durch Addition der Abstände zwischen den rekombinanten Markern erhält man für die Kandidatengenregion eine Größe von 0,41 cM +/- 0,23 cM, was ca. 0,8 Mb entspricht. Dies stimmt in etwa mit der physikalischen Größe des Contigs von 0,8 bis 1 Mb überein, die man erhält, wenn man die Größen der BACs aufaddiert.

5.1.3.2 Kandidatengene in der *wr*-kritischen Region

Durch die Kartierung von *Murr1* liegt erstmals ein nahezu geschlossenes Contig der *wr*-Region vor, das die vollständige Erfassung aller Kandidatengene erlaubt. Auf den vorhandenen BAC-Sequenzen, die vom IMB Jena erstellt und annotiert wurden, sind nur die schon bekannten Gene vorhanden. Auch bei der Analyse der homologen Region beim Menschen, inklusive der der Lücke homologen Region, wurden keine weiteren Gene gefunden, in dem 370 kb großen Bereich zwischen *MURR1* und *KIAA0903* besteht allerdings eine Lücke von ca. 100 kb.

Man kann also davon ausgehen, daß der *wr*-kritische Bereich nur die bis jetzt bekannten Gene von *Kiaa0903* bis *Peli1* enthält (s. Abb. 5.1).

5.1.3.3 *wr*-kritische Region = Inversionsbereich zwischen Maus und Mensch

Interessanterweise entspricht damit der *wr*-kritische Bereich genau dem Inversionsbereich zwischen Maus und Mensch. Der BAC 209f21, der den proximalen Inversionsbruchpunkt zwischen Maus und Mensch abdeckt, wird zur Zeit vom IMB Jena sequenziert. Bei der Analyse der Sequenzdaten wird man vielleicht auf repetitive, rekombinationsfreudige Sequenzen stoßen.

5.2 Ausschluß von Kandidatengenegen über Kartierung

Die Gene *Elp*, *Px19* und *Hspc159* konnten in verschiedenen Phasen des humanen Genomprojekts als Kandidaten neu ermittelt werden und aufgrund der physikalischen Kartierung wieder ausgeschlossen werden. Die Gene *Xpo1* und *Pex13* konnten über die RH-Kartierung außerhalb des *wr*-kritischen Bereichs lokalisiert werden.

Die anonyme cDNA *Murr1* konnte durch Rekombinationsereignisse als Kandidat ausgeschlossen werden.

5.3 Betrachtungen zu den Kandidatengenegen

Es soll vorweg gestellt werden, daß die Ausschlüsse der Kandidatengene hauptsächlich durch die vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region geschehen sind. Das direkte Sequenzieren von PCR-Produkten, wie es fast ausnahmslos praktiziert wurde, kann als zuverlässige Methode angesehen werden, da die Fehler der *Taq*-Polymerase während der Amplifikation, in der Sequenzierung herausgemittelt werden. Nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit könnte z.B. eine Punktmutation nicht detektiert worden sein, wenn mehrfach der gleiche Sequenzierfehler aufgetreten ist, der das mutierte in das Standardnukleotid verwandelt.

5.2.1 Die cytoplasmatische Malatdehydrogenase *Mor2*

Enzymtests hatten bei der cytoplasmatischen Malatdehydrogenase keinen Unterschied zwischen WT und WR gezeigt (Korthaus et al., 1996). Allerdings wurde für den Enzymnachweis die endogene Dehydrogenase-Aktivität genutzt. Eine Leserasterverschiebung oder eine Punktmutation können zu einem sogenannten

dominant negativen Effekt führen, in dem das Protein eine zusätzliche Funktion („gain of function“) erhält, die dem Organismus schadet. Die *wr*-Mutation ist jedoch rezessiv, insofern käme ein dominant negativer Effekt nicht in Frage. Es kann jedoch auch dazu kommen, daß der negative Effekt erst im homozygoten Zustand durchschlägt, z.B. wenn das normale und das mutierte Enzym in einer Konkurrenzreaktion zueinander stehen (Jones et al., 2000). Durch die vergleichende Sequenzierung der kodierenden Region von *Mor2*, in der kein Unterschied zwischen WT und WR Sequenz gefunden wurde, konnte diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

5.2.2 Das Homöobox-Gen *Otx1*

Am Beginn dieser Arbeit wurde ausgehend vom Epilepsie-Phänotyp der *Otx1*-k.o.-Maus (Acampora et al., 1996) das *Otx1*-Gen als unwahrscheinlich für die *wr*-Mutation angesehen. In der k.o.-Maus liegt allerdings ein *Otx1*-Nullallel vor und Null-Allele zeigen häufig einen anderen Phänotyp als mutierte Allele, so daß der *Otx1*^{-/-}-Phänotyp keinesfalls als ein Ausschlußkriterium betrachtet werden kann. Die in dieser Arbeit gewonnenen vergleichenden Sequenzdaten des *Otx1*-Gens sind zu 100 % identisch zwischen WT und WR und auch in der Expression konnte kein Unterschied festgestellt werden, so daß das *Otx1*-Gen als Kandidat für *wobbler* ausgeschlossen werden kann. Ein weitere Ausschluß-Möglichkeit wäre ein Allelietest mit der *Otx1*^{-/-}-Maus, doch ist diese zur Zeit nicht erhältlich.

5.2.3 Die anonyme cDNA *Homoloc-13*

Die in dieser Arbeit etablierte cDNA-Sequenz *Homoloc-13* zeigte keine Unterschiede zwischen WT und WR. Durch RT-PCR und Northern Blotting konnte außerdem demonstriert werden, daß es in der Transkriptgröße und Expressionsstärke keine Abweichung zwischen WT und WR gibt.

Aufgrund kürzlich veröffentlichter humaner Daten ist zu vermuten, daß noch ein Stück der *Homoloc-13* cDNA-Sequenz fehlt. Da in der humanen Sequenz kein zusätzliches Leseraster vorhanden ist, kann man annehmen, daß es sich um 5'-UTR handelt oder die Sequenz fehlerhaft ist. Man könnte versuchen, mit einer RACE-Reaktion (*rapid amplification of cDNA ends*) das 5'-Ende der Maus-cDNA zu erhalten. Die andere Alternative wäre, auf Sequenzen aus diesem Bereich zu warten.

Solange gibt es keine Möglichkeit festzustellen, ob das vorhandene ATG tatsächlich das Startcodon ist, da es außer zu dem hypothetischen humanen Protein keine weiteren Homologien zu bekannten Proteinen gibt. Bis auf weiteres kann man also die cDNA *Homolobc-13* als Kandidat für die *wobbler* Mutation ausschließen.

5.2.4 Die anonyme cDNA *Kiaa0903*

In dieser Arbeit konnte die vollständige Sequenz der cDNA *Kiaa0903* etabliert werden. In der kodierenden Sequenz der cDNA *Kiaa0903* und außerdem in den Spleißstellen der alternativen Exons wurde keine Mutation gefunden. Auch die Expression ist zwischen WT und WR identisch, so daß die cDNA *Kiaa0903* bis auf weiteres als Kandidat für *wobbler* ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund der identifizierten Proteindomänen, CAAX-Box und Calponin-Homologie-Domäne, kann man schließen, daß es sich bei *Kiaa0903* um ein membranverankertes Signaltransduktionsprotein handelt. Über eine CAAX-Box, wie man sie z.B. in G-Protein alpha- und gamma-Untereinheiten findet, können cytosolische Proteine in der Plasmamembran verankert werden (Glomset et al., 1990). In einer posttranslationalen Modifikation wird an das Cystein dieses Motivs ein Prenyl-Anker gebunden. Die Calponin-Homologiedomäne stellt eine Aktinbindungsdomäne vom Spektrin-Typ dar, wie sie in Cytoskelett- und Signaltransduktionsproteinen vorkommt (entnommen aus der *Pfam*-Datenbank). Zusammenfassend kann man sagen, daß *Kiaa0903* durchaus ein interessanter funktioneller Kandidat für die *wr*-Mutation wäre. Auch das komplexe Spleißmuster läßt *Kiaa0903* als einen sehr interessanten Kandidaten erscheinen, da für mehrere neurologische Erkrankungen bereits Mutationen gefunden wurden, die das korrekte Spleißen beeinträchtigen. Für die humane neurodegenerative Erkrankung FTDP-17 (Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to Chromosome 17) z.B., konnten Spleißstellen-Mutationen im Gen für das Mikrotubuli-assoziierte Protein TAU identifiziert werden (Jiang et al., 2000). Im TAU-Gen werden drei der elf Exons alternativ gespleißt und schon relativ geringe Veränderungen im Verhältnis der Isoformen können die Krankheit auslösen (Grover et al., 1999).

Als zweites Beispiel könnte das SMN1-Gen genannt werden, bei dem kleine Deletionen oder Punktmutationen in den Konsensus-Spleißstellen von Intron 6 und 7 zum Überspringen von Exon 7 führen und so Spinale Muskelatrophie auslösen (Lefebvre et al., 1995). Interessanterweise gibt es beim Menschen eine zweite Kopie

des SMN Gens, SMN2. Die beiden Isogene unterscheiden sich nur durch eine Base, wodurch beim SMN2-Gen Exon 7 übersprungen wird und SMN2 nicht in der Lage ist, Mutationen im SMN1-Gen vollständig zu kompensieren. Im Maus-Modell führt das Ausschalten des einzigen *Smn* Gens zum früh-embryonalen Tod. Bringt man das menschliche SMN2 in diese Tiere ein, so entwickeln sich Symptome einer SMA (Hsieh-Li et al., 2000).

Durch die Sequenzierung aller Spleißstellen bei *Kiaa0903* könnte man ausschließen, daß bei *wobbler* ein Exon differentiell gespleißt wird, welches normalerweise immer im Transkript vorhanden ist.

Bis jetzt konnte nicht gezeigt werden, in welcher Kombination die alternativen Exons in den Transkripten vorkommen, ob sie z.B. nur gemeinsam auftreten, und ob es dabei einen Unterschied zwischen WT und WR gibt. Das Vorkommen der einzelnen alternativen Exons in den unterschiedlichen Transkripten könnte man z.B. durch eine Northern-Hybridisierung mit Exon-spezifischen Sonden überprüfen. Doch wird es schwierig sein, bei einem ca. 4 kb langen Transkript einen Unterschied von 100 bp zu detektieren. Alternativ könnte versucht werden, alle Transkripte mit unterschiedlichem Exongehalt zu klonieren; auch hier muß die RT-PCR optimiert sein, um genügend vollständige Transkripte (ca. 4 kb) für eine Klonierung zu erhalten.

Trotzdem bis jetzt keine Mutation bei *Kiaa0903* gefunden wurde und die Expression augenscheinlich zwischen WT und WR unverändert ist, könnte sich in den ca. 300 kb genomischer Sequenz dieses Gens vielleicht noch eine intronische Mutation verstecken.

5.2.5 Targeting des *Peli1*-Gens

Das *Drosophila* Pellino wurde als Interaktionspartner der Pelle-Kinase im Toll-Signalweg identifiziert. Pelle wird im homologen Interleukin-1-Signalweg bei Säugern mit der Interleukin-Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) gleichgesetzt. Beim Menschen sind bislang drei verschiedene Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinasen bekannt, IRAK, IRAK-2 und IRAK-M (Cao et al., 1996; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1999), bei der Maus eine, die Pelle-like Proteinkinase mPLK (Trofimova et al., 1996; Vig et al., 1999).

Bislang ist keine Interaktion zwischen den IRAKs und PELI1 oder 2 gezeigt worden. Da die Funktionsanalyse des Pellino-Proteins bei Säugern bis jetzt noch nicht sehr

weit fortgeschritten ist, wäre der *knock-out* ein wichtiger Schritt in diese Richtung, besonders da schon andere Gene im IL-1-Signalweg ausgeschaltet wurden. Kürzlich wurde z.B. das Maus-Homolog von IRAK-1 ausgeschaltet (Thomas et al., 1999). Die homozygoten *knock-out*-Mäuse sind gesund und fruchtbar und weisen keinerlei Phänotyp auf. Es wird vermutet, daß andere IRAK-Isoformen die ausgeschaltete Kinase kompensieren können. Ähnlich könnten die *Peli1* k.o.-Mäuse gesund sein, da *Peli2* das Fehlen von *Peli1* kompensieren könnte. Mehr Aufschluß über die putativen Interaktionspartner im IL-1-Signalweg könnte der Doppel-k.o. des IRAK-1-Homologen und *Peli1* bringen.

Durch die Isolierung von drei *Peli1*^{-/-} ES-Zelllinien ist eine gute Grundlage für die Generierung von *Peli1*-k.o.-Mäusen geschaffen worden. Die beiden erzeugten Chimären brachten allerdings keinen transgenen Nachwuchs. Der geringe Grad an Chimärität ließ vermuten, daß keine Keimbahngängigkeit vorliegt. Die Gründe für die geringe Beteiligung der ES-Zellen am Embryo sind wohl in ihrem schlechtem Zustand zu suchen. Da die Kulturbedingungen nicht auf eine Selektion der am schnellsten wachsenden Klone ausgerichtet waren, reichte die langsame Teilungsrate der ES-Zellen nicht aus, um einen substantiellen Anteil des Embryos zu bilden. Durch erneute Anzucht und Selektion auf die am besten wachsenden Zellen, ließen sich die positiv getesteten Klone für eine wiederholte Aggregation einsetzen. Gelingt dies nicht, so müssen noch einmal neue Klone erzeugt und getestet werden.

Zur Bewertung, ob *Peli1* *wobbler* ist, muß der Phänotyp der k.o.-Maus mit dem *wr*-Phänotyp verglichen werden. Wenn kein Phänotyp auftritt oder er nicht mit dem *wr*-Phänotyp korreliert, so kann der Ausschluß des *pel1*-Gens über einen Allelietest erfolgen. Trifft ein *wr*-Allel mit dem k.o.-Allel zusammen und die Mäuse sind gesund, so kann *Peli1* nicht *wobbler* sein.

Mit einem *Peli1*^{-/-} Phänotyp böte sich die Möglichkeit die BAC-Transgenen des *Peli1* tragenden BACs 45m7 zu validieren. Es gibt *wr*-Tiere, die den BAC tragen, aber es ist nicht möglich, die Expression des Transgens nachzuweisen, und so *pel1* als Kandidatengen auszuschließen. Eine erfolgreiche Komplementation des *pel1*^{-/-} Phänotyp durch den BAC könnte die Expression beweisen.

5.5 *wobbler* – die (un-)mögliche Positionsklonierung?

Im Laufe dieser Arbeit sind 35000 bp vergleichende Sequenzen von WT und WR produziert worden. In den hier untersuchten Kandidatengen *Otx1*, *Mor2*, *Homoloc-13* und *Kiaa0903* wurde keine Mutation gefunden. Zusammen mit den von K. Resch in ihrer Doktorarbeit untersuchten und ausgeschlossenen Genen *Peli1*, *Ugp2* und *Hcc8* sind keine Kandidatengene mehr vorhanden (s. 5.1.3.2).

5.5.1 Ist ein regulatorisches Element betroffen?

In Ermangelung von Kandidatengen sollten alle anderen Möglichkeiten, den *wobbler*-Phänotyp auszulösen, geprüft werden.

Es besteht z.B. die Möglichkeit, daß ein nicht-kodierendes regulatorisches Element bei *wobbler* betroffen ist. Im Moment hofft man, solche regulatorischen Elemente durch den Vergleich der Genomsequenz bei Maus und Mensch zu finden (conserved non-coding sequences = CNS) (Hardison, 2000). Bei der Funktionsanalyse einiger CNS hat man herausgefunden, daß sie Gene im Abstand von mehreren Hundert kb regulieren können (Loots et al., 2000). Das läuft natürlich dem Prinzip der Positionsklonierung entgegen, da man auch die Expression aller Gene in der näheren und weiteren Umgebung des nicht-rekombinanten Bereichs analysieren muß.

Die Identifizierung von CNS im Bereich von *Otx1* und *Kiaa0903* wurde in der laufenden Doktorarbeit von J. Choudhuri durch den Vergleich des BACs 123j24 mit vorhandenen humanen Sequenzen gestartet. Die gefundenen konservierten Elemente sind jedoch zahlreich und man muß sich fragen, ob durch die gesetzten Auswahlkriterien vielleicht doch das entscheidende Element übersehen wird.

5.5.2 Liegt eine Inversion der *wr*-Region vor?

Es gibt mehrere Hinweise darauf, daß die *wr*-kritische Region von repetitiven Sequenzen flankiert ist: die Inversion zwischen Maus und Mensch, die dem *wr*-kritischen Intervall entspricht, sowie die Schwierigkeit BACs in den flankierenden Regionen zu finden. Man könnte spekulieren, daß die gesamte Kandidatengenregion beim *wobbler*-Tier invertiert ist. Durch eine veränderte Lage im Chromatin oder durch Unterbrechung von regulatorischen Sequenzen könnten entweder alle oder die flankierenden Gene in ihrer Expression beeinträchtigt sein. Bei der Mausmutante *rump white* (*Rw*) wurde eine, allerdings erheblich größere, 30cM Inversion

nachgewiesen, die in heterozygoten Tieren zu einem Pigmentierungsdefekt und in homozygoten Mutanten zur embryonalen Lethalität führt (Bucan et al., 1995). Am proximalen Inversionsbruchpunkt ist das Gen für das Dipeptidyl-Aminopeptidase-ähnliche Protein 6 (*Dpp6*) unterbrochen und es wird vermutet, daß dies zum embryonalen Tod führt. Am distalen Inversionsbruchpunkt hingegen ist kein strukturelles Gen betroffen, es konnte aber gezeigt werden, daß das ca. 200 kb entfernt liegende Tyrosinkinase-Rezeptor *Kit*-Gen in seiner Expression beeinträchtigt ist und so in heterozygoten Tieren zum Pigmentierungsdefekt führen könnte (Hough et al., 1998).

Eine Inversion der untersuchten Region könnte auch den pleiotropen Effekt, wie er in *wobbler*-Tieren zu beobachten ist, erklären. Ein pleiotroper Effekt kann durch ein Gen, was eine Schlüsselrolle in mehreren Signalwegen einnimmt, verursacht werden; es könnten allerdings auch zwei eng gekoppelte Gene betroffen sein. Wenn durch eine Inversion die beiden flankierenden Gene *Kiaa0903* und *Peli1* beeinträchtigt sind, könnte man außerdem annehmen, daß ein Gen für den neurologischen Phänotyp und ein Gen für den Testis-Phänotyp verantwortlich ist. In diesem Fall würde man außerdem beobachten, daß die Kandidatengenregion sich nicht mehr verkleinern läßt, wie es im Moment der Fall ist.

In der laufenden Doktorarbeit von C. Thiel wird versucht eine chromosomale Umstrukturierung bei der *wobbler*-Maus durch FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) nachzuweisen. Dabei werden BACs aus verschiedenen Regionen des Contigs als Sonden verwendet. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, die für die Auflösung notwendige Streckung der Chromosomen zu erreichen und gleichzeitig diese nicht zu zerbrechen, damit die gesamte Region an einem Stück abgebildet werden kann (pers. Mitteilung C. Thiel).

5.6 Ausblick

Da keine Kandidatengene mehr vorhanden sind und eine Mutation in einer nicht-kodierenden oder intergenischen Region immer plausibler wird, gewinnt die Strategie, den Kandidatengen-Bereich bei *wobbler* zu sequenzieren, an Attraktivität. Der finanzielle Aufwand für die Sequenzierung dieser ca. 1,5 Mb-Region ist natürlich enorm, doch es sind Verhandlungen mit der Firma Ingenium Pharmaceuticals (München) im Gange, die dieses Projekts vielleicht ermöglichen. Die Sequenzierung

der Region beim *wobbler* ist nur mit der Fertigstellung der Maus-Genomsequenz sinnvoll. Denn dann wird das Genom desselben Inzuchtstammes, im dem auch die *wr*-Mutation gehalten wird, C57BL/6J als Referenz zur Verfügung stehen und nicht das des 129 Stammes, wie es bis jetzt durch die Sequenzdaten der BACs verfügbar ist. Zwischen C57BL/6J und 129 treten für eine vergleichende Sequenzierung zu viele stammspezifische Polymorphismen auf, um alle auf Relevanz für die *wobbler* Mutation testen zu können: bei einer Rate von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms= SNPs) zwischen C57BL/6J und 129 von eins zu 1000 (Lindblad-Toh et al., 2000) sind in einer 1,5 Mb Region 1500 SNPs zu erwarten. Auch zwischen dem C57BL/6J und dem C57BL/6J-*wr* werden einige Polymorphismen, die nichts mit der *wr*-Mutation zu tun haben, zu finden sein. Seit dem Auftreten der *wr*-Mutation 1956 und der folgenden Inzuchthaltung des Stammes konnten sich einige Unterschiede zu C57BL/6J ansammeln, wie es z.B. beim stamminternen Polymorphismus im *Cct4*-Gen der Fall ist (Rathke-Hartlieb et al., 1999).

Eine weitere Einengung der *wr*-kritischen Region wäre wünschenswert, um Kandidatengene ausschließen zu können und den Sequenzier-Aufwand zu verringern. Die Weiterführung der Interspezies-Kreuzung allein scheint nicht das Mittel der Wahl. Mit den von C. Thiel in ihrer laufenden Doktorarbeit generierten Deletionsvektoren, können Mäuse erzeugt werden, die hemizygot für bestimmte Teile der Kandidatengenregion sind. Diese Tiere, die meist keinen Phänotyp aufweisen, werden mit *wr*/+ Tieren gekreuzt mit dem Ziel, das *wr*-Allel mit dem deletierten Allel zusammenzubringen. Da das ansonsten rezessive *wr*-Allel im hemizygoten Zustand den Phänotyp auslöst, können alle in der deletierten Region liegenden Gene als Kandidaten für die *wr*-Mutation ausgeschlossen werden, wenn die erzeugten Mäuse gesund sind.

In dieser Arbeit wurden die Sequenzen und Exon-Intron-Strukturen von *Homoloc-13* und *Kiaa0903* erstellt. Es bietet sich nun die Möglichkeit diese bislang völlig unbekanntes Gene einer funktionellen Analyse zu unterziehen. In der gerade laufenden Diplomarbeit von A. Fritzenkötter konstruiert sie einen *targeting* Vektor für die cDNA *Kiaa0903*. Auch für *Homoloc-13* bietet sich ein *knock-out* an, da es sich wie bei *Kiaa0903* um ein recht großes Gen handelt.

Durch die in dieser Arbeit erfolgte Einengung des *wr*-kritischen Bereichs, der Ausdehnung des Contigs und dem Ausschluß von *Kiaa0903*, *Homoloc-13*, *Mor2* und

Otx1 kann man davon ausgehen, daß nun keine Kandidatengene für die *wobbler*-Mutation mehr vorhanden sind. Mit der bevorstehenden Veröffentlichung des Mausgenoms wird sich zeigen, ob in der distalen Lücke doch noch ein Gen zu finden ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Acampora, D., S. Mazan, V. Avantaggiato, P. Barone, F. Tuorto, Y. Lallemand, P. Brulet and A. Simeone (1996). "Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the *Otx1* gene." *Nat Genet* 14(2): 218-22.
- Albertsen, H. M., H. Abderrahim, H. M. Cann, J. Dausset, D. Le Paslier and D. Cohen (1990). "Construction and characterization of a yeast artificial chromosome library containing seven haploid human genome equivalents." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11): 4256-60.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- Augustin, M., P. Heimann, S. Rathke and H. Jockusch (1997). "Spinal muscular atrophy gene wobbler of the mouse: evidence from chimeric spinal cord and testis for cell-autonomous function." *Dev Dyn* 209(3): 286-95.
- Bashir, R., S. Britton, T. Strachan, S. Keers, E. Vafiadaki, M. Lako, I. Richard, S. Marchand, N. Bourg, Z. Argov, M. Sadeh, I. Mahjneh, G. Marconi, M. R. Passos-Bueno, E. d. S. Moreira, M. Zatz, J. S. Beckmann and K. Bushby (1998). "A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B." *Nat Genet* 20(1): 37-42.
- Batley, J., E. Jordan, D. Cox and W. Dove (1999). "An action plan for mouse genomics." *Nat Genet* 21(1): 73-5.
- Breathnach, R. and P. Chambon (1981). "Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins." *Annu Rev Biochem* 50: 349-83.
- Bucan, M., D. L. Nagle, R. B. Hough, V. M. Chapman and C. W. Lo (1995). "Lethality of *Rw/Rw* mouse embryos during early postimplantation development." *Dev Biol* 168(2): 307-18.

-
- Cao, Z., W. J. Henzel and X. Gao (1996). "IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor." *Science* 271(5252): 1128-31.
- Carver, E. A. and L. Stubbs (1997). "Zooming in on the human-mouse comparative map: genome conservation re-examined on a high-resolution scale." *Genome Res* 7(12): 1123-37.
- Chambers, D. M., J. Peters and C. M. Abbott (1998). "The lethal mutation of the mouse wasted (*wst*) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform of translation elongation factor 1alpha, encoded by the *Eef1a2* gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4463-8.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Chumakov, I. M., P. Rigault, I. Le Gall, C. Bellanne-Chantelot, A. Billault, S. Guillou, P. Soularue, G. Guasconi, E. Poullier, I. Gros and et al. (1995). "A YAC contig map of the human genome." *Nature* 377(6547 Suppl): 175-297.
- Cox, D. R., M. Burmeister, E. R. Price, S. Kim and R. M. Myers (1990). "Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes." *Science* 250(4978): 245-50.
- Cox, G. A., C. L. Mahaffey and W. N. Frankel (1998). "Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele." *Neuron* 21(6): 1327-37.
- DeGregorio, L., G. Manenti, A. Simeone and T. A. Dragani (1996). "Genetic mapping of the homeobox-containing gene *Otx1* gene on mouse chromosome 11." *Mamm Genome* 7(3): 241.
- Deloukas, P., G. D. Schuler, G. Gyapay, E. M. Beasley, C. Soderlund, P. Rodriguez-Tome, L. Hui, T. C. Matise, K. B. McKusick, J. S. Beckmann, S. Bentolila, M.

- Bihoreau, B. B. Birren, J. Browne, A. Butler, A. B. Castle, N. Chiannikulchai, C. Clee, P. J. Day, A. Dehejia, T. Dibling, N. Drouot, S. Duprat, C. Fizames, D. R. Bentley and et al. (1998). "A physical map of 30,000 human genes." *Science* 282(5389): 744-6.
- Deng, C. and M. R. Capecchi (1992). "Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus." *Mol Cell Biol* 12(8): 3365-71.
- Denny, P. and M. J. Justice (2000). "Mouse as the measure of man?" *Trends Genet* 16(7): 283-7.
- Dietrich, W. F., J. C. Miller, R. G. Steen, M. Merchant, D. Damron, R. Nahf, A. Gross, D. C. Joyce, M. Wessel, R. D. Dredge and et al. (1994). "A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms." *Nat Genet* 7(2 Spec No): 220-45.
- Dredge, K., Polydorides, A., and Darnell, R. (2001): "The splice of life: alternative splicing and neurological disease". *Nat Rev Neuroscience* 2: 43-50
- Duchen, L. W. and S. J. Strich (1968). "An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse: the mutant 'wobbler'." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31(6): 535-42.
- Falconer, D. (1956). "Wobbler (wr)." *Mouse News Letters* 15: 22.
- Flaherty, L. and B. Herron (1998). "The new kid on the block--a whole genome mouse radiation hybrid panel." *Mamm Genome* 9(6): 417-8.
- Glomset, J., M. Gelb and C. Farnsworth (1990). "Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor." *Trends Biochem Sci* 15 (4): 139-42.
- Green, S. L. and R. J. Tolwani (1999). "Animal models for motor neuron disease." *Lab Anim Sci* 49(5): 480-7.

- Grover, A., H. Houlden, M. Baker, J. Adamson, J. Lewis, G. Prihar, S. Pickering-Brown, K. Duff and M. Hutton (1999). "5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10." *J Biol Chem* 274(21): 15134-43.
- Hardison, R. C. (2000). "Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements." *Trends Genet* 16(9): 369-72.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez and A. Bradley (1991). "The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* 11(11): 5586-91.
- Heimann, P., S. Laage and H. Jockusch (1991). "Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse, wobbler (WR)." *Differentiation* 47(2): 77-83.
- Hough, R. B., A. Lengeling, V. Bedian, C. Lo and M. Bucan (1998). "Rump white inversion in the mouse disrupts dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6 and causes dysregulation of Kit expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13800-5.
- Hsieh-Li, H. M., J. G. Chang, Y. J. Jong, M. H. Wu, N. M. Wang, C. H. Tsai and H. Li (2000). "A mouse model for spinal muscular atrophy." *Nat Genet* 24(1): 66-70.
- Ivell, R., W. Pusch, M. Balvers, M. Valentin, N. Walther and G. Weinbauer (2000). "Progressive inactivation of the haploid expressed gene for the sperm-specific endozepine-like peptide (ELP) through primate evolution." *Gene* 255(2): 335-45.
- Jiang, Z., J. Cote, J. M. Kwon, A. M. Goate and J. Y. Wu (2000). "Aberrant splicing of tau pre-mRNA caused by intronic mutations associated with the inherited dementia frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17." *Mol Cell Biol* 20(11): 4036-48.
- Joh, T., H. Takeshima, T. Tsuzuki, C. Setoyama, K. Shimada, S. Tanase, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama and Y. Morino (1987). "Cloning and sequence

- analysis of cDNAs encoding mammalian cytosolic malate dehydrogenase. Comparison of the amino acid sequences of mammalian and bacterial malate dehydrogenase." *J Biol Chem* 262(31): 15127-31.
- Jones, J. M., J. D. Huang, V. Mermall, B. A. Hamilton, M. S. Mooseker, A. Escayg, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and M. H. Meisler (2000). "The mouse neurological mutant flailer expresses a novel hybrid gene derived by exon shuffling between *Gnb5* and *Myo5a*." *Hum Mol Genet* 9(5): 821-8.
- Karin, M. and T. Hunter (1995). "Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus." *Curr Biol* 5(7): 747-57.
- Kaupmann, K., D. Simon-Chazottes, J. L. Guenet and H. Jockusch (1992). "Wobbler, a mutation affecting motoneuron survival and gonadal functions in the mouse, maps to proximal chromosome 11." *Genomics* 13(1): 39-43.
- Kikuno R., S., M HUGE - A Database of Human Unidentified Gene-Encoded Large Proteins Analyzed by Kazusa cDNA Project. <http://www.kazusa.or.jp/huge/>
- Korthaus, D. (1996). Feinkartierung des Gens *Mor2* für die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase auf Chromosom 11 der Maus in der Nähe des *wobbler*-Gens und seines Homologons MDH1 auf dem humanen Chromosom 2p, Universität Bielefeld.
- Korthaus, D., N. Wedemeyer, A. Lengeling, M. Ronsiek, H. Jockusch and T. Schmitt-John (1997). "Integrated radiation hybrid map of human chromosome 2p13: possible involvement of dynactin in neuromuscular diseases." *Genomics* 43(2): 242-4.
- Korthaus, D., N. Wedemeyer, C. Wiegand and H. Jockusch (1996). "The gene for cytoplasmic malate dehydrogenase, *Mor2*, is closely linked to the wobbler spinal muscular atrophy gene (*wr*)." *Mamm Genome* 7(3): 250.

- Laage, S., G. Zobel and H. Jockusch (1988). "Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal atrophy, wobbler." *Dev Neurosci* 10(3): 190-8.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J.

- A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan and J. Szustakowki (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* 409(6822): 860-921.
- Larin, Z., A. P. Monaco and H. Lehrach (1991). "Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(10): 4123-7.
- Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani and et al. (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene." *Cell* 80(1): 155-65.
- Lengeling, A. (1997). Klonierung und Charakterisierung neuer Kandidatengene für die pleiotrope Mutation *wobbler* der Maus, Universität Bielefeld.
- Lengeling, A., W. E. Zimmer, S. R. Goodman, Y. Ma, M. L. Bloom, G. Bruneau, M. Krieger, J. Thibault, K. Kaupmann and H. Jockusch (1994). "Exclusion of two candidate genes, Spnb-2 and Dcd, for the wobbler spinal muscular atrophy gene on proximal mouse chromosome 11." *Mamm Genome* 5(3): 163-6.
- Lindblad-Toh, K., E. Winchester, M. J. Daly, D. G. Wang, J. N. Hirschhorn, J. P. Lavolette, K. Ardlie, D. E. Reich, E. Robinson, P. Sklar, N. Shah, D. Thomas, J. B. Fan, T. Gingeras, J. Warrington, N. Patil, T. J. Hudson and E. S. Lander

- (2000). "Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse." *Nat Genet* 24(4): 381-6.
- Liu, J., C. Wu, K. Bossie, K. Bejaoui, B. A. Hosler, J. C. Gingrich, M. Ben Hamida, F. Hentati, E. Schurr, P. J. de Jong and R. H. Brown, Jr. (1998). "Generation of a 3-Mb PAC contig spanning the Miyoshi myopathy/limb-girdle muscular dystrophy (MM/LGMD2B) locus on chromosome 2p13." *Genomics* 49(1): 23-9.
- Liu, Q. and G. Dreyfuss (1996). "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein." *Embo J* 15(14): 3555-65.
- Loots, G. G., R. M. Locksley, C. M. Blankespoor, Z. E. Wang, W. Miller, E. M. Rubin and K. A. Frazer (2000). "Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons." *Science* 288(5463): 136-40.
- Marschall, S. and M. Hrabe de Angelis (1999). "Cryopreservation of mouse spermatozoa: double your mouse space." *Trends Genet* 15(4): 128-31.
- Monaco, A. P. and Z. Larin (1994). "YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools." *Trends Biotechnol* 12(7): 280-6.
- Muzio, M., J. Ni, P. Feng and V. M. Dixit (1997). "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." *Science* 278(5343): 1612-5.
- Nabetani, A., I. Hatada, H. Morisaki, M. Oshimura and T. Mukai (1997). "Mouse U2af1-rs1 is a neomorphic imprinted gene." *Mol Cell Biol* 17(2): 789-98.
- Nadeau, J. H. and D. Sankoff (1998). "Counting on comparative maps." *Trends Genet* 14(12): 495-501.
- Nagase, T., K. Ishikawa, M. Suyama, R. Kikuno, M. Hirose, N. Miyajima, A. Tanaka, H. Kotani, N. Nomura and O. Ohara (1998). "Prediction of the coding

- sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro." *DNA Res* 5(6): 355-64.
- Newbery, H. J. and C. M. Abbott (2001). "Of mice, men and motor neurons." *Trends Genet* 17(10): S2-6.
- Niu, S., P. B. Antin and E. Morkin (1996). "Cloning and sequencing of a developmentally regulated avian mRNA containing the LEA motif found in plant seed proteins." *Gene* 175(1-2): 187-91.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Botstein (1989). "A common language for physical mapping of the human genome." *Science* 245(4925): 1434-5.
- Osoegawa, K., M. Tateno, P. Y. Woon, E. Frengen, A. G. Mammoser, J. J. Catanese, Y. Hayashizaki and P. J. de Jong (2000). "Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis." *Genome Res* 10(1): 116-28.
- Pellizzoni, L., N. Kataoka, B. Charroux and G. Dreyfuss (1998). "A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing." *Cell* 95(5): 615-24.
- Pioro, E. P. and H. Mitsumoto (1995). "Animal models of ALS." *Clin Neurosci* 3(6): 375-85.
- Rathke-Hartlieb, S., V. C. Schmidt, H. Jockusch, T. Schmitt-John and J. W. Bartsch (1999). "Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse." *Neuroreport* 10(16): 3411-6.
- Resch, K. (1997). Physikalische Kartierung von Genen und anonymen Markern auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus und dem humanen Chromosomenabschnitt 2p13: Ein Beitrag zur Positionsklonierung des *wobbler*-Gens, Universität Bielefeld.

-
- Resch, K. (2000). Interspezies-Genom-Vergleich im Bereich des humanen Chr 2p13: Neue Kandidatengene für die neurologische Mutation wobbler der Maus, Universität Bielefeld.
- Resch, K., H. Jockusch and T. Schmitt-John (2000). "Assignment of homologous genes, Peli1 and Peli2, for the Pelle adaptor protein Pellino to mouse chromosomes 11 and 14 and human chromosomes 2p13.3 and 14q21, respectively, by physical and radiation hybrid mapping." *Cytogenet Cell Genet*: In Press.
- Resch, K., D. Korthaus, N. Wedemeyer, A. Lengeling, M. Ronsiek, C. Thiel, K. Baer, H. Jockusch and T. Schmitt-John (1998). "Homology between human chromosome 2p13.3 and the wobbler critical region on mouse chromosome 11: comparative high-resolution mapping of STS and EST loci on YAC/BAC contigs." *Mamm Genome* 9(11): 893-8.
- Robberecht, W. (2000): "Genetics of amyotrophic lateral sclerosis." *J. Neurol.* 247 (Suppl.6): VI/2-VI/6
- Scherthan, H., Cremer, T., Arnason, U., Weier, H. U., Lima-de-Faria, A., Fronicke, L. (1994): "Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals." *Nat Genet* 6(4): 342-7.
- Schmidt, V. C. (1997). Ausschluß des Gens *Cct4*, das die delta-Untereinheit des cytosolischen TCP-1 enthaltenden Chaperonin-Komplexes (CCT) kodiert, für die Mutation *wobbler* der Maus und weitere Eingrenzung des Kandidatengenbereichs auf dem proximalen Chromosom 11, Universität Bielefeld.
- Schmitt-John, T., Schmidt, V.C., Augustin, M., Korthaus, D., Jockusch, H. (1998): "Neue genetische Strategie für die Positionsklonierung von "Krankheitsgenen" der Maus": BIOforum 22, Git Verlag, Darmstadt

- Setoyama, C., T. Joh, T. Tsuzuki and K. Shimada (1988). "Structural organization of the mouse cytosolic malate dehydrogenase gene: comparison with that of the mouse mitochondrial malate dehydrogenase gene." *J Mol Biol* 202(3): 355-64.
- Simeone, A., D. Acampora, A. Mallamaci, A. Stornaiuolo, M. R. D'Apice, V. Nigro and E. Boncinelli (1993). "A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo." *Embo J* 12(7): 2735-47.
- Thomas, J. A., J. L. Allen, M. Tsen, T. Dubnicoff, J. Danao, X. C. Liao, Z. Cao and S. A. Wasserman (1999). "Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor- associated kinase." *J Immunol* 163(2): 978-84.
- Trofimova, M., A. B. Sprenkle, M. Green, T. W. Sturgill, M. G. Goebel and M. A. Harrington (1996). "Developmental and tissue-specific expression of mouse pelle-like protein kinase." *J Biol Chem* 271(30): 17609-12.
- Ulbrich, M. (2000). Kartierung von Rekombinations-Bruchpunkten in der *wobbler*-kritischen Region auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus, Universität Bielefeld.
- Valentin, M., M. Balvers, W. Pusch, G. F. Weinbauer, J. Knudsen and R. Ivell (2000). "Structure and expression of the mouse gene encoding the endozepine-like peptide from haploid male germ cells." *Eur J Biochem* 267(17): 5438-49.
- Vig, E., M. Green, Y. Liu, D. B. Donner, N. Mukaida, M. G. Goebel and M. A. Harrington (1999). "Modulation of tumor necrosis factor and interleukin-1-dependent NF- kappaB activity by mPLK/IRAK." *J Biol Chem* 274(19): 13077-84.
- Watson, J. D. (1990). "The human genome project: past, present, and future." *Science* 248(4951): 44-9.

- Wedemeyer, N. (1995). Charakterisierung der *Rab1*-Genregion auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus als Beitrag zur Positionsklonierung des Gens für die spinale Muskelatrophie (Wobblers), Universität Bielefeld.
- Wedemeyer, N., A. Lengeling, M. Ronsiek, D. Korthaus, K. Baer, M. Wuttke and H. Jockusch (1996). "YAC contigs of the *Rab1* and wobbler (*wr*) spinal muscular atrophy gene region on proximal mouse chromosome 11 and of the homologous region on human chromosome 2p." *Genomics* 32(3): 447-54.
- Wesche, H., X. Gao, X. Li, C. J. Kirschning, G. R. Stark and Z. Cao (1999). "IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family." *J Biol Chem* 274(27): 19403-10.
- Wichmann, H., H. Jockusch, J. L. Guenet, D. Gallwitz and K. Kaupmann (1992). "The mouse homolog to the ras-related yeast gene *YPT1* maps on chromosome 11 close to the wobbler (*wr*) locus." *Mamm Genome* 3(8): 467-8.
- Wilson, I., J. Vogel and S. Somerville (1997). "Signalling pathways: a common theme in plants and animals?" *Curr Biol* 7(3): R175-8.
- Zhang, Q. H., M. Ye, X. Y. Wu, S. X. Ren, M. Zhao, C. J. Zhao, G. Fu, Y. Shen, H. Y. Fan, G. Lu, M. Zhong, X. R. Xu, Z. G. Han, J. W. Zhang, J. Tao, Q. H. Huang, J. Zhou, G. X. Hu, J. Gu, S. J. Chen and Z. Chen (2000). "Cloning and functional analysis of cDNAs with open reading frames for 300 previously undefined genes expressed in CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells." *Genome Res* 10(10): 1546-60.

7 ANHANG

7.1 In dieser Arbeit verwendete BACs

Bezeichnung	Größe (kb)	Screening-Marker
227l1	110	147n22rev
238o5	95	147n22rev
95i23	85	147n22rev
177l23	110	147n22rev
165d7	95	9035'n/r
180e24	n.d.	9035'n/r
209f21	200	126p12rev
126p12	80	9035'j/k
238h8	180	9035'j/k
76l14	180	9035'j/k
1d15	40	9035'j/k
109l12	50	123j24rev
150h22	50	123j24rev
126p18	n.d.	123j24rev
230a12	120	123j24rev
123j24	100	<i>Otx1</i>
141e23	90	<i>Otx1</i>
178p10	110	MEST13.9/10
208p2	180	MEST13.9/10
200m2	70	MEST13.9/10
4o23	20	MEST13.9/10
45i18	95	MEST13.4/5
71m17	100	MEST13.4/5
193f23	95	MEST13.4/5
203o19	95	MEST13.4/5
220e4	130	MEST13.4/5
165l14	100	Mor2 e/f
40j13	210	<i>Mor2</i>
139o9	100	<i>Mor2</i>
124l2	95	Peli1
178f18	50	Peli1
71f7	60	Peli1
201l21	100	Peli1 5'
73f6	75	192h3uni
115n4	110	192h3uni
112b18	45	<i>Murr1</i>
120j16	95	<i>Murr1</i>
206b11	145	<i>Murr1</i>
59b5	180	<i>Murr1</i>
192h23	70	<i>Murr1</i>
161e23	70	192h3rev
109g16	50	192h3rev
179b2	95	<i>Cct4</i>

>71m17 uni

GACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTACA
CTTTTTAATCATCATTATGTACAATTAACACAATTTCAAAAAGCCTTCAATATTTAATTTCTTTGCTAGCTAGAAA
TGCTCCCAAGAGTTTTCAATGAACCTCTAGGCAATCATTGAAAGGCAGACAGATATTTCTTATGGGATTACAAGCA
GAAAACCTACATGTGAAGATTGACGCCTTAGTTATGTACACAACATAAAACAAGGTACCTACCAGGCTACTTGACTT
ACCAAGTTTAAACAGTAGCACACCCAAAGGTCTTTGTTGAACCTGAGGAAGAGAAGATCACAGATTTCTCCTCT
TTTAGGCTTCTGGAAAACAACAGGAGGAGCCATCCACTGCATTTGAACAAGACTGCTTGAAACATCAAAGAACTT
CTTGAATTTGCAGAGTCTCCTTCGGTGAGTAATCTTCTGCCAAGAGCTGGATGTTGATAGGGGACAGAGCAATATC
AAAAATTTGTAGCTCCCCTTGGTGTCTGCCAACCCAGAAGAATGGCGCCACTTGGGTGGCAGCTTATCAATGAAgG
CCTAAGTTGAGCCTGGGCCAGGAGAGTACACCACgGtGAGCTTCATAGAGAAAtTACTGAAGAGTCTTcACAGCC
CACGA

>95i23 rev

ATAGAATACTCAAGCTTAACTGTGAAATGATATATGATAATTTGAAAATAATTATGCAGTCTTCAATGAGACACC
ACTAAAGTAAGGCAGTTCTGAATTAAGTAGCATGTGACATTTCCAGTTTTAGCTGCTGTAACTTAATTTGGGTT
TTATCTCAGGATAGAAGTGTCTCTTCAAACATCTCAAGCTGATAAAACATCCAGGCAGAATTTGTCTCCTCTC
AAATTGTACAAAAAGTGTGGGTAGCAAGCCACCGGTAATGGCTTATGGATCTACCCAGACTTACTGAATATTGC
TAGCTGCCTGAGCATTTTTCTTCACTGAAGTGTCTCAGAACATCTGAGTTAAATAGCTCACATAAATAGATCAA
AATAATATTGTATTTAAGTAGCAGATCACTGTATAGTACTGTACTGGCTGGTTTTGTGTGTCAACTTGACACAGG
ATGGAGTTATCGTAGAGAAAGAACTTCAGTTGGGGA

>123e14rev

ATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCAAGGATTCATTTGTTTCAAGTGTAGC
GTTGGATTCCAACCTGTAACCTGTCTGTAACTGACTTTGGGCTGGTGTAGTATTCAAAGGAGAGCTGTGTTTCC
AGTTACATGTGCTAAAACCTCAGGTGACACCTACAGATATATTTTCAATGTTTCTCCTGAACCTATTTCTATGCTT
AAGCAGACATCTCTTCCATGCACCCTAAACTGTCTGTTTTCTTTGAATCACCAAGGTTAACAGCAATTTCTC
ATATGCATTTACTTTTTTTTTATTTAGATTCTATTTATCCAGTCTTAAAGGAAACACAGTTCCTCTCTTTACACC
ACACCATCTCTAATCAAAGAAAGTGAGAGAGAAGATGGAGAAGGAGGGTGGGAGAATTCAAgGGAAGG

>123e14uni

ATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATG
CAAGCTTCTAAAACAAAATATCAAATAGTGTAGAATAATAATGTGCATCATGACTTCAGGGCTATGTTGGCCT
GTTGCTCAGTGAATTTAGAGAACTATCAGAAGAAATGGAGTTTCTAGAGAATTTCTTACAAGGAAGAGTTTGTG
AGGAAAGACCTGCTTGGGGGAGCTACTGAAGTTTAAAGAAACAGAAGAGGCCATGGTATTTCAATCAAGATGACT
CTCTCTTTCCAGCTTGGTCTACAGAGATAGTTCTAGGATAGCCAAGGCTATGTGAAGAAATACTGTCAATTA
ACAACAACAATAACAACAACAACAATGCATACAGAGAAAGGTGTGCTGCTTTCTGACAGGAGCATGGTTT
TTACTGCTCTTGTCTTCTGTGGCAGAAGCTAAGAGCCAGTGAATTTGAATTTGAGAGGTAATAATTCCTTCTGAGTT
CATAGCTGTCTTGTATTTATGGAGGATCAACTTGATGTTGATTTTTAAGACTATTTTA

>126p12uni

GGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTGAAGTTTATCATATA
ACTGCAAGTAAGTCACTCAGTGAGCCCTGCTTTCCAGGTACCAAACAGGCTCCACACCTTTCATGTAATAGACAGTTT
AGAAGAGGCACAGGTAAGCTATATAAATTGTCATTATATGCACAAAGACTGAAGTGGTATGTCTGTAAGTCCATAT
TAAGTTGTAGCTTCTGTGAGCTAGTGCTCATTAAAGATTGATGTTATTTTACTAAGTACTAAGAATAGTCACTAAC
AAATTCTGACATAACATCCTTTTTATGGAAGATTTGACAGACAATAAAAATATATTAAGATATATATCTGAAATTTA
TAATGTGGTATATAAAAGATAAGCAGATATTTGTATAAAAATTTAGCTGCAATTTAGAACCCTACCAAACATAAAAGT
CCACATTACATTTTTGGTGTAGATACTGGTTCTGTCTCTTCTGTCAAATGAAGCATTCTATTTATCCTAAGC
AGAATTCCTTCCATTGTTCTTCTTCTTCTTAAATCATGGTCTTGTGTGTAGCTCAGGTTAGCTGGGAACTCATGG
CAGGCAGCCACCTCCTCTGCCTCCTTATCGAGAAGACTACAGGCAGGAACGACCACCACCTGGTTTACTCTA
AGCAAAGCTTTTGTAGTACAAAGCATGGGGCATGGGGGAGGAACAAGCAAACATAATGCTGTAAATCAGCTGTCA
CGCTCTTCATTCTTGTGTAGCACAcCTAACCTTG

>126p12rev

TTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTAGCAATTTATTTAATGAACAAAAGTGAACCTTAACTTGCACGTA
AGTAACTAAAATTTTATTTTGTCTCTGATAAAAAGTCAAACCTTTCAGTGAATATTAGAATTTTAAAAAGCTTCTAC
ATGCTACCTTTAGTTATAGTTTCTCAATGCTTAAAGGTTTTTCTGATAGAATAGGTGGCAGTATAAAAAATATGAT
TTATTTTTGGTAGAGAATAATGAAATGTTTCAAATATCCAAGAGTCTACAGTTCCCCCAGACACCAAAGTATAAG
ATTGAAAATTTATGGACGAGTGGATAATTCATATAGTGTGCATTATAGTACAATGCAATTTTAAATTTTACAGGGA
TTAAAAGTTCAATTGATAAGGTTTCCACATTTGTGTTACTGTTAACTGTTGAAAAACCATTTATTTGAATTTTGGG
ACGCATCTCAAGTATAAGACCTAAAGTGATATGAAGTTACTAAAATATTTGGGTTTTTTTCCCAACTATATAAC
TGTGAGTCTTGATTTTGTATAATCAAGAAATATATATCATCACACAGATGGAATATACCAGAAGAGTTGACTTTCA
AGTAGACATTAAGAGATTTTTAAGGGAGTGAGAAAGAAAAATACCTTAACCAATGTGGAAACAAACATTTTCTCA

CTAGGATTTTTTTATATAGAAAGGTATATTTATTTTTAAAAACCATGTTATCATGAGTTTGGAATTTTAANTCACC
TATTTTTTAATTTAAAATTTTTTCGTCACCAATATAT

>135c3rev

TGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTACTAAAAGTGAAATGGAGGAAAAGCTTAG
CTGCCTTGGCTTGTGGGGAGAGAAGACCTTTATGCTGAGCAGTGAACACATGTGGCTTAGGGGATTTAAGCTGTA
GTCTAGAAGCAGTATCAGAGTTCTCCAGCTTTTACCAACCTGTGAGAACAGTGAGTCCTTGTTCCTTCTGC
ATCTGCTATCCACCCACTCTCAGTTTGTTTAGGTAATAATGCTGACAGATGAAACTGAAGATCTGAAAGCAAGAC
AAGAATAAGGTAGATGCTTTTACGCTTGTACCTGCTGGGCCACTGAGGGTAAGCATATTTTTATAGGCTCCTGCC
AGCACCCAGTATCCCTCGGCTCTGTTAGAGACATTATCTCTGGGATCTGTAACCATAAACCATCTTCTTTGCTC
ATGGAGGCTAGGGAGTTGTAATAGTTTACAATGCTAGCCCCAATACTACACACACCTGTAGGTTTCTATGTCCT
TGCCATTTTGGATTGTTCTTCTATTAAGTTTTGAACGTTATTCTTTTTTGTGTGTGGCAGTGCAGACCTGAATAG
ATTCCACACTCAATGATATAACAGTGGTGGAGGAAATGGCTAAAAGACTCAAAAAGTTAAAATAAAAATCCCAAGTCA
AGTGCTTTCTTTAAGAAGCTTGCA

>135c3uni

ATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT
TCGCTGGCCTGCAGCTGGAAAAATAATGGAAGCGCAGGGTACTGTCTTTTGTGACAAAAGTTTCTCTGGTATGTT
ACAATTATAACGTAGAAAATGATACCTTAGACGGCAACTAATTTGTGAATCCTGGGAAATGCTCAGTGATTCCTC
ATCAGGACTGCAGAACCTGATCTGTAATAATTTGGGCCTCAGCGGGAGGCTGTTTGCCTGAGCGATTTGCATTT
CAATTGTAGGTCCGGGGCAACCTTTAAATCTTGGCTGGCGCTGGACCACATGGAATTTTTCTTTTTCTTTTTCTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTCTCTGGTGTGCTTGGAAAAAAGAAATGCTATCATA
CATCAATTCACA
ATGGTGTACAGGTGTTACAGTGAAGGAAGTGTGGAGTGGATGGACTTAGTCTCAATGAGCAATTAATaTCCAATG
TCTACAATTGCAAGGGAAATGCTATCCCATGGGTAGGATCAGACCACACATTTGTCTGTTAGCCATAAGCAACCA

>15712uni

ATCACTACAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTTCTG
ACCAACCATCAGTTGAGAATAAGTATTAAAAGATTTTTAGTATAAGAGATTAGCCCCACTTGTATTACAACTCT
CTTTCTGGTCTCATACTGACACATAATACTGATGACCACAGAGGTGCAATGTGTAAACAAGAAAACAAGTCTCT
TTTGTGAAAATCAAATAGACCCAGAAAAGATTTAATGCCATTTAACACAGCATCTTTAGAGCCTGACATAATG
TTTATCAACACAGTAATACTAGCCATTAGCTATTAGCACTTGCCAGAATGGAATAGGTATCTTGTATTGGTCC
TGTTTGAACACCACATAGAAATACTTGGGCTGCAGATATTTATTTTTTAATTGACACAAAAGTCATACGTATTTAT
GGAGTGATAGTGATCTCTTATTATATGTATGCATTGTGCAAGTCAAGACTAGATTAAC

>161e23 uni

TATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTTACAAATGCA
TGGATGACAAGTACATGTCACATACAGATGGATAAATTAATATAGTAGAATTTTTAATTATAAAATTA AAAAGAG
TGGGAGCCAGACGGTGGTGGTGCACCTTTAATCCCAGCACTTGAGAGGCAGAGGCAGGCGGATCTCTGAGTT
CAAAGCCAGCCTGGTCTACAAAAACAGAAAAACAGAAAGGAAAAAGAAAGTGCTTGTGCTCTTCTAGAAGAGCC
AGGGTTGATTCCCAGCACACAAATGGTGAATCACAACCCAGTGTACTGCAGTTTTAGGGGATCAGAGGCTTTTC
TGGTCTCCAATTGAGGCAAAACATTACATACACATGAAATAAACAAATTTAAAAATTAGAAAAAGAAATGTTTCA
ACTAATCTTTTATTAAAAAAACAAAACAAAACAAATTCACAGAATTTTGCATAGCCAGGCACAGTGCTTGTAC
ACGGCTGCAGTCTTAGAACTGGGGAGGAAGGAGGAGGATTTGGAAGATG

>161e23rev

TATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCTAACTGTGAAAAGATTTAAAGAAAAGTTAAAGCAATGAAGGA
ATACAACAACAACAGAAAGCTGCTACAGATGTAAGTGAACAAGAAGGCCATGTTCCAGCCCCAGCAGGCAGCAGG
ACTTGGCAGCTTCAGCCTTGTCTTTCTGGCTTTAGAGGCAAGGATAGAAGAAGGGGGTACAGAAATCTCCCTCTG
CAGCTATGGAAGCCCCTGAGGTGAGGCTTGTGTGAGGGGTGTCCTGCATGGAAGCCCTCTGTGAAGCTGTGAT
TTCCCTCAAGTTGCTGGAGATGCCAGAGTCATTGAATACCTGCTATGGAGAATGCTAACAGAGTATAGAACCAG
CCCAAGAAAGAGAAGTGGGTTGTAGTCAACAAAGCTGATAGGAGTTGGAGATCTGAAGAGCGCTTTGACATCAGA
CATGGAGATGCAGAGTTTAGAGTTTGTCTACTGGATCTTGGTCTTGTCTTGTCCAGCATTTCTTGGTATGTTT
CCTTTCTCCCTTTTGAACCATGGTGTG

>165114rev

AAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTTATTTAGTTTGTATGTGTTTTCAAGGGTAAGCCTAAAA
GAGGTATATTTAATGTGGTTCTCGAATCTTTCAGAGAACTACTGAAAATGGTATGCCCTTCCCAAGCCTTGAGC
AGGCTTGATAAACATTAAGTGTCTTGCATGGTTGAAATCCAGCTGAAACAAAGGATGGTCTGTGGCCTCTCCCTA
TATAAACACAGTGGTGAATTAATACTTTGAGCCTTGATCACTTCATCCTGCTCTTGTGCCCCACCCTTTTCATT
TCCAGCCCCCTTTTTCAGGTAACCCAGTTAATTCATGGCTGCTGGACAGGTACAGGTGGTGTCCAACATGGGGCT
GAAAGTGGGAGATCCACTGAGAAACGCTCAGTGGAGCATTTTTTGGTGGAGCTCCACAAAAAACAACAAACAA
AAAAAACAACCGAAGAAAAATAACAATATCCTGCATGATGATAAGCAACAACAGCATTAATGCTAGTGC

TAAATTTTATTTTTTAGAGGCTGTTGTTGCAGGAGGTGCAATAAGGGGATGCAGGCTAGGTTGAAgAGGTGTTGA
CCCCGATGCTGAATTCACCTAGGGGGTGGCAACAAAAGGG

>177123 uni

CTCGGNACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAACGAGAAAAGTCTGGGACCCAGACC
CCGTCTCCAAGTTGCAACCGTCACTGGCCTCAGCTCCTCTCCTGATCTGCCCCAGCAGAGGGCAATGCCAC
CCACCTCAGTNTATCAAGAGCCANATGAACTCTGTGGCCTGAGACAACCTGTGCCAGGAGCTCCAGCCTCCCTAA
CTTTAACCCAGTTtGATCTTTGTCAAACTAAAAAAGGACTAAAATTGTCTGAGCATGTCTTTCCTTCCAGAA
GTATACATCAGCCTCTTCCACTGTATTTGGATGAAAAGACTTTGGGGATCACACGATTTGGTCAGAGTCGACCC
ACGGC

>178f18uni

GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAA
GCTTCCTTGCTTGAGATCTGTCCGAGTCAAGGACACTCCTGAGTGGAGTGTCCATGGAGACAGACACTGCTGCTT
ACTGCCTTTTTTCCATTTCTCCTATCTTCTGATTTTAAAGTTGCTATGAAATTAAGAGAGTTCAATGCTTGAAG
GATGAAAAGTCCAGTTTTTATCTTATCTGTTCTAGTATTTTATGAGTATTTAACTTCAGGTTGGTTACAAGCAGA
ACTCGGTGTTTTCCATTATCCCTGTGTATTCTCTCTCACGTGTTTGTGTGTGTATGTGTGATGCTGCTCTTA
TGGAGATCAGAGGTCACTTTAAAGCTGTCAATACTCACTTCCACTTTGAGTCAGGTCCTGTACTACATATACTG
GGCTAGGGCCTGTAGGTTTCTGCTGATTTTCTATCTCTGCCCCCATCTCACCATAGGATCTATGATCACAAT
TGCACATTACTGTTCTAGATTATCAGGATTCTAGGGACACAACTCAGATCCTCACCCCGTGTAAAGCCTGCT
TCCATGGACCCATCACCTGTTTTATTTTCTTGCAGACCT

>178p10 uni

GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAA
GCTTATAAACAGCAGGAAAAAAGTTGATTCTTTCATCAATATTTAGAGCAAGGATCTGCAACATTTTCTATAAAA
GTGCATGATAGAAAATATTTAGGCTTTGTAGACTATGATGATGTTATAGCTGTGTTACTCTGACGTTATACCAA
AAAAAATCCTAAATAAATTTCTTAATTGAAGGTCCTTATGTTTCTAAAAAATGTAATTATCATAAAAAACATGAA
TTTCATACAGTGTGTAAATATGCTTTGATTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAAAAGTGCAAAAAGTCTTTT
GTGGGGAGACTTTGGCTACCTAGCTTTTTCTTTTTACTCGAAAGCCTTACAGTGTGGAGGGTAAATTTGGATATG
CACCTTTAGCCATACATATTCTGACCTCAGATTCAGAGTAATGAGGCAGGAGGGTTGCTTTGAGTTTAAAGGTAG
CCTGGAAAGGTCCTCAAAATAAAGtGAATCCTTACTAGCGCATAGCTTGGCTGGTAAGACGGCTTCTGGGGTTAAG
ATACCTGCTACCACGCCTGAGTTCAACCCCTCTGATCTACATGGTGAAGGGAGGGAGCTGGCTCCCCAAGCTGT
CCTCTTGGCCAGAAAGTGCATTACTTGTATAACTCTGGCTCATGTCAGGTGTGGTAGTGTGCACTGTAATTC
GGCACTTGGGAGTTGGAGGCAGGAGAGGCAGATGGTCCAACCACCCATGGGTACACAGTGATTTGAGTTTCAGGC
AGCATGGACTACAGCACATTTACTGcTGGCCAGGC

>192h3uni

TACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT
CCTTAAGGTCCCCAGAAAGATGCCAGTAACTCTATTACCCCATTTAATCAAGCAAAAAAGTAGCTTTTCATGTTG
AAGACCGTGGGCAAGTCACACAGGGGCACTTGTCAATTCCTCCAGACCCAACCCCAACCCCATCCCATCCTA
GGCGCATCTGTCTCCAAGCGAAGGATGTAGGATGGCTACCTGGTGGCCACAGCAGCCACACAATCCTCTCCA
TGGCAGCTATTTGCAACATGAGAATCATCCATCTCTGGGTAAAAATAGAGCCAAACGCTCCAAAGTAGGAAGA
GTGTCTGGGAGAAGAAAGCTGCC

>192h3rev

CTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTGATACAAAATATTGAATTATTCTTTTCAAACAAGTATTACCA
ACTAACTTTAATATTGACAGATGATAAAAGGATACTTGCTAGAGCATAGTAGGTACAGAGTGGAACTCTTAAA
ACATTGAAGTGACCCAGATGGCTTTCTCAGAGTCAGACTATCATCGTCAGGCACTCACAGCCCTATCCCTGAAT
GCAGCCTTGCTGCTTAGAGCACTGTCTATGAAACATTTGGGCTGTGTGCTTGTGTTGGATTTTCTATTACAGATT
AAATGAAGAATCTCTTTGGTATAAACTCCCCTTCAAGTGTGGCATTATAACCATTTTCTTTGAGATTAGAACA
GCCACCTGACTTTGGTGAATTATTTTTGTTCTTTGAATTGTGTTGGATCTTTCAGCATCTGACTGGAATACA
TGTTGTTCTTCGGTGTGTTGGCTGACGATCCCTTTAGTGCAGTGCGGAGGAGATC

>221121rev

GAATTGACTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTATATTTAAAAACATTTCAAAAATGCA
TTTGACTCTTAAATCTAGGCTATACTAGGGAGGATGTTTTTAAATAGAATCAAAACAAATTAAGCTATGGAAGGG
TGTTTGCTATTTTTATATCATTATTATTGTTGGTGTGATGATGATGATGATTTGTGTGTGTACCATGGTGCA
GAGGAGGTTAAAGGGCAACTTTTGGAAAGTCAGTGTGTTTCCATGATAATTGCCATATGAACAGCTATTAATTA
ATAAATGTCTTGGCTCCAGGTAGAGAGCCCAACAGATATGGTNTAAGAAGATGGCTGCTCTGAGTCAGAAAGCCA
GAGAATGGAAGCTGTCTACATCTTGGGGCAGATATTGATTTAACTGTGAATTTAAAAATGGGATTTATTTGCTTT
TAGGATAGATTTATGTACgATTTTATCGAAATCACGTGGGAATTTTGCCTGGGTTTGGAACTAGGAAAGGGAA
AATTTGTACCTGATTTCCAACGT

>221121uni

CGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGG
GTTAGGGAATATAGCTCCCTATAACTATTATCCATTTCTATATGGCCCATCAACATTGGCACTGACCTCTCTTCC
TTTGCCTCCTGATAAAGTGGTAGCTTTGGTCTCCACTTTGCCAAAACATGGATTCTTTTATTTGTTCTAGAATAG
TTAAAAGTTAGAGGCAAATGACCAAAATGGGCTTTGTCTTGAACAGACAACAGGTATGTATATTGGTACACTAAT
AGACAGTCCCTAGGGTTGACAAGAAGTCCAAAGAACCAGGTTCAAAAAATTGAGCCAGGGGACTCCAGAGTTGGC
TCAGTGGTACTTACTAGTTACTCTTGCAGGTAACATGGATTTACTTCCAGTATCCACATGGCATCTCACAGCCA
TCTGTTACTTCAAGTCCCAAGAGTTACCGTATCCTTTTCCAGACTCCCTGGCACTAGGCATACATATGGCGCACA
GATAGATATACATGAGGGCAAACCACTCACACACACACAATGAAAGAAATGATCCAGAGAACTGAGCATGCACAA
CTCTAGTCTTAGCACTTGCAA

>203o19 uni

ACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTAAGG
GTTCTTTGGAAAGTCAGTTGTGTTGGGTGGTGTTTTGTCTGGGACAAGTACATGAAGGAATGTTTCACTGAAGCAG
ATACAGGTGAAAGGATGTTTTATTAAAGCAAGCATGTGAAAGGACACATGATGAAGAATCCTTTCTAACATGTA
TTGGTTTGCCTTACATTGCATAGTTAAGCTCCATTTGTGCAACTGTATAGAGAGAAAATGCACCAAAAAACTTCT
GGCGATGTGCTAGCAGCTTTTTGTCTGCTTCCCTCAGGCTCTGGCTGATTGGTAGAGTGTATTAGCAGAGACAAAC
TCCTGTGCTAAGGCAAGAAGTGTGGAGGACGCTTGATGTTTGCAGGGTGTGTAATAGGACTGAGCAGACGGTGG
TGGAGACTTGAGCTTGGTTTGTCTGTATAGCTAAATGATTCTTGGTCTACATCTTTGCTGATCTTCACTTTGCT
GAGAGAGACAAGGCAGACGTTTTCTGTTGTAATCGCTCCTGATGACTCGTGCTGATTTCAGCCTAGGCCTAGCTG
TCTCTGCTAGGTCATGCCACTGCTGCTGCTATGCCAACTCGACCTAACTGGACAGCTGGTATATCTGTGAAGTGT
TTGCAAGTGGAGCCGAGCTACTGCTTGTGACCTGGGAACTGAAA

>209f21 uni

TCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCTCTG
CAGCCTCCCGCCACCCTGGGCAGTCAGAAGTCTGCAGGAGACCAGTATCTGTGGCCTTCAGTGGGAGGGGTGAGC
AATGTCATTGGTCTGAGGTCAAACAAGGGGGTCTACAATGGCCTGCTTTGTCTCTGCTTTGTCTGTAGAAGGC
TAAATAATATGGTACTCATGGTTAATTCTGAAGAAAAAAGAATCATGCAAACCTAGATTTTTTTTTTCTAAGAA
TTAAAACAGAACAACAATATTTTACCCCATATGCAAAAAACATTCCTTGGGATAGTTGCTACTCTGCCATATGGAG
GGTACTTAGTAGA

>209f21 rev

AAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTTCCCTTAGGTTACTAGCTTGCTTTGGGGTTCTAATTTTGT
CCATACAGATGAGTACCATTTTTTAAGCTTCTGTCTTTTACAATAACTTTTTATAACCCTTTCTGTGCTCATCTCT
AAAAATGTTTACGTTTATATGTTTAGCCATGTTTAAACTCATCTGCAACATTTCTCTTTTGTCTTAAACAATT
CTTGCTAGAAGCTACGTCACTAACCTTCCCATATTAACAAGTCTTCAGCTCTGCTGACCCTAATGAACATTCATC
TTCTATCTCACTTTCTACTCATTTTTTAACATTTGCATCATACTTTCTATGTTTTTATCTATCTAAACTCCTGAA
TTTTGATCAGCTTTTACTGTGCCTATACTGTATTTAAACTATGTATTTCTTGGGGCAGGACCCAAAAGCAAGTCC
CAGAACAAAAGCCAAAGAAAAACCAGGAAGACCCCTGGGCCTGCTGGTCCAGCCAGTCCAGTTAATTGGCAAGTTT
TAGGACAATAAGAAACCTTGTCTCAAAATCCTGAGCCTACACCCACACATGCATG

>220e4 uni

CGAAATCGAGCTCGGtACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGTCTTAGAAAAGTGCAC
AAATTCAAGTGCACATTTTTTTTCTAAGTAAATACATTCACGAGGTCAAATCAGGAATCAAAAAATAGAACATTGC
CAGAACCTAAGAGCTGTATTTTCTCATTATATTCATTAACCTGTGCCAGCTCTAATGATGAGTTCTTAGCCCAT
GATTTAGTACATGAAATGGATTATGTAAATATAATTATGACATTTGGAGATAAGTCCAGAGAGAAGAAATTACTT
GCTTTAGGTCAAAAACAATTTAGCACAGGAATTAAGGTAGTCTTCAAACCTGCTATGACCCATCCAGTATTCAT
CCTATCTTGCCACCGATTTTTGTTTTAATTAACAATGGCAAGAAACCGACAAATCTATTGGATGTTAGCTCACTA
TTTCTCTAATGTAGAGTCAAGACTTCCAAACATGAAGGtTTAGTATATGTATCATTTTACCATCTTCCACATATC
TATCTCAAAAACATTGTGCTTCTCATATTGTAGTAGACAACAGAGACAATTAGATACTCAGAGATGGGTCTCAAA
ATACATTTGCATAAGGCAAAGTATAAATAGAAAATATAACTCTCCTTTATCAGTAACTGTCTTCTGGCAAAAGAT
TCgATTACgTGGTGTtTTCACATTGG

7.2 Vergleichende Sequenzierungen der Kandidatengene

7.2.1. *Mor2*

7.2.1.1 Gesamtsequenz mit Primer-Positionen

AGTCTGTTCCGCTGTAGAGGTGACCTGACTGCTGGAGACTGCCTTTTGCAGGTGCAGAGATCGGCCTTGCAGTTT

MOR2 5'

GCAATAATGTCTGAACCAAT**CAGAGTCCTTGTG**ACTGGAGCAGCTGGTCAAATTGCATATTCACTGTTGTACAGT

mor2e>

ATTGGAAATGGATCTGTCTTTGGGAAAGACCAGCCCATCATTCTTGTGCTGTTGGACATCACCCCATGATGGGT

GTTCTGGACGGTGTCTCT**GATGGA**ACT**GCAAGACTGTG**CCCTTCCCCTTCTGCAGGATGTCATTGCAACGGACAAA

<MOR2F

GAAGAGATTGCCTTCAAAGACCTGGATGTGGCTGTCTAGTGGGCTCCATGCCAAGAAGGGAAGGCATGGAGAGG

AAGGACCTACTGAAAGCCAATGTGAAAATCTTCAAATCCCAGGGCACAGCCTTGGAGAAAATACGCCAAGAAAATCA

GTTAAGGT**CATTGTTGTGGGAA**ACCAGCCAATACGAACTGCCTGACAGCCT**CCAAGTCAGCGCCATCGAT**CCCC

MOR2G **<MOR2H**

AAGGAGAATTT**CAGTTGCCTGACTCGCTTGGACCACA**ACCAGCAAAAATCTCAAAT**TGCTCTTAAACTCGGTGTA**

ACCGCTGATGATGTAAAGAATGT**CATTATCTGGGGAAATCATT**CATCGACCCAGTATCCAGATGTCAATCATGCC

MOR2C

AAGGTGAAACTGCAAGGAAAGGAAGTCGGTGTGTATGAAGCCCTGAAAGACGACAGCT**GGCTGAAGGGAGAGTTC**

MOR2A

ATCAGACT**GTGCAACAGCGTGGTGTGCTGT**CATCAAGGCTCGGAAGCTGTCCAGTGCAATGTCTGCTGCGAAA

<MOR2B

GCCATCGCAGACCACATCAGAGACATCTGGTTTGGAAACCCAGAGGGAGAGTTCGTGTCGATGGGTGTTATCTCT

GATGGCAACTCCTATGGTGTCCCTGATGACCT**GCTCTACTCACTCCCTGT**CGTGATCAAGAATAAGACCT**GGAAG**

MOR2INT8A **<MOR2INT8B**

TTTGTGTAAGGCCTCCCATTAATGACTTCTCCCGTGAAAAGATGGACCTGACAGCAAAGGAGCTGACCGAGGAA

AAGGAGACCGCTTTT**GAGTTTCTCCTCTGCGT**GACTAGACACTCGTTTTGACATCAGCAGACAGCCGAAGGCT

GAGGAATCAAATGT**CGTCTTTGAGCCTAGTACCAAACAGTAATAAT**GCTACATTCAAAT**TGTGAACAGCAAAAAT**

ATTTTAAATAGTGTGTGCTTTATGATTTGT**GAAAGTCTATCATGTTGTTAGTGC**TGCAATCTAAATAAAAAGTATA

TTCAAGTAAAAAT **<MOR2 3'**

7.2.1.2 Sequenzdaten von WT und WR

>WT 5'f mit Primer f

AGACACGTCCAGAACACCCATCATGGGGGTGATGTCCAACAGCACAAAGAATGATGGGCTGGTCTTTCCCAAAGAC

AGATCCATTTCCAATACTGTACAACAGTGAATATGCAATTTGACCAGCTGCTCCAGTCACAAGGACTCTGATTGG

TTCAGACATTATTGCAAACCTGCAAGGCCGATCTCTGCACCTGCAAAAAGGCAGTCTCCAGCAGTCAGGTCACCTCT

ACAGC

>WR 5'f mit Primer f

AGGACACGTCCAGAACACCCATCATGGGGGTGATGTCCAACAGCACAAGAATGATGGGCTGGTCTTTCCCAAAGA
CAGATCCATTTCCAATACTGTACAACAGTGAATATGCAATTTGACCAGCTGCTCCAGTCCAAAGGACTCTGATTG
GTTTCCAGACATTATTGCAAAGTCAAGGCCGATCTCTGCACCTGCAAAAAGGCAGTCTCCAGCAGTCCAGGTCACCTC
TAAGC

>WT he mit Primer e

AGCAGCTGGTCAAATTGCATATTTCACTGTTGTACAGTATTGGAAATGGATCTGTCTTTGGGAAAGACCAGCCCAT
CATTCTTGTGCTGTTGGACATCACCCCCATGATGGGTGTTCTGGACGGTGTCTGATGGAAGTCAAGACTGTGC
CCTTCCCCTTCTGCAGGATGTCATTGCAACGGACAAAGAAGAGATTGCCTTCAAAGACCTGGATGTGGCTGTCTT
AGTGGGCTCCATGCCAAGAAGGGAAGGCATGGAGAGGAAGGACCTACTGAAAGCCAATGTGAAAATCTTCAAATC
CCAGGGCACAGCCTTGGAGAAATACGCCAAGAAATCAGTTAAGGTCATTGTTGTGGGAAACCCAGCCAATACGAA
CTGCCTGACAGCCTCCAAGTCAGCGC

>WR he mit Primer e

TGGAGCAGCTGGTCAAATTGCATATTTCACTGTTGTACAGTATTGGAAATGGATCTGTCTTTGGGAAAGACCAGCC
CATCATTCTTGTGCTGTTGGACATCACCCCCATGATGGGTGTTCTGGACGGTGTCTGATGGAAGTCAAGACTG
TGCCCTTCCCCTTCTGCAGGATGTCATTGCAACGGACAAAGAAGAGATTGCCTTCAAAGACCTGGATGTGGCTGT
CCTAGTGGGCTCCATGCCAAGAAGGGAAGGCATGGAGAGGAAGGACCTACTGAAAGCCAATGTGAAAATCTTCAA
ATCCCAGGGCACAGCCTTGGAGAAATACGCCAAGAAATCAGTTAAGGTCATTGTTGTGGGAAACCCAGCCAATAC
GAACTGCCTGACAGCCTCCAAGTCAGCGCAT

>WT he mit Primer h

AGCTGTGAGGCAGTTCGTATTGGCTGGGTTTCCACAACAATGACCTTAACTGATTTCTTGGCGTATTTCTCCAA
GGCTGTGCCCTGGGATTTGAAGATTTTACATTTGGCTTTTCAAGTAGGTCCTTCCCTCCTCCATGCCTTCCCTTCTTG
CATGGAGCCCCTAGGACAGCCACATCCAGGTCTTTGAAGGCAATCTCTTCTTGTCCGTTGCAATGACATCCTG
CAGAAGGGGAAGGGCACAGTCTTGCAGTTCATCAGGACACCGTCCAGAACACCCATCATGGGGGTGATGTCCAA
CAGCACAGAATGATGGGCTGGTCTTTCCCAAAGACAGATCCATTTCCAATACTGTACAACAGTGAATATGCAAT
TTGACCAGCTGCTCCAGTCAAGGACTCTGATTAA

>WR he mit Primer h

AGTGTGAGGCAGTTCGTATTGGCTGGGTTTCCACAACAATGACCTTAACTGATTTCTTGGCGTATTTCTCCAA
GCTGTGCCCTGGGATTTGAAGATTTTACATTTGGCTTTTCAAGTAGGTCCTTCCCTCCTCCATGCCTTCCCTTCTTG
ATGGAGCCCCTAGGACAGCCACATCCAGGTCTTTGAAGGCAATCTCTTCTTGTCCGTTGCAATGACATCCTGC
AGAAGGGGAAGGGCACAGTCTTGCAGTTCATCAGGACACCGTCCAGAACACCCATCATGGGGGTGATGTCCAA
AGCACAGAATGATGGGCTGGTCTTTCCCAAAGACAGATCCATTTCCAATACTGTACAACAGTGAATATGCAAT
TGACCAGCTGCTCCAGTCAAGGACTCTGATT

>WT gb mit Primer b

AGTCGTGATGAACTCTCCCTTCCAGCCAGCTGTGCTTTTCAAGGGCTTCATACACACCGACTTCCCTTCCCTTGCAG
TTTACCTTGGCATGATTGACATCTGGATACTGGGTCGATGAATGATTTCCCAAGATAATGACATTTCTTTACATC
ATCAGCGGTTACACCGAGTTTAAAGAGCAATTTGAGATTTTGTCTCGGTTGTGGTCCAAGCGAGTCAAGCAACTGAA
ATTCTCCTTGGGGATCGATGGCGCTGACTTGGAGGCTGTGAGGCAGTTCGTATTGGCTGGGTTTCCACAACAAT
G

>WR gb mit Primer b

TCGTGATGAACTCTCCCTTCCAGCCAGCTGTGCTTTTCAAGGGCTTCATACACACCGACTTCCCTTCCCTTGCAGTT
TCACCTTGGCATGATTGACATCTGGATACTGGGTCGATGAATGATTTCCCAAGATAATGACATTTCTTTACATCAT
CAGCGGTTACACCGAGTTTAAAGAGCAATTTGAGATTTTGTCTCGGTTGTGGTCCAAGCGAGTCAAGCAACTGAAAT
TCTCCTTGGGGATCGATGGCGCTGACTTGGAGGCTGTGAGGCAGTTCGTATTGGCTGGGTTTCCACAACAATG

>wtcInt8b mit Primer Int8b

TATTCTTGATCACGACAGGSAATGAGTAGAGCAGGTCATCAGGGACACCATAGGAGTTGCCATCAGAGATAACA
CCCATCGACACGAACTCTCCCTCTGGGGTTCCAAACCAGATGTCTCTGATGTGGTCTGCGATGGCTTTTCGAGCA
GACATTGCACTGGACAGCTTCCGAGCCTTGGATGACAGCAGCACCACGCTGTTGCACAGTCTGATGAACTCTCCC
TTCAGCCAGCTGTGCTTTTCAAGGGCTTCATACACACCGACTTCCCTTCCCTTGCAGTTCACCTTGGCATGATTG
ACATCTGGATACTGGGTCGATGAATGATTTCCCAAGATAATGACATTTCTTTACATCATCAGCGGTTA

>wrcInt8b mit Primer Int8b

TTATTCTTGATCACGACAGGGGAATGAGTAGAGCAGGTCATCAGGGACACCATAGGAGTTGCCATCAGAGATAAC
 ACCCATCGACACGAACTCTCCCTCTGGGGTTCCAAACCAGATGTCTCTGATGTGGTCTGCGATGGCTTTCGCAGC
 AGACATTGCACTGGACAGCTTCCGAGCCTTGATGACAGCAGCACCACGCTGTTGCACAGTCGTGATGAACTCTCC
 CTTACAGCCAGCTGTCGTCTTTTCAGGGCTTCATACACACCGACTTCCTTTTCCTTGAGTTTCACCTTGGCATGATT
 GACATCTGGATACTGGGTGATGAATGATTTCCCCAGATAATGACATTCTTTACATCATCAGCGGTTA

>wtcInt8b mit Primer mor2c

ATGTCATTATCTGGGGAAATCATTTCATCGACCCAGTATCCAGATGTCAATCATGCCAAGGTGAAACTGCAAGGAA
 AGGAAGTCGGTGTGTATGAAGCCCTGAAAGACGACAGCTGGCTGAAGGGAGAGTTCATCACGACTGTGCAACAGC
 GTGGTGCTGCTGTTCATCAAGGCTCGGAAGCTGTCCAGTGCAATGTCTGCTGCGAAAGCCATCGCAGACCACATCA
 GAGACATCTGGTTTTGGAACCCCAGAGGGAGAGTTCGTGTGATGGGTGTTATCTCTGATGGCAACTCCTATGGTG
 TCCCTGATGACCTGCTCTACTCATTCCCTGTGCTGATCAAGAATWMGACCTGGAAGTTTGTGTTGAA

>wrc Int8b Primer mor2c

ATGTCATTATCTGGGGAAATCATTTCATCGACCCAGTATCCAGATGTCAATCATGCCAAGGTGAAACTGCAAGGAA
 AGGAAGTCGGTGTGTATGAAGCCCTGAAAGACGACAGCTGGCTGAAGGGAGAGTTCATCACGACTGTGCAACAGC
 GTGGTGCTGCTGTTCATCAAGGCTCGGAAGCTGTCCAGTGCAATGTCTGCTGCGAAAGCCATCGCAGACCACATCA
 GAGACATCTGGTTTTGGAACCCCAGAGGGAGAGTTCGTGTGATGGGTGTTATCTCTGATGGCAACTCCTATGGTG
 TCCCTGATGACCTGCTCTACTCATTCCCTGTGCTGATCAAGAATAAGACCTGGAAGTTTGTGTTGAA

>WT3'8a gelesen mit 3'

TCATAAAGCACACACTAGTTTA_gTAATATTTTGTGTTTACAATTTGAATGTAGCATTATTACTGTTTGGTACTA
 GGCTCAAAGACGACATTTTATTCCCTCAGCCTTCGGCTGTCTGCTGATGTCAAAACGAGTGTCTAGTCACGCAGA
 GGAGAGAAACTCAAAGCGGTCTCCTTTTTCCTCGGTGAGCTCCTTTTGTGTCAGGTCCATCTTTTACGGGAGAA
 GTCATTAATGGGGAGGCCTTCAACAAACTTCCAGGTCTTATTCTTGATCACGACAGGGAGTGAGTA

>WR3'8a gelesen mit 3'

TCATAAAGCACACACTATTTAAATATTTTGTGTTTACAATTTGAATGTAGCATTATTACTGTTTGGTACTAGG
 CTCAAAGACGACATTTTATTCCCTCAGCCTTCGGCTGTCTGCTGATGTCAAAACGAGTGTCTAGTCACGCAGAGG
 AGAGAAACTCAAAGCGGTCTCCTTTTTCCTCGGTGAGCTCCTTTTGTGTCAGGTCCATCTTTTACGGGAGAA
 CATTAAATGGGGAGGCCTTCAACAAACTTCCAGGTCTTATTCTTGATCACGACAGGGAGTGAGTA

7.2.2 Otx1

Exon 1:

>WT555 seq 1.2

TGACTGCTCTGGCCTCAGGCCCTGGNTCCGTCGGGGCACCTCCACCCGGCTGTTAGCATGATGTCTTACCTCA
 AACAACCCCATACGGCATGAACGGGCTGGGCCTAGCTGGCCCTGCCATGGACCTCCTGCACCCCTCCGTGGGCT
 ACCCTGGTGAGCAGTGGCCCTCTGCCCTACCCTCAAACCTCTGTAAATATTGGGGGATTCATCCTCTACAGTT
 TGAA

>WT555-int1a

GAGGTTTGAGGGTAGGGGCAGAGGGCCACTGCTCACCAGGGTAGCCACGGAGGGGTGCAGGAGGTCCATGGCAG
 GGCCAGCTAGGCCAGCCGTTTCATGCCGTATGGGGTTGTTTGGAGGTAAGACATCATGCTAACAGCCGGGTGGA
 GGTGCCCCGACGGATCCAGGGGGCCTGAGGCCAGGAGCAGTTCAGGGCTCCCACTGCGAAGTCCCTTCAAGCTGTT
 GCTTCTGGGGCCTGGCCTANGGAGACAGCAGACATGGAAACCTTCAACCCGAGTCAGTTTGGCTTTTACGCTC
 CTCTAATCCTTGAATGGGGAGGGGGCGCGTGTAGGAACTGCACAGCAGGCAATCCGAGAAAACGTCCTTCTCCTTT
 AGCTCGGCAGCTACACAGCTTCTCAGGAAAGTAACTTTTCCACATCGTTTCTTCTTTT

>WR 555 seq 1.2

TGAACTGCTCCTGGCCTCAGGCCCTGGATCCGTCGGGGCACCTCCACCCGGCTGTTAGCATGATGTCTTACCT
 CAAACAACCCCATACGGCATGAACGGGCTGGGCCTAGCTGGCCCTGCCATGGACCTCCTGCACCCCTCCGTGGG
 CTACCCTGGTGAGCAGTGGCCCTCTGCCCTACCCTCAAACCTCTGTAAATATTGGGGGATTCATCCTCTACAG
 TTTGA

>WR555-int1a

GAGGTTTGAGGGTAGGGGCAGAGGGCCACTGCTCACCAGGGTAGCCACGGAGGGGTGCAGGAGGTCCATGGCAG
 GGCCAGCTAGGCCAGCCGTTTCATGCCGTATGGGGTTGTTTGGAGGTAAGACATCATGCTAACAGCCGGGTGGA

GGTGCCCCGACGGATCCAGGGGGCCTGAGGCCAGGAGCAGTTTCAGGGCTCCCCTGCGAAGTCCCTTCAAGCTGTT
 GCTTCTGGGGCCTGGCCTAGGGAGACAGCAGACACATGGAAACCTTCACCCGACAGTCAGTTTGGCTTTCAGCTC
 CTCTAATCCTTGAATGGGGAGGGGGCGCGTGTAGGAACTGCACAGCAGGCAATCCGAGAAAACGCTTCTCCTTT
 AGCTCGGCAGCTACACAGCTTCTCAGGAAAAGTAACTTTTCCACATCGTTTCTTCTCTTTTAGGGCTTGACAA
 GGGCCAAAGACACTCCTCGAGTGTCAACAGGAAGGAAAAGTTAAAGCGTGATCAGGCTGAGGAGGTGAGAGCCGG
 GACCGCGGAGGGTGCAAAATCCCAAGTGAAGTCAATTTTTTTTTTTT

Exon 2:

>WT231-int2c

AGTCCGAGGGGGCGGANNNGTAGCTCCACTAGCCAGCCCCCTGATCCCCTCTCCTTACCCCTGCTCACTGTAGGTT
 TGGTTCAAGAACC GCCGCGCCAAGTGCCGCCAGCAGCAGCAGAGCGGGAATGGAACGAAAACCCGNCGTCANG
 AAGAAGTCGTNTCCAGTANGCGAGAGCTCGGGTTCAGAGAGCAGCGGCCAGTTTACGCCGCCCGCCGTATCNAGC
 TCTGCTTCTTCGTCTAGCTCAGCGTCCAGTGCCTCCGCCAACCCCGCGGCTGCTGCGGCCGCGGGCCTGGGTGGG
 AACCCAGTGGCAGCAGCGTCTCTCTGAGCACGCCTACTGCTTTCGTCCATCTGGAGCCCGGCCTCCATCTCGCCG
 GGCTCAGCGCCGACATCCGTATCGG

>WT231-231b

GCTGAGAGCGAGAGCGTACTNCTATTCCGGGAAAGAAACGGAGGGCCAAGTGGGAGCACCGGGCCCCACCTCCAA
 GGGGAGAAGGGCTGCATCCTCCACCCCCAACCAAGTGGCACACAGATGGGAGCGGCAGTGCAGGCAATGAATAT
 CTTTTGGGGGACTGAAAATTAAGTTTTGGAAAAGCCAAGGCAAAGGCGGGTGGNGCAGCAGCAACAGGATGG
 GGACCATGGAGGGTATAGGTAGTTGCGTTTTCTTCTCCACTTCCCTTTCCCTCCTGGGCTCACAAGACCTGGAACCC

>WR231-int2c

GTCCGAGGGGGCGGANNNGTAGCTCCACTAGCCAGCCCCCTGATCCCCTCTCCTTACCCCTGCTCACTGTAGGTTT
 GGTTCAGAACC GCCGCGCCAAGTGCCGCCAGCAGCAGCAGAGCGGGAATGGAACGAAAACCCGCGCGTCAAGA
 AGAAGTCGTCTCCAGTACGCGAGAGCTCGGGTTCAGAGAGCAGCGGCCAGTTTACGCCGCCCGCCGTATCTAGCT
 CTGCTTCTTCGTCTAGCTCAGCGTCCAGTGCCTCCGCCAACCCCGCGGCTGCTGCGGCCGCGGGCCTGGGTGGGA
 ACCCAGTGGCAGCAGCGTCTCTCTGAGCACGCCTACTGCTTTCGTCCATCTGGAGCCCGGCCTCCATCTCGCCGG
 GCTCAGCGCCGACATCCGTATCGGTGCCAGAGCCACTGGCCGCTCCGAGCAACGCCCTCGTGCATGCAGCGTCCGG
 TAGCCGCAGGTGCGGCCACTGCCGCAGCCTCCTACCCTATGTCTATGGCCAGGGCGGAAGCTATGGTTCAGGGAT
 ACCCCGCGCCCTCCTCTTCTTACTTTGGCGGTGTAGACTGCAGCTCCCTTACCTAGCGCCCATGCACTCTCATCAC

>WR231-231b

CGCACGAGCTGAGAGCGAGAGCGTACTGCTATTCCGGGAAAGAAACGGAGGGCCAAGTGGGAGCACCGGGCCCCAC
 CTCCAAGGGGGAGAAGGGCTGCATCCTCCACCCCCAACCAAGTGGCACACAGATGGGAGCGGCAGTGCAGGCAAT
 GAATATCTTTTGGGGGACTGAAAATTAAGTTTTGGAAAAGCCAAGGCAAAGGCGGGTGGTGCAGCAGCAGCAACA
 GGATGGGGACCATGGCAGGGTATAGGTAGTTGCGTTTTCTTCTCCACTTCCCTTTCCCTCCTGGGCTCACAAGACCT
 GGAACCGCCACGAGGCTTGGTCTTATAGTCCAGACAGTCCGGGAGAGTTGAAATTGAGTTTCCAGGCAGAGGAAAG
 CAGCGGCGGGCGGGCTCCTTGTAATCCAAGCAATCGGCAGAATTGAAGGCGAG

Exon 3

>WT Exon 3 mt Primer Otx1.7

GGGCGGGTTTTCGTTTATTCCCGCTCTGCTGCTGCTGGCGGCACTTGGCGGGCGGTTCTTGAACCAAACCTACA
 GTGAGCAGGGTGAAGGAGAGGGGATCAGGGGGCTGGCTAGTGGAGCTACTCCTCCGCCCTCGGACTCATACCC
 GCCCAGGATCTCGGGAAGCTCTCAATCC

>WT Exon 3 Primer Otx1.Int2c

GGCGGGTATGAGTCCGAGGGGGCGGAGGAGTAGCTCCACTAGCCAGCCCCCTGATCCCCTCTCCTTACCCCTGCT
 CACTGTAGGTTTTGGTTCAAGAACC GCCGCGCCAAGTGCCGCCAGCAGCAGCAGAGCGGGAATGGAACGAAAACCC
 GGCCGGTCAAGAAGAAGTCGTCTCC

>WT Exon3 Primer otx1.8

TGGCCGCTCCGAGCACGCCTCNTGCATGCAGCGCTCGGTAGCCGAGGTGCGGCCACTGCCGCAGCTCCTACCC
 TATGTCTATGGCCAGGGCGGAAGCTATGGTCAGGGATACCCCGCGCCCTCCTTCTTACTTTGGCGGTGTAGA
 CTGCAGCTCCTACCTAGCGCCCATGCACTCTCATCACACCCGACCCAGCTTAGCCCCATGGCACCTCCTCCAT
 GGCTGGCCATCATCACCATCACCCTCATGCGCACCCACTGAGCCAATCTTACAGCCACCACCACCACCTCA
 CCACCACCACCACCAAGGTTATGGAGGCTCTGGGCTCNCCTTCAATTCTGCCGATTGCTTGGATTACAAGGA
 GCCCNCCGCCCGCTGCTTCTCTGCTGGAAACTCAATTTCAACTCTCCCGACTGTCTGGACTATAAGGACCA
 AGCCTCGTGGCGGTTCCAGGTCTTGTGAGCCCCGGAGGGAAAGGAAGTGG

>WT Exon3 Primer otx1.3

```
TTCACGCCGCCCGCTATCTAGCTCTGCTTCTTCGTCTAGCTCAGCGTCCAGTGCCTCCGCCAACCCCGCGGCT
GCTGCGGCCCGCGGCTGGGTGGGAACCCAGTGGCAGCAGCGTCTCTCTGAGCACGCCTACTGCTTCGTCCATC
TGGAGCCCCGCGCTCCATCTCGCCGGGCTCAGCGCCGACATCCGTATCGGTGCCAGAGCCACTGGCCGCTCCGAGC
AACGCCTCGTGCATGCAGCGCTCGGTAGCCGACAGGTGCGGCCACTGCCGAGCCTCCTACCCTATGTCTATGGC
CAGGGCGGAAGCTATGGTCAGGGATACCCCGCGCCCTCCTCTTCTTACTTTGGCGGTGTAGACTGCAGCTCCTAC
CTAGCGCCCATGCACTCTCATCACCACCCGACCAAGCTTAGCCCCATGGCACCCTCCTCCATGGCTGGCCATCAT
CACCATCACCCTCATGCGCACCACCCACTGAGCCAATCTTCAGGCCACCACCACCACCATCACCACCACCACCAC
CACCAAGGTTATGGAGGCTCTGGGCTCGCCTTCAATTCTGCCGATTGCTTGGATT
```

>WT Exon3 Primer Otx1.int2c

```
AGTCCGAGGGGCGGANNNGTAGCTCCACTAGCCAGCCCCCTGATCCCCCTCTCCTTCACCCTGCTCACTGTAGGTT
TGTTTCAAGAACCGCCGCGCCAAGTGCCGCCAGCAGCAGCAGAGCGGGAATGGAACGAAAAACCCGNCGGTCCANG
AAGAAGTCGTNTCCAGTANGCGAGAGCTCGGGTTCAGAGAGCAGCGCCAGTTTACGCCGCCCGCCGTATCNAGC
TCTGCTTCTTCGTCTAGCTCAGCGTCCAGTGCCTCCGCCAACCCCGCGGCTGCTGCGGCCGCGGGCTGGGTGGG
AACCCAGTGGCAGCAGCGTCTCTCTGAGCACGCCTACTGCTTCGTCCATCTGGAGCCCGCCTCCATCTCGCCG
GGCTCAGCGCCGACATCCGTATCGG
```

>WT Exon3 Primer Otx1.231b

```
GCTGAGAGCGAGAGCGTACTNCTATTCCGGGAAAGAAACGGAGGGCCAAGTGGGAGCACCGGGCCCCACCTCCAA
GGGGGAGAAGGGCTGCATCCTCCACCCCCAACCAAGTGGCACACAGATGGGAGCGGCAGTGCAGGCAATGAATAT
CTTTTGGGGGACTGAAAATTAAGTTTTGGAAAAGCCAAGGCAAAGGCGGGTGGNGCAGCAGCAACAGGATGG
GGACCATGGAGGGTATAGGTAGTTGCGTTTTCTTCTCCACTTCTTTTCCCTCCTGGGCTACAAGACCTGGAACCG
```

> WR Exon 3 Primer Otx1.Int 2c

```
CTGGGCGGgGTATGAGTCCGAGGGGCGGAGGAGTAGCTCCACTAGCCAGCCCCCTGATCCCCCTCTCCTTCACCCT
GCTCACTGTAGGTTTGGTTCAAGAACCGCCGCGCCAAGTGCCGCCAGCAGCAGCAGAGCGGGAATGGAACGAAAA
CCCGGCCGGTCAAGAAGAAGTCGTCTCC
```

>WR Exon 3 Primer Otx1.7

```
GGCGGTTTTTCGTTTCAATTCCTGCTGCTGCTGGCGGCACTTGGCGGGCGGTTCTTGAACCAAACCTACAG
TGAGCAGGGTGAAGGAGAGGGGATCAGGGGGCTGGCTAGTGGAGCTACTCCTCCGCCCTCGGNCTCATAACCCG
CCCAGGATCTCGGGAAGCTCTCAATCC
```

> WR Exon 3 Primer Otx1.int2c

```
GTCCGAGGGGCGGANNNGTAGCTCCACTAGCCAGCCCCCTGATCCCCCTCTCCTTCACCCTGCTCACTGTAGGTTT
GGTTCAAGAACCGCCGCGCCAAGTGCCGCCAGCAGCAGCAGAGCGGGAATGGAACGAAAAACCCGGCCGGTCAAGA
AGAAGTCGTCTCCAGTACGCGAGAGCTCGGGTTCAGAGAGCAGCGGCCAGTTTACGCCGCCCGCCGTATCTAGCT
CTGCTTCTTCGTCTAGCTCAGCGTCCAGTGCCTCCGCCAACCCCGCGGCTGCTGCGGCCGCGGGCTGGGTGGGA
ACCCAGTGGCAGCAGCGTCTCTCTGAGCACGCCTACTGCTTCGTCCATCTGGAGCCCGCCTCCATCTCGCCGG
GCTCAGCGCCGACATCCGTATCGGTGCCAGAGCCACTGGCCGCTCCGAGCAACGCCTCGTGCATGCAGCGCTCGG
TAGCCGCAGGTGCGGCCACTGCCGCAGCCTCCTACCCTATGTCTATGGCCAGGGCGGAAGCTATGGTCAGGGAT
ACCCCGCGCCCTCCTCTTCTTACTTTGGCGGTGTAGACTGCAGCTCCCTACCTAGCGCCCATGCACTCTCATCAC
```

> WR Exon 3 Primer Otx1.3

```
CTCGGGTTAGAGAGCAGCGGCCAGTTTACGCCGCCCGCTATCTAGCTCTGCTTCTTCGTCTAGCTCAGCGTCC
AGTGCCTCCGCCAACCCCGCGGCTGCTGCGGCCGCGGGCTGGGTGGGAACCCAGTGGCAGCAGCGTCTCTCTG
AGCACGCCTACTGCTTCGTCCATCTGGAGCCCGCCTCCATCTCGCCGGGCTCAGCGCCGACATCCGTATCGGTG
CCAGAGCCACTGGCCGCTCCGAGCAACGCCTCGTGCATGCAGCGCTCGGTAGCCGAGGTGCGGCCACTGCCGCA
GCCTCCTACCCTATGTCTATGGCCAGGGCGGAAGCTATGGTCAGGGATAACCCCGCGCCCTCCTCTTCTTACTTT
GGCGGTGTAGACTGCAGCTCCTACCTAGCGCCCATGCACTCTCATCACCACCCGACCAAGCTTAGCCCCATGGCA
CCCTCCTCCATGGCTGGCCATCATCACCATCACCCTCATGCGCACCACCCACTGAGCCAATCTTCAGGCC
```

> WR Exon 3 Primer Otx1.8

```
TGGCCGCTCGAGCACGCCTNNTGCATGCAGCGCTCGGTAGCCGACAGGTGCGGCCACTGCCGAGCCTCCTACCCT
ATGTCTATGGCCAGGGCGGAAGCTATGGTCAGGGATAACCCCGCGCCCTCCTCTTCTTACTTTGGCGGTGTAGAC
TGCAGCTCCTACCTAGCGCCCATGCACTCTCATCACCACCCGACCAAGCTTAGCCCCATGGCACCCTCCTCCATG
GCTGGCCATCATCACCATCACCCTCATGCGCACCACCCACTGAGCCAATCTTCAGGCCACCACCACCACCATCAC
CACCACCACCACCACCAAGGTTATGGAGGCTCTGGGCTCGCCTTCAATTCTGCCGATTGCTTGGATTACAAGGAG
CCNCCCGCCCGCTTCCAGTCTTGTGAGCCAGGAGGAAAGGAAGTGGAGAAGAAACGCAACTACCTATACCCT
GCCTCGTGGCGGTTCCAGTCTTGTGAGCCAGGAGGAAAGGAAGTGGAGAAGAAACGCAACTACCTATACCCT
CCATGGTCCCCATCCTGTTGCTGCTGCTGCACCACCCGCTTTGCTTGGCTTTTCCAAAACCTAATTTTCAGTC
```


TTGAAGGGCCATTTGGTATTTTTCTGTTGAAGAGTTTGCATGTGTGTTGAACCAATGGAAGGAAGAAGGCCTGGAA
 ACTTGTTTTTCTCCTTCAGGCATGAGAGCTGAGCTGGCAAAACCTTCATTGAGCATGTCTCTTCTGTCCAAGGGCC
 CCAGGAGCTCGACTCCAGAGGATACTGACTCAACATCAATATCATGCGCCTTTCTTCTTGCCACTTCAGCCAGTG
 CCAGTTCACCCATATCTAGAGCAAGGTAATGAATGTCCATGAACAGGTACAGAGCTCCAATGTCAACAGCTAGAA
 GAAAGGCTTTTCAAATCTCTTGTACCTGAGCAgGTGGTGGAAAGAGcCTCCTGGCATACTTGCTGACTGGCTCTCT
 ATATCCAAAAATAGTTGTATCCAGAAGTGGTCTTGTGGAGCATAGAAgGtTCCAAGGcTCGCCTCAAGCTGTG
 CTCTCTCTCTGGG

>AA823259 mit T7 sequenziert

ATTGGCCTCGAGGCCAAGAATTCGGCACGAGGGAAAAAACTTCGAGATTCACTGAAGGAGTTGGAGGAACTGATGC
 AAAGCAGTCCGTGTGTGCTGAGCAAATGGAAGAGCAAATACATCTGCCAGCTCCTGTTGGTTCAGGTGTGCTGG
 TGTCCCTAAGTCTTTCTGGGCCTCAGCTGGAGAAAAGTGGTATTGACAGAAAGCCTGGTGGGGAAAGCTCATCTCAG
 ACACCATCAGTGATGCTCTCCTTACAGACAGTTTTCATCATCTTATCATTCTGGCACAAAACAAATATGTTTAA
 TTCAGTTTACAAAGAAAATGGATTCTCTTGGATGGAAAACAAGAGGCTGGAGAAAATCTCAGCCTTGGACCTTAAAG
 TTTCTATTATGACATACCTGGCCAGCCAACAGGACAATAGATCGTCACTTAGCTGTCAACTCCACTCAGGATC
 TAGTTGTTTGGTGGCCGCTGGTCAAGTATGATGTTTGGCCTTGGACTCCAGTTTCTCTGAGAAGGACAGAG
 CCAATATGCTGTTGCTGGGCTTTACTCAAGGAGGATTGGAGGTTCTAAGTTTTGTTGCGACAGAATGGAGTCCCC
 TGGATGTTCACTTCGGCACCAAAACAACCTTATCAgGTGTTTACAGTGGAGTGCTCCGTGAGTGTAGACAAgGAGC
 CATGGCTGACAGCTGTATTTATGAATCTGTCCGGAACAAACTCCACTGCGTGTGAGTACCAGAATACCCTAAG
 ATCGAAgGGCATCAGCTGCTGCAGGAACCTTACGGAAGACAAACTGATCGTGGGCTGTGAAGACTCTCAGTAA t T
 CTCTATGAAGCTCACCGTGGTGTGA

7.2.3.3 vergleichende Sequenzierungen von WT und WR

>WT M13 1.7. mit Primer 7 gelesen

ATCAGTATCAGCAACAGAGCATGGTAACTTAGAAGAAAAACAAAGGCTGGCAGAATCACGAGATTATCCTTGGAC
 ACTCAAAAATAGACGCCAGAAAACTTCGAGATTCACTGAAGGAGTTGGAGGAACTGATGCAAAGCAGTCCGTG
 TGTGCTGAGCAAATGGAAGAGCAAATACATCTGCCAGCTCCTGTTTGGTTCAGGTGTGCTGGTGTCCCTAAGTCT
 TTCTGGGCCTCAGCTGGAGAAAAGTGGTATTGACAGAAGCCTGGTGGGGAAAGCTCATCTCAGACACCATCAGTGA
 TGCTCTCCTTACAGACAGTTTTCATCATCTTATCATTCTGGCACAAAACAAATATGTTTTATTGAGTTTACAAA
 GAAAATGGATTCTCTTGGATGGAAAACAAGAGGCTGGAGAAAATCTCAGCCTTGGACCTTAAAGATTTCTATTATGA
 CATACTGGCCCAGCCAACAGGACAATAGATCGTCACTTAGCTGT

>WR m13.1.7 mit Primer 7 gelesen

ATCAGTATCAGCAACAGAGCATGGTAACTTAGAAGAAAAACAAAGGCTGGCAGAATCACGAGATTATCCTTGGAC
 ACTCAAAAATAGACGCCAGAAAACTTCGAGATTCACTGAAGGAGTTGGAGGAACTGATGCAAAGCAGTCCGTG
 TGTGCTGAGCAAATGGAAGAGCAAATACATCTGCCAGCTCCTGTTTGGTTCAGGTGTGCTGGTGTCCCTAAGTCT
 TTCTGGGCCTCAGCTGGAGAAAAGTGGTATTGACAGAAGCCTGGTGGGGAAAGCTCATCTCAGACACCATCAGTGA
 TGCTCTCCTTACAGACAGTTTTCATCATCTTATCATTCTGGCACAAAACAAATATGTTTTATTGAGTTTACAAA
 GAAAATGGATTCTCTTGGATGGAAAACAAGAGGCTGGAGAAAATCTCAGCCTTGGACCTTAAAGATTTCTATTATGA
 CATACTGGCCCAGCCAACAGGACAATAGATCGTCACTTATCCTGT

>WT m13.1.7 mit Primer 1 gelesen

ATCTATTGTCCTGTTGGCTGGGCCAGGTATGTCATAATAGGAAATCTTAAAGTCCAAGGCTGAGAGTTTCTCCAG
 CCTCTTGTTCATCAAGAGAATCCATTTTCTTTGTAAGTGAATAAAACATAGTTTGTGTTTGTGCCAGAAATGA
 TAAGATGATGAAACTGTCTGTAAGGAGAGCATCACTGATGGTGTCTGAGATGAGCTTCCCCACCAGGCTTCTGTC
 AATCACCCTTTCTCCAGCTGAGGCCAGAAAGACTTAGGGACACCAGCACACCTGAACCAAACAGGAGCTGGCA
 GATGATTTGCTCTTCCATTTGCTCAGCACACACGGACTGCTTTGCATCAGTTCTCCTCAACTCTTTCAGTGAATC
 TCGAAGTTTTTCTGGGCGTCTATTTTTGAGTGTCCAAGGATAATCTCGTGATTCTGCCAGCCTTTGTTTTCTCTC
 TAAGTTACCATGCTCTGTTGCTGATACTGATGGATCTTTCTTGTCA

>WR m13.1.7 mit Primer 1 gelesen

ATCTATTGTCCTGTTGGCTGGGCCAGGTATGTCATAATAGGAAATCTTAAAGTCCAAGGCTGAGAGTTTCTCCAG
 CCTCTTGTTCATCAAGAGAATCCATTTTCTTTGTAAGTGAATAAAACATAGTTTGTGTTTGTGCCAGAAATGA
 TAAGATGATGAAACTGTCTGTAAGGAGAGCATCACTGATGGTGTCTGAGATGAGCTTCCCCACCAGGCTTCTGTC
 AATCACCCTTTCTCCAGCTGAGGCCAGAAAGACTTAGGGACACCAGCACACCTGAACCAAACAGGAGCTGGCA
 GATGATTTGCTCTTCCATTTGCTCAGCACACACGGACTGCTTTGCATCAGTTCTCCTCAACTCTTTCAGTGAATC
 TCGAAGTTTTTCTGGGCGTCTATTTTTGAGTGTCCAAGGATAATCTCGTGATTCTGCCAGCCTTTGTTTTCTCTC
 TAAGTTACCATGCTCTGTTGCTGATACTGATGGATCTTTCTTGTCA

>Wt M13 Fragment sequenziert mit 71m17for b

ACCTGGGCCAGGAGAGTACACACCACGGTGAGCTTCATAGAGAATTACTGAAGAGTCTTCACAGCCCACGATCAGT
 TTGTCTTCCGTAGAGTTCTGCAGCAGCTGATGGCCTTCGATCTTAGTGGTATTCTGGTAACTGACACGCAGTGG
 AGTTTGTTCGGACAGATTTCATAAATACAGCTGTGAGCCATGGGCTCCTTGTCTACACTGACGGAGCACTCCACT
 GTGAACACCTGATAAGGTTGTTTGGTGCCGAAGTGAACATCCAGGGGACTCCATTCTGTGCGAACAAAACTTAGA
 ACCTCCAATCCTCCTTGAGTAAAGCCCAGCAACAGCATATTGGCTCTGTCTTCTCAGAAGAAACTGGAGTCCAA
 GGCCAAACATCATCACTGACCAGCGGCCACCAACAAACAACACTAGATCCTGAGTGGAGTTGACAGCTAAGTGACGA
 TCTATTGTCTGTTGGCTGGGCCAGGTATGTCATAATAGGAAATCTTAAGGTCCAAGGCTGAGAGTTTCTCCAGC
 CTCTTGTTCATCAAGAGAATCCATTTCTTTGTAAACTGAATAAAACATAGTTTGTTTGTGCCAGAAATGAT
 AAGATGATGAAACTGTCTGT

>Wr M13 Fragment sequenziert mit 71ml7for b

TCACCTGGGCCAGGAGAGTACACACCACGGTGAGCTTCATAGAGAATTACTGAAGAGTCTTCACAGCCCACGATCA
 GTTTGTCTTCCGTAGAGTTCTGCAGCAGCTGATGGCCTTCGATCTTAGTGGTATTCTGGTAACTGACACGCAGT
 GGAGTTTGTTCGGACAGATTTCATAAATACAGCTGTGAGCCATGGGCTCCTTGTCTACACTGACGGAGCACTCCA
 CTGTGAACACCTGATAAGGTTGTTTGGTGCCGAAGTGAACATCCAGGGGACTCCATTCTGTGCGAACAAAACTTA
 GAACCTCCAATCCTCCTTGAGTAAAGCCCAGCAACAGCATATTGGCTCTGTCTTCTCAGAAGAAACTGGAGTCC
 AAGGCCAAACATCATCACTGACCAGCGGCCACCAACAAACAACACTAGATCCTGAGTGGAGTTGACAGCTAAGTGAC
 GATCTATTGTCTGTTGGCTGGGCCAGGTATGTCATAATAGGAAATCTTAAGGTCCAAGGCTGAGAGTTTCTCCA
 GCCTCTTGTTCATCAAGAGAATCCATTTCTTTGTAAACTGAATAAAACATAGTTTGTTTGTGCCAGAAATG
 ATAAGATGATGAAACTGTCTGTA

>Wt M13 Fragment sequenziert mit Mest13.2

CATCTTATCATTCTGGCACAAAACAAACTATGTTTTATTTCAGTTTACAAAGAAAATGGATTCTCTTGATGGAAA
 CAAGAGGCTGGAGAAACTCTCAGCCTTGGACCTTAAGATTTCTTATTATGACATACCTGGCCCAGCCAACAGGAC
 AATAGATCGTCACTTAGCTGTCAACTCCACTCAGGATCTAGTTGTTTGGTGGCCGCTGGTCAGTGATGATGT
 TTGGCCTTGGACTCCAGTTTCTTCTGAGAAGGACAGAGCCAATATGCTGTTGCTGGGCTTTACTCAAGGAGGATT
 GGAGGTTCTAAGTTTTGTTTCGCACAGAATGGAGTCCCCTGGATGTTCACTTCGGCACAAAACAACCTTATCAGGT
 GTTCACAGTGGAGTGCTCCGTCACTGTAGACAAGGAGCCCATGGCTGACAGCTGTATTTATGAATCTGTCCGGAA
 CAACTCCACTGCGTGTCACTTACCAGAATAACACTAAGATCGAAGGCCATCAGCTGCTGCAGGAACTCTACGGA
 AGACAACTGATCGTGGGCTGTGAAAGACTCTTCAGTAATTCTCTATGAAGCTCACCGTGGTGTGACTCTCCTGG
 CCCAgGCTGAACTTAGGCCTT

>Wr M13 Fragment sequenziert mit Mest13.2

CATCTTATCATTCTGGCACAAAACAAACTATGTTTTATTTCAGTTTACAAAGAAAATGGATTCTCTTGATGGAAA
 CAAGAGGCTGGAGAAACTCTCAGCCTTGGACCTTAAGATTTCTTATTATGACATACCTGGCCCAGCCAACAGGAC
 AATAGATCGTCACTTAGCTGTCAACTCCACTCAGGATCTAGTTGTTTGGTGGCCGCTGGTCAGTGATGATGT
 TTGGCCTTGGACTCCAGTTTCTTCTGAGAAGGACAGAGCCAATATGCTGTTGCTGGGCTTTACTCAA_gGAGGATT
 GGAGGTTCTAA_cTTTTGTTTCGCACAGAATGG_cAGTCCCCTGGATGTT_cCAG_gTCGGTACCAAACA_cCTTATCAK_g
 TGTT_c

>WT MEST13.16 / 71ml7forc

GTTGCTGACTGAGGAAGAGAAGATCACAGATTTCTCCTCTTTTAGGCTTCTGGAAAACAA_gCAGGAGGAGCCATC
 CACTGCATTTGA_gACAAGACTGCTTGAAACATCAAAGAACTTCTTGAATTGCAGAGTCTCCTTCGGTGAGTAATC
 TTCTGCCAAGAGCTGGATGTTGATAGGGGACAGAGCAATATCAAAAATTTGTAGCTCCCCTTGGTTGCTGCCAAC
 CAGAAGAATGGCGCCACTTGGGTGGCAGCTTATCAATGAAGGCCTAAGTTTCAGCCTGGGCCAGGAGAGTACACCC
 ACGGTGAGCTTCATAGAGAATTACTGAAGA

>Wt 13-16 71ml7uni c nachsequenziert

TTGTTGAACTGATGAAGAGAAGACACAGATTTCTCCTCTTTTAGGCTTCTGGAAAAACAACAGGAGGAGCCATCCA
 CTGCATTTGAACAAGACTGCTTGAAACATCAAAGAACTTCTTGAATTGCAGAGTCTCCTTCGGTGAGTAATCTC
 TGCCAAGAGCTGGATGTTGATAGGGGACAGAGCAATATCAAAAATTTGTAGCTCCCCTTGGTTGCTGCCAACAG
 AAGAATGGCGCCACTTGGGTGGCAGCTTATCAATGAAGGCCTAAGTTTCAGCCTGGGCCAGGAGAGTACACCCAG
 GTGAGCTTCATAGAGAATTACTGAAGAG

>WR MEST13.16 / 71ml7forc

TTGTTGA_gCTGCAGGAAGAGAAGATCACAGATTTCTCCTCTTTTAGGCTTCTGGAAAAACAACAGGAGGAGCCATC
 CACTGCATTTGAACAAGACTGCTTGAAACATCAAAGAACTTCTTGAATTGCAGAGTCTCCTTCGGTGAGTAATCT
 TCTGCCAAGAGCTGGATGTTGATAGGGGACAGAGCAATATCAAAAATTTGTAGCTCCCCTTGGTTGCTGCCAAC
 AGAAGAATGGCGCCACTTGGGTGGCAGCTTATCAATGAAGGCCTAAGTTTCAGCCTGGGCCAGGAGAGTACACCCA
 CGGTGAGCTTCATAGAGAATTACTG

>M13 WT Primer Mest13.12

GCTCACAGCTGGCAACCTGGAATAAAAAATCCATATCGTGGTGTGTTGTTGTTTGGCCTGTTCTTGAAAACATTGAA
ATCACTGTGACGCTGTTTAAAG

Exon 4 54bp

GATCCTCATGCAGAAGAATTTGAAGACAAAAGAATGGACATTTGTCATTGAGAAT

Exon 5 182 bp

GAATCCCCTTCTGGTCCGAGGAAAGCTCTTGCCACCAGCAGCATTAAACATGAAACAGTACGCAAGCCCCATGCCA
ACACAAACTGACGTCAAGTTAAAATTCAAGCCGCTGTCTAAGAAGGTCGTGTCTGCCACTCTCCAGTTCTCACTG
TCCTGTATCTTCTTCCGGGAGGGAAAAGCAAC

Exon 6 140 bp

GGATGAAGATATGCAGAGTTTGGCTAGTTTGTATGAGTATGAAGCAGGCAGACATTGGCAATTTAGATGATTTCGA
AGAAGATAATGAGGATGATGACGAGAACCCTGTGAACCAAGAGGAGAAGGCGGCAAAAATTACAG

Exon 7 105 bp

AAATTGTAAACCAGTTGAATGCTCTGAGCAGCTTAGATGAAGATCAAGATGACTGCATAAAGCAAGCAAATGTGC
CCTCAGCTAAATCAGCCAGTTCTCTGAAG

Exon 8 123 bp

AACTTATAAACACACTTAACTTTTTGGATGAAGCACAAAAGGACTTGGCCACTGTGAATACCAATCCATTTGATG
AACCTGATGTAACAGAATTAATCCATTTGGAGATCCTGACTCAGAAG

Exon 9 238 bp

AACCAATCACTGAAACAACCTTACCTAAAAAACAGAAAGATCTTTTTATAATAACAGCTGTAATCCCTTTAAAG
GTGTACAGACTCCACAGTATTTGAACCCATTTGATGAACCAGAACTTTTGTAAATGATAAAGGATTTCTCCACCCC
AGTCTACACGAAGAAAAACCTAAGACCTGTAGACATGAGCAAGTACCTCTATGCTGATAGTTCAAAGAGTGAAG
AGGAAGTGGATGA

Exon 10 218bp

ATCAAATCCTTTTTATGAGCCTAAGCCAACTTCTCCAAATAATTTGGTCAATACAGTTCAAGAAGGGGAACTGA
ACGGAGAGTGAAGAAGGGCCCCAGCCCCGCCGCCCCACTAGCCCCGCCAGCCCCGCCAGCCCCACCAGCCCT
CACACCAAGACTGGAGTAAATGAAAACACAGTTGTCTCTGCAGGGAAAGATCTCTCTACTTCTCCAA

Exon 11 181 bp

AGCCAAGCCCAGATACCAAGTCTGTTCTGGGGCAAAAGCCAAACGCTAGTCAGTCGCTGCTTGCATGGTGCAGAG
AAGTTACAAAAAAGTACCGGGGCGTGAAAATCACCAACTTTACCACATCGTGGAGGAATGGCTTATCATTTCTGTG
CAATTTTACACCACTTTAGACCAGACTTAAAT

Exon 12 49 bp

CGACTACAAGTCTCTGAATCCTCAAGATATTAAGAAAAACAACAAAAAG

Exon 13 882 bp

GCTTACGATGGATTTGCCAGCATTGGAATTTCCCGTTTACTGGAACCTTCTGATATGGTTTTATTAGCAATCCCT
GACAACTGACTGTTATGACTTATCTCTATCAAATAAGGGCACATTTTACGGACAAGAATAAATGTGGTTCAG
ATAGAGGAAAACAGCAGTAAGAGCACATATAAAGTTGGAAATTATGAGACAGACACAAACAGTTCTGTGGATCAA
GAAAAGTTCTACGCTGAACTCAGCGATCTGAAGCGAGAGCCTGAACCTCACCAGCCTGCCCGTGGGGCTGTGGAT
CTGCTGTGCGCAGGATGACTCTGTGTTTGTAACTGACAGTGGGGTGGGAGAGTCTGAAAAGTGAACACCAGACTCCA
GATGACCACCTTAGTCCAAGCACAGCCTCCCTTACTACCGCAGGACTAAGAGTGACACGGAGCCCCAAAAGTCCG
CAGCAGAGCTCCGCGAGGACTTCAGGGTCTGATGACCCTGGGTAAAGTTCTAGTACTGATTCAGCTCAAGCCCTG
GCTTCTTAGGCAAGAAGAGACTAAAAGCTGAGAACTTGGAACTAAGTGACTTATGTGTGCTGACAAAGAAGAG
GATGTGTCTCCACTCTCAGCTTACGAGCAAAAGCTTACAGCTGTACATGCCAGCAGTGATATGGAACAAGGGAAA
ATGGAGAAGTCCAGATCTTTAGAATGCAGATTGGATGGTGAATTGGCTATCACAAGCCAAATGTATCCTCTCCT
TCTAAACTTGGATATAACAGAGACACAGACTTACGAAAAAACCATGTGCTTCTCTGAGGCAGATAGAGTCTGAT
CCAGATGCAGACAAGGACACTTTAAATCATGCAGACCACCCCAACAAAGCAGTTTCAG

Exon 14 144 bp

CACCGAATGTTGTCCAGACAAGAGGAGCTGAAAGAAAAGAGCGAGAGTTCTGCTT
GAAGAGATGCTGCTTTCAAGGTGGGGAGCAAGCATGGTGGCAGCGCAGCCCTGCGCTCTGCAGCAGACAGCTAA
ATGAT

Exon 15 148 bp

CAGCAAGATGAAGAGAGACGTCGGCAGCTGAGAGAGAGGGCTCGTCAGCTAATAGCAGAAGCTCGATGCGGAGTG
AAGATGTCAGAACTTCCAGCTATGGTGAAATGGCTGCAGAAAAGTTGAAAGAAAGGTCAAAGGCATCTGGAG

Exon 16 108 bp

ATGAAAATGATAATATTGAGATAGATACTAACGAAGAGATTCTGAAGGCTTTGTTGTAGGAGGTGGAGATGAAC
TTACTAATATAGAAAGTGACCTTGATAATCCCG

Exon 17 125 bp

AGCAGAATAGTAAGGTGGTGGACTTGAGGCTGAAGAAGCTATTA_gAAGCCCAGCCACAGGTGGCAAACCTTACTCC
CCAGTGCTGCGCA_gAAAGCTGTAACCGAGGCTCCGAGCAAGGAGAAAAAG

Exon 18 139 bp

AGTGGCGTGAAGATCTCCGGGCTGAACGATTACAAAAAGGAACAGAACGTTTCAGAAATCCTGTTGTGTTTAAAC
AAGGATTCACAGTCAGAAAGACTCAGCTCCAGTCTTTCAGTCAGTATGTTGAGAACAGACCAG

Exon 19 107 bp

AGATGAAAAGACAGAGATCAATACAGGAAGATACAAAGAGGGGAAGCTGAGGAGAAGGCAGAGATAACTGAAACTC
AGAGGAAGCCATCAGAAGATGAA

Exon 20 124 bp

AAAGGGTTCAAAGACACCAGTCAGTATGTTGTAGGGGAATTGGCAGCACTGGAGAATGAGCAGAAGCAAATTGGC
ACCCGTGCCGCGCTGGTGGAGAAGCGCCTCCGCTATCTCATGGACACAG

Exon 21 100 bp

GAAGGAACACGGAAGAAGAGGAGGCGATGATGCAGGAATGGTTCATGCTGGTTAATAAGAAAAATGCCTTAATAA
GGAGGATGAACCAGCTTTCCCTCCT

Exon 22 74 bp

GGAAAAAGAGCATGACTTGGAAACGAAGGTATGAGCTGCTGAACCGGGCGCTACGGGCCATGCTAGCCATTGAAG

Exon 23 115 bp

ACTGGCAGAAAGaCCGAGGCCAGAAAGCGaCGGgACAGCTCCTGCTGGATGAACTAGTAGCCCTGGTGGACAAGC
GAGACGCCCTTGTGAGGGACCTGGACGCCAGGAGAAGCA

Exon 24 1043 bp

GGCCGAAGAAGAAGACGAGCATTGGAGCGAACTCTGGAGCAAAAACAAAGGCAAGATGGCCAAGAAGGAGGAGAA
GTGTGCTCTTCAGTAGTAGCCTTGGACCAGACCTCTCCCCACTACTTGAGTCTTAGGTCCCAGGCCAGAA
GCAGACTGGTTGACTTAAACTTTTTAACATTTTGTGCTGGATTGTACTTCTGGACCCACCCCTCCCCATT
TCCTCTTCTCCAGATAATACACAGAGCTCCAGATAGCTTTAAAGACTCTTTGAGTTAATCATGAAATCATCTTG
AAATCCTGTGAAGTAGATTGCGCAGACACCCCGTGAATGACTGGTACTGAAGATGCTCAAGAAACTGTCCAAAA
GGAGGGAGACTCCCTGGTTATCGCCCCCTTCTGTTTTGGATGGGATGAGAATCTGAAACATGTTTGTGTAGTATT
GTTGGTAATAGCGAAATGACAGTGGGTGGGGGGGCAAAGGGGAGTAAGAAAAATGTCATGATTTTTTTTTTCCAATC
CCGCAGTATGTATGTGACACTGTTACTTAAATCTCATAGTTAGATCTTAGTCTGTGTATTGACGAAGCTGTGTTT
CATTTGCCAGTGGGATTTTCTGCAGTTGTTTGCAATTCACATAAAGATAATAAAGTTTCTCTGCTCTCCTCAG
AGGATGGCCCTGTAAGGTAGCCTGAGACAAACCTGGGGTTTGAAGGTGACCTGGGAGAACAGCTCTGTTCAATG
TGCAGCAGTTTACAAAGACAGCTCATCAGCTGATGATGCACCATCTTATACTCTGAATAAATTTATTACATCT
TGCTTGGTTCTACTTTTTGTTGGGGCTCAACATTGGCTCAAGAATGCTGTTAATATTTATTCTGTATTGATAAA
AGTCTGTCTTGGCACTACAAGTAAATATCCATTACATCTTCTCTAGCATAGCACTGTGTGTTTTGTGAAAAATG
TTATGTTTTATTTATTACAATACTGAGTCATATATAAATTTTCAATAAAAAGCAGAAACTTCTTACCTT

7.2.4.2 vergleichende Sequenzierungen bei WT und WR

>WT 9035`yz Primer y

CTGAAAAATAAAGTTTTATTTAAAAATAACTCCTAACTGGTGGTAGATATATCAAACAGCATCCTGACTTTCCTCG
CCCTGTTCTTCTTCTGCTATGCTAGGTAGGGAAGGCAGGGCCCCGACTGGCATCTCTCAATTGTTGGTTCGAC
ACCTGGTGTATTGCCGCTGTCTTCCGGTGTGATTTGTCAATTTCTTCCCTTAGTATCTTCCATCCTTGATGTTACTG
GCTTTTGAGGCCGGGGTTTTGTTTTATTGTTTTGAAAACCACGCAGATAGCAGAGGTTGTTTCGGTCTTATCTAAC
ACTTCTCATGCGTCTGTCTCATATTCTTTCTTTCTGTCTGTGTTTTGCTTTTTCAGTTCTCCAGAACCCACGT
CATATAGTCCCTGAAGTGAATGATGATGTCTCCATGAGGGAACCTCCTCTCAGTCATCCTGTCTGTACATCAG
CTGTTCTTGACTGGGCCATTGATCTAAGATAGGATTTACCCTGTGAGACA

>WTyz 9035`yz Primer z

CTTCCAAACTGAAGCCATGGATGATAGGCCAAGAGACTGGAACAGTTCTGGATTAGCAACACAGCAGCTTTGATA
AAGCACACGAGCCTTGCATGTATGTGAGTACTTTCAACAAAAACTAGAACTTGAAATGATGCTTGGCGTCCATAA
GTCTTCTCCCTGTCTCACAGGGTAAATCCTATCTTAGATCAATGGCCCAGTCAAGAACAGCTGATGTACAGGACA
GGATGACTGAGAGGAGGTTCCCTCATGGAGACATCATATTCCACTTCAGGGACTATATGACGTGGGTTCTGGAG
AACTGAAAAGCAAAACACAGACAGAAAGAGAAAGAATATGAGGACAGACGCATGAGAAAGTTAGATAAGACCGA
AACAACCTCTGCTATCTGCGTGGTTTTCAAACAATGAAACAAAACCCCGGCTCAAAAAGCCAGTAACATCAAGGA
TGGAAGATACTAAGGAAGAAATGACAAATCACACCGAAGACAGGCGCAATACACCAGGTTGTCAGAACCAACAA
TTGAGAGATGCCAGTCCGGCCCTGCCTTCCCTACCTAGCATAGCAGAAGGAAGAACAGGGCGGAAAGTCAGGAT
GCTGTTTTGATATATCTACCACAGTTAGGAGTTATTTTTTAAATAAACTTTATTTTTTCAGCTGATAATGAATAGC
CTCGAGCTACTGAATATGTACTTAG

>WR 9035`yz Primer y

TCGAGGCTATTCAATATCAGCTGAAAAATAAAGTTTTATTTAAAAATAACTCCTAACTGGTGGTAGATATATCAA
ACAGCATCCTGACTTTCCTCGCCCTGTTCTTCTTCTGCTATGCTAGGTAGGGAAGGCAGGGCCCCGACTGGCATCT
CTCAATTGTTGGTTCGACAACTGGTGTATTGCCGCTGTCTTCCGGTGTGATTTGTCAATTTCTTCCCTTAGTATC
TTCCATCCTTGATGTTACTGGCTTTTGGAGCCGGGGTTTTGTTTTATTGTTTTGAAAACCACGCAGATAGCAGAG
TTGTTTCGGTCTTATCTAACACTTCTCATGCTGTCTCATATTCTTTCTTCTGTCTGTGTTTTGCTTTT
CAGTTCTCCAGAACCCACGTCAATATAGTCCCTGAAGTGAATGATGATGCTCCATGAGGGAACCTCCTCTCAGT
CATCCTGTCTGTACATCAGCTGTTCTTGGACTGGGCCATTGATCTAAGATAGGATTTACCTGTGAGACAGGGAG
AAGACTTATGGACGCCAAGCATCATTTCAAGTTCTAGTTTTTGTGAAAGTACTGACATACATGCAAGGCTCGTG

TGCTTTATCAAAGCTGCTGTGTTGCTAATCCAGAAGTGTCCAGTCTCTTGGCCTATCACCATGGCTTCACGACT
GCAGCGTGTGGGAAA

>WR 9035`yz Primer z

CTTCCAAACTGAAGCCATGGTGATAGGCCAAGAGACTGGAACAGTTCTGGATTAGCAACACAGCAGCTTTGATAA
AGCACACGAGCCTTGCATGTATGTCAGTACTTTCAACAAAAACTAGAACTTGAAATGATGCTTGGCGTCCATAAG
TCTTCTCCCTGTCTCACAGGGTAAATCCTATCTTAGATCAATGGCCAGTCAAGAACAGCTGATGTACAGGACAG
GATGACTGAGAGGAGGTTCCCTCATGGAGACATCATCATTCCACTTCAGGGACTATATGACGTGGGTTCTGGAGA
ACTGAAAAGCAAAACACAGACAGAAAAGAGAAAAGAATATGAGGACAGACGCATGAGAAGTGTAGATAAGACCGAA
ACAACCTCTGCTATCTGCGTGGTTTTCAACAATGAAACAAAACCCCGCCTCAAAGCCAGTAACATCAAGGAT
GGAAGATACTAAGGAAGAAATGACAAATCACACCGAAGACAGGCGGCAATACACCAGGTTGTCAGAACCAACAAT
TGAGAGATGCCAGTCGGGCCCTGCCTTCCCTACCTAGCATAGCAGAAGGAAAGAACAGGGCGGGAAAAGTCAGGATG
CTGTTTGATATATCTACCACCAGTTAGGAGTTATTTTTTAAATAAACTTTATTTTTTCAGCTGATAATGAATAGCC
TCGAGCTACTGAATATGTACTTAGC

>WT 9035`ms Primer s

GAATCTTTTTATAATAACAGCTGTAATCCCTTTAAAGGTGTACAGACTCCACAGTATTTGAACCCATTTGATGAA
CCAGAACTTTTGTAAATGATAAAGGATTCTCCACCCAGTCTACACGAAGAAAAACCTAAGACCTGTAGACATG
AGCAAGTACCTCTATGCTGATAGTTCAAAGAGTGAAGAGGAACTGGATGAATCAAATCCTTTTATGAGCCTAAG
CCAACCTTCTCAAATAATTTGGTCAATACAGTTCAAGAAGGGGAAAAGTGAACGGAGAGTGAAAAGAGGGCCCCA
GCCCCGCGGGCCCCACTAGCCCCGCCAGCCCCGCCAGCCCCACCAGCCCTCACACCCAAGACTGGAGTAAATGAA
AACACAGTTGTCTCTGCAGGGAAAGATCTCTCTACTTCTCAAAGCCAAGCCCGATACCAAGTCTGTCTGGGG
CAAAGCCAAACGCTAGTCAGTCGCTGCTTGCATGGTGCAGAGAAGTTACAAAAAACTACCGGGCGTGAAAATC
ACCAACTTTACCACATCGTGGAGGAATGGCTTATCATTCTGTGCAATTTTACACCCTTTAGACCAGACTTAATC
GACTACAAGT

>WR 9035`ms Primer s

CTAAAAAATCAGAAGAATCTTTTTATAATAACAGCTGTAATCCCTTTAAAGGTGTACAGACTCCACAGTATTTGA
ACCCATTTGATGAACCAGAACTTTTGTAAATGATAAAGGATTCTCCACCCAGTCTACACGAAGAAAAACCTAA
GACCTGTAGACATGAGCAAGTACCTCTATGCTGATAGTTCAAAGAGTGAAGAGGAACTGGATGAATCAAATCCTT
TTTATGAGCCTAAGCCAACCTTCTCAAATAATTTGGTCAATACAGTTCAAGAAGGGGAAAAGTGAACGGAGAGTGA
AAAGAAGGGCCCCAGCCCCGCGGGCCCCACTAGCCCCGCCAGCCCCGCCAGCCCCACCAGCCCTCACACCCAAGA
CTGGAGTAAATGAAAACACAGTTGTCTCTGCAGGGAAAGATCTCTCTACTTCTCAAAGCCAAGCCCGATACCAA
GTCCTGTTCTGGGGCAAAGCCAAACGCTAGTCAGTCGCTGCTTGCATGGTGCAGAGAAGTTACAAAAAACTACC
GGGGCGTGAAAATCACCAACTTTACCACATCGTGGAGGAATGGCTTATCATTCTGTGCAATTTTACACCCTTTA
GACCAGACTTAATCGACTACAAG

>WT 9035` i/Ex5a Primer 9035`i

ACAGAGACACAGACTTCACGAAAAAACCATGTGCTTCTCTGAGGCAGATAGAGTCTGATCCAGATGCAGACAAGA
GCACTTTAAATCATGCAGACCACCCCAACAAAGCAGTTTCAGCACCGAATGTTGTCCAGACAAGAGGAGCTGAAAAG
AAAGAGCGAGAGTTCTGCTTGTAGCAAGCAAGAAGAGATGCTGCTTTCAAGGTGGGGAGCAAGCATGGTGGCAGCG
CAGCCCCCTGCGCTCTGCAGCAGACAGCTAAATGATCAGCAAGATGAAGAGAGACGTCGGCAGCTGAGAGAGAGGG
CTCGTCAGCTAATAGCAGAAGCTCGATGCGGAGTGAAGATGTAGAACTTCCAGCTATGGTGAAATGGCTGCAG
AAAAGTTGAAAGAAAGGTTCAAAGGCATCTGGAGAGCAGAATATGTAAGGTGGTGGACTTGAGGCTGAAGAAGCTAT
TA_gAAGCCACAGGTCAGGTCAGAACTTACTCCCCAGTGTGCGCAT_gAAAGCTGTAACCGAGGCTCCGAGCAA
GGAGAAAAGAGTGG_cGTGAAGATCTCCGGCTGAACGATTACAAAAAGGAACAGAACGTTTCAGAAAATCCTGTT

>WR 9035` i/Ex5a Primer 9035`i

ATCCTTCTAAACTTGGATATAACAGAGACACAGACTTCACGAAAAAACCATGTGCTTCTCTGAGGCAGATAGAGT
CTGATCCAGATGCAGACAAGAGCACTTTAAATCATGCAGACCACCCCAACAAAGCAGTTTCAGCACCGAATGTTGT
CCAGACAAGAGGAGCTGAAAGAAAGAGCGAGAGTTCTGCTTGTAGCAAGCAAGAAGAGATGCTGCTTTCAAGGTGG
GGAGCAAGCATGGTGGCAGCGCAGCCCCCTGCGCTCTGCAGCAGACAGCTAAATGATCAGCAAGATGAAGAGAGAC
GTCGGCAGCTGAGAGAGAGGGCTCGTCAGCTAATAGCAGAAGCTCGATGCGGAGTGAAGATGTCAGAACTTCCCA
GCTATGGTGAAATGGCTGCAGAAAAGTTGAAAGAAAGGTCAAAGGCATCTGGAGAGCAGAATAGTAAGGTGGTGG
ACTTGAGGCTGAAGAAGCTATTAGAAGCCCAGCCACAGGTGGCAAACCTTACTCCCCAGTGTGCGCAGAAAAGCTG
TAACCGAGGCTCCGAGCAAGGAGAAAAGAGTGGCGTGAAGATCTCCGGACTGAACGATTACAAAAAGCAACAG

>WT 903 5`i/Ex5a Primer 903Ex5a

GACTGTGGAATCCTTGTAAACACAACAGGATTTCTGAAACGTTCTGTTGCTTTTTGTAAATCGTTTCAGTCCGGAG
ATCTTCCACGCCACTCTTTCTCCTTGTCTCGGAGGCCTCGGTTACAGCTTTCTGCGCAGCACTGGGGAGTAAGTT
TGCCACCTGTGGCTGGGCTTCTAATAGCTTCTTACGCTCAAGTCCACCACCTTACTATTTCTGCTCTCCAGATGC
CTTTGACCTTTCTTTCAACTTTTCTGCAGCCATTTACCATAAGCTGGGAAGTTCTGACATCTTCACTCCGCATCG
AGCTTCTGCTATTAGCTGACGAGCCCTCTCTCAGCTGCCGACGCTCTCTTTCATCTTGTGATCATTTAGCTG

TCTGCTGCAGAGCGCAGGGGCTGCGCTGCCACCATGCTTGCTCCCCACCTTGAAAGCAGCATCTCTTCTTGCTTG
CTCAAGCAGAACTCTCGCTCTTTCTTTTCAGCTCCTCTTGCTGCGACAACATTCGGTGCTGAACTGCTTTGTTGGG
GTGGTCTGCATGATTTAAAGTGCTCTTGTCTGCATCTGGATCAGACTCTATCTGCCTCAGAGAAGCACATGGTTT

>WR 903 5'i/Ex5a Primer 903Ex5a

CTGAGTCTTTCTGACTGTGGAATCCTTGTTAAACACAACAGGATTTCTGAAACGTTCTGTTGCTTTTTGTAAATCG
TTCAGTCCGGAGATCTTCCACGCCACTCTTTTCTCCTTGCTCGGAGGCCTCGGTTACAGCTTTCTGCGCAGCACT
GGGGAGTAAGTTTGCCACCTGTGGCTGGGCTTCTAATAGCTTCTTTCAGCCTCAAGTCCACCACCTTACTATTCTG
CTCTCCAGATGCCTTTGACCTTTCTTTCAACTTTTCTGCAGCCATTTCCACATAGCTGGGAAGTTCTGACATCTT
CACTCCGCATCGAGCTTCTGCTATTAGCTGACGAGCCCTCTCTCAGCTGCCGACGCTCTCTTCAATCTTGCTG
ATCATTAGCTGTCTGCTGCAGAGCGCAGGGGCTGCGCTGCCACCATGCTTGCTCCCCACCTTGAAAGCAGCATC
TCTTCTTGCTTGCTCAAGCAGAACTCTCGCTCTTTCTTTTCAGCTCCTCTTGCTGCGACAACATTCGGTGCTGAAC
TGCTTTGTTGGGGTGGTCTGCATGATTTAAAGTGCTCTTGTCTGCATCTGGATCAGACTCTATCTGCCTCAGAGA

>WT 9035`c/h Primer 9035`c

CAGCCGATACAAGTCTGTTCTGGGGCAAAGCCAAACGCTAGTCAGTCGCTGCTTGCATGGTGCAGAGAAGTTA
CAAAAACTACCGGGGCGTGAAAATCACCAACTTTACCACATCGTGAGGAATGGCTTATCATTTCTGTGCAATTT
TACACCACTTTAGACCAGACTTAATCGACTACAAGTCTCTGAATCCTCAAGATATTAAGAAAAACAACAAAAAGG
CTTACGATGGATTTGCCAGCATTGGAATTTCCCGTTTACTGGAACCTTCTGATATGGTTTTATTAGCAATCCCTG
ACAACTGACTGTTATGACTTATCTCTATCAAATAAGGGCACATTTTAGCGGACAAGAACTAAAATGTGGTTTCAGA
TAGAGGAAAACAGCAGTAAGAGCACATATAAAGTTGGAAATTTATGAGACAGACACAAAACAGTTCTGTGGATCAAG
AAAAGTTCTACGCTGAACTCAGCGATCTGAAGCGAGAGCCTGAACCTCACCAGCCTGCCCGTGGGGCTGTGGATC
TGCTGTGCGAGGATGACTCTGTGTTTGTAACTGACAGTGGGGTGGGAGAGTCTGAAAGTGAACACCAGACTCCAG

>Wt 9035`c/h Primer 9035`h

ATATCCAAGTTTAGAARGAGAGGATACATTTGGCTTTGTGATAGCCAATTCACCATCCAATCTGCATTTCTAAAGA
TCTGGACTTCTCCATTTTCCCTTGTTCCATATCACTGCTGGCATGTACAGTCTGAAGCTTTTGTCTCGTAAGCTGA
GAGTGGAGACACATCTTCTTCTTGTCACTGACACATAAGTCACTTAGTTCCAAGTTCTCAGCTTTTAGTCTCTT
CTTGCCCTAAGGAAGCCAGGGCTTGAGCTGAATCAGTACTAGAACTTAACCCAGGGTTCATCAGACCCTGAAGTCCCT
CGCGGAGCTCTGCTGCGACTTTTGGGGCTCCGTGTCACTCTTAGTCTGCGGTAGTAAGGGGAGGCTGTGCTTGG
ACTAAGGTGGTCACTCTGGAGTCTGGTGTTCACTTTTCAGACTCTCCACCCCACTGTGAGTTACAAAACAGAGTCT
ATCCTGCGACAGCAGATCCACAGCCCCACGGGCAGGCTGGTGAGGTTCAgGCTCTCGCTTCAGATCGCTGAGTTC
AGCGTAGAACTTTTCTTGATCCACAGAAGTGTGTTGTCTGTCTCATAATTTCCAACCTTATATGTGCTCTTACT

>WR 9035`c/h Primer 9035`c

CAGCCGATACAAGTCTGTTCTGGGGCAAAGCCAAACGCTAGTCAGTCGCTGCTTGCATGGTGCAGAGAAGTTA
CAAAAACTACCGGGGCGTGAAAATCACCAACTTTACCACATCGTGAGGAATGGCTTATCATTTCTGTGCAATTT
TACACCACTTTAGACCAGACTTAATCGACTACAAGTCTCTGAATCCTCAAGATATTAAGAAAAACAACAAAAAGG
CTTACGATGGATTTGCCAGCATTGGAATTTCCCGTTTACTGGAACCTTCTGATATGGTTTTATTAGCAATCCCTG
ACAACTGACTGTTATGACTTATCTCTATCAAATAAGGGCACATTTTAGCGGACAAGAACTAAAATGTGGTTTCAGA
TAGAGGAAAACAGCAGTAAGAGCACATATAAAGTTGGAAATTTATGAGACAGACACAAAACAGTTCTGTGGATCAAG
AAAAGTTCTACGCTGAACTCAGCGATCTGAAGCGAGAGCCTGAACCTCACCAGCCTGCCCGTGGGGCTGTGGATC
TGCTGTGCGAGGATGACTCTGTGTTTGTAACTGACAGTGGGGTGGGAGAGTCTGAAAGTGAACACCAGACTCCAG

>Wr 9035`c/h Primer 9035`h

AAGTTTAGAARGAtAGGATACATTTGGCTTTGTGATAGCCAATTCACCATCCAATCTGCATTTCTAAAGATCTGGA
CTTCTCCATTTTCCCTTGTTCCATATCACTGCTGGCATGTACAGTCTGAAGCTTTTGTCTCGTAAGCTGAGAGTGG
AGACACATCTTCTTCTTGTCACTGACACATAAGTCACTTAGTTCCAAGTTCTCAGCTTTTAGTCTCTTCTTGCC
TAAGGAAGCCAGGGCTTGAGCTGAATCAGTACTAGAACTTAACCCAGGGTTCATCAGACCCTGAAGTCCCTCGCGGA
GCTCTGCTGCGACTTTTGGGGCTCCGTGTCACTCTTAGTCTGCGGTAGTAAGGGGAGGCTGTGCTTGGACTAAG
GTGGTCACTCTGGAGTCTGGTGTTCACTTTTCAGACTCTCCACCCCACTGTGAGTTACAAAACAGAGTCTATCCTG
CGACAGCAGATCCACAGCCCCACGGGCAGGCTGGTGAGGTTTCAGGCTCTCGCTTCAGATCGCTGAGTTCAGCGTA
GAACCTTTCTTGATCCACAGAAGTGTGTTGTCTGTCTCATAATTTCCAACCTTATATGTGCTCTTACTGCTGTT

>WT 903Ex2/Ex5a Primer 903Ex2

GATGTCAKAACCTTCCCAANCTATGGTGAAATGGCTGCAGAAAAGTTGAAAAGAAAGGTCAAAGGCATCTGGAGAGC
AGAATAGTAAGGTGGTGGACTTGAGGCTGAAGAAGCTATTAGAAGCCAGCCACAGGTGGCAAACTTACTCCCCA
GTGCTGCGCAGAAAGCTGTAACCGAGGCCTCCGAGCAAGGAGAAAAGAGTGGCGTGGAAGATCTCCGGACTGAAC
GATTACAAAAGCAACAGAACGTTTCAGAAATCCTGTTGTGTTTAAACAAGGATTCACAGTCAGAAAAGACTCAGC
TCCAGTCTTTTCAGCCAATATATTGAGAACAGAC

>WT 903Ex2/Ex5a Primer 903Ex5a

TCAAAYAgMACAGGATTTCTGAAACGTTCTGTTGCTTTTTGTAAATCGTTTCAGTCCGGAGATCTTCCACGCCACTC
TTTTCTCCTTGCTCGGAGGCCTCGGTTACAGCTTTCTGCGCAGCACTGGGGAGTAAGTTTGCACCTGTGGCTGG
GCTTCTAATAGCTTCTTTCAGCCTCAAGTCCACCACCTTACTATTCTGCTCTCCAGATGCCTTTGACCTTTCTTTC
AACTTTTCTGCAGCCATTTACCATAGCTGGGAAGTTCTGACATCTTCACTCCGCATCGAGCTTCTGCTATTAGC
TGACGAGCCCTCTCTCAgCTGCCGACGTCTCTTTCATC

>WR 903Ex2/Ex5a Primer 903Ex2

GGGCTCGTCAGCTAATAGCaGAAGCTCGATGCGGAGTGAAGATGTCAGAACTTCCCAGCTATGGTGAATGGCTG
CAGAAAAGTTGAAAGAAAGGTCAAAGGCATCTGGAGAGCAGAATAGTAAGGTGGTGGACTTGAGGCTGAAGAAGC
TATTAGAAGCCCAGCCACAGGTGGCAAACCTTACTCCCCAGTGCTGCGCAGAAAAGCTGTAACCGAGGCCTCCGACC
AAGGAGAAAAGAGTGGCGTGAAGATCTCCGGACTGAACGATTACAAaAAGCAACAGAACGTTTCAGAAAATCCTG
TTGTGTTTTAACAAAGGATTCCACAGTCAGAAAAGACTCAGCTCCAGTCTTTCAGCCaaTATATTGAGAACA

>WR 903Ex2/Ex5a Primer 903Ex5a

AGcAGAAcTGGAGCTGAGTCTTTCTGACTGTGGAATCCTTGTTAAACACAACAGGATTTCTGAAACGTTCTGTTG
CTTTTTGTAAATCGTTTCAGTCCGGAGATCTTCCACGCCACTCTTTTCTCCTTGCTCGGAGGCCTCGGTTACAGCTT
TCTGCGCAGCACTGGGGAGTAAGTTTGCACCTGTGGCTGGGCTTCTAATAGCTTCTTTCANCTCAAGTCCACCA
CCTTACTATTCTGCTCTCCAGATGCCTTTGACCTTTCTTTCAACTTTTCTGACCCATTTCAcCATAGCTGGGAA
GTTCTGACAtCTTcActCCGCACCGAGCTtCtGctATTAgCTGACGAAGCCCTCTCTcAgCTGCCGACGTCTCTC
TT

>WT 903Ex5b/Ex9a m13uni

AGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCBGCCAGTGTGAT
GGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGCAACAGAACGTTTCAGAAATCCTGTTGTGTTTAAACAAGGATTCCACAGTCA
GAAAGACTCAGCTCCAGTCTTTTCAGTCAGTATGTTGAGAACAGACCAGAGATGAAAAGACAGAGATCAATACAGG
AAGATACAAAGAGGGGAAGCTGAGGAGAAGGCAGAGATAACTGAAACTCAGAGGAAGCCATCAGAAGATGAAAAAG
GGTTCAAAGACACCAGTCAGTATGTTGTAGGGGAATTGGCAGCACTGGAGAATGAGCAGAAGCAAAATGGCACCC
GTGCCGCGCTGGTGGAGAAGCGCCTCCGCTATCTCATGGACACAGGAAGGAACACCGAAGAAGAGGAGGCGATGA
TGCAGGAATGGTTCATGCTGGTTAATAAGAAAAATGCCTTAATAAGGAGGATGAACCAGCTTTCCCTCCTGGAAA
AAGAGCATGACTTGAACGAAGGTATGAGCTGCTGAACCGGGAGCTACGGGCCATGCTAGCCATTGAAGAAGGGC
GAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATT
TATAGTGTACCTAAATAGCTTGGC

>WR 903Ex5b/Ex9a m13uni

CCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCNGCCGCCAGTGTG
ATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGCAACAGAACGTTTCAGAAATCCTGTTGTGTTTAAACAAGGATTCCACAGT
CAGAAAGACTCAGCTCCAGTCTTTTCAGTCAGTATGTTGAGAACAGACCAGAGATGAAAAGACAGAGATCAATACA
GGAAGATACAAAGAGAGGAAGCTGAGGAGAAGGCAGAGATAACTGAAACTCAGAGGAAGCCATCAGAAGATGAAAA
AGGGTTCAAAGACACCAGTCAGTATGTTGTAGGGGAATTGGCAGCACTGGAGAATGAGCAGAAGCAAAATGACAC
CCGTGCCGCGCTGGTGGAGAAGCGCCTCCGCTATCTCATGGACACAGGAAGGAACACCGAAGAAGAGGAGGCGAT
GATGCAGGAATGGTTCATGCTGGTTAATAAGAAAAATGCCTTAATAAGGAGGATGAACCAGCTTTCCCTCCTGGA
AAAAGAGCATGACTTAGAACGAAGGTATGAGCTGCTGAACCGGGAGCTACGGGCCATGCTAGCCATTGAAGAAGG
GCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTAT
TCTATAGTGTACCTAAATAGCTTG

>wt EX5b/Ex11 Primer 0903Ex11

CTTCTCCTCCTTCTTGGCCATCTTGCCCTTTGTTTTGCTCCAGAGTTCGCTCCAAATGCTCGTCTTCTTCTTCGGC
CTGCTTCTCCTGGGCGTCCAGGTCCCTGACAAGGGCGTCTCGCTTGTCCACCAGGGCTACTAGTTTCATCCAGCAG
GAGCTGTTCCCGTTCGCTTCTGGGCCTCGGTCTTCTGCCAGTCTTCAATGGCTAGCATGGCCCGTAGCTCCCGGTT
CAGCAGCTCATACTTCTGTTCTAAGTCATGCTCTTTTTCCAGGAGGGAAAGCTGGTTCATCTCCTTATTAAGGC
ATTTTTCTTATTAACCAGCATGAACCATTCTGCATCATCGCCTCCTCTTCTTCCGTGTTCTTCTCCTGTGTCCAT
GAGATAGCGGAGGCGCTTCTCCACCAGCGCGGCACGGGTGTCAATTTGCTTCTGCTCATTTCTCCAGTGCCTCAA
TTCCCTTACAACATACTGACTGGTGTCTTTGAACCTTTTTTCATCTTCTGATGGCTTCCCTCTGANNTTCAGNNAT
CTCTGCCTTCTCCTCAGTTCTCTCTTTG

>wr EX5b/Ex11 Primer 0903Ex11

TCCTCCTTCTTGGCCATCTTGCCCTTTGTTTTGCTCCAGAGTTCGCTCCAAATGCTCGTCTTCTTCTTTCGGCCTGC
TTCTCCTGGGCGTCCAGGTCCCTGACAAGGGCGTCTCGCTTGTCCACCAGGGCTACTAGTTTCATCCAGCAGGAGC
TGTTCCCGTTCGCTTCTGGGCCTCGGTCTTCTGCCAGTCTTCAATGGCTAGCATGGCCCGTAGCTCCCGGTT
AGCTCATACTTCTGTTCTAAGTCATGCTCTTTTTCCAGGAGGGAAAGCTGGTTCATCTCCTTATTAAGGCATTT
TTCTTATTAACCAGCATGAACCATTCTGCATCATCGCCTCCTCTTCTTCCGTGTTCTTCTCCTGTGTCCATGAGA


```

|||||
WR : 62 aaaaaataactcctaactggtggtagatatatacaaacagcatcctgactttcccgccctg 121
|||||
WT : 121 ttcttccttctgctatgctaggtaggggaaggcagggccccgactggcatctctcaattggt 180
|||||
WR : 122 ttcttccttctgctatgctaggtaggggaaggcagggccccgactggcatctctcaattggt 181
|||||
WT : 181 ggttctgacaacctggtgtattgccgcctgtcttcggtgtgatttgtcatttcttcctta 240
|||||
WR : 182 ggttctgacaacctggtgtattgccgcctgtcttcggtgtgatttgtcatttcttcctta 241
|||||
WT : 241 gtatcttccatccttgatggtactggcttttgaggccggggtttgtttcattggttgaa 300
|||||
WR : 242 gtatcttccatccttgatggtactggcttttgaggccggggtttgtttcattggttgaa 301
|||||
WT : 301 aaccacgcagatagcagaggttggttcggtcttatctaacacttctcatgctgtctgtcct 360
|||||
WR : 302 aaccacgcagatagcagaggttggttcggtcttatctaacacttctcatgctgtctgtcct 361
|||||
WT : 361 catattcttctcttcttctgtctgtggtttgcttttcagttctccagaaccacgtcatat 420
|||||
WR : 362 catattcttctcttcttctgtctgtggtttgcttttcagttctccagaaccacgtcatat 421
|||||
WT : 421 agtccctgaagtggaatgatgatgtctccatgagggaaacctcctctcagtcacctgtcc 480
|||||
WR : 422 agtccctgaagtggaatgatgatgtctccatgagggaaacctcctctcagtcacctgtcc 481
|||||
WT : 481 tgtacatcagctgttcttgactgggccattgatctaagataggatttaccctgtgagaca 540
|||||
WR : 482 tgtacatcagctgttcttgactgggccattgatctaagataggatttaccctgtgagaca 541
|||||
WT : 541 gggagaagacttatggacgccaagcatcatttcaagttctagtttttgttgaaagtactg 600
|||||
WR : 542 gggagaagacttatggacgccaagcatcatttcaagttctagtttttgttgaaagtactg 601
|||||
WT : 601 acatacatgcaaggctcgtgtgctttatcaaagctgctgtgttgctaatccagaactgtt 660
|||||
WR : 602 acatacatgcaaggctcgtgtgctttatcaaagctgctgtgttgctaatccagaactgtt 661

```

2.)

```

|||||
WT : 2 ctctctcagtcacctgtcctgtacatcagctgttcttgactgggccattgatctaaga 61
|||||
WR : 1 ctctctcagtcacctgtcctgtacatcagctgttcttgactgggccattgatctaaga 60
|||||
WT : 62 taggatttaccctgtgagacagggagaagacttatggacgccaagcatcatttcaagttc 121
|||||
WR : 61 taggatttaccctgtgagacagggagaagacttatggacgccaagcatcatttcaagttc 120
|||||
WT : 122 tagtttttgttgaaagtactgacatacatgcaaggctcgtgtgctttatcaaagctgctg 181
|||||
WR : 121 tagtttttgttgaaagtactgacatacatgcaaggctcgtgtgctttatcaaagctgctg 180
|||||
WT : 182 tgttgctaataccagaactgttccagtccttggcctatcacatggcttcagtttggaa 241
|||||
WR : 181 tgttgctaataccagaactgttccagtccttggcctatcacatggcttcagtttggaa 240
|||||
WT : 242 cgactgcagcgtgtgggaaaacatgcatccaagttccagtttggcctcctaccaggag 301
|||||
WR : 241 cgactgcagcgtgtgggaaaacatgcatccaagttccagtttggcctcctaccaggag 300
|||||
WT : 302 ctgatggttgaatgtacaaaga 323

```

WR : 301 ctgatgggtgaatgtacaaaga 322

3.)

WT : 1 gaatctttttataataaacagctgtaatccctttaaagggtgtacagactccacagtatttg 60
 |||
 WR : 15 gaatctttttataataaacagctgtaatccctttaaagggtgtacagactccacagtatttg 74

WT : 61 aaccatttgatgaaccagaaaacttttgtaatgataaaggattctccaccccagtctaca 120
 |||
 WR : 75 aaccatttgatgaaccagaaaacttttgtaatgataaaggattctccaccccagtctaca 134

WT : 121 cgaagaaaaaacctaagacctgtagacatgagcaagtacctctatgctgatagttcaaag 180
 |||
 WR : 135 cgaagaaaaaacctaagacctgtagacatgagcaagtacctctatgctgatagttcaaag 194

WT : 181 agtgaagaggaactggatgaatcaaatacctttttatgagcctaagccaacttctccaaat 240
 |||
 WR : 195 agtgaagaggaactggatgaatcaaatacctttttatgagcctaagccaacttctccaaat 254

WT : 241 aatttgggtcaatacagttcaagaaggggaaaactgaacggagagtgaaaaagaagggcccca 300
 |||
 WR : 255 aatttgggtcaatacagttcaagaaggggaaaactgaacggagagtgaaaaagaagggcccca 314

WT : 301 gccccgcggccccactagccccgccagccccgccagccccaccagccctcacaccaag 360
 |||
 WR : 315 gccccgcggccccactagccccgccagccccgccagccccaccagccctcacaccaag 374

WT : 361 actggagtaaatagaaaacacagttgtctctgaggggaaagatctctctacttctccaaaag 420
 |||
 WR : 375 actggagtaaatagaaaacacagttgtctctgaggggaaagatctctctacttctccaaaag 434

WT : 421 ccaagccccgataccaagtctgttctggggcaaaaagccaaacgctagtcagtcgctgctt 480
 |||
 WR : 435 ccaagccccgataccaagtctgttctggggcaaaaagccaaacgctagtcagtcgctgctt 494

WT : 481 gcatgggtgcagagaagttacaaaaaactaccggggcggtgaaaatcaccaactttaccaca 540
 |||
 WR : 495 gcatgggtgcagagaagttacaaaaaactaccggggcggtgaaaatcaccaactttaccaca 554

WT : 541 tcgtggaggaatggcttatcattctgtgcaattttacaccactttagaccagacttaatc 600
 |||
 WR : 555 tcgtggaggaatggcttatcattctgtgcaattttacaccactttagaccagacttaatc 614

WT : 601 gactacaag 609
 |||
 WR : 615 gactacaag 623

4.)

WT : 1 cagccgataccaagtctgttctggggcaaaaagccaaacgctagtcagtcgctgcttgc 60
 |||
 WR : 1 cagccgataccaagtctgttctggggcaaaaagccaaacgctagtcagtcgctgcttgc 60

WT : 61 ggtgcagagaagttacaaaaaactaccggggcggtgaaaatcaccaactttaccacatcgt 120
 |||
 WR : 61 ggtgcagagaagttacaaaaaactaccggggcggtgaaaatcaccaactttaccacatcgt 120

WT : 121 ggaggaatggcttatcattctgtgcaattttacaccactttagaccagacttaatcgact 180

```

WR : 121 ggaggaatggcttatcattctgtgcaatTTTtacaccactTTtagaccagacttaatcgact 180
|
|
|
WT : 181 acaagtctctgaatcctcaagatattaaagaaaacaacaaaaaggcttacgatggatttg 240
|
|
|
WR : 181 acaagtctctgaatcctcaagatattaaagaaaacaacaaaaaggcttacgatggatttg 240
|
|
|
WT : 241 ccagcattggaatttcccgtttactggaaccttctgatatggTTTTattagcaatccctg 300
|
|
|
WR : 241 ccagcattggaatttcccgtttactggaaccttctgatatggTTTTattagcaatccctg 300
|
|
|
WT : 301 acaaaactgactgttatgacttatctctatcaaataagggcacatTTtagcggacaagaac 360
|
|
|
WR : 301 acaaaactgactgttatgacttatctctatcaaataagggcacatTTtagcggacaagaac 360
|
|
|
WT : 361 taaatgtgggttcagatagaggaaaacagcagtaagagcacatataaagttggaaattatg 420
|
|
|
WR : 361 taaatgtgggttcagatagaggaaaacagcagtaagagcacatataaagttggaaattatg 420
|
|
|
WT : 421 agacagacacaaaacagttctgtggatcaagaaaagttctacgctgaactcagcgatctga 480
|
|
|
WR : 421 agacagacacaaaacagttctgtggatcaagaaaagttctacgctgaactcagcgatctga 480
|
|
|
WT : 481 agcgagagcctgaacctcaccagcctgcccgtggggctgtggatctgctgtcgcaggatg 540
|
|
|
WR : 481 agcgagagcctgaacctcaccagcctgcccgtggggctgtggatctgctgtcgcaggatg 540
|
|
|
WT : 541 actctgtgTTTgtaactgacagtggggTgggagagtctgaaagtgaacaccagactccag 600
|
|
|
WR : 541 actctgtgTTTgtaactgacagtggggTgggagagtctgaaagtgaacaccagactccag 600
|
|
|
WT : 601 atgaccaccttagtccaagcacagcctccccttactaccgcaggactaagagtgcacagg 660
|
|
|
WR : 601 atgaccaccttagtccaagcacagcctccccttactaccgcaggactaagagtgcacagg 660
|
|
|
WT : 661 agccccaaaagtgcgcagcagagctccgcgaggacttcagggctgatgaccctgggTtaa 720
|
|
|
WR : 661 agccccaaaagtgcgcagcagagctccgcgaggacttcagggctgatgaccctgggTtaa 720
|
|
|
WT : 721 gttctagtactgattcagctcaagccctggcttcccttaggcaagaagagactaaaagctg 780
|
|
|
WR : 721 gttctagtactgattcagctcaagccctggcttcccttaggcaagaagagactaaaagctg 780
|
|
|
WT : 781 agaacttggaaactaagtgacttatgtgtcagtgacaagaagaaggatgtgtctccactct 840
|
|
|
WR : 781 agaacttggaaactaagtgacttatgtgtcagtgacaagaagaaggatgtgtctccactct 840
|
|
|
WT : 841 cagcttacgagcaaaaagcttcagactgtacatgccagcagtgatattggaacaaggTaaaa 900
|
|
|
WR : 841 cagcttacgagcaaaaagcttcagactgtacatgccagcagtgatattggaacaaggTaaaa 900
|
|
|
WT : 901 tggagaagtccagatctTTtagaatgcagattggatggTgaattggctatcacaagccaa 960
|
|
|
WR : 901 tggagaagtccagatctTTtagaatgcagattggatggTgaattggctatcacaagccaa 960
|
|
|
WT : 961 atgtatcctctcyttctaaactt 983
|
|
|
WR : 961 atgtatcctatcyttctaaactt 983
|
|
|
5. b)
WT : 1 acagagacacagacttcacgaaaaaacatgtgcttctctgaggcagatagagtctgatc 60
|
|
|

```

WR : 22 acagagacacagacttcacgaaaaaacatgtgcttctctgaggcagatagagtctgatc 81
 WT : 61 cagatgcagacaagagcactttaaatcatgcagaccacccaacaaagcagttcagcacc 120
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 82 cagatgcagacaagagcactttaaatcatgcagaccacccaacaaagcagttcagcacc 141
 WT : 121 gaatggtgtccagacaagaggagctgaaagaaagagcgagagttctgcttgagcaagcaa 180
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 142 gaatggtgtccagacaagaggagctgaaagaaagagcgagagttctgcttgagcaagcaa 201
 WT : 181 gaagagatgctgctttcaaggtggggagcaagcatggtggcagcgcagcccctgcgctct 240
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 202 gaagagatgctgctttcaaggtggggagcaagcatggtggcagcgcagcccctgcgctct 261
 WT : 241 gcagcagacagctaaatgatcagcaagatgaagagagacgtcggcagctgagagagaggg 300
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 262 gcagcagacagctaaatgatcagcaagatgaagagagacgtcggcagctgagagagaggg 321
 WT : 301 ctcgctcagctaatagcagaagctcgatgctggagtgaaagatgtcagaacttcccagctatg 360
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 322 ctcgctcagctaatagcagaagctcgatgctggagtgaaagatgtcagaacttcccagctatg 381
 WT : 361 gtgaaatggctgcagaaaagttgaaagaaaggtcaaaggcatctggagagcagaatagta 420
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 382 gtgaaatggctgcagaaaagttgaaagaaaggtcaaaggcatctggagagcagaatagta 441
 WT : 421 aggtggtggacttgaggctgaagaagctattagaagcccagccacaggtggcaaacttac 480
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 442 aggtggtggacttgaggctgaagaagctattagaagcccagccacaggtggcaaacttac 501
 WT : 481 tccccagtgctgcgcatgaaagctgtaaccgaggcctccgagcaaggagaaaagagtggc 540
 |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 502 tccccagtgctgcgca-gaaagctgtaaccgaggcctccgagcaaggagaaaagagtggc 560
 WT : 541 gtggaagatctccgggctgaacgattacaaaaaggaacag 580
 |||||||||||||||||| |||||||||||||||||| ||||||
 WR : 561 gtggaagatctccggactgaacgattacaaaaagcaacag 600

5.a)

WT : 13 tctctgaggcagatagagtctgatccagatgcagacaagagcactttaaatcatgcagac 72
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 1 tctctgaggcagatagagtctgatccagatgcagacaagagcactttaaatcatgcagac 60
 WT : 73 cacccaacaaagcagttcagcaccgaatggtgtccagacaagaggagctgaaagaaaga 132
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 61 cacccaacaaagcagttcagcaccgaatggtgtccagacaagaggagctgaaagaaaga 120
 WT : 133 gcgagagttctgcttgagcaagcaagaagagatgctgctttcaaggtggggagcaagcat 192
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 121 gcgagagttctgcttgagcaagcaagaagagatgctgctttcaaggtggggagcaagcat 180
 WT : 193 ggtggcagcgcagcccctgcgctctgcagcagacagctaaatgatcagcaagatgaagag 252
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 181 ggtggcagcgcagcccctgcgctctgcagcagacagctaaatgatcagcaagatgaagag 240
 WT : 253 agacgtcggcagctgagagagagggctcgtcagctaatagcagaagctcgatgctggagt 312
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 241 agacgtcggcagctgagagagagggctcgtcagctaatagcagaagctcgatgctggagt 300
 WT : 313 aagatgtcagaacttcccagctatggtgaaatggctgcagaaaagttgaaagaaaggtca 372

```

|||
WR : 301 aagatgtcagaacttcccagctatggtgaaatggctgcagaaaagttgaaagaaaggtca 360
WT : 373 aaggcatctggagagcagaatagtaaggtggtggacttgaggctgaagaagctattagaa 432
|||
WR : 361 aaggcatctggagagcagaatagtaaggtggtggacttgaggctgaagaagctattagaa 420
WT : 433 gccagccacaggtggcaaacttactccccagtgctgcgagaaaagctgtaaccgaggcc 492
|||
WR : 421 gccagccacaggtggcaaacttactccccagtgctgcgagaaaagctgtaaccgaggcc 480
WT : 493 tccgagcaaggagaaaagagtggtggaagatctccggactgaacgattacaaaaagca 552
|||
WR : 481 tccgagcaaggagaaaagagtggtggaagatctccggactgaacgattacaaaaagca 540
WT : 553 acagaacgtttcagaaatcctggtgtgtttaacaaggattccacagtc 600
|||
WR : 541 acagaacgtttcagaaatcctggtgtgtttaacaaggattccacagtc 588

```

6.)

```

WT : 1 gatgtcagaacttcccagctatggtgaaatggctgcagaaaagttgaaagaaaggtcaaa 60
|||
WR : 35 gatgtcagaacttcccagctatggtgaaatggctgcagaaaagttgaaagaaaggtcaaa 94
WT : 61 ggcacatctggagagcagaatagtaaggtggtggacttgaggctgaagaagctattagaagc 120
|||
WR : 95 ggcacatctggagagcagaatagtaaggtggtggacttgaggctgaagaagctattagaagc 154
WT : 121 ccagccacaggtggcaaacttactccccagtgctgcgagaaaagctgtaaccgaggcctc 180
|||
WR : 155 ccagccacaggtggcaaacttactccccagtgctgcgagaaaagctgtaaccgaggcctc 214
WT : 181 cgagcaaggagaaaagagtggtggaagatctccggactgaacgattacaaaaagcaac 240
|||
WR : 215 cgagcaaggagaaaagagtggtggaagatctccggactgaacgattacaaaaagcaac 274
WT : 241 agaacgtttcagaaatcctggtgtgtttaa 270
|||
WR : 275 agaacgtttcagaaatcctggtgtgtttaa 304

```

7.)

```

WT : 1 gcaacagaacgtttcagaaatcctggtgtgtttaacaaggattccacagtcagaaagact 60
|||
WR : 1 gcaacagaacgtttcagaaatcctggtgtgtttaacaaggattccacagtcagaaagact 60
WT : 61 cagctccagtcctttcagtcagtatggtgagaacagaccagagatgaaaagacagagatca 120
|||
WR : 61 cagctccagtcctttcagtcagtatggtgagaacagaccagagatgaaaagacagagatca 120
WT : 121 atacaggaagatacaaagaggggaactgaggagaaggcagagataactgaaactcagagg 180
|||
WR : 121 atacaggaagatacaaagagaggaactgaggagaaggcagagataactgaaactcagagg 180
WT : 181 aagccatcagaagatgaaaaaggggttcaaagacaccagtcagtatggtgtaggggaattg 240
|||
WR : 181 aagccatcagaagatgaaaaaggggttcaaagacaccagtcagtatggtgtaggggaattg 240
WT : 241 gcagcactggagaatgagcagaagcaaattggcaccgctgcccgcgctggtggagaagcgc 300
|||
WR : 241 gcagcactggagaatgagcagaagcaaattgacaccgctgcccgcgctggtggagaagcgc 300
WT : 301 ctccgctatctcatggacacaggaaggaacacggaagaagaggaggcgatgatgcaggaa 360

```

```

|||||
WR : 301 ctccgctatctcatggacacaggaaggaacacggaagaagaggaggcgatgatgcaggaa 360
|||||
WT : 361 tggttcatgctggttaataagaaaaatgccttaataaggaggatgaaccagctttccctc 420
|||||
WR : 361 tggttcatgctggttaataagaaaaatgccttaataaggaggatgaaccagctttccctc 420
|||||
WT : 421 ctggaaaaagagcatgacttggaaacgaaggtatgagctgctgaaccgggagctacgggcc 480
|||||
WR : 421 ctggaaaaagagcatgacttagaacgaaggtatgagctgctgaaccgggagctacgggcc 480
|||||
WT : 481 atgctagccattgaag 496
|||||
WR : 481 atgctagccattgaag 496

```

8.)

```

|||||
WT : 72 ttcaaagacaccagtcagtatggtgtaggggaattggcagcactggagaatgagcagaag 131
|||||
WR : 61 ttcaaagacaccagtcagtatggtgtaggggaattggcagcactggagaatgagcagaag 120
|||||
WT : 132 caaattgacaccgctgcccgcgctgggtggagaagcgcctccgctatctcatggacacagga 191
|||||
WR : 121 caaattgacaccgctgcccgcgctgggtggagaagcgcctccgctatctcatggacacagga 180
|||||
WT : 192 aggaacacggaagaagaggaggcgatgatgcaggaatggttcatgctggttaataagaaa 251
|||||
WR : 181 aggaacacggaagaagaggaggcgatgatgcaggaatggttcatgctggttaataagaaa 240
|||||
WT : 252 aatgccttaataaggaggatgaaccagctttccctcctggaaaaagagcatgacttagaa 311
|||||
WR : 241 aatgccttaataaggaggatgaaccagctttccctcctggaaaaagagcatgacttagaa 300
|||||
WT : 312 cgaaggtatgagctgctgaaccgggagctacgggccatgctagccattgaagactggcag 371
|||||
WR : 301 cgaaggtatgagctgctgaaccgggagctacgggccatgctagccattgaagactggcag 360
|||||
WT : 372 aagaccgaggcccagaagcgcagcgggaacagctcctgctggatgaactagtagccctgggtg 431
|||||
WR : 361 aagaccgaggcccagaagcgcagcgggaacagctcctgctggatgaactagtagccctgggtg 420
|||||
WT : 432 gacaagcgagacgcccttgtcagggacctggacgcccaggagaagcaggccgaagaagaa 491
|||||
WR : 421 gacaagcgagacgcccttgtcagggacctggacgcccaggagaagcaggccgaagaagaa 480
|||||
WT : 492 gacgagcatttggagcgaactctggagcaaaacaaaggcaagatggccaagaaggagga 550
|||||
WR : 481 gacgagcatttggagcgaactctggagcaaaacaaaggcaagatggccaagaaggagga 539

```

9.)

```

|||||
WT : 59 cgaggcccagaagcgcagcgggaacagctcctgctggatgaactagtagccctgggtggacia 118
|||||
WR : 1 cgaggcccagaagcgcagcgggaacagctcctgctggatgaactagtagccctgggtggacia 60
|||||
WT : 119 gcgagacgcccttgtcagggacctggacgcccaggagaagcaggccgaagaagaagacga 178
|||||
WR : 61 gcgagacgcccttgtcagggacctggacgcccaggagaagcaggccgaagaagaagacga 120
|||||
WT : 179 gcatttggagcgaactctggagcaaaacaaaggcaagatggccaagaaggaggagaagtg 238
|||||

```

WR : 121 gcatttggagcgaactctggagcaaaacaaaggcaagatggccaagaaggaggagaagtg 180
 WT : 239 tgctcttcagtagtagtagccttggaccagacctctccccactacttgagtcttaggtc 298
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 181 tgctcttcagtagtagtagccttggaccagacctctccccactacttgagtcttaggtc 240
 WT : 299 cccaggccagaagcagactggttgacttaaaactttttaacattttgtttgctggattg 358
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 241 cccaggccagaagcagactggttgacttaaaactttttaacattttgtttgctggattg 300
 WT : 359 tacttctggaccaccctccccatttctcttctccagataatacacagagctccaga 418
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 301 tacttctggaccaccctccccatttctcttctccagataatacacagagctccaga 360
 WT : 419 tagctttaagactctttgagttaatcatgaaatcattcttgaaatcctgtgaagtaga- 477
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 361 tagctttaagactctttgagttaatcatgaaatcattcttgaaatcctgtgaagtagat 420
 WT : 478 ttgcgagacaccccgtgaatgactggactga 510
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 421 ttgcgagacaccccgtgaatgactggactga 453

10.) rc

WT : 1 cctgtgaagtaaatttgcgagacaccccgtgaatgactggactgaagatgctcaagaa 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 2 cctgtgaagtaaatttgcgagacaccccgtgaatgactggactgaagatgctcaagaa 61
 WT : 61 actgtccaaaaaggagggagactccctggttatcgcccccttctgttttggatgggatgag 120
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 62 actgtccaaaaaggagggagactccctggttatcgcccccttctgttttggatgggatgag 121
 WT : 121 aatytgaaacatgtttgtttagtattgttggaatagcgaaatgacagtggtgggggg 180
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 122 aatytgaaacatgtttgtttagtattgttggaatagcgaaatgacagtggtgggggg 181
 WT : 181 gcaaaggggagtaagaaaatgtcatgattttttttccaatcccgcagtatgtatgtgac 240
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 182 gcaaaggggagtaagaaaatgtcatgattttttttccaatcccgcagtatgtatgtgac 241
 WT : 241 actgttacttaaatctcatagtttagatcttagtctgtgtattgacgaagctgtgttccat 300
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 242 actgttacttaaatctcatagtttagatcttagtctgtgtattgacgaagctgtgttccat 301
 WT : 301 ttgccagtggggattttctgcagttggttacaattcacataaagataataaagttcctctc 360
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 302 ttgccagtggggattttctgcagttggttacaattcacataaagataataaagttcctctc 361
 WT : 361 t 361
 |
 WR : 362 t 362

10.)

WT : 1 attttctgcagttggttacaattcacataaagataataaagttcctctctgctctcctca 60
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 1 attttctgcagttggttacaattcacataaagataataaagttcctctctgctctcctca 60
 WT : 61 gaggatggccctgtaaggtagcctgagacaaacctggggtttgaaaggtgacctgggaga 120
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 WR : 61 gaggatggccctgtaaggtagcctgagacaaacctggggtttgaaaggtgacctgggaga 120
 WT : 121 acagctctgttcaatgtgcagcagtttacaagacagctcatcagctgatgatgcacat 180

```

|||||
WR : 121 acagctctggttcaatgtgacagcagtttacaaagacagctcatcagctgatgatgcacat 180
|||||
WT : 181 cttatactctgaataattatattacatcttgcttggtcctactttttggtggggctc 240
|||||
WR : 181 cttatactctgaataattatattacatcttgcttggtcctactttttggtggggctc 240
|||||
WT : 241 aacattggctcaagaatgctgttaatatattctgtattgataaaagtctgtccttgga 300
|||||
WR : 241 aacattggctcaagaatgctgttaatatattctgtattgataaaagtctgtccttgga 300
|||||
WT : 301 ctacaagtaaatatcccattacatcttctctagcatagcactgtgtgttttggtgaaaatg 360
|||||
WR : 301 ctacaagtaaatatcccattacatcttctctagcatagcactgtgtgttttggtgaaaatg 360
|||||
WT : 361 gttatggtttatattacaatactgagtcatatataaatttt 402
|||||
WR : 361 gttatggtttatattacaatactgagtcatatataaatttt 402

```

7.2.4.4 Sequenzierungen der alternativ gespleißten Exons

```

>WT 903int5/6 Sequenzierprimer int 5
CCAACATTTGTCTTGACTGGCTTCTGTTTACAGAAATTGTAAACCAGTTGAATGCTCTGAGCAGCTTAGATGAAG
ATCAAGATGACTGCATAAAGCAAGCAAATGTGCCCTCAGCTAAATCAGCCAGTTCCTCTGAAGGTCTAAAGCTCT
CCTCCCTCTGCTTCTGATTGCCTGTCTAACTGTGACTTGCTGCATTCTGACTTCTGTCTGCTTAGCTG

```

```

>WR 903int5/6 Sequenzierprimer int5
ATTTGTCTTGACTGGCTTCTGTTTACAGAAATTGTAAACCAGTTGAATGCTCTGAGCAGCTTAGATGAAGATCAA
GATGACTGCATAAAGCAAGCAAATGTGCCCTCAGCTAAATCAGCCAGTTCCTCTGAAGGTCTAAAGCTCTCCTCC
CTCTGCTTCTGATTGCCTGTCTAACTGTGACTTGCTGCATTCTGACTTCTGTCTGCTTAGCTG

```

```

>WT 903int5/6 Sequenzierprimer int6
GGACGGCATCAGAAGCAGAGGGAGGAGCTTTAGACCTTCAGAGGAACTGGCTGATTTAGCTGAGGGCACATTT
GCTTGCTTTATGCAGTCATCTTGATCTTCATCTAAGCTGCTCAGAGCATTCAACTGGTTTACAATTTCTGTAAAC
AGAAGCCAGTCAAGACAAATGTATGGTCAGGTCATTAATAAAGAGCTGTAGAAGCATGGCTGGTATCA

```

```

>WR 903int5/6 Sequenzierprimer int6
GGCATCAGAAGCAGAGGGAGGAGCTTTAGACCTTCAGAGGAACTGGCTGATTTAGCTGAGGGCACATTTGCTT
GCTTTATGCAGTCATCTTGATCTTCATCTAAGCTGCTCAGAGCATTCAACTGGTTTACAATTTCTGTAAACAGAA
GCCAGTCAAGACAAATGTATGGTCAGGTCATTAATAAAGAGCTGTAGAAGCATGCTGGTATCA

```

Exon = fett

```

WT : 1 tgataccagccatgcttctacagctctttagttaatgacctgaccatacatttgctcttga 60
|||||
WR : 1 tgataccagc-atgcttctacagctctttagttaatgacctgaccatacatttgctcttga 59
|||||
WT : 61 ctggcttctggtttacagaaattgtaaacagttgaatgctctgagcagcttagatgaaga 120
|||||
WR : 60 ctggcttctggtttacagaaattgtaaacagttgaatgctctgagcagcttagatgaaga 119
|||||
WT : 121 tcaagatgactgcataaagcaagcaaatgtgccctcagctaaatcagccagttcctctga 180
|||||
WR : 120 tcaagatgactgcataaagcaagcaaatgtgccctcagctaaatcagccagttcctctga 179
|||||
WT : 181 aggtctaaagctctcctccctctgcttctgattgcctgtcctaactgtgacttgctgcat 240
|||||
WR : 180 aggtctaaagctctcctccctctgcttctgattgcctgtcctaactgtgacttgctgcat 239
|||||
WT : 241 tctgacttctgtctgcttagctg 263
|||||

```


7.3 Sequenzierungen während der Konstruktion des *pli1 targeting* Vektors

7.3.1 Sequenz der Neomycin-Resistenzkassette (β -actin-NEO)

>2252bp

```
GAATTCGAGCTCGGTACCCCCTAGTAACCGAGACATTGAATGGGGCAGTGTCCACAAGGGCGGAGGCTATTCCTG
TACATCTGGGCCTACGGAGCCAGCACCCATCGCCAAAACCTTTCATCCTCTTCTCAATCTCGCTTTCTCTCTCG
CTTTTTTTTTTTTTCTTCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAAAAGGAGGGGAGAGGGGGTAAAAAATGCTGCACT
GTGCGGCGAGGCCGGTGTAGTGAGCGACGCGGAGCCAATCAGCGCCCGCCGTTCCGAAAGTTGCTTTTATGGCTC
GAGTGGCCGCTGTGGCGTCTATAAAAACCCGGCGGCGCAACGCGCAGCCACTGTGAGTCGCGTCCACCCGCGAG
CACAGCTTCTTTGCAGCTCCTTTCGTTGCCGGTCCACACCCGCCACCAGGTAAGCAGGGACGCCGGGCCAGCGGG
CTTCGCTCTCTCGTGGCTAGTACCTCACTGCAGGGTCTGAGGATCACTCAGAACGGACACCATGGGCGGGTGA
GGGTGGTGCCGGGCCGCGGAGCGACACTGGCACAGCCAACCTTTACGCCTAGCGTGTAGACTCTTTGCAGCCACAT
TCCC CGCGGTGTAGACACTCGTGGGCCCGCTCCC GCTCGGTGCGTGGGGCTTGGGGACACACTAGGGTCGCGGTGT
GGGCATTTGATGAGCCGGTGC GGCTTGGCGGTGTTAAAAGCCGATATTAGGTCCATCTTGAGAGTACACAGTATTG
GGAACCAGACGCTACGATCACGCCTCAATGGCCTCTGGGTCTTTGTCAAACCGTTTTGCCTATTCGGCTTGCCG
GGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCAGGGCCGGCTCGGCCGGTGGGGCTGGGATGCCACTGCGCGTGCGC
TCTCTACTGCGCATCGAGGCGCGTGTGCGCTAGGGAGGGAGCTTTCCTCTCCCCCTTTCCTAGTTAGCTG
CGCGTGCATATTGAGGCTGGGAGCGCGGCTGCCCGGGTTGGGCGAGGGCGGGGCCGTTGTCCGGAAGGGCGGG
GTCACAGTGGCACGGGCGCCTTGTTCGCTTCTGCTGGGTGTGGTGCCTCCCGCGCGCACAAAGCCGCCCG
TCGGGCGCAGTGTAGGCGGAGCTTGC GCCCGTTTTGGGGAGGGGGCGGAGGTCTGGCTTCTG CCTAGGTCCGCC
TCCGGGCCAGCGTTTTGCCTTTTATGGTAATAATGCGGCCGGTCTGCGCTTCTTTGTCCCCTGAGCTTGGGCGCG
CGCCCCCTGGCGGCTCGAGCCCCGGGCTTGCCGGAAGTGGGCAGGGCGGCAGCGGCTGCTCTTGGCGGCCCGAG
GTGACTATAGCCTTCTTTTGTGTCTTGATAGTTGCCATGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTTCGTCGACGCAGG
TTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGC
CGTGTTCGGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACT
GCAGGACGAGGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCAACGACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTAC
TGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTACATCACCTTGCTCCTGC
CGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGTACCTGCCCATTCGACCA
CCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CTG GATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATTCGGACGA
AGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGT
CGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGG
CCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGA
ATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCT
TGACGAGTTCTTCTGAGGGGATCGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGCACGGGTGTTGGGTGCTTTGTTCCGAT
CC
```

7.3.2 5' Fragment: *pli1* 5'a – *pli1* 5'b

>4422 bp, Primer sind fett hervorgehoben

```
GTGACTTGTCCCTCCAGAAGCCTGTGTGTGTCAGTATTCTTGGGAGACTAGCTCTCTCTGGGAGGAATTTGGGTATG
GAGAGCTGTGGCACAGGGTCAGCTCTGGTGTGAGAAGGCGACCTAAAGGATCCTGTCCCTGGCTGTTCTTGTAT
TCCTGTGTTCTTATCGCTCTGTGGGGAGTCCATCTTGGGCCAGGAATTTGAGCAGAAGTGGTAGTCTTACCTGTG
CTCACAGGTGTGTGGGTACTCCTGAGAGACCAGCTCTCTCCTGGCGGTATTTGGGTATGAAGTCTGTGGCACAG
GATCAGCTTTGCATATTTGTATCTTTTTAGTGTAAGTTCCACATATGAGGAAGAGGGTGGCTTATCTCATGTAGC
ATGGCCTCCAGTGCTCCATTTTCTGTAGGTAATATCATTTTCATTTTCCATTATAGCTGAGTGAAGCTGCATTTGT
GCCAATGTAATGTTTCTTATTTTCTTGTGTCTCACAGAAGGTGACTTTTGTGCTTTTCTAAGCAAATGTTTGTG
TAACTTAGTTCTAAGAGGAATTTAACTGCTCGGGATCATCATTTAGTGCTACTTTTTTCCATAGCCTATTTAAAA
AGTATTATTTCTTATGCCTAAAATGTATAACAATGGCAATATAATACAACATATTACTTGGTGTCTAACTTTTA
CATTTCTTAAATTAATAATAGTTTGAAGTAGTTGGGGGAAATCTATTTTATTCATTTTCCCCGAGCTTAAATTTT
GTCTCTAGTACACACTCAACTTTTCAGAGGTTTACTTAAAGATTGTGCTGGTGGACAGTAAAACAGTTATACAG
GCTGTGCTTCAATGTGAGAGTTGAGGTGGTTTTGGGTTATTGGTTAACCTACTTTCCAAGTGTAAATCCCCCTTG
TGTTCTTTTATGCATAATATTTTCAGCAGTTTACAGTGGTAGAGTATGAGCTGTGCTGTGTTTCTTTACTGTT
```

ATTGAACCTTACAGTAGTTACTATCTCTTATGATTGTTGTGAGGTTGAAATCACACGTGTCAAATGGTTAGGATA
 GACTTTGGCCCAAAGACAACCCAGCATTAGCTCTTATAAAGGGCAGGCGTTGGGGACAAATGGTGTGGTTTGTAT
 AACTTAGGAGCTAGAATCCCCTGCACTTTTTCTATGTTTGTATCCTGAATAGCTGCTAAGTCTCACCAAACCTTTC
 CCTTCCTTTAAATATTTTTGTTACTTTAATACTTAATAGAGGAATTTCTGTTACTTTTTTCATAAACATATATAACC
 ACTTCAGTAATTTAAGTAATCTAAAATTGCTGAATACAGGCTAGAAAATGACAGAGAACAACAAGCATATTTGAGT
 TTCTGATTGTTTTAAAAATACATTTTTCCAGTAACATAGTGAATACAATGATTTGGGGTTGGAGTGGTGAGCATT
 AAGTAAACCCTGCTTCCCCCAGTCACAAAGACTCCCTACAGCTTCTTCTTGCCTCACATTCAGAAGTACATGGA
 ACTTCTCTTCTGAAGTGTGCGGACTCACATTTCTAATATATGTTTTCTTCTGATGGTACCAGGAATTTGCTTT
 TGTGTGATACCATGTTTTTCCCCTTGGGTTCCCTTCTTCCCTCCATTATTTAAATAAGTATACATTTATTAATAA
 TTTTGTGGTGGTACTACTACCAAGGAAATTTTTCTGCTGCTTGGTGAATTAATGGTGGTGTTCAAAATCTAAG
 TGCTGTCAAATTTGGGGTAGGACTGTGTGCATGGTGTGAGCCAGCTAATATAATGACAACAAGCAGAATGGTGA
 TTGAGGCTATAGGACATTCTTTGTATATGTATCCACACTAAATACTTGAATGATTCAGGAAAATCGTTTTGAAAAA
 TTACATATCTTACTCAGATTTAAGACTACATAGAGAATAGTTGAAGGAAAATGGATACAAAACACTATCTGTGTTA
 AAAATGCTGACCCATTATATAGACAATGGCCTTCTTGTAAAAAATAAATGCTTTTTACAGACATTAATATG
 TACAAGAATTGCACTGAAAGAAAAATGATACTTGTGGCACATTTTATTTGAGTTTAATAATGCTCATTCATGT
 CAGTTGATTGTTTTTAAAGAAAATTTAATCCCAGCCAGGTGTTGATCCCAGCACTCAGGAGACAGAGGCAGGTGGA
 TCTCTGCTCTGAGTGTGGGATCACAAAACCAGCCTGGTCTATACAGTTCAGGACAGCCAGGTTACACAGAG
 AAACCCTGTCTGAAAGGGGAGGGGAGGGGAGGGAAGGAAAAATGAAAGAGAAGAAAAAGAAAACGTAATCTTGTAA
 TCTTGGATCATTTAATTATCTAAGTACTGATGGTACTGAATTATTTTAGGCTTTAGAATATTTAGAGGTAAGAGT
 AGAAGTTGAGTTTGGCTTGTTCCTGTGACTGCAGGTTTAGCGTTACTGATAAATATTTCTAGTCATATCAGATA
 CTTACATTAATAATTCATAACAGTAGCAAAATTACAGTTATGAAGTAGCAATGACATAATTTTACAGTTGGGGGTC
 CCCACAATATGAGGCAATGTAGTAAAGGGTACAGTGTAGGAAGGCTATAACCTATCCTGAATAATAGAGCAGT
 GCACATTTTACTAGTTAAGTTCTCAGGCTAGGGCTGGGGGCTTGCTTATATTTTTCCAGCTCCAAAATTTCCCTT
 CATTCTCTTTATTTTAGTCCCTTTATTTTTAGAGTAAGAAAAATCAGATTGCTTTGGTTAAAGAGCTACAAC TAG
 AACACAGGCTACTACTTGTAGCTGTGTTATATGCTGTGCAAGTATGGGTATTCATGTAACACTTTCAGACTT
 AAGGAATAGCCATGTTTTTCCAAATGCTATAGTTTGAATAAATATATAAGGAGAGATTTCTTTTTATATTTACCTA
 TATTTTTGCTACCCTGTAGCTGTTCTTTTTGTGAGCAATCCCCTTGTAGTCAATCCTTTATGACATAACCCTGG
 CAAGTTCTTGTTCAAAATTTTTCTTTACCTGAAAATGTCTTAAAGTCTTCCCTCTGGTTTTATTTGGGTACAGATTC
 TTCTGTTGACAGTTACTGCTATACATACAAACAACATTAATAAGACTGAAACAGGTTATATTCGTGTATGTATGTA
 TCAAGAATTAGAGAAATAGAGGCCATGAATTTGATAGCTGCAAGAGGGGTGTGGGAAGAATTGGAGGGGAAGAAA
 TGGAAGGGGAAAATGATGTATTATATTTAATTCCAATAAATGGTTAAAGTTTTAAATATATTAACCCTGTTT
 TATGGATCTTGTGGTTTTCTTATGAGACATATGCTGTCAATTAATAGCTTCTTCACTGGAGATAAAAATACCATT
 ATTTTTGTTTGGTTTTTTGTTTGGTTTTGTTGATTTCCATTTTTAGAACTTTTATCTTGATGCTGAGATCTTTGG
 GTTATCTAGAGACAGAAGTGTAGTTTTCATGCATTTGTAGTTTTATTTCTTGTCCAGATTTGTTGTTTTTCAGG
 CATTATTTCTTTGAGTACTGTTTCAGCTCTGCAGTTTTCTTCCAGTGATATAAATTTAGCTTCTTTTGTCTGTAG
 TCTCGCAGACCCAGGAGGCTCTGCCTACTCTGTTGTCCAGTCTACCAAGAGGCTCTTTGTTGTAGTTTGTATGT
 GTCTTGGTTTTGGAGTTTTCCACTTTATGCTCTGTTTGTGTTGAGACTTTTACTTTATCCCCACTGCCCCAG
 ATGTATTGTAATTGCTTCTTGGAGCATTTTTATCATGGCTGCATCTTACTCTGTTGGGCAATCTTAGATTTCCCTT
 GTCTCAGTCTTGTCCCCTGTTGTTACCTCTTCTGCTTTAAGTCTTTTTAGTCTTTCATTTGTAGGGATGATATGT
 TGAACCCTGGGTATTTTCCAGATTCTGTTTGGAGAATTTGTATATTACCTAAACCTTCTCTTTGTACTGACATTT
 CTGACTCTGCTTGTATCAGCAAAGTGCATGTCTTCTGTCTGTTACTGATAGCAGATAAAGTGTAGGTTCTCTAGT
 CAACCTCTGTGGCAGGTTCTTACTCCTGCTGAGTGCATGTGGAATTGAGCTCATCCTTGTAGTCTCCAGTGTCC
 TCACTGGGATTGACCACCTAAGTGTGCTTGTGCACCTAAGTAAGCGCCTTGGCTCCTTCCAAGCTGCATGACA
 CCATCTACTGTGATTTTTTTTCAATCTCTTTTTGTGGTTCCAGTAATTATCAAGGTTCCACACTCAACTCTG
 ACTGGTAAGAATGGGGTATTTTTCTGTAGTATTTGGCTACAGTAGAATAGTTATAGTCAGAACTTCTACCAAGCT
 GACACTTTATTGTTCTTTAAACAAAAAGCAAGCATGNTTTGGTTTTGTCTGTACTAGTTTCATATTTCCAG

a) Ansequenzierung des 5' Fragment mit M13rev (Primer pli15'b fett hervorgehoben)

ACAGCTATGACCATGCATTACGCCAAGCTCAGAATTAACCCCTCACTAAAGGGACTAGTCTCGCAGGTTTAAACGA
 ATTCGCCCTT**CTGGAAATATGAACTAGT**ACAGACAAAACCAAAAACATGCTTGCTTTTTGTTTAAAGGAACAATA
 AAGTGTGAGCTTGGTAGAAAGTTCTGACTATAACTATTCTACTGTAGCCAAATACTACAGAAAAATACCCCATTTCT
 TACCAGTCAGAGTTGAGTGTGGAACCTTGATAATTACTGGAACCACAAAAGAGAGATTGAAAAAATAACACAGT
 AGGATGGTGTGATGCAGGCTTGGGAAGGAGCCAAGGCGTTACTTAGGTGCACAAGCACACTTAGGTGGTCAATC
 CCAGTGACGACACTGGAGACTACAAGGATGAGCTCAATTCACATGCACTCAGCAGGAGTAAGAACCCTGCCACA
 GAGGTTGACTAGAGAACCCTACACTTTATCTGCTATCAGTAACAGACAGAAAGACATGCACTTTGCTGATCAAGCA
 GAGTCAGGAAATGTCAGTACAAAGAGAAGGTTTAGGTAATATACAAATTTCCAAACAGAAATCTGAAAATACCCA
 GGGTTCAACATATCATCCCT

b) Ansequenzierung des 5'Fragment mit M13uni (Primer pli15'a fett hervorgehoben)

TAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTT
GTGACTTGTCCCTCCAGAAGCCTGTGTGTGTCAGTATTCTCTGGGAGACTAGCTCTCTCTGGGAGGAATTTGGGTATG
 GAGAGCTGTGGCACAGGGTCAGCTCTGGTGTGAGAAGGGCAGCTAAAGGATCCTGTCCCTGGCTGTTCTTGTAT
 TCCTGTGTTCTTATCGCTCTGTGGGGAGTCCATCTTGGGCCAGGAATTTGAGCAGAAGTGGTAGTCTTACCTGTG
 CTCACAGGTGTGTGGGTACTCTGAGAGACCAGCTCTCTCTGGCGGTATTTGGGTATGAAGTGCTGTGGTACAG
 GATCAGCTTTGCATATTTGTATCTTTTTAGTGTAAAGTTCCACATATGAGGAAGAGGGTGGCTTATCTCATGTAGC
 ATGGCCTCCAGTGTCCATTTTCTGTAGGTAATATCATTTTCATTTTCCATTATAGCTGA

7.3.3 3' Fragment: Pli1intron d – pli1intron e

> 2625 bp, Primer fett hervorgehoben

CTCTGCATGATGAAACAGAACTGAGTATGGTGTGCTCATTGTTGGTCTCTGGGTTAGAATTGCTGTTACTTTGTTTT
 TTAAAAATTTGTACCTTACTGTATTCCAGAAGAATTTAAAGCTAATTATAAGAAAAATTTTTTAGTGACCGTATTTA
 TGCCATCCTTGTAAGCATTGAAATACTACATGCAGACTGGAGAGACGCTCAGAGACTAACAGTAATGGCACTCAC
 TGCCCTTACCTTCTAGTGGACCTGAGTTTCAGTTTTCCAGCACCCACATCAGGAAGCTCACAGTGGCTGTAACCTCC
 AGATCCAAAAGATGTTGGCACCTCTTCTGACCTGCAAGCAAACACACACACACATAAAATAAATAGATAAAA
 AACCCACTGTAAACGCAGTGTAGGCTTTACTTTGTCCTCACCTGGGAAAAGGATTTGCATGTTCTCTCCCAT
 TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGATTTATTAAGTGGATATTAGCCAAAACCTAGGATACCCAAGATATA
 AGATACAATTTCTAAACACATGAAACTCAAGAAAAATGAAGACTGAAAGTGTGGACACTATGCCCTCCTTAGAA
 GTGGGAACAAAACACCTTGGAAAGGAGTTACAGAGACAAAAGTTTGGAGCTGAGATGAAAGGATGGACCATGTAGA
 GACTGCCATATCCAGGGATCCACCCATAATCAGCATCCAAACGCTGACACCATTGCATACACTAGCAAGATTTT
 ATCGAAAGGACCCAGATGTAGCTGTCTTGTGAGACTAGGCCGGGGCCTAGCAAAACAGAAAGTGGATGCTCAC
 AGTCAGCTAATGGATGGATCACAGGGCTCCCAATGGAGGAGCTAGAGAAAAGTACCAAGGAGCTAAAGAGATCTG
 CAACCTATAGTGGAAACAACATTATGTACTAACCCAGTACCCCGAGCTCTTACTCTAGCTGCATATGTATCAA
 AAGATGGCCTACTCGGCCATCACTGGAAAGAGAGTCCCATTGGACACGCAAACCTTATATGCCCCAGTACAGGGG
 AACGCCAGGGCCAAAAGGGGGAGTGGGTGGGTAGGGGAGTCCGGGTGGGTGGGTATGGGTACTTTTGTATAG
 CATTGGAAATGTAATGAGCTAAATACCTAATAAAAAATGGAAAAGGAAAAAAGATTTATTTATTATACATAA
 GTACACTTTAGCTGACTTCAGACACACCAGAAGAGGGCATCAGATCTCATTACGGGTGGTTGTGAGCCACCATGT
 GGTGCTGGGATTTGAACTCAGGACCTTCGGAAGAGCAGTCAGTGTCTTACCCACTGAGCCATCTTGCTAGCCC
 TCTCCCATTTCTTTGAAACATTTTCTTTAACTACTTGGCCAACTACAAAAGACCCTTTCCCTTTCTGCTTCAG
 GTAATTTTATGTGCCTTAGTGTATATTTGTTCTATTGCCTTCTGAGAAAAGTGTAAATTTGTGCATAAGGACCAGC
 TTTGTTTATACTTCTTGATAAGCAGACTTGTATAGCCCTGAGGGAGCAGTAAACTGACTCTGAAGCACTACACAT
 CTGTTTACTTCAACAGTCACCTCGTTCAATTTAAAAAAGCAACTGAAGAGTGAAGAAGAGGAAATGCATTTCTTC
 AGTTACTTTAACCTAAACCTGGAATTGTAAAACATAGATGCAGTCTGTTAGCTAAGAAGTCTAGAAACTGAAAAT
 TATGGAATCTCCTGTCCACTTGGTACTTATTTTTTACTAAATGTTTGGCTCTCTAGACTTAGTTATGCTTTTGA
 GAGTCAGACTATTATAGCTTCTTGTATTTATGACCTTTTTTAAAAATTTAACTTCATGTGTCTGGGTATTTTGC
 CTGCATATATGCCTGATGCCAGAGAGGCCAAAAGGCAGCTTTGGATTCTTGGGACTGGAATTACAGCAGTTGG
 TGAGCCACCATGTGAGCGATGGGAAGAACCTAGGGTCTCTGGAAAAGGAACGAGTGTCTTATGACAGTGGCCACC
 TCAGCAATTCCTGTTTATGACTCTTGGACTGGAGGCCATACCTCCTAGGCTCCAATGTTTCTCCCTCAGTACTAGT
 GGTATTCCTGGGACCAAGTTACCATACTGGCCAACTCGGCCAACTTAGGTTGGATATGACAGACAGCACATAAC
 AAAATACACACACATAAACACAGTATTGCAAATTTAGGGCTACATAGATTTTAAATAATGTTAAATGATAAACAGC
 TTTTTAAGAAAAAGTATTAAGGATTAATTTATTTTGGCTAGAAAACCTTGTGAACATTTAAAAAGGGTGATTTAAAA
 TTTAAAAATACAATTTAAGCTGTCTTAAATTTAGAAAATTTATCAGCTGCCGGGCATGGTGCCGCACGCCCTTTAATC
 CCAGCAGTTGGGAGGCAGACGCAGGTGGATTTCTGAGTTCCAGGCCAGCCAGGGCTACACAGAGAAAACCTGTCT
 CGGAAAACAAAACAAAACAAAAAATAATAATAATAACAATAATAATAATCAGCTAAGCGTTAGCAGTAGTAATC

a) Ansequenzierung des 3'Fragment Klons mit M13 rev, Primer pli1intron d fett hervorgehoben

ttacGCCAAGCTCAGAATTAACCTCACTAAAGGGACTAGTCTCTGCAGGTTtAAAC**GAAATTC**GCCCTT
CTCTGCATGATGAAACAGAACTGAGTATGGTGTGCTCATTGTTGGTCTCTGGGTTAGAATTGCTGTTACTTTGTTTT
 TTAAAAATTTGTACCTTACTGTATCCAGAAGAATTTAAAGCTAATTATAAGAMaatTTTTTAGTGACCGTATTTA
 TGCCATCCTTGTAAGCATTGAAATACTACATGCAGACTGGAGAGACGCTCAGAGACTAACAGTAATGGCACTCAC
 TGCCCTTACCTTCTAGTGGACCTGAGTTTCAGTTTTCCAGCACCCACATCAGGAAGCTCACAGTGGCTGTAACCTCC

AGATCCAAAAGATGTTGGCACCCCTCTTCTGACCTGCAAGCAAACACACACACACACATAAAATAAATAGATAAa
 MMCCCACTGTAAACGCACTGAGTAGGCTTTACTTTTGTCTCACCCCTGGGAAAAGGATTTGCATGTTCTCTCCCAT
 TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTaaGATTTaTTAAGTGA

7.3.4 Ansequenzierung der pBSNeo Klone mit M13rev

(BamHI Schnittstellen fett hervorgehoben)

>PbsNeo-Klon1

AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGC
 GGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGT**GGATCC**GAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATT
 GCCGATCCCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGT
 AAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCC
 GATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCG
 GCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTGCGGCATGCGCGCTTGAGCCTGGCGAACAGTT
 CGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTG
 CTCGCTCGATGCGATGTTTCgCTTGTTGGTGGTCAATGGGCAgGTA

>PbsNeo-Klon2

AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGC
 GGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGT**GGATCC**GAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATT
 GCCGATCCCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGT
 AAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCC
 GATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCG
 GCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTGCGGCATGCGCGCTTGAGCCTGGCGAACAGTT
 CGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTG
 CTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGTTGGTGGTCAATGGGCGAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCCGCCGATTG

>PbsNeo-Klon3

AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGC
 GGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGT**GGATCC**GAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATT
 GCCGATCCCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGT
 AAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCC
 GATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCG
 GCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTGCGGCATGCGCGCTTGAGCCTGGCGAACAGTT
 CGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTG

7.3.5 Ansequenzierung der pBSNeo5'Fragment Klone mit M13 uni:

bei Klonen 2, 3, 5 Primer pli15'a fett hervorgehoben

bei Klon 6 Primer pli15'b fett hervorgehoben

>Klon2 Neomycin-5'Fragment

GAGCGCGGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAG
 CTTGATATCGAATTCGCCCTT**GTGACTTGTCCCTCCAGAAGC**CTGTGTGTCAGTATTCCTGGGAGACTAGCTCTC
 TCTGGGAGGAATTTGGGTATGGAGAGCTGTGGCACAGGGTCAGCTCTGGTGTGCAGAAGGCGACCTAAAGGATCC
 TGTCCCTGGCTGTTCTTGATTCTGTGTTCTTATCGCTCTGTGGGGAGTCCATCTTGGGCCAGGAATTTGAGCA
 GAAGTGGTAGTCTACCTGTGCTCACAGGTGTGTGGTACTCCTGAGAGACCAGCTCTCTCTGGCGGTATTTGG
 GTATGAAGTGCTGTGGCACAGGATCAGCTTTGCATATTTGTATCTTTTTAGTGTAAGTTCCACATATGAGGAAGA
 GGGTGGCTTATCTCATGTAGCATGGCCTCCAGTGCTCCATTTTCTGTAGGTAATATCATTTTCATTTTCCATTAT
 AGCTGAGTGAAGCTGCATTGTGCCAATGTAATGTTTCTTATTTCTTCTGTGTCTCACAGAAGGTGACTTTTGT

>Klon3 Neomycin-5'Fragment

AGCGCGGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGC
 TTGATATCGAATTCGCCCTT**GTGACTTGTCCCTCCAGAAGC**CTGTGTGTCAGTATTCCTGGGAGACTAGCTCTCT
 CTGGGAGGAATTTGGGTATGGAGAGCTGTGGCACAGGGTCAGCTCTGGTGTGCAGAAGGCGACCTAAAGGATCCT

GTCCCTGGCTGTTTCCTTGATTCTGTGTTCTTATCGCTCTGTGGGGAGTCCATCTTGGGCCAGGAATTTGAGCAG
 AAGTGGTAGTCCTACCTGTGCTCACAGGTGTGTGGGTACTCCTGAGAGACCAGCTCTCTCCTGGCGGTATTTGGG
 TATGAAGTGCTGTGGCACAGGATCAGCTTTGCATATTTGTATCTTTTTTAGTGTAAAGTTCCACATATGAGGAAGAG
 GGTGGCTTATCTCATGTAGCATGGCCTCCAGTGCTCCATTTTCTGTAGGTAATATCATTTTCATTTTCCATTATA
 GCTGAGTGAAGCTGCATTGTGCCAATGTAATGTTTCCTTATTTCTTCTGTGTCTCACAGAAGGTGACTTTTGTTC
 C

> Klon5 Neomycin-5'Fragment

GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAG
 CTTGATATCGAATTCGCCCTT**GTGACTTGTCCCTCCAGAAGC**CTGTGTGTCAGTATTCCTGGGAGACTAGCTCTC
 TCTGGGAGGAATTTGGGTATGGAGAGCTGTGGCACAGGGTCAGCTCTGGTGTGCAGAAGGCGACCTAAAGGATCC
 TGTCCTGGCTGTTTCCTTGATTCTGTGTTCTTATCGCTCTGTGGGGAGTCCATCTTGGGCCAGGAATTTGAGCA
 GAAGTGGTAGTCCTACCTGTGCTCACAGGTGTGTGGTACTCCTGAGAGACCAGCTCTCTCCTGGCGGTATTTGG
 GTATGAAGTGCTGTGGCACAGGATCAGCTTTGCATATTTGTATCTTTTTTAGTGTAAAGTTCCACATATGAGGAAGA
 GGGTGGCTTATCTCATGTAGCATGGCCTCCAGTGCTCCATTTTCTGTAGGTAATATCATTTTCATTTTCCATTAT
 AGCTGAGTGAAGCTGCATTGTGCCAATGTAATGTTTCCTTATTTCTTCTGTGTCTCACAGAAGGTGACTTTTGTTC
 GC

> Klon6 Neomycin-5'Fragment

GAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAG
 CTTGATATCGAATTCGCCCTT**CTGGAAATATGAACTAGTACAGAC**AAAAACAAAAACATGCTTGGCTTTTTGTTTTA
 AAGGAACAATAAAGTGTGAGCTTGGTAGAAAGTTCTGACTATAACTATTCTACTGTAGCCAAATACTACAGAAAA
 TACCCCATTTTACCAGTCAGAGTTGAGTGTGGAACCTTGATAATTACTGGAAACCACAAAAAGAGAGATTGAAAAA
 AAAATCACAGTAGGATGGTGTGCATGCAGGCTTGGGAAGGAGCCAAGGCGCTTACTTAGGTGCACAAGCACACTTA
 GGTGGTCAATCCCAGTGACGACACTGGAGACTACAAGGATGAGCTCAATTCCACATGCACTCAGCAGGAGTAAGA
 ACCTGCCCACAGAGTTGACTAGAGAACCTACACTTTATCTGCTATCAGTAACAGACAGAAAGACATGCACCTTTC
 CTGATCAAGCAGAGTCAGGAAATGTGAGTACAAAGAGAAGGTTTAGGTAATATACAAATTCCTCAAACAGAAATCT

7.3.6 Ansequenzierung der k.o.-Klone

>Klon 52 M13rev

enthält Intron mit EcoRI und NotI Schnittstelle

TGATCGCCAGCGCGCAATTAACCCTCCTAAGGGAAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCGAATTCG
 CCCTT**GATTACTACTGCTAACGCT**TAGCTGATTATTATTATTGTTATTATTATTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTGT
 TTCCGAGACAGGGTTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTGGCCTGGAACCTCAGAAATCCACCTGCGTCTGCCTCCCAACT
 GCTGGGATTAAGGCGTGCAGCACCATGCCCCGAGCTGATAAATTTCTAAATTTAAGACAGCTTAAATTTGTATT
 TTAATTTTTAAATCACCTTTTTTAATAGTTTACAAGTTTTCTAGCAAAATAAATTAATCCTTAATACTTTTTCTT
 AAAAAGCTGTTTTATCATTTAACATTATTAATAAATCTATGTAGCCCTAAATTTGCAATACTGTGTTATGTGTGT
 ATTTTTTTTCTTTTTTACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACAT
 GGTATGTGCTGTCTGTGCATATCCAACCTAAGTTTTGGCCGAGTTTTGGCCAGTATGGTAACTTGGTCCAGGAATAC
 CACTAGTACTGAGGGAGAAACATTGGAGCCTAGGAGGTATGGCCTCCAGTCAAGAGTCATAAACAGGAATTGCTG
 AGGTGGCTCACTGCTAAGAGCACTCGTTCTTTTTCCAGAGACCCTAGGTTCTTCCCATCGCTCACATGGTGGCT
 CACCAACTGCTGTAATTCAGTCCCAAGAATCCAAGCTGCCTTTTTGGCTCTCTGGACATCAAGCATATAT

>Kon 52 M13uni

enthält 5'UTR nach BamHI und EcoRI Schnittstelle

GAGCGTCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAA
 GCTTGATATC**GAAATTC**CTGCAGCCCGGGG**ATCCTGTCCCTGGCTGTT**CCTTGATTCTGTGTTCTTATCGCTCT
 GTGGGGAGTCCATCTTGGGCCAGGAATTTGAGCAGAAGTGGTAGTCCTACCTGTGCTCACAGGTGTGTGGGTACT
 CCTGAGAGACCAGCTCTCTCCTGGCGGTATTTGGGTATGAAGTGCTGTGGCACAGGATCAGCTTTGCATATTTGT
 ATCTTTTTTAGTGTAAAGTTCCACATATGAGGAAGAGGGTGGCTTATCTCATGTAGCATGGCCTCCAGTGCTCCATT
 TTCCTGTAGGTAATATCATTTTCATTTTCCATTATAGCTGAGTGAAGCTGCATTGTGCCAATGTAATGTTTCCCTTA
 TTTCTTCTGTGTCTCACAGAAGGTGACTTTTTGTTGCTTTTTCTAAGCAAATGTTTGTAACTTAGTTCTAAGAGGAA
 TTTAAGTACTCGGGATCATATTTAGTGCTACTTTTTCCATAGCCTATTTAAAAAGTATTTTCTTATGCCTA
 AAATGTAACAATGGCAATATAATAACAACATATTACTTGGTGTCTAACTTTTACATTTCTTAAATTAATAATA
 GTTTGAAGTAGTTGGGGAAATCTATTTTATTCATTTTCCCCGAGCTTAATTTTGTCTCTAGTACACACTCAACT
 TTCAGAGGTTTATTCTTAAATGTGCTGGTGGACAGTAAAACCAGTTTACAGGCTGTGCTTAATGGGC

>Klon 55 M13rev

enthält Intron mit EcoRI und NotI Schnittstelle

```
ATGATACGCCAGCGCGCAATTAACCCTCCTAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCGAATT
CGCCCTTGATTACTACTGCTAACGCTTAGCTGATTATTATTATTGTTATTATTATTATTTTTTTGTTTTGTTTTG
TTTTCCGAGACAGGGTTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTGGCCTGGAACCTCAGAAAATCCACCTGCGTCTGCCTCCCAA
CTGCTGGGATTAAAGGCGTGCGGCACCATGCCCGCAGCTGATAAATTTCTAAAATTTAAGACAGCTTAAATTTGTA
TTTTAAATTTTAAATCACCTTTTTTAATAGTTTACAAGTTTTCTAGCAAAAATAATTTAATCCTTAATACTTTTTTC
TTAAAAAGCTGTTTTATCATTTAACATTATTAATAATCTATGTAGCCCTAAATTTGCAATACTGTGTTATGTGTGT
GTATTTTTTTTTCTTTTTTACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACATACAT
CAGGTATGTGCTGTCTGTTCATATCCAACCTAAGTTTTGGCCGAGTTTTGGCCAGTATGGTAACTTGGTCCCAGGAAT
ACCACTAGTACTGAGGGAGAAACATTGGAGCCTAGGAGGTATGGCCTCCACTCAA
```

>Klon 55 M13uni

enthält 5'UTR nach BamHI und EcoRI Schnittstelle

```
GAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAA
GCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTGTCCCTGGCTGTTCTTGATTCTGTGTTCTTATCGCTCT
GTGGGGAGTCCATCTTGGGCCAGGAATTTGAGCAGAAGTGGTAGTCTACCTGTGCTCACAGGTGTGTGGGTACT
CCTGAGAGACCAGCTCTCTCCTGGCGGTATTTGGGTATGAAGTGTCTGTGGCACAGGATCAGCTTTGCATATTTGT
ATCTTTTTTAGTGTAAGTTCCACATATGAGGAAGAGGGTGGCTTATCTCATGTAGCATGGCCTCCAGTGCTCCATT
TTCCTGTAGGTAATATCATTTTCATTTTCCATTATAGCTGAGTGAAGCTGCATTGTGCCAATGTAATGTTTCCTTA
TTTCTTCTGTGTCTCACAGAAGGTGACTTTTTGTTGCTTTTTCTAAGCAAATGTTTGTAACCTTAGTTCTAAGAGGAA
TTTAACTGCTCGGGATCATCATTTAGTGCTACTTTTTTCCATAGCCTATTTAAAAAGTATTATTTCTTATGCCTA
AAATGTATAACAATGGCAATATAATACAACATATTACTTGGTGTCTAACTTTTACATTTCTTAAATTAATAATA
GTTTGAAGTAGTTGGGGAATCTATTTTATTTTCATTTTCCCACCTTAAATTTTGGCTTTTAGTACCACACTTCAA
CTTTCAGAAGGGTTCATTCTTTAGAATGGGCTGGGGCAGTAAACCCAGTATTCAGGCTGGTC
```

7.4 Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<i>bacterial artificial chomosome</i> , künstliches bakterielles Chromosom
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
GTP	Guanosintriphosphat
hEST	<i>human expressed sequence tag</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktosid
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani-Medium
Mb	Megabasen
MIT	Massachusetts Institute for Technology
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n. d.	nicht definiert
o. g.	oben genannte(n)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease

RT	reverse Transkription
RZPD	Resourcenzentrum Primäre Datenbank
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
STS	<i>sequence tagged site</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Enzymeinheiten)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i> , nicht-translatierte Region
WR	<i>wobbler</i> Phänotyp
WT	Wildtyp Phänotyp
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktosid
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i> , künstliches Hefechromosom

7.5 Bezugsquellen für Chemikalien

- GIBCO BRL, Gaithersburg: Agarose Ultra Pure, Kanamycin, Sucrose
- JT BAKER, Holland: Ethanol, Salzsäure, Wasserstoffperoxid
- MERCK, Darmstadt: di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumacetat
- PHARMACIA; Freiburg: Sephadex G-50
- ROTH, Karlsruhe: Phenol, EDTA, NaCl
- SERVA; Heidelberg: Borsäure, Agar Agar, Lauroylsarcosine Na-Salt, Citrat, Pepton Yeast Extract
- SIGMA, Steinheim: D-Glucose, Isoamylalkohol, Glycerol, Isopropanol, Mineralöl, β -Mercaptoethanol, Tris, BSA, Ampicillin, DTE

7.6 Bezugsquellen für Materialien und Geräte

- ABIMED, Langenfeld: automatische Pipetten
- BIOMETRA: Trio-Thermoblock (Thermocycler), F10-VC (temperierbares Wasserbad), Fluo-Link (UV-Fixiergerät)
- EPPENDORF, Göttingen: Thermomixer 5436, Zentrifuge 5414, Photometer
- HERAEUS CHRIST, Osterode: Biofuge A
- HETTICH, Tuttlingen: Rotanta/S (Tischzentrifuge)
- JANKE & KUNKEL, Staufen i. Br.: Vibrofix (Vortex), Ikamag RET (Magnetrührer mit Heizplatte)
- MEMMERT: Inkubator GTR0214
- PALL Europe, Portsmouth, England : Nylonmembran Biotryne B
- SATRORIUS: 1403MP, universal (Feinwaagen)
- SAVANT INSTRUMENTS INC.: Speed Vac Concentrator
- TECHNE: Thermocycler Progene und Genius

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig und nur mit den hier aufgeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Bielefeld, 21.12.2001

Sonja Fuchs

Lebenlauf

Name: Sonja Fuchs
geb. am: 02.10.1973 in Oelde

Bildungsgang:

1984-1990	Städt. Realschule Oelde
1990-1993	Thomas-Morus Gymnasium in Oelde
1993-1999	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
1999-2001	Promotionsstudiengang an der Universität Bielefeld