

Aus der Abteilung Biochemie II
(Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. von Figura)
im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Erzeugung von Maus-knock-out-Modellen für die
Sulfatasen Sulf1, Sulf2 und Arylsulfatase G**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Michael Padva
aus
St. Petersburg/Rußland

Göttingen 2004

Dekan: Prof. Dr. med. M. Droese

I. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. T. Dierks

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Proteinfamilie der Sulfatasen	1
1.2	Sulfatasedefizienz-Syndrome	4
1.3	Funktion der Heparansulfat-Proteoglykane	5
1.4	Heparansulfat als Substrat der Sulfatasen	7
1.5	Zielsetzung	9
2.	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Geräte	10
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	11
2.1.3	Chemikalien	12
2.1.4	Enzyme, Standards	14
2.1.5	Kits	14
2.1.6	Vektoren	15
2.1.7	Bakterienstämme und Zelllinien	15
2.1.8	Puffer und Stammlösungen	15
2.1.9	Medien zur Anzucht von Bakterien	18
2.1.10	EDV	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Kultivierung von Bakterien	19
2.2.1.1	Agarplatten	19
2.2.1.2	Flüssigkulturen	19
2.2.1.3	Glycerinkulturen	20
2.2.2	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	20
2.2.2.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	20
2.2.2.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	21
2.2.2.3	Isolierung von RNA aus Fibroblasten	22
2.2.2.4	Präparation von genomischer DNA aus ES-Zellen	22
2.2.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.2.2.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Sephadex® G50	23
2.2.2.7	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	24

2.2.2.8	Präzipitation von DNA mit Ethanol	24
2.2.2.9	Agarosegel-Elektrophorese	24
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.2.3.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	25
2.2.3.2	Abschätzen der DNA-Konzentration in Agarosegelen	25
2.2.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	26
2.2.4.1	Restriktionsverdau	26
2.2.4.2	Glätten „klebriger Enden“	27
2.2.4.3	Dephosphorylierung von DNA	27
2.2.4.4	Ligation	28
2.2.4.5	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	28
2.2.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	29
2.2.5.1	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	29
2.2.5.2	Transformation	29
2.2.6	Hybridisierungstechniken	30
2.2.6.1	Transfer von DNA auf Hybond-N™-Membran	30
2.2.6.2	Transfer von RNA auf Hybond-N™-Membran.	30
2.2.6.3	Screening der Cosmid-Bibliothek	31
2.2.6.4	Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde	32
2.2.7	DNA-Amplifikation mittels PCR	32
2.2.7.1	Die Standard-PCR	33
2.2.7.2	Die Kolonie-PCR	34
2.2.7.3	PCR mit genomischer DNA	34
2.2.7.4	Gerichtete Mutagenese	34
2.2.8	Sequenzanalysen	35
2.2.9	Kultivierung von eukariotischen Zellen	36
2.2.9.1	Trypsinierung von Zellen	38
2.2.9.2	Einfrieren von ES-Zellen und Anlegen von „DNA-Platten“	38
2.2.9.3	Auftauen von Zellen	38
2.2.9.4	Elektroporation	39
2.2.9.5	Picken von ES-Zell-Klonen	39
2.2.9.6	Präparation von primären Fibroblasten	39
2.2.9.7	Herstellung der Feederplatten	40
2.2.10	Blastozysten-Mikroinjektion und Maushaltung	41

2.2.10.1 Maushaltung	41
2.2.10.2 Superovulation	41
2.2.10.3 Vaginalpfropfkontrolle	41
2.2.10.4 Blastozystengewinnung	41
2.2.10.5 Erzeugung pseudoträchtiger Weibchen	42
2.2.10.6 Blastozysten-Mikroinjektion	42
2.2.10.7 Embryo-Transfer in pseudoträchtige Mäuse	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Generierung von Sulf2-defizienten Mäusen	43
3.1.1 Ermittlung der murinen cDNA-Sequenz über EST-Klone	43
3.1.2 Identifizierung genomischer Cosmid-Klone	44
3.1.3 Konstruktion des gene-targeting-Vektors	47
3.1.4 Erweiterung des gene-targeting-Vektors auf der 5'-Seite	48
3.1.5 Herstellung der Sonden für die Genotypisierung	49
3.1.6 Transfektion und Screening der embryonalen Stammzellen	51
3.1.7 Erzeugung von Mäusen mit Keimbahnbeteiligung des mutierten <i>SULF2</i> -Allels	52
3.1.8 Phänotyp-Beschreibung Sulf2-defizienter Mäuse	52
3.2 Generierung von Sulf1-defizienten Mäusen	55
3.2.1 Die murine <i>SULF1</i> -cDNA	55
3.2.2 Identifizierung genomischer Cosmid-Klone	55
3.2.3 Konstruktion des Sulf1-gene-targeting-Vektors und Generierung externer Sonden	56
3.2.4 Gewinnung von ES-Zellen mit einem <i>SULF1</i> -Null-Allel und Generierung Sulf1-defizienter Mäuse	58
3.2.5 Phänotyp-Beschreibung der Sulf1-defizienten Mäuse	58
3.3 Generierung von Arylsulfatase-G-defizienten Mäusen	61
3.3.1 Die murine Arylsulfatase-G-cDNA	61
3.3.2 Screening der genomischen Cosmid-Bibliothek	61
3.3.3 Generierung des ASG gene-targeting-Konstruktes	62
3.3.4 Herstellung einer externen Sonde für die Genotypisierung	63
3.3.5 Gewinnung von ES-Zellen mit einem <i>ASG</i> -Null-Allel und Generierung ASG-defizienter Mäuse	63

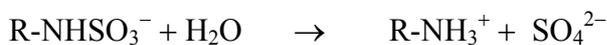
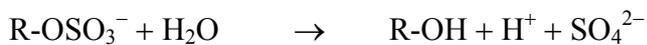
4.	Diskussion	65
4.1	Wahl und Durchführung der gene-targeting-Strategien	65
4.2	Modulierung Heparansulfat-abhängiger Signaltransduktionswege durch Sulf1 und/oder Sulf2 in Entwicklung und Homöostase	69
4.3	Phänotyp der Sulf1- bzw. Sulf2-knock-out-Mäuse	72
4.4	ASG knock-out	74
4.5	Ausblick	74
5.	Zusammenfassung	76
6.	Anhang	78
6.1	Nukleotidsequenz der murinen <i>SULF2</i> -cDNA (codierende Sequenz)	78
6.2	Nukleotidsequenz der murinen <i>SULF1</i> -cDNA (codierende Sequenz)	79
6.3	Nukleotidsequenz der murinen <i>ASG</i> -cDNA (codierende Sequenz)	80
6.4	Von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des Sulf2-Proteins	80
6.5	Von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des Sulf1-Proteins	81
6.6	Von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des ASG-Proteins	81
6.7	Sequenz des Klons 1247A42	81
6.8	Sequenz des Klons 1247A41	82
6.9	Sequenz des Klons 1247A4F	84
6.10	Sequenz des Klons 1077B41	84
6.11	Sequenz des Klons 1001C12	86
6.12	Sequenzen der verwendeten Primer	88
6.12.1	PCR- und Sequenzierprimer	88
6.12.2	Vektorprimer	90
6.12.3	Mutageneseprimer	90
7.	Literaturverzeichnis	91
8.	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	99
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	103

1. Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Sulfatasen

Sulfatester kommen in zahlreichen biologisch wichtigen Verbindungen vor. Sie werden in Glykosaminoglykanen (Dermatansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Heparansulfat), sulfatierten Glykolipiden (Cerebrosidsulfat), Tyrosinsulfat tragenden Proteinen und sulfatierten Hydroxysteroiden (Cholesterolsulfat, Dehydroepiandrosteronsulfat) gefunden.

Sulfatasen (Sulfatester-Sulfohydrolasen) sind Enzyme, die Sulfatester wie *O*- oder *N*-Sulfate hydrolysieren.



Die Sulfatasen gehören einer in der Evolution stark konservierten Proteinfamilie an und werden sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten gefunden. Ihre Ähnlichkeit auf der Proteinebene ist am stärksten im N-terminalen Drittel ausgeprägt (Franco *et al.* 1995; Parenti *et al.* 1997; Dierks *et al.* 1999). Ungeachtet dieser Ähnlichkeit zeigen die Sulfatasen eine hochgradige Spezifität bezüglich ihrer natürlichen Substrate. Eine weitere Gemeinsamkeit der Sulfatasen stellt eine neuartige posttranslationale Aminosäuremodifikation dar. Im katalytischen Zentrum der Enzyme wird die für die Funktion kritische Aminosäure C α -Formylglycin (FGly) gefunden (Schmidt *et al.* 1995). In dieser Position wird aufgrund der genomischen DNA-Sequenzen in Prokaryoten ein Cystein- oder Serinrest, in Eukaryoten immer ein Cysteinrest erwartet (Dierks *et al.* 1998). Die posttranslationale Umwandlung des Cysteinrests in das FGly findet bei Eukaryoten im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt (alle Sulfatasen besitzen ein Signalpeptid zur Einschleusung in das ER) und wird durch das vor kurzem identifizierte Formylglycin-generierende Enzym (FGE) katalysiert (Dierks *et al.* 2003; Cosma *et al.* 2003). Der zu modifizierende Cysteinrest findet sich in eukaryoten Sulfatasen in einem CxPSR-Motiv, das die posttranslationale Modifikation determiniert (Dierks *et al.* 1999).

Im humanen Genom wurden aufgrund der Sequenzhomologie und des Vorhandenseins des FGly-determinierenden Motivs 16 Sulfatasegene identifiziert und ihre Expression auf Protein- oder mRNA-Ebene nachgewiesen. 13 von diesen Sulfatasen (Abb. 1.1) wurden biochemisch und/oder molekularbiologisch charakterisiert. Dabei wurden ihre subzellulären Lokalisationen und in den meisten Fällen auch die natürlichen Substrate bestimmt (Tab.1.1).

Humane Sulfatasen	↓									Länge (AS)	Signal-peptid	FGly				
Arylsulfatase A	C	T	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	(Pos. 69-80)	507	+	+
Arylsulfatase B	C	T	P	S	R	S	Q	L	L	T	G	R	(Pos. 91-102)	533	+	+
Arylsulfatase C	C	T	P	S	R	A	A	F	M	T	G	R	(Pos. 83-94)	583	+	n.u.*
Arylsulfatase D	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	(Pos. 89-100)	593	+	n.u.
Arylsulfatase E	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	(Pos. 86-97)	589	+	n.u.
Arylsulfatase F	C	S	P	S	R	S	A	F	L	T	G	R	(Pos. 79-90)	591	+	n.u.
Arylsulfatase G (KIAA1001)	C	T	P	S	R	A	A	F	L	T	G	R	(Pos. 181-192)	688	+	n.u.
N-Acetylgalactosamin 6-Sulfatase	C	S	P	S	R	A	A	L	L	T	G	R	(Pos. 79-90)	522	+	n.u.
N-Acetylglucosamin 6-Sulfatase	C	C	P	S	R	A	S	I	L	T	G	K	(Pos. 91-102)	552	+	n.u.
Iduronatsulfatase	C	A	P	S	R	V	S	F	L	T	G	R	(Pos. 84-95)	550	+	n.u.
Sulfamidase	C	S	P	S	R	A	S	L	L	T	G	L	(Pos. 70-81)	502	+	n.u.
Sulf1 (KIAA 1077)	C	C	P	S	R	S	S	M	L	T	G	K	(Pos. 87-98)	871	+	n.u.
Sulf2 (KIAA 1247)	C	C	P	S	R	S	S	I	L	T	G	K	(Pos. 88-99)	870	+	n.u.
Sulfatasen anderer Eukaryoten:																
<i>Coturnix coturnix (QSulf1)</i>	C	C	P	S	R	S	S	M	L	T	G	K	(Pos. 87-98)	869	+	n.u.
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	C	T	P	S	R	S	A	I	M	T	G	R	(Pos. 100-111)	551	+	n.u.
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	C	T	P	S	R	S	A	I	V	T	G	R	(Pos. 115-126)	567	+	n.u.
<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	C	T	P	S	R	S	A	I	M	T	G	R	(Pos. 106-117)	559	+	n.u.
<i>Volvox carteri</i>	C	C	P	S	R	T	N	L	W	R	G	Q	(Pos. 72-86)	649	+	+
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	C	C	P	S	R	T	N	L	W	R	G	Q	(Pos. 73-84)	646	+	n.u.
<i>Neurospora crassa</i>	C	C	P	A	R	V	S	L	W	T	G	K	(Pos. 89-100)	639	+	n.u.

Abb. 1.1: Sequenzhomologien unter den Mitgliedern der Sulfatasefamilie. Dargestellt ist das FGly-determinierende Motiv. Hervorgehoben sind die Aminosäuren, die in mind. 9 der 13 humanen Sulfatasen konserviert sind. Das markierte Cystein (Pfeil) wird in Formylglycin umgewandelt.

*n.u. - nicht untersucht.

Sieben Sulfatasen bilden eine Untergruppe und werden als Arylsulfatasen bezeichnet. Die Arylsulfatasen A, B, C, E und F sind in der Lage, synthetische chromogene oder fluorogene Arylsulfate (p-Nitrocatecholsulfat, 4-Methylumbelliferylsulfat und Indoxylsulfat) zu spalten, die in Enzymassays und in der Histochemie Verwendung finden. Die Arylsulfatasen D und G hingegen besitzen keine Sulfataseaktivität gegenüber den o.g. Arylsulfaten, werden aber aufgrund ihrer starken Sequenz-Homologien zu den Arylsulfatasen A und C zur Gruppe der Arylsulfatasen gezählt. Die Arylsulfatase C (Steroidsulfatase) ist die einzige Sulfatase, deren natürliches Substrat ein Arylsulfat darstellt, nämlich Steroidsulfat.

Acht Sulfatasen sind lysosomale Enzyme mit einem pH-Optimum um 5 und sind an der Degradation von Glykosaminoglykanen und Sulfolipiden beteiligt (Tab. 1.1). Die Steroidsulfatase, ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran, katalysiert die Desulfatierung von sulfatierten Steroidhormonen und Cholesterolsulfat. Die Arylsulfatase E ist im Golgi-Apparat lokalisiert und spielt vermutlich eine Rolle im Vitamin-K-Metabolismus (Daniele *et al.* 1998).

Sulfatase	Subzelluläre Lokalisation	Natürliches Substrat	Erkrankung
Arylsulfatase A	Lysosomen	Cerebrosid 3-sulfate	Metachromatische Leukodystrophie
Arylsulfatase B	Lysosomen	Dermatansulfat, Chondroitin 4-sulfat	MPS ^b VI (Maroteaux-Lamy)
<i>N</i> -Acetylgalactosamin 6-Sulfatase (Galactose 6-Sulfatase)	Lysosomen	Keratansulfat, Chondroitin 6-sulfat	MPS ^b IV A (Morquio A)
<i>N</i> -Acetylglucosamin 6-sulfatase	Lysosomen	Heparansulfat, Keratansulfat	MPS ^b III D (Sanfilippo D)
Iduronatsulfatase	Lysosomen	Dermatansulfat, Heparansulfat	MPS ^b II (Hunter)
Sulfamidase (Heparan <i>N</i> -Sulfatase)	Lysosomen	Heparansulfat	MPS ^b III A (Sanfilippo A)
Glucuronat 2-Sulfatase ^a	Lysosomen	Heparansulfat	nicht bekannt
<i>N</i> -Acetylglucosamin 3-Sulfatase ^a	Lysosomen	Heparansulfat	nicht bekannt
Arylsulfatase C (Steroidsulfatase)	ER, Plasmamembran	3 β -Hydroxysteroid-sulfat	X-chromosomale Ichthyose
Arylsulfatase D	ER	nicht bekannt	nicht bekannt
Arylsulfatase E	Golgi-Apparat	nicht bekannt	Chondrodysplasia punctata
Arylsulfatase F	ER	nicht bekannt	nicht bekannt
Arylsulfatase G	ER	nicht bekannt	nicht bekannt
Sulf1 (KIAA 1077)	Zelloberfläche, ER	Heparansulfat	nicht bekannt ^c
Sulf2 (KIAA 1247)	Zelloberfläche, ER	Heparansulfat	nicht bekannt

Tab. 1.1: Humane Sulfatasen mit ihren subzellulären Lokalisationen, natürlichen Substraten sowie den durch ihre Defizienz hervorgerufenen Erkrankungen.

^aDie Glucuronat 2-Sulfatase und *N*-Acetylglucosamin 3-Sulfatase sind bisher lediglich biochemisch charakterisiert, aber nicht molekular identifiziert.

^bMPS = Mukopolysaccharidose

^cZum Zusammenhang von Sulf1 und Kanzerogenese s. 1.4

Die im Rahmen dieser Arbeit behandelte Arylsulfatase G wurde 2002 von Ferrante *et al.* in COS-7 Zellen exprimiert und teilweise charakterisiert. Trotz hoher Homologie zur Arylsulfatase A zeigte das rekombinante Enzym weder gegenüber p-Nitrocatecholsulfat noch gegenüber 4-Methylumbelliferylsulfat Sulfataseaktivität (Ferrante *et al.* 2002).

Zwei neue, kürzlich identifizierte Mitglieder der Sulfatasefamilie (Sulf1 und Sulf2), die auch im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden, nehmen eine gesonderte Stellung ein. Diese Enzyme bestehen aus 870 bzw. 871 Aminosäuren und sind damit um ca. 300 Aminosäuren länger als andere Sulfatasen. Die Längendifferenz kommt durch Insertion einer zusätzlichen hydrophilen Domäne im C-terminalen Drittel des Proteins zustande. Beide Sulfatasen sind auf der Zelloberfläche lokalisiert worden, zeigen eine Arylsulfatase-Aktivität mit einem pH-Optimum im neutralen Bereich und eine Endosulfatase-Aktivität gegenüber Heparansulfat und Heparin (Dhoot *et al.* 2001; Morimoto-Tomita *et al.* 2002). Es konnte indirekt gezeigt

werden, dass Sulf1 in die Wnt-abhängige Signalkaskade der Myogenese sowie in andere Signaltransduktionsprozesse während der Embryonalentwicklung involviert ist, indem sie den Sulfatierungsstatus der Heparansulfatproteoglykane auf der Zelloberfläche verändert (Dhoot *et al.* 2001; Ai *et al.* 2003; Wang S *et al.* 2004) (s. auch 1.4 und 4.2).

1.2 Sulfatasedefizienz-Syndrome

Die ausgeprägte Substratspezifität der Sulfatasen hat zur Folge, dass bei Funktionsausfall eines Enzyms das Substrat nicht abgebaut und vermehrt mit dem Urin ausgeschieden wird. Handelt es sich dabei um lysosomale Sulfatasen, führt die resultierende Substratakkumulation zu bestimmten Speicherkrankheiten (Tab. 1.1). Bis jetzt sind 6 Erkrankungen beschrieben worden, die durch den Ausfall einzelner lysosomaler Sulfatasen hervorgerufen werden.

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) wird durch die genetisch bedingte Defizienz der Arylsulfatase A verursacht. Diese Sulfatase spielt eine entscheidende Rolle beim Abbau von Cerebrosid 3-Sulfat, einem wichtigen Bestandteil der Myelin-Scheiden. Die Akkumulation dieses Glykolipids führt zu Demyelinisierung im zentralen und peripheren Nervensystem (von Figura *et al.* 2001). Die Erkrankung beginnt meist im frühen Kindesalter, obwohl auch adulte Formen beschrieben worden sind. Die zunehmende schwere neurologische Symptomatik (Ataxie, Dysarthrie, spastische Paresen, geistige Retardierung) kennzeichnet den Verlauf dieser Erkrankung, die in schweren Fällen innerhalb weniger Jahre zum Tod führt.

Die Erkrankungsgruppe der Mukopolysaccharidosen kennzeichnet eine lysosomale Speicherung der sauren Mukopolysaccharide (Glykosaminoglykane), deren enzymatischer Abbau gestört ist. Die Symptome reichen von relativ milden Haut- und Bindegewebsveränderungen bis zu schweren Skelettdeformitäten und geistigem Abbau. Durch Ausfall der Arylsulfatase B z.B. wird die Mukopolysaccharidose Typ VI (Maroteaux-Lamy) verursacht, bei der die Patienten durch Minderwuchs, Hüftdysplasie, Hornhauttrübungen und Herzbeteiligung auffallen (Neufeld und Muenzer, 2001). Im Harn erfolgt eine vermehrte Ausscheidung von Chondroitinsulfat B. Andere Varianten der Mukopolysaccharidosen werden durch Defizienzen weiterer lysosomaler Sulfatasen (Tab. 1.1) sowie einiger anderer an der Degradation der Glykosaminoglykane beteiligten Enzyme hervorgerufen.

Der Funktionsausfall der Steroidsulfatase resultiert in einer vergleichsweise milden Erkrankung, der X-chromosomalen Ichthyose, die mit fischartiger Schuppenbildung der Haut

einhergeht. Im Stratum corneum wird dabei vermehrt Cholesterolsulfat nachgewiesen (Ballabio und Shapiro, 2001).

Eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, ist die multiple Sulfatasedefizienz (MSD). Sie vereinigt Symptome der verschiedenen Sulfatasedefekte in einem klinischen Bild. Die Aktivität aller bekannten Sulfatasen ist bei erkrankten Kindern stark erniedrigt. Ursächlich konnte eine stark verminderte posttranslationale C α -Formylglycin-Bildung nachgewiesen werden. Kürzlich wurden bei MSD-Patienten mehrere Mutationen im FGE-codierenden *SUMF1*-Gen beschrieben, die zur deutlichen Aktivitätsminderung des FGE führen (Dierks *et al.* 2003; Cosma *et al.* 2003). Alle untersuchten MSD-Patienten zeigen eine schwache Restaktivität der Sulfatasen, was auf eine residuale Aktivität des FGE oder aber auf die Existenz eines zweiten FGly-generierenden Enzyms hindeutet. Es ist anzunehmen, dass ein kompletter Funktionsverlust der FGly-Bildung mit dem Leben nicht vereinbar ist. Dies ist ein Indiz für die Bedeutung der Sulfatasen insgesamt sowie von Sulf1 (und wahrscheinlich Sulf2) im Besonderen, da letztere eine Rolle in der Embryonalentwicklung spielen (s. 1.4).

1.3 Funktion der Heparansulfat-Proteoglykane

Heparansulfate (HS) gehören zusammen mit Chondroitin-, Keratan- und Dermatansulfaten der Familie der Glykosaminoglykane an. Diese linearen Polysaccharide, kovalent über Serinreste an ein Zellmembran-verankertes Core-Protein gebunden und so als Heparansulfatproteoglykan (HSPG) bezeichnet, bilden einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix eukaryotischer Zellen. Sie vermögen unterschiedliche Proteine zu binden, darunter diverse Strukturproteine wie Kollagen, Enzyme und Inhibitoren wie Lipoproteinlipase und Antithrombin III, aber auch eine Vielzahl an Wachstums- und Morphogenesefaktoren, Chemokinen und Zytokinen.

Das Grundgerüst der Heparansulfate besteht aus den alternierenden Monosacchariden *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und D-Glucuronsäure (GlcA). Ein charakteristisches Merkmal der Heparansulfate ist ihre weitreichende strukturelle Heterogenität. Diese wird durch partielle Epimerisierung der D-Glucuronsäure zu L-Iduronsäure (IdoA) und durch selektive Sulfatierung der Monosaccharide erreicht. Das den Heparansulfaten strukturell verwandte, aber weitaus homogenere Heparin unterscheidet sich von HS durch den Grad dieser Modifikationen. Während beim Heparin ca. 80% der Disaccharideinheiten modifiziert sind, sind es bei Heparansulfaten unter 10%, was die strukturelle Variabilität und die bemerkenswerte Bindungsspezifität gegenüber Ligandenproteinen von HS erklärt.

wurden Defekte in Hedgehog (Hh/Shh in Vertebraten), Wingless (Wg/Wnt), Decapentaplegic (Dpp/TGF- β) und FGF-Signalwegen untersucht. Die Orthologen der gefundenen defekten Gene in Vertebraten stellten sich als NDST, HS-Kopolymerase und UDP-Glukose-Dehydrogenase heraus, die in der Heparansulfatsynthese eine Schlüsselrolle spielen.

Mehrere Maus-knock-out-Modelle offenbarten die Bedeutung der HS-Modifikationen im Säugerorganismus. Das Fehlen der HS-2-O-Sulfotransferase bei der Maus führt zur perinatalen Letalität. Die Mäuse zeigen multiple Defekte, darunter eine komplette renale Agenesie sowie verschiedene Skelettanomalien (Bullock *et al.* 1998). C5-Epimerase-defiziente Mäuse zeigen ähnliche renale und skelettale Entwicklungsstörungen, hinzu kommen schwere Lungendefekte (Li *et al.* 2003). Das Fehlen der Isoform 1 der NDST resultiert bei der Maus ebenfalls in einer letalen pulmonalen Missbildung und Skelettanomalien, die Nierenentwicklung scheint bei diesen Tieren jedoch nicht betroffen zu sein (Ringvall *et al.* 2000). Diesen schweren Defekten steht eine vergleichsweise harmlose Mastzellstörung mit fehlender Heparinsynthese bei NDST-2-defizienten Mäusen gegenüber (Forsberg *et al.* 1999).

1.4 Heparansulfat als Substrat der Sulfatasen

An der Degradation der Heparansulfate in den Lysosomen sind verschiedene Enzyme wie Glykosidasen und lysosomale HS-Sulfatasen (*N*-Acetylglucosamin 6-Sulfatase, *N*-Acetylglucosamin 3-Sulfatase, Iduronatsulfatase, Sulfamidase, Glucuronat 2-Sulfatase) beteiligt (Tab. 1.1). Charakteristisch für diese Sulfatasen ist eine Exosulfatase-Aktivität, d.h. sie greifen ausschließlich am nicht-reduzierenden Ende der Polysaccharid-Kette an. Die *N*-Acetylglucosamin 3-Sulfatase sowie die Glucuronat 2-Sulfatase wurden lediglich biochemisch charakterisiert; ihre Gene sind noch unbekannt.

Mit der Entdeckung der Sulf1 und Sulf2 wurden zwei Sulfatasen mit einer 6-O-Endosulfatase-Aktivität gegenüber Heparansulfat bekannt, die dessen Sulfatierung innerhalb des intakten HS-Grundgerüsts modulieren können. Da Sulfatierungsgrad und -muster der HSPGs als molekulare Determinanten für die Proteinbindung bedeutsam sind, kann durch Verminderung der Sulfatierung auf der Zelloberfläche die Interaktion mit bestimmten Proteinen beeinflusst werden.

Dhoot *et al.* haben 2001 die Rolle der QSulf1 (Wachtel-Ortholog der Sulf1) im Wnt-Signaltransduktionsweg in Wachtel-Embryonen beschrieben. In antisense-Experimenten haben sie gezeigt, dass QSulf1 für die Wnt1-abhängige MyoD-Aktivierung benötigt wird.

Dabei scheint die Wirkung der Sulfatase in der Freisetzung der Wnt1-Moleküle aus ihrer Assoziation mit HSPGs zu liegen.

Kürzlich wurde die hemmende Wirkung der QSulf1 auf FGF2- und FGF4-induzierte Vorgänge der mesodermalen Differenzierung in *Xenopus-laevis*-Embryonen sowie auf FGF-abhängige Angiogenese beim Hühnerembryo demonstriert (Wang S *et al.* 2004).

Der Sulfatierungsgrad der HSPGs scheint auch eine Rolle bei durch Wachstumsfaktoren vermittelten Proliferationsprozessen der Kanzerogenese zu spielen. Lai *et al.* (2003, 2004a, 2004b) beobachteten eine fehlende bzw. verminderte Expression von Sulf1 in 5 von 7 Ovarialkarzinomzelllinien sowie in einer Reihe anderer Tumorzelllinien. Eine Re-Expression von Sulf1 in solchen Karzinomzellen führte zu einer verminderten Sulfatierung der HSPGs, einer reduzierten Proliferationstendenz nach Behandlung mit FGF-2 sowie zu einer erhöhten Apoptosebereitschaft nach Behandlung mit Cisplatin (Lai *et al.* 2003, 2004a, 2004b). *SULF1* kann somit auch eine Rolle als Tumor-Suppressor-Gen zugeschrieben werden.

1.5 Zielsetzung

Aus den kürzlich publizierten *in-vitro*-Studien zu Sulf1 und Sulf2 wurde ihre besondere Rolle innerhalb der Sulfatasefamilie evident. *In-vitro*-Untersuchungen können jedoch die Aufgaben der Proteine im Gesamtorganismus nicht hinreichend beschreiben. Die Herstellung von knock-out-Mausmodellen ist eine etablierte Methode, um die Funktion der Gene im Zusammenhang des Gesamtorganismus zu untersuchen.

Defizienzen anderer Sulfatasen sind als Ursache einer Reihe von überwiegend schwerwiegenden bis letalen Erkrankungen beschrieben und z.T. ebenfalls anhand von knock-out-Mausmodellen untersucht worden (Hess *et al.* 1996; Evers *et al.* 1996).

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Erzeugung von knock-out-Mauslinien für die Sulfatasen Sulf1, Sulf2 und ASG unter Verwendung der gene-targeting-Methode. Im Einzelnen sind dazu folgende Schritte notwendig:

- Isolierung und Charakterisierung der jeweiligen murinen Gene aus einer genomischen Bibliothek
- Herstellung der spezifischen gene-targeting-Konstrukte
- Einbringen der Konstrukte in murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen)
- Identifizierung der ES-Zelllinien mit erfolgter homologer Rekombination
- Injektion der ES-Zellen in Blastozysten und Transfer der Blastozysten in den Uterus pseudoträchtiger Mäuse
- Verpaarung von Chimären mit dem Ziel, das Null-Allel in den Nachkommen heterozygot (+/-) und homozygot (-/-) vorliegen zu haben.

Die Verfügbarkeit dieser Mausmodelle sollte eine ganze Reihe weiterer Studien ermöglichen. Die Charakterisierung ihres Phänotyps soll Hinweise auf die Rolle der jeweiligen Sulfatasen für prä- und postnatale Entwicklungsprozesse und ihre natürlichen Substrate liefern. Für die Sulf1- und Sulf2-knock-out-Mäuse sind Veränderungen des HS-Sulfatierungsmusters und demzufolge Störungen in mehreren Signaltransduktionswegen (Entwicklung, Differenzierung, Homöostase) zu erwarten. Eine mögliche Funktion von *SULF1* und/oder *SULF2* als Tumor-Suppressor-Gen(e) macht die knock-out-Mäuse für die Onkologie interessant. Sollten ein oder mehrere knock-outs deletäre Effekte haben und in prä- oder perinataler Letalität der Mäuse resultieren, so könnten Untersuchungen an Embryonen bzw. in daraus abgeleiteten Zelllinien wichtige Erkenntnisse liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaagen, Typ 1265 MP, CP3202P und M5P	Sartorius, Göttingen
Autoklav, Typ Tuttnauer 3870 EL	Systec, Wetzlar
Brutschrank	Heraeus Sepatech, Osterode
CO ₂ -Brutschrank	Forma Scientific, Marietta, USA
DNA-Sequenzer, Typ 310	ABI, PE Biosystems
Drehrad (Eigenbau)	Werkstatt des Instituts
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammern (Eigenbau)	Werkstatt des Instituts
Elektroporator Stratagene® 1000	Stratagene, La Jolla, USA
Filmentwicklungsmaschine, Typ Curix 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Filmkassetten	Kodak, Stuttgart
Flüssigstickstofftank	Messer Griesheim, Frankfurt/M.
Flüssigszintillationszähler, Typ LS 6500	Beckmann, München
Freezer –80 °C, Typ Hera freeze	Heraeus Sepatech, Osterode
Gene Pulser™ und Capacitance extender (125-960 µF)	BioRad, München
Handmonitor, Typ LB122	Berthold, Bad Wildbad
Hybridisierungsofen, Typ memmert	Schütt, Göttingen
Kühl- und Gefrierschränke (+4 und –20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer, Typ IKAMAG® REO	IKA, Staufen i. Breisgau
Mikroskop, Typ ID 03	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellenherd	Siemens, München
Peristaltische Pumpe , Typ P1	Pharmacia, Uppsala, Sweden
pH-Meter	Beckmann, München
Phosphoimager, Typ Fujix BAS 1000	Fuji, Tokio, Japan
Pipettierhilfe, Typ Pipetus® akku	Hirschmann, Eberstadt
Pipetten, Typ Pipetman 10, 20, 200, 1000 µl	Gilson, Villers le bel, France
Pinzetten	Aesculap, Tuttlingen
Power Supply, Typ EC250-90	Thermo EC, Holbrook, USA

Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Schüttelinkubator, Typ G25	New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, USA
Schüttelwasserbad	Köttermann, Hönigsen
Speedvac-Konzentrator, Typ 100H	Bachhofer, Reutlingen
Sterile Werkbank, Typ A/B3 und SG 400	Baker Co. Inc., Stanford, USA
Spektralphotometer, Typ Uvikon 932	Kontron Instruments, Eching
Thermocycler, Typ Gene Amp 9600 und 2400	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Thermoprinter, Typ P91E	Mitsubishi, Tokio, Japan
Thermostat, Typ 5320	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator, Modell IL-400-M	Bachofer, Reutlingen
UV-Handlampe (254/365 nm), Typ VL-4.LC	Vilbert Lourmat, Frankreich
Video-Copy-Prozessor	Mitsubishi, Tokio, Japan
Vortex-Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad, Typ Julabo VC	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wipptisch, Typ Rocky®	Fröbel Labortechnik, Lindau
Zentrifugen und Zubehör:	
Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Osterode
Kühlzentrifuge, Typ J-21C und J2-MC	Beckmann, München
Laborzentrifuge	Heraeus Sepatech, Osterode
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode
Tischzentrifugen, Typ 5415C, 5402 und 5417R	Eppendorf, Hamburg
Rotor JA-10, bis 17680×g	Beckmann, München
Rotor JA-20, bis 48300×g	Beckmann, München

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten	Invitrogen, Leek, Niederlande
Gene Pulser™ Küvetten, 0.4 cm	BioRad, München
Gewebekulturplatten 6-, 24-, 96-Loch	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen 35, 60, 100 und 150 mm	Greiner, Nürtingen

Hybond-N™-Filter	Amersham, Braunschweig
Kanülen, steril	Braun, Melsungen
Parafilm®	American National Can™, Neeah, USA
Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen 10, 20, 200, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen, 10, 15 und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße:	
0.2 ml	Perkin-Elmer, Norwalk, USA
0.5 ml	Sarstedt, Braunschweig
1.5 ml und 2 ml	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Sterilfilter Minisart NML, 0.45 µm und 0.2 µm	Sartorius, Göttingen
Whatmann GB002-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatmann GB003-Papier, extra dick	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturpipetten, 2, 5, 10 und 25 ml	Greiner, Nürtingen
Zellschaber	Sarstedt, Braunschweig
Zentrifugenbecher, JA 10 und JA 20	Nalgene, München

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „p.a.“ und wurden von folgenden Firmen bezogen: Baker (Deventer, Holland), Boehringer (Mannheim), Difco (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), ICN Biomedicals (Eschwege), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München).

α -[³² P]-dCTP, Redivue	Amersham
Agarose	Roth
Agarose (ultrapure, für RNA)	Life Technologies, USA
Agar	Sigma
Ampicillin	Sigma
Ammoniumacetat	Merck

β-Mercaptoethanol	Sigma
Chloroform	Merck
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma
DMF (Dimethylformamid)	Merck
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz)	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ficoll	Pharmacia
Formaldehyd	Merck
Gelatine	Serva
Geneticin G418	Gibco BRL
Glycerol	Merck
HEPES (<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure)	Serva
Kanamycin	Sigma
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Serva
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Phenol	Merck
Rapid-hyb™ - Hybridisierungsmix	Amersham
Salzsäure 37%	Merck
Sephadex® G50	Amersham
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	ICN Biomedicals
Tryptone	Difco
Wasser, HPLC analyzed	Baker, Deventer, Holland
XC (Xylencyanol)	Sigma
Yeast Extract	Difco

2.1.4 Enzyme, Standards

λ / <i>Hind</i> III-Standard	Gibco BRL
Alkalische Phosphatase	Boehringer
β -Aktin cDNA-Sonde	BD Biosciences, Heidelberg
BSA	New England Biolabs
DNA-Ladder	Gibco BRL
Klenow DNA-Polymerase	New England Biolabs
Oligonukleotide	IBA-NAPS, Göttingen
	MWG Biotech, München
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Pharmacia
<i>Pfu</i> Reaktionspuffer	Pharmacia
Proteinase K	Boehringer
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs
RNA-Auftragspuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Pharmacia
<i>Taq</i> Reaktionspuffer	Pharmacia
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia

2.1.5 Kits

ABI PRISM Dye Terminator	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Cycle Sequencing Ready Reaction	
QIAprep Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed™ Plasmid Midiprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction und PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Rediprime™II DNA labeling Kit	Amersham
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden

2.1.6 Vektoren

pBluescript II SK+

Stratagene, La Jolla, USA

2.1.7 Bakterienstämme und Zelllinien

Dieser Stamm wurde routinemäßig für die Transformation von Plasmid- und Cosmid-DNA eingesetzt:

E. coli DH5- α (Genotyp: F⁻ deoR recAI endAI hsdR1(r_k⁻m_k⁺) supE44 1-thi gyrA96 relAI

MPI-2 murine ES-Zellen (Subklone der ES-Zelllinie „D3“, Mausstamm 129/Ola) wurden uns freundlicherweise von der AG Peter Gruss, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen, zur Verfügung gestellt

MEFs (murine embryonale Fibroblasten) stammen aus Eigenproduktion.

2.1.8 Puffer und Stammlösungen

Als Lösungsmittel wurde, soweit nicht anders angegeben, bidestilliertes Wasser verwendet.

Ampicillin, 25 mg/ml	2.5	g	Ampicillin in 80 ml H ₂ O lösen, mit NaOH auf pH 8.0 einstellen, auf 100 ml auffüllen, sterilfiltrieren, in 2-ml-Aliquots bei -20 °C lagern.
----------------------	-----	---	---

CI			Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis von 24:1 zusammen- gemischt.
----	--	--	---

Denaturierungslösung	0.5	M	NaOH
	1.5	M	NaCl

DEPC behandeltes H ₂ O	0.1	%	DEPC (w/v) in H ₂ O lösen, bei 37 °C ü.N. inkubieren, anschließend autoklavieren.
Ficoll-Lösung, 15%	15	%	Ficoll in H ₂ O
	0.05	%	XC
Kanamycin, 50 mg/ml	2.5	g	Kanamycin in 50 ml H ₂ O lösen, sterilfiltrieren, in 2-ml-Aliquots bei -20 °C lagern
10×MOPS	200	mM	MOPS
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA in DEPC- H ₂ O aufnehmen, pH 7.0 mit NaOH einstellen.
3 M Natriumacetat-Lösung	3	M	Natriumacetat mit Essigsäure auf pH 5.2 einstellen.
NET-Puffer	100	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl pH 8.0
	25	mM	EDTA
Neutralisierungslösung	0.5	M	Tris-HCl
	1.5	M	NaCl mit 37% Salzsäure auf pH 7.2 einstellen.
PCI			Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis von 25:24:1 zusammengemischt.

Proteinase K-Lösung	2	mg/ml	Proteinase K in NET-Puffer lösen in 2-ml-Aliquots bei -20 °C lagern nur unmittelbar vor Gebrauch auf Eis auftauen!
Sephadex® G50	5	g	Sephadex® G50 in 50 ml TE-Puffer aufschwemmen, autoklavieren, bei 4 °C lagern, vor Gebrauch schütteln.
10% SDS	5	g	SDS in 50 ml H ₂ O auflösen.
20×SSC	175.3	g/l	NaCl
	88.2	g/l	Na-Citrat pH 7.0
50×TAE-Puffer	2	M	Tris-HCl
	0.1	M	EDTA mit Essigsäure auf pH 8.0 einstellen.
TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl
	1	mM	EDTA pH 8.0
Waschlösung 1	2	×	SSC
	0.1	%	SDS
Waschlösung 2	0.2	×	SSC
	0.1	%	SDS

2.1.9 Medien zur Anzucht von Bakterien

Luria-Bertani (LB) Medium	10	g/l	Trypton
	5	g/l	Yeast Extract
	5	g/l	NaCl
			mit NaOH auf pH 7.5 einstellen
			autoklavieren, bei RT aufbewahren
LB-Agarplatten (LB-Amp/LB-Kan)	15	g/l	Agar
			in LB-Medium lösen, autoklavieren,
			nach dem Abkühlen auf 60 °C Ampicillin
			oder Kanamycin zusetzen (100 mg/l),
			bei 4 °C aufbewahren

2.1.10 EDV

Adobe Acrobat	Adobe Systems
Adobe Photoshop	Adobe Systems
Apple Power PC 7600/132	Apple Macintosh
Excel 2002	Microsoft
Freehand MX	Macromedia
GCG Wisconsin Package	Genetics Computer Group
HP LaserJet 4050N	Hewlett Packard
HP ScanJet 4c/T	Hewlett Packard
IBM-kompatibler PC	div. Hersteller
Image Gauge	Fuji
Image Reader	Fuji
Windows NT	Microsoft
Windows XP	Microsoft
Word 2002	Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

2.2.1.1 Agarplatten

Die Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten ermöglicht, im Gegensatz zur Flüssigkultur, das Picken von Einzelklonen. Die Voraussetzung ist die richtige Beimpftechnik, wie z.B. die 3-Ösen-Methode.

Beim Ausplattieren von Transformationsansätzen wurde die Bakteriensuspension mit einer über Gasflamme zurechtgebogenen Pasteurpipette gleichmäßig über die gesamte Plattenoberfläche verteilt.

Es wurden je nach Resistenz LB-Amp- oder LB-Kan-Platten benutzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Zum Picken von Klonen wurden sterile Zahnstocher benutzt. Dabei wurde zuerst ein Klon vorsichtig angepickt. Als nächstes wurde mit dem Zahnstocher ein Strich auf einer „Masterplatte“ gemacht und schließlich eine 5-ml-Flüssigkultur angeimpft. Die Masterplatte, die mehrere Kolonien enthalten konnte, diente der mittelfristigen Sicherung von Klonen und war nach der Inkubation einige Wochen bei 4 °C haltbar.

2.2.1.2 Flüssigkulturen

Die Kultivierung von *E.coli* im LB-Flüssigmedium diente vor allem der Vermehrung von benötigten Plasmiden für nachfolgende DNA-Präparation. Je nach Aufgabe wurden 5-ml- bzw. 200-ml-Kulturen angesetzt.

Das Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) wurde dem Medium in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugesetzt. Das Animpfen erfolgte mit einer ausgeglühten Platinöse aus Glycerinkultur oder von einer Masterplatte. Die Inkubation erfolgte über Nacht, maximal jedoch 16-18 h bei 37 °C in einem Schwenkinkubator bei ca. 240 rpm.

2.2.1.3 Glycerinkulturen

Zur langfristigen Aufbewahrung von *E. coli*-Klonen wurden Glycerinkulturen angelegt.

Es wurden 0.75 ml einer ü.N. gewachsenen Flüssigkultur steril entnommen und mit 0.25 ml autoklaviertem 80% Glycerin in einem 1.5-ml-Reaktionsgefäß vermischt. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Kulturen bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Das QIAprep® Miniprep Kit von Qiagen erlaubt es, kleinere Mengen von Plasmid- oder Cosmid-DNA (bis zu 20 µg) aus einer Flüssigkultur zu gewinnen. Für die Präparation wurden 2-4 ml einer ü.N. gewachsenen 5-ml-*E. coli*-Kultur eingesetzt. Das nachfolgende Protokoll richtet sich nach dem Handbuch des Herstellers.

2 ml Bakterienkultur wurden in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Erschien das Zellpellet sehr klein, wurden noch einmal 2 ml Kultur dazugegeben und erneut zentrifugiert. Die Reste von LB-Medium wurden durch vorsichtiges Abklopfen auf dem Filterpapier entfernt.

Das Sediment wurde nun in 250 µl kaltem RNaseA-haltigen Puffer P1 durch Hoch- und Runterpipettieren resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer P2 wurde mehrmals vorsichtig invertiert und max. 5 min lang bei RT inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 350 µl Neutralisierungspuffer N3 gestoppt, und nach mehrmaligem, vorsichtigem Invertieren wurde erneut 5 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden danach 10 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert, der klare Überstand wurde auf Minisäule überführt und nach der Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) war die DNA auf der Säule gebunden. Die Säule wurde nun mit 750 µl ethanolhaltigem Puffer PE gewaschen (1 min bei 14000 rpm). Um die Reste von Ethanol vollständig zu entfernen, wurde die Säule danach noch einmal ohne Pufferzugabe 1 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert. Die gebundene DNA wurde dann mit 100 µl HPLC-H₂O durch Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) eluiert.

Die Konzentration der so erhaltenen DNA-Lösung wurde im Rahmen der Agarosegelelektrophorese abgeschätzt. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Um größere Mengen von Plasmid- oder Cosmid-DNA zu erhalten, wurde das HiSpeed™ Plasmid Midi Kit von Qiagen benutzt. Damit war es möglich, bis 250 µg Plasmid-DNA aus 100-150 µl Flüssigkultur zu gewinnen. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Zuerst wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert (JA-10 Rotor, 6000×g, 15 min bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 6 ml RNaseA-haltigem Puffer P1 aufgenommen und resuspendiert. Nach Zugabe von 6 ml Lysepuffer P2 wurde 4-6 Mal vorsichtig invertiert und max. 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde Neutralisierungspuffer P3 (6 ml) zugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz in das QIAfilter überführt, wo er 10 min lang bei RT inkubiert und schließlich auf die zuvor mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Midi-Säule gegeben wurde. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml QC-Puffer gewaschen, und die DNA mit 5 ml QF Puffer in ein 10-ml-Plastikröhrchen eluiert. Durch das Zugeben von 3.5 ml (0.7 Vol.) Isopropanol und fünfminütige Inkubation bei RT wurde die DNA präzipitiert. Danach wurde die Lösung mit Hilfe einer 20-ml-Spritze durch den QIAprecipitator gefiltert, und der QIAprecipitator anschließend durch mehrmaliges Luftdurchpressen getrocknet. Die DNA wurde dann mit 1 ml ddH₂O mittels einer 5-ml-Spritze eluiert, wobei das Eluat zwecks Ausbeutesteigerung noch einmal durch den QIAprecipitator durchgepresst wurde.

Die Konzentration der so gewonnenen DNA-Lösung war für viele Zwecke zu niedrig. Deswegen wurde die DNA anschließend mit Ethanol gefällt und in einem kleineren Volumen aufgenommen.

Die Präzipitation erfolgte nach Zugabe von 2 Vol. 100% Ethanol und 0.1 Vol. 3 M Natriumacetat 1 h bei -80 °C. Danach wurde die DNA 20 min bei 14000 rpm und 4 °C pelettiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und in 100 µl HPLC-H₂O aufgelöst. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt, und die Lösung ggf. mit HPLC-H₂O verdünnt, um eine Konzentration von 1 µg/µl einzustellen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.3 Isolierung von RNA aus Fibroblasten

Zur Präparation der Gesamt-RNA aus murinen Fibroblasten wurde das RNeasy-Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die RNA wurde anschließend in 50 µl DEPC-behandeltem (RNase-freiem) H₂O aufgenommen und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.2.2.4 Präparation von genomischer DNA aus ES-Zellen

Die ES-Zellen für die DNA-Präparation wurden in 6-Loch-Gewebescheiden in Kultur gehalten. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und 5 ml PBS wurden zugegeben. Danach wurde der Zellrasen mit einem sterilen Zellschaber mobilisiert und das Gemisch in ein 15-ml-Plastikröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm, RT, 5 min lang sedimentiert. PBS wurde abgesaugt, und es wurden erneut 5 ml PBS zugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert, erneut bei gleichen Bedingungen sedimentiert, und das Pellet wurde bei –20 °C bis zur DNA-Präparation aufbewahrt.

Die eigentliche Präparation begann mit dem Aufnehmen von eingefrorenen Pellets in 700 µl NET-Puffer. Dann wurden 70 µl Proteinase K-Lösung zugesetzt und gevortext. Schließlich wurden 70 µl 10% SDS zugesetzt, gevortext und 3-4 h bei 56 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden erneut 70 µl Proteinase K-Lösung zugegeben, und es folgte eine weitere Inkubation ü.N. bei 56 °C. Die DNA wurde anschließend mit PCI und CI extrahiert und mit 2.5 Vol. 100% Ethanol präzipitiert. Mit einer über Gasflamme zugeschweißten Pasteurpipette wurde die DNA entnommen, in 70% Ethanol gewaschen und an der Spitze der Pasteurpipette ca. 15 min luftgetrocknet. Danach wurde die DNA durch wiederholtes Eintauchen der Spitze in 100 µl HPLC-H₂O aufgenommen und 2 h lang bei 37 °C aufgelöst. Die Konzentrationbestimmung erfolgte photometrisch, die Lösung wurde bei 4 °C gelagert. Für die Southernblot-Analyse wurden ca. 15 µg DNA eingesetzt.

Die Präparation der Mausschwanz-DNA für die Genotyp-Bestimmung der Mäuse erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

2.2.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Sollten bestimmte DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau oder PCR-Produkte aufgereinigt werden, wurde folgende Methode eingesetzt. Zwar bietet Qiagen auch eine direkte Möglichkeit der Aufreinigung von PCR-Produkten, doch wurde der Gelaufreinigung der Vorzug gegeben, um nur das jeweilige spezifische Produkt zu isolieren.

Das benötigte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein 1.5-ml-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Sollten mehrere Fragmente ausgeschnitten werden, wurde das Skalpell nach jedem Fragment in 1 M NaOH gewaschen und abgetrocknet, um eine Verschleppung von DNA zu vermeiden. Danach wurden 3 Vol. QG-Puffer zugegeben, und der Ansatz wurde bis zur vollständigen Auflösung bei 50 °C inkubiert. Um den Vorgang zu beschleunigen, wurde zwischendurch gevortext. Danach wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben und gevortext. Der Ansatz wurde dann auf eine Minisäule gegeben und 1 min lang bei 14000 rpm, RT zentrifugiert. Die Säule wurde dann mit 750 µl PE-Puffer gewaschen (1 min, 14000 rpm, RT), durch erneutes Zentrifugieren wurden Ethanolreste entfernt, und die DNA wurde mit 50 µl HPLC-H₂O eluiert.

2.2.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Sephadex® G50

Diese Methode wurde zur Entfernung von ungebundenen Nukleotiden und Salzen bei radioaktiver Markierung von DNA-Sonden angewendet.

Eine blaue Pipettenspitze wurde mit wenig silanisierter Glaswolle gestopft und in ein Zentrifugenröhrchen gestellt. Danach wurde die Spitze mit Sephadex® G50 gefüllt (das Abschneiden der Spitze erleichtert das Pipetieren). Nach 3 min Zentrifugation bei 3000 rpm war die Säule fertig. Der Durchfluss wurde zum Abstoppen der Markierungsreaktion benutzt (s. 2.2.4.5).

Der radioaktive Ansatz wurde auf die Säule gegeben und 6 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die Radioaktivität der Sonde mit einem Handmonitor abgeschätzt.

2.2.2.7 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Diese Methode ermöglicht eine Entfernung von Proteinen aus einer DNA-haltigen Lösung. Dabei finden sich anschließend die ausgefallenen Proteine in der phenolischen, die DNA in der wässrigen Phase.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit einem Vol. PCI durch Schütteln vermischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (5 min, 1400 rpm, RT) erreicht. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu vollständiger Entfernung möglicher Phenolreste wurde 1 Vol. CI zugegeben und zentrifugiert. Die DNA-haltige Phase wurde abgenommen und weiter verarbeitet.

2.2.2.8 Präzipitation von DNA mit Ethanol

Diese Methode diente der Konzentrierung und Reinigung von DNA. Dazu wurde die DNA-haltige Lösung mit 2-3 Vol. eiskaltem 100% Ethanol vermischt. Nach Zugabe von 0.1 Vol. 3 M NaAc wurde 1 h lang bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde 20 min lang bei 14000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sedimentiert, das Pellet anschließend mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und nach erneuten Zentrifugation luftgetrocknet.

Auf diese Weise wurde die Plasmid-DNA gefällt. Der Zusatz von Salz, die Inkubation bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Zentrifugation erübrigten sich bei der Präzipitation der chromosomalen DNA. Dort wurde die DNA direkt nach Zugabe von 2 Vol. 100% Ethanol mit einer Pasteurpipette entnommen, mit 70% Ethanol gewaschen und an der Pasteurpipettenspitze luftgetrocknet.

2.2.2.9 Agarosegel-Elektrophorese

Diese Methode wurde zur Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe eingesetzt. Dabei fanden horizontale Gele Verwendung. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente:

Agarosekonzentration (%(w/v))	Fragmentgrößen (kb)
0.6	20-1
1	7-0.5
2	3-0.1

Die Agarose wurde in 300 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt und durch Schwenken aufgelöst. Nach Abkühlung auf 60 °C wurde Ethidiumbromid zugesetzt (EK 0.5 µg/ml). Die Lösung wurde in einen Gelträger mit benötigten Gelkämmen gegossen. Nach Erstarren wurden die Gele bei 4 °C aufbewahrt.

Die Elektrophorese erfolgte in mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern bei 4 bis 5 V/cm. Die Proben wurden mit 0.2 Vol. Ficoll-Lösung versetzt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. In der ersten Tasche wurde die DNA-Ladder aufgetragen. Das Fortschreiten der Auftrennung wurde mit einer UV-Handlampe bei 254 nm kontrolliert (bei präparativen Gelen bei 365 nm). Das fertige Gel wurde schließlich auf dem UV-Transilluminator mit Hilfe eines Videosystems fotografiert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Nach Midi-Präparation und nach Präparation von genomischer DNA wurde die Konzentration der Nukleinsäure in einem Spektralphotometer bestimmt.

Es wurden Extinktionen bei 260, 280 und 320 nm gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml Doppelstrang-DNA bzw. 40 µg/ml Einzelstrang-DNA oder RNA. Bei 320 nm absorbieren Nukleinsäuren nicht. Die Konzentration von DNA wurde somit als $K [\mu\text{g/ml}] = (OD_{260} - OD_{320}) \times 50$ errechnet. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} spiegelt die Verunreinigung durch Proteine, Phenole und andere organischen Verbindungen wieder und sollte über 2.0 für DNA liegen.

2.2.3.2 Abschätzen der DNA-Konzentration in Agarosegelen

Bei der Agarosegelelektrophorese wurde immer ein DNA-Größenstandard, die DNA-Ladder, auf das Gel aufgetragen. Sollte auch die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt werden, wurde zusätzlich $\lambda/HindIII$ -Standard benutzt. Durch Vergleich der Bandenintensität unter UV-Licht mit der der Standardlösungen konnte die Konzentration abgeschätzt werden.

2.2.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen spezifische palindrome Sequenzen doppelsträngiger DNA und spalten diese innerhalb oder neben der Erkennungsstelle.

Dabei entstehen entweder glatte (Hydrolyse von direkt gegenüberliegenden Phosphodiesterbindungen) oder klebrige (Spaltung ist um ein oder mehrere Nukleotide versetzt) Enden.

Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen wird in Units [U] angegeben, wobei 1 U eines Enzyms definitionsgemäß 1 µg der λ-Phagen-DNA in einer Stunde vollständig spalten kann. Die Restriktionsenzyme besitzen individuelle Temperaturoptima (meist jedoch 37 °C) und werden vom Hersteller New England Biolabs mit dazugehörigem 10×Puffer (Universalpuffer NEB 1-4 oder enzyspezifischer Puffer) geliefert. Einige Enzyme erfordern die Zugabe von BSA zum Reaktionsansatz.

Bei Analytischen Verdaus wurde meist folgender Reaktionsansatz verwendet:

DNA	0.5 µg
Enzym	2 U
Puffer 10×	2 µl
BSA 10×(optional)	2 µl
HPLC-H ₂ O	ad 20 µl
=> 1 h bei 37 °C	

Bei präparativen Ansätzen wurde die DNA- und die Enzymmenge erhöht, das Reaktionsvolumen auf 50 µl vergrößert und es wurde meist ü.N. inkubiert.

Die Konzentration des Enzyms darf max. 1/10 Vol. betragen. Sollte die DNA mit 2 Enzymen gespalten werden, wurden nach Möglichkeit simultane Verdaus durchgeführt. Dabei wurde ein Reaktionspuffer gewählt, in dem beide Enzyme genügend Aktivität entwickeln. War dies nicht möglich, mussten die Reaktionen sukzessiv, mit zwischenzeitlicher Aufreinigung der DNA im Agarosegel durchgeführt werden.

Für die Spaltung der genomischen DNA für die Southernblot-Analyse wurde folgender Ansatz verwendet:

DNA	15 µg
Enzym	5 µl
Puffer 10×	5 µl
BSA 10×(optional)	5 µl
HPLC-H ₂ O	ad 50 µl
=> ü.N. bei 37 °C	

Es wurde in diesem Fall mit einem Überschuss an Enzym gearbeitet (maximal mögliche Konzentration von 1/10 Vol.), um einen quantitativen Verdau zu gewährleisten.

2.2.4.2 Glätten „klebriger Enden“

Wurden keine kompatiblen Restriktionsstellen in Vektor und Insert gefunden, die eine unmittelbare Ligation ermöglicht hätten, wurden die klebrigen Enden aufgefüllt und anschließend eine blunt-end-Ligation durchgeführt.

Nach erfolgter Restriktionsreaktion wurden dem Ansatz 1 U Klenow DNA-Polymerase pro 1 µg DNA, die notwendige Menge 10×*Eco*Pol-Reaktionspuffer sowie dNTPs in einer Endkonzentration von je 33 µM hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 15 min lang bei 25 °C.

2.2.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Wurde für die Ligation ein mit nur einer Restriktionsendonuklease linearisierter Vektor verwendet, oder im Falle von blunt-end-Ligation, setzte man alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) ein, um die endständigen 5'-Phosphatgruppen abzuspalten. Dies senkte die Wahrscheinlichkeit einer intramolekularen Religation der Vektor-DNA (Ullrich *et al.* 1977).

Bei Vektoren, die mit 2 Restriktionsenzymen gespalten wurden, war die Religationsrate auch ohne CIP-Behandlung gering.

Meist wurde die Dephosphorylierung unmittelbar der Linearisierung angeschlossen, ohne vorherige DNA-Aufreinigung. Dabei wurde die Restriktionsendonuklease zuerst hitzeinaktiviert. Danach wurden dem Ansatz eine entsprechende Menge 10×Dephosphorylierungspuffer und einige Units CIP zugegeben. Es wurde 30 min lang bei 37 °C inkubiert, im Anschluss darauf wurde die alkalische Phosphatase 10 min lang bei 68 °C inaktiviert.

2.2.4.4 Ligation

Der liniarisierte und ggf. dephosphorylierte Plasmidvektor und das zu klonierende Fragment wurden in einem molaren Verhältnis wie 1:2.5 genommen. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Vektor	10-100 ng
Insert	2.5× mol. Überschuss
T4-Ligationspuffer	1.3 µl
T4-DNA-Ligase	0.5 µl
HPLC-H ₂ O	ad 13 µl
=> ü.N. bei 16 °C	

Die Hälfte des Reaktionsansatzes wurde anschließend für die Transformation eingesetzt, die andere Hälfte bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Radioaktiv markierte DNA-Sonden (Feinberg und Vogelstein 1983) wurden für die Hybridisierungsexperimente zum Screening von Cosmid-Bibliotheken und ES-Zelllinien, zur Genotypisierung von Mäusen sowie für die Northern-Blot Analyse der murinen Fibroblasten eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung von Doppelstrang-DNA mit α -[³²P]-dCTP wurde das RediprimeTMII DNA labeling kit von Amersham benutzt.

20-50 ng der Sonden-DNA wurden in 47 µl TE-Puffer aufgenommen, 5 min lang bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und für 3 min auf Eis gestellt. Die DNA wurde dann in das eiskalte, den fertigen Reaktion-Mix (dATP, dGTP, dTTP, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, Zufallsprimer) enthaltende RediprimeTM-Reaktionsgefäß pipettiert. Dem Ansatz wurden dann sofort 20-30 µCi α -[³²P]-dCTP (meist 2-4 µl) zugesetzt, und nach dem Vermischen wurde 15 min lang bei 37 °C inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurde die Sephadex® G50-Säule vorbereitet. Die Reaktion wurde mit 200 µl des Säulen-Durchflusses gestoppt und der Ansatz über die Säule von nicht inkorporierten Nukleotiden gereinigt.

Die „heiße“ Sonde konnte sofort zur Hybridisierung eingesetzt werden oder auch bei 4 °C aufbewahrt werden, dabei war allerdings die Halbwertszeit von ³²P zu beachten (ca. 15 Tage).

2.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.5.1 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Kompetente *E. coli* können durch einen Hitzeschock oder durch Elektroporation zur Aufnahme von DNA gebracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden elektrokompetente Zellen für Transformation benutzt.

Eine ü.N. gewachsene *E. coli*-Flüssigkultur wurde in ca. 100 Vol. LB-Medium (200 ml) aufgenommen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 inkubiert. Danach wurden die Zellen gereinigt. Dazu wurden sie pelletiert (JA-10 Rotor, 6000 rpm, 15 min, 4 °C) und im sterilen eiskalten ddH₂O aufgenommen. Der Reinigungsschritt wurde drei Mal durchgeführt. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Pellet mit sterilem eiskaltem 10% Glycerin versetzt und im JA-20 Rotor 15 min lang bei 4 °C sedimentiert. Die Zellen wurden dann in ca. 1 Vol. 10% Glycerin aufgenommen und schnell in 100 µl-Portionen aliquotiert. Die Zellen wurden bei -80 °C aufbewahrt und erst unmittelbar vor der Transformation vorsichtig auf Eis aufgetaut. Erwärmen auf RT sollte vor der Transformation unbedingt vermieden werden.

2.2.5.2 Transformation

Für eine Transformation wurden 50 µl auf Eis aufgetauter kompetenter *E.coli* eingesetzt. Die Zellen wurden zusammen mit 6.5 µl Ligationsansatz in eine eiskalte Elektroporationsküvette gegeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Küvette außen abgetrocknet, und die Bakterien wurden bei 2400 V im Stratagene-Elektroporator transformiert. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurde die Zellsuspension auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen, wobei zwei Platten mit 50 µl und 450 µl angeimpft wurden. Dies sollte das Picken von Einzelklonen auch bei hoher Transformationseffizienz und dichtstehenden Kolonien ermöglichen.

2.2.6 Hybridisierungstechniken

2.2.6.1 Transfer von DNA auf Hybond-N™-Membran

(Southern 1975)

Diese Methode, auch „Southernblot“ genannt, wurde zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente in einem Fragmentgemisch, speziell zum Screening der ES-Zelllinien, verwendet. 15 µg der ü.N. verdauten ES-Zell-DNA wurden auf ein 0.6% Agarosegel geladen und innerhalb von 8 Stunden langsam elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf dem Transilluminator zusammen mit einem Lineal fotografiert, um spätere Zuordnung von Fragmentgrößen zu ermöglichen. Dabei wurde die Orientierung des Gels durch abschneiden einer Ecke festgelegt.

Das Gel wurde 2×15 min in Denaturierungslösung, danach 2×15 min in Neutralisierungslösung und anschließend 15 min lang in 20×SSC geschwenkt. In der Zwischenzeit wurde die Hybond-N™-Membran zurechtgeschnitten, beschriftet, 3 min lang in ddH₂O und anschließend 15 min lang in 20×SSC inkubiert. Die DNA wurde durch Kapillartransfer (Abb. 1) ü.N. auf die Membran übertragen, als Transferpuffer wurde 20×SSC verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran noch feucht für 20 sec auf den Transilluminator gelegt, um die DNA zu fixieren, 30 sec lang in ddH₂O gewaschen und 30 min lang bei 65 °C getrocknet.

2.2.6.2 Transfer von RNA auf Hybond-N™-Membran.

Zur Detektierung spezifischer mRNA wurde diese Methode, auch als Northernblot bekannt, eingesetzt.

Die Elektrophoresekammer, die Gelkämme, die Meßzylinder etc. wurden ü.N. in 1 M NaOH eingeweicht. Am nächsten Morgen wurden sie mit ddH₂O gespült, anschließend wurde eine pH-Kontrolle durchgeführt.

Es wurde ein spezielles Agarosegel verwendet:

Agarose ultrapure	3	g	EK 2% (w/v)
10×MOPS	15	ml	
DEPC-H ₂ O	150	ml	

Nach dem Aufkochen und dem Abkühlen auf 60 °C wurden 7.5 µl Ethidiumbromid sowie 2.5 ml Formaldehyd zugesetzt und das Gel in die vorbereitete Form gegossen.

Ca. 10 µg RNA wurden mit dem 2×RNA-Auftragspuffer vermischt, 5 min lang bei 70 °C inkubiert, danach kurz aufs Eis gelegt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 35-45 V. Das Gel wurde zurechtgeschnitten, mit einem Lineal auf dem Transilluminator fotografiert und 15 min in 20×SSC äquiliert. Der Transfer der RNA auf die Hybond-N™-Membran erfolgte wie unter 2.2.6.1 beschrieben (Abb. 2.1).

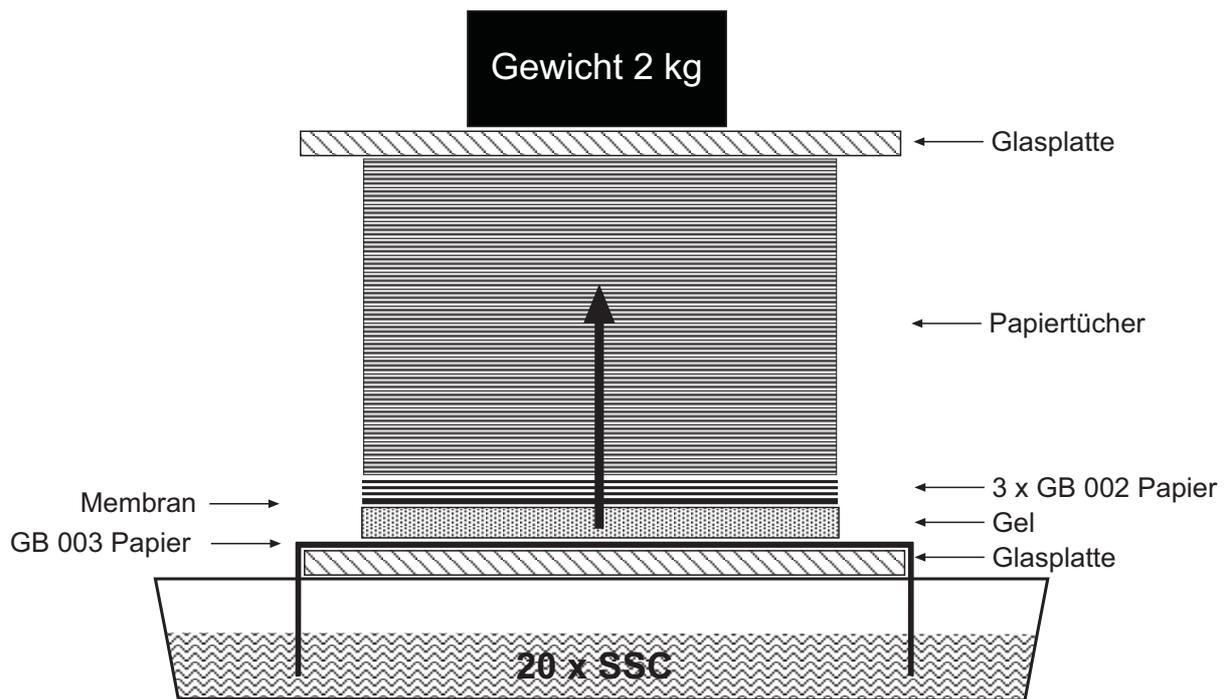


Abb. 2.1: **Southern- bzw. Northernblot:** Transfer von Nucleinsäure aus dem Gel auf Hybond-N™-Membran. Der Pfeil zeigt die Richtung des Flüssigkeitsstromes an.

2.2.6.3 Screening der Cosmid-Bibliothek

Die Fragmente der genomischen Maus-DNA, die Abschnitte des interessierenden Gens enthielten, wurden aus einer Cosmid-Bibliothek vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) bezogen. Zuvor wurden spezielle Cosmid-Filter mittels DNA-DNA-Hybridisierung untersucht, um die gesuchten Cosmide zu identifizieren. Diese Filter stellen Nitrocellulose-Membranen dar, auf die in einem bestimmten Muster Cosmid-DNA aufgetragen wurde. Die Hybridisierung und das Waschen der Filter erfolgte analog zu den im Kapitel 2.2.6.4 beschriebenen Experimenten. Anschließend erfolgte eine Exposition auf Röntgenfilmen. Die Expositionsdauer wurde so gewählt, dass die Signale auf dem Film in

Form von kleinen, scharfen Punkten sichtbar waren, und variierte zwischen wenigen Minuten und einigen Stunden. Nach Angaben des Herstellers konnten die Signalmuster ausgewertet und die entsprechenden Cosmide auf der Webseite von RZPD (www.rzpd.de) bestellt werden.

2.2.6.4 Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde

Durch Hybridisierung der auf Hybond-NTM-Membran oder Cosmid-Filter fixierten DNA-Fragmente mit einer radioaktiv markierten Sonde, mit nachfolgender Exposition auf einem Röntgenfilm oder Phosphoimager-Screen, konnten diese Fragmente sichtbar gemacht werden. Die Membran wurde in einem Hybridisierungsrohr 30 min lang bei 65 °C inkubiert, nebenbei wurde auch das Rapid-hybTM-Hybridisierungsmix auf 65 °C erwärmt. Danach wurden 5-10 ml Hybridisierungsmix in das Hybridisierungsrohr gegeben, und es wurde 30 min lang unter Rotation bei 65 °C inkubiert.

Die markierte DNA-Sonde wurde 5 min lang bei 95 °C denaturiert, kurz abzentrifugiert und vorsichtig in das Hybridisierungsrohr pipettiert, dabei sollte sich die Sonde erst mit dem Hybridisierungsmix vermischen, bevor sie mit der Membran in Kontakt tritt.

Die Hybridisierung erfolgte ü.N. unter Rotation bei 65 °C.

Danach wurde die Membran 2×15 min lang bei RT in Waschlösung 1 und 2×15 min lang im Schüttelwasserbad bei 65 °C in Waschlösung 2 gewaschen, feucht in PE-Folie eingeschweißt und einige Stunden lang auf dem Phosphoimager-Screen exponiert.

2.2.7 DNA-Amplifikation mittels PCR

(Saiki *et al.* 1988)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion können bestimmte DNA-Fragmente *in vitro* vervielfältigt werden. Diese Methode wurde für folgende Zwecke eingesetzt:

- Herstellung von DNA-Sonden
- Einführung von Restriktionsstellen
- Screening von Cosmiden
- Screening von rekombinanten *E. coli*-Kolonien (Kolonie-PCR)
- Genotypisierung von Mäusen.

Die PCR besteht üblicherweise aus einer Serie von 20-30 Zyklen, wobei jeder Zyklus drei Hauptschritte beinhaltet:

1. Schmelzen der Template-DNA (melting, denaturation)
2. Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die Einzelstränge (annealing)
3. Synthese von DNA durch die DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern (extension).

Die Schmelztemperatur lag bei 94-96 °C. Die Annealing-Temperatur wurde nach der Formel $T [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (\text{A} + \text{T}) + 4 \times (\text{G} + \text{C})$ berechnet, wobei A+T und G+C der Anzahl von jeweiligen Basen im Oligonukleotid entspricht. Die Primer wurden so gewählt, dass die Anzahl der Nukleotide bei ca. 20 und die Annealing-Temperatur bei ca. 60 °C lagen. Die Extensionszeit wurde abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes gewählt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die *Taq*-Polymerase 500 bp/min, die *Pfu*-Polymerase 1000 bp/min schafft. Bei der Kolonie-PCR und der PCR mit der genomischen DNA wurde vor dem ersten Zyklus 4 min lang bei 94 °C denaturiert. Dem letzten Zyklus schloss sich ein Elongationsschritt von 7 min bei 72 °C an.

2.2.7.1 Die Standard-PCR

Diese Reaktion wurde zur Herstellung von Sonden und für analytische Zwecke verwendet:

Standard-PCR	
Template-DNA	50 ng
Primer 1	100 pmol
Primer 2	100 pmol
dNTP's (je 12.5 mM)	2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/µl)	0.5 µl
<i>Taq</i> -Puffer 10×	10 µl
HPLC-H ₂ O	ad 100 µl
Programm	
5 sec	96 °C
30 sec	50 °C
1 min	72 °C
25 Zyklen	

2.2.7.2 Die Kolonie-PCR

Diese Methode wurde zum Screening von *E. coli*-Kulturen eingesetzt:

Kolonie-PCR	
Bakterienkultur	2 μ l
Primer 1	100 pmol
Primer 2	100 pmol
dNTP's (je 12.5 mM)	2 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase (5U/ μ l)	0.5 μ l
<i>Taq</i> -Puffer 10 \times	5 μ l
HPLC-H ₂ O	ad 50 μ l
Programm	
15 sec	95 °C
30 sec	50 °C
2 min	72 °C
25 Zyklen	

2.2.7.3 PCR mit genomischer DNA

Zur Bestimmung des Genotyps der Nachkommen von chimären Mäusen, und teilweise auch zum Screening von ES-Zelllinien wurde ebenfalls PCR eingesetzt. Für die Genotypisierung wurde die Template-DNA aus Mäuseschwänzen präpariert. Folgendes Programm wurde verwendet:

PCR mit genom. DNA	
1 min (preheat)	94 °C
30 sec	94 °C
30 sec	52 °C
4 min	72 °C
30 Zyklen	

2.2.7.4 Gerichtete Mutagenese

Für die Einführung von benötigten Restriktionsstellen in ein Plasmid wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Zuerst wurde in der interessierenden Region eine Sequenz gefunden, die durch Austausch weniger benachbarter Nukleotide die notwendige Restriktionsstelle ergeben würde. Die

verwendeten Primer beinhalteten in der Mitte die nötige Mutation. Das zirkuläre Plasmid wurde unter Verwendung von *Pfu*-Polymerase amplifiziert. Nach Zugabe von 1 μ l *DpnI* zum PCR-Ansatz und 1 h Inkubation bei 37 °C wurde nur die methylierte Template-DNA hydrolysiert, und der Ansatz wurde für die Transformation eingesetzt. Die *E. coli*-Klone, die das Mutation tragende Plasmid enthielten, wurden durch analytische Restriktionsverdau identifiziert.

Mutagenese-PCR	
Template-Plasmid	50 ng
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
dNTP mix	1 μ l
<i>Pfu</i> -Polymerase (2.5U/ μ l)	0.5 μ l
<i>Pfu</i> -Puffer 10 \times	5 μ l
HPLC-H ₂ O	ad 50 μ l
Programm	
15 sec	95 °C
30 sec	55 °C
5 min	68 °C
18 Zyklen	

2.2.8 Sequenzanalysen

Zur Sequenzierung von Plasmid- oder Cosmid-DNA wurde das ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer verwendet. Dem Prozess liegt die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) mit nachfolgender Kapillarelektrophorese in einem automatischen Sequenzierer (Typ 310, PE Biosystems) zugrunde. Die Sequenzierungsreaktion wurde modifiziert nach Protokollen des Herstellers durchgeführt:

Sequenzierungsreaktion	
Template	0.2-0.5 μ g
Primer	3.5 pmol
Sequenzierungs-Mix	1-2 μ l
HPLC- H ₂ O	ad 10 μ l
Programm	
10 sec	96 °C
5 sec	50 °C
4 min	60 °C
25 Zyklen	

Der Ansatz wurde nach Ablauf der Reaktion mit 50 μ l 95% Ethanol und 1 μ l 3 M NaAc 10 min lang bei RT inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde 20 min lang bei 14000 rpm und

RT sedimentiert. Aufgrund der geringen DNA-Menge war das Pellet nicht sichtbar! Der Überstand wurde sehr vorsichtig entnommen und verworfen. Die DNA wurde nun mit 70% Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurde das Pellet bei 37 °C luftgetrocknet und in 50 µl HPLC-H₂O aufgenommen. Diese Lösung konnte für die automatische Sequenzierung eingesetzt werden. Das verwendete Gerät lieferte recht zuverlässige Sequenzen von einer Länge bis zu 500 Basen. Trotzdem wurden die Rohdaten zusätzlich von Hand überprüft, um eventuelle Fehler der Analyse-Software zu korrigieren.

2.2.9 Kultivierung von eukariotischen Zellen

Medien für eukariotische Zellen:

DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium)			Gibco BRL
FKS (fetales Kälberserum)			Boehringer/Gibco BRL
Geneticin G418 (25 mg/ml)			Gibco BRL
L-Glutamin (100×)			Gibco BRL
LIF-faktor ESGRO™			Chemicon International Ltd., Hofheim
Mitomycin C			Sigma
Natriumpyruvat (100×)			Gibco BRL
Nichtessenzielle Aminosäuren (100×)			Gibco BRL
PBS			Gibco BRL
Trypsin-EDTA			Gibco BRL
β-Mercaptoethanol (1000×)	35	µl	β-Mercaptoethanol mit 5 ml PBS verdünnen, sterilfiltrieren. Bei 4 °C im Dunkeln 10 Tage haltbar.
Mitomycin C (1 mg/ml, 100×)	2	mg	Mitomycin C
	100	µl	DMSO
	1.9	ml	PBS
			in 150- und 300-µl-Portionen aliquotieren, bei -20 °C lagern.

Medium für die MPI-2 ES-Zellen	500	ml	DMEM
	100	ml	FKS Boehringer (EK 20%)
	5	ml	L-Glutamin (EK 2 mM)
	5	ml	Natriumpyruvat (EK 1 mM)
	5	ml	Nichtessenzielle Aminosäuren
	0.5	ml	β -Mercaptoethanol
	50	μ l	LIF-faktor (5×10^5 U)
optional wurden dem Medium	8.2	ml	G418 (EK 335 μ g/ml) zugesetzt
Medium für MEF	500	ml	DMEM
	50	ml	FKS Gibco BRL (EK 10%)
	5	ml	L-Glutamin (EK 2 mM)
Einfriermedium für die ES-Zellen	60	%	MPI-2 ES-Medium
	20	%	FKS Boehringer
	20	%	DMSO

Folgende Mediumvolumina wurden benötigt:

Medium pro:	
Loch einer 24-well-Platte	2 ml
Loch einer 6-well-Platte	3 ml
6-cm-Platte	4 ml
10-cm-Platte	10 ml
15-cm-Platte	25 ml

Alle Arbeiten mit eukariotischen Zellen wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter, 5% CO₂-haltiger Atmosphäre bei 37 °C kultiviert. Sobald das Medium gelblich wurde, wurde es gewechselt. Sollten die Zellen Haufen, und keinen Rasen gebildet haben, wurden sie trypsiniert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien, PBS etc. vor Benutzung auf 37 °C vorgewärmt. Zum Absaugen des Mediums von Gewebekulturplatten wurden eine peristaltische Pumpe und sterile Pasteur-Pipetten benutzt. Die Zentrifugationsschritte fanden in der Megafuge 1.0 bei 1000 rpm und RT statt.

2.2.9.1 Trypsinierung von Zellen

Diese Methode wurde zum Auflösen des Zellverbandes nach Erreichen der Konfluenz, bei Wachstum in „Haufen“ oder vor dem Einfrieren durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und es wurde PBS dazugegeben. Nach dem Absaugen von PBS wurde Trypsin-EDTA-Lösung zugesetzt und 5 min lang bei 37 °C inkubiert. Das Fortschreiten der Auflösung wurde durch vorsichtiges seitliches Beklopfen kontrolliert, ggf. wurde etwas länger inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Medium gestoppt, und die Zellen durch vorsichtiges hoch- und runterpipettieren resuspendiert. Falls die Zellen weiter in Kultur gehalten werden sollten, wurde am folgenden Tag das Medium gewechselt.

2.2.9.2 Einfrieren von ES-Zellen und Anlegen von „DNA-Platten“

Die auf 24-Loch-Gewebescheiden kultivierten ES-Zellen wurden trypsinisiert und in 2 ml Medium resuspendiert. Davon wurden 1.3 ml auf 6-Loch-Gewebescheiden übertragen, in welchen 3 ml Medium (ohne LIF-faktor) vorgelegt wurden. Diese ES-Zellen dienten der späteren DNA-Präparation.

Die restlichen 0.7 ml wurden in ein Einfriereröhrchen übertragen und mit 0.7 ml eiskaltem Einfriermedium versetzt. Die Endkonzentration von DMSO im Medium betrug 10%. Die Röhrchen wurden ü.N. bei -80 °C gehalten, am nächsten Tag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.9.3 Auftauen von Zellen

Das Einfriereröhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 1 min bei RT stehengelassen. Danach wurde das Röhrchen in 70% Ethanol aufgetaut, und sobald nur noch ein kleiner Eisrest sichtbar war, wurden die Zellen in 9 ml eiskaltem Medium aufgenommen und 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen im benötigten Volumen Medium resuspendiert und auf Gewebekulturplatten übertragen. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

2.2.9.4 Elektroporation

Durch die Elektroporation können die ES-Zellen zur Aufnahme des gene-targeting-Konstruktes gebracht werden.

Die ES-Zellen wurden trypsiniert, pelletiert und nach Absaugen des Überstandes in 800 µl Elektroporationspuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in eine sterile Gene Pulser™-Küvette überführt und 30 µg DNA wurden zugegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 240 V und 500 µF. Danach wurde die Suspension für 10 min bei RT stengelassen und anschließend auf die vorbereitete 15-cm-Feederplatte gegeben, auf der zuvor das MEF-Medium durch das ES-Zell-Medium ohne G418 ersetzt wurde. Nach 48 h wurde die Selektion gestartet, indem das alte Medium vorsichtig abgesaugt und das G418-haltige ES-Zell-Medium zugegeben wurde. Nach max. 7-10 Tagen wurden die Einzelklone gepickt und auf vorbereiteten 24-Loch-Feederplatten kultiviert.

2.2.9.5 Picken von ES-Zell-Klonen

Pro Elektroporation wurden etwa 100-120 Klone gepickt. Vor dem Picken sollten genügend 24-Loch-Feederplatten vorbereitet werden. In 96-well-Platten wurden je Loch 30 µl Trypsin-EDTA vorgelegt, wobei zur besseren Übersicht nur jede zweite Reihe benutzt wurde.

Zum Picken der ES-Zell-Klone wurde die Gewebeschale unter das ID 03 Mikroskop gestellt. Eine 200-µl-Pipette wurde auf 30 µl eingestellt. Mit der gelben Pipettenspitze wurde der Klon samt darunterliegenden Feederzellen vorsichtig vom restlichen Feeder-Rasen getrennt, auf die 96-Loch-Platte überführt und mit Trypsin durch mehrmaliges hoch- und runterpipettieren vermischt. Nachdem eine 96-Loch-Platte voll war, wurde 5 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in vorbereitete 24-Loch-Feederplatten überführt und bis zur Konfluenz kultiviert.

2.2.9.6 Präparation von primären Fibroblasten

Zur Hemmung der Differenzierung von ES-Zellen und zu einer besseren Haftung in den Kulturschalen wurden sog. Feederzellen verwendet. Diese bilden einen Rasen am Boden der

Schalen und stellen embryonale Fibroblasten von G418-resistenten Mäusen dar, deren Fähigkeit zur Teilung durch Mitomycin C unterbunden wurde.

Eine Trächtige Maus der F1-Generation wurde am 13. Tag der Schwangerschaft getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde der Uterus entnommen und in eine sterile Petrischale mit PBS gelegt. Die Embryonen wurden aus der Amnionhöhle herausgenommen, in eine neue Gewebeschale mit PBS überführt und gewaschen. Der Kopf, die Leber und das Herz der Embryonen wurden entfernt, wobei der Kopf für spätere DNA-Gewinnung und PCR-Genotypisierung bei 4 °C aufbewahrt wurde. Die Embryonen wurden in Stücke geschnitten und jeder einzeln in einen separaten 25-ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kolben wurden zuvor mit einer Schicht Glasperlen und einem Magnetstab am Boden sterilisiert und mit 5 ml Trypsin-EDTA gefüllt. Die Inkubation erfolgte 15 min bei 37 °C auf Magnetrührern. Die Trypsinierung wurde anschließend mit 25 ml Medium gestoppt, die Zellen durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren vereinzelt und 5 min lang in der Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und auf 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, und die größeren Gewebestücke wurden vorsichtig entfernt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert, ein Teil wurde eingefroren, der Rest weiter in Kultur gehalten. Zur Herstellung von Feederplatten wurden die Zellen auf 15-cm-Schalen überführt.

2.2.9.7 Herstellung der Feederplatten

Das Medium einer konfluenten 15-cm-Fibroblasten-Stammpalte wurde vorsichtig abgesaugt und durch 15 ml frisches Mediums ersetzt. 150 µl 100×Mitomycin-C wurden vorsichtig zugegeben und 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden 3 mal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in benötigter Menge Medium resuspendiert und auf die Kulturschalen bzw. 24-well-Platten verteilt. Nachdem die Fibroblasten sich abgesetzt und einen Rasen gebildet haben, konnten die Platten zur Kultivierung von ES-Zellen verwendet werden.

2.2.10 Blastozysten-Mikroinjektion und Maushaltung

Diese Schritte wurden in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt.

2.2.10.1 Maushaltung

Die Maushaltung erfolgte unter üblichen Bedingungen (Temperatur 21-23 °C, Luftfeuchtigkeit 45-60%, Tag-Nacht-Rhythmus: 12 h Licht/12 h Dunkelheit) (Hogan *et al.* 1994).

2.2.10.2 Superovulation

Durch Gonadotropingaben kann die Anzahl der ovulierten Eizellen pro Zyklus um bis zu Faktor 5 erhöht werden (Hogan *et al.* 1994). Es wurde das Pregnant Mare's Serum als Ersatz für follikelstimulierendes Hormon und das humane Choriongonadotropin als Ersatz für das luteinesierende Hormon verwendet. Es wurden jeweils 5 IU der Hormone mit einem Intervall von ca. 48 h intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Verpaarung.

2.2.10.3 Vaginalpfropfkontrolle

Ca. 8 h nach der Verpaarung wurden die Weibchen auf das Vorliegen eines Sperma-Vaginalpfropfes untersucht. Dazu wurde die Vagina mit einer abgerundeter Pasteurpipette leicht dilatiert, so dass auch tieferliegende Abschnitte inspiziert werden konnten. Das Vorliegen eines Vaginalpfropfes weist auf eine stattgehabte Kohabitation hin.

2.2.10.4 Blastozystengewinnung

Vier Tage vor Blastozystengewinnung wurden 40 C57BL/6J-Weibchen gegen 16 Uhr verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Mäuse mit einem Vaginalpfropf von den übrigen Tieren separiert. 3.5 d *post conceptionem* wurden die Blastozysten isoliert (Hogan *et al.* 1994)

2.2.10.5 Erzeugung pseudoträchtiger Weibchen

Zwei Tage nach Verpaarung der Blastozystenspender, wurden 20 B6/CBF_{1(agouti)}-Weibchen im Alter von 10-20 Wochen mit zehn vasktomierten Moro-Männchen verpaart, und am nächsten Tag der Vaginalpfropfkontrolle unterzogen. Tiere mit einem Vaginalpfropf wurden bis zur Blastozystenimplantation gesondert gehalten.

2.2.10.6 Blastozysten-Mikroinjektion

Der Aufbau der Mikroinjektions-Anlage sowie die Durchführung der Mikroinjektion der ES-Zellen in die Blastozysten erfolgten nach den Angaben von Hogan *et al.* (1994). Während der Injektion wurden die ES-Zellen bei einer Temperatur von ca. 10 °C gehalten. Der Mikroinjektion schloss sich eine Inkubation der Blastozysten von 1 h bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank an. Danach erfolgte der Transfer in pseudotrchtige Mäuse.

2.2.10.7 Embryo-Transfer in pseudotrchtige Mäuse

Durch die Verpaarung mit den vasktomierten Männchen wurden die Reproduktionstrakte der Weibchen für die Aufnahme der befruchteten Eizellen vorbereitet. Diesen pseudotrchtigen Weibchen wurden am Tag 2.5 oder 3.5 *post cohabitationem* die vorbereiteten Blastozysten unter Injektionsnarkose mit Ketavet/Rompun implantiert (Hogan *et al.* 1994).

3. Ergebnisse

Im Rahmen eines 1999 in Japan durchgeführten Sequenzierungsprojekts humaner cDNAs, die sich aus mRNA des Gehirns ableiteten, wurden drei Sequenzen beschrieben, die für putative Sulfatasen codieren (Nagase *et al.* 1999a; Kikuno *et al.* 1999; Nagase *et al.* 1999b). Die Sequenzen erhielten die Bezeichnungen *KIAA1001*, *KIAA1077* und *KIAA1247* und codieren für die Arylsulfatase G bzw. für Teile der Sulfatasen Sulf1 und Sulf2. Durch die Vorarbeit der Arbeitsgruppe um T. Dierks wurden diese cDNAs subkloniert und charakterisiert, die inkompletten *SULF1*- und *SULF2*-cDNAs wurden durch 5'-RACE-Reaktionen vervollständigt. Die cDNAs wurden auf beiden Strängen sequenziert (Dierks 2001). Diese Sequenzen bildeten den Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Sämtliche Sequenzen der in dieser Arbeit gewonnenen cDNAs, der daraus abgeleiteten Sulfatase-Proteine, der verwendeten genomischen Fragmente sowie der benutzten Primer finden sich im Anhang.

3.1 Generierung von Sulf2-defizienten Mäusen

3.1.1 Ermittlung der murinen cDNA-Sequenz über EST-Klone

Die humane *KIAA1247/SULF2*-cDNA-Sequenz diente als Vorlage für die Ermittlung von EST-Klonen, die Fragmente der murinen cDNA enthalten. Die Suche in der Maus-EST-Datenbank erfolgte mit Hilfe von BLAST, zu erreichen unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. EST-Klone, deren cDNAs etwa 90% Identität zu der humanen Sequenz auf der cDNA-Ebene zeigten, wurden ausgewählt und vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) bezogen (Tab. 3.1).

Klon	Nr.	Vektor	Insert	Restr. Sites	Primer	RZPD ID	GI
1247-A	3,4	pT7T3D-Pac	ca. 1.5 kb	<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>	T3, T7	IMAGp998G091033Q2	1463884
1247-M1	3	pT7T3D-Pac	ca. 1 kb	<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>	T3, T7	IMAGp988P13799Q2	4056753
1247-M2	3,4	pCMVSPORT6	ca. 2 kb	<i>NotI</i> , <i>SalI</i>	M13R-3, M13F	IMAGp988E138744Q2	9320195
1247-E1	2,4	pSPORT1	ca. 2 kb	<i>NotI</i> , <i>SalI</i>	M13R, M13F	IMAGp988K185183Q2	6516356
1247-E2	1,2	pT7T3D-Pac	ca. 1.5 kb	<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>	T3, T7	IMAGp988I04991Q2	1427795

Tab 3.1: **Die verwendeten Sulf2-EST-Klone.** Angegeben sind die Plasmidvektoren, die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, die für die Sequenzierung eingesetzten Vektorprimer sowie die Identifikationsnummern der Klone.

Die erhaltenen Bakterien wurden auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen. Die gepickten Einzelkolonien wurden als Glycerin-Kulturen gesichert und jeweils 4 Klone für Plasmid-Minipräparationen kultiviert.

Zur Feststellung der Insertgröße wurde die Plasmid-DNA mit den in der Tabelle angegebenen Restriktionsenzymen analytisch verdaut und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei zeigte Klon 1247-M1 eine Heterogenität der Fragmente, was auf eine Kontamination schließen ließ. Dieser Klon konnte nach Vereinzelungsausstrich gereinigt und durch Sequenzierung identifiziert werden. Es wurden die in der Tabelle genannten Insertgrößen gefunden.

Die DNA wurde anschließend einer Sequenzanalyse unterzogen. Der mit BLAST durchgeführte Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit der humanen cDNA ergab eine fast vollständige Abdeckung im kodierenden Bereich. Lediglich ein kleiner Abschnitt in der Mitte war in den EST-Klonen nicht enthalten (Abb 3.1). Die vollständige *SULF2*-cDNA wurde später durch Fusion des 1247-M2 EST-Inserts mit einem RT-PCR-Produkt erhalten (nicht gezeigt). Die komplette codierende Sequenz (2628 bp) sowie die abgeleitete Proteinsequenz (875 AS) ist im Anhang (siehe 6.1 bzw. 6.4) zu finden.

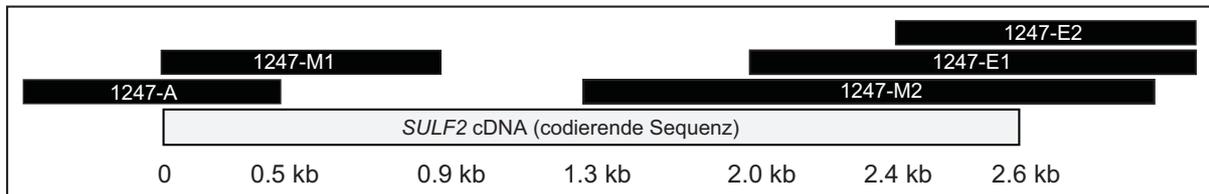


Abb. 3.1: Abdeckung der *SULF2*-cDNA durch die cDNA-Fragmente der EST-Klone

3.1.2 Identifizierung genomischer Cosmid-Klone

Zur Identifizierung genomischer *SULF2*-DNA auf einem Cosmid-Array über Hybridisierungsexperimente musste eine geeignete DNA-Sonde generiert werden. Solch eine Sonde sollte sinnvollerweise spezifisch für den interessierenden DNA-Abschnitt sein. Die Sulf1 und Sulf2 Proteine sind zu 63% identisch, und ihre Homologie ist im N-terminalen Bereich am stärksten ausgeprägt. Deswegen war es nahe liegend, die Sonde aus dem 3'-Bereich der kodierenden Sequenz zu wählen. Aus zwei Gründen haben wir uns dennoch für den 5'-Bereich entschieden. Zum einen wollten wir das Gen in einem der ersten Exons unterbrechen, und eine gezielte Suche nach den ersten Exons erschien sinnvoll. Zum anderen hätte ein Screening mit einer „unspezifischen“ 5'-Sonde mit einer gewissen

Wahrscheinlichkeit genomische Cosmid-Klone beider Sulfatasen aufgedeckt. Dies wäre von Vorteil, denn man müsste die Klone nur differenzieren, und ein zweites Screening mit einer *SULF1*-Sonde hätte sich erübrigt.

Die 5'-Sonde A wurde mittels Standard-PCR mit anschließender Produkt-Aufreinigung generiert. Als Template diente das EST-Plasmid des Klons 1247-A#3. Die beiden Primer 1247_Startc und 1247_Anc wurden so gewählt, dass die Sonde den Anfang der kodierenden Sequenz, einschließlich des FGly-determinierenden Motivs, enthielt und eine Länge von 436 bp aufwies (Abb. 3.2).

```

SULF2 49 TCCCTGCTGGCTGGCAGCTCGGCCTTCCTCTCCCATCCCCGCCTGAAGGG 98
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SULF1 46 CAGCTGCTGGGAAGCCTGTGTTCCACCGTTCGGTCCCAGAGGTTCCGAGG 95
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          99 ACGCTTCCAGAGGGACCGCAGGAACATCCGGCCCAACATCATCTTGGTGC 148
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          96 AAGGATACAGCAGGAACGAAAAAACATCAGACCCAATATTATCCTTGTGC 145
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          149 TTACGGATGACCAGGATGTGGAGCTGGGCTCCATGCAAGTGATGAACAAG 198
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          146 TCACTGACGACCAGGATGTGGAGCTGGGTTCCCTGCAAGTCATGAACAAG 195
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          199 ACAAGGCGTATCATGGAGCAGGGCGGGGCGCACTTCATCAATGCCTTCGT 248
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          196 ACGAGAAAGATCATGGAACAGGGTGGGGCCACCTTACCAATGCCTTTGT 245
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          249 GACTACACCAATGTGTGCTGTCCGTCTCGCTCCTCCATTCTCACCGGCAAGT 298
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          246 GACCACGCCCATGTGCTGTCCATCAGCTCATCCATGCTCACTGGGAAGT 295
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          299 ACGTCCACAACCATAACACCTACACCAACAATGAGAATTGTTCCCTCGCCC 348
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          296 ACGTGCATAACCACAATGTCTACACCAACAATGAGAACTGCTCGTCTCCC 345
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          349 TCCTGGCAGGCCAGCAGCAGAGCCGCACCTTCGCCGTGTATCTCAACAG 398
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          346 TCGTGGCAGGCAATGCACGAGCCTCGGACCTTTGCTGTGTATCTCAACAA 395
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          399 CACAGGCTACCGGACAGCTTTCTTCGAAAATACCTCAATGAGTACAACG 448
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          396 CACCGGCTACAGAACAGCCTTTTTTTGGAAAATACCTCAATGAATACAATG 445
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          449 GCTCATACGTGCCGCCGGCTGGAAGGAGTGGGTCG 484
          | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
          446 GCAGCTACATCCCTCCTGGATGGCGAGAATGGCTCG 481

```

Abb. 3.2: Vergleich der *SULF2*- und *SULF1*-cDNA-Sequenzen im Bereich der Hybridisierung mit der Sonde A: Die Sequenzen sind in diesem Abschnitt zu 73% identisch. Hervorgehoben sind die jeweiligen Exone der beiden Sulfatasen (*SULF2*: Exon 1, *SULF1*: Exon 2), die durch Einsetzen der neoR-Kassette unterbrochen wurden.

High density cosmid filter arrays der 129/Ola Maus Bibliothek wurden vom RZPD bezogen. Die Hybridisierung der 17 Filter (mit jeweils 27648 Cosmid-Klonen) mit der ³²P-markierten Sonde A ergab insgesamt 15 positive Signale. Die entsprechenden Cosmid-Klone wurden vom RZPD bestellt und geliefert.

Nach dem Ausplattieren der Bakterien auf LB-Kanamycin-Platten, dem Picken der Einzelklone und deren Sicherung als Glycerin-Kultur folgte eine genauere Untersuchung der Cosmide. Die DNA wurde präpariert und durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* in Fragmente gespalten. Mehrere Cosmide boten ein homogenes Bandenmuster, einige andere zeigten ein abweichendes Muster. Die *EcoRI*-Spaltprodukte wurden einer Southernblot-Analyse unterworfen. Nach der Hybridisierung mit der Sonde A waren bei den meisten Cosmiden zwei Signale bei 3.1 bzw. 3.4 kb zu sehen. Drei Cosmide boten nur ein Signal bei 3.1 kb, vier Cosmide zeigten keine Hybridisierung. Bei dem Cosmid B4 war ein Signal bei ca. 7.7 kb sichtbar – dieses Cosmid enthielt genomische *SULF1*-DNA (s. 3.2.2).

Es erfolgte ein erneuter, diesmal präparativer Verdau der interessierenden Sulf2-Cosmide mit *EcoRI* mit nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung. Die 3.1 bzw. 3.4 kb großen Fragmente wurden aus dem Gel aufgereinigt, in den Plasmidvektor pBluescriptII SK+ ligiert und in *E.coli*-Zellen transformiert.

Die so subklonierten *EcoRI*-Fragmente wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Das 3.1 kb große Insert des Klons A42#1 enthielt das 268 bp lange Exon 1 des *SULF2*-Gens. Da das Exon von 1.1 bzw. 1.7 kb nicht-codierender DNA flankiert wurde, wurde diese genomische DNA als geeignet befunden, um für die Konstruktion des gene-targeting-Konstruktes eingesetzt zu werden. Dieser Klon (A42#1) stammt vom Cosmid A4 (RZPD_ID MPM Gc121N1389Q2). Das 3.4-kb-Fragment, im Klon A41 subkloniert, enthielt keine Exone. Demzufolge kann dieses Fragment nicht dem Fragment entsprechen, das im Southernblot ein positives Signal nach Hybridisierung mit der Sonde A ergab, wie oben erwähnt. Der Klon A41 ist unter 3.1.5 näher beschrieben.

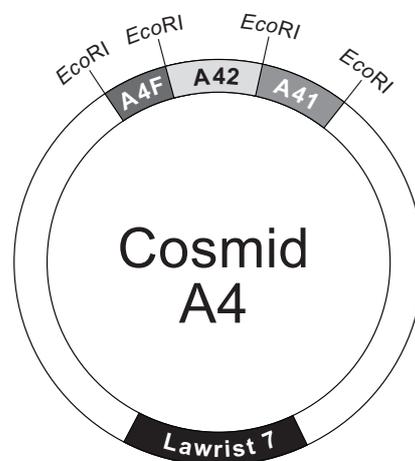


Abb. 3.3: **Schema des Cosmids A4.** Dargestellt sind die relevanten *EcoRI*-Fragmente sowie der Lawrist7 Cosmidvektor. Das 3.1-kb-*EcoRI*-Fragment A42 sowie ein Teil des 1.9-kb-Fragmentes A4F wurden zur Konstruktion des GTV eingesetzt.

3.1.3 Konstruktion des gene-targeting-Vektors

Die Gestaltung eines gene-targeting-Vektors (GTV) beim klassischen knock-out beinhaltet das Einbringen eines Aminoglykosid-Resistenzgens (neoR-Kassette) in ein Exon und das Schaffen einer Möglichkeit, das Ereignis der homologen Rekombination des GT-Konstruktes im Genom mittels Southernblot-Analytik zu verifizieren. Die neoR-Kassette unterbricht zum einen das Leseraster im Exon und führt so auf mRNA-Ebene zu einem Translationsabbruch, zum anderen wird die G418-Resistenz als Selektionsmarker nach der Transfektion der ES-Zellen ausgenutzt. Es gibt die Möglichkeit einer negativen Selektion bei nicht-homologer Rekombination unter Benutzung von Thymidinkinase und Gancyclovir; darauf wurde aber im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, um die Kulturzeit der ES-Zellen gering zu halten.

Die vollständige Sequenzierung des Klons A42#1 ermöglichte eine Restriktionskartierung der DNA mit Hilfe des GCG Softwarepakets. Die interessierenden Schnittstellen wurden mit einem Restriktionsverdau überprüft. Innerhalb des Exons fand sich eine singuläre *Bse*RI Erkennungssequenz. Diese wurde zum Einsetzen der neoR-Kassette benutzt (Abb. 3.5 A). Das Enzym *Bse*RI hydrolysiert die DNA 10 Basen nach der Erkennungsstelle und hinterlässt 2 Basen Überhang. Die Insertionsstelle würde demnach auf Protein-Ebene vor der 11. Aminosäure innerhalb des Signalpeptids liegen.

Die 1.1 kb große neoR-Kassette wurde aus dem pMC1neo Vektor mit *Xba*I und *Sal*I ausgeschnitten und nach elektrophoretischer Auftrennung aufgereinigt. Die klebrigen Enden wurden durch Behandlung mit Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt.

Die A42#1 Plasmid-DNA wurde mit *Bse*RI linearisiert, die klebrigen Enden ebenfalls mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die vorbereitete neoR-Kassette wurde dann in das linearisierte Plasmid ligiert. Durch Kolonie-PCR wurden positive Klone identifiziert. Dabei wurden die Exon-Primer 1247_neocon_c sowie 1247_365_nc verwendet und es entstand bei positiven Klonen ein 1.45-kb-PCR-Produkt. Die Ausrichtung der neoR-Kassette wurde durch einen analytischen Verdau der DNA der positiven Klone mit *Eco*RI überprüft. *Eco*RI schneidet die neoR-Kassette in zwei (0.2 kb und 0.9 kb große) Fragmente. Die Sequenzanalyse des fertigen Konstruktes (1247GTV#2) bestätigte, dass durch die neoR-Kassette ein Stop-Codon in alle drei Leseraster der *SULF2*-mRNA eingeführt worden war.

Die Transfektion der ES-Zellen mit diesem Konstrukt führte nicht zu einer homologen Rekombination in den untersuchten 100 Zelllinien. Deswegen wurde eine Modifikation des GTV vorgenommen.

3.1.4 Erweiterung des gene-targeting-Vektors auf der 5'-Seite

Die Frequenz eines homologen Rekombinationsereignisses in gene-targeting-(GT) Experimenten zeigt eine positive Korrelation mit der Länge der zum Zielgen sequenzgleichen Abschnitte auf beiden Seiten der neoR-Kassette. Im Falle von 1247GTV#2 umfasste der sequenzgleiche Bereich 5' von der Kassette lediglich ca. 1.1 kb. Der Misserfolg der ersten Transfektion veranlasste uns zu einer Erweiterung dieses Bereichs.

Durch Sequenzierung der Cosmid A4#1-DNA mit dem Primer 1247_flank1-nc war eine flankierende Sequenz von ca. 500 bp Länge auf der 5'-Seite des targeting-Abschnitts A42 bekannt. Aufgrund dieser Sequenz wurden 2 Primer (1247_Sonde5'_c und 1247_Sonde5'_nc) ausgewählt, um ein 266 bp großes PCR-Produkt zu generieren, das als „Sonde 1247_5“ benannt wurde. Mit dieser Sonde wurde in einer Southernblot-Analyse das *EcoRI*-Fragment A4F des Cosmids A4 identifiziert, das 1247A42 auf der 5'-Seite flankiert (Abb. 3.3). Es wurde ein Signal bei ungefähr 1.9 kb beobachtet. Nach einem präparativen *EcoRI*-Verdau der A4#1-Cosmid-DNA wurde das entsprechende Fragment in den mit *EcoRI* linearisierten pBSK SK+ Vektor subkloniert (Klon A4F, 1909 bp). Die Sequenzanalyse bestätigte, dass dieses *EcoRI*-Fragment dem A42 benachbart ist. Ein Teil dieses Fragmentes sollte nun mit dem 1247GTV fusioniert werden.

Die Restriktionsanalyse der A4F-Sequenz deckte eine singuläre *SalI*-Schnittstelle in der Position 1206 auf. Diese 1.2 kb des A4F wurden durch *SalI*-Verdau des Klons A4F#8 und Religation verworfen, wobei die Existenz einer *SalI*-Schnittstelle in der MCS des Vektors ausgenutzt wurde (Abb. 3.4). So wurde der Klon A4S erhalten, der die restlichen, benachbarten 0.7 kb enthielt, die auf der 5'-Seite an den 1247GTV angehängt werden sollten. Für die Fusion sollte der gesamte GT-Abschnitt des 1247GTV mit *EcoRI* ausgeschnitten und in den neuen, mit *EcoRI* linearisierten A4S-Vektor, subkloniert werden (Abb. 3.4). Da die neoR-Kassette jedoch auch eine *EcoRI*-Schnittstelle enthielt, musste ein partieller Verdau der 1247GTV-DNA mit *EcoRI* durchgeführt werden. Das interessierende Fragment von 4.2 kb wurde bereits nach 5 minütigem Verdau mit 1 U *EcoRI*/μg DNA erhalten und aus dem Agarosegel aufgereinigt. Nach Insertion in den linearisierten und 5'-dephosphorylierten A4S-Vektor wurden die erhaltenen Klone durch Kolonie-PCR (Primer 1247_5'_c und 1247_flank1_nc) und Sequenzanalysen auf das Vorliegen des richtigen Inserts in korrekter Orientierung überprüft. Es wurde das Plasmid 1247mGTVα#1 (Abb. 3.4 D) erhalten, das als neues gene-targeting-Konstrukt eingesetzt wurde.

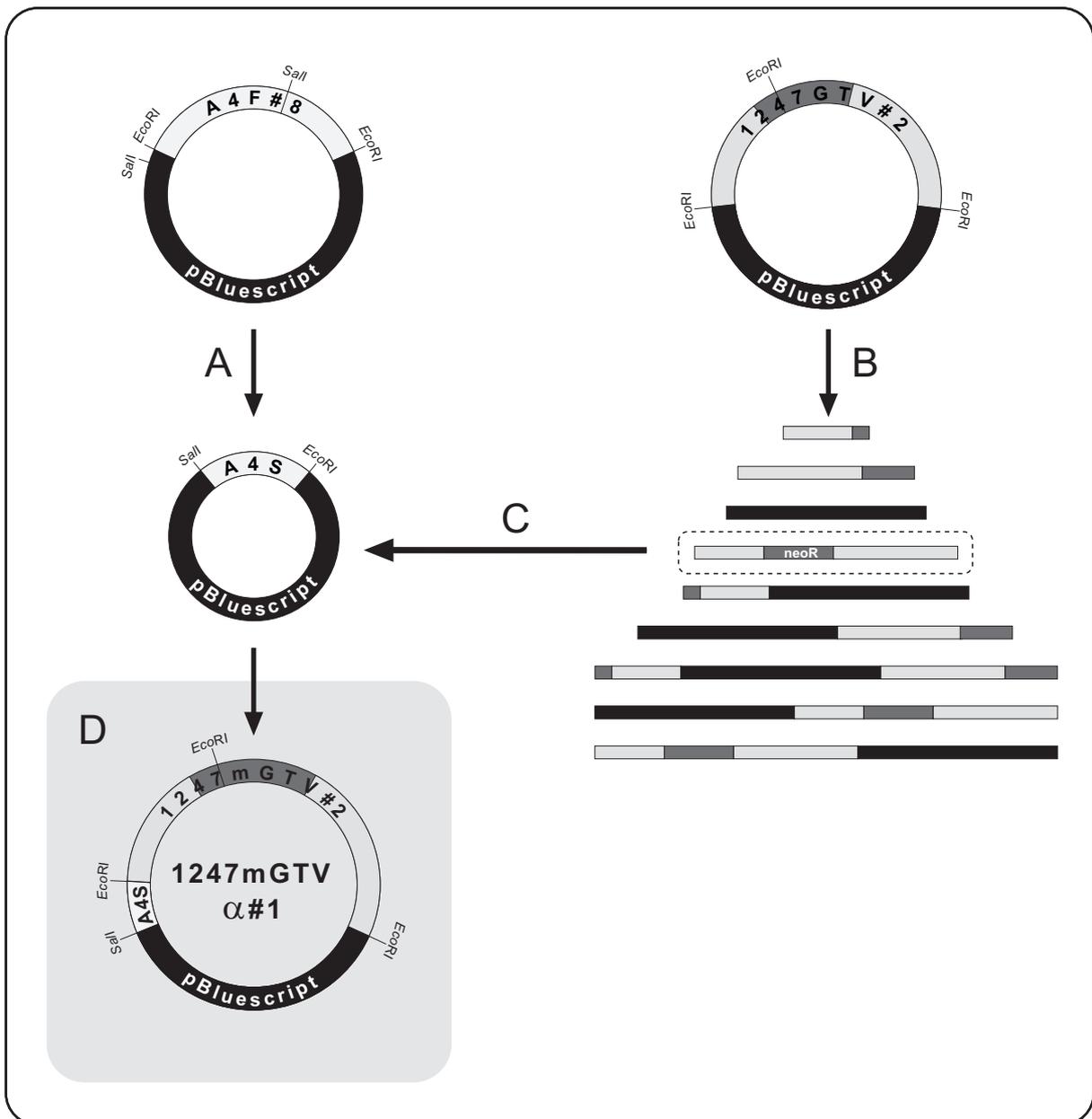


Abb. 3.4: **Erweiterung des 1247GTV auf der 5'-Seite.** Entfernung des *SalI*-Fragmentes aus pBluescript-A4F#8 und Religation (A), partieller Verdau von 1247GTV#2 mit *EcoRI* und Isolierung des 4,2-kb-Fragmentes (B), Insertion des 4,2-kb-Fragmentes in den mit *EcoRI* linearisierten A4S-Vektor (C). Das erhaltene Produkt (D) ist als gene-targeting-Konstrukt 1247mGTVα#1 eingesetzt worden.

3.1.5 Herstellung der Sonden für die Genotypisierung

Um eine homologe Rekombination der GT-DNA am gewünschten genomischen Locus nachzuweisen, muss eine Southernblot-Analyse durchgeführt werden. Hierzu werden DNA-Sonden für die benachbarte Region 5' bzw. 3' vom GT-Abschnitt sowie geeignete Restriktionsschnittstellen benötigt. Mit Hilfe zweier Primer (1247_flank1_c und 1247_flank1_nc) wurden die den GT-Bereich flankierenden Regionen auf dem Cosmid A4 sequenziert. Es stellte sich heraus, dass der GT-Bereich (aus Klon A42#1) auf der 3' Seite von

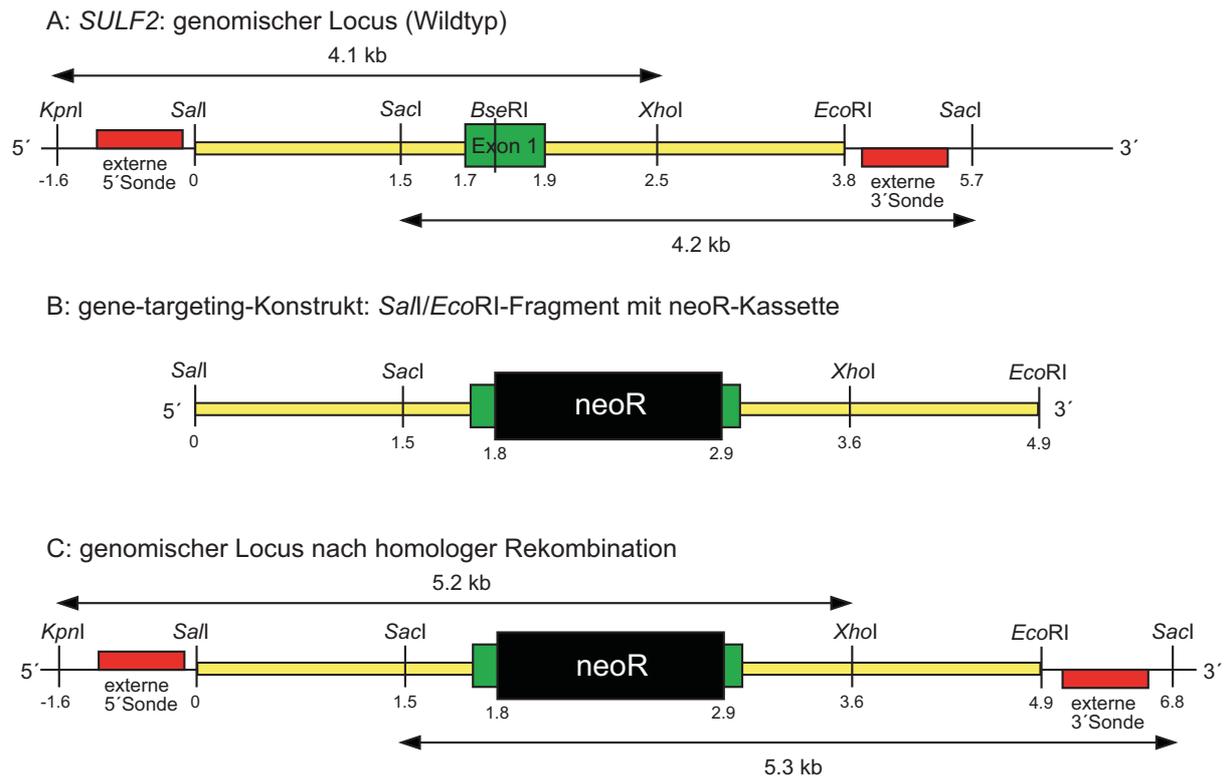


Abb. 3.5: **Homologe Rekombination am *SULF2*-Locus:** Schematische Darstellung des genomischen Locus vor (A) und nach (C) homologer Rekombination mit dem gene-targeting-Konstrukt (B)

dem in Klon A41#1 subclonierten *EcoRI*-Fragment des Cosmids A4 flankiert wird (Abb. 3.3). Dieses Fragment wurde vollständig sequenziert. Die Restriktionsanalyse lieferte *SacI* als ein geeignetes Enzym für die Genotypisierung mit jeweils einer Schnittstelle innerhalb und außerhalb (3') vom GT-Abschnitt (Abb. 3.5 A). Es wurde eine 495 bp lange externe 3'-Sonde („1247_3'“) durch eine PCR-Reaktion generiert. Dabei wurden die Primer 1247_3'_c (entspricht 1247_A41rein_c) und 1247_3'_-nc sowie die A41#1-DNA als Template eingesetzt. Der Southern-Blot nach Verdau der Wildtyp-DNA (Cosmid A4 bzw. genomische Maus-Schwanz DNA) mit *SacI* zeigt nach der Hybridisierung mit der Sonde 1247_3' ein Signal bei ca. 4.2 kb im Einklang mit der aufgrund der Sequenz vorhergesagten Größe (Abb. 3.5 A). Nach Insertion der *neoR*-Kassette vergrößert sich dieses *SacI*-Fragment auf ca. 5.3 kb (Abb. 3.5 C).

Ein 420 bp langes *EcoRI-HindIII*-Fragment der A4F#8-DNA wurde als eine zusätzliche externe 5' Sonde benutzt (Sonde 1247_New5'). Diese Sonde stammt also aus dem nicht für die GTV-Konstruktion verwendeten 1.2 kb Bereich der A4F#8-DNA (vgl. Abb. 3.4). Als Restriktionsenzyme für die Genotypisierung über diese 5'-Sonde wurden *XhoI/KpnI* ausgewählt, die jeweils einmal innerhalb (*XhoI*) und außerhalb (*KpnI*, 5') vom GT-Abschnitt schneiden (Abb. 3.5 A). Die Wahl der *KpnI*-Schnittstelle wurde aufgrund der computer-gestützten Restriktionsanalyse der kürzlich verfügbar gewordenen genomischen Sequenz der

Maus getroffen. Die erwarteten Fragmentgrößen zur Überprüfung der homologen Rekombination waren 4.1 kb (Wildtyp) und 5.2 kb (Mutante) (Abb. 3.5). Das Auftreten des 4.1-kb-Fragmentes wurde durch Southernblot-Analyse der mit *XhoI* und *KpnI* verdauten genomischen Wildtyp-DNA verifiziert.

Zur Überprüfung der einmaligen Integration des GT-Konstrukts ins Genom der ES-Zellen wurde außerdem eine neo-Sonde konstruiert. Zu diesem Zweck wurde ein ca. 660 bp langes *EcoRI-SphI*-Fragment der neoR-Kassette verwendet.

3.1.6 Transfektion und Screening der embryonalen Stammzellen

30 µg der DNA des Plasmids 1247mGTV α #1 wurden mit *NotI* in der MCS linearisiert, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Danach erfolgte die Elektroporation der MPI-2 ES-Zellen und deren Kultivierung auf Feederzellen in Gegenwart von G418 (s. Kapitel 2.2.9). Nach 7 Tagen wurden 100 Neomycin-resistente ES-Zellklone isoliert. Diese Klone wurden zum einen durch Einfrieren konserviert und zum anderen weiter kultiviert, so dass eine Präparation genomischer DNA für die Southernblot-Analytik durchgeführt werden konnte. Es wurden 30 Klone pro Southernblot nach *SacI*-Restriktionsverdau ihrer DNA getestet. Unter den ersten 30 wurde eine ES-Zelllinie mit erfolgreicher homologer Rekombination gefunden (Klon 1247ES#4). Dabei wurden nach der Hybridisierung mit der Sonde 1247_Sonde_3' (Abb. 3.5) die zwei zu erwartenden Signale (4.2 und 5.3 kb) beobachtet (Abb. 3.6 A). Die restlichen 70 Klone wurden nicht untersucht, jedoch wurde deren DNA für eventuelle weitere Genotypisierungen gesichert, für den Fall einer fehlenden Keimbahneteiligung des verwendeten Klons #4.

Durch eine weitere Southernblot-Untersuchung der mit *XhoI/KpnI* verdauten ES#4-DNA mit der 1247_New5' Sonde (Abb. 3.5) wurde die homologe Rekombination des Konstruktes bestätigt (Signale bei 4.1 und 5.2 kb, Abb. 3.6 B).

Es erfolgte eine zusätzliche Hybridisierung des *SacI*-Blots mit der neo-Sonde, um eine einmalige Aufnahme des GT-Konstruktes im Genom zu beweisen. Dabei wurde nur ein Signal, der Größe des mutierten Allels entsprechend, registriert und somit die singuläre Integration belegt (nicht gezeigt).

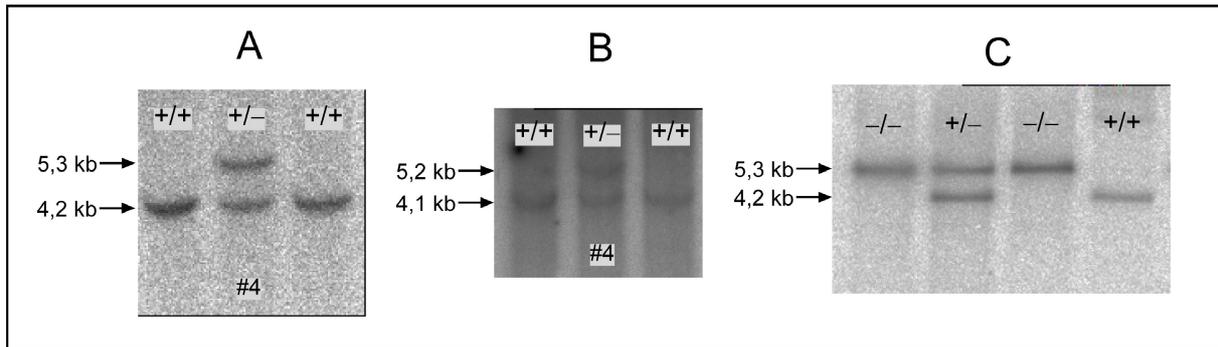


Abb. 3.6: Nachweis der homologen Rekombination am *SULF2*-Locus mittels Southernblot. In der ES-Zelllinie #4 unter Verwendung einer 3'-externen Sonde nach einem *SacI*-Verdau (A) und einer 5'-externen Sonde nach einem *XhoI/KpnI*-Verdau (B) sowie in hetero- (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen (F2-Generation) (3'-externe Sonde) (C). Die Lage der verwendeten Sonden sowie der Restriktionsschnittstellen ist in Abb. 3.5 beschrieben.

3.1.7 Erzeugung von Mäusen mit Keimbahneteiligung des mutierten *SULF2*-Allels

Die Mikroinjektion der ES-Zellen in Blastozysten wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt. Dort erfolgte die Injektion der revitalisierten ES-Zellen in die Blastozysten von C57BL/6J-Mäusen mit nachfolgendem Embryotransfer in die pseudoträchtigen Weibchen des Stammes B6/CBF_{1(agouti)}. Unter den Nachkommen waren 3 chimäre Männchen (40, 60 und 75% Chimärismus), deren Verpaarung mit den C57BL/6J-Weibchen heterozygote F1 Tiere lieferte. Die Genotypisierung der Mäuse nach der Präparation der Schwanz-DNA, dem Restriktionsverdau mit *SacI* und Hybridisierung mit der Sonde 1247_3' verlief analog der Genotypisierung der ES-Zelllinien (Abb. 3.6 C).

3.1.8 Phänotyp-Beschreibung *Sulf2*-defizienter Mäuse

Durch die Verpaarung der F1-Mäuse wurden lebende, für das Null-Allel homozygote F2-Nachkommen erhalten. Deren Anteil an der gesamten F2-Population entsprach im Einklang mit den Mendelschen Regeln genau 25%, jedoch wichen die Wildtyp- sowie Heterozygoten-Anteile von den erwarteten Zahlen deutlich ab (Tab. 3.2).

Zum Nachweis des Fehlens des *SULF2*-Transkriptes wurde eine Northernblot-Analyse der Gesamt-RNA aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) durchgeführt. Die MEFs wurden am Tag E12.5 gewonnen. Als cDNA-Sonde diente ein 1415 bp langes PCR-Produkt (Primer m1247_RTMc und m1247_E2_nc, Template: DNA des Klons m47His#9). In den

MEF^{SULF2^{-/-}} konnte keine *SULF2*-mRNA nachgewiesen werden, wohl aber in den Wildtyp-MEFs sowie in den MEFs aus den *Sulf1*-defizienten Tieren (Abb. 3.7 A). Als Kontrolle diente eine Hybridisierung des gleichen Blots mit einer *SULF1*-cDNA-Sonde (Abb. 3.7 B) sowie mit einer β -Aktin-Sonde (Abb. 3.7 C). Die starke Erniedrigung des *SULF2*-Mutanten-Transkripts lässt sich durch dessen Instabilität infolge der blockierten Translationsaktivität erklären.

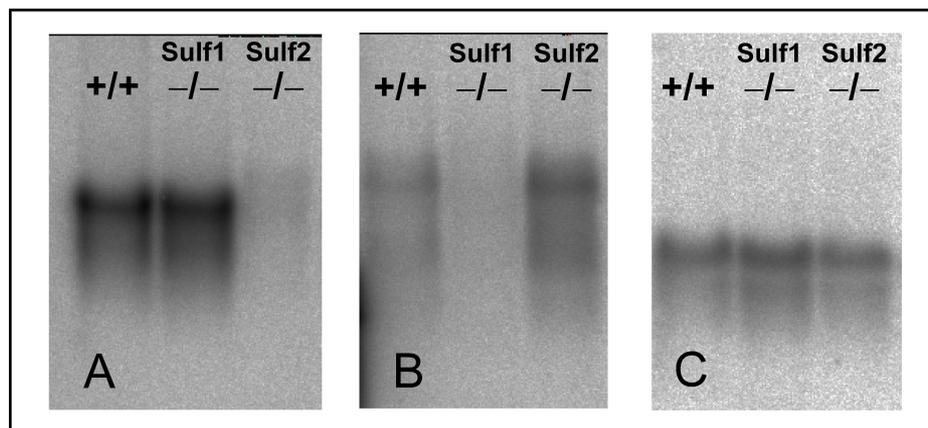


Abb. 3.7: **Northernblot-Analyse der Gesamt-RNA (10 µg) aus MEFs.** Nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten *SULF2*-cDNA-Sonde (s. Text) beobachtet man ein Signal (4 kb) bei den Wildtyp- sowie *Sulf1*-defizienten, nicht jedoch bei den *Sulf2*-defizienten MEFs (A). Eine Hybridisierung mit einer *SULF1*-cDNA-Sonde (das 2 kb lange RT-PCR-Produkt, s. 3.2.5) bietet ein reziprokes Bild (B). Man gewinnt den Eindruck, dass in *Sulf2*-defizienten MEFs eine größere Menge an *SULF1*-mRNA vorliegt, als in WT-MEFs (B), denn die Menge an Gesamt-RNA ist in jeder Spur vergleichbar (β -Aktin-Sonde, C).

Die *SULF2*^{-/-}-Tiere sind fertil, so dass durch ihre Verpaarung die F3- sowie im weiteren Verlauf die F4-Generation generiert werden konnte. Die Wurfgrößen in diesen Generationen waren leicht erniedrigt (Tab. 3.2). In diesen Generationen findet man ein Ungleichgewicht der Geschlechter - 48 (63.2%) Männchen gegenüber 28 (36.8%) Weibchen. Bei 8 Tieren konnte keine Geschlechtszuordnung getroffen werden. In der Kontrollgruppe (134 Tiere) findet man 55% Männchen sowie 45% Weibchen.

	Anzahl der Würfe	Zahl der Tiere	Mittlere Wurfgröße	Wildtyp (+/+)	Heterozygot (+/-)	Homozygot (-/-)
K	16	134	8.4	134	-	-
F1	4	33	8.25	17	16	-
F2	6	44	7.3	19 (43.2%)	14 (31.8%)	11 (25%)
F3, F4	11	84	7.6	-	-	84

Tab. 3.2: **Zucht der *Sulf2*-defizienten Mäuse.** Wurfgröße sowie Verteilung von Wildtyp, hetero- und homozygoten Mäusen in der F1, F2, F3 und F4-Generation. Die angegebenen Tierzahlen wurden zum Zeitpunkt des Absetzens (ca. 21 Tage) erhoben, wobei zuvor verstorbene Tiere genotypisiert und mitgezählt wurden. K: Kontrollmäuse, gezüchtet aus (+/+)-Tieren der F2-Generation.

Es zeigte sich im Verlauf, dass ca. 40% der *SULF2*^{-/-}-Mäuse im Alter zwischen 1 und 6 Wochen versterben. Diese Tiere sind dystroph, ihr Gewicht beträgt zu diesem Zeitpunkt weniger als die Hälfte des Gewichtes ihrer Geschwister. Bei über 75% dieser Tiere konnte schon äußerlich ein ausgeprägter Hydrozephalus beobachtet werden.

In Kooperation mit Frau Prof. R. Lüllmann-Rauch (Abteilung Anatomie, Universität Kiel) und Prof. C. Viebahn (Abteilung Anatomie, Universität Göttingen) wurden makroanatomische und histologische Untersuchungen des ZNS von auffälligen *SULF2*^{-/-}-Tieren durchgeführt. Dabei wurden multiple Hirn-Anomalien festgestellt. Im einzelnen konnten erweiterte innere Liquorräume, schwere Großhirnrinden-Atrophie, Hypo- bzw. Aplasie von Fasern des *Corpus callosum* sowie irreguläre Auflockerungen der Zellverbände in der ventrikulären Zone im rostralen Anteil des telencephalen Hirnbläschen beobachtet werden. Weiterhin findet sich eine Schnürfurche im Bereich des Hirnstamms oder des Kleinhirns als Ausdruck von Verdrängung dieser Hirnanteile nach kaudal durch das *Foramen magnum*. Bei einigen Tieren konnte eine Linsentrübung beobachtet werden. Andere wesentliche Organsysteme waren unauffällig.

3.2 Generierung von Sulf1-defizienten Mäusen

3.2.1 Die murine *SULF1*-cDNA

Analog dem unter 3.1.1 beschriebenen Verfahren und unter Verwendung der humanen *SULF1*-cDNA-Sequenz wurden zwei murine EST-Klone identifiziert und vom RZPD bezogen (Tab. 3.3).

Klon	Nr.	Vektor	Insert	Restr. Sites	Primer	RZPD ID	GI
1077-E1	1,2	pCMVSPORT6	ca. 2 kb	<i>NotI</i> , <i>SalI</i>	M13R-3, M13F	IMAGp998N146603Q2	6756970
1077-E2	-	pT7T3D-Pac	-	<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>	T3, T7	IMAGp998K012813Q2	4601390

Tab 3.3: **Die verwendeten Sulf1-EST-Klone.** Angegeben sind die Plasmidvektoren, die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, die für die Sequenzierung eingesetzten Vektorprimer sowie die Identifikationsnummern der Klone.

Die Klone wurden durch Restriktionskartierung und durch Sequenzanalysen charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass der Klon 1077-E2 keine Homologie zur humanen *SULF1*-cDNA zeigte und nicht weiter verwendet werden konnte. Durch den Klon 1077-E1 wurden die letzten 0.7 kb der kodierenden Sequenz sowie ein großer Teil der 3' untranslatierten Region abgedeckt. Damit stand uns wenig Information zur murinen cDNA zu Verfügung. Die vollständige *SULF1*-cDNA-Sequenz der Maus wurde im Rahmen eines Laborpraktikums von Ersin Karatayli in unserer Arbeitsgruppe durch Sequenzierung eines 2.1 kb großen RT-PCR Produktes ermittelt, das den kompletten 5'-Bereich der cDNA bis zur Nahtstelle mit der 1077E1-Sequenz erfasste. Die 2613 bp lange Sequenz der *SULF1*-cDNA und das daraus abgeleitete, 870 AS umfassende Protein, finden sich im Anhang (6.2 bzw. 6.5)

3.2.2 Identifizierung genomischer Cosmid-Klone

Ein separates Screening der murinen Cosmid-Bibliothek musste nicht durchgeführt werden, da bei der Suche nach dem Sulf2-Cosmid wegen der hohen Homologie zwischen beiden Sulfatasen im Bereich der Hybridisierung der verwendeten Sonde (Abb. 3.2) schon ein Sulf1-Cosmid identifiziert werden konnte (s. 3.1.2).

Dieses Sulf1-Cosmid B4 (RZPD_ID MPMGc121J17350Q2) enthielt ein ca. 7.7 kb großes *EcoRI*-Fragment, das bei der Hybridisierung mit der *SULF2*-cDNA-Sonde ein positives Signal ergab. Das Fragment wurde in pBluescriptII subkloniert (Klon B41#1) und einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurde eine Sequenz von 240 bp Länge aufgedeckt, die für

das FGly-determinierende Motiv codierte und eine höhere Homologie zur humanen *SULF1*-cDNA (89% Identität) als zur humanen *SULF2*-cDNA (80% Identität) zeigte. Diese Sequenz war ferner nicht mit der entsprechenden Sequenz der murinen *SULF2*-cDNA identisch, so dass es sich dabei mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Exon des murinen *SULF1*-Gens handeln musste. Diese Annahme wurde durch fast komplette Sequenzierung des Plasmids 1077B4#1 (mit Ausnahme des Bereichs zwischen 4.3 und 6.1 kb) und später durch einen Vergleich mit der genomischen Sequenz in der Mausdatenbank bestätigt.

In den 7.7 kb dieses Plasmids fand sich das 240 bp umfassende Exon 2 des *SULF1*-Gens, flankiert von 1.25 kb des Intron 1 und 5.5 kb des Intron 2 (s. 6.10). Es wurden keine weiteren Exone gefunden. Der nicht sequenzierte Bereich enthielt ebenfalls nur einen Abschnitt des Introns 2, wie der Vergleich mit der Mausdatenbank zeigte. Um Sequenzinformationen auf der 5'-Seite des Fragments B41 zu erhalten, wurden ca. 0.7 kb des Cosmids B4 mit den Primern m1077_B41_flank1_nc und m1077_B41_flank2_nc sequenziert.

3.2.3 Konstruktion des *Sulf1* gene-targeting-Vektors und Generierung externer Sonden

Die Restriktionsanalyse der 1077B41#1-Sequenz sowie der ca. 0.7 kb langen, das *EcoRI*-Fragment B41 auf der 5' flankierenden Sequenz des Cosmid B4 mit Hilfe des GCG Softwarepakets, lieferte alle notwendigen Schnittstellen für die Konstruktion des GTV und für die zukünftige Genotypisierung.

Nach einem Restriktionsverdau der Cosmid B4-DNA mit *HindIII* wurde ein 3.1 kb großes Fragment in den pBluescriptII SK+ Plasmidvektor subkloniert (Klon 1077 B4H#1). Dieses Fragment enthielt das beschriebene Exon 2 genau in der Mitte (Abb. 3.8 A). Im Exon wurde eine *BsaAI*-Schnittstelle identifiziert, die für die Insertion der neoR-Kassette verwendet werden sollte. Da der Plasmidvektor auch eine *BsaAI*-Schnittstelle aufweist, musste auch hier ein partieller Restriktionsverdau erfolgen. Bei Verwendung von 0.1 U *BsaAI* pro µg DNA war bereits nach 10 min Inkubation die gesuchte Bande des linearisierten Plasmids im Agarosegel nachweisbar. Die gesuchte Bande wurde aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Die Insertion der neoR-Kassette konnte direkt erfolgen, denn *BsaAI* hinterlässt glatte Enden. Nach Ligation und Transformation wurden die positiven Klone, die neoR im Exon und nicht im Vektor enthielten, mittels Kolonie-PCR (Primer 1077_control1_c und 1077_neocon_nc) identifiziert. 50% der Klone waren erwartungsgemäß positiv. Durch Sequenzierung wurde die korrekte Konstruktion überprüft und die Orientierung der Kassette festgestellt. Für die spätere

Genotypisierung war eine „rückwärtige“ Orientierung (gegenläufig zur *SULF1*-Orientierung) sinnvoll, da hierfür die *StuI*-Schnittstelle der Kasette benutzt werden sollte und die Orientierung der Kasette für die entstehenden Fragmentgrößen nach einem *StuI*-Restriktionsverdau relevant war (Abb. 3.8 B und C). Der Klon 1077GTV#2 zeigte die notwendige Orientierung und wurde als gene-targeting-Konstrukt benutzt (Abb. 3.8 B).

Für die Herstellung externer 5'- und 3'-Sonden wurden zwei PCR-Produkte unter Verwendung der Cosmid B4-DNA als Template amplifiziert (Primerpaare: 1077Sonde5'c und 1077Sonde5'_nc sowie 1077Sonde3'c und 1077Sonde3'_nc). Die Sonden umfassten 486 bzw. 443 bp. Ihre Lage abwärts einer 5'-gelegenen *StuI* bzw. aufwärts einer 3'-gelegenen *BamHI*-Schnittstelle zeigt Abb. 3.8 A. Für die Verifizierung der homologen Rekombination auf der 5' Seite wurde *StuI* verwendet. Wegen der Kassetten-internen *StuI*-Schnittstelle sollte sich das mit der 5'-Sonde hybridisierende Fragment von 3.6 kb im Wildtyp- auf 3 kb beim mutierten Locus verkleinern (Abb. 3.8 A bzw. C). Auf der 3' Seite sollte nach einem *BamHI*-Verdau eine Vergrößerung des mit der 3'-Sonde hybridisierenden Fragments von 2.8 im Wildtyp- auf 3.9 kb im mutierten Locus zu beobachtet sein (Abb. 3.8 A bzw. C).

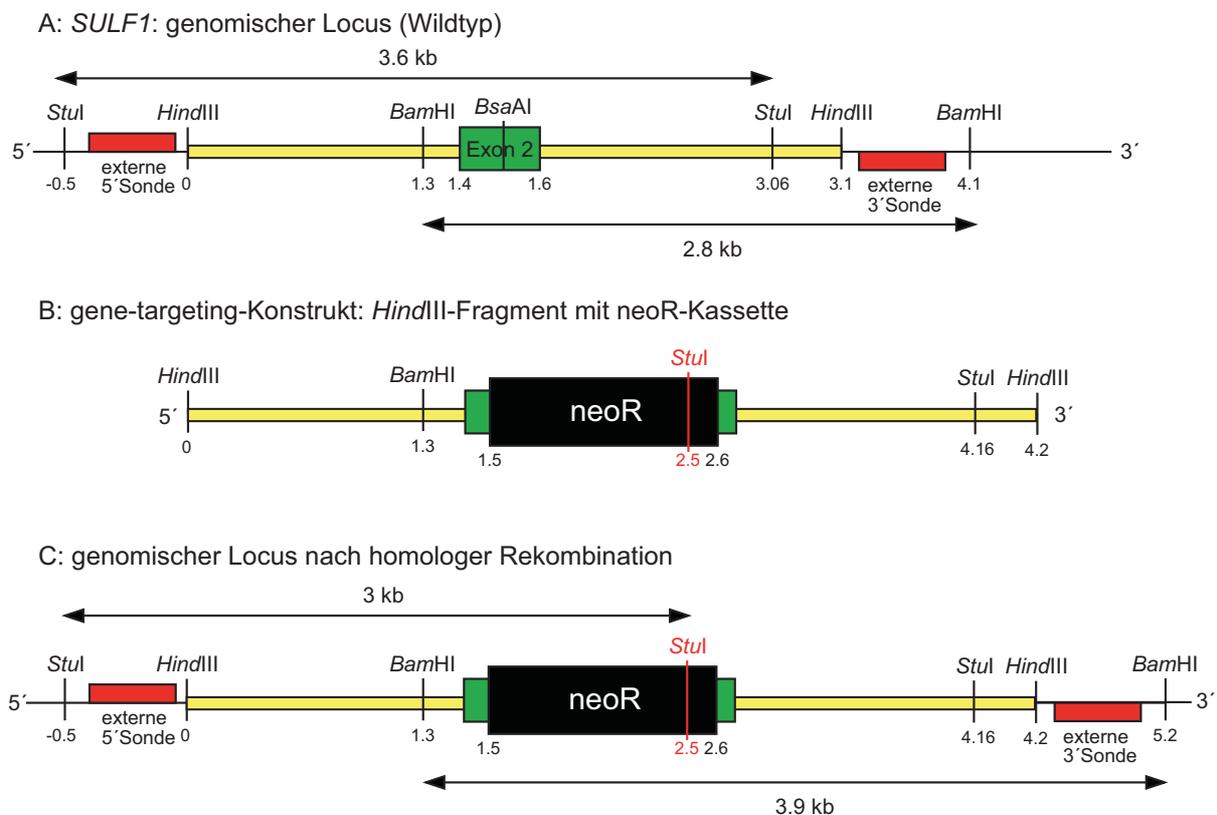


Abb. 3.8: **Homologe Rekombination am *SULF1*-Locus.** Schematische Darstellung des genomischen Locus vor (A) und nach (C) homologer Rekombination mit dem gene-targeting-Konstrukt (B).

3.2.4 Gewinnung von ES-Zellen mit einem *SULF1*-Null-Allel und Generierung *Sulf1*-defizienter Mäuse

Diese Experimente wurden analog zu dem unter 3.1.6 und 3.1.7 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Beim Screening der ersten 30 ES-Zelllinien wurde eine positive Linie mit korrekter homologer Rekombination gefunden (Klon 1077 ES#7). Ein weiterer positiver ES-Zellklon (1077 ES#36) wurde unter nächsten 30 untersuchten Zelllinien mittels einer PCR-Reaktion identifiziert (Primer 1077_Sonde5'_c und neoD2; amplifiziertes Produkt von ca. 2 kb). Die homologe Rekombination wurde mittels Southernblot unter Verwendung der 5'- und 3'-externen Sonden verifiziert (Abb. 3.9 A, B für 1077 ES#7), was zu den erwarteten Signalen führte (vgl. Abb. 3.8). Die singuläre Integration des gene-targeting-Konstruktes ins Genom wurde mit einer neo-Sonde bestätigt, die nur ein Signal auf Höhe des mutierten *SULF1*-Allel-Fragmentes ergab (nicht gezeigt).

Nach der Blastozysten-Injektion des Klons 1077 ES#7 und Verpaarung von vier männlichen Chimären (10, 70, 95 und 95 % Chimärismus) wurden heterozygote Tiere der F1 Generation mit Keimbahnbeitragsung des Null-Alleles erzeugt.

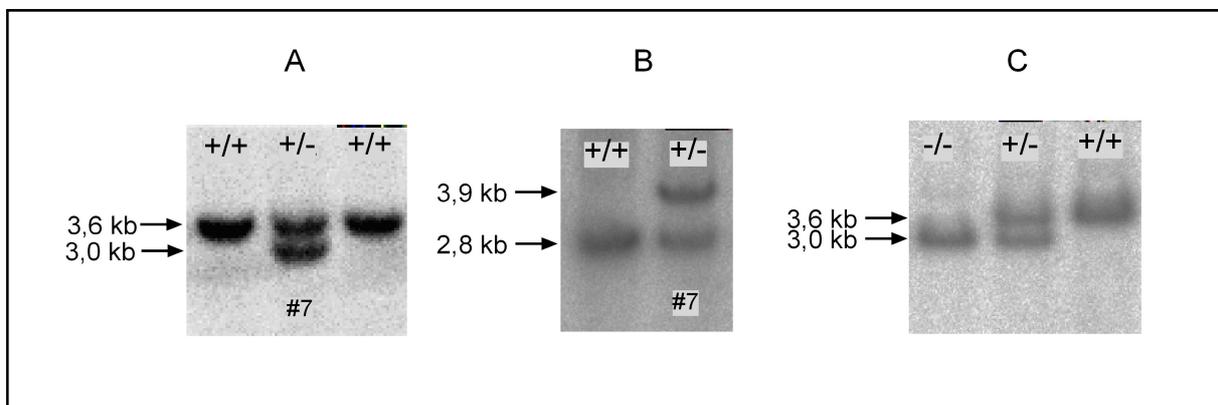


Abb. 3.9: Nachweis der homologen Rekombination am *SULF1*-Locus mittels Southernblot. In der ES-Zelllinie #7 unter Verwendung einer 5'-externen Sonde nach einem *StuI*-Verdau (A) und einer 3'-externen Sonde nach einem *Bam*HI-Verdau (B) sowie in hetero- (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen (F2-Generation) (C). Die Lage der verwendeten Sonden sowie der Restriktionsschnittstellen ist in Abb. 3.8 beschrieben.

3.2.5 Phänotyp-Beschreibung der *Sulf1*-defizienten Mäuse

Durch Verpaarung heterozygoter Tiere der F1 Generation wurden in der F2 Generation homozygot *Sulf1*-defiziente Mäuse erzeugt (Abb. 3.9 C). Das Fehlen der *SULF1*-mRNA wurde durch Northernblot-Analyse der Gesamt-RNA aus den von KO-Tieren stammenden embryonalen Fibroblasten (MEF^{*SULF1*^{-/-}}) mit drei verschiedenen *SULF1*-cDNA-Sonden

belegt. Als Sonden dienten ein 826 bp langes PCR-Produkt (Primer: m1077_Ec1 und m1077_Enc2, Template: 1077E1#1-DNA), das 2.3 kb lange Insert des Klons 1077E1#1 sowie ein 2 kb langes RT-PCR-Produkt (Primer: m1077_RTc und m1077_RTnc) (Abb. 3.10, vgl. auch Abb. 3.7 B). Durch diese Sonden wurde der codierende Bereich der *SULF1*-cDNA samt 3'-UTR nahezu vollständig abgedeckt.

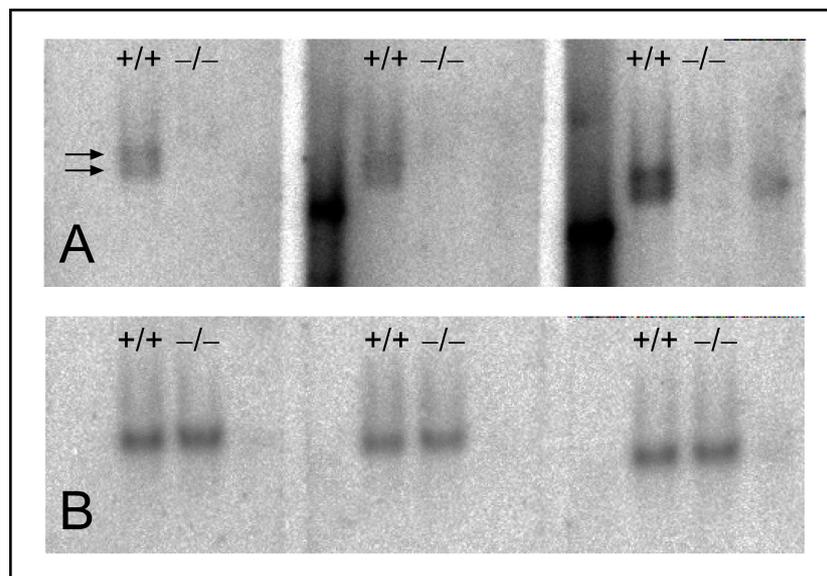


Abb. 3.10: **Nachweis des *SULF1*-Transkriptes in MEFs mittels Northernblot-Analyse.** A: Auf den drei dargestellten Blots, die mit drei verschiedenen *SULF1*-Sonden hybridisiert wurden (s. Text), beobachtet man jeweils zwei Signale (ca. 4.2 und 6 kb) bei der Wildtyp-RNA (+/+). Dies ist wahrscheinlich auf das Vorhandensein von 2 alternativen Spleißprodukten zurückzuführen. Die Signale fehlen bei den *Sulf1*-defizienten Fibroblasten (-/-). B: Eine Kontroll-Hybridisierung mit einer *SULF2*-cDNA-Sonde (vgl. 3.1.8) bzw. einer β -Aktin-Sonde (nicht gezeigt) bietet Signale ähnlicher Intensität sowohl bei der WT- als auch bei der Mutanten-RNA.

Die homozygot *Sulf1*-defizienten Mäuse weisen keinen äußerlich auffälligen Phänotyp auf und sind fertil. Es fällt jedoch eine von den Mendelschen Regeln abweichende Verteilung der Allele in der F2-Generation auf, wobei das mutierte Allel deutlich unterrepräsentiert ist (Tab 3.4). Auch die um ca. 20% verminderte Wurfgröße in den F2-, F3- und F4-Generationen deutet auf eine erhöhte embryonale Letalität von Tieren mit mutiertem *SULF1*-Allel hin (Tab 3.4). Die Anteile der Weibchen (46%) und Männchen (54%) in diesen Generationen entsprechen den Anteilen in der Kontrollgruppe.

Von den bislang 154 Mäusen der F3 bzw. F4-Generation starben 20 Tiere im Alter von 2 bis 5 Tagen, bei den Kontrollen starben in dieser Altersgruppe 7 von 127 Tieren. Es liegt demnach eine erhöhte Sterblichkeit der Mutanten vor (Odds ratio von 0.37 ($p < 0.05$), Fischers exakter Test für Vierfeldertafeln). Eine vermehrte Sterblichkeit auf anderen Altersstufen der mittlerweile über 240 Tage alten Mäuse konnte nicht beobachtet werden.

	Anzahl der Würfe	Zahl der Tiere	Mittlere Wurfgröße	Wildtyp (+/+)	Heterozygot (+/-)	Homozygot (-/-)
K	16	134	8.4	134	-	-
F1	9	42	4.7	33	9	-
F2	8	55	6.9	24 (43.6%)	24 (43.6%)	7 (12.7%)
F3, F4	23	154	6.7	-	-	154

Tab. 3.4: **Zucht der Sulfl-defizienten Mäuse.** Wurfgröße sowie Verteilung von Wildtyp, hetero- und homozygoten Mäusen in der F1, F2, F3 und F4-Generation.

Durch Analyse der Gewichtsentwicklung der Weibchen (Abb. 3.11) mittels eines gemischten ANOVA-Modells konnte festgestellt werden, dass die $SULFI^{-/-}$ -Tiere, über den gesamten Zeitraum gemittelt, 1.4 Gramm schwerer als die Kontrollen werden ($p < 0.01$). Betrachtet man Tiere, die Älter als 50 Tage sind, also nach Abschluss der Wachstumsphase (Hogan *et al.* 1994), so beträgt der Gewichtsunterschied 1.8 Gramm ($p < 0.001$). Während der Wachstumsphase besteht kein Gewichtsunterschied (Abb. 3.11).

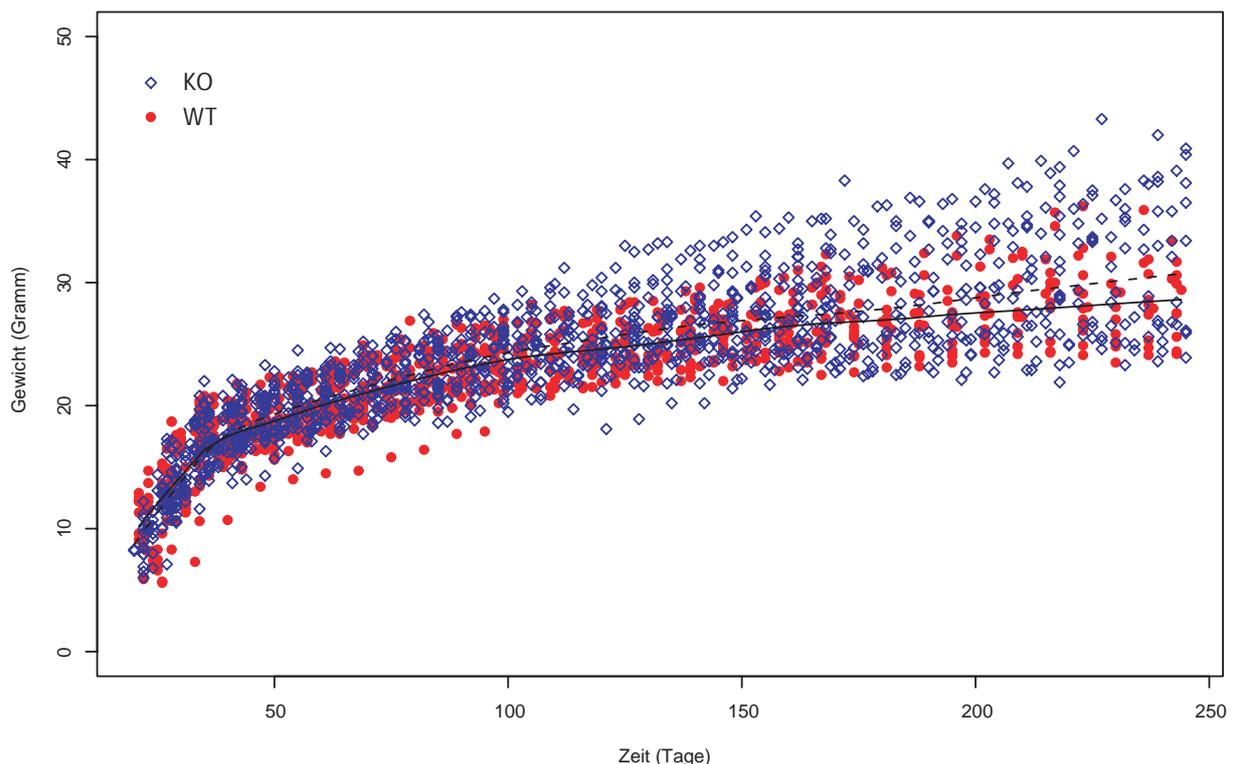


Abb. 3.11 **Scatterplot der Gewichtsentwicklung der $SULFI^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäuse.** Abszisse: Lebensalter (d), Ordinate: Gewicht (g). Nicht lineare (lowess) Regression der Gewichtsentwicklung bei WT- (durchgezogene Linie) und knock-out-Mäusen (gestrichelte Linie).

3.3 Generierung von Arylsulfatase-G-defizienten Mäusen

3.3.1 Die murine Arylsulfatase-G-cDNA

Zwei Maus-EST-Klone mit cDNA-Fragmenten der Arylsulfatase G (ASG) wurden vom RZPD bezogen (Tab. 3.5).

Klon	Nr.	Vektor	Insert	Restr. Sites	Primer	RZPD ID	GI
1001-M1	1,2	pCMVSPORT6	ca. 2 kb	<i>NotI</i> , <i>SalI</i>	M13R-3, M13F	IMAGp998M088741Q2	9320632
1001-M2	1,2	pME18S-FL3	ca. 1.5 kb	<i>DraIII</i>	pME3', pME5'	IMAGp998J154622Q2	3987944

Tab 3.5: **Die verwendeten ASG-EST-Klone.** Angegeben sind die Plasmidvektoren, die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen, die für die Sequenzierung eingesetzten Vektorprimer sowie die Identifikationsnummern der Klone.

Die Klone wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Durch den Klon 1001-M1 wurde fast die komplette kodierende Sequenz der cDNA mit einem Teil der 3'-untranslatierten Region erfasst, lediglich die ersten 280 bp nach dem Startcodon fehlten. Der Klon 1001-M2 beinhaltete einen etwas größeren Abschnitt der 3'-UTR, jedoch weniger von der kodierenden Sequenz und brachte keine zusätzlichen Informationen. Die vollständige Sequenz der cDNA der murinen *ASG* (1689 bp) sowie des hieraus abgeleiteten Proteins (562 AS) ist im Anhang zu finden (6.3 bzw. 6.6).

3.3.2 Screening der genomischen Cosmid-Bibliothek

Die 712 bp lange Sonde 1001M (Nukleotide 403 bis 1114 der *ASG*-cDNA) wurde durch eine PCR-Reaktion mit 1001-M1#2 DNA als Template sowie mit den Primern m1001_Ac und 1001M2_147nc generiert. Nach der Hybridisierung der Cosmid-Filter (vgl. 3.1.2) wurden 12 positive genomische Klone identifiziert und beim RZPD bestellt. Die Southernblot-Analyse der mit *EcoRI* verdauten Cosmid-DNA zeigte nur bei drei der zwölf Cosmid-Klone ein positives Ergebnis. Bei dem Cosmid C1 (RZPD_ID MPMGc121G07655Q2) wurde bei mehreren Restriktionsfragmenten ein Signal beobachtet. Alle Fragmente wurden subkloniert und einer Sequenzanalyse unterzogen. Durch gezielte Sequenzierung der Fragmente mit dem Exon-Primer 1001_Ac wurde in dem Klon 1001C12#1 das Exon 2-enthaltende *EcoRI*-Fragment der ASG entdeckt. Das Exon 2 (Nukleotide 330 bis 517) kodiert für das konservierte FGly-Motiv der ASG.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass das Cosmid C1 viele repetitive Sequenzen enthält.

Ferner waren einige der *EcoRI*-Restriktionsfragmente zwar als eine Bande im Agarosegel zu sehen, stellten aber mehrere unterschiedliche Fragmente gleicher Länge dar. Diese Tatsachen erschwerten die Sequenzanalyse und Charakterisierung des Cosmids C1 erheblich.

3.3.3 Generierung des ASG gene-targeting-Konstruktes

Der Klon 1001C12#1 enthielt ein ca. 3.8 kb großes *EcoRI*-Fragment mit dem 188 bp langen Exon 2 der murinen ASG (Abb. 3.12 A). Auf der 3'-Seite vom Exon waren ca. 2 kb des Intron 2 vorhanden, auf der 5'-Seite ca. 1.6 kb des Intron 1, wobei hier eine repetitive Sequenz von ca. 350 bp nicht vollständig sequenziert werden konnte.

Für die Insertion der neoR-Kassette in die 1001C12-DNA wurde in das Exon nach der Methode der gerichteten Mutagenese (Quikchange™, Stratagene) eine *StuI*-Schnittstelle eingeführt. Dazu wurden 31 Basen lange komplementäre Mutageneseprimer (m01_ *StuI*_c und m01_ *StuI*_nc) verwendet. Nach der Mutagenese-PCR-Reaktion unter Verwendung der Turbo-*Pfu*-Polymerase (Stratagene) wurde das Produkt einer Restriktionsanalyse mit *EcoRI* und *StuI* unterzogen. Dabei stellte es sich heraus, dass die Mutagenese zwar erfolgreich war, jedoch ein Teil des Introns 1 fehlte. Wahrscheinlich führte die ca. 0.9 kb vor dem Exon gelegene repetitive Sequenz zu einer fehlerhaften Synthese durch die *Pfu*-Polymerase.

Daraufhin wurde das mutagenisierte Exon zusammen mit dem Intron 2 in das ursprüngliche Plasmid 1001C12#1 mit intaktem Intron 1 zurückkloniert. Hierzu diente eine 150 bp vor dem Exon gelegene *XmaI*-Schnittstelle, die außerdem in der MCS des Vektors auf der 3'-Seite des Inserts vorhanden war. Das 2.4 kb große *XmaI*-Fragment der ursprünglichen C12-DNA wurde durch das entsprechende Fragment der mutagenisierten C12_ *StuI*-DNA ersetzt. Nach Transformation wurden Klone mit der korrekten Orientierung des Inserts durch eine Kolonie-PCR identifiziert (Primer 01C12_ raus2_c und M13-R). Die Korrektheit der Klone 1001C12+ *StuI*#1 und #5 wurde durch Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung bestätigt. Die neoR-Kassette wurde mit der mit *StuI* linearisierten 1001C12+ *StuI*#1-Plasmid-DNA ligiert. Auch in diesem Fall war die Orientierung der Kassette wichtig für die nachfolgende Genotypisierung, denn es sollte eine Kassetten-interne *SphI*-Schnittstelle benutzt werden (Abb. 3.12). Die Klone mit der in kodierender Richtung eingesetzten Kassette wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert (Primer 01_ neocon_c und AK-30). Die DNA der Klone 1001GTV-neo_c#8 und #9 wurde einer Sequenzanalyse unterzogen, wodurch die korrekte Insertion der neoR-Kassette validiert wurde. Das erhaltene GT-Konstrukt ist schematisch in Abb. 3.12 B dargestellt.

3.3.4 Herstellung einer externen Sonde für die Genotypisierung

Bei den Sulf1- und Sulf2-knock-outs wurden 5'- und 3'-externe und eine interne Sonden für die Genotypisierung der ES-Zelllinien benutzt. Es ist jedoch im Allgemeinen nicht erforderlich, zwei externe Sonden zu verwenden. Eine Analyse der 5'- oder der 3'-Region sowie die Bestätigung einer einmaligen Integration durch Verwendung einer internen Sonde ist ausreichend für den Nachweis einer homologen Rekombination. Es lag uns keine verwertbare Sequenzinformation von der 3'-benachbarter Region des GT-Abschnittes vor. Deswegen wurde bei der Genotypisierung auf eine 3' Sonde verzichtet.

Durch eine Sequenzanalyse der Cosmid C1-DNA 5' vom GT-Abschnitt wurden eine geeignete *SphI*-Schnittstelle sowie Primer für die Sondenherstellung gefunden. Eine 355 bp lange Sonde 1001 5' wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer 1001Sonde5'_c und 1001Sonde5'_nc sowie der Cosmid C1#1-DNA als Template hergestellt. Nach einem *SphI*-Verdau hybridisierte die Sonde mit einem 2.5 kb Fragment im Falle des Wildtyp-Allels (Abb. 3.12 A). Beim mutierten Locus wurde durch die neoR-Kassette eine *SphI*-Schnittstelle eingeführt. Das entsprechende Fragment vergrößert sich somit auf 3 kb (Abb. 3.12 C).

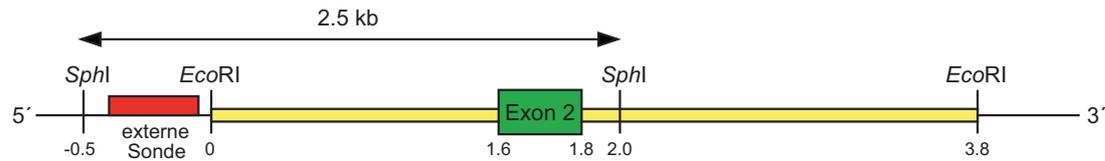
3.3.5 Gewinnung von ES-Zellen mit einem ASG-Null-Allel und Generierung ASG-defizienter Mäuse

Nach Transfektion und Genotypisierung selektionierter ES-Zell-Klone wurden zwei positive ES-Zelllinien mit dem ASG-Null-Allel identifiziert, 1001ES#3 (nicht gezeigt) und 1001ES#70 (Abb. 3.13 A). Der Klon 1001 ES#70 zeigte ein, der Klon 1001ES#3 jedoch zwei Signale bei der Hybridisierung mit der internen neo-Sonde, so dass in letzterem Fall eine mehrfache Integration des Konstruktes ins Genom nicht ausgeschlossen werden kann (Abb. 3.13 B). Nach Mikroinjektion des ES-Zellklons #70 in Blastozysten und deren Transfer in pseudoträchtige Weibchen wurden zwei männliche Chimären erhalten (30 bzw. 45% Chimarismus). Die erste männliche Chimäre lieferte einen Wurf mit einem Agouti-farbenen Nachkommen, der homozygot für den ASG-Wildtyplocus war. Die Chimäre verstarb. Die zweite Chimäre lieferte bislang zwei Würfe, die beide kurz nach der Geburt von der Mutter aufgefressen wurden. Auch die zweite Chimäre konnte nach einer Penis-Entzündung nicht weiter zur Verpaarung eingesetzt werden.

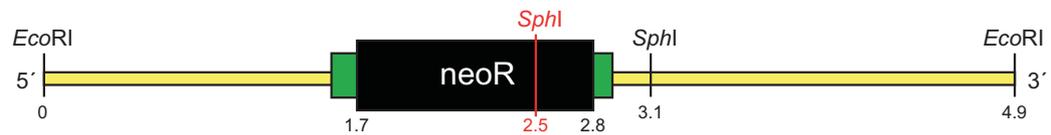
Es wurde eine erneute Blastozysteninjektion durchgeführt. Dabei wurden beide ES-Zell-Klone (1001ES#3 und 1001ES#70) verwendet, und in beiden Fällen konnten Chimären

erhalten werden. Nach Verpaarung der Chimären mit den C57BL/6-Weibchen wurden heterozygote F1-Tiere erhalten, durch Verpaarung dieser wurden für das *ASG*-Null-Allel homozygote F2-Mäuse generiert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden beide Mauslinien weitergezüchtet. Sobald eine knock-out-Tierlinie vom ES-Klon #70 etabliert sein wird, wird man sich auf diese konzentrieren.

A: *ASG*: genomischer Locus (Wildtyp)



B: gene-targeting-Konstrukt: *EcoRI*-Fragment mit *neoR*-Kassette



C: genomischer Locus nach homologer Rekombination

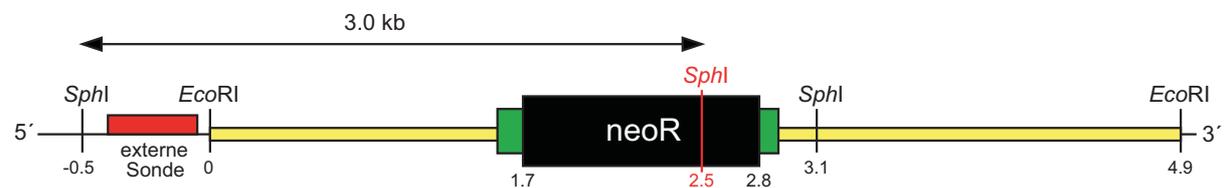


Abb. 3.12: **Homologe Rekombination am *ASG*-Locus.** Schematische Darstellung des genomischen Locus vor (A) und nach (C) homologer Rekombination mit dem gene-targeting-Konstrukt (B).

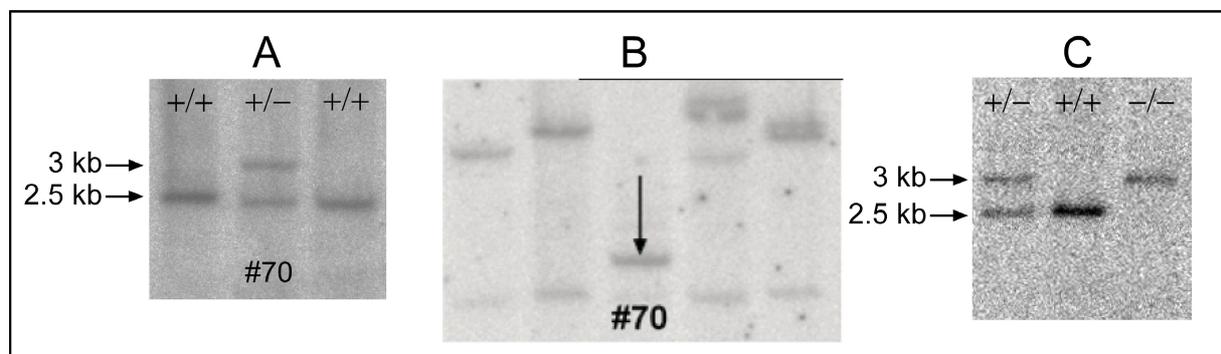


Abb. 3.13: **Nachweis der homologen Rekombination am *ASG*-Locus mittels Southernblot.** Unter Verwendung der externen 5'-Sonde nach einem *SphI*-Verdau in der ES-Zelllinie #70 (A) sowie in heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen der F2-Generation (C). Nachweis der singulären Integration des gene-targeting-Konstruktes in das Genom des ES-Zell-Klons #70 mittels interner *neo*-Sonde (B). Die Lage der verwendeten Sonde sowie der *SphI*-Schittstellen ist in Abb. 3.12 dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Wahl und Durchführung der gene-targeting-Strategien

Die gezielte Manipulation des Genoms von pluripotenten embryonalen Stammzellen, sei es zum Zwecke des Ausschaltens eines Gens (knock-out) oder des Einbringens von neuem genetischen Material, ist eine etablierte Methode und aus der heutigen Forschung (funktionelle Genomik) nicht mehr wegzudenken.

Die ES-Zellen, zum ersten mal von Evans und Kaufman (1981) sowie von Martin (1981) isoliert, besitzen die Eigenschaft, nach Einbringen in einen im frühen Stadium befindlichen Embryo sich an der Entwicklung sämtlicher Gewebe und Organsysteme zu beteiligen (Bradley *et al.* 1984). Die Veränderungen im Genom der ES-Zellen können bei Keimbahneteiligung auf die Nachkommen übertragen werden. Durch gezielte Verpaarungen können schließlich homozygote Tiere erhalten werden.

Wie führt man nun diese gezielte Genom-Manipulation durch? Eine mögliche Antwort heißt „gene targeting“. Dabei wird mittels homologer Rekombination der interessierende Locus durch einen modifizierten Genabschnitt ersetzt (Thomas und Capecchi 1987). Die Häufigkeit der homologen Rekombination ist in Säugerzellen, im Gegensatz zu beispielsweise Hefen sehr gering, so dass es im Anschluß einer positiven Selektion bedarf. Diese wird durch das Einbringen eines Selektionsmarkers, beispielsweise eines Aminoglykosid-Resistenzgens, in den modifizierten Locus mit nachfolgender Kultivierung im Aminoglykosid-haltigen (meist wird das Antibiotikum G418 verwendet) Selektionsmedium erreicht. Der Selektionsmarker wird bei dieser Methode in ein Exon des Zielgens eingesetzt und führt so zu einem Translationsabbruch – das Gen wird ausgeschaltet (Abb. 4.1 B).

Diese Technik, als klassischer oder konventioneller knock-out bekannt, beherbergt ein Problem. Sollte es sich nämlich bei dem Zielgen um ein für die Embryonalentwicklung essentielles Gen handeln, resultiert der knock-out häufig in einem intrauterinen oder perinatalen Tod der Tiere, so dass Phänotyp-Studien erschwert bzw. unmöglich werden. Hier schafft eine andere Methode Abhilfe, nämlich der konditionale knock-out.

Bei dieser Technik wird versucht, das Gen gewebsspezifisch bzw. erst in einem bestimmten Entwicklungsstadium des Organismus zu inaktivieren. Dabei bedient man sich eines Orts-spezifischen Rekombinase-Systems. Momentan stehen zwei solche Systeme zur Verfügung, nämlich das Cre-*loxP*-System des Bakteriophagen P1 (Lakso *et al.* 1992; Orban *et al.* 1992) sowie das Flp-*FRT*-System aus *Saccharomyces cerevisiae* (Dymecki 1996). Die

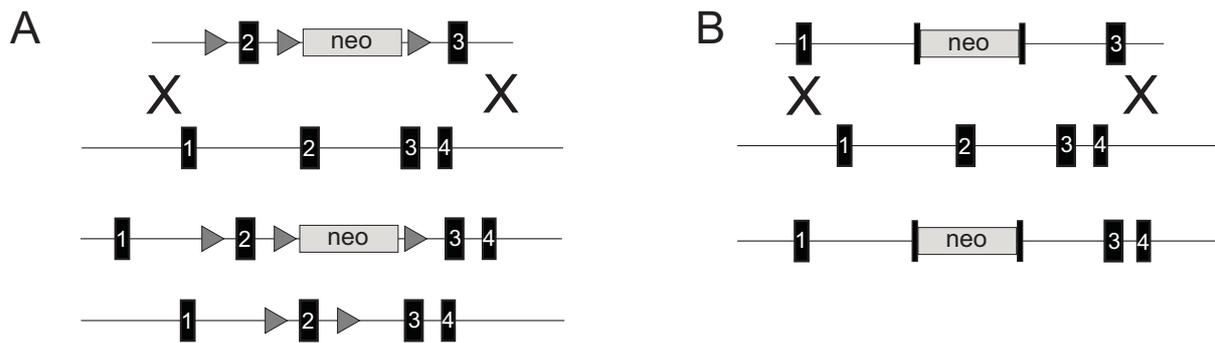


Abb. 4.1: Darstellung der konditionalen (hier 3-*loxP*-Strategie nach Rajewsky *et al.* 1996) bzw. der klassischen knock-out-Technik. Bei der Herstellung des GT-Konstruktes für den konditionalen knock-out (A) werden 3 *loxP*-Erkennungssequenzen sowie der Selektionsmarker wie abgebildet in die Introns des Zielgens eingeführt. Nach erfolgter homologer Rekombination und Selektion werden die G418-resistenten ES-Zellen einer passageren Cre-Expression durch Transfektion mit einem Cre-Plasmid unterzogen. Dies führt zur Deletion entweder von Exon 2 und dem Selektionsmarker oder eines von beiden. Die ES-Zell-Klone mit entferntem Selektionsmarker und *loxP*-flankiertem Exon werden identifiziert und zur Generierung von Chimären eingesetzt. Eine Cre-Exposition der für die Mutation homozygoten F2-Tiere führt zur Deletion des Exons 2 (Rajewsky *et al.* 1996). Bei der klassischen Technik (B) wird der Selektionsmarker in einen Exon eingesetzt und unterbricht diesen dabei. Nach der homologen Rekombination in ES-Zellen und Transduktion des mutierten Allels durch die Keimbahn sind die für das Null-Allel homozygoten F2-Tiere defizient für das entsprechende Gen.

Rekombinasen Cre bzw. Flp erkennen jeweils ihre spezifischen, 34 bp langen Erkennungssequenzen (*loxP* bzw. *FRT*) und katalysieren eine Rekombination eines von zwei solchen Sequenzen flankierten DNA-Abschnittes. Abhängig von der Orientierung und der Lage der Erkennungssequenzen findet z.B. eine Deletion oder eine Inversion des betroffenen DNA-Abschnittes statt. Beim Design des gene-targeting-Konstruktes beispielsweise für einen konditionalen Cre-*loxP*-knock-out wird im einfachsten Fall ein essentieller Genbereich bzw. das komplette Gen von zwei gleich orientierten *loxP* Sequenzen flankiert sowie ein Selektionsmarker in den Intronbereich eingeführt (Abb. 4.1 A). Nach erfolgter homologer Rekombination in ES-Zellen wird das mutierte Allel an die Nachkommen vererbt, jedoch bleibt das Gen funktionstüchtig, bis eine Cre-Exposition erfolgt.

Dies kann auf unterschiedlichen Wegen geschehen. Möglich ist beispielsweise eine Verpaarung mit Cre-exprimierenden Mäusen. Dabei kann die Cre-Expression ubiquitär, so dass die Nachkommen einen kompletten knock-out in sämtlichen Gewebe entwickeln, oder auch gewebsspezifisch sein. Wird ein solches Tier zur Verpaarung eingesetzt, wird in den Nachkommen nur in Cre-exprimierendem Gewebe die Rekombination stattfinden und der knock-out wird gewebsspezifisch.

Ferner ist es möglich, Fusionsproteine aus Cre und mutagenisierten Steroidhormon-Rezeptoren zu erzeugen. In diesem Fall wird die Rekombinase-Aktivität durch die Bindung von Liganden gesteuert, wobei die natürlichen Steroidhormone an den spezifisch veränderten Rezeptoren unwirksam sind. Exprimiert eine Maus solch ein Fusionsprotein (was auch

gewebsspezifisch erfolgen kann), kann Cre durch Verabreichung synthetischer Steroide wie Tamoxifen oder RU486 zu einem beliebigen Zeitpunkt aktiviert werden. (Brocard *et al.* 1998; Schwenk *et al.* 1998; Kellendonk *et al.* 1999; Hayashi und McMahon 2002).

Eine weitere Möglichkeit der Cre-Einschleusung ist die Nutzung eines Adenovirus-Systems (Wang Y *et al.* 1996; Lee *et al.* 1997; Chang *et al.* 1999).

Die Rekombinase-Methode bietet die Möglichkeit, den Selektionsmarker nach erfolgter Selektion zu entfernen. Dieser kann in bestimmten Fällen die Expression der benachbarten Gene (Fiering *et al.* 1995) und demzufolge auch den Phänotyp beeinflussen. Zur Entfernung des Selektionsmarkers wird dieser beispielsweise durch *loxP*-Sequenzen flankiert und die ES-Zellen werden nach der Selektion einer passageren Cre-Expression durch Transfektion mit einem Cre-Plasmid unterzogen (Gu *et al.* 1994). Eine weitere Möglichkeit ist die gleichzeitige Verwendung zweier Rekombinasesysteme (Meyers *et al.* 1998).

Insgesamt bietet die konditionale Strategie mehr Flexibilität, insbesondere in Hinblick auf den Zeitpunkt bzw. die Gewebsspezifität des knock-outs, erfordert jedoch größeren Aufwand bei der Konstruktion des gene-targeting-Vektors, u.U. größere Passagezahlen der ES-Zellen, zusätzliche Verpaarungen etc. Außerdem sind die Cre-Systeme oft nicht 100% effizient, was zur Entstehung von Mosaiken und zur Verschleierung des Phänotyps führen kann.

Die Tatsache, dass die Sulfatasen Sulf1 und Sulf2 wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung spielen, sollte eigentlich zur Wahl der konditionalen Strategie verleiten, gerade wegen der Möglichkeit der deletären Folgen für den Embryo. Warum haben wir uns dennoch für einen klassischen knock-out entschieden? Zum Zeitpunkt der Planung dieser Arbeit waren diese Sulfatasen weder molekulargenetisch noch funktionell beschrieben. Es gab keinen Grund zur Annahme, Sulf1 und Sulf2 seien keine metabolischen Enzyme, wie die restlichen Sulfatasen. Die Defizienz anderer Sulfatasen ist nämlich weder embryonal noch perinatal letal. Die bislang untersuchten Sulfatase-knock-out-Mausmodelle wurden alle nach der konventionellen Strategie erzeugt, ohne dass dies zu den genannten Komplikationen geführt hätte (Hess *et al.* 1996; Evers *et al.* 1996). Der Einsatz dieser klassischen Strategie führt schneller und mit geringerem Aufwand zum Erfolg. Letztendlich hat sich der Ansatz auch in dieser Arbeit als erfolgreich erwiesen – das Fehlen der einzelnen Sulfatasen Sulf1, Sulf2 oder ASG führte nicht zum intrauterinen Tod. Für Sulf1 und Sulf2 würden wir mit dem heutigen Wissen die Wahl jedoch zu Gunsten der konditionalen Technik treffen, um embryonale Funktionen der Sulfatasen von adulten unterscheiden zu können, um evtl. lebensfähige Doppel-knock-out-Tiere zu erzeugen und um gewebsspezifische Aussagen zu erhalten. Sollten sich Sulf1 und Sulf2 in ihrer Funktion zumindest partiell ersetzen können, so

sollte die Defizienz einer Sulfatase vermutlich besser durch die jeweils andere Sulfatase kompensiert werden, wenn der Defekt bereits während der Embryonalentwicklung vorliegt.

Die Konstruktion der GTVs entsprach dem Stand der Technik vor Bekanntwerden des Mausgenoms. Heutzutage ließen sich die genomischen DNA-Abschnitte sehr viel leichter lokalisieren und zu der gewünschten Größe amplifizieren. Die strategische Planung (Verwendung geeigneter Restriktions-Schnittstellen und Herstellung externer Sonden) wäre viel zielstrebigter und einfacher möglich. Dennoch zeigt der Erfolg der durchgeführten knock-out-Projekte mit Keimbahn-Gängigkeit der Null-Allele in allen drei Fällen, dass die verwendeten GTVs für den konventionellen knock-out geeignet waren.

Die 3.1 bis 3.8 kb großen genomischen Abschnitte dieser GTVs enthielten das Exon relativ mittig, so dass 1.5 bis 2 kb große Homologiearme auf beiden Seiten vorhanden waren, die eine genügend hohe Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination versprachen. Diese Wahrscheinlichkeit wächst mit der Länge dieser homologen Bereiche, jedoch ist sie ab 1.5 kb meist ausreichend hoch (Saftig 2001). Der anfängliche Misserfolg bei Verwendung des Sulf2 GT-Konstruktes mit nur 1.1 kb 5' vom Exon sowie der Erfolg nach Verlängerung dieses 5'-Bereiches auf 1.8 kb belegen diese Aussagen (s. 3.1.4).

Ein weiterer Faktor, der die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination beeinflusst, ist die Isogenität der Konstrukt-DNA und der ES-Zellen (te Riele *et al.* 1992). Sowohl die Cosmidbibliothek als auch die verwendeten MPI-2 ES-Zellen stammen von der 129/Ola Maus, so dass auch diese Bedingung erfüllt war.

Für das Einsetzen der neoR-Kassette wurden im Falle von Sulf1 und Sulf2 natürliche Restriktionsschnittstellen (*BsaAI* bzw. *BseRI*) im jeweiligen Exon verwendet, im ASG-Exon 2 musste mittels gerichteter Mutagenese (Quikchange™, Stratagene) eine *StuI* Schnittstelle eingeführt werden. Die Orientierung der Kassette war im Falle von Sulf1 und ASG von Bedeutung, denn es sollten kassetteninterne Schnittstellen für die Genotypisierung verwendet werden. Für die Inaktivierung des Gens ist die Orientierung irrelevant, denn bei beiden Orientierungen wird in allen drei Leserastern durch die Kassette ein Stop-Codon eingeführt.

Auf eine zusätzliche negative Selektion durch das Einbringen eines Thymidinkinasegens (TK) an das Ende eines Homologiearms wurde verzichtet. Eine TK-Kassette wird bei nichthomologer, zufälliger Integration ins Genom mit aufgenommen und macht die ES-Zellen empfindlich gegen Gancyclovir. Auf diese Weise kann die Wahrscheinlichkeit, ES-Zell-Klone mit erfolgter homologer Rekombination zu selektionieren, weiter gesteigert werden, jedoch auf Kosten verlängerter Kulturzeit. Diese sollte aber so gering wie möglich gehalten werden, damit die Pluripotenz der ES-Zellen erhalten bleibt. Der geringere Aufwand beim

Screening der ES-Zell-Klone könnte also den Gesamterfolg durch die fehlende Keimbahneteiligung der ES-Zellen nach der Blastozysteninjektion gefährden. Aus diesem Grund wurde von der negativen Selektion Abstand genommen.

4.2 Modulierung Heparansulfat-abhängiger Signaltransduktionswege durch Sulf1 und/oder Sulf2 in Entwicklung und Homöostase

Das Ansehen der Heparansulfate (HS) hat sich in den letzten 10 Jahren dramatisch verändert. Wurden sie früher für schlichte Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix gehalten, so wird ihnen heute eine Schlüsselrolle bei einer Vielzahl regulatorischer Vorgänge zwischen Zellen zugeschrieben (Turnbull *et al.* 2001). Ihre bemerkenswerte strukturelle Heterogenität ist von entscheidender Bedeutung für die spezifischen Interaktionen mit einer Vielzahl von Liganden. Diese Strukturvariabilität beruht auf selektiven enzymatischen Modifikationen des Polysaccharid-Grundgerüsts (Epimerisierung der D-Glucuronsäure zu L-Iduronsäure, N-, 3-O- und 6-O-Sulfatierung von Glucosamin sowie 2-O-Sulfatierung von L-Iduronsäure, s. 1.3) und macht HS zu einem Molekül mit einem enormen Informationsgehalt. Die Steuerungsmechanismen dieser Modifikationen sind bis heute nicht hinreichend aufgeklärt. Die Tatsache, dass einige der beteiligten Enzyme in mehreren Isoformen existieren, könnte für die Ausbildung der Modifikationsmuster mitbestimmend sein.

Die neuen Sulfatasen Sulf1 und Sulf2 bieten eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Variabilität von HS, speziell für die Variabilität des Sulfatierungsgrades. Beide Sulfatasen besitzen 6-O-Endosulfataseaktivität gegenüber Heparin und HS. Für die QSulf1 konnte gezeigt werden, dass diese spezifisch disulfatierte GlcA-GlcNS-6S und vor allem trisulfatierte IdoA-2S-GlcNS-6S Disaccharide desulfatiert, die in den S-Domänen von HS vorkommen; keine Aktivität konnte gegenüber IdoA-GlcNS-6S beobachtet werden (Ai *et al.* 2003; Viviano *et al.* 2004). Auf die Potenz dieser Sulfatasen, durch Desulfatierung von HS in verschiedene Signalwege modulierend eingreifen zu können, soll anhand einiger kürzlich publizierter Arbeiten näher eingegangen werden.

QSulf1 wurde von Dhoot *et al.* (2001) beim Screening von Wachtel-Embryonen nach Sonic hedgehog (Shh) Antwort-Genen entdeckt. Es wurde gezeigt, dass QSulf1 in den epaxialen Muskelvorläuferzellen der Somiten der Wachtelembryonen Shh-abhängig exprimiert wird. Hingegen ist die Expression in der Bodenplatte sowie im Notochord Shh-unabhängig. Nach

Behandlung der Embryonen mit Antisense-*QSULF1*-mRNA konnte eine spezifische Hemmung der MyoD-Aktivierung in den Muskelvorläuferzellen beobachtet werden. Da MyoD durch Wnt induzierbar ist, welches seinerseits Bindungen mit HSPGs eingeht, wurde der QSulf1 eine mögliche Rolle im Wnt-Signaltransduktionsweg zugeschrieben. Diese Annahme wurde durch eine vielfache Verstärkung im Wnt-Signalweg bei QSulf1-exprimierenden Zellen untermauert. Es wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem die Wirkung der Sulfatase in der Freisetzung der Wnt-Moleküle aus ihrer Assoziation mit HSPGs liegt (Dhoot *et al.* 2001). Die Interaktion von Wnt mit HS ist jedoch für seine Funktion unerlässlich. Eine vollständige Desulfatierung der HS blockiert den Wnt-Signalweg, so dass für die Funktion der QSulf1 ein sog. „catch or presentation“-Modell angenommen wird (Abb. 4.2). Dabei wird durch selektive 6-*O*-Desulfatierung von HS die Affinität von Wnt zu HS herabgesetzt; in diesem Zustand wird Wnt durch HS seinem Rezeptor Frizzled präsentiert, so dass ein aktiver HS-Wnt-Frizzled Komplex entsteht (Ai *et al.* 2003).

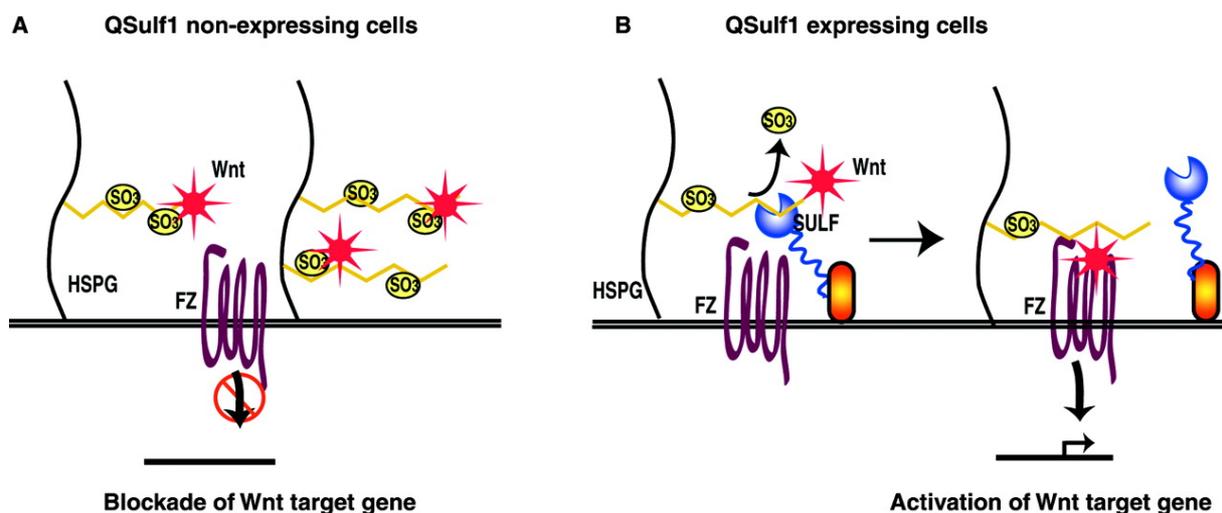


Abb. 4.2: „Catch or presentation-Modell“ der Regulation des Wnt-Signalweges durch QSulf1. (A) In Abwesenheit von QSulf1 bleibt Wnt an HS gebunden. Die hohe Affinität für HS unterbindet die Reaktion von Wnt mit seinem Rezeptor Frizzled (FZ). (B) Durch selektive 6-*O*-Desulfatierung durch QSulf1 wird die Affinität von Wnt zu HS herabgesetzt. In diesem Zustand präsentiert HS Wnt seinem Rezeptor Frizzled und die Signaltransduktionskaskade wird in Gang gesetzt (aus Ai *et al.* 2003, S. 348).

Viviano *et al.* (2004) konnten die Rolle von QSulf1 im BMP (bone morphogenetic proteins)-Signalweg demonstrieren. Noggin, ein Heparin-bindendes Protein, kann eine Bindung mit BMPs eingehen und so deren Signalfunktion antagonisieren, was insbesondere für die Neurogenese bedeutsam ist. Es konnte gezeigt werden, dass Noggin auf der Zelloberfläche an HSPGs gebunden vorliegt und dass für diese Bindung *N*-, 6-*O*- und 2-*O*-Sulfatierung bedeutsam sind. Durch die hohe lokale Konzentration von Noggin auf der Zelloberfläche kann dort die Wirkung von BMP an seinem Rezeptor abgeschwächt werden. Durch

Expression von QSulf1 konnte *in vitro* eine Freisetzung von Noggin ins Medium erreicht werden, so dass die Antwort der Zellen auf BMP verstärkt wurde (Viviano *et al.* 2004).

Ein bedeutsamer Aspekt scheint die Funktion der Sulf1 bei der Kanzerogenese zu sein. Lai *et al.* (2003, 2004a, 2004b) beobachteten eine verminderte bzw. fehlende Expression von Sulf1 in 5 von 7 Ovarialkarzinom-Zelllinien sowie in ca. 75% der Ovarialkarzinome. Durch weitere Untersuchungen konnte eine verminderte Sulf1-Expression in diversen anderen Tumoren wie Mamma-, Pankreas-, Nierenzell-, Plattenepithel- und hepatozellulären Karzinomen (HCC) beobachtet werden. Eine Reexpression von Sulf1 in Ovarial-, Plattenepithel- und hepatozellulären Karzinomzellen führte zu einer erhöhten Apoptose-Bereitschaft der Zellen nach Behandlung mit dem Zytostatikum Cisplatin oder dem Kinase-Inhibitor Staurosporin. Die Signalwege von Fibroblasten- (FGF2), Heparin-bindendem epidermalen- (HB-EGF) und Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) wurden durch die Expression der Sulfatase unterdrückt. Diese Wachstumsfaktoren gehören zu den Liganden von HSPGs und benötigen diese als Co-Rezeptoren für ihre funktionelle Bindung an ihre eigenen Rezeptoren. Die Erklärung ist naheliegend, dass Sulf1 durch die 6-O-Desulfatierung von HS auf der Zelloberfläche die Bindung der genannten Wachstumsfaktoren an HSPG verhindert und so ihre proliferationsfördernde Wirkung auf die Zielzelle hemmt (Lai *et al.* 2003, 2004a, 2004b). Dies würde *SULF1* die Funktion eines Tumor-Suppressor-Gens zuschreiben.

Die Rolle von Sulf1 in der Modulierung von FGF-vermittelten Signalwegen wurde 2004 von Wang S *et al.* bestätigt. Es wurde der hemmende Einfluß der Sulfatase auf die FGF2- und FGF4-abhängige Mesoderminduktion in Embryonen von *Xenopus laevis* sowie auf die FGF-abhängige Angiogenese in Hühnerembryos untersucht. Durch 6-O-Desulfatierung von HSPGs auf der Zelloberfläche durch Sulf1 wurde die HS-abhängige Interaktion von FGFs mit ihren Rezeptoren gestört, und dementsprechend eine starke Attenuation in den genannten Signalwegen erreicht (Wang S *et al.* 2004).

In einigen HCC-Zelllinien konnte jedoch durch Lai *et al.* (2004a) eine erhöhte Sulf1-Expression beobachtet werden. Dies könnte zum einen eine reaktive Antwort im Sinne eines Tumor-Suppressor-Effekts sein, zum anderen jedoch theoretisch auch auf onkogene Eigenschaften der Sulfatase hindeuten. Es ist denkbar, dass die Desulfatierung von HS zu einem Freisetzen der zuvor auf der Zelloberfläche fixierten Wachstums- und Angiogenesefaktoren führen kann (Lai *et al.* 2004a). Analog zur Wnt-Signalverstärkung kann es andere Signalwege geben, die durch Sulf1 aktiviert werden könnten. Die Regulation der Sulf1-Expression wäre demzufolge ein Stellglied für ein ganzes Netzwerk von Signalwegen und bedarf genauerer Untersuchung.

4.3 Phänotyp der Sulf1- bzw. Sulf2-knock-out-Mäuse

Phänotypstudien der knock-out-Tiere gehörten nicht zu den unmittelbaren Zielen der vorliegenden Arbeit und würden den Rahmen dieser bei weitem sprengen. Deswegen wird hier lediglich auf einige Beobachtungen eingegangen, die an den zum gegenwärtigen Zeitpunkt verfügbaren knock-out-Mäusen gemacht wurden.

In Anbetracht der vermutlichen Rolle der neuen "langen" Sulfatasen Sulf1 und Sulf2 in der Embryonalentwicklung konnte bei den knock-out-Tieren mit schweren Fehlbildungen bis hin zu intrauteriner oder perinataler Letalität gerechnet werden. Wider Erwarten zeigen die Sulf1-defizienten Mäuse jedoch keinen äußerlich erkennbaren Phänotyp. Auffällig ist die reduzierte Häufigkeit der (-/-)-Nachkommen in der F2-Generation, die verminderte Wurfgröße in den F3 und weiteren Generationen sowie eine vermehrte Sterblichkeit der Tiere im Alter von 2-5 Tagen. Die Anzahl der Mäuse ist derzeit für verlässliche statistische Analysen jedoch zu gering. Sollten sich diese Beobachtungen in Zukunft bestätigen, so wird man deletäre Effekte des Sulf1 knock-outs während der Embryonalentwicklung sowie perinatal annehmen müssen, allerdings mit einer sehr niedrigen Penetranz.

Die ersten Untersuchungen der Gewichtsentwicklung der Sulf1 KO-Weibchen zeigten, dass diese Tiere über den gesamten Zeitraum gemittelt 1.4 g schwerer, unter Ausschluss der Wachstumsphase sogar 1.8 g schwerer werden, als die WT-Tiere. Während der Wachstumsperiode konnte kein Gewichtsunterschied festgestellt werden. Mögliche Ursachen für dieses Phänomen könnten in der regulatorischen Funktion der Sulf1 bei den Wachstumsprozessen liegen, aber auch beispielsweise eine reduzierte motorische Aktivität der Tiere mit daraus resultierender Adipositas könnten daran beteiligt sein. Verhaltenstests können an dieser Stelle neue Erkenntnisse mit sich bringen. Es sollte erwähnt werden, dass Mäuse, die Syndecan-1, einen Bestandteil der HSPG-Substrate von Sulf1, überexprimieren, ebenfalls einen obesity-Phänotyp aufweisen (Reizes *et al.* 2001). Angesichts der vermutlichen Funktion von Sulf1 als Tumorsuppressor (Lai *et al.* 2003, 2004a, 2004b) bleibt abzuwarten, ob die Sulf1-knock-out-Mäuse Krebs entwickeln.

Die Defizienz der Sulf2 hat gravierendere Effekte als die der Sulf1, jedoch ist auch hier die Penetranz inkomplett. Etwa 40% der defizienten Tiere versterben im Alter von 1 bis 6 Wochen, mit Schwerpunkt im Alter von 2 bis 3 Wochen, und zeigen z.T. schwerwiegende ZNS-Missbildungen wie Hydrozephalus, Großhirnrinden-Atrophie, fehlen des *Corpus callosum* sowie Verdrängung der Hirnanteile nach kaudal durch das *Foramen magnum* mit

Ausbildung einer Schnürfurche. Die nicht betroffenen KO-Tiere zeigen keine erkennbaren Auffälligkeiten. Die Missbildungen lassen einige Gemeinsamkeiten mit Krankheitsbildern wie dem sog. CRASH-Syndrom (**c**orpus callosum hypoplasia, **m**ental retardation, **a**dducted thumbs, **s**pastic paraplegia, **h**ydrocephalus) oder dem zu den Dysraphien zählenden Arnold-Chiari-Syndrom erkennen.

Die Ursache des Hydrozephalus ist noch nicht geklärt. Obwohl einige wenige der betroffenen Tiere Stenosen des *Aquaeductus sylvii* zeigen, können diese dennoch sekundärer Natur sein und als Folge der Einklemmung interpretiert werden. Bei Tieren, die lediglich mikroskopisch das Bild eines Hydrozephalus boten, könnte der Schwund der Neurone ein Hydrozephalus *e vacuo* herbeiführen. Dennoch zeigen viele Mäuse das Bild eines Hochdruck-Hydrozephalus mit aufgetriebenen Schädelknochen, so dass hier ein anderer Mechanismus, möglicherweise eine noch nicht erkannte Abflussstörung, angenommen werden muss.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Tiere durchgeführt, die evtl. weitere Anomalien aufdecken werden. Mit Hilfe von MRT erhoffen wir uns Einblick in die Gehirne der Tiere auf unterschiedlichen Stadien und ohne störende Fixationsartefakte.

Wie erklärt man die doch relativ geringe Penetranz bei Sulf2- und insbesondere bei Sulf1-knock-outs? Die Annahme, eine der zueinander stark homologen Sulfatasen könnte jeweils die Funktion der anderen, zumindest partiell, übernehmen, liegt nahe. Diese Hypothese wird ferner durch die Tatsache unterstützt, dass es uns bislang nicht gelungen ist, doppeldefiziente Nachkommen (*SULF1*^{-/-} *SULF2*^{-/-} oder *SULF1*^{+/-} *SULF2*^{-/-}) zu erhalten; das Fehlen beider Sulfatasen scheint deletäre Effekte für den Embryo zu haben. Außerdem scheint der Ausfall einer der Sulfatasen eine erhöhte Expression der anderen nach sich zu ziehen, wie vor allem für Sulf1 in Sulf2-knock-out-MEFs zu beobachten war (Abb. 3.7). Diese Beobachtung gilt es hinsichtlich seiner Gültigkeit für verschiedenen Gewebe und Entwicklungsstadien zu überprüfen.

Die Unterschiede im Phänotyp können auf dem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Tiere entstehen. Es ist bekannt, dass Mäuse des Stammes C57BL zur Ausbildung eines Hydrozephalus neigen und in 4% der Fälle einen spontanen Hydrozephalus entwickeln (Mori 1968). Tiere der 129-iger Stämme zeigen gehäuft Hypoplasie oder Agenesie (in bis zu 70% der Fälle bei 129/J) des *Corpus callosum* (Livy und Wahlsten 1991). Magara *et al.* (1999) haben beispielsweise gezeigt, dass Mutationen im β -Amyloid Precursor Protein (β APP), die u.a. Fehlbildungen der vorderen Kommissur verursachen, insbesondere auf dem 129/SvEv und 129/Ola Hintergrund zu schweren Defekten des *Corpus callosum* führen. Da unsere

Mäuse einen gemischten genetischen Hintergrund besitzen (C57BL/6J und 129/Ola), kann so die Bereitschaft zur Ausbildung einiger der Anomalien erklärt werden. Es wurden kürzlich Verpaarungen vorgenommen, um Tiere mit einem reinen 129/Ola-Hintergrund zu erhalten. Auch die so gewonnenen *SULF2*^{-/-}-Mäuse entwickelten einen makroskopisch feststellbaren Hydrozephalus, der gegenwärtig weiter untersucht wird.

4.4 ASG knock-out

Nach dem Misserfolg der ersten Blastozysten-Injektion, bei der die Chimären verstorben bzw. kohabitationsunfähig waren, wurden kürzlich ASG-defiziente Mäuse erhalten. Dabei werden 2 Mauslinien (vom ES-Zell-Klonen 1001ES#3 und 1001ES#70) unterhalten. Die Tiere, die vom Klon #70 abstammen, sind jedoch von größerem Interesse, denn dort konnte im Gegensatz zu Klon #3 die singuläre Integration des gene-targeting-Konstruktes im Genom nachgewiesen werden. Es ist nämlich möglich, wenngleich nicht sehr wahrscheinlich, dass ein irgendwo im Genom zufällig eingebautes gene-targeting-Konstrukt den Phänotyp beeinflussen kann.

Die ASG-defizienten Mäuse sind noch zu klein, um Aussagen über ihren Phänotyp treffen zu können. Über die biologische Funktion der ASG ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nichts bekannt, so dass Spekulationen über den zu erwartenden Phänotyp nicht sinnvoll sind.

4.5 Ausblick

Die Sulf1- und die Sulf2-knock-out-Mäuse stehen zunächst im Mittelpunkt des Interesses. Hier seien nur einige der geplanten Untersuchungen genannt.

Gegenwärtig werden erste biochemische Analysen von HS aus *SULF1*^{-/-}- und *SULF2*^{-/-}-MEFs durchgeführt, um die strukturellen Auswirkungen der Desulfatierungsdefekte zu beschreiben. Funktionelle Untersuchungen zur Wachstumsfaktor-Bindung an HS und zur Signaltransduktion werden folgen. Hierbei ist die Auswahl an Faktoren sehr groß. *In-situ*-Hybridisierungen von Maus-Embryonen zu verschiedenen Stadien werden zeigen, welche Entwicklungsprogramme (Myogenese, Neurogenese, Angiogenese) normal bzw. gestört sind und welche Kompensationsmechanismen ggf. zum Tragen kommen. Zu diesem Zweck sollen auch embryonale Stammzellen aus den knock-out-Mäusen gewonnen und verschiedenen

Differenzierungsprotokollen unterworfen werden. Im adulten Tier stehen Untersuchungen zu Defekten in der Wundheilung und zur Tumorsuppression an. Für letztere Fragestellung könnten Verpaarungen mit Tumor-Modell-Mäusen hilfreich sein, die Wachstumsfaktoren überexprimieren oder aber mutierte Rezeptoren für Wachstumsfaktoren besitzen (Birchmeier *et al.* 2003). Bei all diesen Fragestellungen müssen *in-vivo*-Befunde durch *in-vitro*-Untersuchungen näher analysiert werden, um letztendlich eine molekulare Erklärung der meist komplexen Zusammenhänge geben zu können.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Maus-knock-out-Modelle für die Sulfatasen Sulf1, Sulf2 und Arylsulfatase G (ASG) unter Verwendung der gene-targeting-Methode generiert. Erste *in-vitro*-Experimente konnten Sulf1 eine bedeutsame Funktion für embryonale Differenzierung, Homöostase und andere wesentliche Prozesse zuschreiben, die über Heparansulfat-abhängige Signaltransduktionswege gesteuert werden. Die Rolle der zu Sulf1 stark homologen Sulf2 und der ASG ist bislang unerforscht. Für den Gen-knock-out wurde die klassische, nicht-konditionale Strategie gewählt.

Zunächst wurden die murinen cDNAs in Form von EST-Klonen erhalten und charakterisiert. Durch Screening der genomischen Cosmid-Bibliothek der 129/Ola-Maus mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurden Cosmide identifiziert, die Genabschnitte der drei Sulfatasen enthielten. Die Cosmide wurden auf das Vorhandensein der interessierenden Exon-/Intron-Bereiche mittels Southernblot untersucht. Die positiven Cosmide wurden durch Restriktionskartierung und Sequenzanalyse charakterisiert. 3.1 bis 3.8 kb große Abschnitte der Cosmid-DNA, die eines der beiden ersten Exons des jeweiligen Sulfatase-Gens mittig enthielten, wurden subkloniert und zur Konstruktion der gene-targeting-Vektoren eingesetzt. Es wurde das Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen, das den Zellen Resistenz gegenüber Aminoglykosidantibiotika wie G418 verleiht, als positiver Selektionsmarker in das Exon eingeführt, und so dessen Leserahmen unterbrochen. Diese Konstrukte wurden durch Elektroporation in embryonale Stammzellen transfiziert, die anschließend in G418-haltigem Selektionsmedium kultiviert wurden. Jeweils ca. 100 G418-resistente ES-Zell-Klone wurden isoliert und auf erfolgte homologe Rekombination des Konstruktes unter Verwendung externer sowie interner DNA-Sonden mittels Southernblot überprüft. Positive ES-Zell-Klone wurden kryokonserviert sowie für die Blastozysteninjektion vorbereitet.

Nach erfolgter Blastozysteninjektion und Retransfer in den Uterus pseudoträchtiger Mäuse wurden Chimären erhalten, deren Verpaarung mit C57BL/6-Mäusen die heterozygote F1-Generation ergab. Daneben wurden die Chimären mit 129/Ola-Weibchen verpaart, um Tiere mit einem genetisch reinen 129/Ola-Hintergrund zu erhalten. Durch Verpaarung der Tiere der F1-Generation wurden in der F2-Generation für das *SULF1*- bzw. *SULF2*-Null-Allel homozygote Tiere mit reduzierter, von den Mendelschen Regeln abweichender Häufigkeit erhalten. Kürzlich konnten auch erste ASG-knock-out-Mäuse erhalten werden, zu denen gegenwärtig noch keine Aussagen gemacht werden können. Die Sulf1- bzw. Sulf2-knock-out-Mäuse sind fertil, so dass sie zur weiteren Verpaarung eingesetzt werden können. Die

SULF1^{-/-}-Tiere zeigen keinen äußerlich erkennbaren Phänotyp, sie sind nach dem Abschluss der Wachstumsphase im Durchschnitt 1.8 g schwerer als die WT-Mäuse. Etwa 40% der *SULF2*^{-/-}-Mäuse versterben im Alter von 1-6 Wochen und zeigen diverse ZNS-Missbildungen wie Hydrozephalus oder Hypo- bzw. Aplasie des *Corpus callosum*. Die restlichen *SULF2*^{-/-}-Tiere sind unauffällig. Doppel-Mutanten (*SULF1*^{-/-} *SULF2*^{-/-}) konnten bis jetzt nicht generiert werden, die Defizienz beider Sulfatasen scheint embryonal letal zu sein.

Mit der Erzeugung dieser knock-out-Maus-Modelle werden weitere Studien der Funktion der neuen Sulfatasen Sulf1 und Sulf2 sowie der ASG im Zusammenhang des Gesamtorganismus ermöglicht. Abgeleitete Zelllinien werden bereits zur Identifizierung der natürlichen Substrate dieser Sulfatasen und für funktionelle *in-vitro*-Untersuchungen eingesetzt.

6. Anhang

6.1 Nukleotidsequenz der murinen *SULF2*-cDNA (codierende Sequenz)

```

1  ATGGCACCCC CTGGCCTGCC ACTATGGCTG CTGTCCACCG CTCTCCTCTC
51  CCTGCTGGCT GGCAGCTCGG CCTTCCTCTC CCATCCCCGC CTGAAGGGAC
101 GCTTCCAGAG GGACCGCAGG AACATCCGGC CCAACATCAT CTTGGTGCTT
151 ACGGATGACC AGGATGTGGA GCTGGGCTCC ATGCAAGTGA TGAACAAGAC
201 AAGGCGTATC ATGGAGCAGG GCGGGGCGCA CTTTCATCAAT GCCTTCGTGA
251 CTACACCAAT GTGCTGTCCG TCTCGCTCCT CCATTCTCAC CGGCAAGTAC
301 GTCCACAACC ATAACACCTA CACCAACAAT GAGAATTGTT CCTCGCCCTC
351 CTGGCAGGCC CAGCACGAGA GCCGCACCTT CGCCGTGTAT CTCAACAGCA
401 CAGGCTACCG GACAGCTTTC TTCGGAAAAAT ACCTCAATGA GTACAACGGC
451 TCATACGTGC CGCCCGGCTG GAAGGAGTGG GTCGGCCTAC TTAAGAACTC
501 CCGCTTTTAT AACTACACAC TCTGCCGGAA TGGGGTGAAG GAGAAACATG
551 GCTCAGACTA CTCACGGAT TACCTCACGG ATCTCATCAC CAATGACAGT
601 GTGAGCTTCT TCCGAACATC CAAGAAGATG TACCCACACA GGCCCGTGCT
651 CATGGTCATC AGCCACGCGG CTCCCCATGG CCCCAGGAC TCAGCACCCC
701 AGTACTCACG GCTCTTCCCC AATGCGTCCC AGCACATCAC ACCGAGTTAC
751 AACTATGCAC CCAACCCAGA CAAGCATTGG ATCATGCGCT ACACGGGACC
801 CATGAAGCCC ATTCACATGG AATTCACCAA CATGCTACAA CGAAAACGCC
851 TACAGACCCT CATGTCTGTG GATGACTCCA TGGAGACGAT CTATGACATG
901 CTGGTGGAGA CGGGGGAGCT GGACAACACG TACATCCTGT ACACCGCCGA
951 CCACGGCTAC CACATGGGCC AGTTTGGGCT GGTGAAGGGC AAGTCTATGC
1001 CGTATGAATT CGACATCAGA GTCCCCTTCT ACGTGAGGGG CCCCACCGTG
1051 GAAGCTGGCT CTCTGAACCC CCACATTGTC CTCAACATTG ACCTGGCCCC
1101 CACCATACTG GATATCGCTG GACTGGACAT CCCTGCAGAC ATGGACGGGA
1151 AGTCTATTCT CAAACTACTG GACTCAGAGC GGCCAGTGAA CCGGTTCCAC
1201 TTGAAAAAGA AGCTGAGGGT CTGGCGAGAC TCCTTCCTGG TGGAGAGAGG
1251 CAAACTGCTC CACAAGAGGG AGGGTGACAA AGTGAATGCC CAGGAGGAGA
1301 ACTTCCTGCC CAAGTACCAG CGCGTGAAGG ACCTGTGTCA GCGAGCTGAG
1351 TACCAGACAG CATGCGAACA GCTGGGGCAG AAGTGGCAGT GTGTGGAGGA
1401 CGCTTCTGGG ACGCTGAAGC TGCACAAATG TAAAGGCCCC ATGCGGTTTG
1451 GTGGCGGCGG TGGCAGCAGA GCCCTCTCCA ACCTGGTGCC CAAGTATGAC
1501 AGCCAGAGCA GCGAGGCC TG CAGCTGTGAC AGTGGCGGTG GAGGGGACTA
1551 CAAACTGGGC CTGGCTGGAC GCCGTAAGCT CTTTAAGAAA AAGTATAAGA
1601 CCAGCTATGC CCGGAACCGC TCCATCCGTT CCGTGGCCAT CGAGTGGGAC
1651 GGTGAGATAT ACCACGTAGG CTTGGATACT GTACCTCAGC CCCGCAACCT
1701 TAGCAAGCCG CACTGGCCAG GGGCCCCTGA AGACCAAGAT GACAAGGATG
1751 GTGGCAGTTT CAGTGGTACT GGTGGCCTTC CAGATTATTC TGCCCCCAAT
1801 CCCATCAAAG TGACCCATCG GTGCTACATC CTTGAGAATG ACACAGTCCA
1851 GTGCGACTTG GACCTGTACA AGTCCCCTGCA GGCTTGAAA GACCACAAGC
1901 TGCACATCGA CCATGAGATC GAAACCCTGC AGAACAAAAT TAAGAACCTT
1951 CGAGAAAGTCA GGGGTCACCT GAAGAAGAAG CGACCGGAAG AATGTGACTG
2001 CCATAAAAAT AGTTACCACA GCCAACACAA AGGCCGTCTC AAGCACAAAG
2051 GCTCCAGCCT GCACCCTTTC AGGAAGGGTC TGCAGGAGAA GGACAAGGTG
2101 TGGCTGCTGC GGGAGCAGAA ACGCAAGAAG AAACCTGCGCA AGCTGCTCAA
2151 ACGGCTGCAG AACAACGATA CGTGCAGCAT GCCCGGCCCTC ACGTGCTTTA
2201 CCCACGACAA CCACCCTGG CAGACGGCGC CACTCTGGAC GCTGGGGCCG
2251 TTCTGCGCCT GCACCAGCGC CAACAACAAC ACGTACTGGT GCTTGAGGAC
2301 CATAAATGAG ACCCACAAC TCCCTTCTG CGAATTTGCA ACCGGCTTCA
2351 TAGAATACTT TGACCTCAGT ACAGACCCCT ACCAGCTGAT GAACGCGGTG
2401 AACACACTGC ACAGGGACGT CCTTAACCAA CTGCACGTGC AGCTCATGGA
2451 GCTAAGGAGC GTTAAAGGCT ACAAGCAGTG CAACCCCGG ACCCGAACA
2501 TGGACCTGGG GCTTAGAGAC GGAGGAAGCT ATGAACAATA CAGGCAGTTT
2551 CAGCGTCGAA AATGGCCAGA AATGAAGAGA CCTTCTTCCA AATCACTGGG
2601 ACAGCTATGG GAAGTTGGG AAGGCTTAA

```

6.2 Nukleotidsequenz der murinen *SULF1*-cDNA (codierende Sequenz)

```

1  ATGAAGTATT CCCTCTGGGC TCTGCTGCTT GCCGTGCTGG GCACACAGCT
51 GCTGGGAAGC CTGTGTTCCA CCGTTCGGTC CCAGAGGTTT CGAGGAAGGA
101 TACAGCAGGA ACGAAAAAAC ATCAGACCCA ATATTATCCT TGTGCTCACT
151 GACGACCAGG ATGTGGAGCT GGGTTCCTTG CAAGTCATGA ACAAGACGAG
201 AAAGATCATG GAACAGGGTG GGGCCACCTT CACCAATGCC TTTGTGACCA
251 CGCCCATGTG CTGTCCATCA CGCTCATCCA TGCTCACTGG GAAGTACGTG
301 CATAACCACA ATGTCTACAC CAACAATGAG AACTGCTCGT CTCCCTCGTG
351 GCAGGCAATG CACGAGCCTC GGACCTTTGC TGTGTATCTC AACAAACCCG
401 GCTACAGAAC AGCCTTTTTT GGAAAATACC TCAATGAATA CAATGGCAGC
451 TACATCCCTC CTGGATGGCG AGAATGGCTC GGATTAATCA AGAAttCTCG
501 TTTCTATAAT TACACTGTTT GTCGCAACGG CATCAAGGAG AAGCATGGAT
551 TTGATTATGC AAAGGATTAC TTCACAGACT TAATCACTAA CGAGAGCATT
601 AATTACTTCA AAATGTCTAA GAGAATGTAT CCCCATAGGC CCATTATGAT
651 GGTGATCAGC CATGCAGCAC CACATGGCCC TGAAGACTCC GCCCCACAGT
701 TTTCAAAACG GTACCCCAAT GCCTCCCAAC ACATAACACC CAGCTATAAC
751 TATGCACCGA ACATGGACAA ACACTGGATC ATGCAGTACA CAGGGCCCAT
801 GTTGCCATAT CACATGGAGT TCACCAACGT CCTCCAGCGC AAACGACTGC
851 AGACTCTGAT GTCAGTTGAC GACTCTGTCT AGAGGTTGTA CAACATGCTT
901 GTGGAGAGCG GGGAGCTGGA CAACACTTAC ATCATCTACA CTGCGGACCA
951 CGGCTACCAC ATTGGACAGT TTGGGCTGGT CAAGGGGAAA TCCATGCCCT
1001 ACGACTTTGA CATCCGTGTG CTTTTCTTCA TTCGTGGTCC AAGCATAGAA
1051 CCAGGGTCGA TAGTCCCACA GATTGTTCTG AACATCGACC TAGCTCCTAC
1101 CATTCTGGAT ATTGCTGGTC TTGACTCTCC TTCTGATGTG GATGGTAAAT
1151 CTGTCCTCOA ACTTCTAGAC CTGGAAAAGC CGGGTAAACAG GTTTCGGACA
1201 AACAAAGAAG CAAAATCTG GCGTGATACA TTCCTAGTGG AAAGAGGGAA
1251 ATTTTTACCG AAGAAGGAGG AATCCGGCAA GAATATCCAA CAGTCAAACC
1301 ACTTGCCCAA ATATGAGAGG TCAAGGAAC TGTGCCAGCA AGCCAGTAC
1351 CAGACGCCCT GTGAGCAGCC TGGGCAGAAC TGGCAGTGCA TCGAGGACAC
1401 ATCCGGCAAG CTCCGAATCC ACAAGTGTA GGGACCCAGC GACCTGCTCA
1451 CGGTCCGTCA GAATGCACGC AACCTCTACT CTCGCGGATT GCATGACAAA
1501 GACAAAGAGT GCCATTGTAG GGACTCTGGC TATCGCTCGA GCAGAAGCCA
1551 GAGAAAGAAT CAAAGGCAGT TCCTGAGGAA CAAGGGAACA CCAAAGTATA
1601 AGCCCAGATT TGTGCACACC CGGCAGACTC GGTCCCTGTC TGTTGAATTC
1651 GAAGGTGAAA TATATGACAT CAACCTGGAA GAAGAAGAAC TGCAAGTGTT
1701 ACCACCAAGG AGCATTGCCA AGCGCCATGA TGAGGGTAC CAGGGCTTCA
1751 TTGGCCACCA GGCTGCTGCT GGTGACATCA GGAATGAGAT GTTGGCAGAC
1801 AGCAACAATG CTGTGGGGTT ACCCGCCACT GTCCGGGTGA CACACAAGTG
1851 CTTTATTCTT CCAAACGACA CAATCCACTG TGAGAGGGAG CTGTACCAGT
1901 CAGCCAGAGC GTGGAAGGAC CATAAGGCC T ACATTGATAA AGAGATTGAA
1951 GTTCTACAAG ATAAAAATTAA GAATTTAAGG GAAGTGAGGG GACACCTAAA
2001 GAAAAGGAAA CCTGAGGAGT GTAGCTGTGG TGACCAGAGC TATTACAACA
2051 AAGAGAAAAG TGTCAAACGA CAGGAGAAGC TAAAGAGTCA CCTTCACCCC
2101 TTCAAGGAGG CTGCTGCCCC GGAGGTGGAT AGCAAACCTC AGCTCTTCAA
2151 GGAGCATCGG AGGAGGAAGA AGGAGAGGAA GGAGAAGAAA CGGCAGAGGA
2201 AGGGAGAGGA GTGTAGCCTG CCTGGCCTTA CTGTCTTAC CCATGACAAC
2251 AACCACTGGC AGACTGCCCC ATTTCTGGAAC TTGGGATCTT TCTGTGCCTG
2301 CACAAGTTCT AACAATAATA CCTACTGGTG TTTGCGTACA GTCAACGAGA
2351 CACACAATTT CCTGTTTTGT GAGTTTGCTA CTGGCTTTCT GGAATATTTT
2401 GACATGAATA CGGATCCTTA TCAGCTCACA AATACAGTAC ACACAGTAGA
2451 ACGGAGCATC TTAAATCAGC TACACATACA GCTGATGGAG CTCCGAAGCT
2501 GCCAAGGGTA TAAACAGTGC AACCCAAGAC CCAAGAGCCT GGACATTGGA
2551 GCTAAAGAAG GAGGAACTA TGACCCGCAC AGAGGACAGT TATGGGATGG
2601 ATGGGAAGGT TAG

```

6.3 Nukleotidsequenz der murinen ASG-cDNA (codierende Sequenz)

```

1  ATGGGGTGCG CCAACGATCC AGTGCCTGGG AGAACCACCT TTGACCTCAT
51  GTGGACAGCT GGTGCCCAAG GCCCCTCCTG TTCATCCGAA AGCTTCGTTT
101 CTGGAAAACC AACAGAGCCC CGAGCCAGCA AGGTTTTTGTT GGTTGGCATG
151 GCTTTTCTG GATTTTCTA CCCTCTCGTG GATTTCTCTA TCAGTGGGAA
201 AACAAAGAGC CCCCAACCAA ACATCGTGAT CATTTTGGCT GATGACATGG
251 GATGGGGTGA TCTGGGAGCA AACTGGGCAG AAACAAAGGA CACCACCAAT
301 CTTGACAAGA TGGCTTCCGA AGGAATGAGG TTTGTAGACT TCCACGCAGC
351 TGCTTCTACC TGCTCCCAT CCCGAGCCTC CCTGTCTACT GGCCGGCTGG
401 GTCTACGGAA CGGAGTCACG CACAAC TTCG CAGTCACCTC TGTAGGGGGG
451 CTCCAGTCA ACGAGACCAC CTTGGCAGAG GTGCTGCGAC AGGAGGGTTA
501 CGTCACTGCC ATGATAGGCA AGTGGCATCT TGGGCATCAT GGCTCTTATC
551 ATCCCAATTT CCGTGGCTTC GATTACTACT TTGGAATCCC ATATAGCAAT
601 GACATGGGTT GCACTGATGC TCCAGGCTAC AACTACCCTC CTTGTCCAGC
651 GTGTCCACAG AGAGATGGCC TATGGAGGAA CCCTGGGAGG GACTGTTACA
701 CAGATGTTGC CCTTCTCTC TATGAAAACC TGAACATCGT GGAGCAGCCT
751 GTGAACCTGA GCGGCCTTGC ACAGAAGTAC GCAGAAAGGG CAGTGGAGTT
801 CATTGAGCAG GCAAGCACCA GTGGAAGACC CTTCTGTCTC TACGTGGGCC
851 TGGCTCACAT GCATGTGCCT TTGTCTGTAA CTCCACCATT GGCACACCCA
901 CAGCGCCAAA GCCTGTACCG TGCAAGTCTC CGGGAGATGG ACAGTCTGGT
951 AGGGCAGATC AAGGACAAAG TTGACCATGT GGCAAGAGAA AACACACTCC
1001 TCTGGTTTAC AGGAGACAAT GGCCCATGGG CTCAGAAGTG TGAGCTGGCA
1051 GGCAGCGTGG GTCCCTTCTT CGGGTTGTGG CAAACCCATC AAGGGGGAAG
1101 TCCAACCAAG CAGACCACCT GGAAGGTGG GCATCGGGT CCAGCACTGG
1151 CTTACTGGCC TGGCAGAGTT CCAGCCAACG TCACTAGCAC CGCCTTGTTA
1201 AGCTTGCTAG ACATCTTCCC CACCGTGATA GCTCTGGCAG GAGCCAGCTT
1251 GCCCCAAAC CGGAAATTTG ATGGACGGGA TGTCTCTGAG GTGCTCTTTG
1301 GCAAGTCAA GATGGGGCAC AGGGTGCTAT TCCACCCCAA CAGTGGGGCT
1351 GCTGGAGAGT ATGGCGCCCT CGAGACTGTC CGCCTAAACC ATTACAAAGC
1401 TTTCTACATC ACTGGTGGAG CCAAAGCTTG TGATGGGAGC GTGGGTCTTG
1451 AGCAGCACCA CGTGGCCCCT CTCATTTTCA ACCTAGAAGA TGCTGCTGAT
1501 GAAGGGATGC CTCTACAGAA GGGGAGCCCC GAGTACCAGG AGGTGCTGCA
1551 GCAGGTCACC AGGGCTCTCG CAGATGTCCT CCAAGACATC GCTGATGACA
1601 ACAGCTCCCG AGCAGACTAC ACTCAGGATC CTTCAAGTAT TCCTTGCTGT
1651 AACCCCTATC AACTACCTG CCGTTGCCAA CCGGTCTGA

```

6.4 Von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des Sulf2-Proteins

```

1  MAPPGLPLWL LSTALLSLLA GSSAFLSHPR LKGRFQRDRR NIRPNIILVL
51  TDDQDVELGS MQVMNKTRRI MEQGGAHFIN AFVTPMCCP SRSSILTGYK
101 VHNHNTYTNN ENCSSPSWQA QHESRTFAV LNSTGYRTAF FGKYLNEYNG
151 SYVPPGWKEW VGLLKNSRFY NYTLCRNGVK EKHGSDYSTD YLTDLITNDS
201 VSFFRTSKKM YPHRPVLMVI SHAAPHGPEL SAPQYSRLFP NASQHITPSY
251 NYAPNPKHW IMRYTGPMKP IHMEFTNMLQ RKRLQTLMSV DDSMETIYDM
301 LVETGELDNT YILYTADHGY HIGQFGLVKG KSMPYEFDIR VPFYVRGPNV
351 EAGSLNPHIV LNIDLAPTIL DIAGLDIPAD MDGKSILKLL DSERPVNRFH
401 LKKKLRVWRD SFLVERGKLL HKREGDKVNA QEENFLPKYQ RVKDLQCRAE
451 YQTACEQLGQ KWQCVEDASG TLKLHKCKGP MRFGGGGSR ALSNLVPHYD
501 SQSSEACSCD SGGGGDYKLG LAGRRKLFKK KYKTSYARNR SIRSVAIEVD
551 GEIYHVGLDT VPQPRNLSKP HWPAPEDQD DKDGGFSFGT GGLPDYSAPN
601 PIKVTHRCYI LENDTVQCDL DLYKSLQAWK DHKLHIDHEI ETLQNKIKNL
651 REVRGHLKKK RPEECDCHKI SYHSQHKGRL KHKGSSLHPF RKGLQEKDKV
701 WLLREQRKK KLRKLLKRLQ NNDTCSMPGL TCFTHDNHHW QTAPLWTLGP
751 FCACTSANNN TYWCLRTINE THNFLFCEFA TGFIEYFDLS TDPYQLMNAV
801 NTLDRDVLNQ LHVQLMELRS CKGYKQCNPR TRNMDLGLRD GGSYEQYRQF
851 QRRKWPEMKR PSSKSLGQLW EGWEG*

```

6.5 Von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des Sulf1-Proteins

```

1  MKYSLWALLL  AVLGTQLLGS  LCSTVRSQRF  RGRIQQERKN  IRPNIILVLT
51  DDQDVELGSL  QVMNKTRKIM  EQGGATFTNA  FVTTPMCCPS  RSSMLTGKYV
101 HNHNVYTNNE  NCSSPSWQAM  HEPRTFAVYL  NNTGYRTAFF  GKYLNEYNGS
151 YIPPGWREWL  GLIKNSRFYN  YTVCRNGIKE  KHGFDYAKDY  FTDLITNESI
201 NYFKMSKRMY  PHRPIMMVIS  HAAPHGPEDS  APQFSKLYPN  ASQHITPSYN
251 YAPNMDKHWI  MQYTGPMLPI  HMEFTNVLQR  KRLQTLMSVD  DSVERLYNML
301 VESGELDNTY  IITYTADHGYH  IGQFGLVKGK  SMPYDFDIRV  PFFIRGPSIE
351 PGSIVPQIVL  NIDLAPTILD  IAGLDSPSDV  DGKSVLKLLD  LEKPGNRFRT
401 NKKAKIWRDT  FLVERGKFLR  KKEESGKNIQ  QSNHLPKYER  VKELCQQARY
451 QTACEQPGQN  WQCIEDTSGK  LRIHKCKGPS  DLLTVRQNAR  NLYSRGLHDK
501 DKECHCRDSG  YRSSRSQRKN  QRQFLRNKGT  PKYKPRFVHT  RQTRSLSVEF
551 EGEIYDINLE  EEELQVLPPR  SIAKRHDEGH  QGFIGHQAAA  GDIRNEMLAD
601 SNNAVGLPAT  VRVTHKCFIL  PNDTIHCERE  LYQSARAWKD  HKAYIDKEIE
651 VLQDKIKNLR  EVRGHLKRRK  PEECSCGDQS  YYNKEKGVKR  QEKLKSHLHP
701 FKEAAAQEVN  SKLQLFKEHR  RRKKERKEKK  RQRKGEECSL  PGLTFCFTHDN
751 NHWQTAPFWN  LGSFCACTSS  NNNTYWCLRT  VNETHNFLFC  EFATGFLEYF
801 DMNTDPYQLT  NTVHTVERSI  LNQLHIQLME  LRSCQGYKQC  NPRPKSLDIG
851 AKEGGNYDPH  RGQLWDGWEG  *

```

6.6 Von der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz des ASG-Proteins

```

1  MGCANDPVPG  RTTFDLMWTA  GAQGPSCSSE  SFVSGKPTEP  RASKVLLVGM
51  AFSGFFYPLV  DFSISGKTRA  PQPNIVIILA  DDMGWGDLGA  NWAETKDTTN
101 LDKMASEGMR  FVDFHAAAST  CSPSRASLLT  GRLGLRNGVT  HNFVTSVGG
151 LPVNETTLAE  VLRQEGYVTA  MIGKWHLGHH  GSYHPNFRGF  DYYFGIPYSN
201 DMGCTDAPGY  NYPPCPACPO  RDGLWRNPRG  DCYTDVALPL  YENLNIVEQP
251 VNLSGLAQKY  AERAVEFIEQ  ASTSGRPFL  YVGLAHMHVP  LSVTPPLAHP
301 QRQSLYRASL  REMDSL VGQI  KDKVDHVARE  NTLWFTGDN  GPWAQKCELA
351 GSVGPFGLW  QTHQGSPTK  QTTWEGGHRV  PALAYWPGRV  PANVTSTALL
401 SLLDIFPTVI  ALAGASLPPN  RKFDRDVS  VLFGKSQMGH  RVLFHPNSGA
451 AGEYGALQTV  RLNHYKAFYI  TGGAKACDGS  VGPEQHHPV  LIFNLEDAAD
501 EGMPLQKQSP  EYQEVLQQVT  RALADVLQDI  ADDNSSRADY  TQDPSVIPCC
551 NPYQTTCRCQ  PV*

```

6.7 Sequenz des Klons 1247A42

```

1  GAATTCAGAG  TTTCTTCCAA  TCTCCACCCC  TCTAGTTACC  TAGTCATTTG
51  CATCAGGCAC  TGCCCAAGGA  GCAGGGGACC  TAGCTGTGAC  CAACACAGGC
101 CTCATCTCTG  CCCCTCATGG  GACATCCTCC  ATCTGCCCTG  AGGAAAAGAA
151 CACCCCTGGG  CATTTTACAG  CCCTGGGGCG  AGTGACATGG  TGACAACAGC
201 AGGCCACACA  ACCCATGGG  GGCCCTGGGT  AGGGCTCTGA  GGTGGTGGCT
251 AGCATCCCC  TCCCATACCT  CCATAGTCAA  CAGGGCAGAC  AGACACCTTC
301 AAGGTCATAG  TTATGGTGAT  GTGTCTGAC  TCAATGGCAC  ATAGTCTCTC
351 CTTCTCCGCC  CCCCCACCC  CCCAGCGAGA  GGTGGCTGAG  CCGCTGCTCG
401 GGGACCATAT  CCCACCTCCC  TTACCCACCT  TTGCTGGAGA  TACAGTCTGC
451 CTGCGGTCAA  GGATGACAGA  GAGAGGCTAG  CGTGGAATGC  TCTCTGTGTA
501 GTCATCTTGT  TTA TCTCCGCA  AGGTCAATCT  GATGGGAACC  CTTGTGCCCA
551 ACTGTGGTAT  CAGGGGATGA  GGGCCATCCA  TCCACGGCCT  TGTAAAAGT
601 AATTAGCTTG  GCCATGGGGA  AACTGGGGTT  CTCCTGATGT  TTGTGAGGAC
651 AACAAACCCC  AAGGGGTGGG  TCTGAGCCAA  GAACCTGTGA  ACATACAGCC
701 CAAAGCACCC  AGGAACCCAA  GCCTTCTGCT  GCTGGAGCTG  GAAGGGAAGG
751 GGCAAGCAGG  GGTGCTGGTG  GCTTGTCTCT  TGCTGTGTCT  GGGTAGGTGG

```

```

801 GTACACAGAG CTCTTGTCTG TTAAGGGTTT CTTTACTATG CTTTCAGGGCA
851 GTTCCTGTGA ACAGTTCTGC TGCCAATCTG CCCCTGAGAC AATTTCTCTA
901 GCTTAGCCGG CCCTGTGTTC ATGCCATCTT AGACAGCGGG GAAGGCTCTT
951 CTTGCCCACA CTGAGCCTTC CTTGTGTGAG GCAGCATGCA AGCCCAGCGG
1001 GGCAACTGTG GTGTCAGTAC TAACTCTCAC CTACCCCTCT CATCCTTCAG
1051 ATCCTGAGGG AAGAGGGGAA GGAATCCCAT CCTCACGACA CCACCTCGGC
1101 CTCTGCATCC AGGAAGAAGC AAAGGACCAG CAAGCCACGC CAATGGCACC
1151 CCCTGGCCTG CCACTATGGC TGCTGTCCAC CGCTCTCCTC TCCCTGCTGG
1201 CTGGCAGCTC GGCCTTCCTC TCCCATCCCC GCCTGAAGGG ACGCTTCCAG
1251 AGGGACCACA GGAACATCCG CCCC AACATC ATCTTGGTGC TTACGGATGA
1301 CCAGGATGTG GAGCTGGGTA AGTGGCTGAG CTAGCCGGGG ACACCTGGGG
1351 CTCTAGAAGA ACCATGTCCC CACACCCCA TAGAACTCC AGGTGCCAGG
1401 CAGTTGTGTG GAGTTTGCAT CTGAGTTCAC ACTTGGGGGC CTTGAGAATG
1451 TGGGTTTCGT GTGACCCTCA AGGGTAGGGA TCTCCATCTT CCCAATGCAG
1501 ACTGATTCCC CAATGCCTAC AACCTAAGGA GCAGAGAGAC TGTGCTCAGT
1551 TTGCTCTTGT CAACCATTTG CTCTCCCAAG CCACTGGGCC ATGGCCTTGG
1601 CTGACAGCTA AGCCATCCCC TGTCCCTTCC CATCTGAGCA ATGCCACGGC
1651 TTTTGTCTTT TCTGTACAA GAAGCACTGG TAGGAGACGC CAAAACGGAG
1701 GCCACAAAA GAGGCTTCAA GAGTCAATCT AATGCCCGGC GTGGTGGCGA
1751 ATGCCCTTAA TCCCAGCACT CGGGAGGCAG AGGCAGGCAG ATTTCTGAGT
1801 TTGAGGCCAG CCTGGTCTAC AAAGTGAGTT CCAGGACAGC CAGGACTGCA
1851 GAGAAACCTT GTCTCGAGAA AAAAAAAAAA AAAAGAATC AATCTAGATC
1901 TGTCTGGGAT CACCTGTGGG CATCTCCAG TGAGCCCAT CTCTCCCTCT
1951 CCGTGTCTTC TCACCTTGAA GTCAACGTAT GGGTTCCTCC CCAGCTGAGC
2001 CCCTCGTCTT TGCTGCCCCA TGGGAACACT CGACCCTCTG TATCCTCAGT
2051 TCTCCATTTG CAGATTCAAC CAAACACAGA TCAAAACCAA AGAGTACGGA
2101 TGGCATTTC CACTAATCAT TAGTCCCTGA GCAGTACCGT AAGACCTAGC
2151 TCCCTGTGTC ACGGTCATCT AGAGCGAATA AGGGGGATAC AGGCTATTAG
2201 CAAAGAGCAC GGCAGTTAAT ACGGGAGCCT GAACATCATC AGGGCCTGAT
2251 TCCCCAGCAC CGAGGGACAA CTGTGCAATC TGAGCCACAA ATGCAAGTGA
2301 CTAGAGATGT GGCTTAGTTG GTAGAGCACT TGCCTGGCAT TTGCAAAGCC
2351 CTGCATTCTG TCTCCACCCA GCACTATAAA CACCAGGCGA CATGGAAGTG
2401 TGAGCCCAGC ACTAGGGAGG TGGAGGCAA CAGATCAAAA GTACCTGACT
2451 ACGCAGCTAG TGGGAGGCCA GCCTGGGCTA CATGAGATCC AGAAATTAAG
2501 AAAAAAAAAA TGTAATAATGA AATGAGTGCG GTAATATTTT GTTTAACCCA
2551 ATATGCAATC ACCTGAAGCG TGGTCAGCAG CGTGGATTCC TTAAGAATGC
2601 TTTGCCCTTC CTTCCCTTGC CCCCAGAGC TGGCATGCCG TATCCAGGC
2651 TGCACAGCCA CATGGAGCTT GGGACCTTCA TACGGCACAG TGTGCACGGT
2701 AATGCAGCTT CCTTCTGCAA GTTAGGTGCC CCTCCTAATC ATCTCTCCTA
2751 CTGTGCACTG TGAAAATCTG GAAGCGGGTG TCCCAGGTAG GGGAGAAGAG
2801 AATGTGCAAA GGCCCTGGGG CAGGATCAAA GAAGTAGATA TGGCTGGAGC
2851 CTGGAAAGGG AGGTAAAACG GAGACCAGCG AAGGATGGGG TTGTGGTTGT
2901 TATTCCTGAC CAGGTGGACG CTGTTGACCA GGTGAGGGGT GGGCCCTTTC
2951 CTGTCTGCTC TCTGAGGACA ATGGAATATA GTTGGTGGCA ATGACAGAGT
3001 GACTTACAGG GCAGATCTTT GCAACTTGAG TCTATGCTTT AACTACCCAA
3051 AAGCCAGCCT TGACCCAGTG GGTACTGATG ACCCCAAGCT CAGGGAATTC

```

6.8 Sequenz des Klons 1247A41

```

1 GAATTCTAAG TACAGAAACA ATGGCCCAGA AGCAGGCAGG GCTCAGAGCT
51 TTATCGACAG CTTGACATGC AGGGTGCTGA TCTGCTCATG GGAAGGAGG
101 GATCTGTGGG GAGTCTGCAT TGTGTGGCCT AGGAACACGG GTGATTTGTA
151 TGCAGCAGGG CCTGGCCTCT GGGCCCTTGG GCTCCCTTCC TGTGACTGCC
201 AAGCTGTTGG CTCTGGTGGT CAGGACACCC AAAACAGCCC ACATGGCTCC
251 ACGGTCCAGC AGCAAAGTTT AATGAGAATA GTAGGTGTTT GTTCTGCCAG
301 GTGCTGGGGG CTGCTGGCAG GGTGGGGTGG GGGATACTGT GCTGGCAAAG
351 GGATACAATA TTGATAAACC ACGAGCCATG TGGCCCCAGT GAAGGGGCAG
401 AGGGATATTG GGTGGGATT TTTGTTGTTG TCGTCGTCTT TGGTTTTGTT
451 TTGAAATAAG GTCTTGCTAT AGAGCAGAGG TTGGCCTCGA ACTCAAGATC
501 CTCTTCTC AGCCACTTGA GTGTTAGGGA GACAGGCATG AGCCGCCACA

```

551 TGCACCTTCA GTGTCATTCT TAGTGAAACA GGTCAGGAGG GAGTGTGTGG
601 CCTCACTTGA GTTCCCGAGG GACCCCACTG CTATGCTGAT GACATCAGGG
651 ACAAGAGCAG GAGCAGAGGG TCGAGATGTG TAAGGATGAA GGCTCAGAGC
701 AAGCTGTGTA TACCTGGATG CACGGATGCA GGACCTGACC CAGCATCAAC
751 TACATGCTGA CTTTCAGGAC AATGCCCTTG CTAAGCCCGA ATCGCATCAC
801 AACATTGAAG CTGACTCTTA TCAAAACCAG TGTAAAGCAA CAAATCAGGA
851 ACCCATGGAT GAAATAAAGA GGGGAGAGAG AATGAACCAT GGCTGACTGT
901 AAGTAGATA ATTCAATCCC CTCTCCATCT TACCAATGGA GAAAGTGAGG
951 CACAGAGGTG TTAAACTACA TGTCCAGGTT GAAACAGGAT TTGAACCTAG
1001 AACCATGACC TTCGTCAC TGTCGCTCAG CCCATTTCTG GGATGGATGA
1051 TGGCCTATCT AGAGAGTGTC CATGTTGATG CTTCACTGTC GCAAGTACTG
1101 TCATCAGCAG AATCTGCATA TGTGCGTCAT TGCTCACGAG AGTGAGTATT
1151 CTGAAATGTA AATTTTCAGGG AGCCAGTCAT TCGAGACAAG GACTTGCATA
1201 TTCTGTGCTG TGACAGCTCC TGCCACATC CCTGGGTGAC AGAGATTGGT
1251 GCCCACC AAC CGTTACCTCC TCGAGTGTCT TGTTGTGTCC TAAGCAAACA
1301 AAACTGAGCC TCTGTGAGGA GGGTGGGACG GGAAGTAGGT AGTTGGGGGC
1351 CTGACTGGCT TTTTATAAAC CAGACAGACC CAGATCAATA ATGCATGCGC
1401 CCAAAAAGCC CGGCACATTA TCTCACAGTT GGCCACCACT GGCAAACCGA
1451 GGGTGGTCC T GAAAAATTCA TCGGCTGCTA TTTTCTGCTT GTCTGTGAGG
1501 CAGCTCCAGA GGGCCTCTGG CTGGAGGCC TCAACAGAG CTAATCTTGG
1551 GTTCCCTTCC AGTCCCAGGT GGGGACAGCT GTCCACACTC ATCAGGACCC
1601 AGTGAGAAGG GCTCAATCTA TCTCATGGTT GNTGGNTGTG GTCGCTTGCC
1651 TTTTCGTTGC ACCTGCAGTT CCTGGTGGCA TTTGGAATCG TTGGGTGCTG
1701 GGTTC CAGA GCACTAGTGA CTGAGCACCT GGGTTGTCTG TCCACTTTGC
1751 AGAGAGTGAG GACATCTCTA AAAATACACA GGAACACTAG CAGAACAGCA
1801 GCATGGGCTT ATGTGTGACA CCACAGTCC TGCACAACGG CTGCGCTGTG
1851 CCCAGGGAAG CCAAGGAAAT GCTGGGTTCT GCCAGCACTG ACCAAGTTAA
1901 GTGGATGCAG GCCAACTTCA GGCATCTCC AGAGCTCAGC TGGCTTCTGA
1951 GAGAGCCAG GGAGAGTAC ACATAGCCTG GAGCAGATCT ATTAGATAGG
2001 ATTGTTCCAT CATAAGTGTT AAAGGTCAGC TATGTGGCAC TGTCAGATGG
2051 GCCATTAAGG TGGTGTGGGG ACAGGTATCT CATCAGCTAT GACAGCTCAT
2101 GAATGAACCC AGGCATGGTT GTATATGTCT GTCACCCAG CACTCAGGAG
2151 GTAGAGGCAA GAGGATCACA AGTCCAGGCC AACCTGGAAG ATAATGAGAC
2201 TGTCTCAAAA AGAAAACAAA ATCAGACAAG CATAGGTCTC GCCTCTCCTG
2251 GTTACAAGTG ACTTCTTGTA ACTCAGCCCA AGCAATGCTG GATGAAGTGG
2301 AACCAGCAAC TTACTGGGGA TTGAAATGAG AAGTTCAAGC GTACTTGAGG
2351 TTTCAGGTGC GTTTAGATCC TTCTGCTCAC CGGGGACCAA GCCCGAGTCC
2401 GCATCCGACC AAGAGGCACC ATCCCAGCTT CCGTGTGTCT CGCCGTCCCC
2451 GGGTCTGTCT CTCTGTCTCT CCATCCTCGC TTCAGGCCGG GGCCCAGCCC
2501 GAGAGACATT GGCCCGGCC GTGCATCCTC CCTGCCTACC CCGTGTCTC
2551 TGTCTCCCTC CCTCTGTCCC AAGGCTCCT CCAGATGTCA CCGGTCTCTG
2601 TGTGACCTCA TCTCTACCTC TTCCAAGCTG GCTCTGCCTT CAGACAGCTT
2651 GCTAAGCACT TCTGTATAAG GCCAGTGCAG CCAGCAGGGC CATTAGACAG
2701 CCCAGAAATC TCTAGCCTGG GATTGAGGTG AGCTGGGCAG GTTTCCCTCA
2751 AGGGAAACTG GACATTGGCT CTGGAGGACA CAAGCAGCCG GGACTGTTAA
2801 GTTAGGGGGT GTTCAGCGTT TCCCCACACA TCTGCTGCAG GATGATGAAC
2851 CATGCGACCC TCACTTGCTC CGTCATCCTC ATTCACTGAG CACTTGTCTT
2901 TAGAGAAGGG TAACTAGCAA CAAAGTAACA AACTAGACAG AATCTTGA
2951 GATGTGCAAA GAGCAACAAA GTAACAGAAT CTTTACTGCA GCGCTGGGCG
3001 TCTAGCACAG CTGTGTGTCA ATAACCAAGA CAAAACACAC AAATAAAAG
3051 CTGGGCAGTG GCGGTCCACA CCTGTAATCC CAGCACTTGC AGACGGAGGC
3101 AGGAAGATCT CTGCGTTCCG AGATAGCCTG GGCTACAGAG TCACTTCTAG
3151 GACCGCTGA GCTACACAGA GAAACCCTGT CTCGGAAAAT CAAAACAAGA
3201 AGAAGGAGGA GGAGGAGAGG AAAAAAAAAA CTGCATATGA CAGGGAAGGT
3251 GGTGAGAAAG GATCAGAAGT CAAGCAAAGA GGAAGGGGAG TTGTGGGGGT
3301 GGGGAGGTCG TGTGAAACTT TATCCATAAT GATCTCATTG ATAAAGGGGA
3351 CACAGGATCA AGAAAGGCCA GGAACCTTAT TAACAGGAAT TC

6.9 Sequenz des Klons 1247A4F

```

1   GAATTCCCTC GGGACTGTCT TACTTCTACT TCTGGGACAT TCAGTGTATC
51  TACATTGGTG CTTCTGGAGG GGCCCTTGGC CTCTTGATAA GTGTACTTTT
101 GGGGGGATGA CCCTAATTTG GAGTAGTTCA GGGGCCAGCA CCATGGTGAG
151 GGAATCTCTC TGTTTCATGCG AGCCTCCTGT TCCCTCCAGA CTGGGTGGCA
201 GTGTGCATTG GTTTCTGGCA TCGGCTGGTA TCCTCACTCA GGAGAACAGT
251 GTTTGAAAGG GCCCTCCTGC AGTGCACAGG GAGGCCGCCA GCTTTCTTTA
301 GCTCCATGGG AGCCACTCTA CACCCTCACA CTGGGGAAAA GAGGTTCCCA
351 ATTCAGAGTG TGTATTTGTT TGTTTATTTA TCGTGGTGGT AGATGCTGTG
401 ACTCCGACAG GCTTCAAGCT TGTAAGTCTC CTGTCTCAGC TTCCGGAGCG
451 CTGTGATGGC ATTGTTACCT CACCTGCCAT TAAAAATGTG TCTGAAGATG
501 TCGTGGATTA AGGTGACGCC CAGTTGTGGG CTTGCCTAGC TTGTGCCTAC
551 CCTGAGTTTG ATCCCTGGCA TAGCATAAGC CATGGTGGTG CACCCCTGTA
601 ATCTCAGTAC CCAATAGTGG AGGTGAGGTC ATTCCCGGCT ACATGGCAAG
651 TTCAAGGCCA CACTGAGAGC TTGTCCCAA AACAACAGAA AAGAGTGGGT
701 TAAGCAAGGA AAGGGATAGG AAGGTGACAG GAATGGGGAC TGTGGCGTTG
751 GATTGAAGAA GTTGGGGGAC AGAGTTGGGG CCAGGAGAGA CACCAGGCAG
801 TCAGGAGGGC AAGGTTTAGG TGCTCCCTGT AGTCCTCTCT GGGTGCCTAT
851 GGGGACGGTG AGTCTGTCTT CTTGGCTGTC TTGGGTAGAT GAGGAGAGCC
901 CATAGGGGGT GGGAGGGTCA TGGAAGGGGC TGTGGAAACC CCTGCAGGAG
951 GGTGATCACT GCCTCCAGAG AGCATTCACA CTGCAGTGGG AAAGCTCTGC
1001 TCCCACCTCT GGGCGACGTG TTTGATCTCT CATGCCCAGC TGTCTCAGG
1051 GAAAACCTAG GCACGGTGGT TTTAAATGAC CAGACCAGGA ACTCAAAGT
1101 CTGTGCTTTT AGCTGTCATG CAGGGTGGAT CAGGGGAGGC CACCACATTG
1151 GCTCTCTGTG GTGGTAGATG AGGGTTTTAA CATGGCAGGA GGCCAAGGCG
1201 GCCAGTGTG ACCCTCAAGG ACGCCACCCT CAGTGAGCAG GCCAGTTTTT
1251 CCTTCTTAGT GTGTCTCAG TGGCCTGGTG CCATGACTCC CTTCCCAGAT
1301 CTCTGTGGAG AACTGAGGC AGGCACTGGG AATCACTCAC AGTCTTTGCC
1351 CCACAAAACA ACCCTCTCG GGGTGGGGTG GGGGGGGGAG AGGCAAATGT
1401 TCAAGGACAC TCTGTCAACC TGTCACAGCG CCTGGTTTGG AACTGGGTAC
1451 TCACCGTGCA GTGGGAGAGG TGACCACAGA CATAGAGGAC AGAAAGGCTC
1501 CACCAGCAAC AAAGAGGGAT GCAGACTCTG GGGCCCTCAG AGGGCAGGGC
1551 CCATTGCTAC CCTGGAGCAA GGGACAAGAG GAGGAAGCAA TCCACGTGGC
1601 CCCAGCAGAC CTGTGGCTAC AGATGGGGAG CTA CTGTTGGGG GAGGGCAGGG
1651 CGAAGGAGGA AAAATAGCCG AGCTCTCAGA TGGCTTCCAG AGGTGGATGC
1701 AGGCTCTGCT CCCTGTGGAG AGATCAAGAG AGTGAACAGC ACCCACCCAG
1751 ACCGTCCCCTG GTGCCCTCTT AATGATGCCA CCATGATGGC TGACTCCTCC
1801 TTGGGGGGCC CTCTGGAGAA GCATGTGGGT GCCCTAGGTC TCTGAGTTGT
1851 GTAGACTTTA GGTACGGCAT GGCCCTCTAG AACCTAGCCT CCCTCCCTCT
1901 GCAGAATTC

```

6.10 Sequenz des Klons 1077B41

```

1   GAATTCTATT GCTCTTCTCA TCACCGGAGC CTCAGCCATG CAGTTCTCCC
51  TGTGTCCCCA GCAATGCACT GCTCCTGCCC ACCCAAAGTG GGTGTGTACT
101 CTATGTCATG TACTGACTAT GAAAGGTGCC TGGTCTCCAG AAAAACACTG
151 AAAGGGGGAG CAGTCACAAG CACCCTGCAC AAAACCATAG TTAAGTTCTA
201 ATGAGACGCA ATTAGAAGCT CCCCACACAC TGTCCTGTGC ACTGAGTGAA
251 TAGAAAACAC TCTGGAGTAG GTCCCATTTT CCTTGAAAC CAAAGACTTC
301 CCTCCTTTCT TTGGAAAGAG TGTCACCTGT TAGAAATCTG AGGCTCTGGG
351 ATTCAAATGC AATGGGCTTG ACTGTAGCAC TCTGTAGTAC ATTTCTTGAC
401 AGTCCTGAAA AGACTACAGA ATTTGGCCTG TGCTCTCTG TGGGGAGGGT
451 GGGGGAGGGG GAGCGGGAAG TGTTTCAGCG GCAGTCAGAG GAGTGGGGCA
501 GATTGTTTTT CTTCCTCAGA AATCTCATTT ACCATGTCAC CTCACCCTTA
551 AAGTTAGAAC TATTTTGCGT TCATGCCCAT ACTTTTGAGC AAGAAGACAA
601 CCTAACCTTA AAAGTGTGTG GTAAACTGTC CAAGGCATAA CCCAATAGTC
651 TTATCCAGAG AGAAACACGG GCAGATATTG GTTAGCTTGC TAGAGGATAG

```

701	CAAGTTACCT	CGAAGATACC	TTTTTCCCC	TCTCCCTCCT	TATGACCCTC
751	TGTCCGGTTA	CAGGTATCTT	AGAGGATCTT	TTGCTTTATA	GGGTTCTTTT
801	TTTTTTTCTT	TTTTGTCTGC	ATTAGAATTA	AGATTTAAAT	GTTGTATCTG
851	CTAAACTCCA	GTGTCCTTAG	GCTTTCCCTG	TGCTTAGCAG	GATTTTGCTA
901	CTCTGTACCA	AGCTATTGTT	TCTCAGGATC	TTCAAAGGCT	CAAGGACACT
951	GGAATCTCCC	TCATATCAGA	AAGTCTGGCT	TTAATTACAT	GATTAGCCTG
1001	CATGCTTTTT	CCTTTGTGGT	TAAAGAGGAG	AGAGATTGAA	ATGTGCTTAC
1051	TGTTTATTCT	ACAGAATGTC	TGAGATGTTT	GGATCCCAA	TGGCTTGTTT
1101	TGTTCTAGAA	TTGAGAACTG	ATAGAATTGT	AGACTCCTTC	ACACGGGGAA
1151	GGAACTAAT	AAATGAGGGA	ACAGCGCTAT	CTAAATGACT	TATGGAAGTG
1201	TGTGTTTTGC	TAACCAGTGT	CAGACCTGTG	CCTTTCAGGT	TCCCTGCAAG
1251	TCATGAACAA	GACGAGAAA	ATCATGGAAC	AGGGTGGGGC	CACCTTACC
1301	AATGCCTTTG	TGACCACGCC	CATGTGCTGT	CCATCACGCT	CATCCATGCT
1351	CACTGGGAAG	TACGTGCATA	ACCACAATGT	CTACACCAAC	AATGAGAACT
1401	GCTCGTCTCC	CTCGTGGCAG	GCAATGCACG	AGCCTCGGAC	CTTTGCTGTG
1451	TATCTCAACA	ACACCGGCTA	CAGAACAGGT	AAAACATGAC	GTTCTTTTCC
1501	CCCCACAGTC	TCAGATGAGG	GGAAGTGCAC	TGGGTAATAT	TATATATGAG
1551	AAGTTCAGG	AGACTCAACA	ATGAAGAGTC	TAACCTCTCT	CGTCTCTGCC
1601	TTGGTCCATG	TTCTGTTGCT	ATAACAGAAT	CCACGAGGCA	GGGTAACCTA
1651	CTGAAGAAAA	AGGTTTAAGG	AGCATAGAGT	CAGTGGGTCA	AAGTTGCAAG
1701	AACATGCTAG	CAGCTTCCAG	CAGAAGATTT	TATTTCTCAAT	CATTAATGGC
1751	AACGAGTGAA	AAAAACAAG	TTAAGTGCC	TGGGAACACA	AGGCTGGCCT
1801	CACTTCCTAG	TAACCTTGTC	AGGAGGCAAA	AACTACTCCT	GGGAAAGGTA
1851	CTTAGCGACC	TACTTAGGTC	TAAACACTCA	AATTTTAAAG	AAGATAAGCC
1901	ATATTAACAC	CAGAGCAAAA	AGTGTTTTCA	CTCAGGAGGA	TGTACCAATG
1951	TGACATCCCT	TATAGAAAAC	CCAGGACTTG	GGCTGGAGAG	ACCACCTCAGT
2001	GGTTAAGAGC	ACTGGCTGCT	CTTCCAGAGG	TCCTGAGTTC	AATTCCCAGC
2051	AACCACATAA	CCATCAGTAA	TGGGATCTGA	TGCCCTCTTC	TGGTGTGTCT
2101	GAAGACAGTA	AGTGATAGTG	TACTCACATA	CATAAAATGA	ATAAGTATTT
2151	TGAAAAGAAA	AGAAAATCCT	GGATTCTCAG	TGGGTGCCGT	ATGAAAATAT
2201	TCCCATGAGG	GCCCCCAGCG	AGTGGAAATAT	TGCAAGGTGA	CATGCCATGA
2251	ATGAGGTTAC	ATTCCCTTCA	CAAATCTCAA	GGGTTAATGG	GAAAACCTGG
2301	GGATTTTCTT	AGATGCAGGT	AACCCCTGCT	GGTTTTTCGG	GAGAAATCTC
2351	CAAGGTCTGT	TCACTCAGTG	TCTATGCAAG	AGCCCTGGAT	GCGGTAGATG
2401	GGCCAAATAA	CTTCCCGAAT	GGATGGATGA	GTACGCCAGT	CTCTGTGGAC
2451	CCTCCTCATA	TGTTTCATTTA	CTCAGACGTA	GTTAATGGGG	CTTGAACCAT
2501	TGCTTCTGCT	GAAGTCTCAG	GACTAAGCAT	TCACGGTTC	TTCCAGCAGA
2551	CGAGCTGTCT	CTGTTGTCCC	AGCTCCCAAC	CCTGAACCTG	CACACAGCAA
2601	AATGAGGGTT	ATGGTTAGCT	GGGATTTTGA	AAGCTGGACT	CTTTTGAGAG
2651	GGATTCTGAG	GCAGGAATAA	AGAAGAATGG	CTTCCTGGGA	ATATCATCCT
2701	AAAGCCCTTA	TTCTCCCGCA	CTGGGTACTG	CTTCCAGTTT	ACTTAGCATT
2751	TCTTCATGGA	TGCACATGGA	GGGTTTGCCT	AGTCAAAGGT	AGGGTTGGGT
2801	TCTCTACCTC	AAGATCCACT	TAGATTCAAT	CATGAGAATT	GAAGATGACA
2851	TCAAAAAGGC	TTATTGGAAA	TAATTTTTAG	GCCTCCAGAG	TATCTGTTCT
2901	CAAAGCTTAA	AACTAAAGAA	TTTCAGAAAA	ATATTCTTTT	GGATCTCTTT
2951	TTTTAATCTC	TCCCAACAGG	CTCAGAAAAT	ACGTAGTCAT	TTTCTTTTTT
3001	ACAGCAAACC	CCATGGGCAC	TTAATTCTTG	TTATTTATGG	ATGAAATGGT
3051	TGATTGTACA	TATGGGAGCT	TCACCACATA	GGTATCAGAG	GATTCTGATT
3101	CACAGAGGAC	ACCCCTGT	ATCTCAGGGG	TGTTTGCTTC	TGGTTAGTGG
3151	GGACTTACAG	AGGGTATCTT	CTCCTAGTAT	GTCCTCTCAC	ATTAATGGTT
3201	TAAATTTATG	GCACCTTTCA	TCTTAGGACT	CTCTAGCAAT	TTGCAAATCC
3251	ACCAAGCATC	TGTGCCATCC	AGGTTGGCAA	ATGTGCTTGG	CCGTACCATA
3301	CAACTGGAGT	AGGGGCTTCA	GAAACTGTGT	ATGGCTAAAC	CTCAGAAGCA
3351	GGTTTAAAAC	AGTCCCTTAA	TACCCGGTGC	CTAAGTAGCT	GTACAGGCTA
3401	GTTTTGTGTC	AACTTGACAC	AGCTGGAGTT	ATCACAGAGA	AAGGAGCTTC
3451	AGTTGGGGGA	ATGCCTCCAT	GAGATCCAAC	TGTAAGGCAT	TTTCTCAATT
3501	AGTGATCAAG	GGGGAAGGC	CCCCTTGTGG	GTGGGACCAT	CTCTGGGCTG
3551	GTAGTCTTGG	GTTCTATAAG	AGAGCAGGCT	GAGCAAGCCA	GGGGAAGCAA
3601	GCCAGTAAGG	GAACATCCCT	CCATGGCCTC	TGCATCAGCT	CCTGCTTCTT
3651	GACCTGTTTG	AGTTCCAGTC	CTGACTTCTT	TGATGATGAA	CAGCAATGTG
3701	GGAAGTGTA	GCCGAATAAA	CCCTTTCCTC	CCCATTGCT	TCTTGGTCTAT
3751	GATGTTTTGTG	CAGGAATAGA	AACCCTGACT	AAGACAGTAG	CCATCAAATG
3801	TGTTTTGTTC	ATGAGAAGCG	TGTGAAATCA	GTGCCTTTGC	TTTTCCCAGG

```

3851 ATCCCTGTAG TACAATGTGG AGCTGGGAAG ACTGAACTGT CTGCACACCC
3901 AGAACATATG GATGCTTTTG TGCTCAGGGA TGGAGCTGCA GGGTTGGGCT
3951 TAGGGCAGCA CCTAGGGTGT GTTGATTTGT TTCAGGGATA ACTTTCTCAG
4001 AAAAGTGAGG AAGACGTGGA TGGGCATCTA TGGCTTACCC ACTCTGTCTT
4051 GGACACTTTA GTTATGTCAT CTAGGTCTTA CAAAAAActT GGAGGAAGGC
4101 TATGGTACCA AGGAAGAAAC CAGGACTCAA GAAGACTCCT TGTCAAAGGA
4151 CAAAAGTCCC TCCCTGATGG TGCATAGTTT TCCAGGAGCC TTTTGGTTGT
4201 CTTTTATGAC GGGGCTTCTA TAGTCTCGGC TCACCTCAA CTCAGTACTT
4251 GGAGCTTTTG ATCATCCTCC CTTCCTGCAG AGTGCTGGGA TATAGCATAT
4301 GTCGCTATGT CTGCTGTCTC AGATCATATT TCTGTGCAT

```

[1.8 kb nicht sequenziert]

```

6101 TTTTATTAGG CACAGAAAAG TGAAATGTTA TATATATCTA TTGGATCAAG
6151 GCATACTGCG GGTACACCAG ACCCTGGGAT ATAAAGAGGC AAGAGTCCAT
6201 TCTTCAAGAT GCTTCCACTC CATTTGAGTA GCCCAAATTC ATAAGTACAG
6251 ATGCATCACA AAGTAACACA GTTCTCAATT ATGTCATAGT CACTACAATA
6301 AAAGTGCCCT AGGCATTAAT ATGTCATGAC AACATCATTC ACTATACTAA
6351 ATAAGGTTCA ATTTTTCTAA GCACCACATC TTTTACAGTT ACTATGATGT
6401 AACAAAGGAT TTTCTTCNAG ACAGTGAATG CATTTTTTTC TAATGCAGTA
6451 GATTAACCTA AGCAGAAGTT GTATGACACC TCCCCCCTC CCCTGACACA
6501 CACACACTAA CAGTTATAAT CCAGTCTTTC TTACTTCTTC TTTCCAGCTT
6551 CAGCCACTAC CTTACACAGC TGTGAAGGCC AGTGGTAATG CCTAAAGGAA
6601 CAAAATGGTT CTGAAAGCCA TGCCCACGTT GGGTAACTCT AACAAACCCG
6651 TTAAGTGAAG GAGGAAGAAA ATTCAGTACT TATACCCAAG CCATTGGCAT
6701 GGTAGTATGG ACCTGGGAAT CAAGTTCACT TTAGAGAGAG ACATAGGTGA
6751 ATAATACGCA TGGAGCAGAT TGAAGTGAAG CCCATAAAAT CAAGTGTAGA
6801 GCACTGCCAA GACATTTAAT ATCCAGAGAA GCCAGGGGAT GGTTAGAGAT
6851 GGCTGGAGGC TCCAAAATGA TGAGACTAAG TTGTGCTGCC ATCCTGGGCC
6901 TGGGCACTCT TGCAAGTGAAT GTGGTCCGCA ACAGCACATC TGGAATCCTG
6951 AATACATTTT TCACACTCCA TGAACACAAA GACTTGGAGG CAGTTCTGAA
7001 GGCAATGGCA AGAACTGTTA ACAGACATGA AGGCGTCATT TATAAGGGAA
7051 GGATTAAGGC AAGGGGCACT CACTGTAGTA ATGGCTAGAA ATGGTACAAA
7101 GTGACCTAAA AAGTCCAGCC ACGAAGGAAA GGCAGGCATG ACTGGGCATG
7151 GCTGCCCTGA AGGCGGGAGC ACCGAAAGGA GCAGGGAAGG TTTGAAAATC
7201 AGCTAAGGAA AATGGAAACC ACAGGAGAGA TACTTGGTTT CTACAAAGTA
7251 AGTCATAGAG CAAGGTGTCC TTCAACCAGA AAATGGTAAA GTACTTAAAA
7301 TATGGGATTG TGTGAGAAGC CCCAGTATAT GTCAAGCACT GTTTTAGGTC
7351 CTTTACCTCT TGATCAGGCT CTTCGGCCCA CACAACACCC TACCATTATG
7401 CTCTCCAC TCAGGTCTT CAGAGCGGTG TAGGAAGGAG GAGATGGGAG
7451 CAAGCCTTTA GGTGCCGTGCA AAGCCTGCTC TCAGCTACAA AGTCCAATTG
7501 CTATGCTATG CTCTTTTACA AAACCTCTCT GAAAGCAAAT GGGTAAAAAA
7551 GTAGGGTGAG GCCCTTAGGG ATAAGGAGGA AGACAGAGCA GGGCAGGGTT
7601 AAGCACAAGC TCCAGCACA GCCTCTTCTC GAATCAGAA CGAGCAGGAA
7651 CAAGGGTCTG GGCTGCTTCT CAGATTGAAT TC

```

6.11 Sequenz des Klons 1001C12

```

1 GAATTCCTAG TTAAGGAGAC TTGGTAAATG CAGTCTCTTT CCAGAGGTAG
51 CTGTGGGTCT TGGAGATGGT ATCAAAGGTA ACCTTGGCAA AGTTGCCAG
101 GGTGGCAGTG CAGCCCCTGG CTGATGTGTA GCAGTCATCC ATACCATCTG
151 TTGTCATCAG TAGCTTCTTG GGCACAGGAG TAGAGACACA CATAACATA
201 ATTACAAATA AAAAATTCTT CTCTTCTTCT TTCTTCTTCT TCTTCTTCTT
251 CTCTTCTTCT TTCTTCTTCT TCTTCTTCTC CTCTCTCTTC TCCTTCTCTT
301 TCTCTTCTCT CTCTCTCTTC TCTTCTCTTC CTCCTCTCTT TCTTCTCTCT

```

[350 bp repetitive Sequenzen]

```

701 CCTCTGGGGG CAGGGATGAG AGGCACCAGC ACAGAGGCAC AGTGGCCTGT
751 CACTCTGCGT GGAGCTTGCT AATCTTGTTT CCCCAATAGC CTCTCTGCAT

```

801 AGGGACGATG ATGGCCGAAA TGATAGGATG GTCCCTTGTA TGGCAGTGGC
851 TACCTCCTTG GAGCACCTGA CGCCAAGACC AACATGACCA TCCTTTCTTT
901 AGGGATTCTC CCAGGAAAAA GTCAATAATC TCAGATTCAT AATGGGCAGG
951 GAGATTTCCCT CCAGGGATTA TGGCCTCATA AGCCTAGGTC CCAGGTCCTC
1001 AAGACCTTCC CACTACACCT TGTCATCTGC CATTTGCTGT TTCCTGAAGA
1051 AGAAGCAACT ATTTTTTTTT ATTTTTAATT ATGTGTGTGT GTATGTACGT
1101 GGGAGTATTC ACACACGAGG ACAATTGTCC ATGGAAGCCT GAGGAGGGCG
1151 TTGACCCCA CCCCACTCCG GGATTGGAGT TACAGCCTGC ATACCATGGG
1201 TGCTGGGAAT GGGACTCTCT GGTCCCTCTGA ACGAGCAGTC TGTACTTTTA
1251 ATCATGAAGT TGTCTCTCCT TCATGTCTGT TTCTATCCAT GGATGATTCT
1301 AAACCAGCTC AAATATTGAT TTGGGGGGCA GAGGTTACA AGCTCAAAGA
1351 AGTGAGTGAC TTTGACATCC AGAATTTGTA AGTACAGAAG ATAGACCCTG
1401 TCAATNTGAG TTAACCTCAG ACTTTTTTTTT TTTTTTCTCC CCGGGCTTCA
1451 TGTTCCCTGA GCACCATGGG TGATTTTTAA AGCTTTTCTC AGGACTGCCT
1501 TTCTAGTTCC TGAGTGAGTC CCCATTGCTT TTCGGTTGGC TTCCTGTAGC
1551 TGGCCAGGTC CTGATCGAGT TACCCTTTCC TTACAGGTTT GTAGACTTCC
1601 ACGCAGCTGC TTCTACCTGC TCCCATCCC GAGCCTCCCT GCTCACTGGC
1651 CGGCTGGGTC TACGGAACGG AGTCACGCAC AACTTCGCAG TCACCTCTGT
1701 AGGGGGGCTT CCAGTCAACG AGACCACCTT GGCAGAGGTG CTGCGACAGG
1751 AGGGTTACGT CACTGCCATG ATAGGTAACG TGCCCTGGGG AGCTGCTTCA
1801 AGGTCTCAGC GTCTCTCAAT GGCTCCTGCC TCTTCTGCTC ACATCTGTGG
1851 TTTTGTCCG TTTCTTGCCG GGTGTGGTAG GGATGCTCTC AGATAGCTTT
1901 AAGTCACTGG AAAGACCTGA CTCTGGCCCC GGAAACACNC ATAGTTCTTT
1951 TGTCCTATGA TAATAAGCTT TGTGGTAAGT GATTGCATCC ATGGGTCAN
2001 ATCATCCCAA AGATACCTTG GGGAGTTTTT CAGACTCTCT TCAGCTAGGG
2051 TGAGCATGCT GGCTTTTGTT CTTGCTCCTG TGGCTGCCAT GGCTCATCTT
2101 CGGGTCTCCT CGTTATAATT AGGTTGAGG AGGGAGAAGA GAGAGTAGGT
2151 AGCAGGTTCA TGGACCCACC CACTCCCATC AAGAACTGA ATCTTTTGT
2201 TAAGGTAAGT ATTCTTTCGT CCCAAGAACT GGGCTTAAAT CTTACTGTCC
2251 AGAGATGGGT GGTCTGGCTC CTGGGTGCA AAGAAGGCTG GGAACTTGA
2301 GACAGAGTTA TCATCATGTA CATGGCCCTG GCGGTGGTCA TCTTGAACAA
2351 ACTGACAGTC TAGGCTAGGA GTGCCTCAGG GATGGAACAC CTACCTAGAA
2401 TGCACAGCGT ACTGGGTGCC ATCTCTATAG ACAAGCAGAC AGCCCTGCCC
2451 CACCCACCA TAAATGAGGG CCTGGCTATA GGATAGGAAG ACAGCAGTTG
2501 ATTCCCTATT GCCCAACTGA TTCTTTTCTT CTCTCCCTCC CTCCCTCCCT
2551 TCCTCCCTCC CTCCCTTGCT TCCTTCCCTC ATTTTTTTAA AGAGTCTCAC
2601 ATGTTTCAAG ATGGCTCAA CTATTCTAG ATCCTCCTGC CTCTGCCTCC
2651 TGAAGGCTGG AATTTTAGGC ATGTGCCACC ATGCCCCGTT TTCCGTGGTC
2701 CTGAGCACAG AACCCAGGAC TTCGTGGGTG CTAGGCAAGC ACTCTACCCA
2751 ACTGCATCCC TAACCTTCTT TGTTTTTGAA AACTGTCTT ACTACGTAGC
2801 CCAGGCTAGC CCCTAACATA CAGTCCGTGT TGCAGCCTT GAGTGTGGG
2851 ATTCCAGGCT TCTCTTGCTT GTATATATAT TTTTTTAAGA CACCTCTTAC
2901 TCAGCGCAGC TTAGGATGCA TTTGTTTACA CAGCATCATT ATTTCTTAT
2951 TATAGACAG GAGAGAACTA TGCCAGCAT CTGACCCAG CTTTCTCCAG
3001 ATGCTGGAGC TCTCCCTGCT CTTTCTTGCA GATGCTGAGA CCACAGTCTA
3051 AGTTCCTACA GTCTCCTCAG CTTTGTGTTGT GATGGTTAGT TACTTACACA
3101 GAGTCAATC CAGTGGGATT CCTGCATCTC TCTACCAAAG CGAAATGGCA
3151 AGGGAGGGTG TGCCAACAGG CTTGTGACAG CGAGGGTCCC TGTGGAGGAG
3201 AACTGGTCT CCTGAGCCTT CTGTGTTGGC TTGGAGGATA TTGCCTTACT
3251 CCAGACCAA GGCTGACATC TCTGGTGTTC CCTTGCCTAC TCAGGGTGAC
3301 ATTCATTGTG TCAGGAGGAG AAGCCTCAGG CATGGGAAGG AAGGGACCAA
3351 TTAAGTGTGA CTCTTCTCCC TTTCTAACTT CCTGTACTGG CTAGTTTTAT
3401 GCTAACCTGA CACAAGCTGA GTCAGCTGAA GGGAGGGAAG CTTAATTAGG
3451 AAAATGCCTC TATGATCCAG CTCTAGGACG TTTTCTTTCT TTCTTTGTTT
3501 CATTCATTCA TTCATTCAAT CTTTTTTTTT TAAAGATTTA TTTATTTTAT
3551 ATGAATACAC TGTGACTGC TGCTGTCTTC AGACACACCA GAAGAGGACA
3601 TCTGATCTCA TTACAGATGG TTGTGAGCCA CCATGTGGTT GCTGGGAATT
3651 GAACTCAGGA CCTCTGGAAG AGCAGTCAGT GCTGTTTTGT TTTGTTTTGT
3701 TTTGTTTTGT TTTGTTTTGT TTTTCGAGAC AGGGTTTCTC TGTGTAGCCC
3751 TCCTGGCTG TCCTGGAAC CACTCCGTAG ACCAGGCTGG CCTCGAATTC

6.12 Sequenzen der verwendeten Primer

6.12.1 PCR- und Sequenzierprimer

AK-30	5'-CGG ATC AAG CGT ATG CAG CCG -3'
m1001_Ac	5'-CTA CGG AAC GGA GTC ACG-3'
m1001_C11_rein1_F	5'-CAT GTG ACT GTG GTT GCT C-3'
m1001_C12_flank3_nc	5'-TTC CCA GCA CCC ATG TAC C-3'
m1001_C12_raus1_c	5'-CAG ACT CTC TTC AGC TAG G-3'
m1001_C12_raus1_F	5'-TGT CCT GGA ACT CAC TCC-3'
m1001_C12_raus1_nc	5'-AAG GTG GTC TCG TTG ACT G-3'
m1001_C12_raus1_R	5'-CCT CTG GAA AGA GAC TGC-3'
m1001_C12_raus2_c	5'-TGC CAT CTC TAT AGA CAA GC-3'
m1001_C12_raus2_nc	5'-CTT CTT TGA GCT TGT GAA CC-3'
m1001_C12_rein1_F	5'-CTT GGG CAC AGG AGT AGA G-3'
m1001_C12_rein1_R	5'-CTA GAG CTG GAT CAT AGA GG-3'
m1001_C12_rein2_nc	5'-GCT CTG TGT AAG TAA CTA ACC-3'
m1001_C13_rein1_F	5'-GAC TCA GGC TGC AAT CTG G-3'
m1001_C15_flank1_c	5'-GGT CCT ATC TGT AGT CAG G-3'
m1001_C15_flank1_nc	5'-TAG TGA GAT GAA GAC CAG CC-3'
m1001_C15_rein1_F	5'-CTA CCC TGT CTA AGC TCC-3'
m1001_C15_rein1_R	5'-ACA GAC AAC GTG CTC AGA G-3'
m1001_C16_rein1_F	5'-CAG ACT CTA CAA GAG GAA AC-3'
m1001_C16_rein1_R	5'-GAT GCT CAG GTT GTC TCA AC-3'
m1001_C17_rein1_F	5'-CTC TCA TGT CCT GAA AGC C-3'
m1001_C17_rein1_R	5'-CTG TTT CAG AAG AAT CCA AAG G-3'
m1001_Enc	5'-CAT CAC AAG CTT TGG CTC C-3'
m1001_flank2_nc	5'-TGG GAA TTT GAG TTC ATG CTC-3'
m1001_M2_147nc	5'-TCT GCT TGG TTG GAC TTC C-3'
m1001_neocon_c	5'-TTT GTA GAC TTC CAC GCA GC-3'
m1001_Sonde5'_c	5'-GAG TCT CTC ACC AAA CCT G-3'
m1001_Sonde5'_nc	5'-CGG GGG AAG AAT TAA CTC TG-3'
m1077_B41_flank1_nc	5'-AGG AGC AGT GCA TTG CTG G-3'
m1077_B41_flank2_nc	5'-GGA GTT GAC TAA TGG CTC AG-3'
m1077_B41_Mitte2_c	5'-TAC TTA GCG ACC TAC TTA GG-3'
m1077_B41_Mitte2_nc	5'-CTG AGT GGT CTC TCC AGC-3'
m1077_B41_raus2_c	5'-CAC CAC ATA GGT ATC AGA GG-3'
m1077_B41_raus2_nc	5'-CCT GAG CCT TTG AAG ATC C-3'
m1077_B41_raus5_c	5'-CTC GCC TGA TGG TGC ATA G-3'
m1077_B41_rein3_nc	5'-AGG TAG TGG CTG AAG CTG G-3'
m1077_control1_c	5'-CTA ACC AGT GTC AGA CCT G-3'
m1077_control2_c	5'-TCC CTT CAC AAA TCT CAA GG-3'
m1077_Ec1	5'-CGT GGA AGG ACC ATA AGG C-3'
m1077_Ec2	5'-TTA CCT GCT TCA CCC ATG AC-3'
m1077_Enc	5'-GAT CCC AAG TTC CAG AAT GG-3'
m1077_Enc2	5'-TCA GGA GTT AGT CCA GTC C-3'
m1077_flank5c	5'-TGT TGC TGC AGC AAC ACC-3'
m1077_Mittel_c	5'-CTG TGT ATC TCA ACA ACA CC-3'
m1077_Mittel_nc	5'-CAG ACC TTG GAG ATT TCT CC-3'
m1077_neocon_nc	5'-CGA GCA GTT CTC ATT GTT GG-3'
m1077_raus1_c	5'-CTG GGA ATA TCA TCC TAA AGC-3'
m1077_raus1_nc	5'-CAC AAA GGC ATT GGT GAA GG-3'

m1077_raus3_c	5'-GAA TGC CTC CAT GAG ATC C-3'
m1077_raus3_nc	5'-GTG AGG TGA CAT GGT AAA TG-3'
m1077_raus4_c	5'-CCT GAC TAA GAC AGT AGC C-3'
m1077_rein_F1	5'-CAG TGC TTG ACA TAT ACT GG-3'
m1077_rein_R1	5'-TTG ACT GTA GCA CTC TGT AG-3'
m1077_rein2_nc	5'-ATT CAG GAT TCC AGA TGT GC-3'
m1077_RTc	5'-GGA TAC CTA ATT CAA GCT CCC-3'
m1077_RTnc	5'-CAC AGC TAC ACT CCT CAG G-3'
m1077_Sonde_3'_c	5'-TCT CTC CCA ACA GGC TCA G-3'
m1077_Sonde_3'_nc	5'-AGC CTG TAC AGC TAC TTA GG-3'
m1077_Sonde_5'_c	5'-GAA ACT TTG AGA GCT GGT TC-3'
m1077_Sonde_5'_nc	5'-GTG TTG CTG CAG CAA CAG C-3'
m1247_365nc	5'-GCT CCA CAT CCT CGT CAT C-3'
m1247_369_c	5'-GCT CCA TGC AAG TGA TGA AC-3'
m1247_514_c	5'-CAC CAA CAA TGA GAA TTG TTC C-3'
m1247_608_nc	5'-CTG TCC GGT AGC CTG TGC-3'
m1247_A41_rein_c	5'-AAA GTT TAA TGA GAA TAG TAG G-3'
m1247_A41_rein_nc	5'-AAC GCA GAG ATC TTC CTG C-3'
m1247_A41_rein2_c	5'-AGC ATC AAC TAC ATG CTG AC-3'
m1247_A41_rein2_nc	5'-GCT GTC TGA AGG CAG AGC-3'
m1247_A41_rein3_c	5'-CTG TGC TGT GAC AGC TCC-3'
m1247_A41_rein3_nc	5'-GAG ACA GTC TCA TCA TTA TCT TC-3'
m1247_A4F_6c	5'-GTG TCT GAA GAT GTC GTG G-3'
m1247_A4F-nc	5'-AAC CTG GCC TGC TCA CTG-3'
m1247_Anc	5'-CGA CCC ACT CCT TCC AGC-3'
m1247_E2_nc	5'-AGG GTG CAG GCT GGA GC-3'
m1247_Ec	5'-ACT GCC ATA AAA TCA GTT ACC-3'
m1247_Enc	5'-AGC TGT CCC AGT GAT TTG G-3'
m1247_flank1_c	5'-TGA GTC TAT GCT TTA ACT ACC-3'
m1247_flank1_nc	5'-CAA ATG ACT AGG TAA CTA GAG-3'
m1247_flank2_nc	5'-CCA CAT GCT TCT CCA GAG G-3'
m1247_flank5'_c	5'-GAC TTT AGG TAC GGC ATG G-3'
m1247_Mc	5'-CTG AGT ACC AGA CAG CAT GC-3'
m1247_neocon_c	5'-TCT GCA TCC AGG AAG AAG C-3'
m1247_neocon_c	5'-TCT GCA TCC AGG AAG AAG C-3'
m1247_raus1_c	5'-ATA CCT CCA TAG TCA ACA GG-3'
m1247_raus1_nc	5'-TAT CTA CTT CTT TGA TCC TGC-3'
m1247_raus2_c	5'-TCT GTA TCC TCA GTT CTC C-3'
m1247_rein1_c	5'-GCT GAC AGC TAA GCC ATC C-3'
m1247_rein1_nc	5'-CTG TCT AAG ATG GCA TGA AC-3'
m1247_RTm_c	5'-CAT GGT CAT CAG CCA CGC-3'
m1247_Sonde3'_nc	5'-CAG CAT GTA GTT GAT GCT GG-3'
m1247_Sonde5'_c	5'-GAC CTG TGG CTA CAG ATG G-3'
m1247_Sonde5'_nc	5'-CCA TGC CGT ACC TAA AGT C-3'
m1247_Start_c	5'-TCC CTG CTG GCT GGC AGC-3'
m1247_Startc	5'-TCC CTG CTG GCT GGC AGC-3'
neOD2	5'-CCG TGA TAT TGC TGA AGA GC-3'

6.12.2 Vektorprimer

M13F	5´-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3´
M13R	5´-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C-3´
M13R-3	5´-ACA GGA AAC AGC TAT GAC C-3´
pME-3´	5´-CGA CCT GCA GCT CGA GCA CA-3´
pME-5´	5´-CTT CTG CTC TAA AAG CTG CG-3´
T3	5´-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA-3´
T7	5´-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GG-3´

6.12.3 Mutageneseprimer

m01_StuI_c	5´-GCT GCG ACA GGA GGC CTA CGT CAC TGC CAT G-3´
m01_StuI_nc	5´-CAT GGC AGT GAC GTA GGC CTC CTG TCG CAG C-3´

7. Literaturverzeichnis

Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CP Jr (2003): QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J Cell Biol* 162, 341-351

Aikawa J, Kojima-Aikawa K, Tsujimoto M (2001): Biological functions of *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferases in the biosynthesis of heparan sulfate/heparin. *RIKEN rev* 41, 35-37

Ballabio A, Shapiro L: STS deficiency and X-linked ichthyosis; in: The metabolic and molecular bases of inherited disease; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D; McGraw-Hill, New-York 2001, 4241-4262

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF (2003): Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 915-925

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256

Brocard J, Feil R, Chambon P, Metzger D (1998): A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res* 26, 4086-4090

Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RS, Wilson VA (1998): Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev* 12, 1894-1906

Chang BH, Liao W, Li L, Nakamuta M, Mack D, Chan L (1999): Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse. *J Biol Chem* 274, 6051-6055

Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, Newbold RF, Grompe M, Parenti G, Ballabio A (2003): The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* 113, 445-456

Daniele A, Parenti G, d'Addio M, Andria G, Ballabio A, Meroni G (1998): Biochemical characterization of arylsulfatase E and functional analysis of mutations found in patients with X-linked chondrodysplasia punctata. *Am J Hum Genet* 62, 562-572

Dierks T, Göttingen: persönliche Mitteilungen 2001

Dierks T, Miech C, Hummerjohann J, Schmidt B, Kertesz MA, von Figura K (1998): Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *J Biol Chem* 273, 25560-25564

Dierks T, Lecca MR, Schlotterhose P, Schmidt B, von Figura K (1999): Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *EMBO J* 18, 2084-2091

Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K (2003): Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* 113, 435-444

Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM, Emerson CP Jr (2001): Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* 293, 1663-1666

Dymecki SM (1996): Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6191-6196

Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156

Evers M, Saftig P, Schmidt P, Hafner A, McLoughlin DB, Schmahl W, Hess B, von Figura K, Peters C (1996): Targeted disruption of the arylsulfatase B gene results in mice

resembling the phenotype of mucopolysaccharidosis VI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8214-8219

Feinberg AP, Vogelstein B (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13

Ferrante P, Messali S, Meroni G, Ballabio A (2002): Molecular and biochemical characterisation of a novel sulphatase gene: Arylsulfatase G (ARSG). *Eur J Hum Genet* 10, 813-818

Fiering S, Epner E, Robinson K, Zhuang Y, Telling A, Hu M, Martin DI, Enver T, Ley TJ, Groudine M (1995): Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev* 9, 2203-2213

von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J: Metachromatic leukodystrophy; in: The metabolic and molecular bases of inherited disease; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D; McGraw-Hill, New-York 2001, 3695-3724

Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellen L (1999): Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 400, 773-776

Franco B, Meroni G, Parenti G, Levilliers J, Bernard L, Gebbia M, Cox L, Maroteaux P, Sheffield L, Rappold GA et al. (1995): A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* 81, 15-25

Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106

Hayashi S, McMahon AP (2002): Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* 244, 305-318

Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lullmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G et al. (1996): Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14821-14826

Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1994

Kellendonk C, Tronche F, Casanova E, Anlag K, Opherk C, Schutz G (1999): Inducible site-specific recombination in the brain. *J Mol Biol* 285, 175-182

Kikuno R, Nagase T, Ishikawa K, Hirosawa M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O (1999): Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 6, 197-205

Lai J, Chien J, Staub J, Avula R, Greene EL, Matthews TA, Smith DI, Kaufmann SH, Roberts LR, Shridhar V (2003): Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer. *J Biol Chem* 278, 23107-23117

Lai J, Chien JR, Moser DR, Staub JK, Aderca I, Montoya DP, Matthews TA, Nagorney DM, Cunningham JM, Smith DI et al. (2004a): hSulf1 Sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling. *Gastroenterology* 126, 231-248

Lai J, Chien J, Strome SE, Staub J, Montoya DP, Greene EL, Smith DI, Roberts LR, Shridhar V (2004b): HSulf-1 modulates HGF-mediated tumor cell invasion and signaling in head and neck squamous carcinoma. *Oncogene* 23, 1439-1447

Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr, Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992): Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6232-6236

Lee YH, Sauer B, Johnson PF, Gonzalez FJ (1997): Disruption of the c/ebp alpha gene in adult mouse liver. *Mol Cell Biol* 17, 6014-6022

Li JP, Gong F, Hagner-McWhirter A, Forsberg E, Abrink M, Kisilevsky R, Zhang X, Lindahl U (2003): Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J Biol Chem* 278, 28363-28366

Livy DJ, Wahlsten D (1991): Tests of genetic allelism between four inbred mouse strains with absent corpus callosum. *J Hered* 82, 459-464

Magara F, Muller U, Li ZW, Lipp HP, Weissmann C, Stagljar M, Wolfer DP (1999): Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4656-4661

Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638

Merry CL, Bullock SL, Swan DC, Backen AC, Lyon M, Beddington RS, Wilson VA, Gallagher JT (2001): The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st^{-/-} mutant mouse. *J Biol Chem* 276, 35429-35434

Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR (1998): An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18, 136-141

Mori A (1968): Hereditary hydrocephalus in C57BL mouse. *Brain Nerve* 20, 695-700

Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD (2002): Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *J Biol Chem* 277, 49175-49185

Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Hirosawa M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O (1999a): Prediction of the coding sequences of unidentified

human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 6, 63-70

Nagase T, Ishikawa K, Kikuno R, Hirosawa M, Nomura N, Ohara O (1999b): Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 6, 337-345

Neufeld EF, Muenzer J: The mucopolysaccharidoses; in: The metabolic and molecular bases of inherited disease; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D; McGraw-Hill, New-York 2001, 3421-3452

Orban PC, Chui D, Marth JD (1992): Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6861-6865

Parenti G, Meroni G, Ballabio A (1997): The sulfatase gene family. *Curr Opin Genet Dev* 7, 386-391

Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996): Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98, 600-603

Reizes O, Lincecum J, Wang Z, Goldberger O, Huang L, Kaksonen M, Ahima R, Hinkes MT, Barsh GS, Rauvala H et al. (2001): Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell* 106, 105-116

te Riele H, Maandag ER, Berns A (1992): Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5128-5132

Ringvall M, Ledin J, Holmborn K, van Kuppevelt T, Ellin F, Eriksson I, Olofsson AM, Kjellen L, Forsberg E (2000): Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking *N*-deacetylase/*N*-sulfotransferase-1. *J Biol Chem* 275, 25926-25930

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467

Saftig P, Göttingen: persönliche Mitteilung 2001

Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K (1995): A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82, 271-278

Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF (1998): Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 26, 1427-1432

Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517

Thomas KR, Capecchi MR (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512

Turnbull J, Powell A, Guimond S (2001): Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* 11, 75-82

Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischler E, Rutter WJ, Goodman HM (1977): Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196, 1313-1409

Viviano BL, Paine-Saunders S, Gasiunas N, Gallagher J, Saunders S (2004): Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J Biol Chem* 279, 5604-5611

Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Lu Q, Kessler DS, Emerson CP Jr (2004): QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4833-4838

Wang Y, Krushel LA, Edelman GM (1996): Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3932-3936

8. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
βAPP	β-Amyloid Precursor Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CI	Chloroform/Isoamylalkohol
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
COS-7	Affennierenzellen (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
d	Tag(e)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Endkonzentration
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	embryonale Stamm(zellen)
EST	expressed sequence tag
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
FGF	fibroblast growth factor
FGly	Formylglycin

g	Gramm
G	Guanin
GlcA	D-Glucuronsäure
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GlcNS	<i>N</i> -Sulfoglucosamin
GT(V)	gene targeting (vektor)
h	Stunde(n)
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
Hh	hedgehog
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IdoA	L-Iduronsäure
k	Kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
KO	knock-out
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LIF	leukaemia inhibitory factor
m	Milli- (10^{-3}), Meter
M	molar
μ	Mikro (10^{-6})
MCS	multiple cloning site
MEF	murine embryonale Fibroblasten
min	Minute(n)
MLD	metachromatische Leukodystrophie
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPS	Mukopolysaccharidose
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MSD	multiple Sulfatasedefizienz

MRT	Magnetresonanztomographie
n	Nano (10^{-9})
NDST	<i>N</i> -Deacetylase/ <i>N</i> -Sulfotransferase
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> (zur Analyse)
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	polymerase chain reaction
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic hedgehog
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil, Unit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
V	Volt

Vol.	Volumen
Wg	wingless
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
XC	Xylencyanol
×g	-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	S. 2	Tab. 1.1	S. 3
Abb. 1.2	S. 6		
Abb. 2.1	S. 31		
Abb. 3.1	S. 44	Tab. 3.1	S. 43
Abb. 3.2	S. 45	Tab. 3.2	S. 53
Abb. 3.3	S. 46	Tab. 3.3	S. 55
Abb. 3.4	S. 49	Tab. 3.4	S. 60
Abb. 3.5	S. 50	Tab. 3.5	S. 61
Abb. 3.6	S. 52		
Abb. 3.7	S. 53		
Abb. 3.8	S. 57		
Abb. 3.9	S. 58		
Abb. 3.10	S. 59		
Abb. 3.11	S. 60		
Abb. 3.12	S. 64		
Abb. 3.13	S. 64		
Abb. 4.1	S. 66		
Abb. 4.2	S. 70		

Danksagungen

Herrn PD Dr. Thomas Dierks danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die beispielhafte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Kurt von Figura danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Für die finanzielle Förderung meiner Arbeit durch ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Molekularbiologische Analyse pathophysiologischer Prozesse“ danke ich dem ehemaligen Sprecher des Kollegs, Herrn Prof. Dr. med. E. Günther.

Herrn Dr. Jobst Landgrebe danke ich für seine Unterstützung auf dem Gebiet Statistik.

Herrn PD Dr. Peter V. Schu und Herrn Prof. Dr. Paul Saftig danke ich für ihre wertvollen Ratschläge bei allem, was mit Mäusen zu tun hatte.

Herrn Klaus Neifer danke ich für seine Hilfestellung bei der DNA-Sequenzierung. Frau Martina Balleiniger, Frau Nicole Leister, Frau Ellen Eckermann und Frau Annegret Schneemann danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft bei allen möglichen Problemen in dem manchmal nicht so einfachen Laborleben.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Frau Dr. Ljudmilla Borissenko, Frau Stefanie Schulz und Herrn Dr. Qinghua Fang danke ich einfach dafür, dass sie da waren.

Meiner Frau Elena danke ich für ihre Geduld sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Michael Padva, wurde am 28. April 1977 als erstes Kind des Ingenieurs Ilia Padva und der Ärztin Evguenia Padva, geb. Voskobochnik, in St. Petersburg geboren. Von 1984 bis Ende 1987 besuchte ich die Mittelschule Nr. 359 in St. Petersburg, von 1988 bis 1990 besuchte ich die Mittelschule Nr. 35 in St. Petersburg. Von 1990 bis 1992 besuchte ich das Lyzeum „Physical-Technical School Nr. 566 at the Ioffe Physical-Technical Institute“ in St. Petersburg.

Im September 1992 ist unsere Familie in die BRD emigriert.

Von Oktober 1992 bis 1994 besuchte ich den Gymnasialzweig der Georg-August-Zinn-Schule in Kassel und von 1994 bis 1997 das Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium in Kassel. Dort legte ich 1997 mein Abitur mit den Prüfungsfächern Mathematik, Informatik, Geschichte und Russisch ab.

Seit dem Wintersemester 1997/98 studiere ich Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im August 1999, den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im August 2000 und den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im März 2003 ab. Derzeit bereite ich mich auf den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung vor.

Die vorliegende Arbeit fertigte ich zwischen November 2000 und September 2002 in der Abteilung Biochemie II des Zentrums Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Universität Göttingen unter der Leitung von PD Dr. Thomas Dierks an. Im Rahmen dieser Doktorarbeit war ich von November 2000 bis April 2001 Stipendiat des Graduiertenkollegs „Molekularbiologische Analyse pathophysiologischer Prozesse“.