

# **Untersuchungen zur Bedeutung der *sal*-ähnlichen Gene bei der Maus**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Anja Buck**

aus Kiel

Göttingen 2001

D7

Referent:

Prof. Dr. W. Engel

Korreferentin:

Prof. Dr. S. Hoyer-Fender

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Gen <i>spalt</i> bei <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2 <i>sal</i> -ähnliche Gene bei Vertebraten	2
1.2.1 <i>sal</i> -ähnliche Gene beim Fisch Medaka, bei <i>Xenopus laevis</i> und beim Huhn	3
1.2.2 <i>sal</i> -ähnliche Gene beim Menschen	4
1.2.3 <i>sal</i> -ähnliche Gene bei der Maus	6
1.3 Mutationen im <i>SALL1</i> -Gen verursachen TBS	6
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit	7
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1 Chemikalien	8
2.2 Kits	10
2.3 Gebrauchswaren und Geräte	11
2.3.1 Gebrauchswaren	11
2.3.2 Geräte	12
2.4 Puffer und Lösungen	12
2.5 Sterilisation	16
2.6 Kulturmedien	16
2.6.1 Medien für Bakterien	16
2.6.2 Medien für die Zellkultur	17
2.7 Biologisches Material	18
2.7.1 Bakterienstämme	18
2.7.2 Vektoren	18
2.7.3 Eukaryotische Zelllinien	19
2.7.4 Antikörper	19

2.7.5	Oligonukleotide	19
2.7.6	Gensonden	20
2.7.7	DNA-Bibliothek	22
2.7.8	Mausstämme	22
2.8	Molekulargewichtstandards	22
2.9	Nukleinsäuretechnische Methoden	23
2.9.1	Präparation von Nukleinsäuren	23
2.9.1.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	23
2.9.1.2	Herstellung von Glycerinkryokulturen	23
2.9.1.3	Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA	24
2.9.1.4	Endotoxin-freie Maxipräparation von Plasmid-DNA	24
2.9.1.5	Isolierung genomischer DNA aus Geweben	24
2.9.1.6	Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben	24
2.9.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	25
2.9.3	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	25
2.9.3.1	Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA	25
2.9.3.2	Restriktionsspaltung von genomischer DNA	26
2.9.3.3	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	26
2.9.3.4	Auffüllreaktion	27
2.9.3.5	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	27
2.9.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
2.9.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	28
2.9.5.1	Ligation	28
2.9.5.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.9.5.3	Transformation	29
2.9.6	Sequenzanalyse	29
2.9.7	PCR-Techniken	30
2.9.7.1	PCR an Plasmid-DNA	30
2.9.7.2	PCR an genomischer DNA	31
2.9.7.3	Analytische PCR an genomischer DNA von knock out-Mäusen	31
2.9.8	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.9.8.1	Horizontale Gelelektrophorese	32
2.9.8.2	Vertikale Gelelektrophorese	32
2.9.8.3	Denaturierende Gelelektrophorese	33
2.9.9	Transfertechniken von Nukleinsäuren	33
2.9.9.1	Southern-Blot	33



2.9.9.2 Northern-Blot . . . . .	34
2.9.10 Radioaktive Hybridisierungstechniken . . . . .	34
2.9.10.1 Hybridisierung von Southern- und Northern-Blots . . . . .	34
2.9.10.2 Hybridisierung der genomischen Cosmid-Bibliothek 129/Ola . . . . .	35
2.9.11 <i>In situ</i> -Hybridisierungen . . . . .	35
2.9.11.1 Digoxigenin-Markierung von Nukleinsäuren . . . . .	35
2.9.11.2 Präparation von Maus-Embryonen . . . . .	36
2.9.11.3 Whole mount- <i>in situ</i> -Hybridisierung . . . . .	36
2.9.11.3.1 Vorbehandlung der Embryonen . . . . .	36
2.9.11.3.2 Waschschrte und Antikörper-Inkubation . . . . .	37
2.9.11.3.3 Waschschrte und Farbreaktion . . . . .	37
2.9.11.3.4 Gelatine-Einbettung . . . . .	38
2.9.11.4 Herstellung von Paraffinschnitten . . . . .	38
2.9.11.5 <i>In situ</i> Hybridisierung von Schnittpräparaten . . . . .	39
2.9.11.5.1 Vorbehandlung und Hybridisierung . . . . .	39
2.9.11.5.2 Waschschrte und Antikörper-Inkubation . . . . .	39
2.9.11.5.3 Waschschrte und Farbreaktion . . . . .	40
2.9.11.6 Herstellung von Embryo-Pulver . . . . .	40
2.9.11.7 Fotografische Auswertung . . . . .	40
2.9.11.8 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH) . . . . .	41
2.9.11.8.1 Markierung der Sonde über Nick-Translation . . . . .	41
2.9.11.8.2 Vorbehandlung und Hybridisierung . . . . .	42
2.9.11.8.3 Waschschrte und Antikörper-Inkubation . . . . .	42
2.9.11.8.4 Gegenfärbung der Chromosomen . . . . .	43
2.10 Proteinchemische Methoden . . . . .	43
2.10.1 Herstellung der <i>Strep</i> -tag-Fusionsproteine . . . . .	43
2.10.1.1 Klonierung der Plasmide . . . . .	44
2.10.1.2 Zellwachstum, Genexpression und Präparation des Zell- extrakts . . . . .	45
2.10.1.3 Aufreinigung des Fusionsproteins . . . . .	45
2.10.1.4 Analyse der Expression und der Reinigung . . . . .	46
2.10.2 Kernproteinextraktion aus Gewebe . . . . .	46
2.10.3 Proteinbestimmung . . . . .	47
2.10.4 SDS-Polyacrylamidgel . . . . .	48
2.10.5 Western-Blot . . . . .	49
2.10.6 Färbung von Polyacrylamidgelen . . . . .	49

2.10.7	Reversible Färbung von Western-Blots	49
2.10.8	Immunumsetzung von Western-Blots	50
2.10.9	Aufreinigung monospezifischer Antikörper mittels Western-Blot-Verfahren	50
2.10.10	Aufreinigung monospezifischer Antikörper mittels Affinitäts-Säulen	51
2.10.11	Gewinnung eines polyklonalen Antiserums	52
2.11	Zellkultur	53
2.11.1	Routinekultur von ES-Zellen	53
2.11.2	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	53
2.11.3	Isolierung und Kryokonservierung von ES-Zellklonen	54
2.11.4	DNA-Extraktion aus ES-Zellen	54
2.11.5	Herstellung von Chimären	55
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1	Isolierung und Charakterisierung des <i>Sall1</i> -Gens der Maus	56
3.1.1	Isolierung und Charakterisierung zweier genomischer Cosmidklone	56
3.1.2	Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von <i>Sall1</i>	58
3.1.3	Identifizierung des Transkriptionsendpunktes	59
3.1.4	Chromosomale Lokalisation von <i>Sall1</i>	63
3.2	Untersuchungen zur Expression des <i>Sall1</i> -Gens der Maus	63
3.2.1	Expression in adulten Geweben	63
3.2.2	Expression in neuralen Embryonalgeweben	64
3.2.3	Expression in anderen Embryonalgeweben	65
3.2.4	Expression in den Gliedmaßenknospen	65
3.3	Homologe Rekombination des <i>Sall1</i> -Gens	68
3.3.1	Herstellung eines <i>Sall1</i> -knock out-Konstrukts	68
3.3.2	Herstellung von homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen	71
3.3.3	Generierung von <i>Sall1</i> -defizienten Mäusen	71
3.4	Herstellung eines monospezifischen Anti-Sall1-Antikörpers	72
3.4.1	Auswahl von Peptiden zur Immunisierung von Kaninchen	72
3.4.2	Herstellung von Sall1- und SALL1-Fusionsproteinen	72
3.4.3	Gewinnung der Sall1- und SALL1-Fusionsproteine	75
3.4.4	Gewinnung von monospezifischen Anti-Sall1-Antikörpern	75
3.4.5	Nachweis von Sall1 in Kernproteinextrakten	76

3.4.6	Herstellung eines Antiserums gegen Sall1	77
3.5	Untersuchungen zur embryonalen Expression des <i>Sall2</i> -Gens der Maus	78
3.5.1	Expression in neuralen Embryonalgeweben	79
3.5.2	Expression in anderen embryonalen Geweben	79
3.6	Homologe Rekombination des <i>Sall2</i> -Gens	81
3.6.1	Herstellung eines <i>Sall2</i> -knock out-Konstrukts	81
3.6.1.1	Charakterisierung des Intron 1 und der 3'-Region von <i>Sall2</i>	81
3.6.1.2	Klonierung genomischer Fragmente in den pTKneo-Vektor	81
3.6.2	Herstellung von homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen	85
3.6.3	Generierung von <i>Sall2</i> -defizienten Mäusen	86
3.7	Analyse <i>Sall2</i> -defizienter Mäuse	88
3.7.1	Statistische Analyse der Wurfgrößen und Genotypen	88
3.7.1.1	Der Hintergrund C57BL	88
3.7.1.2	Der Hintergrund 129/SvJ	89
3.7.2	Deletionskontrolle des <i>Sall2</i> -Gens durch Northern-Blot-Analysen	89
3.7.3	Histologische Analysen an Organen <i>Sall2</i> -defizienter Mäuse	90
3.7.4	Analyse der <i>Sall1</i> -Expression in <i>Sall2</i> -knock out-Embryonen	90
3.7.5	Morphologische Analysen an <i>Sall2</i> -knock out-Embryonen	92
3.8	Herstellung eines Anti-Sall2/SALL2-Antikörpers	93
3.8.1	Herstellung von Sall2- und SALL2-Fusionsproteinen	94
3.8.2	Gewinnung der Sall2- und SALL2-Fusionsproteine	95
3.8.3	Gewinnung von Antikörpern gegen das murine Sall2- und das humane SALL2-Protein.	96
3.8.4	Herstellung eines Antiserums gegen Sall2	97
3.9	Untersuchungen zur Expression des <i>Sall3</i> -Gens der Maus	98
3.9.1	Generierung einer <i>Sall3</i> -Sonde	98
3.9.2	Expression des <i>Sall3</i> -Gens in neuralen embryonalen Geweben	99
3.9.3	Expression des <i>Sall3</i> -Gens in anderen embryonalen Geweben	101
3.10	Untersuchungen zur Expression muriner <i>spalt</i> -Gene in <i>sonic hedgehog</i> -Mutanten	101
3.10.1	<i>Sall1</i> -Expression in <i>shh</i> -defizienten Embryonen	101
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>104</b>
4.1	Das Gen <i>Sall1</i>	104

4.1.1	Zur Struktur des <i>Sall1</i> -Gens	104
4.1.2	Zur Struktur des <i>Sall1</i> -Proteins	105
4.1.3	Expression des <i>Sall1</i> -Gens	108
4.1.3.1	Expression des <i>Sall1</i> -Gens in adulten Geweben der Maus	108
4.1.3.2	Expression des <i>Sall1</i> -Gens in embryonalen Neuralgeweben	108
4.1.3.3	Expression des <i>Sall1</i> -Gens in den Gliedmaßenknospen	110
4.1.3.4	Expression des <i>Sall1</i> -Gens während der Nierenentwicklung	113
4.1.3.5	Expression des <i>Sall1</i> -Gens im Genitalhöcker	114
4.1.3.6	Expression des <i>Sall1</i> -Gens in der Augenentwicklung	115
4.1.3.7	Expression des <i>Sall1</i> -Gens in den Branchialbögen	116
4.1.4	<i>Sall1</i> -Expression in der Maus und das TBS	116
4.1.5	Funktionsanalyse des <i>Sall1</i> -Gens	119
4.2	Das Gen <i>Sall2</i>	120
4.2.1	Charakterisierung des Intron 1 und der 3'-UTR von <i>Sall2</i>	120
4.2.2	Expression des <i>Sall2</i> -Gens in adulten Geweben	121
4.2.3	Expression des <i>Sall2</i> -Gens im embryonalen ZNS	121
4.2.4	Expression des <i>Sall2</i> -Gens in anderen Embryonalgeweben	122
4.2.5	Funktionsanalyse des <i>Sall2</i> -Gens	123
4.3	Embryonale Expression des Gens <i>Sall3</i>	126
4.4	Vergleich der drei <i>sal</i> -ähnlichen murinen Gene	127
4.4.1	Strukturvergleich	127
4.4.2	Expressionsvergleich	128
4.5	<i>sal</i> -ähnliche Vertebratengene lassen sich in Homologiegruppen einteilen	131
4.5.1	Strukturvergleich	131
4.5.2	Vergleich der embryonalen Expression	133
4.6	Zur Regulation des murinen <i>sal</i> -ähnlichen Gene durch Sonic hedgehog	134
4.7	Weiterführende Arbeiten	137
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
	<b>Anhang</b>	<b>157</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Vergleich der humanen SAL-Proteine mit dem SAL-Protein von <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	5
3.1	Restriktionskarte und genomische Organisation sowie Sequenzierung von <i>Sall1</i> . . . . .	57
3.2	Genomische Nukleotidsequenz des <i>Sall1</i> -Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens . . . . .	62
3.3	Chromosomale Lokalisation des <i>Sall1</i> -Gens . . . . .	63
3.4	Northern-Blot-Analyse des <i>Sall1</i> -Gens in adulten Geweben . . . . .	64
3.5	Expression des <i>Sall1</i> -Gens während der Embryonalentwicklung der Maus . . . . .	66
3.6	Expression des <i>Sall1</i> -Gens während der Gliedmaßenentwicklung . . . . .	67
3.7	Strategie der homologen Rekombination zur Inaktivierung des <i>Sall1</i> -Gens . . . . .	69
3.8	Restriktionsanalyse des <i>Sall1</i> -knock out-Konstrukts . . . . .	70
3.9	Genotypisierung der ES-Zellklone mittels Southern-Blot . . . . .	71
3.10	Homologievergleich zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>Sall1</i> und <i>SALL1</i> im Bereich des Peptids S1-I . . . . .	73
3.11	Homologievergleich zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von <i>Sall1</i> und <i>SALL1</i> im Bereich des Peptids S1-II . . . . .	73
3.12	Fusionsproteine des <i>Sall1</i> - und <i>SALL1</i> -Gens . . . . .	74
3.13	Western-Blot-Analyse bakteriell exprimierter <i>Sall1</i> - und <i>SALL1</i> -Fusionsproteine . . . . .	75
3.14	Test der unterschiedlich aufgereinigten Antikörper auf ihre Antigen-Spezifität . . . . .	77
3.15	Nachweis des <i>Sall1</i> -Proteins in Kernproteinextrakten . . . . .	78
3.16	Expression des <i>Sall2</i> -Gens während der Embryonalentwicklung der Maus . . . . .	80

3.17 Restriktionskarte und genomische Organisation sowie Sequenzierung von <i>Sall2</i> . . . . .	82
3.18 Strategie der homologen Rekombination zur Inaktivierung des <i>Sall2</i> -Gens . . . . .	84
3.19 Restriktionsanalyse des <i>Sall2</i> -knock out-Konstrukts . . . . .	85
3.20 Genotypisierung der ES-Zellklone mittels Southern-Blot . . . . .	86
3.21 Genotypisierung der F1-Generation durch PCR . . . . .	87
3.22 Genotypisierung der F2-Generation durch PCR . . . . .	87
3.23 Northern-Blot-Analyse <i>Sall2</i> -defizienter Mäuse . . . . .	90
3.24 Histologische Analysen an einer <i>Sall2</i> <sup>-/-</sup> -Maus . . . . .	91
3.25 Morphologische Analyse <i>Sall2</i> -defizienter Embryonen . . . . .	93
3.26 Fusionsproteine für das murine <i>Sall2</i> - und das humane <i>SALL2</i> -Gens . . . . .	95
3.27 Western-Blot-Analyse der Fusionsproteine <i>Sall2</i> und <i>SALL2</i> . . . . .	96
3.28 Aufreinigung des Fusionsproteins HS2 über immobilisiertes Streptactin . . . . .	97
3.29 Test des Antiserums und des Antikörpers gegen das Fusionsprotein HS2 . . . . .	98
3.30 Amplifikation der <i>Sall3</i> -Sonde . . . . .	99
3.31 Expression des <i>Sall3</i> -Gens während der Embryonalentwicklung der Maus . . . . .	100
3.32 Expression verschiedener <i>spalt</i> -Gene in <i>dsh</i> -Deletionsmutanten . . . . .	103
4.1 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gene <i>Sall1</i> und <i>SALL1</i> . . . . .	107
4.2 Die frühe Gehirnentwicklung bei Vertebraten . . . . .	110
4.3 Die Organisationszentren und Achsen der Gliedmaßenknospen von Vertebraten . . . . .	111
4.4 Die Entwicklung der Vertebratenniere . . . . .	114
4.5 Die frühe Entwicklung der äußeren Genitalien . . . . .	115
4.6 Die Entwicklung des Vertebratenauges . . . . .	122
4.7 Vergleich der embryonalen Expressionsmuster von <i>Sall1</i> , <i>Sall2</i> und <i>Sall3</i> . . . . .	130
4.8 Phylogenetischer Vergleich aller <i>sal</i> -ähnlicher Vertebratengene . . . . .	132
A.1 Genomische Nukleotidsequenz des <i>Sall1</i> -Gens . . . . .	162
A.2 Genomische Nukleotidsequenz des <i>Sall2</i> -Gens . . . . .	168

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BCCP	biotinyliertes Bakterienprotein
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
Cos	Cosmid
CTP	Cytidintriphosphat
d-	desoxy-
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DB	<i>Dilution Buffer</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dd-	didesoxy-
dest.	Destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxygenin

---

DMDC	Dimethyl-Dicarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dpc	<i>days post coitum</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DZF	Doppelzinkfinger
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -Aminoethylether)-Tetraacetat
ERL	Epitheliale Randleiste
et al.	et alteres
ES	Embryonale Stamm-
EtOH	Ethanol
EZF	Einzelzinkfinger
Fi	Fibroblasten
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
fkh	<i>fork head</i>
FKS	fetales Kälberserum
x g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEF	<i>human elongation factor</i>
HS2	humanes SALL2-Fusionsprotein
HSV	<i>Herpes simplex-Virus</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LB	Luria Bertani



---

LIF	Leukämie-Inhibitionsfaktor
M	Molarität
m-	mili- ( $1 \times 10^{-3}$ )
m	Meter
MAB	Maleinsäure-Puffer
min	Minute
$\mu$ -	mikro- ( $1 \times 10^{-6}$ )
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS2	murines Sall2-Fusionsprotein
n-	nano- ( $1 \times 10^{-9}$ )
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitrotetrazoliumblau
neo	Neomycin-Resistenzgen
n. S.	nächste Seite
NTMT	Natriumchlorid-Tris-Magnesiumchloridlösung mit Tween-20
OD	Optische Dichte
p-	pico- ( $1 \times 10^{-12}$ )
P	Phosphat
p.A.	pro analysi
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	Phosphatgepufferte Salzsäure mit Tween
pc	<i>post coitum</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	pH-Wert
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PZ	Progresszone
®	<i>Registered</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RE	Restriktionsendonukleasen
RNA	Ribonukleinsäure

---

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RZPD	Ressourcen-Zentrum-Primärdatenbank
S.	Seite
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	<i>standard saline citrat</i> (-Puffer)
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA(-Puffer)
TBS	<i>tris buffered saline</i> (-Puffer)
TBS	Townes-Brocks-Syndrom
TE	Tris-EDTA(-Puffer)
TK	Thymidin-Kinase
™	<i>Trademark</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uraciltriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galaktosid
z. B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger
ZPA	Zone polarisierender Aktivität

**Code der Nukleinsäuren**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

**Code der Aminosäuren**

A	(Ala)	Alanin	M	(Met)	Methionin
C	(Cys)	Cystein	N	(Asp)	Asparagin
D	(Asp)	Asparaginsäure	P	(Pro)	Prolin
E	(Glu)	Glutaminsäure	Q	(Glu)	Glutamin
F	(Phe)	Phenylalanin	R	(Arg)	Arginin
G	(Gly)	Glycin	S	(Ser)	Serin
H	(His)	Histidin	T	(Thr)	Threonin
I	(Ile)	Isoleucin	V	(Val)	Valin
K	(Lys)	Lysin	W	(Trp)	Tryptophan
L	(Leu)	Leucin	Y	(Tyr)	Tyrosin

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Gen *spalt* bei *Drosophila melanogaster*

Ein großer Teil unseres gegenwärtigen Wissens über genetische Grundlagen der Säugetierembryogenese basiert auf der Klonierung und Charakterisierung von Genen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu regulatorischen Entwicklungsgenen bei *Drosophila* isoliert wurden (Kessel und Gruss, 1990). Eine Untergruppe dieser Regulatorgene bei *Drosophila* sind die homöotischen Gene, deren Mutation dazu führt, dass ein bestimmter Körperteil an einer Stelle im Embryo entsteht, an der normalerweise ein anderer gebildet wird. Diese Gene kontrollieren folglich die Identität, nicht aber die Anzahl, Polarität oder Größe von Körpersegmenten (Lewin, 1997; Manak und Scott, 1994). Die Großzahl dieser homöotischen Gene von *Drosophila* befinden sich innerhalb zweier Genkomplexe, dem *Antennapedia*- (ANT-C; Kaufman et al. (1980)) und dem *Bithorax*- (BX-C; Lewis (1978)) Komplex. Zwei weitere *Drosophila*-Gene wurden als neuartige homöotische Gene beschrieben, da sie außerhalb der homöotischen Genkomplexe lokalisiert sind. Es handelt sich dabei um die Gene *fork head* (*fkh*, Jürgens und Weigel (1988)) und *spalt* (*sal*, (Jürgens, 1988)), die die Identität von Kopf- und Schwanz-Regionen des *Drosophila*-Embryos bestimmen. Diese Gene werden auch als regionsspezifische homöotische Gene bezeichnet. Das *fkh*-Gen kodiert für das sogenannte *winged helix*- oder *fork head*-Motiv (Clark et al., 1993; Lai et al., 1990, 1991), das *sal*-Gen für Zinkfinger-Domänen als DNA-bindende Motive (Miller et al., 1985; Pieler und Theunissen, 1993; Theunissen et al., 1993).

Zinkfinger (ZF) sind ein häufiges Motiv in DNA-bindenden Proteinen. Der Name rührt von der Eigenschaft dieser Proteinmotive her, Zinkionen mittels konservierter Cysteine und Histidine derart in einem Komplex zu binden, dass die zwischen den Cysteinen und Histidinen gelegenen Aminosäuren solcher Motive fingerartig aus dem Protein herausragen (El-Baradi und Pieler, 1991). Das wich-

tigste ZF-Motiv in Entwicklungsgenen von *Drosophila* und anderen Spezies ist der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZF. Sind zwei oder mehrere Einheiten von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZFs miteinander verbunden, finden sich zwischen diesen Einheiten regelmäßig sieben konservierte, als HC-link bezeichnete Aminosäuren zwischen dem letzten Histidin des vorangehenden und dem ersten Cystein des folgenden ZF (Schuh et al., 1986).

Die erste Erwähnung fand das Gen *sal* in einem Artikel von Nüsslein-Volhard et al. (1984), in dem der Genort in der Region 32F/33B auf dem linken Arm von Chromosom 2 beschrieben wurde. Jürgens (1988) charakterisierte das Gen als regionspezifisches homöotisches Gen, das die Entwicklung von posterioren Kopf- und anterioren Schwanzstrukturen im *Drosophila*-Embryo determiniert. Die zugehörige Transkriptionseinheit wurde von Kühnlein et al. (1994) beschrieben. Das *sal*-Transkript von 6.1 kb setzt sich aus vier Exons zusammen und kodiert für ein Protein von 1 355 Aminosäuren. Die Exons des Gens sind durch ein aminoterminales und zwei carboxyterminale Introns getrennt. Das SAL-Protein zeigt eine charakteristische Struktur von drei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Doppelzinkfinger (DZF)-Domänen, welche in größeren Abständen über das Protein verteilt sind (s. Abb. 1.1). Zusätzlich findet sich kurz hinter der mittleren DZF-Domäne ein einzelner C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger (ZF). Die drei DZF-Domänen ähneln sich in ihrer Aminosäuresequenz und weisen jeweils im carboxyterminalen Motiv eine charakteristische Folge von acht Aminosäuren (FTTKGNLK), die sogenannte SAL-Box (Kühnlein et al., 1994), auf.

Neben der Funktion von *sal* in der frühen Embryogenese konnten dem Gen auch wesentliche Funktionen bei der Entwicklung des larvalen Tracheensystems (Chen et al., 1998; Kühnlein et al., 1994) sowie bei der Morphogenese des adulten Flügels der Fruchtfliege (de Celis et al., 1996; Nellen et al., 1996; Sturtevant et al., 1997) zugeordnet werden. Zudem wird es in den sich entwickelnden sensorischen Organen des Thorax exprimiert (de Celis et al., 1999) und beeinflusst die Entwicklung der im peripheren Nervensystem liegenden neuronalen Vorläuferzellen (Elstob et al., 2001; Rusten et al., 2001). Dabei agiert das *sal*-Gen downstream des für ein Signalmolekül kodierenden Gens *hedgehog* (Celis et al., 1996; Sturtevant et al., 1997).

## 1.2 *sal*-ähnliche Gene bei Vertebraten

Aufgrund der charakteristischen Struktur des *sal*-Gens aus *Drosophila* konnten in einer Reihe von Vertebratenspezies *sal*-ähnliche Gene identifiziert werden. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über das heutige Wissen zur Struktur und Regulation *sal*-ähnlicher Vertebratengene gegeben werden.

### 1.2.1 *sal*-ähnliche Gene beim Fisch Medaka, bei *Xenopus laevis* und beim Huhn

Aus dem Genom des Fisches Medaka (*Oryzias latipes*) konnte bislang ein *sal*-ähnliches Gen isoliert werden (Köster et al., 1997). Das Medaka-*sal*-Transkript ist ca. 4.7 kb lang und kodiert wie das *Drosophila sal* für ein Protein mit drei DZF-Domänen. Dem zweiten DZF folgt ein einzelner C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZF, und alle DZF-Domänen enthalten im carboxyterminalen Motiv die SAL-Box. Außerhalb dieser Bereiche finden sich jedoch nur wenige konservierte Regionen. Zusätzlich zu den in *Drosophila* gefundenen Strukturen ist für das Medaka-SAL-Protein ein einzelner ZF vom C<sub>2</sub>HC-Typ am aminoterminalen Ende des Proteins beschrieben. Medaka *sal* ist ein Zielgen für die Signale von Sonic hedgehog (Köster et al., 1997), ein Mitglied der Hedgehog-Familie in Vertebraten.

Aus dem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) konnten bereits zwei *sal*-ähnliche Gene isoliert werden, *Xsal-1* (Holleman et al., 1996) und *Xsal-3* (Onuma et al., 1999). *Xsal-1* kodiert für ein Protein von 1 278 Aminosäuren. Anders als bei *Drosophila* und Medaka enthält es vier DZF-Domänen, die aber SAL-ähnlich gleichmäßig über das Protein verteilt sind. Nach der zweiten DZF-Domäne folgt ein einzelner C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZF, und wie bei Medaka SAL ist der aminoternale C<sub>2</sub>HC-ZF vorhanden. Ein weiterer Unterschied zu *sal* besteht im Vorkommen alternativer Transkripte, die entweder alle vier, drei oder nur zwei Doppelzinkfinger-Domänen kodieren, wobei das Transkript mit herausgespleißtem DZF Nr. 3 dominiert. *Xsal-1* wird bereits früh in der Embryonalentwicklung bevorzugt im prospektiven Neuroektoderm exprimiert, später in spezifischen Regionen des Gehirns, im Rückenmark, im Herzen, im Pronephros, in den Gliedmaßenknospen und in den otischen Vesikeln (Holleman et al., 1996).

Für *Xsal-3* wurden ebenfalls alternative Transkripte mit einer resultierenden Länge von 1 061 bzw. 826 Aminosäuren nachgewiesen (Onuma et al., 1999), die für zwei bzw. drei DZF-Domänen kodieren. Ebenso wie bei dem *Xsal-1*-Protein folgt nach dem zweiten DZF ein einzelner ZF, und am aminoterminalen Ende des Proteins findet sich ein einzelner C<sub>2</sub>HC-ZF. *Xsal-3* wird stark in der Neuralfalte und -platte exprimiert, des Weiteren wurden Transkripte im Mandibular- und Hyalbogen, den anterioren und posterioren Branchialbögen, dem pronephrischen Gang und in geringen Mengen auch im otischen Vesikel und der sich entwickelnden Schwanzspitze festgestellt (Onuma et al., 1999).

Aus dem Huhn sind bisher zwei *sal*-ähnliche Gene identifiziert worden. Das von Farrell und Munsterberg (2000) isolierte *Csal1*-Gen kodiert für ein Transkript

von 3924 bp. Wie bei den anderen aufgeführten SAL-Vertebratenproteinen sind die typischen DZF-Domänen mit den SAL-Boxen und der aminoterminalen C<sub>2</sub>HC-ZF konserviert. Die Aminosäuresequenz zeigt eine hohe Homologie zum humanen SALL1-Protein (s.u.) (Farrell und Munsterberg, 2000). In den Gliedmaßenknospen wird *Csal1* in der epithelialen Randleiste und im distalen Mesenchym exprimiert, des Weiteren im ZNS. Die Expression des *Csal1*-Gens in den Gliedmaßenknospen wird unter anderem durch Sonic hedgehog reguliert (Farrell und Munsterberg, 2000).

Für das von Farrell et al. (2001) beschriebene *Csal2*-Protein treffen ebenfalls die für SAL-ähnliche Vertebratenproteine beschriebenen Charakteristika zu, es enthält die üblichen vier DZF-Domänen, den aminoterminalen C<sub>2</sub>HC-ZF und die SAL-Boxen. Das *Csal2*-Protein zeigt eine hohe Homologie zum *Xsal-1*-, *Sall3*- und *SALL3*-Protein (Farrell et al., 2001). Auch *Csal2* wird schon in frühen Embryonalstadien exprimiert, hauptsächlich in der Neuralplatte und später im Neuralrohr, in bestimmten Gehirnregionen, in den Gliedmaßenknospen, der Schwanzknospe, dem Mesonephros und dem Genitalhöcker.

### 1.2.2 *sal*-ähnliche Gene beim Menschen

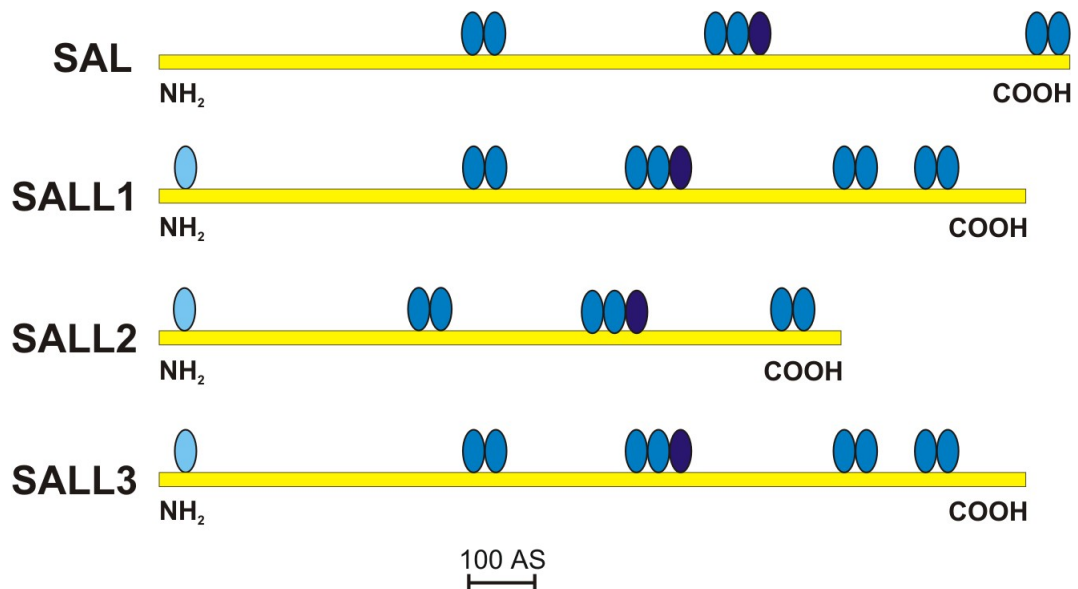
Drei *sal*-ähnliche humane Gene konnten bislang aus dem menschlichen Genom isoliert werden, *SALL1* (*SALL* = *spalt-like*), *SALL2* (beide Kohlhase et al. (1996)) und *SALL3* (Kohlhase et al., 1999a). Zudem wurde das *SALL1*-ähnliche Pseudogen *SALL1P* identifiziert (Kohlhase et al., 1999b).

Das Gen *SALL1* (vormals *HSAL1*) auf Chromosom 16q12.1 kodiert für ein Protein von 1324 Aminosäuren (Kohlhase et al., 1996, 1999c). Wie für fast alle weiteren SAL-ähnliche Vertebratenproteine bereits beschrieben, enthält es vier DZF-Domänen vom SAL-Typ und das aminoterminalen C<sub>2</sub>HC-ZF-Motiv (s. Abb. 1.1). Das *Csal1*-Protein ist von den oben beschriebenen SAL-ähnlichen Proteinen in seiner Struktur und Sequenz dem *SALL1*-Protein am ähnlichsten (Farrell und Munsterberg, 2000). Eine Expression des Gens konnte in der Niere, im Gehirn und in der Leber des adulten Menschen sowie im fetalen Gehirn nachgewiesen werden (Kohlhase et al., 1996).

Das Gen *SALL2* (vormals *HSAL2*) auf Chromosom 14q11.1-12.1 (Kohlhase et al., 1996) kodiert wie das *Medaka-sal*-Gen für drei DZF-Domänen (s. Abb. 1.1). Nur zwei dieser Domänen zeigen eine deutliche Ähnlichkeit zu SAL, die carboxyterminale Domäne enthält jedoch statt des SAL-ähnlichen DZF mit 49 Aminosäu-

ren einen Doppelzinkfinger mit 51 Aminosäuren. Zudem findet sich in dieser Domäne keine typische SAL-Box. Die genomische Struktur von *SALL2* lässt das für die meisten *sal*-Gene von Vertebraten beschriebene 3'-Intron vermissen, die typische Proteinstruktur und Aminosäuresequenz-Übereinstimmung mit den SAL-ähnlichen Proteinen weisen *SALL2* jedoch eindeutig als Mitglied der *sal*-Familie aus (Kohlhase et al., 1996). In adulten Geweben des Menschen wird *SALL2* hauptsächlich in Gehirn und Herz exprimiert, auch eine Expression im fetalen Gehirn wird beschrieben.

Das putative Protein des Gens *SALL3* auf Chromosom 18q23 (Kohlhase et al., 1999a) entspricht in seiner Struktur mit vier DZF-Domänen, einem zusätzlichen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZF-Motiv nach dem zweiten DZF und einem aminoterminalen C<sub>2</sub>HC-ZF-Motiv dem Bild eines typischen SAL-Vertebratenproteins (s. Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Schematischer Vergleich der humanen SAL-Proteine mit dem SAL-Protein von *Drosophila melanogaster*.** Die Ovale stellen die Zinkfinger motive innerhalb der Proteine dar. Die Doppelzinkfinger sind blau, der angehängte Zinkfinger dunkelblau und der aminoterminalen C<sub>2</sub>HC-Zinkfinger hellblau unterlegt.

Die für die vierte DZF-Domäne kodierende Nukleotidsequenz ist durch ein Intron getrennt, ein 5'-Intron ist ebenfalls vorhanden. Das Protein *Csal2* zeigt eine hohe Homologie zur Sequenz des humanen *SALL3*-Proteins (Farrell et al., 2001). Durch alternatives Spleißen entsteht ein Produkt ohne das aminoterminalen C<sub>2</sub>HC-ZF-Motiv, und der von Spleißstellen umgebene dritte DZF scheint immer aus dem Transkript entfernt zu werden (Kohlhase et al., 1999a). In adulten Geweben des



Menschen wird *SALL3* hauptsächlich im Herzen, schwächer im Gehirn, Pankreas, Niere, Skelettmuskel, Leber und Plazenta exprimiert. Eine Expression des *SALL3*-Gens im fetalen Gehirn wurde ebenfalls festgestellt.

### 1.2.3 *sal*-ähnliche Gene bei der Maus

Das erste murine *sal*-ähnliche Gen, *Msal-1*, wurde von [Ott et al. \(1996\)](#) publiziert. Nach Rücksprache mit dem *Nomenclature committee for human and mouse genomes* ([Kohlhase, 2000a](#)) werden die murinen Gene nun entsprechend ihrer Homologie zu den humanen Genen nummeriert und benannt. Somit ist die neue Bezeichnung für *Msal-1* jetzt *Sall3*. Das putative Protein enthält vier DZF-Domänen vom SAL-Typ, ein aminoterminales C<sub>2</sub>HC-ZF-Motiv und kann alternativ gespleißt werden. Dem kürzeren Transkript fehlt wie bei *SALL3* und *Xsal-1* der für den dritten DZF kodierende Bereich, und das vollständige Transkript mit allen vier DZF wird nur sehr schwach exprimiert ([Ott et al., 1996](#)). Während der Embryogenese wird *Sall3* hauptsächlich im sich entwickelnden Neuroektoderm von Gehirn, Innenohr und Rückenmark exprimiert. Weitere Expressionsdomänen sind von der Urogenitaleiste abstammende Gewebe wie Testis, Ovar und Nieren. Eine Expression wurde außerdem in den Kiemenbögen, im Notochord, in den Gliedmaßenknospen und im Herz festgestellt ([Ott et al., 1996](#)).

Ein weiteres murines *sal*-Gen, *Sall2* (vormals *Msal-2*, [Kohlhase et al. \(2000\)](#)), kodiert für ein putatives Protein von 1 004 Aminosäuren. Es enthält zwei kurze 5'-Exons, die alternativ gespleißt werden. Exon 2 kodiert für drei DZF-Domänen, wobei wiederum der zweiten ein einzelner ZF folgt und am aminoterminalen Ende ein C<sub>2</sub>HC-ZF-Motiv vorliegt. Das *Sall2*-Protein ähnelt in hohem Maße dem humanen *SALL2*-Protein. Das ca. 5 kb lange *Sall2*-Transkript wird in adulten Mäusen in abnehmender Stärke in Gehirn, Niere, Lunge und Ovar exprimiert. Eine Analyse mittels RT-PCR ergab, dass *Sall2*-Transkripte bereits in 8.5 Tage alten Embryonen vorliegen ([Kohlhase et al., 2000](#)).

## 1.3 Mutationen im *SALL1*-Gen verursachen TBS

Mutationen im *SALL1*-Gen verursachen das Townes-Brocks-Syndrom (TBS, OMIM Nr. 107480), ein nach seinen Erstbeschreibern [Townes und Brocks \(1972\)](#) benanntes autosomal-dominant vererbtes Fehlbildungssyndrom ([Kohlhase et al., 1998](#); [Kohlhase, 2000b](#)). Es ist gekennzeichnet durch Analatresie, Fehlbildun-

gen der oberen Extremitäten (triphalangealer Daumen, präaxiale Polydaktylie) und Ohrmuscheldysplasien (Kohlhase et al., 1998). Seltener treten Schwerhörigkeit, urogenitale Fehlbildungen, Zehen- und Fußfehlbildungen sowie mentale Retardierung auf (Cameron et al., 1991; Ishikiriya et al., 1996; O'Callaghan und Young, 1990; Powell und Michaelis, 1999; Wischermann und Holschneider, 1997). Alle bislang in Patienten identifizierten *SALL1*-Mutationen sind Stopp-Mutationen oder kurze Deletionen bzw. Insertionen, wobei sämtliche Veränderungen zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führen (Kohlhase et al., 1998, 1999c; Marlin et al., 1999). Es wird angenommen, dass die beschriebenen Mutationen zu funktionslosen *SALL1*-Allelen und damit über eine Haploinuffizienz zu TBS führen. Das *SALL1*-Gen scheint somit eine wichtige Funktion bei der Entwicklung der beim TBS betroffenen Organe einzunehmen.

## 1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das bisher unbekanntes murine Homolog zu dem humanen *SALL1*-Gen isoliert und hinsichtlich seiner Expression in der Embryogenese und in adulten Tieren charakterisiert werden. Es sollten monospezifische Antikörper zum Nachweis des Proteins gewonnen werden. Durch die Methode der homologen Rekombination sollten knock out-Mäuse hergestellt werden, die das rekombinierte Allel im heterozygoten und homozygoten Zustand enthalten.

Die bisher vorliegenden Informationen zur Sequenz und Struktur des murinen *Sall2*-Gens sollten ergänzt und die Expression des Gens während der Embryogenese analysiert werden. Fusionsproteine sollten erzeugt und zur Herstellung eines Antiserums genutzt werden. Zudem sollten mittels homologer Rekombination knock out Mäuse produziert werden, die das homolog rekombinierte Allel in heterozygotem und homozygotem Zustand enthalten. Diese Mäuse sollten phänotypisch charakterisiert werden.

Des Weiteren sollte die embryonale Expression des Gens *Sall3* anhand von whole mount-*in situ*-Hybridisierungen analysiert werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.A. Qualität bezogen.

Adenosintriphosphat	Biomol, Hamburg
Acrylamid	Gibco BRL, Eggenstein
Agarose	Fluka, Neu-Ulm
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Ammoniumacetat	Fluka
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa H <sub>2</sub> O	Fresenius, Bad Homburg
Antifading-Lösung Vectashield	Camon, Heidelberg
Aqua Poly/Mount	Polysciences, Heidelberg
Avidin-FITC-Lösung	Serva, Heidelberg
BCIP	Roth
Bisacrylamid	Serva
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics
BM Purple AP Substrat	Roche Diagnostics
Borsäure	Roth
BPB	Sigma
BSA (DNase-frei)	Biomol
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase	Fluka
Chaps	Sigma
Chloroform	Roth
Dextransulfat	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DMDC	Fluka

---

DTT	Biomol
DNase I	Roche Diagnostics
dNTPs	Roche Diagnostics
EDTA	ICN, Eschwege
Entwickler G	AGFA-Gevaert AG, Mortsel, Belgien
Ethanol	Roth
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich
Ficoll 400	Amersham Pharmacia Biotech
Fixierer G 354	AGFA-Gevaert AG
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Gelatine	Sigma
Glycerol	Roth
Glycin	ICN
Heparin	Sigma
IPTG	Biomol
Kaliumacetat	Sigma
Kaliumphosphat	Sigma
Kanamycin	Sigma
Klenow-DNA-Fragment	Amersham Pharmacia Biotech
Lachsspermien-DNA	Sigma
Levamisol (Tetramisol)	Sigma
Lysozym	Roche Diagnostics
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva
Mineralöl	Sigma
MOPS	Sigma
Natriumcarbonat	Sigma
NBT	Roth
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen
Orange G	Sigma
Paraplast	Sigma
PFA	Sigma
<i>Pfu Turbo</i> ® DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg

Phenol	Biomol
Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	Gibco BRL
Ponceau S	Serva
Proteinase K	Amersham Pharmacia Biotech
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP und [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP (3 000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech
Restriktionsenzyme	Gibco BRL; Biolabs, Schwalbach
RNase A	Sigma
RNase Away	Roth
RNA-Längenstandard 0.29–9.5 kb	Gibco BRL
SDS	ICN
Select Peptone	Gibco BRL
Select Yeast Extract	Gibco BRL
Simply Blue™ Safestain	Invitrogen
T3-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL
Total RNA Reagent	Biomol
Tris	Gibco BRL
tRNA	Roche Diagnostics
Tween-20	Sigma
X-Gal	Biomol
Xylol	Roth

## 2.2 Kits

BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
DIG-RNA Labeling Kit	Roche Diagnostics
DYEnamic ET-Terminator-Mix	Amersham Pharmacia
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Hexalabel™ DNA Labeling Kit	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
JETsorb Gel Extraction Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
JETstar Plasmid MIDI Kit	Genomed
Megaprime® DNA Labelling Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Nick-Translations-Kit	Gibco BRL

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Recombinant Protein Expression and Purification Kit	IBA, Göttingen
Rediprime™ II Random Prime Labeling System	Amersham Pharmacia Biotech
The QIAexpressionist™	Qiagen

## 2.3 Gebrauchswaren und Geräte

### 2.3.1 Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Krannich und Schütt (Göttingen), Nunc (Wiesbaden), Greiner (Nürtingen) und Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen.

Affinitätssäulen HiTrap affinity columns, NHS-aktiviert	Amersham Pharmacia Biotech
Aufreinigungssäule MicroSpin™ S-200 HR	Amersham Pharmacia Biotech
Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Centrisart I	Sartorius, Göttingen
Elektroporationsküvette Gene Pulser Cuvette, 0.4 cm, gap 50	BioRad, München
Filterpapier 0850	Schleicher & Schüll
Fotoklebstoff Fix-o-Gum	Marabu, Tamm
Rubber-Cement	
Glas-Scintillationsgefäße, steril	Sigma
Nitrocellulose-Membran Hybond™-C	Amersham Pharmacia Biotech
NuPAGE® BisTris Gele	Invitrogen
Nylon-Membran Hybond™-N	Amersham Pharmacia Biotech
Objektträger Superfrost* Plus	Schütt
PAGEr™ Gold Precast Gels	Biozym
Peel-A-Way Einbettungsformen	Polysciences
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hess. Oldendorf
PVDF-Membran Hybond™-P	Amersham Pharmacia Biotech
Röntgenfilme Hyperfilm™ MP	Amersham Pharmacia Biotech
Sterilfilter	Sartorius

### 2.3.2 Geräte

Automated DNA-Sequencer ABI 377	Applied Biosystems, Foster City, USA
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer, Überlingen
Dispergierwerkzeug Ultraturrax T25	Schütt
Elektrophoresesystem SCell	Invitrogen
<i>SureLock™</i> Mini-Cell	
Fotostereomikroskop SZX12	Olympus, München
Fotomikroskop BX60	Olympus
GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer
Gene Pulser	BioRad
Paraffin-Einbettungsstation	Shandon, Frankfurt a.M.
<i>Histocentre 2</i>	
Luminometer Typ LB 953	Berthold, Bad Wildbad
Mikrotiterplatten-Photometer	BioRad
<i>Microplate Reader 450</i>	
Mikrotom RM 2035	Leica, Nussloch
<i>Personal Molecular Imager FX</i>	BioRad
Phosphoimager-Screen	Kodak, Rochester, New York
Semi-Dry-Blot <i>Fast Blot</i>	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer Ultrospec 3000 <i>pro</i>	Amersham Pharmacia Biotech
<i>SpeedVac</i> concentrator SVC 100H	Schütt
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Turboblotter™	Schleicher & Schüll
Ultraschallstab <i>Ultraturrax</i>	Branson, Soest, Niederlande
UV Stratalinker™ 1800	Stratagene, Heidelberg
Vibratom 1000M	Leica
Video-Dokumentationssystem	Herolab, Heidelberg
X-Ray Automatic Processor Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien

## 2.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden nach [Sambrook et al. \(1989\)](#) hergestellt. Die Chemikalien wurden den Erfordernissen entsprechend in bidestilliertem oder deionisiertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Für die Arbeiten

mit RNA wurden die Puffer, sofern sie kein Tris oder SDS enthielten, üN mit 0.1 % DMDC inkubiert und anschließend autoklaviert. Tris-Puffer oder SDS-haltige Lösungen wurden in RNase-freien Gefäßen mit DMDC-behandeltem Wasser angesetzt. Puffer von Enzymen und gebrauchsfertigen Kits wurden wie vom Hersteller angegeben genutzt, ihre Zusammensetzung ist hier nicht weiter aufgeführt.

Acrylamid-Lösung	38 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid
Auftragspuffer 1	Glycerol (autoklaviert) 1 % BPB 0.25 M EDTA, pH 7.4 Ampuwa H <sub>2</sub> O
Auftragspuffer 2	15 % Ficoll 400 200 mM EDTA, pH 7.4 0.1 % Orange G
BCIP	5 % w/v in 100 % DMF
Blocking-Lösung I	5 % BSA 4x SSC 0.1 % Tween pH 7.0
Blocking-Lösung II	3 % Blocking-Reagenz 0.5 % Tween 0.02 % Natrium-Azid in 1x PBS
Blotting-Puffer	25 mM Tris-HCl 150 mM Glycin 10 % Methanol
Denaturierungslösung	0.5 M NaOH 1.5 M NaCl
Denhardt´s Lösung (50x)	1 % BSA 1 % PVP 1 % Ficoll 400
DMDC-H <sub>2</sub> O	0.5 % DMDC in Aqua dest. üN auf Magnetrührer mischen, danach autoklavieren
dNTP-Lösung	2 mM dATP 2 mM dCTP



---

	2 mM dGTP
	2 mM dTTP
EDTA	0.5 M, mit NaOH auf pH 8.0 einstellen
E-Puffer (10x)	300 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	50 mM EDTA
	pH 7.0
ES-Lysispuffer	100 mM Tris-HCl pH 8.5
	5 mM EDTA
	0.2 % SDS
	200 mM NaCl
	100 µg/mL Proteinase K
Färbepuffer	100 mM NaCl
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	100 mM Tris-HCl pH 8.0
Färbelösung	10 µL NBT
	60 µL BCIP
	in 20 mL Färbepuffer
Gewebe-Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.0
	100 mM EDTA
	0.5 % SDS
Hybridisierungslösung 1 (für Southern- u. Northern-Blot)	10 % Dextransulfat
	12.5x Denhardt's Lösung
	5x SSC
	0.1 % SDS
Hybridisierungslösung 2 (für Roboter-erzeugte Filter)	0.5 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2
	7 % SDS
	1 mM EDTA
Hybridisierungslösung 3 (für <i>in situ</i> -Hybridisierungen)	50 % Formamid
	5x SSC pH 4.5
	50 µg/µL Hefe tRNA
	100 µg/µL Heparin
	0.1 % Tween 20
	(0.1 % Chaps für Hybridisierungen an Paraffin-Schnitten)
MAB-Puffer	0.1 M Maleinsäure
	0.15 M NaCl

---

	0.1 % Tween-20
	pH 7.5
MAB/Block-Puffer	2 % Blocking-Reagenz in MAB
MEMFA	100 mM MOPS
	2 mM EGTA
	1 mM MgSO <sub>4</sub>
	1/10 Formaldehyd (37 %)
MOPS-Puffer (10x)	0.2 M MOPS
	50 mM NaAc
	0.5 M EDTA
	pH 7.0
Natriumphosphatpuffer	684 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1M)
	316 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1M)
	pH 7.2
NBT	5 % w/v
	in 70 % DMF
Neutralisierungslösung	130 mM NaCl
	7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
NTMT	100 mM Tris-HCl pH 9.5
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM NaCl
	0.1 % Tween-20
	2 mM Levamisol
PBS-Puffer (10x)	130 mM NaCl
	7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7.5
PBT-Puffer	1x PBS
	0.1 % Tween 20
RF1-Lösung	100 mM RbCl
	50 mM MnCl <sub>2</sub>
	30 mM KAc
	15 % (w/v) Glycerol
	pH 5.8
RF2-Lösung	10 mM MOPS

	10 mM RbCl
	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	15 % (w/v) Glycerol
Sammelgel-Puffer	0.25 M Tris-HCl pH 6.8
	0.2 % SDS
SDS	10 % in H <sub>2</sub> O oder DMDC-H <sub>2</sub> O
SSC (20x)	pH 6.8
	0.3 M Na <sub>3</sub> Citrat
	pH 7.0 und pH 4.5
TBE (5x)	0.45 M Tris-HCl
	0.45 M Borsäure
	10 mM EDTA
	pH 8.2
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0
	1 mM EDTA
TE-Puffer (low EDTA)	10 mM Tris-HCl pH 8.0
	0.1 M EDTA
Trenngel-Puffer	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
	0.4 % SDS
tRNA	20 mg/mL in DMDC-H <sub>2</sub> O
X-Gal-Lösung	2 % X-Gal in Dimethylformamid

## 2.5 Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte 20 min bei 120°C und 10<sup>5</sup> Pa im Dampfdruckautoklaven (Webco, Bad Schwartau) oder durch Sterilfiltration (Sterilfilter, 0.2–0.45 µm Porengröße). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder für 8–12 h bei 180°C hitzesterilisiert.

## 2.6 Kulturmedien

### 2.6.1 Medien für Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium	1 % Select Pepton
---------------------------	-------------------

	0.5 % Select Yeast Extract
	1 % NaCl
	pH 7.2
Zusätze zur Selektion	Ampicillin (0.1 mg/mL)
	Kanamycin (0.05 mg/mL)
Zusätze für Oja-Platten	100 $\mu$ M IPTG
	0.4 % X-Gal
Agarplatten enthielten 1.5 % (w/v) Agar	

Die Medien wurden mit einfach destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert.

Stammlösungen	
100 mg/mL	Ampicillin in H <sub>2</sub> O
25 mg/mL	Kanamycin in H <sub>2</sub> O
0.2 g/mL	IPTG in H <sub>2</sub> O
8 %	X-Gal in Dimethylformamid

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Antibiotika, IPTG und X-Gal wurden nach dem Autoklavieren des Mediums zu den abgekühlten Medien (ca.  $50^{\circ}\text{C}$ ) hinzugefügt. Platten und Flüssigmedien wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.6.2 Medien für die Zellkultur

Medien und Zusätze zur Anzucht eukaryotischer Zellen wurden als sterile Lösungen bezogen (Pan, Aidenbach; Gibco BRL, Eggenstein).

RI-ES-Zellmedium	DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
	0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM Natrium-Pyruvat
	1 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol
	2 mM L-Glutamin
	1 000 U/mL LIF
EmFi-Fibroblasten-Zellmedium	DMEM
	2 mM L-Glutamin
	10 % FKS

Zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden folgende Einfriermedien verwendet:

RI-ES-Zellen	30 % ES-Zellmedium 50 % FKS 20 % DMSO
EmFi-Zellen	30 % EmFi-Zellmedium 50 % FKS 20 % DMSO

## 2.7 Biologisches Material

### 2.7.1 Bakterienstämme

Es wurde mit folgenden *Escherichia coli* K12-Stämmen gearbeitet:

DH5 $\alpha$	<a href="#">Hanahan (1985)</a>
XL1-blue	<a href="#">Bullock et al. (1987)</a>

### 2.7.2 Vektoren

Es wurden folgende Vektoren verwendet:

pASK-IBA2	IBA, Göttingen
pBluescript <sup>®</sup> II SK (+/-)	Stratagene, Heidelberg
pBluescript <sup>®</sup> II KS (+/-)	Stratagene
pGEM <sup>®</sup> -T	Promega, Wisconsin, USA
pGEM <sup>®</sup> -T easy	Promega
Lawrist 7	RZPD, Berlin
pTKneo	Dr. N. Brose, MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen
pQE-32	Qiagen

### 2.7.3 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	isoliert aus	Referenz
RI	Embryonale Stammzellen	<a href="#">Nagy et al. (1993)</a>
EmFi	Embryonale Fibroblasten	<a href="#">Adham et al. (1997)</a>

### 2.7.4 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Biotinylierter Ziege-Anti-Avidin-Antikörper, Serva  
 Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-FAB-Fragmente, Roche  
 StrepTactin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, IBA  
 Polyklonaler Ziege-Anti-Maus-Alkalische Phosphatase-  
 konjugierter Antikörper, Invitrogen

### 2.7.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) synthetisiert und im lyophilisierten Zustand erworben, mit Ampuwa auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (100 pmol/ $\mu\text{L}$ ) eingestellt und als Stock bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Primer	Sequenz
pTK R	5'-AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC G-3'
pTKneo F	5'-ATT GTC TGA GTA GGT G-3'
pTKneo R	5'-GCG CGA ATT CGA TGA TCC TGA ACG GC-3'
pTKneo R2	5'-CAG AGG TTA CGG CAG TTT GTC-3'
MS3 F1	5'-GCA GAC AGC GGC AGC GAG A-3'
MS3 R2	5'-GCT GAC TGG CTC GGC TTT AG-3'
1B7 F1	5'-GTC TCG GCG AAA GCA ACG-3'
1B7 R1	5'-TTT AAG ACA AGG TTA CTG AG-3'
1B7 R2	5'-CAC GCA CAA CAC AGA CTC-3'
1B7 R3	5'-AGC CCA ATC CTT TTA GAG ACA C-3'
1B5 R1	5'-CTC CCT GCC CTC AAG TC-3'
1B5 R2	5'-GAA TCA GAA GGT CAA GGG TAT C-3'
1B7HB F1	5'-TGG ACC TGT GCT GAA CG-3'
1B7HB F2	5'-TCT GTG TAG TTT TGG CTG TCC T-3'

Fortsetzung

---

1B7HB R1	5´-CTT ACC CAG GTT AAT AAG G-3´
1B7E/H F1	5´-CGT CTC TTA GGG ATG GGA TTT C-3´
CE6 F1	5´-AAA ATG TTC AGG TAG AAA AAC-3´
CE6 F2	5´-CCG CGT GAG GCA GGA TAA CT-3´
CE4 F1	5´-TAA CCT TAT TCC CCC GCC-3´
JBa1 F1	5´-TGC CCT GCT AGG CGG TCT TA-3´
Neo R1	5´-AGG AGC AAG GTG AGA TGA CAG-3´
SA F1	5´-GGC TCA CAA CCA TCC GTA ACA-3´
SA F2	5´-TAC CAC CAA AAC ACA AAT CCA AG-3´
Ex R1	5´-ACA CCT GCT CAC CTC CAT CG-3´
Neo F264	5´-GGC TGA CCG CTT CCT CGT G-3´
Ex2 F164	5´-TGA TTA CAC GAC ATT TCC TAC TG-3´
SA R164	5´-GAC GAC TCA AGT AAA AAG CAC AA-3´
SA R364	5´-CTC TTC TTC CTG GCT AAC TCG-3´
MS1FP F1	5´-TTG CAT GGT CTC AGG CCG GGG ACA CAG AGA AGG GTC-3´
MS1FP R1	5´-ATA GCA GGT CTC TGC GCT CAG CAG CAG TAT TTG GTG ACG-3´
MS1FP F2	5´-TTG CAT GGT CTC AGG CCA ACC TCA AGA CCC ATT ACA GC-3´
MS1FP R2	5´-ATA GCA GGT CTC TGC GCT CAA AGC ACC TCC GTT CAC TG-3´
MS2FP F2	5´-TTG CAT GGT CTC AGG CCC TGC AGC AGC TAG TAG AAA AG-3´
MS2FP R1	5´-ATA GCA GGT CTC TGC GCT AGA TGG CTG CTG GGA CTG C-3´
HS1FP F1	5´-TTG CAT GGT CTC AGG CCC GGA GGA AGC AAG CGA AGC-3´
HS1FP R1	5´-ATA GCA GGT CTC TGC GCT GAG TTG AGG TAG AGA GGT TGT-3´
HS1FP F2	5´-TTG CAT GGT CTC AGG CCC GTG CTA TGC CCC CGC TC-3´
HS2FP F1	5´-TTG CAT GGT CTC AGG CCA TCA GTG GAG TGG CAG AAA GT-3´
HS2FP R1	5´-ATA GCA GGT CTC TGC GCT CTG CTG CTG GGG GAA ACT C-3´
pASK-IBA F	5´-AGA GTT ATT TTA CCA CTC CCT-3´
pASK-IBA R	5´-GAC GCA GTA GCG GTA AAC G-3´

---

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonukleotide

### 2.7.6 Gensonden

Die nachfolgende Tabelle erläutert die Verwendung, Herkunft und Größe sämtlicher in der Arbeit verwendeter Gensonden. Die Positionen der *Sall1*- und *Sall2*-

Fragmente sowie die Startpunkte der Cosmide, soweit bekannt, sind in den Abbildungen 3.1 und 3.17 angegeben.

Sonde	Verwendung	Herkunft
1B1	Screening der Cosmidbibliothek 121	600 bp Bam HI-Subklon aus Cosmid 7
1B2	Nachweis von <i>Sall2</i> in Northern- und Southern-Blots	1.1 kb Bam HI-Subklon aus Cosmid 7 ( <a href="#">Kohlhase et al., 2000</a> )
1B6	Screening der Cosmidbibliothek 121	2.4 kb Subklon aus Cosmid 7
CB3E	Nachweis von <i>Sall1</i> bei <i>in situ</i> -Hybridisierungen	2 kb Bam HI/Eco RI-Subklon aus Cosmid C
1B7 E/H	Nachweis von homolog rekombinierten ES-Zellklonen für den <i>Sall2</i> -knock out	1.7 kb Eco RI/Hind III-Subklon aus 1B7 von Cosmid 7
c-son	Hybridisierung der murinen Cosmid-Bibliothek 121	humanes PCR-Fragment aus Exon 2 von <i>SALL1</i>
CB0	Nachweis von <i>Sall1</i> in Northern-Blots	0.56 kb Bam HI-Subklon aus Cosmid C
JBa1 X/E4 Bgl II	Nachweis von homolog rekombinierten ES-Zellklonen für den <i>Sall1</i> -knock out	240 bp-Subklon aus JBa1 von Cosmid J
CE 0.95 480	Nachweis von <i>Sall1</i> in Northern-Blots	480 bp Eco RI/EcoO109 I-Fragment aus Cosmid C
CE 0.95 440	Nachweis von <i>Sall1</i> in Northern-Blots	440 bp Eco RI/EcoO109 I-Fragment aus Cosmid C
Sall3	Nachweis von <i>Sall3</i> bei <i>in situ</i> -Hybridisierungen	1.7 kb MS3 F1/MS3 R2 PCR-Fragment
Sall3 B 400	Nachweis von <i>Sall3</i> im RNase Protection Assay	320 bp Bam HI-Fragment aus pSall3 ( <a href="#">Ott, 1995</a> )
$\beta$ -Actin	Kontrollhybridisierung von RNA-Blots	1.6 kb Not I/Sal I-Fragment aus humanem RZPD-Klon



Fortsetzung

HEF-2	Kontrollhybridisierung von RNA-Blots	1.6 kb Bam HI/Bgl II-Fragment aus pHEF-2 (Rapp et al., 1989)
neo	Neomycin-Resistenzgen: Kontrollhybridisierung von ES-Blots	830 bp Eco RI/Xba I-Fragment aus pTKneo

**Tabelle 2.2:** Gensonden

### 2.7.7 DNA-Bibliothek

Es wurde eine genomische Cosmid-Bibliothek von Mäusen des Stammes 129/Ola verwendet. Die Bibliothek (Nr. 121) wurde von der RZPD (Ressourcen-Zentrum-Primärdatenbank, Berlin) bezogen. Die genomischen Fragmente sind in den Vektor Lawrist 7 kloniert und in *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

### 2.7.8 Mausstämme

Für die Herstellung von Chimären und die Rückkreuzung auf Wildtyp-Stämme wurden die Mausstämme C57BL und 129/SvJ verwendet. Die Embryonen für die whole mount-*in situ*-Hybridisierung an Wildtyp-Mäusen wurden vom Stamm CD1 präpariert. Die Haltungsbedingungen bestanden aus einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus bei 22°C und 55  $\pm$  5 % relativer Luftfeuchtigkeit.

## 2.8 Molekulargewichtstandards

DNA-Längenstandard (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	100 bp-Leiter (100–1500 bp)
	1 kb-Leiter (0.12–12.2 kb)
	5 kb-Leiter (5–40 kb)
	(Gibco BRL, Eggenstein)

Die DNA-Längenstandards wurden nach Herstellerangaben verdünnt und mit Auftragspuffer 1 versetzt.

RNA-Längenstandard (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	RNA-Leiter (0.24–9.5 kb) (Gibco BRL)
SDS-Proteinmarker	SDS-Page Standard 10 kDa Protein-Leiter (10–200) kDa (Gibco BRL) Gefärbter SDS-Page Standard SeeBlue™ Plus2 (4–500 kDa) (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

## 2.9 Nukleinsäuretechnische Methoden

### 2.9.1 Präparation von Nukleinsäuren

#### 2.9.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

([Sambrook et al., 1989](#))

Diese Methode diente analytischen Zwecken und wurde nach einer modifizierten Form der alkalischen Lyse ([Birnboim und Doly, 1979](#)) durchgeführt. Von einer üN-Kultur wurde durch Behandlung mit den Puffern E1, E2 und E3 DNA isoliert, präzipitiert und in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Anschließend wurde eine restriktionsenzymatische Spaltung und bei Bedarf eine Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA durchgeführt.

E1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCl pH 8.0 10 mM EDTA 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNase A
E2 (Lysispuffer)	0.2 M NaOH 1 % SDS
E3 (Neutralisationspuffer)	3 M KAc pH 5.5

#### 2.9.1.2 Herstellung von Glycerinkryokulturen

Glycerinkryokulturen wurden aus den LB-üN-Kulturen der Plasmid-Minipräparationen (s. [2.9.1.1](#)) durch Zugabe von 300  $\mu\text{L}$  sterilem Glycerin zu 700  $\mu\text{L}$  der Bakteriensuspension hergestellt. Die Reaktionsgefäße wurden gut durchmischt und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.9.1.3 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden über DNA-Affinitätsäulen aus dem Jet-star Plasmid Midi- oder Maxi-Kit nach den Angaben der Hersteller aufgereinigt. Die Bakterien einer üN-Kultur wurden abzentrifugiert und die Plasmid-DNA durch Behandlung mit den Puffern des Kits und Aufreinigung über die mitgelieferte Säule aufgereinigt, präzipitiert und in H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

### 2.9.1.4 Endotoxin-freie Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurde das Plasmid mit dem EndoFree Plasmid Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) Endotoxin-frei präpariert. Dazu wurden 100 mL üN-Bakterienkultur abzentrifugiert und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Zelltrümmer, Proteine und Salzkomplexe wurden durch Filtration in der QIAfilter Maxi Cartridge abgetrennt, das Lysat über eine äquilibrierte Säule gegeben, die gebundene DNA gewaschen und in ein steriles, Endotoxin-freies Zentrifugenröhrchen aus Glas eluiert. Nach der Präzipitation mit 0.7 Vol Isopropanol wurde das Pellet mit 70 %igem EtOH (hergestellt mit Endotoxin-freiem H<sub>2</sub>O aus dem Kit) gewaschen, luftgetrocknet und in 100–200 µL ebenfalls Endotoxin-freiem TE-Puffer aufgenommen.

### 2.9.1.5 Isolierung genomischer DNA aus Geweben

(nach [Laird et al. \(1991\)](#))

1–2 g Gewebe wurden zerkleinert und in 700 µL Gewebe-Lysispuffer gemörsert. Für die Genotypisierung von Mäusen wurden 1–2 cm der Schwanzspitze 5 Wochen alter Mäuse mit 700 µL Gewebe-Lysispuffer versetzt. Dazu wurden 30 µL Proteinase K (10 µg/µL) gegeben und dieser Ansatz üN bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit 1 Vol Isopropanol präzipitiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in 100–200 µL H<sub>2</sub>O gelöst und bei 4°C gelagert.

### 2.9.1.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben

Gesamt-RNA für Northern-Blot-Analysen wurde aus unterschiedlichen Geweben der Maus isoliert. Da RNA besonders anfällig gegen Abbau durch RNasen ist, wurden alle Lösungen und das Millipore-H<sub>2</sub>O üN mit 0.1 % DMDC inkubiert und

autoklaviert und verwendete Glaswaren für 8–12 h bei 180°C erhitzt (s. 2.5). Die Arbeitsschritte wurden nach Möglichkeit auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt.

100 mg frisches Gewebe wurde in ein 15 mL Falcon-Gefäß mit Total RNA Reagent (Biomol, Hamburg) gegeben. Das Gewebe wurde mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax) homogenisiert und die Suspension 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0.2 Vol auf 4°C vorgekühltem Chloroform wurde der Ansatz vorsichtig invertiert und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde anschließend mit 4 000x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Aus dem wässrigen Überstand wurde die RNA mit 1 Vol Isopropanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in DMDC-H<sub>2</sub>O gelöst. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung und einem Integritätstest im denaturierenden Agarosegel (s. 2.9.8.3) wurde die RNA bei –70°C gelagert.

## 2.9.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte in einem Spektrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Es wurden die Extinktionen bei 230, 260, 280 und 320 nm gemessen und die Differenz  $OD_{260} - OD_{320}$  sowie die Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  und  $OD_{260}/OD_{320}$  ermittelt. Unter Zugrundelegung einer  $OD_{260}$  von 1 bei einer DNA-Lösung von 50 ng/ $\mu$ L (bzw. 40 ng/ $\mu$ L für RNA) wurden die entsprechenden Konzentrationen errechnet. Die Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  und  $OD_{260}/OD_{320}$  sind ein Maß für die Protein- bzw. Salzkontamination und sollten >1.8 bzw. >2.0 sein.

## 2.9.3 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

Alle enzymatischen Modifikationen wurden nach den etablierten molekularbiologischen Standardmethoden durchgeführt, wie sie z. B. in [Sambrook et al. \(1989\)](#) bzw. [Ausubel et al. \(1994\)](#) beschrieben sind.

### 2.9.3.1 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen (RE) verschiedener Hersteller gespalten und weiter verarbeitet. Die Restriktionsansätze enthielten standardmäßig 1/10 Vol des vorgeschriebenen Enzympuffers und maximal 1/10 Vol an Enzym. Es wurden in der Regel 2–10 U RE/ $\mu$ g DNA eingesetzt. Für die simultane restriktionsenzymatische Spaltung mit zwei unterschiedlichen Enzymen wur-

de, soweit möglich, ein mit beiden Enzymen kompatibler Puffer eingesetzt, oder die DNA wurde zwischen den beiden Reaktionen präzipitiert, um einen Pufferwechsel zu ermöglichen. Neigten die RE zu unspezifischen Reaktionen, wurde dem Restriktionsansatz 1  $\mu\text{g}$  BSA (10 mg/mL) zugegeben. Die Reaktion erfolgte über 1–2 h im Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms. Je nach weiterer Verwendung wurden die Reaktionsansätze auf ein Agarosegel aufgetragen, das Enzym durch Hitze (10 min, 70°C) inaktiviert oder bei Verwendung von hitzeresistenten Restriktionsenzymen diese über eine Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung entfernt.

### 2.9.3.2 Restriktionsspaltung von genomischer DNA

Für Southern-Blots wurden 20  $\mu\text{g}$  genomischer DNA in einem 50  $\mu\text{L}$  Reaktionsvolumen mit 5  $\mu\text{L}$  RE (50 U) für 2 h restringiert, nachfolgend das Reaktionsvolumen auf 60  $\mu\text{L}$  erhöht, weitere 3  $\mu\text{L}$  RE zugegeben und  $\text{üN}$  inkubiert. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde auf einem Testgel durch Auftragung von 2  $\mu\text{L}$  des Ansatzes überprüft und bei Bedarf durch erneute Zugabe des entsprechenden RE die Reaktion fortgesetzt.

### 2.9.3.3 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Bei diesem Verfahren werden Phosphat-Reste am 5'-Ende von DNA-Molekülen, die bei der restriktionsenzymatischen Spaltung (s. 2.9.3.1) entstehen, durch eine Alkalische Phosphatase (AP) entfernt. Dadurch wird die Religation von Vektoren verhindert und somit die Rate der rekombinanten Klone erhöht. Nach Restriktionsspaltung, Präzipitation und Aufnahme der Vektor-DNA in  $\text{H}_2\text{O}$  wurde ein 30  $\mu\text{L}$ -Reaktionsansatz mit 1  $\mu\text{L}$  AP (1 U/ $\mu\text{L}$ ) und 1/10 Vol AP-Puffer hergestellt. Um die optimale  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration für das Enzym zu erreichen, wurde soviel Verdünnungs-Puffer (*Dilution Buffer*, DB) dazu gegeben, dass AP + DB 1/10 des Reaktionsvolumens ergaben, und der Ansatz 1 h bei 37°C dephosphoryliert. Für 3'-überhängende oder glatte Enden wurden 2  $\mu\text{L}$  AP eingesetzt und 1 h bei 50°C inkubiert. Darauffolgend wurde das Enzym für 10 min bei 70°C inaktiviert, die DNA präzipitiert, das Pellet in einer Endkonzentration von 50 ng/ $\mu\text{L}$  in 1x TE-Puffer aufgenommen und bei –20°C gelagert.

#### 2.9.3.4 Auffüllreaktion

(Costa und Weiner, 1994)

Wurden für Klonierungen DNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) benötigt, um so nicht kompatible DNA-Überhänge in *blunt end*-vorbereitete Vektoren zu ligieren, wurden diese durch eine Reaktion mit der *Pfu*-Polymerase aufgefüllt. 50–500 ng DNA wurden in 20  $\mu\text{L}$ -Reaktionen mit 2  $\mu\text{L}$  *Pfu*-Puffer, 2  $\mu\text{L}$  5 mM dNTPs und 2 U *Pfu*-Enzym gemischt und 60 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert.

#### 2.9.3.5 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden wurde der Rediprime-Kit zum Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>]P dCTP oder der Hexalabel-Kit zum Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>]P dATP verwendet. Für die dCTP-Sonden wurden 2.5–25 ng DNA in 45  $\mu\text{L}$  TE-Puffer denaturiert, abgekühlt in das Reaktionsgefäß mit dem Rediprime-Pellet gegeben und nach Zugabe von 40  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ -<sup>32</sup>]P 10 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf eine MicroSpin-Aufreinigungssäule aufgetragen und für 1 min bei 3 000xg zentrifugiert. Danach konnte die markierte Probe bei 4°C bis zur Verwendung gelagert oder sofort für 10 min bei 95°C denaturiert und verwendet werden.

Für dATP-Sonden wurden 100 ng DNA in 10  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer und H<sub>2</sub>O denaturiert, abgekühlt und nach Zugabe von dNTP-Mix (ohne dATP), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>]P dATP und Klenow-Fragment nach Angaben des Herstellers für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 4  $\mu\text{L}$  dNTP-Mix dazugegeben, der Ansatz weitere 5 min bei 37°C inkubiert und die markierte Sonde über eine MicroSpin-Säule aufgereinigt.

### 2.9.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente zur Sequenzierung (s. 2.9.6) sowie für Hybridisierungs- (s. 2.9.3.5) und Klonierungsexperimente (s. 2.9.5) zu isolieren. Hierfür kamen die Fertigsysteme QIAquick Gel Extraction Kit und JETsorb Gel Extraction Kit zum Einsatz.

Die entsprechende DNA-Bande wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung (s. 2.9.8.1) auf einem Transilluminator unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und nach Herstellerangaben isoliert. Sowohl im QIAquick- wie auch im JETsorb-Kit wurde die Agarose anschließend nach Zugabe einer hochmolaren Lösung des chaotropen Salzes Natriumperchlor-

rat ( $\text{NaClO}_4$ ) bei  $50^\circ\text{C}$  irreversibel aufgelöst und die DNA nach dem von [Vogelstein und Gillespie \(1979\)](#) beschriebenen Prinzip in Suspension (Glasmilch) oder in Säulen an Anionenaustauschersilikat gebunden, mehreren Waschschrinen mit Hochsalzpuffer und Niedrigsalzpuffer unterzogen und mit Ampuwa- $\text{H}_2\text{O}$  oder TE-Puffer eluiert. Ein Aliquot der aufgereinigten DNA wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein Agarosegel aufgetragen.

## 2.9.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 2.9.5.1 Ligation

Die restriktionsenzymatisch gespaltenen (s. [2.9.3.1](#)), isolierten (s. [2.9.4](#)) und bei Bedarf aufgefüllten DNA-Fragmente (s. [2.9.3.4](#)) konnten direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen des nötigenfalls dephosphorylierten Plasmid-Vektors (s. [2.9.3.3](#)) ligiert werden. Dafür wurde das Verhältnis der DNA-Enden von Vektor und Fragment auf ca. 1:3 eingestellt und in einer  $10\ \mu\text{L}$ -Reaktion mit  $2\ \mu\text{L}$  5x Ligase-Puffer,  $1\ \mu\text{L}$  10 mM ATP und 1 U T4-DNA-Ligase vermischt. Der Ansatz wurde entweder 30 min bei RT oder üN bei  $16^\circ\text{C}$  inkubiert.

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das pGEM-T oder das pGEM-T easy Vektorsystem genutzt. Das System enthält linearisierten Vektor mit 3'-T-Überhängen, die kompatibel zu den 3'-A-Überhängen von PCR-Produkten sind, die von den meisten DNA-Polymerasen erzeugt werden ([Clark, 1988](#); [Hu, 1993](#)). Zur Ligation in diese Vektoren wurde üN bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 2.9.5.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

(nach [Dagert und Ehrlich \(1979\)](#))

400 mL LB-Medium ( $15\ \mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin) wurden mit 10 mL einer üN-Kultur angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{550} = 0.5$  vermehrt. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und nachfolgend bei  $5000\times g$  für 12 min bei  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in  $66\ \mu\text{L}$  RF1 resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 16 mL RF2 aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.9.5.3 Transformation

(Sambrook et al., 1989)

Für die Transformation eines Ligationsansatzes (s. 2.9.5.1) wurden 200  $\mu\text{L}$  kompetenter Zellen (s. 2.9.5.2) auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 42°C für 90 sec einem Hitzeschock ausgesetzt und nach 2 min Inkubation auf Eis mit 200  $\mu\text{L}$  LB-Medium versetzt. Die transformierten Bakterien wurden für 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, auf Selektionsplatten ausplattiert und  $\text{ÜN}$  bei 37°C inkubiert.

### 2.9.6 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde modifiziert nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Die modifizierte Methode beruht auf dem Prinzip der durch den Einbau von fluoreszenzfarbstoffmarkierten ddNTPs (Didesoxynukleosid-5'-triphosphate) statistisch unterbrochenen DNA-Synthese.

Die eingesetzte Menge der zu sequenzierenden Template-DNA wurde nach der Formel  $\text{ng DNA} = x(\text{bp})/5$  berechnet. Die DNA wurde mit 10 pmol Sequenzprimer und  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Vol von 16  $\mu\text{L}$  gebracht und mit 4  $\mu\text{L}$  BigDye-Mix oder DYEnamic ET-Mix gemischt. Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und mit folgendem PCR-Programm im DNA Thermal Cycler 480 für 25 Zyklen sequenziert:

20 sec	98°C	Denaturierung
15 sec	50°C	Anlagerung
1 min	60°C	Verlängerung

Die PCR wurde standardmäßig mit vektorspezifischen Primern oder für die direkte Sequenzierung mit den Amplifikationsprimern durchgeführt.

Die Ansätze wurden gefällt und das getrocknete Pellet in Formamid-Ladepuffer (0.5 M EDTA pH 8.0:Formamid im Verhältnis 1:5) 5 min denaturiert. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung im 7%igen denaturierenden Polyacrylamidgel und der computergesteuerten Analyse in der automatischen Sequenzieranlage wurden die Daten als EDV-Datei gespeichert. Zur Analyse wurden das DNASIS-Programm für PC und das MacMollyTetra® Software Paket für Apple Macintosh Computer verwendet. Vergleiche mit den Sequenzdatenbanken EMBL und GenBank wurden mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul et al., 1998) über die entsprechenden www Server (z. B. NCBI Blast Notebook, <http://www.ncbi.nlm.nih/>) durchgeführt.



## 2.9.7 PCR-Techniken

(Saiki et al., 1988)

Mit der Methode der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) werden DNA-Templates sequenzspezifisch amplifiziert. Dazu wird die DNA zuerst hitzedenaturiert (Denaturierung), darauf binden die Oligonukleotidprimer in einer Anlagerungsreaktion an den komplementären Strang (Anlagerung), und die Polymerase synthetisiert die DNA zwischen den Primern (Verlängerung). Die meist verwendete Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Chien et al., 1976) verfügt über einen hitzelabilen Inhibitor, der während der Denaturierung inaktiviert wird und damit die Durchführung einer *hot start* PCR möglich macht, wodurch die Entstehung unspezifischer Amplifikate während des ersten Zyklus vermieden wird.

Es wurden zwei verschiedene Thermocycler verwendet (s. 2.3.2), wobei entweder 0.2 oder 0.5  $\mu\text{L}$ -Reaktionsgefäße verwendet und bei dem Thermocycler ohne Deckelheizung die Ansätze mit Mineralöl überschichtet wurden.

### 2.9.7.1 PCR an Plasmid-DNA

Eine PCR an Plasmid-DNA wurde durchgeführt um Fragmente zu erhalten, die nicht über eine restriktionsenzymatische Spaltung isoliert werden konnten. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

x $\mu\text{L}$	Plasmid-DNA (30–500 ng)
5 $\mu\text{L}$	10x <i>Taq</i> Polymerase Puffer
1 $\mu\text{L}$	Primer 1 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
1 $\mu\text{L}$	Primer 2 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
1.5 $\mu\text{L}$	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1 $\mu\text{L}$	dNTP-Lösung (10 mM)
0.5 $\mu\text{L}$	<i>Taq</i> Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )
<hr/>	
ad 50 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O

Der Reaktionsansatz wurde folgendem Zyklus 15–35x im Thermocycler unterworfen:

30–60 sec	95	°C	Denaturierung
15–30 sec	50–65	°C	Anlagerung
30–90 sec	72	°C	Verlängerung

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde die DNA 5 min bei 95°C denaturiert. An den letzten Zyklus schloss sich ein weiterer Verlängerungsschritt von 5 min bei 72°C an. Nach Abschluss der PCR wurde zur Kontrolle 1/10 des Ansatzes mit Auftragspuffer 2 gemischt, je nach Größe des erwarteten PCR-Produkts auf ein 1–1.5%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.9.7.2 PCR an genomischer DNA

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen genomischer DNA wurde diese wie unter [2.9.1.5](#) beschrieben extrahiert und mit folgenden Substanzen in einem Reaktionsansatz zusammen gegeben:

x $\mu$ L	DNA (300–500 ng)
2 $\mu$ L	10x <i>Taq</i> Polymerase-Puffer
1 $\mu$ L	Primer 1 (10 pmol/ $\mu$ L)
1 $\mu$ L	Primer 2 (10 pmol/ $\mu$ L)
0.6 $\mu$ L	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1 $\mu$ L	dNTP-Lösung (10 mM)
0.2 $\mu$ L	<i>Taq</i> Polymerase (5 U/ $\mu$ L)
ad 20 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O

Für jede Primerkombination wurden die MgCl<sub>2</sub>- und dNTP-Menge optimiert und optional DMSO zu der Reaktion zugegeben. Die Dauer des Verlängerungsschritts wurde nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments gewählt (1 kb  $\approx$  1 min), die Anlagerungstemperatur nach dem Schmelzgrad der jeweiligen Primer. Die PCR begann mit einer initialen Denaturierung für 5 min bei 95°C, der Zyklus wurde zumeist 35x wiederholt und nach dem letzten Zyklus ein weiterer Verlängerungsschritt für 5 min bei 72°C durchgeführt. Nach der Amplifikation wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt (s. [2.9.8.1](#)).

### 2.9.7.3 Analytische PCR an genomischer DNA von knock out-Mäusen

Für die Genotypisierung von knock out-Mäusen wurde ein dritter Primer eingesetzt, so dass ein Wildtyp- und ein mutiertes Allel unterschiedlicher Länge amplifiziert werden konnten. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz zusammen gegeben:

x $\mu\text{L}$	DNA (300–500 ng)
2 $\mu\text{L}$	10x <i>Taq</i> Polymerase-Puffer
1 $\mu\text{L}$	Primer 1 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
1 $\mu\text{L}$	Primer 2 (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )
1 $\mu\text{L}$	Primer 3 (10 mM)
0.6 $\mu\text{L}$	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1 $\mu\text{L}$	dNTP-Lösung (10 mM)
0.2 $\mu\text{L}$	<i>Taq</i> Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )
ad 20 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O

Die DNA wurde über 30 Zyklen nach folgendem Programm amplifiziert:

30 sec	94°C	Denaturierung
30 sec	64°C	Anlagerung
60 sec	72°C	Verlängerung

Vor Beginn des ersten Zyklus erfolgte eine initiale Denaturierung für 5 min bei 94°C, an den letzten Zyklus schloss sich ein weiterer Verlängerungsschritt von 5 min bei 72°C an. Nach der Amplifikation wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem 1.5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt (s. 2.9.8.1).

## 2.9.8 Agarose-Gelelektrophorese

### 2.9.8.1 Horizontale Gelelektrophorese

(Sambrook et al., 1989)

Die horizontale Gelelektrophorese wurde hauptsächlich bei Testgelen, Gelen für Restriktionskartierungen und Insertisolierungen eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0.8–2 %ige Gele in 0.5x TBE-Puffer hergestellt. Die DNA wurde mit Auftragspuffer 2 vermischt, aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Gele wurden fotografisch dokumentiert und die aufgetrennte DNA bei Bedarf auf Nitrozellulose-Membran transferiert (s. 2.9.9.1). Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit der DNA-Leiter (s. 2.8).

### 2.9.8.2 Vertikale Gelelektrophorese

Die vertikale Gelelektrophorese wurde in einigen Versuchen zur Auftrennung der restriktionsenzymatisch gespaltenen genomischen DNA verwendet. Die geringere

Dicke des Gels gewährleistet eine bessere Übertragung der DNA beim Blotten. Zum Abdichten der Innenkammer wurde ein 1.5%iges Sockelgel aus Agarose gegossen und nach Aushärtung der Agarose ein 1%iges Gel darüber geschichtet. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 1x E-Puffer benutzt. Die Elektrophorese wurde unter ständigem Umwälzen (Peristaltikpumpe Ismatec Sa, Zürich) des Laufpuffers durchgeführt.

### 2.9.8.3 Denaturierende Gelelektrophorese

(Hodge, 1994)

Für die Auftrennung von RNA wurden 1%ige Gele verwendet. Die Gele wurden wie unter 2.9.8.1 und 2.9.8.2 beschrieben in Horizontal- oder Vertikalkammern gegossen, wobei für die horizontale Elektrophorese 1x MOPS-Puffer und für die vertikale 1x E-Puffer verwendet wurde. Zusätzlich enthielten diese Gele 7.4% Formaldehyd, um die Rückbildung der Sekundärstrukturen der RNA während der Elektrophorese zu verhindern.

Die Proben (20  $\mu$ g Gesamt-RNA) wurden mit 10x MOPS- oder E-Puffer, Formaldehyd (37%) und Formamid (40%) gemischt und 10 min bei 65°C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden Auftragspuffer 2 und Ethidiumbromid zu der RNA gegeben und der Ansatz auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4°C und 65 V für 6–8 h durchgeführt.

## 2.9.9 Transfertechniken von Nukleinsäuren

### 2.9.9.1 Southern-Blot

(Southern, 1975)

Mit Hilfe des Southern-Transfers werden DNA-Fragmente im Kapillarblotting-Verfahren aus Agarosegelen auf Nitrocellulosemembranen oder Nylonmembranen transferiert. Sollten DNA-Fragmente >10 kb aus Gelen transferiert werden, wurden die Gele zunächst für 15 min in 0.25 M HCl depuriniert, alle Gele wurden 15 min mit Denaturierungslösung und 15 min mit Neutralisierungslösung behandelt. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die mit 20x SSC vorbehandelte Membran gelegt, unter der sich ein ebenfalls mit SSC getränktes Blotting-Papier sowie ca. 30 weitere, trockene Blotting-Papiere befanden. Auf das Gel wurden luftblasenfrei zwei weitere getränkte Blotting-Papiere gelegt und mit einem langen Blotting-Papier die Verbindung zu zwei Puffertanks an zwei Seiten der Blot-Apparatur her-

gestellt. Die Größen der jeweiligen Papiere und Membrane wurde so gewählt, dass sie genau die Gelgröße abdeckten.

Der Transfer erfolgte üN, anschließend wurde die Position der Geltaschen auf der Nitrocellulose markiert und die DNA durch eine Behandlung des Filters im UV-Stratalinker oder durch Backen (2 h, 80°C) auf der Membran fixiert. Alternativ wurde für das Blotten genomischer DNA ein Turboblotter™ (Schleicher & Schüll, Dassel) nach den Angaben der Hersteller verwendet.

### 2.9.9.2 Northern-Blot

Die RNA aus dem denaturierenden RNA-Gel (s. 2.9.8.3) wurde direkt nach der Elektrophorese ohne weitere Vorbehandlung auf einen Nitrocellulosefilter transferiert und nach dem Transfer an die Membran fixiert. RNA-Längenstandard enthaltende Spuren wurden vom Filter abgeschnitten, die RNA 15 min in 5 % Essigsäure auf der Membran fixiert und 10 min in Methylblau (0.04 % in 0.5 M NaAc, pH 5.2) angefärbt. Überschüssige Färbung wurde unter fließendem Wasser entfernt, bis die blaugefärbten RNA-Banden sichtbar wurden, und die Membran anschließend luftgetrocknet.

## 2.9.10 Radioaktive Hybridisierungstechniken

### 2.9.10.1 Hybridisierung von Southern- und Northern-Blots

(Denhardt, 1966)

Die DNA- bzw. RNA-Filter (s. 2.9.9.1 bzw. 2.9.9.2) wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit 15 mL Hybridisierungslösung 1 und 150 µL denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/mL) für mindestens 2 h bei entsprechender Temperatur, die je nach Homologiegrad zwischen eingesetzter DNA-Sonde und zu hybridisierender DNA oder RNA zwischen 55–68°C gewählt wurde, vorhybridisiert. Die radioaktiv markierte DNA-Probe (s. 2.9.3.5) wurde im Thermomixer bei 95°C denaturiert, auf Eis gekühlt und der Hybridisierungslösung zugesetzt.

Die Hybridisierung erfolgte üN, anschließend wurde 15 min bei RT und 15 min bei Hybridisierungstemperatur mit 2x SSC und 0.1 % SDS und nochmals bei Hybridisierungstemperatur mit 0.2x SSC und 0.1 % SDS gewaschen. Die Filter wurden in PE-Folie eingeschweißt, in eine Autoradiografiekassette mit Verstärkerfolie eingelegt, ein Röntgenfilm bei –70°C exponiert und nach 1–10 Tagen entwickelt. Alternativ wurde der Blot mit dem Phosphor-Imager-System nach 0.5–5 Tagen ausgewertet.

### 2.9.10.2 Hybridisierung der genomischen Cosmid-Bibliothek 129/Ola

Die Hybridisierung der Cosmid-Bibliothek erfolgte nach den von der RZPD empfohlenen Bedingungen. Die 12 Cosmid-Filter wurden im Wasserbad je nach Homologie der Sonde zum gesuchten Klon bei 55–65°C 2 h in Hybridisierungslösung 2 mit 500 µL Lachsspermien-DNA (10 mg/mL) vorhybridisiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde und Hybridisierung üN wurden die Filter 2x 20 min in 40 mM Natriumphosphatpuffer, 0.1 % SDS bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, in PE-Folie eingeschweißt, autoradiographiert und die Signale nach Angaben der RZPD ausgewertet. Die berechneten Cosmid-Klone wurden bei der RZPD online bestellt (<http://www.rzpd.de>).

### 2.9.11 *In situ*-Hybridisierungen

*In situ*-Hybridisierungen an Embryonen wurden durchgeführt, um die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten während der Embryonalentwicklung der Maus zu untersuchen. Zur genaueren Bestimmung der exprimierenden Zellen erfolgte eine Hybridisierung an Embryonen- oder Gewebsschnitten. Die im folgenden beschriebenen Protokolle wurden modifiziert nach Ausubel et al. (1994) durchgeführt und in der Arbeitsgruppe von Dr. A. Kispert im Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg erlernt.

#### 2.9.11.1 Digoxigenin-Markierung von Nukleinsäuren

Die *in vitro*-Transkripte wurden nach der Anleitung des DIG-RNA Labeling Kits markiert. Die zu markierende Template-DNA wurde über Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung aufgereinigt. Die Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge zum Reaktionsansatz pipettiert:

5 µL	DMDC-H <sub>2</sub> O
2 µL	10x Transkriptionspuffer
2 µL	linearisierte Plasmid-DNA (500 ng/µL)
2 µL	10x DIG NTP Labeling-Mix
1 µL	RNase Inhibitor
1 µL	RNA-Polymerase T3/T7/SP6
2 µL	0.2 M DTT

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und das DNA-Template durch Inkubation mit 1 µL DNase für 15 min bei 37°C aus dem Ansatz entfernt. Die markierte

RNA wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  DMDC- $\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{L}$  4 M LiCl und 300  $\mu\text{L}$  EtOH gefällt, das Pellet getrocknet, mit 70 % Ethanol/DMDC- $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 55  $\mu\text{L}$  DMDC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Ein 5  $\mu\text{L}$ -Aliquot wurde auf ein nicht-denaturierendes TBE-Gel aufgetragen, fotografisch dokumentiert und daraus die einzusetzende Menge der DIG-markierten Sonde abgeschätzt.

### 2.9.11.2 Präparation von Maus-Embryonen

Weibliche NMRI-Mäuse bzw. *Sall2*-knock out-Mäuse wurden verpaart und am nächsten Morgen auf einen Vaginalpfropf als äußeres Zeichen für eine erfolgte Verpaarung kontrolliert. Die Embryonen wurden an den gewünschten Tagen post coitum (dpc; 7.5–14.5 Tage pc, für embryonale Gewebe 12.5–18.5 Tage pc) präpariert, 2x in DMDC-PBS gewaschen und üN in 4 % PFA in PBT fixiert. Am nächsten Tag folgten zwei Waschschriffe in PBT (je 5 min) und eine aufsteigende Methanolreihe in PBT (25 %, 50 %, 75 %, 100 %), um das Gewebe zu entwässern. Nach zweimaliger Inkubation in 100 % Methanol für je 5 min konnten die Embryonen bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  in 100 % Methanol gelagert werden.

### 2.9.11.3 Whole mount-*in situ*-Hybridisierung

Alle Schritte wurden in sterilen 20 mL Glas-Szintillationsgefäßen mit Schraubdeckel oder 12-Loch Zellkultur-Platten durchgeführt. Die Gefäße wurden auf einem Taumel-Rollenmischer bewegt, die Platten auf einer Laborwippe.

#### 2.9.11.3.1 Vorbehandlung der Embryonen

Die Behandlung der Embryonen vor der Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden begann mit der Rehydrierung in einer absteigenden Methanolreihe in PBT (75 %, 50 %, 25 %) für je 5–10 min. Durch 2 Waschschriffe in PBT für 10 min wurden die Methanolreste aus den Embryonen entfernt. Das Bleichen erfolgte in 6 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBT für 1 h bei RT, danach wurde erneut in PBT für 3x 5 min gewaschen. Embryonen, die älter als 8.5 dpc waren, wurden mit einer 0.5 mm Kanüle 1–2x im Kopfbereich punktiert, um eine unspezifische Einlagerung der Sonde in die Hohlräume zu vermeiden (*probe trapping*). Darauf folgte eine Behandlung mit Proteinase K (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bei RT in 12-Loch Zellkultur-Platten, durch die das Gewebe für die Sonde zugänglich gemacht wurde. Die Inkubationsdauer variierte abhängig vom Alter der Embryonen.

---

7.5 und 8.5 dpc-Embryonen	1 min
9.5 dpc-Embryonen	4 min
10.5 dpc-Embryonen	6 min
11.5 dpc-Embryonen	8 min
12.5 dpc-Embryonen	10 min
13.5 dpc-Embryonen	12 min
14.5 dpc-Embryonen	14 min

Die Reaktion wurde durch 2x 10 min Waschen mit 2 mg/mL Glycin in PBT bei RT abgestoppt und die Embryonen danach 3x 5 min bei RT in PBT gewaschen. Nach einer Postfixierung für 20 min bei RT in 4 % PFA/0.2 % Glutardialdehyd in PBT und nachfolgenden 3x 5 min in PBT wurden die Embryonen in Zellkultur-Platten übertragen und 5 min bei RT mit 1 mL Hybridisierungslösung 3 inkubiert. Mit frischer Hybridisierungslösung erfolgte darauf eine Vorhybridisierung für 1–2 h bei 70°C im Inkubator, wobei die Zellkultur-Platte in einer Feuchtkammer plaziert wurde. Die Hybridisierung wurde nach erneutem Wechsel der Hybridisierungslösung und Zugabe der DIG-RNA-Sonde ün bei 70°C durchgeführt.

#### 2.9.11.3.2 Waschschritte und Antikörper-Inkubation

Die Embryonen wurden 3x 30 min in vorgewärmter Waschlösung I bei 70°C gewaschen, anschließend wieder in Szintillationsgefäße überführt und 3x 5 min bei RT mit TNT gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation in den Zellkultur-Platten für 30 min mit 100 µg/mL RNase in TNT bei 37°C, um nicht gebundene und damit einzelsträngige RNA abzubauen. Gewaschen wurde anschließend 5 min bei RT mit TNT/Waschlösung II (1:1), 3x 30 min bei 65°C mit Waschlösung II und 3x 5 min bei RT mit MAB. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Embryonen 2–3 h in Zellkultur-Platten bei RT mit 10 % Schafserum in MAB/2 % Blocking Lösung I inkubiert, 1–2 mL Antikörperlösung mit Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics) zugegeben und ün bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

#### 2.9.11.3.3 Waschschritte und Farbreaktion

Am nächsten Tag wurden die Embryonen wieder in Schraubdeckelgefäße überführt und zunächst 3x 10 min bei RT mit MAB gewaschen, darauf erfolgte ein stündliches Wechseln der Waschlösung über den Tag und ein Waschschriff mit MAB bei 4°C ün. Danach wurde 3x 10 min bei RT mit NTMT gewaschen und



die Embryonen bei RT in Dunkelheit so lange in BM Purple inkubiert, bis die gewünschte Anfärbung erreicht war; falls nötig, erfolgte die Inkubation üN. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Embryonen 3x 5 min bei RT in PBT pH 4.5 gewaschen und nachfolgend 1 h bei RT bis üN bei 4°C in 4 % PFA/0.1 % Glutaraldehyd fixiert. Zur Lagerung verblieben die Embryonen in PBT pH 4.5, zur fotografischen Dokumentation wurden sie in 80 % Glycerol/PBT und für die Anfertigung von Schnitten in 70 % Ethanol/isotonische Kochsalzlösung überführt.

#### 2.9.11.3.4 Gelatine-Einbettung

Zur Anfertigung von Vibratom-Schnitten wurden die Embryonen zunächst in einen Gelatine-Block in einer Einbettungsform eingebettet. Dazu wurde in 2 mL der Gelatine-Lösung mit 120  $\mu$ L Glutaraldehyd (25 %) eine Polymerisierungsreaktion gestartet, kurz verrührt und luftblasenfrei in eine Einbettungsform überführt. Je nach Größe wurde ein Embryo nach 30–60 sec auf die polymerisierende Schicht verbracht und mit einer zweiten Gelatineschicht überdeckt. Nach ca. 1 h waren die Gelatineblöcke vollständig ausgehärtet und konnten im Vibratom auf 20–80  $\mu$ m geschnitten werden. Zur Lagerung wurde Aqua Poly/Mount aufgetragen, luftblasenfrei ein Deckglas aufgelegt und die Objektträger bei 4°C für max. 1 Woche gelagert.

#### Gelatinelösung

2.2 g	Gelatine	in 450 mL PBS bei 65°C erhitzen
135 g	Rinderserumalbumin	bis zum Lösen verrühren
90 g	Saccharose	fertige Lösung bei –20°C lagern

#### 2.9.11.4 Herstellung von Paraffinschnitten

Das frisch präparierte Material (Organe, Embryonen) wurde in PBS gewaschen, üN bei 4°C in PFA fixiert und erneut 2x 5 min in PBS bei RT gewaschen. Durch eine aufsteigende Methanolreihe (s. 2.9.11.2) wurde das Gewebe entwässert und zur vollständigen Entfernung des Alkohols 3x 15 min in Xylol inkubiert. Für die Einbettung wurde eine Paraffin-Einbettungsstation genutzt. Nach Aushärtung des Blocks wurde das Material in einem Mikrotom auf 7  $\mu$ m geschnitten und auf Superfrost-Objektträger überführt. Paraffinblöcke und Schnitte wurden bei 4°C gelagert.

### 2.9.11.5 *In situ* Hybridisierung von Schnittpräparaten

#### 2.9.11.5.1 Vorbehandlung und Hybridisierung

Die Embryonen- oder Gewebsschnitte wurden zunächst 2x 10 min in Xylol bei RT deparaffiniert, 5 min in Methanol gewaschen und durch eine absteigende Methanolreihe in DMDC-H<sub>2</sub>O (75 %, 50 %, 25 %) rehydriert. Nach einem Waschschrift in PBS für 5 min wurden die Schnitte durch Inkubation für 20 min in 4% PFA in PBS postfixiert. Darauf folgten 2x 5 min Waschen mit PBS bei RT und eine Behandlung mit Proteinase K (10 µg/mL) in 0.1 M Tris pH 7.5 bei 37°C für 15 min, um das Gewebe für die Hybridisierung durch die DIG-RNA-Sonde zugänglich zu machen. Diese Reaktion wurde durch 0.2 % Glycin in PBS abgestoppt, in dem die Schnitte 1x 10 min bei RT inkubiert wurden. Nach 2 Waschschriften für 5 min in PBS wurden die Schnitte acetyliert. Dazu wurden die Objektträger in eine Küvette mit 0.25 % Essigsäureanhydrid überführt, unter heftigem Rühren 0.1 M Triethanolamin (pH 8.0) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Es folgten 2 Waschschriften in PBS und DMDC-H<sub>2</sub>O für je 5 min bei RT, anschließend wurden die Schnitte für 2 h bei 65°C mit je 100 µL Hybridisierungslösung 3 vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurde 50 µL frische Hybridisierungslösung mit DIG-markierter Sonde (s. 2.9.11.1) dazugegeben und die Schnitte mit einem sterilem Deckglas abgedeckt und mit Fotoklebstoff umrandet, um ein Verdunsten der Lösung zu vermeiden. Die Hybridisierung erfolgte ün bei 65°C in einer Feuchtkammer mit DMDC-H<sub>2</sub>O.

#### 2.9.11.5.2 Waschschriften und Antikörper-Inkubation

Der Fotoklebstoff wurde entfernt, die Schnitte 3x 30 min in vorgewärmter Waschlösung I bei 65°C inkubiert und 3x 5 min mit TNT bei RT gewaschen. Um den Hintergrund zu reduzieren, folgte eine Behandlung mit 100 µL RNase (100 µg/mL) in TNT für 30 min bei 37°C um den Hintergrund zu reduzieren und darauf ein Waschschrift für 5 min mit TNT/Waschlösung II (1:1) bei RT. Die 3 Waschschriften mit Waschlösung II wurden für 30 min bei 65°C durchgeführt. Zur Vorhybridisierung wurden die Objektträger in MAB/2 % Blocking-Lösung I mit 10% Schafserum für 2–3 h bei RT inkubiert, darauf 200 µL Antikörper-Lösung zugegeben, die Schnitte mit einem Deckglas abgedeckt und in einer Feuchtkammer bei 4°C ün inkubiert.

### 2.9.11.5.3 Waschschritte und Farbreaktion

Die Schnitte wurden zunächst 3x 10 min bei RT mit MAB, anschließend 3x 10 min mit NTMT bei RT gewaschen. 100  $\mu$ L Färbelösung wurden auf die Objektträger gegeben und unter gelegentlicher Überprüfung unter einem Mikroskop so lange inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2x 10 min mit PBS bei RT gewaschen, die Fixierung erfolgte für 45 min bei RT in MEMFA. Die Schnitte wurden 2x 5 min in PBS bei RT gewaschen und zur Lagerung bei 4°C mit Aqua Poly/Mount überschichtet.

### 2.9.11.6 Herstellung von Embryo-Pulver

(Harlow und Lane, 1988)

Das Maus-Embryo-Pulver wurde verwendet, um unspezifische Antikörper, die mit Maus-Antigenen reagieren und den Hintergrund erhöhen können, aus der Antikörper-Lösung zu entfernen. Zur Herstellung wurden ca. 60 14.5 dpc-Embryonen aus 5 Mäusen in DMDC-PBS auf Eis mit einem Dispergierwerkzeug homogenisiert und mit 4x Vol 4°C kaltem Aceton versetzt. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt und 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10 000x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das pelletierte Präzipitat in kaltem Aceton gelöst. Erneut wurde kräftig geschüttelt, für 10 min auf Eis inkubiert und bei 10 000x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde auf einem Filterpapier ausgestrichen und während der Trocknungszeit bei RT wiederholt mit einem Spatel gemischt und verstrichen. Das Embryo-Pulver wurde bei -20°C in einem luftdichten Behälter gelagert. Vor Benutzung erfolgte eine Hitzeinaktivierung endogener Alkalischer Phosphatasen durch Inkubation bei 70°C für 30 min in MAB/Block-Puffer.

### 2.9.11.7 Fotografische Auswertung

Die *in situ*-gefärbten Embryonen und Schnittpräparate wurden mit einem Fotostereomikroskop und/oder Fotomikroskop mit Hilfe der Analysis®-Software und einer digitalen Kamera fotografiert und die Bilder mit den Programmen Corel PhotoPaint und Microsoft PowerPoint bearbeitet.

### 2.9.11.8 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

(Koehler et al., 1996)

Die chromosomale Lokalisation des murinen *Sall1*-Gens erfolgte über mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung. Die Methode beruht auf der Hybridisierung von Chromosomenpräparaten mit Biotin-markierten einzelsträngigen DNA-Fragmenten an komplementäre Sequenzen auf den denaturierten Chromosomen. Ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltes Antikörpersystem ermöglicht die Detektion des Hybridisierungsergebnisses bei gleichzeitiger Verstärkung des Signals. Die in dieser Arbeit verwendeten Maus-Metaphasenpräparate der WMP-1-Zelllinie (Zörnig et al., 1995) von neugeborenen WMP-Mäusen Chromosomen, die die Robertsonsche Translokation tragen (Said et al., 1986), wurden freundlicher Weise von Dr. C. Dixkens angefertigt und zur Verfügung gestellt.

#### 2.9.11.8.1 Markierung der Sonde über Nick-Translation

(Rigby et al., 1977)

Für die Markierung großer genomischer Fragmente mit markierten Desoxyribonukleotiden wird die Methode der Nick-Translation angewandt. Hierbei setzt eine Desoxyribonuklease I (DNase I) Einzelstrangbrüche (*nicks*) in die doppelsträngige DNA, die durch eine Klenow-Polymerase unter Einbau von im Überschuss zugesetztem Biotin-16-dUTP wieder komplettiert wird. Zeitgleich kommt es durch die DNase I zur Fragmentierung des DNA-Templates, so dass markierte Fragmente von 200–600 bp Länge entstehen. Diese Länge gewährleistet eine gute Diffusionsfähigkeit durch Chromosomenmatrix zu den Zielsequenzen und eine spezifische Hybridisierung.

Hier wurde als Sonde für die Hybridisierung von Maus-Chromosomenpräparaten murine genomische DNA aus dem Cosmidklon C eingesetzt, die mittels Nick-Translation mit Biotin-16-dUTP in folgendem Reaktionsansatz markiert wurde:

1 $\mu$ L	DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)
5 $\mu$ L	dNTP (je 0.2 mM dATP, dGTP, dCTP)
1.5 $\mu$ L	Biotin 16 dUTP (1 mM)
5 $\mu$ L	Pol I (0.5 U/ $\mu$ L) / DNase I (0.4 mU/ $\mu$ L)-Mix
ad 50 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O

Nach 90 min Inkubation wurde ein Aliquot von 8  $\mu$ L auf ein 1.6%iges Agarosegel (s. 2.9.8.1) aufgetragen und der Fragmentlängenbereich bestimmt. Bei einer

mittleren Fragmentlänge von 200–600 bp wurde die Sonde mit 10  $\mu\text{g}$  Lachs-DNA (zur Absättigung von unspezifischen Sequenzen, siehe [Lichter et al. \(1988\)](#); [Pinkel et al. \(1986\)](#)) und 4  $\mu\text{g}$  Cot1-DNA (zur Absättigung von hochrepetitiven Sequenzen) präzipitiert und das gewaschene Pellet in Mastermix (8 % Dextransulfat in 4x SSC) und Formamid (pH 7.0) gelöst. Bei einer deutlich größeren mittleren Fragmentlänge wurde die Inkubationszeit bei 16°C verlängert oder erneut 50  $\mu\text{L}$  Markierungsansatz ohne DNA zugegeben, weitere 30 min inkubiert und der Fragmentlängentest wiederholt.

#### 2.9.11.8.2 Vorbehandlung und Hybridisierung

Die Proben-DNA wurde bei 75°C im Heizblock denaturiert, zur Absättigung der hochrepetitiven DNA-Sequenzen bei 37°C vorhybridisiert und auf die denaturierten Chromosomenpräparate gegeben. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas abgedeckt, mit Fotoklebstoff umrandet und  $\text{üN}$  bei 37°C in einer Feuchtkammer hybridisiert.

#### 2.9.11.8.3 Waschschritte und Antikörper-Inkubation

Durch die Bindung von Fluorochrom-gekoppeltem Avidin an Biotin kann die biotinmarkierte Sonde nach der Hybridisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Als Fluorochrom wurde FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat) verwendet, dessen Signal über ein Verstärkungssystem verstärkt wird. Dazu wurde das Biotin-Signal im ersten Detektionsschritt mit einer Avidin-FITC-Lösung und im zweiten und dritten Detektionsschritt mit einem biotinylierten anti-Avidin markiert und darauf erneut mit Avidin-FITC verstärkt, wie im Folgenden kurz erläutert.

Die Objektträger wurden 1x in 2xSSC, 3x 10 min in 50 % Formamid/2x SSC und nochmal 3x 5 min in 2x SSC gewaschen und für 30 min bei 37°C in Blocking-Lösung I inkubiert. Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte über eine Antikörper-Reaktion mit FITC-Avidin, das 1:200 in 1% BSA/4x SSC/0.1% Tween (pH 7.0) verdünnt wurde. Die Lösung wurde auf die Objektträger aufgetragen, 30 min bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert und anschließend 3x 5 min in 4x SSC/0.1% Tween bei 45°C gewaschen. Die Verstärkung des Signals erfolgte durch einen zweiten Antikörperschritt mit biotinyliertem Anti-Avidin, 1:100 in 1% BSA/4x SSC/0.1% Tween verdünnt. Die Inkubation wurde für 45 min bei 37°C in einer Feuchtkammer durchgeführt, die Waschschritte erfolgten bei 45°C 3x in 4x SSC/0.1% Tween. Anschließend wurde der Biotinnachweis mit FITC-Avidin wiederholt.

#### 2.9.11.8.4 Gegenfärbung der Chromosomen

Im Anschluss an den Immunfluoreszenz-Nachweis wurden die Chromosomenpräparate mit Propidiumjodid (PI) und DAPI (3  $\mu\text{g}$  PI und 70  $\mu\text{g}$  DAPI in 70 mL 4x SSC/0.1 % Tween, [Lin et al. \(1977\)](#)) für 5–10 min bei RT gegengefärbt. Diese Substanzen binden ausschließlich an DNA und bilden stark fluoreszierende Farbkomplexe. Nachfolgend wurden die Objektträger 4x kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen, luftgetrocknet und mit einer Antifading-Lösung ([Johnson und Nogueira Araujo, 1981](#)) überschichtet. Die Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte mit einem Zeiss Axiophot-Fluoreszenzmikroskop mit Filterradkombination.

## 2.10 Proteinchemische Methoden

### 2.10.1 Herstellung der *Strep*-tag-Fusionsproteine

Zur Gewinnung spezifischer Antikörper bzw. zur Aufreinigung der bereits vorhandenen Antisera sollten Fusionsproteine in Bakterien erzeugt werden. Hierzu wurde das *Recombinant Protein Expression and Purification Kit* von IBA verwendet.

Der pASK-IBA2-Vektor trägt nach dem Polylinker eine *Strep*-tag II-Sequenz, die bei Expression der klonierten cDNA C-terminal das *Strep*-tag II-Peptid NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-COOH an das Protein fusioniert. Dadurch kann das Fusionsprotein in einem Schritt mittels Chromatographie an immobilisiertem StrepTactin von den bakteriellen Proteinen abgetrennt und über das mit der Alkalischen Phosphatase (AP)-konjugierte StrepTactin im Western-Blot detektiert werden.

Die Expressionskassette des pASK-IBA2-Vektors steht unter der Kontrolle des *tetA*-Resistenzgens, das nach Zugabe von geringen, nicht antibiotisch wirksamen Konzentrationen an Anhydrotetracyclin (AHT) die Expression der klonierten cDNA induziert. In Abwesenheit des Induktors wird der Promotor durch das ebenfalls auf dem Vektor kodierte *tet*-Repressorgen reprimiert, um einen Wachstumsnachteil der Bakterien durch die Produktion des Fremdproteins zu vermeiden. Da der *tetA*-Promotor/Operator keinen weiteren zellulären Regulationsmechanismen unterliegt, kann weitestgehend jeder *E. coli*-Bakterienstamm verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm DH5 $\alpha$  genutzt.

### 2.10.1.1 Klonierung der Plasmide

Der Polylinker des pASK-IBA2-Vektors trägt u. a. die Restriktionsschnittstelle Bsa I. Das Enzym produziert bei der Restriktion zwei verschiedene Enden, so dass das Fragment gerichtet in den Vektor kloniert werden kann. Dazu muss die entsprechende cDNA mit zwei Primern, die die Erkennungssequenz für das Enzym enthalten, amplifiziert werden.

Zur Klonierung der verschiedenen cDNA-Fragmente wurden genspezifische Primer mit 5'-angefügten artifizialen Bsa I-Schnittstellen mit einer Schmelztemperatur von je 64°C hergestellt. Um den Einbau von nicht komplementären Nucleotiden in das PCR-Produkt zu vermeiden, wurde die *proof reading Pfu turbo*-Polymerase von Stratagene verwendet. Folgende Substanzen wurden in ein 200 µL-Reaktionsgefäß pipettiert:

x µL	Plasmid-DNA (20–200 pg)
5 µL	10x <i>Pfu</i> -Polymerase-Puffer
2.5 µL	Primer 1 (10 pmol/µL)
2.5 µL	Primer 2 (10 pmol/µL)
2.5 µL	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
1 µL	dNTP-Lösung (10 mM)
1 µL	<i>Pfu</i> -Polymerase (2.5 U/µL)
<hr/>	
ad 50 µL	H <sub>2</sub> O

Die PCR wurde im GeneAmp-Thermocycler nach folgendem Schema durchgeführt:

30 sec	94°C	Denaturierung
30 sec	64°C	Anlagerung
60 sec	72°C	Verlängerung

Die Ansätze wurden einer initialen Denaturierung bei 95°C für 3 min unterworfen, der Zyklus 35x wiederholt und die Ansätze nachfolgend für 5 min bei 72°C inkubiert. Nach der Auftrennung in einem Agarosegel (s. 2.9.8.1) wurden die amplifizierten Fragmente isoliert (s. 2.9.4) und mit *Bsa*I restriktionsenzymatisch gespalten. Nach Konzentrationskontrolle auf dem Gel erfolgte die Klonierung in den vorher mit *Bsa* I linearisierten pASK-IBA2-Vektor (s. 2.9.5.1) und die Überprüfung der amplifizierten DNA mittels Sequenzanalyse durch vektorspezifische Primer (s. 2.9.6).



### 2.10.1.2 Zellwachstum, Genexpression und Präparation des Zellextrakts

Als Wirtsstamm für die Expression wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. 5 mL LB-Medium (100  $\mu$ g/mL Ampicillin) wurden mit einer frisch ausplattierten Einzelkolonie des transformierten Expressionstammes angeimpft und üN bei 30–37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2x 100 mL LB-Medium (100  $\mu$ g/mL Ampicillin) mit je 2.5 mL der Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0.5 inkubiert. In einer der Kulturen wurde darauf die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 10  $\mu$ L AHT (2 mg/mL) induziert und beide Ansätze wurden für weitere 3 h inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und 4 000x g für 12 min. Nach vollständigem Entfernen des Mediums wurde das Pellet bei 4°C in 1 mL Puffer W resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung für 2 min bei 40 % Impulsstärke mit einem Ultraschallstab (Branson) aufgeschlossen. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde die Suspension bei 4°C für 15 min bei 14 000x g zentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Um ähnliche Proteinmengen in der Western-Blot-Analyse einsetzen zu können, erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte (s. 2.10.3). Die entsprechenden Mengen wurden anschließend wie unter 2.10.4 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und mit AP-konjugiertem StrepTactin getestet.

### 2.10.1.3 Aufreinigung des Fusionsproteins

Für die Immunisierung von Kaninchen bzw. zur Gewinnung von monospezifischen Antikörpern musste das Fusionsprotein von den bakterieneigenen Proteinen abgetrennt werden. Hierzu erfolgte eine Aufreinigung der wie unter 2.10.1.2 beschrieben gewonnenen Rohextrakte über die StrepTactin-Säule. Die Säule wurde zunächst durch Waschen mit Puffer W (2x 2.5 mL) von Resten des Lagerpuffers gereinigt und äquilibriert, anschließend wurde 1 mL des Bakterienextrakts für 15 min bei 14 000x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand aufgetragen. Nach vollständigem Eindringen in die Matrix wurde diese mit 5x 1 mL Puffer W gewaschen, um nicht an das StrepTactin haftende Bestandteile auszuwaschen. Danach erfolgte die Elution der Fusionsproteine mit 6x 0.5 mL Puffer E, der den spezifischen Kompetitor Desthiobiotin enthält. Das Eluat wurde in 0.5 mL-Fractionen aufgefangen und die Säule anschließend zur Regenerierung mit 3x 5 mL Puffer R gespült. Die Bestandteile des Puffers verdrängen das *Strep*-tag-Peptid von der



StrepTactin-Bindungsstelle und führen zu einer Rotfärbung der Säule, so dass die Regenerationskapazität der Säule optisch zu verfolgen ist. Der Puffer R wurde durch 2x 4 mL Puffer W entfernt und die StrepTactin-Säule konnte bis zur nächsten Aufreinigung in diesem Puffer bei 4°C gelagert werden. Für die Analyse durch SDS-PAGE wurden von jeder Fraktion 20 µL auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, geblottet und wie unter 2.10.1.4 beschrieben mit AP-konjugiertem StrepTactin umgesetzt.

#### 2.10.1.4 Analyse der Expression und der Reinigung

Zur Überprüfung der Gesamtprotein-Extrakte bzw. der über die StrepTactin-Säule aufgereinigten Eluate erfolgte nach der SDS-PAGE und dem Western Blotting die Detektion des *Strep*-tags mittels AP-konjugiertem StrepTactin. Dazu wurden die Proben wie unter 2.10.4 gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.10.5). Zur Abschwächung unspezifischer Proteinbindung erfolgte eine Inkubation des Filters in Blocking-Lösung II. Anschließend wurde die Membran 3x für 5 min mit PBT gewaschen. Danach wurde der Filter 1 h bei RT mit ca. 20 mL Blocking-Lösung II mit 1 : 4 000 verdünntem AP-konjugiertem StrepTactin inkubiert, 3x 1 min mit PBT und 2x 1 min mit PBS gewaschen und die detektierten Banden durch die Farbreaktion der AP mit dem Färbepuffer visualisiert. Erfolgte keine Inkubation mit Biotin, wurde das bakterielle BCCP-Protein von ca. 20 kDa ebenfalls detektiert. Die Farbentwicklung erfolgte in Dunkelheit und wurde bei Erreichen der gewünschten Intensität durch Waschen mit H<sub>2</sub>O abgestoppt.

#### 2.10.2 Kernproteinextraktion aus Gewebe

Alle für diesen Versuch verwendeten Lösungen wurden auf 4°C gekühlt und die Präparationsschritte im Kühlraum auf Eis durchgeführt.

300 mg Gewebe wurden in PBS gewaschen, in 5 mL Kernproteinpuffer A überführt und mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax) homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 4°C für 20 min und 4 000x g wurde das Pellet in 1 mL Kernproteinpuffer C resuspendiert, 30 min unter Rühren auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 4°C und 15 000x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

## Kernproteinpuffer A

10 mM	HEPES pH 7.9
1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	KCl
0.5 mM	DTT
0.5 mM	PMSF
0.5 µg/mL	Leupeptin
0.7 µg/mL	Pepstatin
1.0 µg/mL	Aprotinin

## Kernproteinpuffer C

20 mM	HEPES pH 7.9
25 %	Glycerin
1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
0.42 M	NaCl
0.2 mM	EDTA
0.5 mM	DTT
0.5 mM	PMSF
0.5 µg/mL	Leupeptin
0.7 µg/mL	Pepstatin
1.0 µg/mL	Aprotinin

### 2.10.3 Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung des löslichen Proteins erfolgte nach [Bradford \(1976\)](#), als Standard wurde BSA eingesetzt. Aliquots des Extrakts wurden unterschiedlich stark mit H<sub>2</sub>O verdünnt, um im linearen Bereich der Eichreihe (0–10 µg) zu messen. Dabei wurde jede Verdünnung 2x angesetzt, um aus den gemessenen Werten die Extinktion mitteln zu können. 20 µL des verdünnten Extraktes wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten zu 280 µL Bradfordlösung pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Der Proteingehalt wurde photometrisch bei 595 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt.

### 2.10.4 SDS-Polyacrylamidgel

(Laemmli, 1970)

Zur Auftrennung von Proteinextrakten wurden fertige Gele (s. 2.3.1) mit einem Acrylamidgehalt von 10–15 % bzw. Gradientengele von 4–12% oder selbst hergestellte Gele mit einem Acrylamidgehalt von 10–15% verwendet. Zum Auftragen wurden die Proben mit 4x Sample Buffer versetzt, 10 min bei 95°C im Thermomixer denaturiert, abgekühlt und kurz abzentrifugiert.

Zur Herstellung von SDS-PAGE-Gelen wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungen für das Trenngel zusammen pipettiert, kurz gemischt, zwischen zwei gesäuberte und mit Agarose abgedichtete Glasplatten gefüllt und mit Wasser überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung (ca. 1 h) wurde das Wasser abgeschüttet, die Lösungen für das Sammelgel zusammen gegeben und auf das Trenngel geschichtet. Der Gelkamm wurde luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt und mit MOPS-Elektrophoresepuffer überschichtet. Nach Entfernen des Gelkamms wurden die Taschen gut mit Elektrophoresepuffer ausgespült, die Proben aufgetragen und für 4–8 h bei 100–120 V und 4°C elektrophoretisch aufgetrennt.

Trenngel (20 mL)

Acrylamidkonzentration	10 %	12 %	15 %
H <sub>2</sub> O	10 mL	9 mL	7.5 mL
Acrylamidlösung (40 %)	5 mL	6 mL	7.5 mL
Trenngel-Puffer (4x)	5 mL	5 mL	5 mL
SDS (10 %)	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL
APS (10 %)	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL

Sammelgel (10 mL)

H <sub>2</sub> O	3.7 mL
Acrylamidlösung (40 %)	1.3 mL
Sammelgel-Puffer (2x)	5 mL
10 % APS	50 µL
TEMED	10 µL

Die fertigen Gele wurden in die entsprechende Elektrophoresekammer eingespannt, die Kammer mit MOPS-Elektrophoresepuffer gefüllt und die Proben bei RT für 45–120 min bei 200 V aufgetrennt.

### 2.10.5 Western-Blot

Die Proteine wurden standardmäßig nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung (s. 2.10.4) auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurden 6 Filterpapiere sowie ein PVDF-Filter in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Es wurden 3 Filterpapiere in Blotting-Puffer getränkt und auf die untere Elektrode des Semi-Dry-Blot-Geräts gelegt. Darauf wurde die zuvor für 10 sec in Methanol aktivierte und 5 min in H<sub>2</sub>O und 10 min in Blotting Puffer gewaschene Membran luftblasenfrei aufgelegt. Das Gel wurde von den Gelplatten gelöst, vorsichtig auf die Membran aufgebracht und erneut mit 3 in Blotting Puffer getränkten Filterpapieren überschichtet. Nach dem Aufbringen der Kathodenplatte erfolgte der Proteintransfer für 1 h bei max. 5 mA/cm<sup>2</sup>. Die Membran wurde anschließend mit einem monospezifischen Antikörper bzw. polyklonalen Antiserum gegen das zu detektierende Protein inkubiert. Wurde ein Proteinmarker ohne Bandenfärbung benutzt, erfolgte eine reversible Anfärbung der Membran (s. 2.10.7).

### 2.10.6 Färbung von Polyacrylamidgelen

SDS-Gele wurden standardmäßig mit Simply Blue™ Safestain angefärbt. Nach erfolgter Gelelektrophorese und Blotting wurde das Gel 3x 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen, ca. 1 h in der Färbelösung geschwenkt und darauf erneut in H<sub>2</sub>O gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren. Das Gel konnte nun in Plastikfolie eingeschweißt und für einige Wochen gelagert werden.

### 2.10.7 Reversible Färbung von Western-Blots

(Salinovich und Montelaro, 1986)

An eine Membran gebundene Proteine können reversibel mit 0.5 % Ponceau S in 1 % Essigsäure angefärbt werden. Diese Methode wurde angewandt, wenn ein Proteinstandard ohne gefärbte Banden benutzt wurde, um die Qualität des Proteintransfers zu kontrollieren und die Markerproteine zur späteren Bestimmung der Molekulargewichte zu markieren. Die Entfärbung erfolgte durch Waschen in H<sub>2</sub>O.

### 2.10.8 Immunumsetzung von Western-Blots

Vor der Umsetzung mit dem Antiserum wurden freie Bindungsstellen auf der Membran 1 h bei RT mit Blocking-Lösung II abgesättigt. Danach wurde der Filter 1–2 h bei RT mit ca. 20 mL Antiserum (in Blocking-Lösung II verdünnt) inkubiert und anschließend ungebundener Antikörper durch 3 Waschschriffe von 5–30 min mit PBT entfernt. Die Inkubation mit dem an eine AP konjugierten Zweitantikörper erfolgte für 1 h bei RT, nachfolgend wurden wieder ungebundene Antikörper durch 3x 1–15 min Waschen in PBT entfernt und die Filter auf die Bedingungen des Färbepuffers eingestellt. Die Visualisierung der detektierten Banden erfolgte durch die Farbreaktion der AP mit dem Färbepuffer. Die Farbentwicklung erfolgte in Dunkelheit und wurde bei Erreichen der gewünschten Intensität durch Waschen mit H<sub>2</sub>O abgestoppt.

### 2.10.9 Aufreinigung monospezifischer Antikörper mittels Western-Blot-Verfahren

Die polyklonalen Antiseren gegen Sall1 und Sall2 wurden aufgereinigt, um die spezifisch gegen die Proteine reagierenden Antikörper von den übrigen im Serum enthaltenen Antikörpern abzutrennen. Hierzu wurde ein bakterieller Proteinextrakt mit den jeweiligen StrepTag-Fusionsproteinen nach Aufreinigung über die StrepTactin-Säule mittels PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurden schmale Randstreifen vom Filter abgetrennt und mit AP-Streptactin-Konjugat inkubiert, um die Höhe der Fusionsproteinbande festzustellen. Diese wurde nach Inkubation mit 200  $\mu$ L des polyklonalen Antiserums ausgeschnitten, 3x 10 min in PBT gewaschen und zur Elution der monospezifischen Antikörper 15 min mit 1 mL Elutionslösung mit dem Vortexer kräftig geschüttelt. Nach Waschschriffen in PBS wurde der Filterstreifen erneut mit dem Antiserum inkubiert.

Die eluierten Antikörper wurden in ein Centrisart-Röhrchen überführt und durch Zentrifugtion bei 4°C und 2 500xg konzentriert, wobei der Elutionspuffer in den inneren Stempel übertritt und der Antikörper durch die Membran im Außenröhrchen zurückgehalten wird. Der Überstand wurde verworfen, die Restflüssigkeit mit PBS auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das KSCN vollständig aus der Antikörperlösung entfernt war (3–4x).

Die monospezifische Antikörperlösung wurde mit 0.2 % NaN<sub>3</sub> versetzt und bei 4°C gelagert.

## Elutionslösung

3 M KSCN  
0.1 % BSA  
in 1x PBS

### 2.10.10 Aufreinigung monospezifischer Antikörper mittels Affinitäts-Säulen

N-Hydroxysuccinimid-aktivierte Sepharose™-Säulen (*HiTrap affinity columns*, Amersham Pharmacia Biotech) können kovalent Liganden mit primären Aminogruppen binden. So konnten die Peptide, die zur Immunisierung von Kaninchen gegen SALL1 eingesetzt wurden, an die Säule gebunden und diese zur Aufreinigung monospezifischer Antikörper verwendet werden.

Das zur Vermeidung der Deaktivierung von NHS-Gruppen bei der Lagerung zugegebene Isopropanol wurde direkt vor der Verwendung mit 3x 2 mL 1 mM HCl (4°C) ausgewaschen. Die Lösung wurde mit Hilfe einer Spritze und eines Adapters auf die Säule appliziert. Um die Matrix nicht irreversibel zu komprimieren, wurde für diesen und alle weiteren Schritte eine Flussrate von maximal 1 mL/min eingehalten. 1 mL der Peptide S1-I und S1-II, die in einer Konzentration von je 10 µg/mL in Bindungspuffer aufgenommen worden waren, wurden auf je eine Säule gegeben und diese nach dem Eindringen der Ligandenlösung 4 h bei 4°C inkubiert. Durch eine Behandlung mit 3x 2 mL Puffer A, 3x 2 mL Puffer B, 3x mL Puffer A, Inkubation bei RT für 30 min, 3x 2 mL Puffer B, 3x 2 mL Puffer A und nochmals 3x 2 mL Puffer B1 wurden die überzähligen aktiven Gruppen, die keinen Liganden gebunden hatten, deaktiviert und unspezifisch gebundene Liganden ausgewaschen. Die Lagerung der Säulen erfolgte im Lagerungspuffer. Vor der Verwendung für die Aufreinigung von Antikörpern wurde der Lagerungspuffer mit 3 mL PBS und 3 mL Elutionspuffer ausgewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 10 mL PBS äquilibriert und 2 mL des mit PBS 1:4 verdünnten Antiserums appliziert. Durch eine am unteren Ende der Säule angebrachte Spritze konnte die Serum/PBS-Lösung mehrmals durch die Matrix gepumpt werden. Die Säule wurde mit 7x 1 mL PBS gewaschen und der an die Peptide gebundene Antikörper mit 2 mL Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde wie unter [2.10.9](#) beschrieben entsalzt. Die Säulen wurden mit 7x 1 mL PBS reäquilibriert und bis zur weiteren Verwendung in Lagerungspuffer bei 4°C aufbewahrt.

---

Bindungspuffer	0.2 M NaHCO <sub>3</sub> 0.5 M NaCl pH 8.3
Puffer A	0.5 M Ethanolamin 0.5 M NaCl pH 8.3
Puffer B	0.1 M NaAc 0.5 M NaCl pH 4.0
Lagerungspuffer	0.05 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1 % Natriumazid pH 7.0
Elutionspuffer	3 M MgCl <sub>2</sub> in 1x PBS

### 2.10.11 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums

Aufgereinigte Fusionsproteine können genutzt werden, um Kaninchen durch Injektion mit dem gewünschten Antigen zur Produktion von spezifischen Antikörpern anzuregen. Zur Präimmunisierung wurden stark überexprimierte, aufgereinigte *Strep*-tag-Fusionsproteine ausgewählt und 1:1 mit *Freund's Complete Adjuvans* gemischt. Vor der ersten subkutanen Injektion wurde den Kaninchen Präimmunisierungsserum abgenommen, um nach der Immunisierung eine spezifisch auf das applizierte Antigen erfolgte Antikörperbildung nachweisen zu können. Nach 3 Wochen erfolgte eine *Boost*-Immunisierung mit dem Fusionsprotein 1:1 mit *Freund's Incomplete Adjuvans* versetzt. Es wurde erneut Serum abgenommen, um zu prüfen, ob eine Reaktion auf die Erstimmunisierung erfolgt war. 14 Tage nach der zweiten Immunisierung wurde dem Kaninchen durch Herzpunktion das Blut entnommen. Zur Gerinnung der zellulären Bestandteile wurde das Blut für 1 h bei 37°C und nachfolgend üN bei 4°C inkubiert. Die agglutinierten Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15 min, 10 000x g) pelletiert und das aliquotierte Serum bei -80°C gelagert. Die Überprüfung auf eine erfolgte Antikörperbildung erfolgte mittels Immunodetektion (s. [2.10.5](#), [2.10.8](#)).

## 2.11 Zellkultur

### 2.11.1 Routinekultur von ES-Zellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden zusammen mit Mitomycin C behandelten embryonalen Fibroblasten auf 0.2 % Gelatine beschichteten Kulturschalen ausplattiert. Das Kulturmedium wurde auf Grund der starken Ansäuerung durch die ES-Zellen täglich gewechselt. Eine erneute Passagierung wurde je nach Dichte der Zellen alle 2–3 Tage durchgeführt und die ES-Zellen in Trypsin/EDTA-Puffer 1:3 bis 1:8 geteilt. Vor der erneuten Ausplattierung wurde die Trypsinlösung durch Zentrifugation mit 270xg für 5 min bei RT entfernt. Bei jeder Passage wurden Stocks der ES-Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (s. 2.11.3).

### 2.11.2 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

(Joyner, 2000)

Durch Elektroporation wird eine biologische Membran durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert, ohne die Membranstruktur zu zerstören. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Eindringen linearisierter Plasmid-DNA durch die Membran stattfinden. Die Elektroporation der ES-Zellen wurde nach den Angaben von Joyner (2000) durchgeführt. Dazu wurden  $7 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^7$  exponentiell wachsende Zellen nach der Trypsinierung in 800  $\mu\text{L}$  Elektroporationspuffer und 40  $\mu\text{g}$  linearisierte DNA eingesetzt.

Die wie unter 2.9.1.4 beschriebene aufgereinigte Konstrukt-DNA wurde nach der Linearisierung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym zunächst mit Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert und gewaschen. Um eine Kontamination mit Endotoxinen zu vermeiden, fanden dabei sämtliche Schritte, soweit möglich, unter der Sterilbank statt. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 100  $\mu\text{L}$  Elektroporationspuffer aufgenommen. Die ES-Zellen wurden nach der Trypsinisierung in 9 mL Elektroporationspuffer und nach erneuter Zentrifugation in 700  $\mu\text{L}$  Elektroporationspuffer aufgenommen. Die Suspensionen wurden in einer *Gene Pulser* Küvette vereinigt und mit 240 V und 55  $\mu\text{F}$  bei RT im *Gene Pulser* elektroporiert. Anschließend wurden die ES-Zellen für 20 min auf Eis inkubiert und nachfolgend in fünf 60 mm Kulturschalen auf embryonalen Fibroblasten ausplattiert.

Die Selektion in G418 (Positivselektion) und Gancyclovir (Negativselektion) begann nach 12 bis 16 h. Die Gancyclovir-Selektion wurde nach 5 Tagen beendet,



während die G418-Selektion bis zur Isolierung resistenter Klone an Tag 8–9 aufrecht erhalten wurde.

### 2.11.3 Isolierung und Kryokonservierung von ES-Zellklonen

Resistente ES-Zellklone wurden lichtmikroskopisch identifiziert und die Kolonien nach einer G418-Selektion über 8–9 Tage isoliert. Dazu wurden die Kulturen 1x in PBS-Puffer gewaschen und mit 10 mL PBS-Puffer überschichtet. Die Klone wurden mechanisch mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipettenspitze von den Fibroblasten getrennt und bei 37°C in 1x Trypsin-EDTA in 96-Loch-Zellkulturplatten dissoziiert. Die Restriktion wurde nach 5 min durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  ES-Zellmedium gestoppt. Die vereinzelt Klone wurden auf 24-Loch-Zellkulturplatten mit Fibroblasten und frischem ES-Zellmedium übertragen und bei 37°C kultiviert.

Nach 2–3 Tagen wuchsen die Einzelklone zur Konfluenz und wurden erneut trypsinisiert. Eine Hälfte der Zellen wurde wieder auf Fibroblasten ausgeplattiert (*master plate*), während die andere Hälfte der Zellen auf einer Gelatinebehandelten Platte (*duplicate plate*) inkubiert wurde. Die auf Fibroblasten wachsenden ES-Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit 100  $\mu\text{L}$  Trypsin/EDTA bei 37°C für 5 min dissoziiert, in 1 mL-Kryogefäße (Nunc) überführt und nach Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  2x Gefriermedium gemischt und bei –80°C eingefroren. Die für die DNA-Isolierung vorgesehenen Zellen wurden ebenfalls bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend der DNA-Extraktion unterworfen (s. 2.11.4).

### 2.11.4 DNA-Extraktion aus ES-Zellen

Die Platten mit den ES-Zellen (s. 2.11.1) wurden mit PBS gewaschen und mit 500  $\mu\text{L}$  ES-Lysispuffer pro ES-Zellklon  $\text{üN}$  bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Zelllyse wurde die DNA mit 500  $\mu\text{L}$  Isopropanol gefällt und 15 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig entfernt. Mit 500  $\mu\text{L}$  70 %igem Ethanol wurde die DNA unter Schütteln für ebenfalls 15 min gewaschen und die DNA in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem 90  $\mu\text{L}$  TE-Puffer vorgelegt waren. Die DNA wurde bei offenem Deckel bei 60°C für 30 min gelöst und dabei noch vorhandene Ethanolrückstände verdampft. Um ein vollständiges Lösen der DNA zu erreichen, wurde das Volumen auf 200–300  $\mu\text{L}$  mit TE-Puffer aufgefüllt und eine  $\text{üN}$ -Inkubation im Wasserbad bei 55°C durchgeführt.

Die genomische DNA konnte nun restriktionsenzymatisch geschnitten (s. 2.9.3.1), über ein analytisches Agarosegel aufgetrennt (s. 2.9.8.1) und einem Southern-Transfer (s. 2.9.9.1) unterworfen werden.

### 2.11.5 Herstellung von Chimären

Die Isolierung von 2,5 Tage alten Mausembryonen, die Injektion von rekombinanten ES-Zellen in die Embryonen und die Reimplantation der injizierten Blastocysten in pseudoschwangere Mäuse wurden von MitarbeiterInnen des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin, Göttingen, durchgeführt. Die ES-Zellen wurden aus Tieren des Mausstammes 129/SvJ isoliert, deren Fell eine braune Färbung aufweist (Agouti-Fellmarker). Die bei der Aggregation eingesetzten Blastocysten wurden aus dem C57BL-Stamm isoliert, dessen Mäuse eine schwarze Fellfärbung zeigen. Sind ES-Zellen an der Entwicklung der reimplantierten Embryonen involviert, können die chimären Tiere anhand einer gescheckten Fellfärbung identifiziert werden. Männliche Mäuse mit einem Chimerismus von mindestens 80 % wurden auf die Stämme C57BL und 129/SvJ zurückgekreuzt und die Tiere der F1-Generation im Alter von 5 Wochen mit Hilfe der PCR (s. [2.9.7.3](#)) genotypisiert.

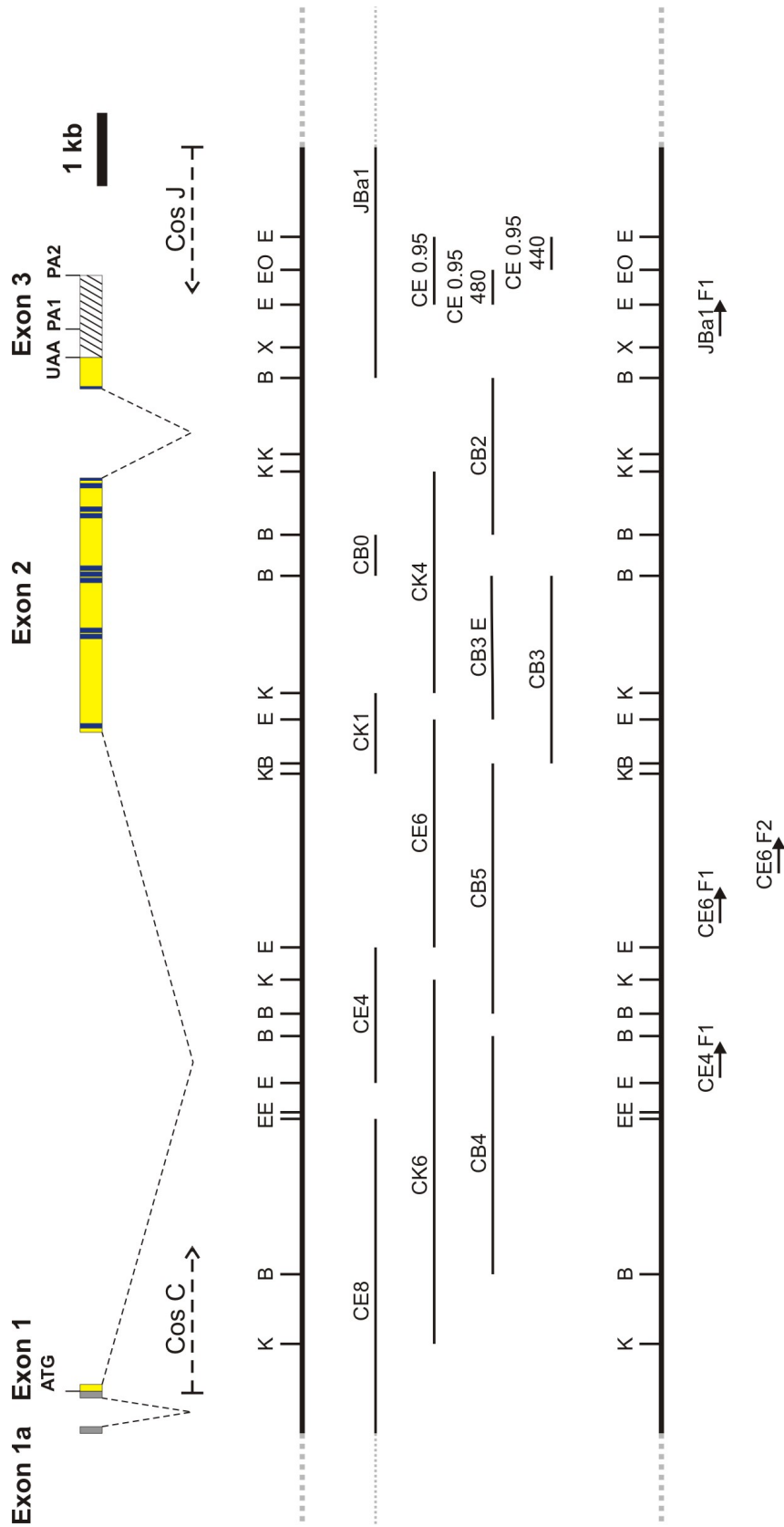
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Isolierung und Charakterisierung des *Sall1*-Gens der Maus

Bei Beginn der vorliegenden Arbeit waren zwei spalt-homologe Gene der Maus bekannt, *Sall2* (Kohlhase et al., 2000) und *Msal*, später *Sall3* genannt (Ott et al., 1996). Da das Gen *Msal* zum Xenopus-Gen *Xsal-1* eine höhere Ähnlichkeit ausweist als zu *SALL1*, wurde vermutet, dass bei der Maus ein weiteres *SALL1*-homologes *sal*-ähnliches Gen existiert. Dieses Gen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst isoliert werden.

#### 3.1.1 Isolierung und Charakterisierung zweier genomischer Cosmidklone

Eine Maus-Cosmid-Bibliothek (s. 2.7.7) wurde mit einer humanen *SALL1*-Sonde aus Exon 2 (c-son, s. 2.2) nach den von der RZPD empfohlenen Bedingungen (s. 2.9.10.2) mittelstringent hybridisiert. Das 1.5 kb große Fragment aus Exon 2 wurde mit den Primern TF1 und TR2 (Kohlhase et al., 1998) amplifiziert und enthält unter anderem die für den ersten Doppelzinkfinger kodierende Sequenz. Die Signale wurden ausgewertet und die entsprechenden Klone bestellt. Nach der Rehybridisierung mit der humanen *SALL1*-Sonde erwiesen sich zwei Klone als positiv (RZPD-ID-Nrs. MPMGc12109685Q3 = Cos C, MPMGc121J23368Q3 = Cos J), die im Folgenden kartiert und partiell sequenziert wurden. Ein Teil der klonierten Fragmente ist in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1: Restriktionskarte und genomische Organisation sowie Sequenzierung von *SalI1*.** Die kodierenden Bereiche des Gens sind durch gelbe Rechtecke gekennzeichnet, die 5'-UTR durch das graue Rechteck und die 3'-UTR durch das schraffierte Rechteck. Die gestrichelten Linien stellen die Introns dar. Die blauen Striche repräsentieren die Zinkfinger-kodierenden Regionen. Die klonierten Fragmente, die nur partiell angegeben sind, sind als schwarze Linien dargestellt, die Pfeile zeigen die ungefähre Position der Sequenzierprimer. Die gestrichelten Pfeile stellen die Cosmide mit den bekannten Enden dar. Die Positionen der Restriktionsschnittstellen sind teilweise angegeben. B: Bam HI; E: Eco RI; K: Kpn I.

### 3.1.2 Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *Sall1*

Aus Cos C konnte das Kpn I-Fragment CK4 (s. Abb. 3.1) isoliert werden, das mit der humanen *SALL1*-Sonde c-son hybridisierte. Mit dem 5´- bzw. 3´-Bereich dieses Fragments wurden weitere Hybridisierungen der mit verschiedenen Enzymen restringierten DNA von Cos C durchgeführt und so zunächst eine durchgehende Sequenz von ca. 5 000 bp erstellt. Der größte offene Leserahmen dieser Sequenz kodiert im 5´-Bereich für ein vermutliches C<sub>2</sub>HC-Einzelzinkfinger (EZF)-Motiv gefolgt von Sequenzen, die für vier C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Doppelzinkfinger (DZF)-Domänen kodieren (s. Abb. 3.1.3). Die Sequenz, die für die letzte DZF-Domäne kodiert, ist durch eine Insertion von 1129 bp unterbrochen. Der Vergleich mit der humanen Sequenz zeigte eine Konservierung der Spleißstellen am Anfang und Ende der eingefügten Sequenz, was zu der Annahme führte, dass es sich hierbei um Intron 2 handelt. Auch die Spleißstelle 105 bp in 5´-Richtung des C<sub>2</sub>HC-Zinkfingers ist konserviert, was vermuten ließ, dass die Position des Intron 1 ebenfalls konserviert ist und somit noch ein weiteres Exon vorliegt. Damit wurde das Exon mit dem Hauptteil an Zinkfinger-kodierenden Regionen Exon 2 genannt und eine Länge von 3464 bp festgestellt, das kleine Exon mit 435 bp wurde Exon 3 genannt.

Um das vermutlich einige kb in 5´-Richtung lokalisierte Exon 1 zu isolieren, wurde der Cos C-Blot mittelstringent mit einem Exon 1 enthaltenden PCR-Fragment aus *SALL1* hybridisiert und das resultierende CE8-Fragment mit humanen Primern sequenziert. Das so identifizierte Exon 1 des *Sall1*-Gens der Maus weist 76 bp codierender Sequenz und 17 AS 5´-UTR auf (s. Abb. 3.2). Die Länge des Introns wurde mit 9 079 bp bestimmt. Im Rahmen einer anderen Arbeit in dieser Arbeitsgruppe wurde mittels 5´RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) ein weiteres, nicht translatiertes Exon in 5´-Richtung des ATG ermittelt (Exon 1a), das ebenfalls in der humanen Sequenz konserviert ist (Archangelo, 1999). Es ist 151 bp lang und wird von Exon 1 durch ein Intron von 1587 bp (Intron 1a) getrennt.

Neben den EZF- und DZF-Motiven sind in der Aminosäuresequenz eine Prolin-reiche (AS 78–94), eine Glutamin-reiche (AS 232–249), eine Alanin-reiche (AS 295–309) und eine Serin-reiche (AS 353–383) Domäne vorhanden (s. Abb. 3.2).

Die gesamte in der vorliegenden Arbeit aus den Cosmidklonen ermittelte genomische Sequenz beträgt 16 410 bp und ist im Anhang (s. Abb. A.1) dargestellt.

### 3.1.3 Identifizierung des Transkriptionsendpunktes

Zur Bestimmung des 3'-Endes der *Sall1*-Transkriptionseinheit wurden elektronische Datenbanken nach *Sall1*-EST-Sequenzen durchsucht. Dabei konnte ein muriner EST-Klon (Zugangsnr. AI426947, IMAGE-Klon-Nr. 537158) gefunden werden, der mit dem das Stopp-Kodon enthaltenden Bam HI / Xba I-Fragment CBX überlappt und ein Polyadenylierungssignal (Poly-AS) 383 bp in 3'-Richtung des Stopp-Kodons, gefolgt von einem poly-(A)-Schwanz, aufweist. Des Weiteren wurde ein EST-Klon (Zugangsnummer AU067623) identifiziert, der mit dem EST-Klon 537158 überlappt, im weiteren 3'-Bereich ist jedoch keine weitere Poly-AS-Konsensus-Sequenz vorhanden. In [Burfeind und Hoyer-Fender \(1991\)](#) wurde ein Poly-AS mit der Sequenz AATACA beschrieben, und dieses Motiv konnte 728 bp nach dem ersten Poly-AS gefunden werden. Eine 3'RACE sollte klären, ob es möglicherweise noch weitere Transkripte gibt bzw. die Nutzung beider Poly-AS bestätigt werden, die Methode konnte jedoch nicht etabliert werden. Daher wurde mittels Northern-Blot-Analyse mit den Fragmenten CE 0.95 480 bzw. CE 0.95 440 (s. [2.2](#)), die vor und hinter dem zweiten identifizierten Poly-AS lokalisiert sind, das Vorhandensein der entsprechenden Transkripte überprüft. Dabei ergab sich in dem Hybridisierungsexperiment mit dem Fragment nach dem Poly-AS 1 ein im Vergleich zur Kontrollhybridisierung mit der CB0-Sonde schwächeres Signal, in dem Experiment mit der Sonde nach dem Poly-AS 2 gar kein Signal (Daten nicht gezeigt). Somit ist anzunehmen, dass beide Poly-AS genutzt werden, weiter 3'-wärts jedoch kein weiteres funktionelles Signal vorliegt.

1		<b>M</b>	S R R K Q A K	8
1	gtaattttttattctgcccc	gctgatgtttgagcCAGC <b>ATG</b>	TCGCGGAGGAAGCAAGCGAAG	63
9	P Q F F Q S D	P E V A S L P	R R D G	26
64	CCTCAACATTTCCAATCCGAC	CCCGAAGTGGCCTCGCTCCCC	CGGCGAGATG <b>gt</b> gagtgctcc	126
127	Ggcccgcgcccggacacacag	acacgcactcacacgcacact	cggaccacgcacacgcggy	189
190	gggcccgcgcccaccgcccgt	ttcgc...tactgacagtctg	tcctcgcttcacttttaacc	9090
27		D T E K G Q	P S R P T K S	39
9091	ctgcaccttttgatgtttgta	gGGGACACAGAGAAGGGTCAA	CCAAGTCGCCCCACTAAGAGC	9153
40	K D A H V C G	R C C A E F F	E L S D L L L	60
9154	AAGGATGCCATGTCTGTGGC	CGGTGCTGCGCTGAATCTTTT	GAATTATCAGACCTCTGCTC	9216
61	H K K S C T K	N Q L V L I V	N E S P A S P	81
9217	CATAAAAAGAGCTGCACTAAA	AATCAATTAGTTTTGATTGTC	AATGAAAGTCCAGCCTCCCCA	9274
82	A K T F P P G	P S L N D P D	D Q M K D A A	102
9275	GCAAAAACCTTCCCTCCTGGC	CCGTCTCTCAATGATCCCGAT	GACCAAAATGAAAGACGCGGG	9342
103	N K A D Q E D	C S D L S E P	K G L D R E E	123
9343	AATAAAGCAGACCAAGAAGAC	TGCAGCGACCTTTCAGAACCC	AAGGGGCTTGACAGGGAAGAG	9405
124	S M E V E V P	V A T T T T T	T T G G S G G	144
9406	TCATGGAGGTGGAGGTCCCA	GTTGCCACCACCACCACC	ACCACTGGCGGCAGCGGGGG	9468
145	S G G S T L S	G V T N I T T	P S C H S G C	165
9469	AGTGGTGGCAGCACTCTGAGC	GGTGTACCAACATCACACC	CCGAGCTGCCACAGCGCTGT	9531
166	S S G T S A I	T T S L P Q L	G D L T T L G	186
9532	TCCTCGGGTACCTCAGCGATC	ACAACCTCTCTACCTCAACTG	GGGGACCTGACGACACTGGGC	9594
187	N F S V I N S	N V I I E N L	Q S T K V A V	207
9595	AACTTCTCGGTGATCAACAGC	AACGTCATCATTGAGAATCTC	CAGAGCACCAGGTAGCGGTG	9657
208	A Q F S Q E A	R C G G A S G	G K L L I S T	228
9658	GCCCAGTTCTCCAGGAGGGC	AGGTGTGGGGGGCCTCCGGA	GGCAAGCTGCTCATCTCAACC	9720
229	L M E Q L L A	L Q Q Q Q I H	Q L Q L I E Q	249
9721	CTCATGGAACAACTCCTGGCT	CTGCAGCAGCAGCAGATTCAC	CAGCTGCAGCTCATAGAGCAA	9783
249	I R H Q I L L	L A S Q S A D	L P A A P S I	270
9784	ATACGTACCAAATACTGCTG	CTGGCCTCTCAGAGCGCAGAC	CTGCCGGCAGACCCCTCTATC	9846
271	P S Q G T L R	T S A N P L T	T L S S H L S	291
9847	CCTCTCAAGTACTCTGCGA	ACATCTGCCAACCCTTGACC	ACACTGAGCTCCCATCTGTCT	9909
292	Q Q L A V A A	G L A Q S L A	S Q S A N I S	312
9910	CAACAGCTGGCQGGTGGCAGCT	GGATTAGCAGAGCCTTGCT	AGCCAATCTGCCAACATCAGC	9972
313	G V K Q L P H	V Q L P Q S S	S G T S I V P	333
9973	GGTGTGAAGCAGCTTCCCCAC	GTCAGCTACCTCAGAGCAGC	TCCGGCACCTCCATCGTCCCG	10035
334	P S G G T S P	N M S I V T A	A V P T P S S	354
10036	CCAGTGGTGGCACTTCTCCC	AACATGAGCATAGTGACGGCT	GCAGTGGCCACCCCGTCTCTCA	10098
355	E K V A S N A	G A S H V S S	P A V S A S S	375
10099	GAAAAAGTGGCTTCCAATGCT	GGTGCCTCCCATGTGAGCTCC	CCGGCCGTCTCAGCATCGTCC	10161
376	S P A F A I S	S L L S P E S	N P L L P Q P	396
10162	TCACCAGCATTCGCAATAAGC	AGTCTGTTGAGTCCGAATCT	AACCCACTTCTACCTCAGCCG	10224
397	T P A N A V F	P T P L P N I	A T T A E D L	417
10225	ACCCAGCTAACGCTGTTTTC	CCTACCCCTTGCCTAACATT	GCAACAACCGCAGAAGATTTG	10287
418	N S L S A L A	Q Q R K S K P	P N V T A F E	438
10288	AACTCCCTGTCTGCCTTGCC	CAGCAAAGAAAAGCAAGCCACCA	AAATGTACTGCCTTTGAA	10350
439	A K S T S D E	A F F K H K C	<u>R F C A K V F</u>	459
10351	GCGAAAAGTACTTCAGACGAG	GCGTTCTTTAAACACAAGTGC	AGGTTCTGTGCGAAGGTCTTC	10413
460	G S D S A L Q	I H L R S H T	G E R P F K C	480
10414	GGGAGCGACAGTGCCTTGCG	ATCCACTTGCCTCCATACT	GGAGAGAGGCGGTTCAAGTGC	10476
481	N I C G N R F	S T K G N L K	V H F Q R H K	501
10477	AACATCTGTGGGAACAGGTT	TCTACTAAGGGCAATCTGAAA	GTCCACTTTTCAGCGCCACAAA	10539
502	E K Y P H I Q	M N P Y P V P	E H L D N V P	522
10540	GAGAAGTACCCCCACATCCAG	ATGAACCCTACCCTGTACCG	GAGCACTTGGACAATGTC	10602
523	T S T G I P Y	G M S I P S E	K P V T S W L	543
10603	ACGAGCACCAGGATTCCTTAC	GGCATGTCCATCCCTTCAGAG	AAGCCAGTTACCAGCTGTCTA	10665
544	D T K P V L P	T L T T S V G	L P L P P T L	564
10666	GACACCAAGCCAGTCTGCCC	ACTCTGACCACTTCCGTCGGC	CTACCATTGCCTCCAACCTCTC	10728
565	P S L T P F I	K T E E P A P	I P I S H S A	585
10729	CCAAGCCTCACGCCCTTCATC	AAGACGGAAGAGCCAGCCCC	ATCCCTATTAGCCATTCTGCT	10791

586	A S P Q G S V	K S D S G A P	D L A T R N P	606
10792	GCCAGTCCCCAAGGCTCAGTC	AAAAGTGACTCTGGGGCCCCT	GATTTGGCCACAAGAAACCCA	10854
607	S G V P E E V	E G S A V P P	F G G K G E E	627
10855	AGCGGCGTCCCCGAGGAAGTG	GAAGGGTCTGCTGTGCCACCC	TTTGGTGGCAAGGGTGAAGAG	10917
628	S N M A S S A	V P T A G N S	T L N S P V A	648
10918	AGTAACATGGCAAGCTCCGCC	GTCCCCGACAGCGGGCAACAGT	ACTCTGAACTCCCCAGTGGCT	10980
649	D G G P G G T	T F T N P L L	P L M S E Q F	669
10981	GACGGTGGTCCAGGAGGGACC	ACCTTCACCAACCCCTCTGTTG	CCCCTCATGTCTGAGCAGTTC	11043
670	K A K F P F G	G L L D S A Q	A S E T S K L	690
11044	AAGGCCAAGTTTCTTTTGGG	GGACTCTTAGATTCTGCCCAG	GCCTCAGAGACATCCAAGCTG	11106
691	Q Q L V E N I	D K K A T D P	N E C I I C H	711
11107	CAGCAACTGGTAGAAAACATT	GACAAGAAGGCCACGGATCCC	AATGAGTGTATCATCTGCCAC	11169
712	<u>R V L S C Q S</u>	<u>A L K M H Y R</u>	<u>T H T G E R P</u>	732
11170	CGGGTTCTCAGCTGCCAGAGC	GCCTTGAAAATGCACTACCGG	ACACACACTGGGGAGAGGCC	11232
733	F K C K I C G	R A F T T K G	N L K T H Y S	753
11232	TTCAAGTGTAAAGATCTGCGGC	CGGGCTTTCACCACGAAAGGG	AACCTCAAGACCCATTACAGC	11295
754	<u>V H R A M P P</u>	<u>L R V Q H S C</u>	<u>P I C Q K K F</u>	774
11296	GTCCATCGGGCTATGCCTCCA	CTCAGAGTCCAGCATTCCTGC	CCCATCTGTCTCAGAAAGTTC	11358
775	<u>Q N A V V L Q</u>	<u>Q H I R M H M</u>	<u>G G Q I P N T</u>	795
11359	ACAAACGCAGTGGTCCCTCCAG	CAGCATATTCGTATGCACATG	GGAGGCCAGATCCCCAACACC	11421
796	P V P D N Y P	E S M E S D T	G S F D E K N	816
11422	CCAGTCCCTGACAACCTACCTT	GAGTCCATGGAGTCTGACACA	GGCTCCTTTGATGAGAAAAAT	11484
817	F D D L D N F	S D E N M E E	C P E G S I P	837
11485	TTGACACTTAGACAACCTTC	TCAGATGAGAATATGGAAGAG	TGTCCTGAGGGCAGCATCCCA	11547
838	D T P K S A D	A S Q D S L S	S S P L P L E	858
11546	GACACACCCAAAGTCAGCGGAC	GCTTCCCAAGATAGCCTGTCA	TCTTCGCCTCTGCCCTCGAG	11610
859	M S S I A A L	E N Q M K M I	N A G L A E Q	879
11611	ATGTCGAGCATCGCTGCTCTG	GAAAATCAGATGAAGATGATC	AATGCTGGCCTGGCGGAGCAG	11673
880	L Q A S L K S	V E N G S M E	G D V L T N D	900
11674	CTGCAGGCCAGCCTGAAGTCT	GTGGGAACGGATCCATGGAA	GGGGATGTGCTGACCAACGAC	11736
901	S S S V G G D	M E S Q S A G	S P A I S E S	921
11737	TCCTCCTCAGTGGGTGGCGAC	ATGGAGAGCCAGAGTGCAGGC	AGCCCAGCCATCTCAGAGTCT	11799
922	T S S M Q A L	S P S N S T Q	E F H K S P G	942
11800	ACCTCTTCCACTCAGGCTCTG	TCCCCGTCNCAACAGCACCCAA	GAATTTCAACAAGTCCACCCGGC	11862
943	M E E K P Q R	V G P G E F A	N G L S P T P	963
11863	ATGGAGGAAAAGCCACAGCGA	GTGGGGCCAGGCGAGTTCGCC	AATGGTCTATCTCCACCCCA	11925
964	V N G G A L D	L T S S H A E	K I I K E D S	984
11926	GTGAACGGAGGTGCTTTGGAC	TTGACTTCTAGTGCAGAG	AAAATCATCAAAGAAGATTCT	11988
985	L G I L F P F	R D R G K F K	N T A C D I C	1005
11989	CTGGGAATCCTCTTTCTCTTC	AGAGACCAGGGGTAATTTAAA	AACACTGCTTGCGACATTTGT	12051
1006	<u>G K T F A C Q</u>	<u>S A L D I H Y</u>	<u>R S H T K E R</u>	1026
12052	GGCAAGACCTTTGCTTGTGTCAG	AGTGCCTTGGACATTCACACTAC	AGAAGTCATACCAAGAGAGA	12114
1027	<u>P F I C T V C</u>	<u>N R G F S T K</u>	<u>G N L K Q H M</u>	1047
12115	CCGTTTCATTTGCACAGTTTGC	AATCGTGGCTTTTCCACAAAAG	GGTAATTTGAAGCAGCACATG	12177
1048	<u>L T H Q M R D</u>	<u>L P S Q L F E</u>	<u>P S S N L G P</u>	1068
12178	TTGACACATCAGATGCGAGAT	CTGCCATCGAGCTCTTTGAG	CCCAGTTCCAACCTCGGCCCC	12240
1069	N Q N S A V I	P A N S L S S	L I K T E V N	1089
12240	AATCAGAACTCTGCAGTGATT	CCCGCCAACTCGCTGTCATCT	CTCATCAAACAGAGGTCAAC	12303
1090	G F V H V S P	Q D S K D A P	T S H V P Q G	1110
12304	GGCTTTGTACACGTTTCTCCT	CAGGACAGTAAGGACGCCCC	ACTAGTCATGTCCCTCAGGGG	12366
1111	P L S S S A T	S P V L L P A	L P R R T P K	1131
12367	CCTCTGTGCTCCTCTGCGACA	TCCCCAGTTCTGCTCCAGCT	CTGCCCCGGAGAACTCCCAAA	12429
1132	<u>Q H Y C N T C</u>	<u>G K T F S S S</u>	<u>S A L Q I H E</u>	1152
12430	CAGCACTATTGTAACACGTGT	GGTAAAACCTTCTCTTCTCG	AGTGCCTGCAGATCCACGAG	12492
1153	<u>R T H T G E K</u>	<u>P F A C T I C</u>	<u>G R A F T T K</u>	1173
12493	AGAACTCACACTGGAGAGAAG	CCCTTTGCTTGCATATCTGT	GGAAGAGCATTCACAACAAAA	12555
1174	<u>G N L K</u>			1177
12556	GGCAATCTGAAGgtaccaaat	ttattcaaggcgttgggacag	...ttctctctcttcccccaa	13684
1178	<u>V H M</u>	<u>G T H M W N S</u>	<u>T P A R R G R</u>	1194
13685	cccacattacaggtCCACATG	GGCACCCATATGTGGAACAGC	ACCCCTGCACGCCGGGGCCGG	13747

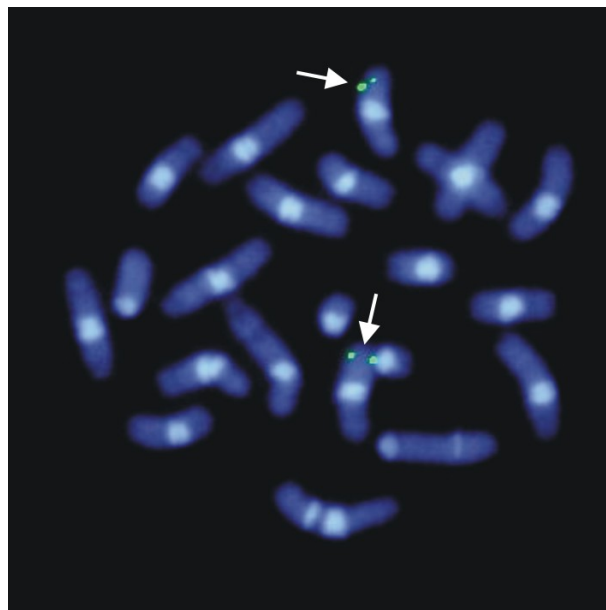


1195	R L S V D G P	M T F L G G N	P V K F P E M	1215
13748	CGGCTCTCAGTGGATGGCCCC	ATGACATTTCTAGGAGGCAAT	CCTGTCAAGTCCCAGAAATG	13810
1216	F Q K D L A A	R S G S G D P	S S F W N Q Y	1236
13811	TTCCAGAAGGATCTAGCGGCG	AGGTCAGGAAGCGGGATCCG	TCCAGCTTTTGAACCAGTAT	13873
1237	T A A L S N G	L A M K A N E	I S V I Q N G	1257
13874	ACAGCAGCACTGTCCAACGGG	CTGGCCATGAAGGCCAACGAG	ATCTCTGTCAATTCAGAACGGC	13936
1258	G I P P I P G	S L G S G S S	P I S G L T G	1278
13937	GGCATCCCTCCAATTCCTGGA	AGCCTGGGCAGTGGGAGCTCA	CCTATCAGTGGGCTGACTGGG	13999
1279	N V E K L G N	S E P S A P L	A G L E K M A	1299
14000	AACGTGAAAAACTGGGCAAT	TCGGAACCCAGTGCTCCTCTG	GCTGGCCTGGAGAAAATGGCG	14062
1300	S S E N G T N	F R F T R F V	E D S K E I V	1320
14063	AGCAGCGAGAACGGAACCAAC	TTCCGTTTCACCCGCTTCGTG	GAGGACAGCAAAGAGATCGTC	14125
1321	T S •			1322
14126	ACAAGC <b>TAA</b> AGCTGCCAGAGT	GCTTCCTCTCAGAATGTCGCC	CCGAGGTTGGCCTCCTGCCCC	14188
		EST-Klon AI426947		
		→		
14189	TCCCCCGCCCTTTACCTTCT	GGCCCTGGGACTATGAACTA	CACTATGAAGACATTCTTTTG	14251
14252	TATGTTGTTCAACCTCTAGAG	TTCTAAGAAAGCTTATTTATT	AGTGCTATAACCTTGCTTTGC	14314
14315	AAACAGAGTGCAGGCATTAAC	TTTGGTCTTCTGTATTTTGA	CTAAATACTAATGGACTAGAG	14377
14378	TGCTCCTAGCTTGCTGTAACA	TTTATGGCAATCGCAAGTTGC	CCTGCTAGGCGGTCTTAATCC	14440
			EST-Klon AU067623	
			→	
14441	GGCATTAACTTATTTTCTATA	TCCAGTTTAAATATGAATCTGG	TGTTTGATGCAATGCCTCCCG	14503
		EST-Klon AI426947		
		←		
14504	TGATACGTTAGATCTCT <b>AATA</b>	<b>AA</b> GTGTATATAAATGTACAC	TTTGATCCTGCTGGAAAATTT	14566
14567	TATCAGCGAACACATTTGTCTA	ATCTTTCCAACAGATTTAAG	GGAAGGACTTTAAGTACAGGC	14629
14630	TGAACATTTGGAAGGCTTAGG	GTTTGTGTGTTGTTGTTTGG	TTTGTGTTGTTGTTGTTTGG	14692
14693	GTTTTGGTTTCATTTTGATTC	TAAACTTCAACCTGCTTTTTT	TTTTTTGGTTTTGTTTTAGAG	14755
14756	AGTTAACCATTTCCGTTTTGA	ACTATTTGTATTGTGCTTTTT	ACTTGAGTCGCTTCAATGTT	14818
14819	AATACGTTTTCTGTACAGTAA	TAAGCACGCAGAATTCCTTAG	CAGGAAAAAAAAAACACAAG	14881
14882	TGTTGTTTTGGTAGTTGAAAC	TGAGACGTAGCATTTTGGCCT	TGTAGGGTATATTCACAGTAG	14944
14945	AAAACGTGTGCTGGAATTTCA	CAATGCTGCTAACGATAGCAT	CTTGAACGACCTTCAGTGGAG	15007
15008	AAATGZAGATGCTCTTCTATA	TACAATAAGAAATATCACTTT	CATTAAAATGTACATATGTTT	15070
		EST-Klon AU067623		
		←		
15071	CTTACAAGAGCAAATGCCTCT	TGATCAAGAGCAGGTATAGTG	TTGGTTTATTTTGTATTAGGT	15133
15134	ATGGAAGGAAAAAATGGACT	GTTACATGCACTTTCTTGGAA	AGTTGAAGGGGGGTTCCAAT	15196
15197	TTCTTTAACATTTAATACTTA	CTAACACAGAGATACTGTAA	TTTACTCAAGTAATCA <b>AATA</b>	15259
15260	<b>CA</b> ttttttttgcccacagataa ...			15280

**Abbildung 3.2: Genomische Nukleotidsequenz des *Sall1*-Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens.** Die Sequenz des kodierenden Stranges der cDNA ist in Großbuchstaben angeführt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der Nukleotidsequenz angeordnet und das Startkodon sowie die Exon/Intron-Übergänge durch Fettdruck hervorgehoben. Intronische Bereiche sind nur partiell angegeben. Die Zinkfinger motive sind unterstrichen, die Poly-AS sind unterstrichen und bezeichnet. Das Stoppkodon nach dem offenen Leserahmen wurde mit • gekennzeichnet. Die Start- und Endpunkte der überlappenden Bereiche zwischen den EST-Klonen und der 3'-UTR sind durch Pfeile gekennzeichnet und die Klon-Nummern angegeben. Die Nummerierungen für die Nukleotid- und Aminosäuresequenz sind auf beiden Seiten angegeben.

### 3.1.4 Chromosomale Lokalisation von *Sall1*

Mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (s. 2.9.11.8) wurde die chromosomale Lokalisation des *Sall1*-Gens durchgeführt. Dazu wurden Metaphasenpräparate der Maus-Zelllinie WMP-1 (Zörnig et al., 1995) mit einer biotinmarkierten Sonde des Cosmid-Klons CosJ hybridisiert. Die Abbildung 3.3 zeigt die Lokalisierung von *Sall1* auf Chromosom 8D der Maus.



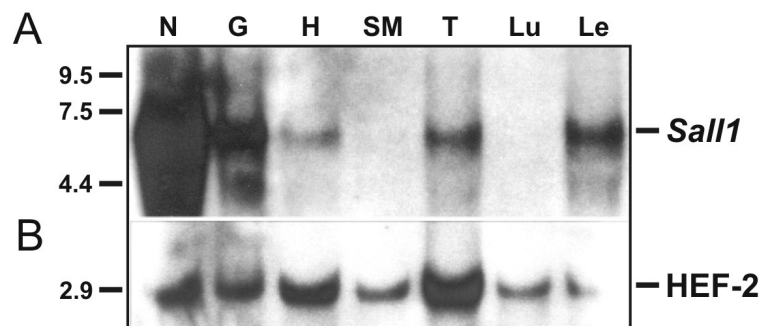
**Abbildung 3.3: Chromosomale Lokalisation des *Sall1*-Gens.** Der Cosmidklon Cos J (RZPD-Klon-Nr. MPMGc121J23368Q3) wurde als Sonde an murinen Metaphasechromosomen der Maus-WMP-1-Zelllinie eingesetzt. Die Pfeile deuten auf die spezifischen Hybridisierungssignale auf den Chromosomen Rb(8.9) an der Position 8D.

## 3.2 Untersuchungen zur Expression des *Sall1*-Gens der Maus

### 3.2.1 Expression in adulten Geweben

Für die Expressionsanalyse in adulten Geweben wurde von jedem untersuchten Gewebe 20  $\mu$ g Gesamt-RNA für einen Northern-Blot (s. 2.9.9.2) eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C mit der Sonde CB0 (s. Abb. 3.1). Die stärkste

Expression war in Niere und Gehirn festzustellen (s. Abb. 3.4), zusätzlich wurden *Sall1*-Transkripte auch in Leber, Testis und Herz gefunden. In Skelettmuskel und Lunge konnten keine *Sall1*-Transkripte festgestellt werden. Das Transkript zeigte eine Größe von ca. 5.5 kb. Die Integritätskontrolle und Quantifizierung erfolgte durch eine zweite Hybridisierung mit dem humanen Elongationsfaktor 2 (HEF-2, s. 2.2).



**Abbildung 3.4: Northern-Blot-Analyse des *Sall1*-Gens in adulten Geweben.** Je 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden für die Northern-Blot-Analyse eingesetzt und mit der Sonde CB0 bei 65°C hybridisiert. Die Abb. A zeigt die Detektion des *Sall1*-Transkripts in RNA aus Niere, Gehirn, Herz, Testis und Leber, in RNA aus Skelettmuskel und Lunge konnten dagegen keine Transkripte festgestellt werden. Die Transkriptlänge liegt bei ca. 5.5 kb. Die Abb. B zeigt die Nachhybridisierung mit der HEF-2-Sonde. N: Niere; G: Gehirn; H: Herz; SM: Skelettmuskel; T: Testis; Lu: Lunge; Le: Leber.

### 3.2.2 Expression in neuralen Embryonalgeweben

Die Expression des *Sall1*-Gens in Embryonen wurde mit Hilfe der whole mount-*in situ*-Hybridisierung untersucht. Dazu wurden Embryonen von 7.0–12.5 dpc präpariert sowie Metanephren aus 14.5 bzw. 18.5 dpc Embryonen isoliert. Zur genaueren Analyse wurden einige gefärbte Embryonen in Gelatine eingebettet und mit einem Vibratom auf 20–80  $\mu\text{m}$  geschnitten. Von 12.5 dpc Embryonen und den Metanephren wurden 7  $\mu\text{m}$  dicke Paraffin-Schnitte angefertigt und für die *in situ*-Hybridisierung an Schnitten verwendet. Zur Hybridisierung wurde der DIG-markierte antisense-Strang des Fragments CB3 E (s. Abb. 3.1) eingesetzt.

Ab 7.5 dpc wird eine *Sall1*-Expression im neuralen Ektoderm in einer breiten anterioren Region im zukünftigen Kopf detektiert (s. Abb. 3.5.A). Diese Expression bleibt bis 8.5 dpc bestehen, wobei eine zusätzliche Expressionsdomäne in der Neuralgrube zu sehen ist (s. Abb. 3.5.B). An 9.5 dpc sind Transkripte in der

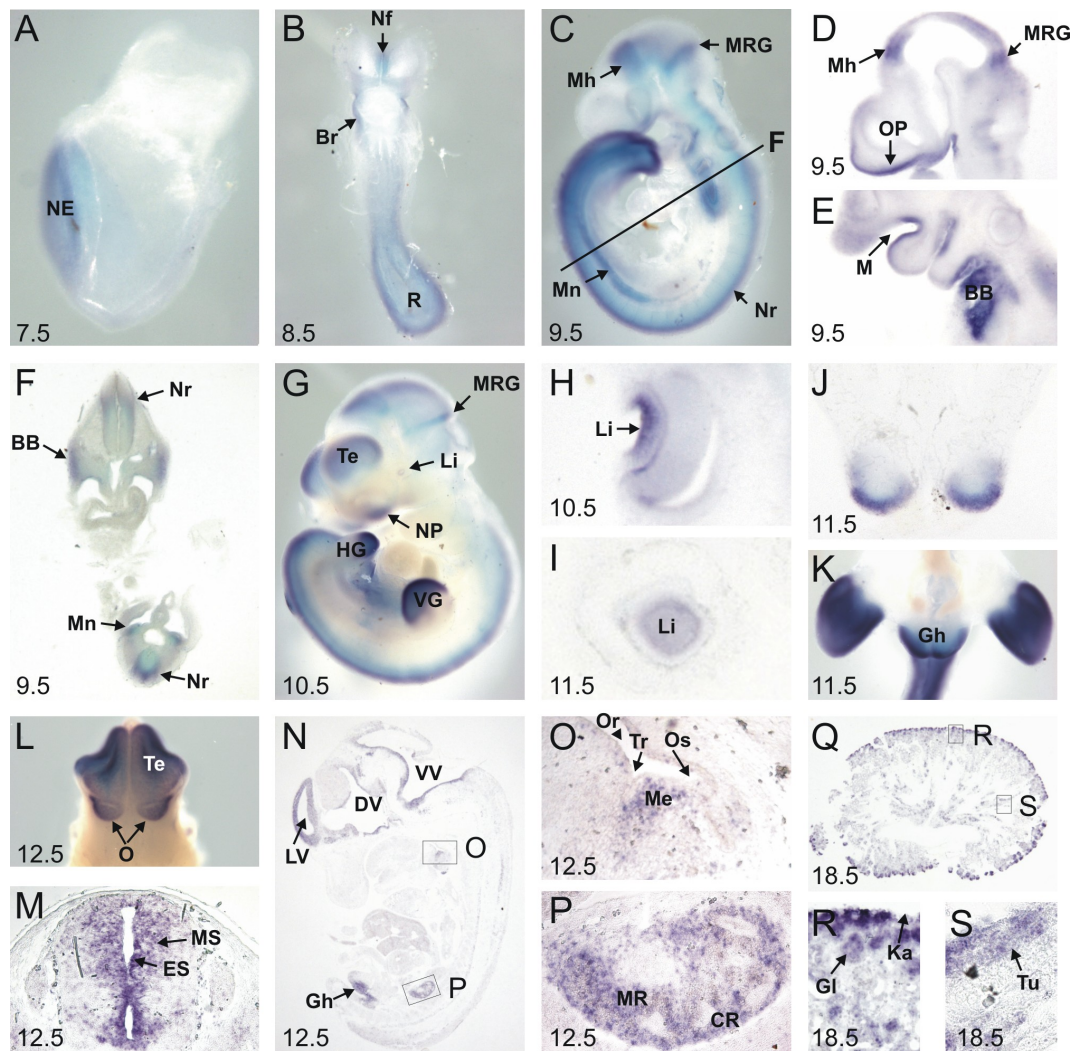
Mittelhirn-Rautenhirngrenze, der anterioren Region des Mittelhirns und der olfaktorische Plakode zu finden (s. Abb. 3.5.C,D). In späteren Stadien kann ein Signal ebenfalls im Telencephalon und im medialen Nasalprozess sowie den Olfaktorischen Bulbi detektiert werden (s. Abb. 3.5.G,J,L). *Sall1*-Expression ist auch in dem Gewebe, das die lateralen Ventrikel sowie den dritten und vierten Ventrikel umgibt, festzustellen (s. Abb. 3.5.N). Im Neuralrohr können Signale ab 9.5 dpc bis mindestens 12.5 dpc im Bereich der ependymalen Schicht und der Mantelschicht gefunden werden (s. Abb. 3.5.C,F,G,M).

### 3.2.3 Expression in anderen Embryonalgeweben

Von 8.5 bis mindestens 10.5 dpc wird *Sall1*-Expression im posterioren Bereich und neuformierten Mesoderm der Embryonen detektiert (s. Abb. 3.5.B,C,G). An 8.5 und 9.5 dpc sind Transkripte im Bereich der Branchialbögen zu finden (s. Abb. 3.5.B,C,E), und an 9.5 dpc in dem Mesenchym, das die Mundhöhle auskleidet (s. Abb. 3.5.E). Des Weiteren sind Signale im Meso- und Metanephros (s. Abb. 3.5.C,F,P,Q) und im Epithel des Genitalhöckers (s. Abb. 3.5.K,N) festzustellen. An 12.5 dpc sind Transkripte im Mesenchym des Oropharynx, genauer in dem Bereich der Gabelung des Oropharynx in Trachea und Oesophagus, vorhanden (s. Abb. 3.5.O). Von 10.5 bis mindestens 12.5 dpc kann *Sall1*-Expression in der Augenlinse detektiert werden (s. Abb. 3.5.G,H,I,L).

### 3.2.4 Expression in den Gliedmaßenknospen

*Sall1*-Expression kann in allen untersuchten Embryonalstadien in den Gliedmaßenknospen detektiert werden (s. Abb. 3.6). Zu Beginn der Gliedmaßenentwicklung (10.5 dpc) ist eine verstärkte Expression im posterioren Bereich der Handknospe zu beobachten, ab 11.5 dpc werden die Transkripte zusätzlich anterior detektiert (s. Abb. 3.6.A,B,D). Ab 11.5 dpc teilt sich die Expression in eine proximale Domäne im Bereich der Handplatte und eine distale Domäne in der epithelialen Randleiste (ERL) sowie dem darunter befindlichen Mesenchym (s. Abb. 3.6.B,E). Bei der ERL handelt es sich um eine Schicht von Zellen, die im distalen Gliedmaßenbereich angesiedelt sind und eine wichtige Rolle bei der Produktion und Steuerung von Signalen zur proximodistalen Entwicklung der Gliedmaßen einnehmen. In der proximalen Region werden *Sall1*-Signale sowohl in dorsalen und ventralen Geweben als auch einer breiteren posterioren und schmalen anterioren Region der Handplatte detektiert (s. Abb. 3.6.C,D,G). Ab 13.5 dpc ist eine Abnahme der

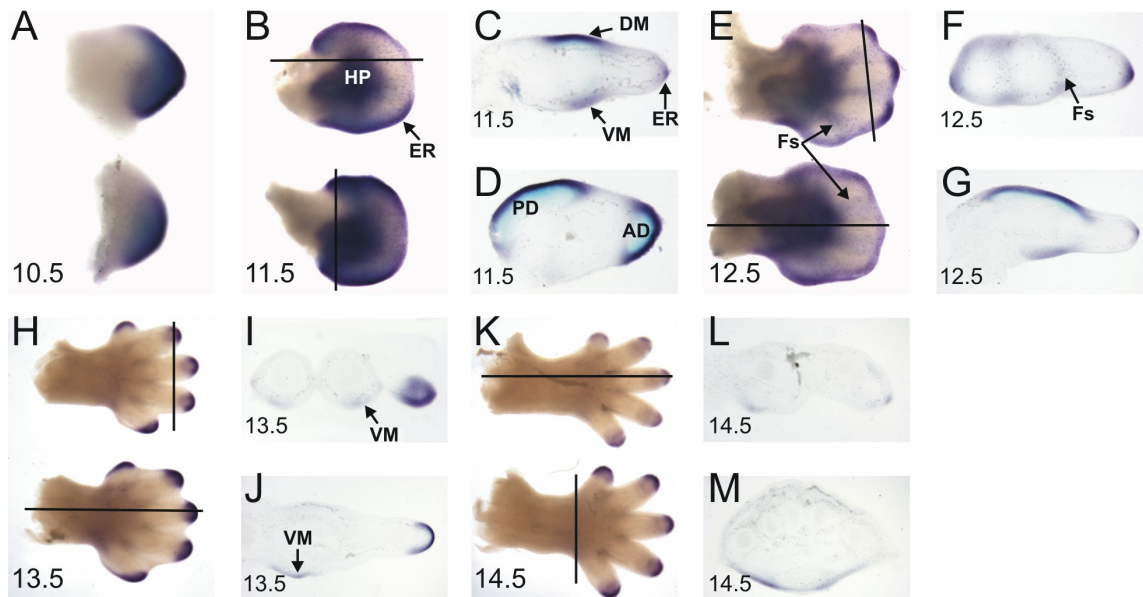


**Abbildung 3.5: Expression des *Sall1*-Gens während der Embryonalentwicklung der Maus.**

A, B, C und G zeigen whole mount-*in situ*-Hybridisierungen, K und L Ausschnitte von whole mount-gefärbten Embryonen. In D, E, F, H, I und J sind Vibratom-Schnitte von whole mount-*in situ*-gefärbten Embryonen gezeigt, in M, N und Q *in situ*-Hybridisierungen an Mikrotom-Schnitten von in Paraffin eingebetteten Embryonen. Die jeweiligen Altersstadien sind angegeben. BB: Dritter und vierter Branchialbogen; Br: Branchialbögen; CR: cortikale Region; DV: Dritter Ventrikel; ES: ependymale Schicht; Gh: Genitalhöcker; GI: Glomerulus; HG: Hintere Gliedmaßenknospe; Ka: Kapsel; Li: Linsenvesikel; LV: Lateraler Ventrikel; M: Mundhöhle; Me: Mesenchym; Mh: Mittelhirn; Mn: Mesonephros; MR: medulläre Region; MRG: Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze; Ms: Mantelschicht; NE: neurales Ektoderm; Nf: Neuralfurche; NP: Medialer Nasalprozess; Nr: Neuralrohr; O: Bulbus olfaktorius; OP: Olfaktorische Plakode; Or: Oropharynx; Os: Oesophagus; R: Rumpfregion; Te: Telencephalon; Tr: Trachea; Tu: Tubulus; VG: Vordere Gliedmaßenknospe; VV: Vierter Ventrikel.



Expression in den dorsalen Geweben zu beobachten, jedoch nicht auf der ventralen Seite der Gliedmaßenknospen (s. Abb. 3.6.I,J,L,M). Das Gewebe zwischen den Fingerstrahlen zeigt eine schwache Färbung an 12.5 dpc (s. Abb. 3.6.F). Im distalen Bereich beschränkt sich die *Sal1*-Transkription zunehmend auf das Mesenchym unter den phalangealen Spitzen, in dem eine Abnahme von 14.5 dpc an beobachtet werden kann (s. Abb. 3.6.H,J,K,L).



**Abbildung 3.6: Expression des *Sal1*-Gens während der Gliedmaßenentwicklung.** In allen Bildern sind die Gliedmaßenknospen mit der dorsalen Seite zum Betrachter abgebildet, die anteriore Seite ist nach oben gerichtet. Die oberen der paarweise angeordneten Gliedmaßen sind jeweils die vorderen, die unteren die hinteren Gliedmaßenknospen. Die Vibratommontage wurden aus den whole mount-gefärbten Gliedmaßen zur linken angefertigt, die schwarzen Linien deuten die Schnittebene an. Die sagittalen Schnitte zeigen mit der proximalen Seite nach links, die transversen Schnitte mit der posterioren Seite nach links. ER: Epitheliale Randleiste; DM: dorsales Mesenchym; VM: ventrales Mesenchym; Fz: Bereich zwischen den sich entwickelnden Fingern bzw. Zehen; PD: posteriore Expressionsdomäne; AD: anteriore Expressionsdomäne. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

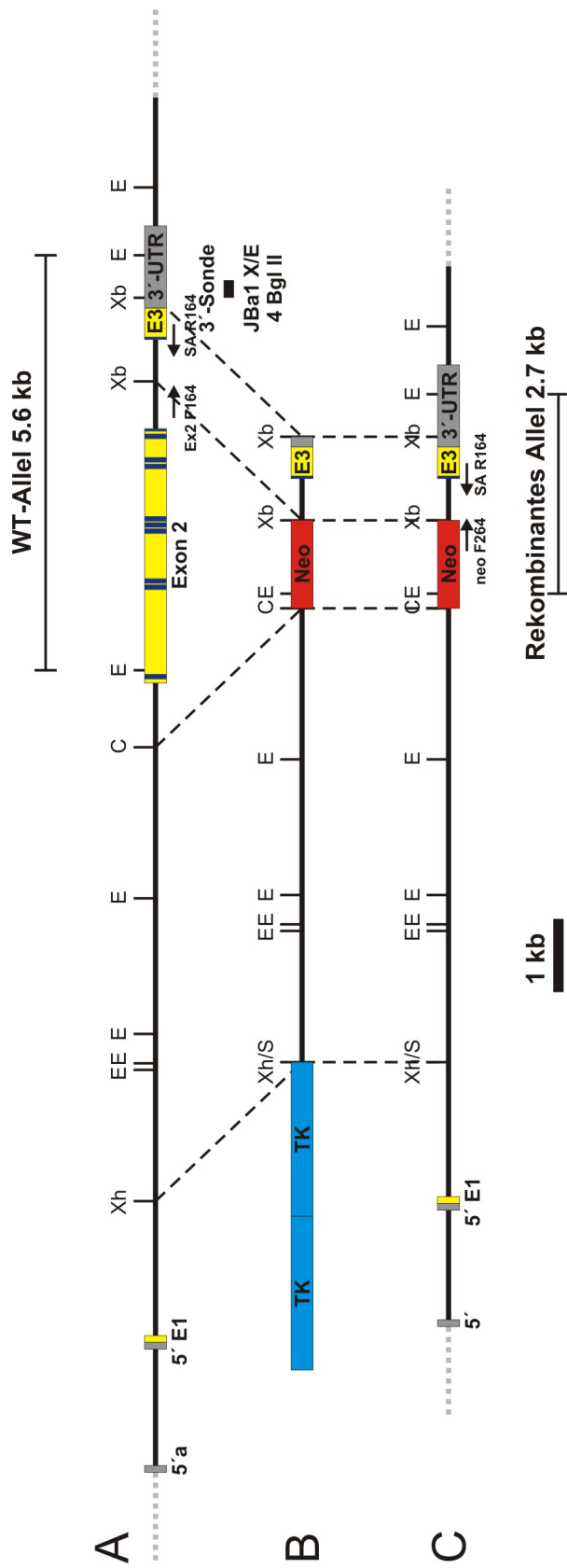
### 3.3 Homologe Rekombination des *Sall1*-Gens

Um die Funktion eines Gens *in vivo* zu untersuchen, bietet sich die Erzeugung von knock out-Mäusen an, in denen gezielt ein Gen ausgeschaltet ist. Mit Hilfe eines Targeting-Vektors werden in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) endogene Sequenzen im Allel gegen speziesfremde DNA-Fragmente ausgetauscht, wodurch das Gen inaktiviert wird (Ausubel et al., 1994; Capecchi, 1989). Der Austausch erfolgt durch genomische Fragmente, die die speziesfremde DNA flankieren, deren Gesamtgröße  $\geq 7$  kb betragen sollte (Joyner, 2000) und die in richtiger Anordnung und Orientierung in den Vektor kloniert sind.

Der Targeting-Vektor pTKneo (s. 2.7.2), dessen Gesamtgröße 8.3 kb beträgt, basiert auf dem pBluescript-Vektor und enthält somit eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion auf geeigneten Agarplatten (s. 2.6.1). Zusätzlich wurde eine Neomycinkassette, die einen Promotor und ein Polyadenylierungssignal der Phosphoglyceratkinase (PGK) besitzt und die Resistenz gegen G418 (s. 2.11.2) bewirkt, in den Vektor integriert. Zur Negativselektion der embryonalen Stammzellen sind zwei *Herpes simplex*-Virus 1-Thyrosinkinase-Gene (HSV-TK) in 5'-Richtung der Neomycinkassette vorhanden. In 5'- und 3'-Richtung der Neomycinkassette befinden sich Polylinker-Sequenzen, die zur Klonierung von homologen Sequenzen in 5'- und 3'-Richtung der zu deletierenden Gen-Sequenz dienen.

#### 3.3.1 Herstellung eines *Sall1*-knock out-Konstrukts

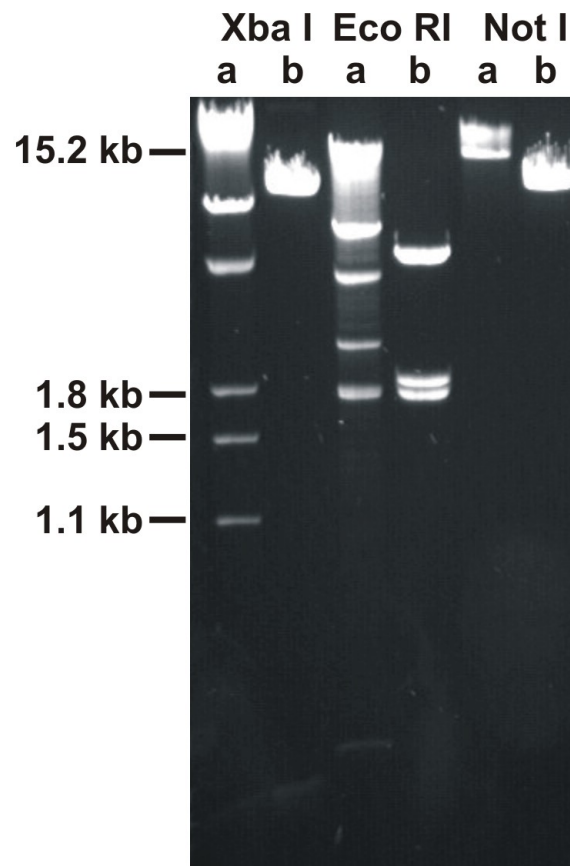
Der knock out des murinen *Sall1*-Gens sollte durch die vollständige Deletion von Exon 2 und 3 erfolgen, die mit insgesamt 3 899 bp nahezu die gesamte kodierende Sequenz mit allen ZF-Domänen beinhalten. Mit dieser Strategie blieb also nur Exon 1, das für keine funktionelle Domäne zu kodieren scheint, erhalten. Für die Herstellung des knock out-Konstrukts war es nötig, mehr Informationen aus dem 3'-Bereich des Gens zu gewinnen. Da kein weiteres Fragment 3' von CE 0.95 aus Cos C gefunden werden konnte (s. Abb. 3.1), wurde angenommen, dass dieser Cosmidklon dort endete. Als das am weitesten 3'-wärts gelegene Fragment wurde CE 0.95 für die Hybridisierung des zweiten positiven Cosmidklons, Cos J, eingesetzt. Es konnte ein Bam HI-Fragment (JBa1) isoliert werden, das ausreichend Information über den 3'-Bereich von *Sall1* enthielt. Zur Klonierung in den pTKneo-Vektor wurde ein 6.2 kb Xho I/Cla I-Fragment in 5'-Richtung von Exon 2 und ein 1.1 kb Xba I-Fragment mit 566 bp aus Intron 2, dem gesamten Exon 2 sowie 139 bp aus der 3'-UTR gewählt.



**Abbildung 3.7: Strategie der homologen Rekombination zur Inaktivierung des *Sall1*-Gens.** Das native *Sall1*-Gen der Maus ist unter A dargestellt. Die genomischen Fragmente Xho I/Cla I (in 5'-Richtung der Neomycinkassette) und Xba I/Xba I wurden in den pTKneo-Vektor kloniert (B). Mittels homologer Rekombination wurde der kodierende Bereich von Exon 2 durch die Neomycinkassette im nativen Gen ersetzt (C). Über dem nativen bzw. unter dem rekombinierten Allel sind die jeweiligen Fragmentlängen bei Hybridisierung mit der 3'-Sonde dargestellt. Die Neomycinkassette ist rot, die beiden HSV-TK-Gene blau dargestellt. Die Exons sind durch gelbe Rechtecke gekennzeichnet, die blauen Striche darin repräsentieren die für die Zinkfinger kodierenden Regionen. Die 5'-bzw. 3'-UTR ist durch die grauen Rechtecke repräsentiert. Der schwarze Balken zeigt die Sonde für die Genotypisierung mittels Southern-Blot, die Pfeile deuten die PCR-Primer zur Genotypisierung an. C: Cla I; E: Eco RI; S: Sal I; Xb: Xba I; Xh: Xho I; neo: Neomycin-Kassette; TK: HSV-Thymidinkinase-Gen.



Zunächst wurde das 3'-Fragment in den Vektor ligiert und ein Klon mit richtiger Orientierung des Fragments durch Sequenzierung identifiziert. Das 5'-Fragment konnte danach aufgrund der passenden Schnittstellen gerichtet in die *Sal I*/*Cla I*-Schnittstellen des so linearisierten Vektors kloniert werden. Die Gesamtgröße des *Sall1*-knock out-Konstrukts beträgt 15.2 kb, die Strategie ist in Abb. 3.7 dargestellt. Abb. 3.8 zeigt die Überprüfung des klonierten knock out-Konstrukts mittels restriktionsenzymatischer Spaltung.

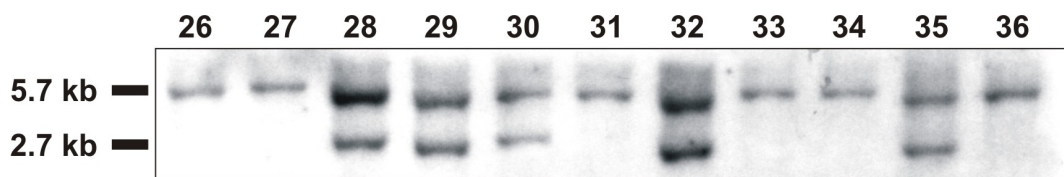


**Abbildung 3.8: Restriktionsanalyse des *Sall1*-knock out-Konstrukts.** In den mit **a** bezeichneten Spuren wurde restriktionsenzymatisch gespaltene *Sall1*-knock out-Konstrukt-DNA aufgetrennt, in den mit **b** bezeichneten Spuren der pTKneo-Vektor ohne Insert. Anhand der Restriktion mit Xba I, das in der Multiple Cloning Site des Vektors restringiert, konnte die Anwesenheit des 3'-Fragments (1.1 kb) und die richtige Orientierung des 5'-Fragments geprüft werden (1.5 kb). Mittels Eco RI-Analyse wurde das Vorhandensein beider Gene für die Thymidinkinase im knock out-Konstrukt und pTKneo-Vektor bestätigt (1.8 kb). Die Restriktion mit Not I, das zur Linearisierung des fertigen Konstrukts dienen sollte, zeigt die Anwesenheit nur einer Restriktionsschnittstelle sowie die Gesamtgröße des klonierten knock out-Konstrukts von 15.2 kb.

Anhand der Restriktion mit Xba I, das in der Multiple Cloning Site des Vektors schneidet, konnte die Anwesenheit des 3'-Fragments (1.1 kb) und die korrekte Orientierung des 5'-Fragments verifiziert werden (1.6 kb). Mittels Eco RI-Analyse wurde das Vorhandensein beider HSV-TKs im knock out- und pTKneo-Vektor bestätigt (1.8 kb). Die Restriktion mit Not I, das zur Linearisierung des fertigen Konstrukts dienen sollte, zeigt die Anwesenheit nur einer Restriktionsschnittstelle.

### 3.3.2 Herstellung von homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen

RI-ES-Zellen wurden wie unter 2.11.2 beschrieben elektroporiert und 43 resistente ES-Zellklone isoliert (s. 2.11.3). Die von der *duplicate plate* isolierte ES-DNA wurde mit Eco RI geschnitten und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der externen 240 bp-langen 3'-Sonde JBa1 X/E4 Bgl II sowie der internen Neomycin-Sonde neo (s. 2.2). Aufgrund des hohen A/T-Gehalts der relativ kurzen 3'-Sonde erfolgte die Markierung mit [ $\alpha$ - $^{32}$ ]P dATP (s. 2.9.3.5). Das WT-Allel wurde durch ein Fragment von 5.7 kb, das rekombinierte durch eines von 2.7 kb repräsentiert (s. Abb. 3.9). Von den 43 getesteten ES-Zellklonen erwiesen sich 27 Klone als positiv. Alle positiven Klone zeigten ein Hybridisierungssignal von 2.8 kb mit der Neomycin-Sonde (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.9: Genotypisierung der ES-Zellklone mittels Southern-Blot.** Die genomische ES-Zell-DNA wurde mit dem Enzym Eco RI restriktionsenzymatisch gespalten. Die Hybridisierung erfolgte mit der externen 3'-Sonde JBa1 X/E4 Bgl II, positive Klone zeigen das native Allel durch eine Bande bei 5.7 kb sowie das mutierte Allel bei 2.7 kb. Die Zelllinien 28, 29, 30, 32 und 35 erwiesen sich als heterozygot für die eingefügte Mutation.

### 3.3.3 Generierung von *Sall1*-defizienten Mäusen

Die Injektion von rekombinanten ES-Zellen Blastocysten und deren Transfer in pseudoschwangere Mäuse wurde von MitarbeiterInnen des Max-Planck-Instituts

für Experimentelle Medizin, Göttingen, durchgeführt. 6 männliche Mäuse mit 60–100 % Chimärismus wurden im hauseigenen Tierstall mit Weibchen der Mauslinien C57BL und 129/SvJ verpaart. Die Genotypisierung der Nachkommen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Die vorgesehene PCR wurde mit drei verschiedenen Primern etabliert, zwei Primer stammen aus dem nativen Gen und ein Primer aus der inserierten Neokassette (s. Abb. 3.7). Die Primerkombination Ex2 F164 / SA R164 ergibt ein Produkt des nativen Allels von ca. 400 bp, mit dem Vorwärtsprimer neo F264 aus dem Targeting-Vektor und SA R164 entsteht ein Produkt von ca. 750 bp.

### **3.4 Herstellung eines monospezifischen Anti-Sall1-Antikörpers**

#### **3.4.1 Auswahl von Peptiden zur Immunisierung von Kaninchen**

Zur Herstellung eines spezifischen Anti-Sall1-Antikörpers wurden von der Firma Eurogentec aus der von der humanen *SALL1*-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz Regionen herausgesucht, die geeignete Epitope darstellen sollten. In diesen Regionen wurden anschließend zwei Peptide (S1-I und S1-II) ausgewählt, die eine relativ hohe Homologie zwischen dem murinen Sall1- und dem humanen SALL1-Protein aufweisen (s. Abb. 3.10, 3.11). Gegen diese Peptide wurden Antiseren in Kaninchen hergestellt, deren Aufreinigung im Folgenden beschrieben wird.

#### **3.4.2 Herstellung von Sall1- und SALL1-Fusionsproteinen**

Die Aufreinigung der Antiseren sollte über *Strep*-tag-Fusionsproteine erfolgen, die in den Bereichen des murinen bzw. humanen Proteins liegen, aus denen die Peptide zur Immunisierung eingesetzt wurden (s. Abb. 3.12). Entsprechend wurden für die Herstellung der Konstrukte zur Generierung von Sall1-Fusionsproteinen PCRs mit den Primerpaarungen MS1FP F1 / MS1FP R1 (MS1-I, PCR-Produkt von 696 bp) und MS1FP F2 / MS1FP R2 (MS1-II, PCR-Produkt von 669 bp) etabliert (s. 2.10.1.1). Als Template für die Amplifikation von MS1-I diente der *Sall1*-Klon CB3, für die Amplifikation von MS1-II der *Sall1*-Klon CK4. Für die Herstellung

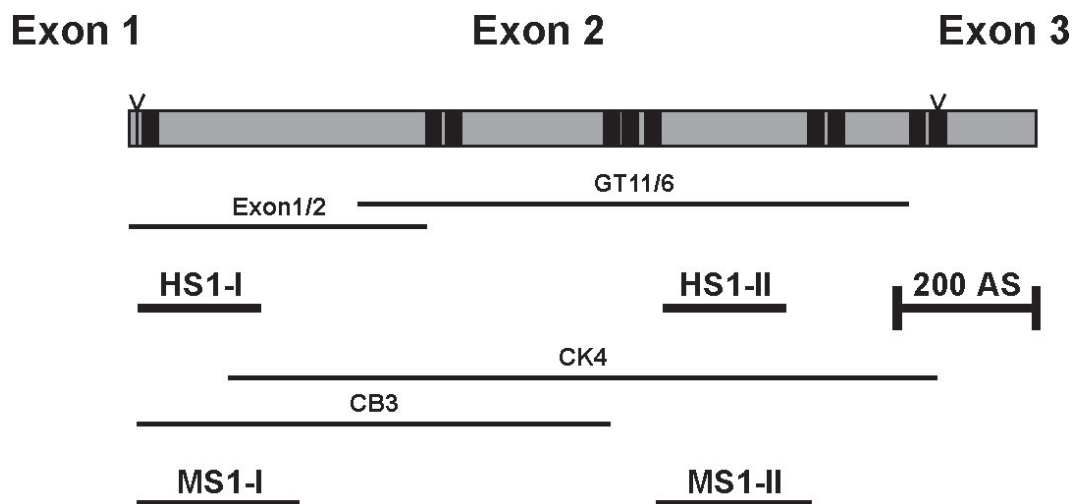
					MS1FP F1			
1	MSRRKQAKPQ	HFQSDPEVAS	LPRRDGDETEK	<b>GQPSRPTKSK</b>	DAHVCGRCCA	<u>EFFELSDLLL</u>	60	
1	MSRRKQAKPQ	HFQSDPEVAS	LPRRDGDETEK	<b>GQPSRPTKSK</b>	DAHVCGRCCA	<u>EFFELSDLLL</u>	60	
61	<b>HKKSCTKNQL</b>	VLIVNESPAS	PAKTFPPGPS	LNDPDDQMKD	AANKADQEDC	SDLSEPKGLD	120	
61	<b>HKKNCTKNQL</b>	VLIVNENPGS	PPETFSPSP	PDNPDEQMND	TVNKTDQVDC	SDLSEHNGLD	120	
121	REESMEVEVP	VATTTTTTTG	GSGGSGGSTL	SGVTNITTPS	CHSGCSSGTS	AITTSLPQLG	180	
121	REESMEVEAP	VANKSGSGTS	SGSHSSTAPS	SSSSSSSSSG	GGGSSSTGTS	<u>AITTSLPQLG</u>	180	
181	DLTTLGNFSV	INSNVIEENL	QSTKVAVAQF	SQEARCGGAS	GGKLLISTLM	<u>EQLLALQQQQ</u>	240	
181	DLTTLGNFSV	INSNVIEENL	QSTKVAVAQF	SQEARCGGAS	GGKLAVPALM	<u>EQLLALQQQQ</u>	240	
241	IHQQLIEQI	<b>RHQILLASQ</b>	SADLPAAPSI	PSQGLRTSA	NPLTTLSSHL	<u>SQQLAVAAGL</u>	300	
241	IHQQLIEQI	<b>RHQILLASQ</b>	NADLPTSSS	PSQGLRTSA	NPLSTLSSHL	<u>SQQLAAAAGL</u>	299	

**Abbildung 3.10: Homologievergleich zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Sall1 und SALL1 im Bereich des Peptids S1-I.** Die obere Sequenz stellt die aus dem murinen *Sall1*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz dar, die untere ist die aus dem humanen *SALL1*-Gen abgeleitete Sequenz. Das C<sub>2</sub>HC-Zinkfingermotiv ist unterstrichen. Das für die Immunisierung eingesetzte Peptid S1-I ist fett gedruckt, die Pfeile symbolisieren die Primer zur Herstellung der murinen und humanen Fusionsproteine.

					MS1FP F2			
719	<u>ALKMHYRHT</u>	<u>GERPFKCKIC</u>	<u>GRAFTTKGNL</u>	<u>KTHYSVHRAM</u>	PPLRVQHSCP	<u>ICQKKFTNAV</u>	778	
720	<u>ALKMHYRHT</u>	<u>GERPFKCKIC</u>	<u>GRAFTTKGNL</u>	<u>KTHYSVHRAM</u>	PPLRVQHSCP	<u>ICQKKFTNAV</u>	779	
779	<u>VLQQHIRMHM</u>	GGQIPNTPVP	DNPESMESD	TGSFDEKNFD	DLDNFSDENM	EECPGSIPTD	838	
780	<u>VLQQHIRMHM</u>	GGQIPNTPVP	DSYSEMESD	TGSFDEKNFD	DLDNFSDENM	EDCPGSIPTD	839	
839	TPKSADASQD	SLSSSPLPLE	MSSIAALENQ	MKMINAGLAE	QLQASLKSVE	NGSMEGDVLV	898	
840	TPKSADASQD	SLSSSPLPLE	MSSIAALENQ	MKMINAGLAE	QLQASLKSVE	NGSIEGDVLV	899	
899	NDSSSVGGDM	ESQSAGSPAI	SESTSSMQAL	<b>SPSNSTQEFH</b>	<b>KSPGMEKPKQ</b>	RVGPGEFANG	958	
900	NDSSSVGGDM	ESQSAGSPAI	SESTSSMQAL	<b>SPSNSTQEFH</b>	<b>KSPSIEKPKQ</b>	RAVPSEFANG	959	
959	LSPTPVNGGA	LDLTSSHAEK	IIKEDSLGIL	PFPRDRGKFK	NTACDICGKT	<u>FACQSALDIH</u>	1018	
960	LSPTPVNGGA	LDLTSSHAEK	IIKEDSLGIL	PFPRDRGKFK	NTACDICGKT	<u>FACQSALDIH</u>	1019	

**Abbildung 3.11: Homologievergleich zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Sall1 und SALL1 im Bereich des Peptids S1-II.** Die obere Sequenz stellt die aus dem murinen *Sall1*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz dar, die untere ist die aus dem humanen *SALL1*-Gen abgeleitete Sequenz. Die Bereiche, die DZF-Motiven entstammen, sind unterstrichen. Das für die Immunisierung eingesetzte Peptid S1-II ist fett gedruckt, die Pfeile symbolisieren die Primer zur Herstellung der murinen und humanen Fusionsproteine.

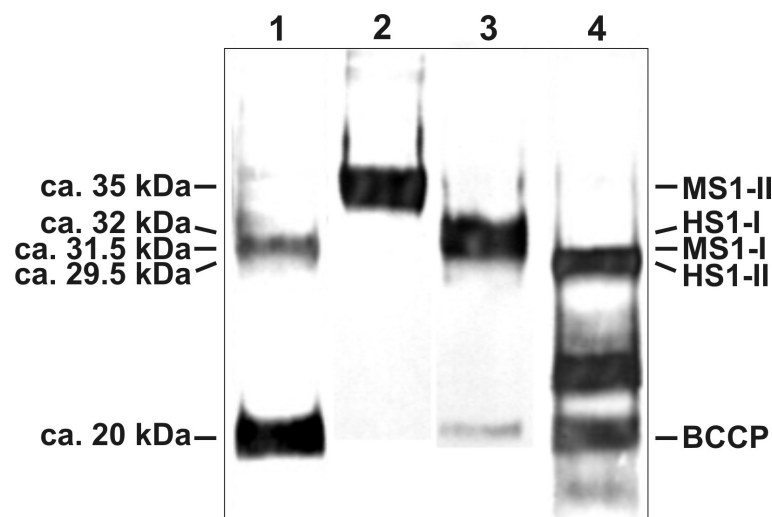
der Konstrukte von SALL2-Fusionsproteinen wurden PCRs mit den Primerpaarungen HS1FP F1 / HS1FP R1 (HS1-I, PCR-Produkt von 531 bp) und HS1FP F2 / MS1FP R2 (HS1-II, PCR-Produkt von 624 bp) etabliert (s. 2.10.1.1). Hier dienten als Templates für HS1-I der cDNA-Klon Exon1/2 (Blanck, 2000) und für HS1-II der Klon GT11/6 (Kohlhase, 1996). Die Primer sind in der Tabelle 2.7.5 sowie den Abbildungen 3.10 und 3.11 aufgeführt. Die Positionen der Fragmente innerhalb des Proteins sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Amplifikate wurden mit Bsa I restriktionsenzymatisch gespalten und in den ebenfalls mit Bsa I linearisierten Vektor IBA2 ligiert. Mehrere aus der Transformation hervorgegangene Kolonien wurden in Selektionsmedium angezogen und mittels Restriktionsanalyse vorselektiert. Einige positive Plasmidklone wurden mittels Sequenzanalyse auf mögliche Punktmutationen und die Klonierung im korrekten Leseraster überprüft. Von den korrekt amplifizierten und klonierten Plasmiden wurden für jedes der herzustellenden Fusionsproteine je zwei für die weiteren Versuche ausgewählt.



**Abbildung 3.12: Fusionsproteine des *Sall1*- und *SALL1*-Gens.** Die Struktur des *Sall1*- und des *SALL1*-Gens sind aufgrund der großen Homologie schematisch in einer Abbildung gezeigt. Die Zinkfingerregionen sind als senkrechte Balken innerhalb der Aminosäuresequenz dargestellt. Die dünnen Striche deuten die für die Amplifikation der FP-Fragmente verwendeten humanen und murinen Klone an, die dicken Striche stehen für die FP-Fragmente. Die Haken repräsentieren die Exon-Intron-Übergänge.

### 3.4.3 Gewinnung der Sall1- und SALL1-Fusionsproteine

Um die murinen Sall1- bzw. humanen SALL1-Fusionsproteine in *E. coli* nachzuweisen, erfolgte eine Anzucht der Bakterien wie unter 2.10.1.2 beschrieben. Nach der Anzucht der Bakterien und dem Aufschluss der Proteine wurden diese zur Kontrolle auf einem PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und der Filter mit StrepTactin umgesetzt (s. 2.10.1.4). Dabei konnten Signale bei der erwarteten Größe von ca. 31.5 kDa (MS1-I), 30.5 kDa (MS1-II), 25.5 kDa (HS1-I) und 29.5 kDa (HS1-II) detektiert werden (Abb. 3.13). Davon sind etwa 5 kDa auf das *Strep*-tag II-Peptid zurückzuführen. Die Extrakte zeigten unterschiedlich viele unspezifische Banden unklarer Herkunft.



**Abbildung 3.13: Western-Blot-Analyse bakteriell exprimierter Sall1- und SALL1-Fusionsproteine.** Die transformierten Bakterienkulturen wurden nach 3 h Inkubation mit Anhydrotetracyclin geerntet und der Zellextrakt aufgeschlossen. Nach PAGE und Elektrotransfer wurde die Membran mit AP-konjugiertem StrepTactin umgesetzt und mit NBT/BCIP gefärbt. 1: MS1-I; 2: MS1-II; 3: HS1-I; 4: HS1-II.

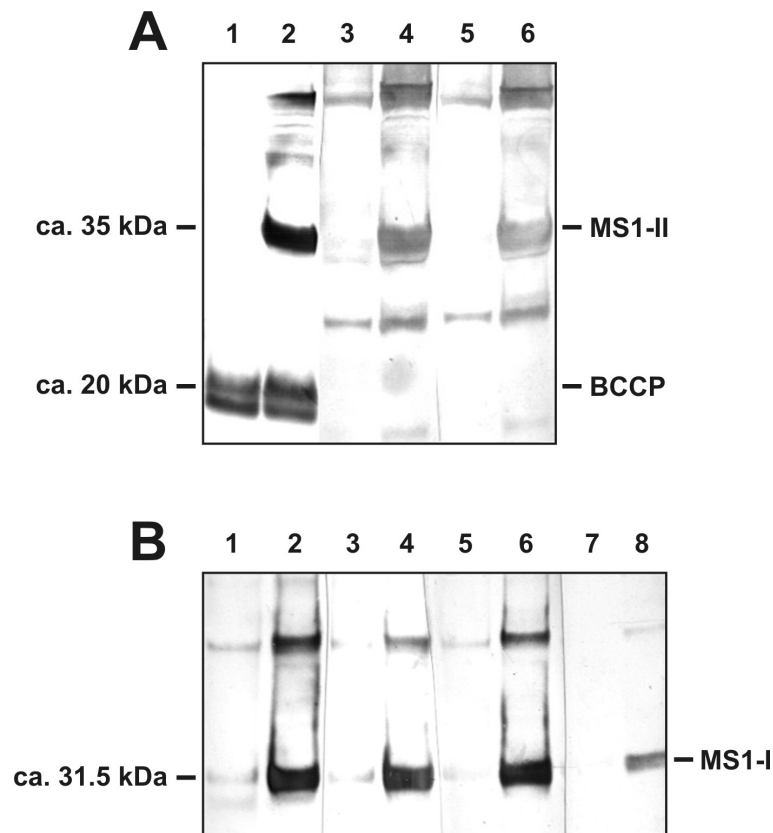
### 3.4.4 Gewinnung von monospezifischen Anti-Sall1-Antikörpern

Die zur Aufreinigung der Antiseren verwendeten Fusionsproteine konnten nun eingesetzt werden, um aus den bereits vorhandenen Seren monospezifische Antikörper gegen Sall1 bzw. SALL1 zu isolieren. Hierzu mussten die Rohextrakte

der geernteten Proteine zunächst über immobilisiertes StrepTactin aufgereinigt werden (s. 2.10.1.3). Je 20  $\mu\text{L}$  der Eluate wurden mittels SDS-PAGE analysiert und eine Fraktion mit einer deutlichen Fusionsproteinbande ausgewählt. Das ausgewählte Eluat wurde eingesetzt, um wie in 2.10.9 beschrieben eine Antikörper-Aufreinigung durchzuführen. Die Abbildung 3.14.A zeigt die Detektion der MS1-II-Fusionsproteinbande mit dem Antikörper, der gegen das Peptid S1-II hergestellt wurde. Bei der Immunumsetzung mit Kernproteinextrakten aus murinem Nierengewebe konnte die native Sall1-Bande jedoch nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass eine weitere Methode zur Aufreinigung der Seren angewendet wurde. Die von der Firma Eurogentec synthetisierten und mit den Seren gelieferten Peptide wurden wie unter 2.10.10 beschrieben an eine Affinitäts-Säule gebunden und die Seren zur spezifischen Bindung der Antikörper auf die so präparierte Säule gegeben. Die eluierten Antikörper wurden entsalzt und zunächst gegen Western-Blots der Fusionsproteine getestet. Wie in Abb. 3.14.B gezeigt, konnte das Fusionsprotein MS1-I erfolgreich mit dem Antikörper, der gegen das Peptid S1-I hergestellt worden war, detektiert werden. Daher folgten weitere Untersuchungen, um die Qualität des aufgereinigten Antikörpers zu testen.

### 3.4.5 Nachweis von Sall1 in Kernproteinextrakten

Das Sall1-Protein sollte als Transkriptionsfaktor im Zellkern lokalisiert sein. Dies wurde im Rahmen anderer Experimente mit Hilfe von SALL1-*Green fluorescent protein*-Fusionsproteinen nachgewiesen (Rieger, 2001). An Kernproteinextrakten aus murinem Nierengewebe sollte nun die Präsenz von Sall1 durch eine Western-Blot-Analyse gezeigt werden. Für das Sall1-Protein wurde, abgeleitet von der AS-Sequenz, eine Größe von ca. 158 kDa angenommen. Aus einer Nierengewebe wurden wie unter 2.10.2 beschrieben Kernproteine extrahiert und mit dem über die Affinitätssäule aufgereinigten anti-Sall1-I Antiserum inkubiert. Da durch den zu Beginn der Aufreinigung durchgeführten Verdünnungsschritt mit dieser Methode keine Anreicherung des Antikörpers erfolgte, wurden die Filter nur mit relativ geringen Verdünnungen inkubiert (s. 3.15). Das Antiserum detektierte eine Bande von ca. 160 kDa, die dem angenommenen Molekulargewicht des Sall1-Proteins entspricht.



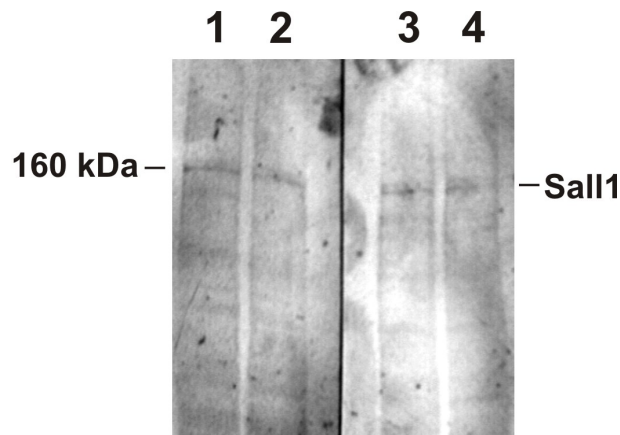
**Abbildung 3.14: Test der unterschiedlich aufgereinigten Antikörper auf ihre Antigen-Spezifität.** Die Abbildung **A** zeigt die Detektion der Fusionsproteinbande MS1-II bei ca. 35 kDa mit dem über das Western-Blot-Verfahren aufgereinigten Antikörper. Die Spuren **1** und **2** wurden mit StrepTactin, die Spuren **3** und **4** mit einer 1:500-Verdünnung des Antikörpers und die Spuren **5** und **6** mit einer 1:1000-Verdünnung des Antikörpers umgesetzt. In den mit einer ungeraden Zahl bezeichneten Spuren wurden die jeweiligen Zelllysate, in den Spuren anderen Aliquots einer Elutionsfraktion aufgetragen.

In der Abbildung **B** ist die Detektion des MS1-I FPs mit dem mittels Affinitätssäule aufgereinigten Antikörper gezeigt. Die Spuren **1** und **2** wurden mit einer 1:50-Verdünnung des Antikörpers umgesetzt, die Spuren **3** und **4** mit einer 1:100-Verdünnung, **5** und **6** mit einer 1:250-Verdünnung des Antikörpers und die Spuren **7** und **8** mit StrepTactin. In den mit einer ungeraden Zahl bezeichneten Spuren wurden die jeweiligen Zelllysate, in den anderen Spuren Aliquots einer Elutionsfraktion aufgetragen.

### 3.4.6 Herstellung eines Antiserums gegen Sall1

Nach der Aufreinigung des Sall1-I-Antiserums mit einer Affinitätssäule war es zwar gelungen, das Sall1-Protein in Kernproteinextrakten nachzuweisen, jedoch waren die Spezifität und die Stärke des Signals nicht von einer Qualität, die den Einsatz





**Abbildung 3.15: Nachweis des Sall1-Proteins in Kernproteinextrakten.** Aus Nierengewebe der Maus wurden Kernproteine präpariert und einer PAGE und einem Elektrotransfer unterworfen. Der Blot wurde mit dem Anti-Sall1-I Antikörper umgesetzt, mit AP-konjugiertem Anti-Kaninchen Zweitantikörper inkubiert und mit NBT/BCIP gefärbt. Die Spuren 1 und 2 wurden mit einer 1:100-Verdünnung des Antikörpers inkubiert, die Spuren 3 und 4 mit einer 1:50-Verdünnung.

des Antiserums für *in situ*-Hybridisierung von Gewebeschnitten erlaubte. Daher sollten mit einer weiteren Methode, bei der nicht gegen Peptide, sondern gegen Proteine immunisiert wird, neue Antikörper gewonnen werden. Für die Herstellung eines Antiserums gegen Sall1 sollte das Fusionsprotein verwendet werden, dass die größte Homologie zwischen der murinen und der humanen Aminosäuresequenz aufweist. Folglich wurde das S1-II-FP für die Immunisierung ausgesucht (vgl. Abb. 3.11). Die Herstellung und Aufreinigung der *Strep*-tag-Fusionsproteine für Sall1 und SALL1 ließ erkennen, dass das MS1-II-FP stärker als das HS1-II-FP in den Bakterien exprimiert wird (s. 3.13), welches daher für die Injektion von Kaninchen verwendet wurde. Die Analyse des Antiserums konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

### 3.5 Untersuchungen zur embryonalen Expression des *Sall2*-Gens der Maus

Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass das *Sall2*-Gens der Maus hauptsächlich im Gehirn und der Niere exprimiert wird, und eine Analyse mittels RT-PCR hatte ergeben, dass *Sall2*-Transkripte bereits in Embryonen des Entwicklungsstadiums 8.5 *days post coitum* (dpc) vorhanden sind (Kohlhase et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollten genauere Untersuchungen über die embryonale Expression von *Sall2* durchgeführt werden.

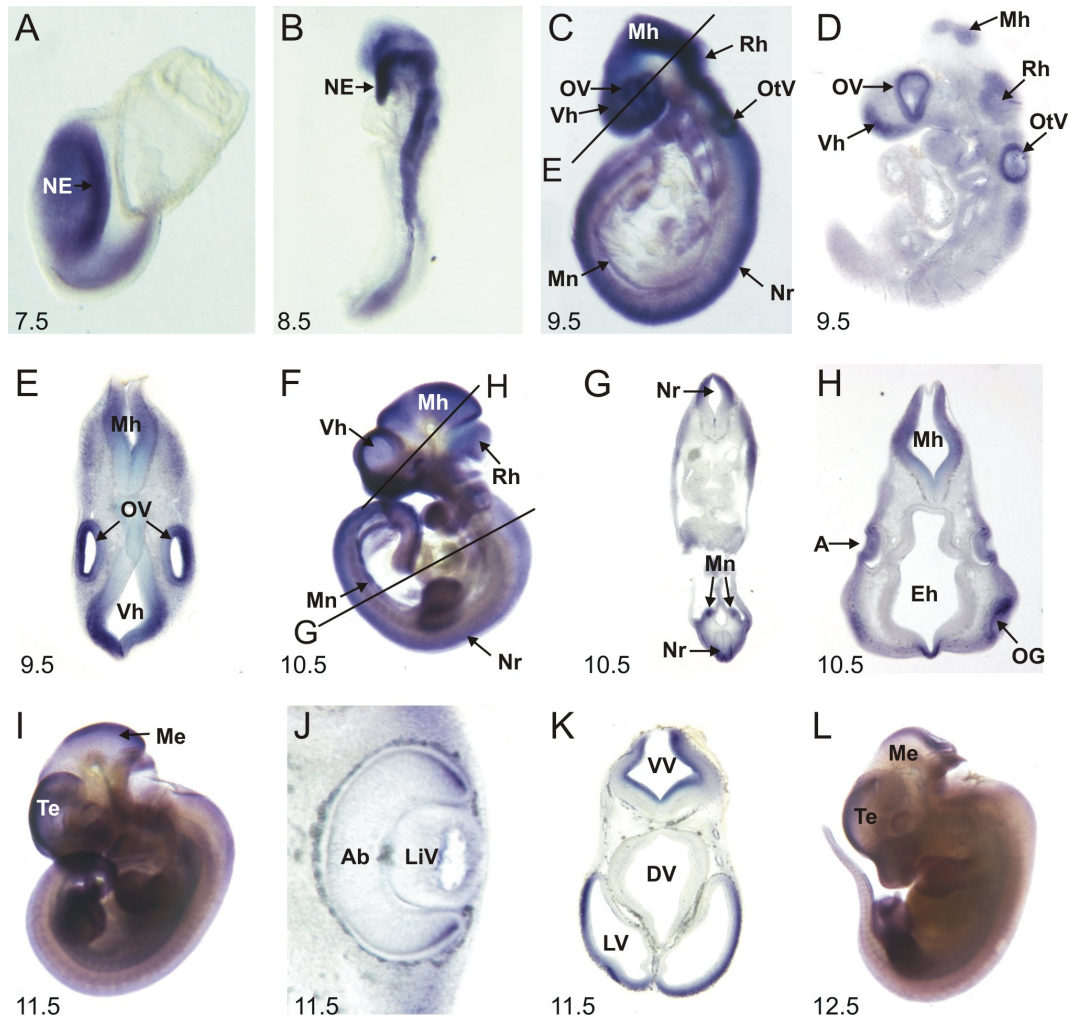
Aus dem 1B2-Subklon von Cosmid 7 (s. Abb. 3.17, S. 82) wurde eine DIG-markierte antisense-Sonde hergestellt und für die *in situ*-Hybridisierung verschiedener Embryonalstadien (s. 2.9.11.3) eingesetzt. Verwendet wurden dafür aus CD1-Mäusen präparierte Embryonen der Altersstadien 7.5–12.5 dpc. Einige der gefärbten Embryonen wurden zur besseren Untersuchung der *Sall2*-exprimierenden Gewebe in Gelatine eingebettet und mit einem Vibratom geschnitten (s. 2.9.11.3.4).

### 3.5.1 Expression in neuralen Embryonalgeweben

Die Abbildung 3.16.A zeigt, dass die Expression von *Sall2* bereits in den frühesten untersuchten Stadien (7.5 dpc) beginnt. Dabei ist eine starke Anfärbung im neuralen Ektoderm in einer breiten anterioren Region des zukünftigen Kopfes zu finden. Ein identisches Expressionsmuster ist auch im 8.5 dpc-Embryo (s. Abb. 3.16.B) festzustellen. Am Tag 9.5 dpc zeigen das Neuralrohr und große Bereiche des Vorder-, Mittel- und Rautenhirns ein starkes Signal (s. Abb. 3.16.C–E). Diese Expression bleibt auch am Tag 10.5 dpc bestehen (s. Abb. 3.16.G, H). Die Anfärbung des Neuralrohrs lässt ab Tag 11.5 nach, das Telencephalon und der dritte Ventrikel zeigen eine *Sall2*-Expression bis mindestens 12.5 dpc. In den otischen Vesikeln können *Sall2*-Transkripte an 9.5 dpc detektiert werden.

### 3.5.2 Expression in anderen embryonalen Geweben

Am Tag 7.5 und 8.5 dpc wird *Sall2* nahezu ubiquitär im gesamten neuralen Ektoderm und im neuformierten Mesoderm des sich entwickelnden Embryos exprimiert (s. Abb. 3.16.A,B). Kurz darauf schränkt sich die Expression auf spezifische Strukturen ein. Wie an den Vibratom-Sektionen von 9.5 dpc-Embryonen (s. Abb. 3.16.D,E) zu erkennen, ist die Anfärbung bevorzugt im Epithel lokalisiert. An 9.5 und 10.5 dpc ist eine starke Anfärbung des Mesonephros zu erkennen (s. Abb. 3.16.C,D,F). Ab 9.5 können *Sall2*-Transkripte im optischen Vesikel und an 10.5 in der Linsenplakode detektiert werden (s. Abb. 3.16.C–E,H,J). Ab Tag 11.5 pc begrenzt sich die Expression auf den Bereich des Augenbechers, in dem der Übergang zwischen der äußeren und inneren optischen Schicht lokalisiert ist.



**Abbildung 3.16: Expression des *Sal12*-Gens während der Embryonalentwicklung der Maus.** A, B, C, F, I und L zeigen whole mount-*in situ*-Hybridisierungen, in D, E, G, H, J und K Vibratommikroskopische Schnitte von whole mount-*in situ*-gefärbten Embryonen. Die jeweiligen Altersstadien sind angegeben. A: Auge; Ab: Augenbecher; DV: Dritter Ventrikel; LV: Lateraler Ventrikel; Me: Mesencephalon; Mh: Mittelhirn; Mn: Mesonephros; NE: neurales Ektoderm; Nr: Neuralrohr; OG: Olfaktorische Grube; OtV: Otischer Vesikel; OV: optischer Vesikel; Rh: Rautenhirn; Te: Telencephalon; Vh: Vorderhirn; VV: Vierter Ventrikel. Die Erklärung befindet sich im Text.

## 3.6 Homologe Rekombination des *SalI2*-Gens

### 3.6.1 Herstellung eines *SalI2*-knock out-Konstrukts

Bei Aufnahme der vorliegenden Arbeit lagen weder Erkenntnisse über die Funktion des murinen *SalI2*-Gens noch des humanen *SALL2*-Gens vor. Daher sollten *SalI2*-knock out-Mäuse erzeugt werden, durch deren Analyse Erkenntnisse über die Funktion des Gens gewonnen werden sollten.

Zur Herstellung eines knock out Targeting-Konstrukts musste zunächst die genomische DNA-Sequenz des Intron 1 und der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) vervollständigt werden, um geeignete Fragmente zur Klonierung in den Targeting Vektor pTKneo zu finden. Dazu wurde das Intron 1, von dem eine grobe Restriktionskarte vorhanden war (Altmann, 1998), auf weitere Schnittstellen untersucht und sequenziert. Zudem wurde aus der genomischen Maus-Cosmid-Bibliothek (s. 2.7.7) der Cosmidklon Cos N isoliert (s. 2.9.10.2), der zusätzliche Informationen im 3'-Bereich des murinen *SalI2*-Gens enthält.

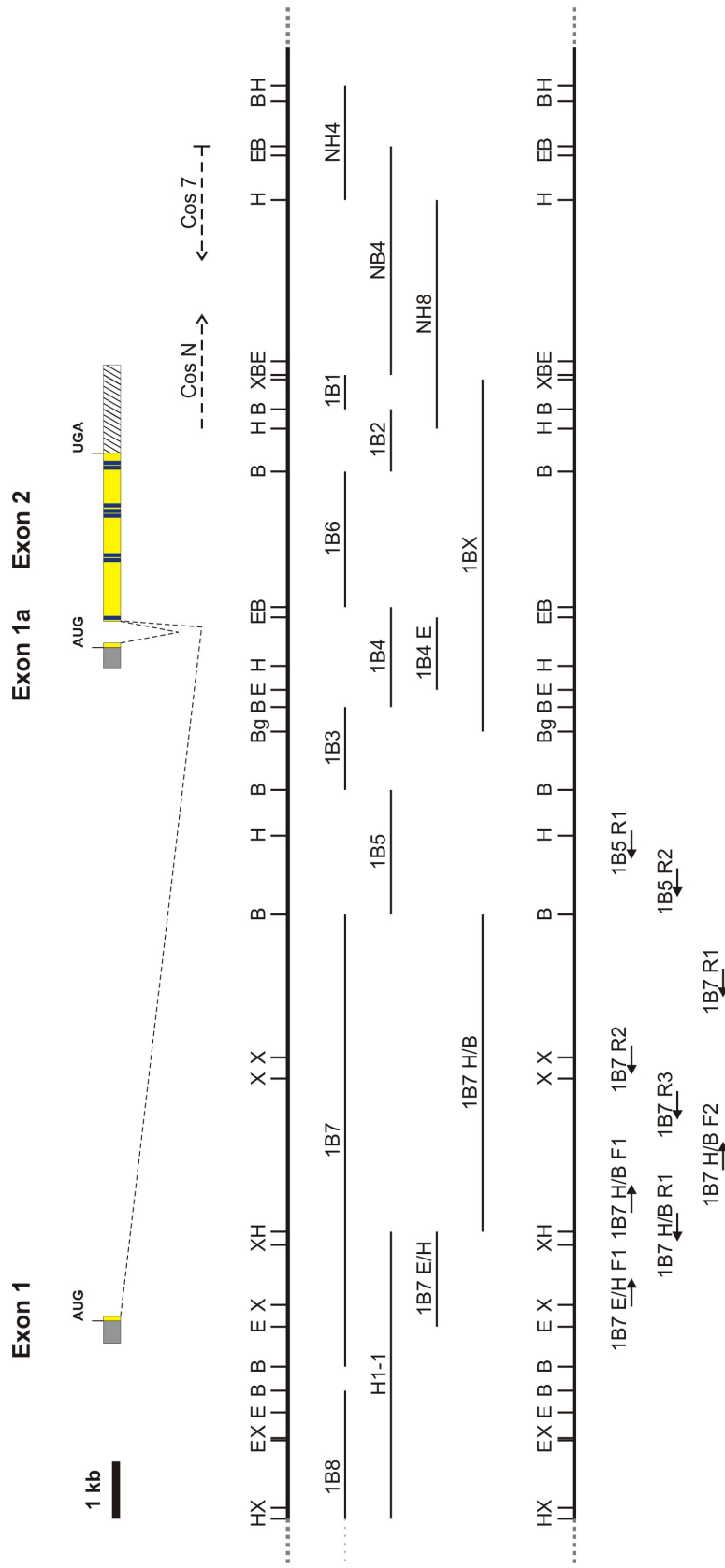
#### 3.6.1.1 Charakterisierung des Intron 1 und der 3'-Region von *SalI2*

Um den Intron 1-Bereich näher zu charakterisieren, wurden aus den vorhandenen Klonen mit Hilfe weiterer Restriktionsspaltungen Subklone hergestellt, durch deren Sequenzierung mit vektor- und sequenzspezifischen Primern (s. 2.7.5) die vollständige Sequenz von Intron 1 erstellt werden konnte (s. Abb. A.2).

Für die weitere Charakterisierung des 3'-Bereichs musste zunächst die genomische Cosmid-Bibliothek 121 der Maus gescreent werden (s. 2.9.10.2), da der für die Isolierung von *SalI2* genutzte Cosmidklon 7 in der 3'-UTR endete (Altmann, 1998). Mit den beiden Sonden 1B1 und 1B2 (s. 2.7.6) konnte ein Cosmidklon (Cosmid N) isoliert werden, der weitere Informationen über den 3'-Bereich von *SalI2* enthielt. Durch Hybridisierungen und Restriktionsspaltungen wurde ausreichend Information gewonnen, um ein Fragment für das knock out-Konstrukt auszuwählen (s. Abb. 3.17).

#### 3.6.1.2 Klonierung genomischer Fragmente in den pTKneo-Vektor

Der knock out sollte durch die vollständige Deletion von Exon 1a und Exon 2 erfolgen, da mit dieser Strategie annähernd die gesamte kodierende Sequenz und alle Zinkfinger-kodierenden Regionen aus dem rekombinanten Allel entfernt wer-



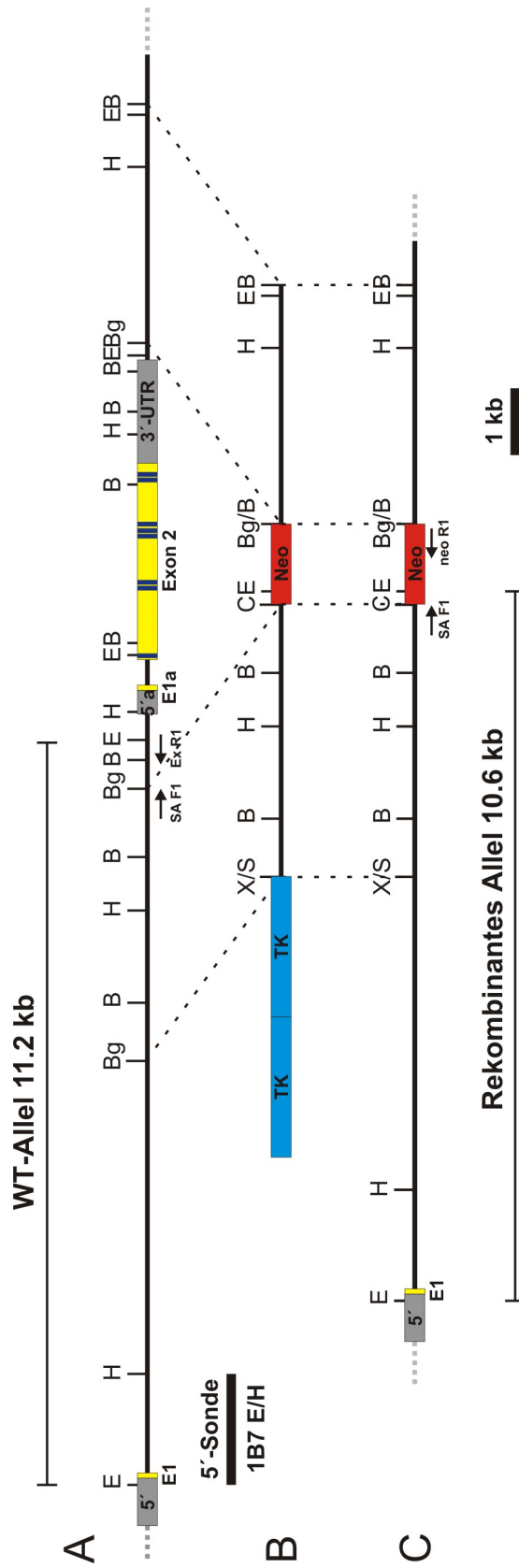
**Abbildung 3.17: Restriktionskarte und genomische Organisation sowie Sequenzierung von SalI/2.** Die kodierenden Bereiche des Gens sind durch gelbe Rechtecke, die beiden 5'-UTR von Exon 1 und Exon 1a durch graue Rechtecke und die 3'-UTR durch ein schraffiertes Rechteck gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie stellt das Intron dar, die blauen Striche repräsentieren die Zinkfinger-kodierenden Regionen. Die Translationsstartpunkte sind durch die Starkodons, der Translationsendpunkt durch das Stoppkodon markiert. Die klonierten Fragmente sind als schwarze Linien dargestellt, die Pfeile zeigen die Position der Sequenzierprimer an. Die gestrichelten Pfeile stellen die Cosmidklone dar, der senkrechte Strich an dem Pfeil für Cos 7 zeigt den bekannten Endpunkt der Cosmid-DNA an. Die Buchstaben markieren die Positionen von Restriktionsschnittstellen. B: Bam HI; E: Eco RI; H: Hind III; X: Xba I.

den können. Für die Klonierung des knock out-Konstrukts musste eine Strategie gewählt werden, mit der das bereits in den Vektor ligierte Fragment durch die Klonierung des zweiten Fragments nicht restringiert wird. Aufgrund der wenigen vorhandenen Restriktionsschnittstellen in den beiden Polylinkern erfolgte zunächst eine Klonierung der beiden Fragmente in pBlueskript.

Zunächst sollte ein Fragment aus Intron 1 in den knock out-Vektor kloniert werden. Aus dem Cosmid 7-Subklon 1BX wurde ein 4.3 kb großes Insert mittels Bgl II gewonnen (s. Abb. 3.18.A), mit der *Pfu*-Polymerase die Enden des Fragments geglättet (s. 2.9.3.4) und in den zuvor mit Hinc II linearisierten und dephosphorylierten pBlueskript-Vektor ligiert. Aus diesem wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen Xho I und Cla I wieder herausgespalten und gerichtet in den mit Sal I und Cla I geschnittenen pTKneo-Vektor kloniert (s. Abb. 3.18.B). Bei den Restriktionsenzymen Xho I und Sal I handelt es sich um kompatible Enzyme, die überlappende und somit wieder ligierbare Überhänge erzeugen, aber durch die Ligation das Erkennungspalindrom der Ausgangssequenz verlieren. Aus dem 3'-Bereich des Gens wurde aus Subklon NB4 ein 3 kb großes Fragment mittels Bam HI und Bgl II isoliert und in die Bam HI-Schnittstelle des zweiten Polylinkers kloniert (Bgl II und Bam HI sind ebenfalls kompatibel; s. Abb. 3.18.A,B). Da diese Klonierung nicht gerichtet erfolgen konnte, wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung ein Klon ermittelt, der die richtige Orientierung aufwies. Damit stand ein *SalI2*-knock out-Konstrukt mit einer Gesamtgröße von 16.2 kb zur Verfügung, das für die homologe Rekombination von murinen embryonalen Stammzellen verwendet werden konnte.

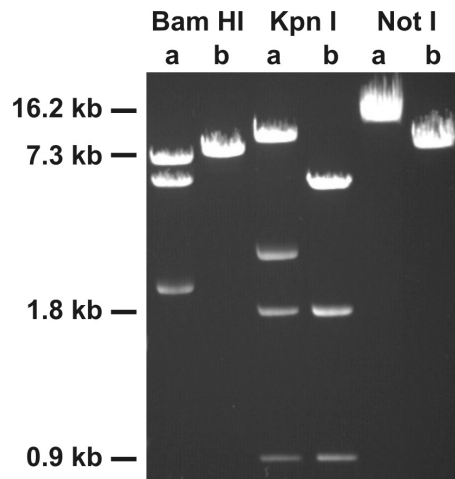
Die Restriktionsanalyse des Konstrukts ist in Abbildung 3.19 dargestellt. Die restriktionsenzymatische Spaltung mit Bam HI zeigte die richtige Orientierung des 5'-Fragments anhand der 7.3 kb-Bande, bestehend aus beiden TKs, dem pBlueskript-Vektor sowie dem 5'-Bereich des Bgl II/Bgl II-Fragments. Die weiteren Banden entstanden durch das im Bgl II/Bgl II-Fragment vorhandenen Bam HI-Fragment von 2.2 kb und dem übrigen knock out-Vektor bei 6 kb. Anhand der Kpn I-Restriktion konnte sowohl am leeren pTKneo-Vektor als auch am fertiggestellten knock out-Konstrukt geprüft werden, ob beide TKs im Plasmid vorhanden sind. Dies wurde durch die in beiden Spuren vorkommende 1.8 kb-Bande bestätigt. Das in beiden Restriktionsanalysen vorkommende 0.8 kb-Fragment besteht aus dem 5'-Bereich der an den pBlueskript grenzenden HSV-TK. Die zusätzlichen Fragmente des knock out-Konstrukts sind die 2.8 kb-Bande aus dem 3'-Bereich der zweiten TK und dem 5'-Bereich des 5'-liegenden genomischen Fragments sowie





**Abbildung 3.18: Strategie der homologen Rekombination zur Inaktivierung des *SalI1*-Gens.** Das native *SalI1*-Allel der Maus ist unter A dargestellt. Die genomischen Fragmente Bgl II/Bgl II (in 5'-Richtung der Neomycinkassette) und Bgl II/Bam HI wurden in den pTKneo-Vektor kloniert (B). Mittels homologer Rekombination wurden Exon 1a und Exon 2 mit den 3'- und 5'-UTRs durch die Neomycinkassette im nativen Gen ersetzt (C). Über dem nativen (A) bzw. unter dem rekombinierten Allel (C) sind die jeweiligen Fragmentlängen bei Hybridisierung mit der 5'-Sonde dargestellt. Die Neomycinkassette ist rot, die beiden HSV-TK-Gene sind blau dargestellt. Die Exons sind durch gelbe Rechtecke gekennzeichnet, die blauen Striche darin repräsentieren die für die Zinkfinger kodierenden Regionen. Die 5'- bzw. 3'-UTR sind durch die grauen Rechtecke angedeutet. Die Pfeile zeigen die PCR-Primer zur Genotypisierung, der schwarze Balken die Sonde für die Genotypisierung mittels Southern-Blot. Es sind nur die für die Klonierung des knock out-Konstrukts wichtigen Restriktionsschnittstellen für Bgl II angegeben. B: Bam HI; Bg: Bgl II; E: Eco RI; H: Hind III; S: Sal I; X: Xho I; neo: Neomycin-Kassette; TK: HSV-Thymidinkinase-Gen.

die 10.8 kb-Bande, bestehend aus dem restlichen 5'-Arm, der Neokassette, dem 3'-Arm und dem pBlueskript-Vektor. Anhand der restriktionsenzymatischen Spaltung mit Not I konnte gezeigt werden, dass sich sowohl im pTKneo-Vektor als auch im knock out-Konstrukt nur eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym befindet.



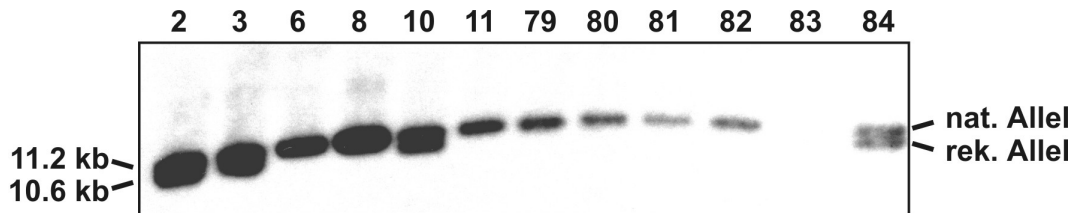
**Abbildung 3.19: Restriktionsanalyse des *SalI2*-knock out-Konstrukts.** In den mit **a** bezeichneten Spuren wurde restriktionsenzymatisch gespaltene *SalI2*-knock out-Konstrukt-DNA aufgetrennt, in den mit **b** bezeichneten wurde der restringierte pTKneo-Vektor ohne Insert aufgetragen. Die Restriktion mit Bam HI zeigt durch das 7.3 kb-Fragment die richtige Orientierung des 5'-Fragments an. Die 1.8 und 0.9 kb-Bande der Kpn I-Restriktionsanalyse des knock out-Konstrukts und des pTKneo-Vektors bestätigen die Präsenz beider Gene für die HSV-TKs. Anhand der Not I-Restriktionsanalyse konnte gezeigt werden, dass sich sowohl im pTKneo-Vektor als auch im knock out-Konstrukt nur eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym befindet. Die Gesamtgröße des vollständig klonierten knock out-Konstrukts beträgt 16.2 kb.

### 3.6.2 Herstellung von homolog rekombinierten embryonalen Stammzellen

RI-ES-Zellen wurden wie unter 2.11.2 beschrieben elektroporiert, selektioniert und 120 resistente ES-Zellklone isoliert (s. 2.11.3). Die von der *duplicate plate* isolierte ES-Zell-DNA wurde mit Eco RI geschnitten und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit der externen 1.7 kb großen 5'-Sonde 1B7 E/H sowie der internen Neomycin-Sonde neo (s. 2.2) hybridisiert. Das WT-Allel wurde durch eine 11.2 kb Bande, das rekombinierte Allel durch eine 10.6 kb Bande repräsentiert. Von den ersten 36 Klonen erwiesen sich bereits 9 als positiv, so dass die restlichen nicht weiter ausgewertet wurden. Ein



Beispiel für die Genotypisierung der ES-Zellklone ist in Abb. 3.20 dargestellt. Alle positiven Klone zeigen ein Hybridisierungssignal von 4.5 kb mit der Neomycin-Sonde (Daten nicht gezeigt).

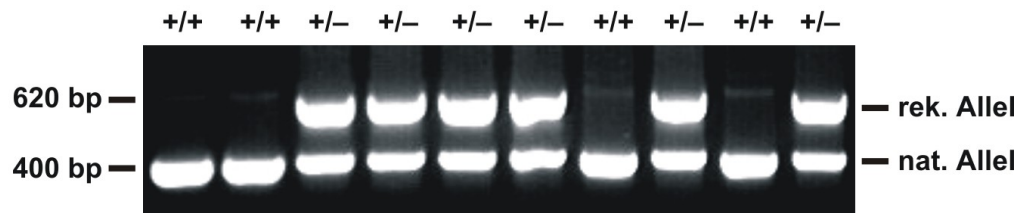


**Abbildung 3.20: Genotypisierung der ES-Zellklone mittels Southern-Blot.** Die genomische ES-Zell-DNA wurde mit dem Enzym Eco RI restriktionsenzymatisch gespalten. Die Hybridisierung erfolgte mit der externen 5'-Sonde 1B7 E/H. Die für die homologe Rekombination positiven Klone zeigen das native Allel durch eine Bande bei 11.2 kb sowie das mutierte bei 10.6 kb. Die ES-Zellklone 2, 3, 10 und 84 erwiesen sich als heterozygot für das homolog rekombinierte Allel.

### 3.6.3 Generierung von *Sall2*-defizienten Mäusen

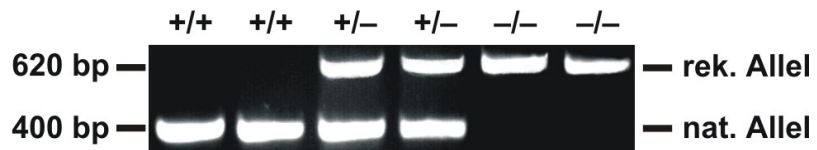
Die Injektion von rekombinanten ES-Zellen in Maus-Blastocysten und deren Transfer in pseudoschwangere Mäuse wurde von MitarbeiterInnen des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin, Göttingen, durchgeführt. Die Mäuse mit dem stärksten Chimärismus (80–100%, ca. 10 männliche Tiere) wurden im hauseigenen Tierstall mit Tieren der Mauslinien C57BL und 129/SvJ verpaart und die Nachkommen im Alter von ca. 3–4 Wochen durch Analyse mittels PCR an DNA aus einer Schwanzbiopsie genotypisiert. Dazu wurden drei verschiedene Primer eingesetzt, zwei aus dem nativen Gen und einer aus der inserierten Neomycin-kassette (s. Abb. 3.18). Die Primerkombination SA F1 / Ex R1 (s. 2.7.5) ergab ein Produkt des nativen Allels von ca. 400 bp. Mit dem reversen Primer neo R1 aus dem Targeting-Vektor und SA F1 entstand ein Produkt von 620 bp, so dass mittels der amplifizierten Banden eine Genotypisierung zur Identifizierung heterozygoter Mäuse erfolgen konnte. Die Abbildung 3.21 zeigt ein Beispiel für eine Genotypisierung von Nachkommen einer männlichen Chimäre und Weibchen des Stammes C57BL.

Konnten unter den Nachkommen keine heterozygoten Tiere gefunden werden, da sich die rekombinanten ES-Zellen nicht an der Keimbahn beteiligt hatten, wurde die Chimäre aus der Zucht entfernt. Heterozygote Mäuse zeigten in keiner der



**Abbildung 3.21: Genotypisierung der F1-Generation durch PCR.** Gezeigt ist eine gelelektrophoretische Auftrennung der *Sall2*-KO-PCR im 1.5%igen Agarosegel zur Genotypisierung der Nachkommen aus der Verpaarung einer Chimäre mit weiblichen Mäusen des Mausstammes C57BL. Das vom nativen Gen mit den Primern SA F1 / Ex R1 amplifizierte Fragment zeigt eine Größe von 400 bp, das mutierte Allel, amplifiziert mit den Primern SA F1 / neo R1, liefert ein 620 bp-Fragment.

beiden Mauslinien (C57BL und 129/SvJ) Auffälligkeiten und wurden zur Generierung homozygoter knock out-Mäuse miteinander verpaart. In Abb. 3.22 ist die Genotypisierung von Tieren aus heterozygoten Verpaarungen dargestellt.



**Abbildung 3.22: Genotypisierung der F2-Generation durch PCR.** Gezeigt ist eine gelelektrophoretische Auftrennung der *Sall2*-KO-PCR im 1.5%igen Agarosegel zur Genotypisierung von F2-Tieren aus Verpaarungen von heterozygoten Mäusen des Mausstammes C57BL. Das vom nativen Gen amplifizierte Fragment zeigt eine Größe von 400 bp, das mutierte Allel liefert ein 620 bp-Fragment.

## 3.7 Analyse *Sall2*-defizienter Mäuse

### 3.7.1 Statistische Analyse der Wurfgrößen und Genotypen

Erste Beobachtungen der Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen zeigten keinen auffälligen Phänotyp in homozygoten F2-Tieren. Um eventuelle Abweichungen von den Mendel-Regeln feststellen zu können, wurde von den beiden Zuchtlinien (C57BL und 129/SvJ) eine Statistik über die Wurfgrößen und den Genotyp der Nachkommen erstellt.

#### 3.7.1.1 Der Hintergrund C57BL

Durch Verpaarungen von 4 transmittierenden männlichen Chimären mit Weibchen des Stammes C57BL wurden in der F1-Generation heterozygote (+/-) und Wildtyp-(+/+) Nachkommen generiert. Dabei betrug die Zahl der heterozygoten Mäuse 30 bei einer Gesamtzahl von 79 in 11 Würfen (durchschnittlichen Anzahl von 7 Nachkommen pro Wurf). Der Anteil homozygoter (-/-) Nachkommen aus Verpaarungen heterozygoter Tiere belief sich bei 12 Würfen mit insgesamt 92 Nachkommen auf 18 Tiere (20%), was nach den Mendelschen Regeln annähernd dem zu erwartenden statistischen Viertel entspricht. Die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen pro Verpaarung betrug 8. Dieses Ergebnis kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass *Sall2*<sup>-/-</sup>-Mäuse keine embryonalen Entwicklungsstörungen aufweisen und nach der Geburt normal lebensfähig sind. Die Mäuse unterschieden sich äußerlich in keiner Weise von ihren *Sall2*<sup>+/-</sup>- und Wildtyp-Geschwistern. Die Nachkommen aus homozygoten Verpaarungen zeigten ebenfalls keine Auffälligkeiten. In Tabelle 3.1 ist die Verteilung der genotypisierten Nachkommen mit C57BL-Hintergrund in den beiden Generationen dargestellt.

	Anzahl Würfe	Anzahl Nachkommen	Mittlere Wurfgröße	Wildtyp (+/+)	Heterozygot (+/-)	Homozygot (-/-)
F1	11	79	7.2	49 (62 %)	30 (38 %)	X
F2	12	92	7.7	25 (27.2 %)	49 (53.3 %)	18 (19.6 %)

**Tabelle 3.1: Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten *Sall2*-Mäusen auf dem C57BL-Hintergrund.**

### 3.7.1.2 Der Hintergrund 129/SvJ

Durch die Verpaarung einer transmittierenden männlichen Chimäre mit Weibchen des Stammes 129/SvJ wurden in der F1-Generation bei 3 Würfen mit einer durchschnittlichen Nachkommenzahl von 6 Tieren 13 heterozygote (+/-) und 5 Wildtyp (+/+) Nachkommen generiert. Bei insgesamt 92 Nachkommen von 19 Würfen aus Verpaarungen heterozygoter Tiere betrug der Anteil homozygoter (-/-) Nachkommen 24 Tiere (26.1 %), was nach den Mendelschen Regeln dem zu erwartenden statistischen Viertel entspricht. Die durchschnittliche Anzahl der Nachkommen pro Verpaarung betrug 4.8 Tiere, was etwas unter dem Durchschnitt von 6 Nachkommen beim Stamm 129/SvJ liegt. Die *SalI2*<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten sich normal und zeigten keine Auffälligkeiten oder Unterschiede zu ihren *SalI2*<sup>+/-</sup>- und Wildtyp-Geschwistern. Die homozygoten *SalI2*<sup>-/-</sup>-Tiere waren fertil und die Nachkommen ebenfalls unauffällig. In Tabelle 3.2 ist die Verteilung der genotypisierten Nachkommen mit 129/SvJ-Hintergrund in den beiden Generationen dargestellt.

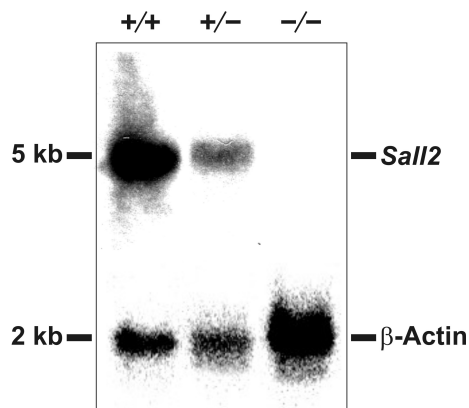
	Anzahl Würfe	Anzahl Nachkommen	Mittlere Wurfgröße	Wildtyp (+/+)	Heterozygot (+/-)	Homozygot (-/-)
F1	3	18	6	5 (27.8 %)	13 (72.2 %)	X
F2	19	92	4.8	27 (29.3 %)	41 (44.6 %)	24 (26.1 %)

**Tabelle 3.2: Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten *SalI2*-Mäusen auf dem 129/SvJ-Hintergrund.**

### 3.7.2 Deletionskontrolle des *SalI2*-Gens durch Northern-Blot-Analysen

Für die Kontrolle der Deletion des *SalI2*-Gens in den Mutanten wurden aus adulten Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen (Hintergrund 129/SvJ) Nieren präpariert und die isolierte RNA mit der 1B2-Sonde hybridisiert.

Die Abbildung 3.23 zeigt, dass wie erwartet in heterozygoten Mäusen die Transkriptmenge verringert ist und homozygote Mäuse keine *SalI2*-Transkripte exprimieren. Die Quantifizierung der eingesetzten RNA-Menge erfolgte durch eine Rehybridisierung mit einer menschlichen  $\beta$ -Actin-Sonde (s. 2.2).



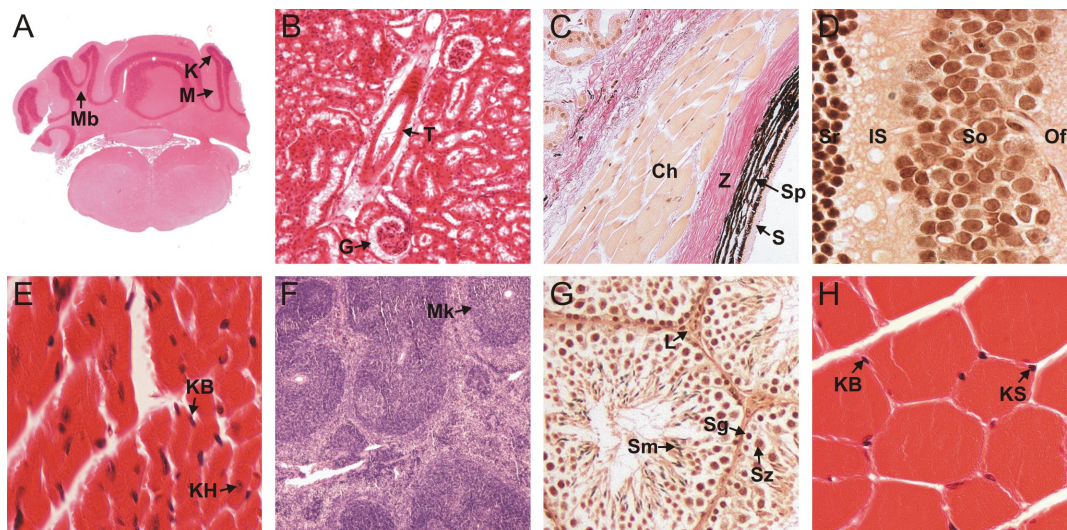
**Abbildung 3.23: Northern-Blot-Analyse *Sall2*-defizienter Mäuse.** Die Abbildung zeigt eine Northern-Blot-Analyse mit je 20  $\mu$ g Gesamt-RNA aus Nierengewebe von Wildtyp-Mäusen sowie von heterozygoten und homozygoten *Sall2*-knock out-Mäusen. Das *Sall2*-Transkript hybridisierte bei ca. 5 kb, die  $\beta$ -Actin-Sonde zur Quantifizierung bei ca. 2 kb.

### 3.7.3 Histologische Analysen an Organen *Sall2*-defizienter Mäuse

Histologische Untersuchungen verschiedener Organe wurden freundlicher Weise von Dr. Schulz-Schaeffer, Abt. Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen, durchgeführt. Mehrere Organe einer adulten *Sall2*-knock out-Maus auf dem Hintergrund 129/SvJ wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit verschiedenen Methoden angefärbt. Besonderes Augenmerk wurde auf die Gewebe gerichtet, die starke *Sall2*-Expression in den whole mount-*in situ*-Hybridisierungen oder in der Northern-Blot-Analyse zeigten. In [Abbildung 3.24](#) ist eine Zusammenstellung von Gewebeaufnahmen dargestellt. Bei den histologischen Untersuchungen ergaben sich keine auffälligen Befunde.

### 3.7.4 Analyse der *Sall1*-Expression in *Sall2*-knock out-Embryonen

Eine mögliche Kompensation der *Sall2*-Defizienz durch das *Sall1*-Gen sollte anhand von Expressionsanalysen für das *Sall1*-Gen der knock out-Mäuse überprüft werden. Erfüllt das *Sall1*-Gen partiell oder vollständig die Aufgabe des in der Maus deletierten *Sall2*-Gens, ist eine verstärkte oder ektopische Expression zu erwarten. Ist dagegen *Sall2* an der Regulation der *Sall1*-Expression beteiligt, ist eine verminderte *Sall1*-Expression zu erwarten. Daher wurden whole mount-



**Abbildung 3.24: Histologische Analysen an einer *Sall2*<sup>-/-</sup>-Maus.** Gezeigt sind Aufnahmen von Schnitten, die von verschiedenen Organen einer *Sall2*-knock out-Maus hergestellt wurden. A, B, D und H wurden mit Hämalaun-Eosin, C, D und G nach der van Gieson-Methode, F mit PAS angefärbt. **A:** Ausschnitt eines Mediosagittalschnitts durch die Kleinhirnrinde; **B:** Ausschnitt eines senkrechten Durchschnitts durch die Niere; **C, D:** Ausschnitte aus einem senkrechten Durchchnitt durch das Auge; **E:** Querschnitt durch die Herzmuskulatur des linken Ventrikels; **F:** Ausschnitt eines senkrechten Durchschnitts durch die Milz; **G:** Ausschnitt eines senkrechten Durchschnitts durch den Testis; **H:** Ausschnitt eines Querschnitts durch die quergestreifte Muskulatur. Ch: Choroidea; G: Glomerulus; Is: innere plexiforme Schicht der Netzhaut; K: Körnerschicht der Kleinhirnrinde; KB: Kern einer Bindegewebszelle; KH: Kern einer Herzmuskelzelle; KS: Kern einer Skelettmuskelzelle; L: Leydig-Zwischenzelle; M: Molekularschicht der Kleinhirnrinde; Mb: Markblätter; Mk: Milzknötchen mit Zentralarterie; Of: Optikusfaserschicht; S: äußere plexiforme Schicht der Netzhaut; Sg: Spermogonie; Sm: Spermium; So: Stratum ganglionare n. optici; Sp: Stratum photosensorium; Sr: Stratum ganglionare retinae; Sz: Spermatozyt I; T: Tubulus der Niere; Z: Zone der Innen- und Außenglieder der Sehzellen.

*in situ*-Hybridisierungen an 9.5 bzw. 10.5 dpc-*Sall2*<sup>-/-</sup>-Embryonen aus *Sall2*<sup>-/-</sup>-Verpaarungen mit einer DIG-markierten antisense-Sonde des CB3 E-Fragments aus *Sall1* (s. Abb. 3.1, S. 57) durchgeführt. Es konnte keine Veränderung in der Expression des *Sall1*-Gens oder der Lokalisierung der Transkripte festgestellt werden. Die Abbildung 3.25.A zeigt einen 9.5 dpc-Embryo, in dem das typische *Sall1*-Expressionsmuster mit Transkripten in der Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze, in einem anterioren Bereich des Mittelhirns, im Neuralrohr, in der Region des dritten und vierten Branchialbogens, im Mesonephros und einem großen Bereich der Schwanzspitze (vgl. auch Abb. 3.5, S. 80) detektiert wurde. Im Embryonalstadium 10.5 dpc konnte wie bei Wildtyp-Embryonen eine beginnende Expression in

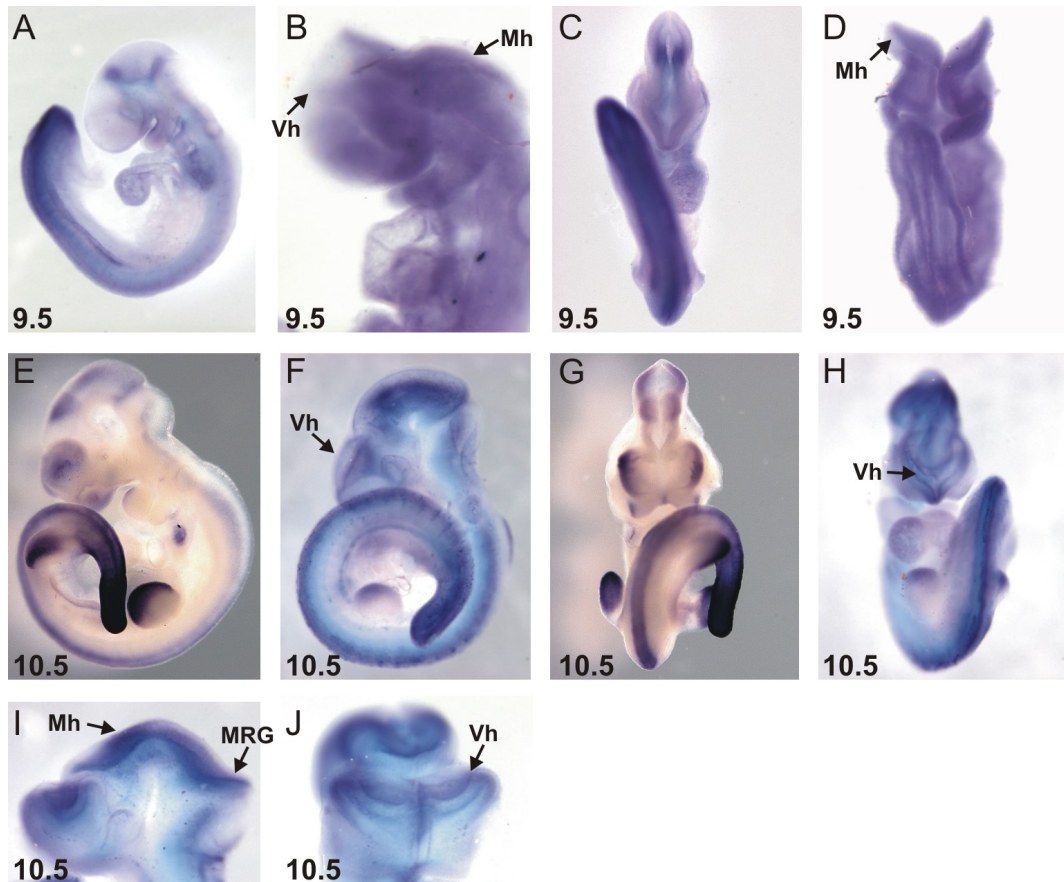


einer posterioren Domäne der vorderen Gliedmaßenknospen beobachtet werden (s. Abb. 3.25.F).

### 3.7.5 Morphologische Analysen an *Sall2*-knock out-Embryonen

Im Verlauf der Präparation von *Sall2*<sup>-/-</sup>-Embryonen aus Verpaarungen homozygoter *Sall2*-Deletionsmutanten für whole mount-*in situ*-Hybridisierungen wurden an mehreren Embryonen verschiedener Altersstadien Fehlbildungen im Kopfbereich festgestellt (s. Abb. 3.25), die bei der Präparation von Wildtyp-Embryonen für whole mount-*in situ*-Hybridisierungen nicht beobachtet wurden.

Aus 7 Verpaarungen konnten 16 Embryonen präpariert werden, womit die durchschnittliche Anzahl von Nachkommen bei 2.8 lag. 9 dieser Embryonen zeigten eine normale und dem jeweiligen Alter entsprechende Morphologie, 7 wiesen dagegen unterschiedlich starke Störungen bei der Entwicklung verschiedener Gehirnbereiche auf. In den Abbildungen 3.25.B und D ist ein 9.5 dpc-Embryo abgebildet, bei dem festgestellt wurde, dass der rostrale Neuroporus nicht, wie bei normalen Embryonen dieses Entwicklungsstadiums (Abb. 3.25.A, C), geschlossen war, sondern bei dem die Vorderhirnwülste noch auseinander standen. Der Kopf ähnelte dem eines in der Entwicklung noch nicht so weit fortgeschrittenen 8.5 dpc-Embryonen. Dieser Defekt konnte bei den *Sall2*<sup>-/-</sup>-Embryonen nur im Bereich des rostralen Neuroporus, nicht aber im Bereich des caudalen Neuroporus oder des Neuralrohrs beobachtet werden. Die Abbildungen 3.25.F und H zeigen einen Embryo, bei dem eine gestörte Vorderhirn-Entwicklung beobachtet wurde. Die lateralen Ventrikel waren nicht so ausgebildet wie in einem normal entwickelten 10.5 dpc-Embryo (s. Abb. 3.25.E, G), da der Bereich zwischen den Ventrikeln unvollständig ausgebildet zu sein scheint und die Vorderhirnwülste weit auseinander klaffen. In den Abbildungen 3.25.I und J sind Aufnahmen eines 10.5 dpc-Embryonen dargestellt, der im Vergleich zu dem Embryo in den Abbildungen 3.25.E und G eine stark reduzierte Mittelhirn-Struktur aufweist, wodurch die Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze (MRG) aus dem Kopf hervorstehen scheint. Auch das Vorderhirn ist in diesem Embryo deformiert, die posteriore Region vor dem Übergang zum Mittelhirn ist stark eingedrückt oder nicht richtig miteinander verwachsen.



**Abbildung 3.25: Morphologische Analyse *Sall2*-defizienter Embryonen.** Gezeigt sind *Sall2*<sup>-/-</sup>-Embryonen der Stadien 9.5 und 10.5 dpc aus verschiedenen Verpaarungen von *Sall2*-defizienter Mäuse ohne (A, C, E und G) und mit Gehirnfehlbildungen (B, D, F, H, I, J). Bis auf I und J sind jeweils die entwicklungsgestörten Embryonen zum Vergleich neben gleichaltrigen Vergleichstieren in lateraler bzw. frontaler Ansicht dargestellt. Die Pfeile zeigen auf die deformierten Gehirnregionen. Der Embryo in B und D wurde zur besseren Visualisierung der Morphologie nach der Hybridisierung mit einer sense-Sonde überfärbt, alle anderen Embryonen wurden mit einer DIG-markierten *Sall1*-Sonde hybridisiert. Mh: Mittelhirn; MRG: Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze; Vh: Vorderhirn.

### 3.8 Herstellung eines Anti-Sall2/SALL2-Antikörpers

Um die Expression des Sall2-Proteins *in situ* und in Western-Blots von Mausgeweben untersuchen zu können, sollte ein monospezifischer Anti-Sall2-Antikörper hergestellt werden. Dies lässt sich durch eine Immunisierung von Kaninchen mit dem gesamten Protein, einem Teil des Proteins oder einer kurzen Peptidsequenz aus dem Protein erreichen. Da die Aminosäuresequenz des murinen Sall2-Proteins



und des humanen SALL2-Proteins sehr homolog ist (86 %, [Kohlhase et al. \(2000\)](#)), sollte versucht werden, einen Antikörper der spezifisch beide Proteine detektiert zu gewinnen. Dazu sollte in der vorliegenden Arbeit ein Fusionsprotein (FP) aus einem Bereich des Proteins hergestellt werden, der eine hohe Homologie zu dem humanen Homolog SALL2 aufweist. Um unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Proteinen zu vermeiden, sollte der Bereich zudem möglichst wenige Homologien zu anderen Proteinen, insbesondere Zinkfingerproteinen, aufweisen. Das FP sollte nachfolgend zur Immunisierung von Kaninchen genutzt werden. Des Weiteren sollte versucht werden, über das hergestellte FP aus einem gegen das humane SALL2-Protein hergestellten Antiserum ([Kohlhase, 2000a](#)) Antikörper gegen humane SALL2- bzw. murine Sall2-Proteine zu isolieren. Dazu wurde das Proteinexpressionskit *Recombinant Protein Expression and Purification Kit* von IBA verwendet (s. [2.10.1](#)).

### 3.8.1 Herstellung von Sall2- und SALL2-Fusionsproteinen

Für die Herstellung des Konstrukts zur Generierung eines murinen Sall2-FPs (MS2) wurde eine PCR mit den Primern MS2FP F2 / MS2FP R1 etabliert (s. [2.10.1.1](#)). Als Template für die PCR, mit der ein Produkt von 495 bp amplifiziert wurde, diente der *Sall2*-Klon 1B6 (s. Abb. [3.17](#)). Der Forward-Primer MS2FP F2 reicht innerhalb der im Anhang dargestellten Sequenz des murinen *Sall2*-Gens (s. Abb. [A.2](#)) von bp 17 394 bis bp 17 414, der reverse Primer MS2FP R1 von bp 17 870 bis bp 17 888. Das amplifizierte Fragment liegt im Bereich der zweiten Doppelzinkfinger (DZF)-Domäne, der ein weiterer Einzelzinkfinger (EZF) folgt (s. Abb. [3.26](#)). Für das humane SALL2-FP (HS2) wurde mit der Primerkombination HS2FP F1 / HS2FP R2 ein Produkt von 651 bp an dem genomischen Phagenklon H6 ([Kohlhase, 1996](#)) amplifiziert. Die Primer liegen innerhalb der humanen Aminosäure (AS)-Sequenz ([Kohlhase et al., 2000](#)) im Bereich der AS 535–542 für HS2FP F1 und AS 746–752 für HS2FP R2. Damit deckt HS2 ebenfalls den Bereich des zweiten DZF und des nachfolgenden EZF ab (s. Abb. [3.26](#)).

Beide PCR-Produkte wurden mit Bsa I restriktionsenzymatisch gespalten und in den gleichfalls mit Bsa I linearisierten Vektor IBA2 ligiert. Mehrere aus der Transformation hervorgegangene Kolonien wurden in Selektionsmedium angezogen und mittels Restriktionsanalyse vorselektiert. Einige positive Plasmidklone wurden mittels Sequenzanalyse auf mögliche Punktmutationen und die Klonierung im korrekten Leseraster überprüft. Von den korrekt amplifizierten und klonierten



**Abbildung 3.26: Fusionsproteine für das murine *Sall2*- und das humane *SALL2*-Gens.** Die Karte zeigt schematisch die Struktur des murinen *Sall2*- bzw. des humanen *SALL2*-Proteins, die aufgrund der großen Homologie durch ein Schema darzustellen sind. Die Zinkfinger sind als senkrechte Balken dargestellt. Das Fusionsprotein FP1 wurde zur Herstellung des bei der Aufnahme dieser Arbeit vorliegenden Antiserums gegen das humane *SALL2*-Protein eingesetzt. Die FPs sind als dicke Striche dargestellt, die Klone, die als Templates dienten, werden durch die dünnen Striche repräsentiert. Das Häkchen gibt den Übergang von Exon 1 zu Exon 2 an.

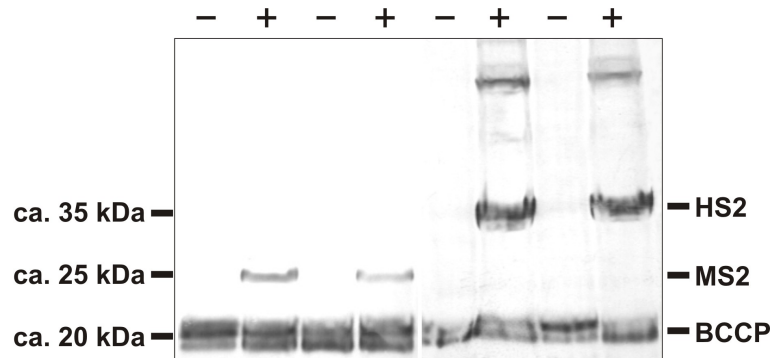
Plasmiden wurden je zwei des *Sall2*- bzw. *SALL2*-Gens für die weiteren Versuche ausgewählt.

### 3.8.2 Gewinnung der *Sall2*- und *SALL2*-Fusionsproteine

Um das MS2- bzw. HS2-FP in *E. coli* nachzuweisen, erfolgte eine Anzucht wie unter 2.10.1.2 beschrieben. Das *tet*-Repressorgen verhindert die Expression des klonierten Gens im Zusatz-freien Medium, durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin wird die Expression des FPs induziert. Das carboxyterminal fusionierte *Strep*-tag II-Peptid ermöglicht die Erkennung durch mit der AP konjugiertem StrepTactin.

Nach der Anzucht der Bakterien und dem Aufschluss der Proteine wurden diese zur Kontrolle auf einem PAGE-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und diese mit StrepTactin umgesetzt (s. 2.10.1.4). Dabei konnten Signale der erwarteten Größe von ca. 25 kDa (MS2) und ca. 35 kDa (HS2) detektiert werden (s. Abb. 3.27). Davon sind etwa 5 kDa auf das *Strep*-tag II-Peptid zurückzuführen. Das HS2-FP lieferte ein stärkeres Signal als das MS2-FP. Die 20 kDa-Bande ist auf das bakterielle, kovalent biotinylierte Biotinyl-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP) zurückzuführen, das ohne Avidin-Behandlung zusätzlich detektiert wird (Schmidt und Skerra, 1993). Unter Anzuchtbedingungen von 30°C, unter denen auch die hier gezeigten Fusionsprotein-exprimierenden Bakterien ver-

mehrt wurden, stellte sich in diesen Experimenten das Bakterienprotein als Doppelbande dar.



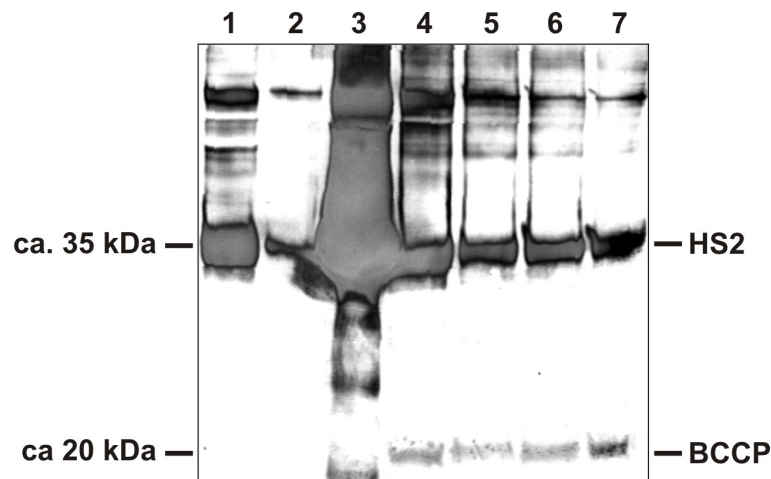
**Abbildung 3.27: Western-Blot-Analyse der Fusionsproteine Sall2 und SALL2.** Gezeigt ist ein mit NBT/BCIP-gefärbter Westernblot der Fusionsproteine MS2 und HS2 nach PAGE und Elektrottransfer. In den ersten vier Spuren wurden Zelllysate von Sall2-transformierten Bakterien, in den nächsten vier Spuren Lysate von SALL2-transformierten Bakterien aufgetrennt, wobei die mit + bezeichneten 3 h mit dem Induktor Anhydrotetracyclin inkubiert wurden und die mit – bezeichneten Parallelansätze ohne Induktion als Kontrolle dienten. HS2: humanes SALL2-Fusionsprotein; MS2: murines Sall2-Fusionsprotein; BCCP: biotinyliertes Bakterienprotein.

### 3.8.3 Gewinnung von Antikörpern gegen das murine Sall2- und das humane SALL2-Protein.

Die FPs konnten nun eingesetzt werden, um aus dem bereits vorhandenen anti-SALL2-Serum Antikörper zu isolieren, die sowohl das murine Sall2- als auch das humane SALL2-Protein binden. Das Serum war durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem SALL2-FP gewonnen worden (Kohlhase, 2000a). Es enthält ein 115 AS großes Fragment des SALL2-Proteins, welches den zweiten Doppelzinkfinger sowie den nachfolgenden Einzelzinkfinger einschließt (s. Abb. 3.26). Da das HS2-FP ein wesentlich stärkeres Signal aufwies als das MS2-FP und die Homologie zwischen den verwendeten murinen und humanen Aminosäuresequenz im überlappenden Bereich bei 97 % liegt (Kohlhase et al., 2000), sollte HS2 für die weiteren Versuche verwendet werden und die so erhaltenen monospezifischen Antikörper auch zur Detektion des murinen Proteins eingesetzt werden.

Die Rohextrakte der geernteten Proteine wurden zunächst über immobilisiertes StrepTactin aufgereinigt (s. 2.10.1.3). Je 20  $\mu$ L der Eluate wurden mittels SDS-PAGE analysiert und eine Fraktion mit einer deutlichen Fusionsproteinbande ge-

wählt (s. Abb. 3.28). Das ausgewählte Eluat wurde eingesetzt, um wie in 2.10.9 beschrieben eine Antikörper-Aufreinigung mittels Western-Blot-Verfahren durchzuführen. Zur Überprüfung der gewonnenen Antikörper wurde eine Immunodetektion gegen das HS2-FP mit verschiedenen Verdünnungen des Antiserums und des Antikörpers durchgeführt. Wie in Abbildung 3.29 gezeigt, konnte mit dieser Methode kein wirkungsvoller monospezifischer Antikörper aufgereinigt werden.

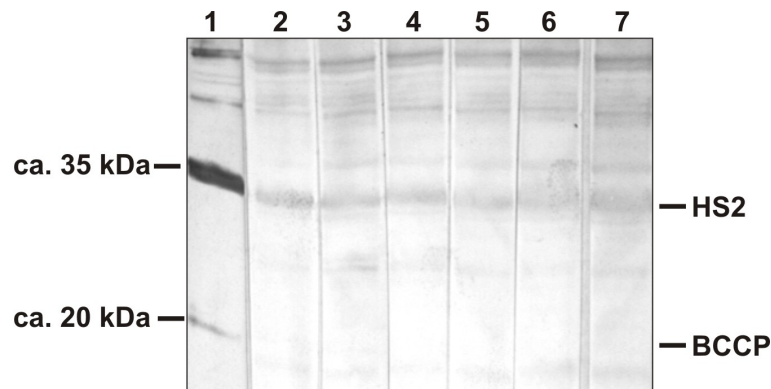


**Abbildung 3.28: Aufreinigung des Fusionsproteins HS2 über immobilisiertes StrepTactin.** Die Western-Blot-Analyse zeigt die Anreicherung des Fusionsproteins HS2 in den Elutionsfraktionen nach der StrepTactin-Aufreinigung über die Säule. In Spur 1 wurde das Zelllysate, in den Spuren 2–7 je 20  $\mu$ L der Elutionsfraktionen aufgetragen. Der Filter wurde mit AP-konjugiertem StrepTactin umgesetzt und mit NBT/BCIP gefärbt. HS2: humanes SALL2-Fusionsprotein; BCCP: biotinyliertes Bakterienprotein.

### 3.8.4 Herstellung eines Antiserums gegen Sall2

Die Versuche zur Herstellung von Sall2- bzw. SALL2-Fusionsproteinen ergaben eine deutlich stärkere Expression des humanen HS2-FPs gegenüber dem murinen MS2-FP (s. Abb. 3.27). Die geringe Menge des erhaltenen MS2-FPs ließ eine erfolgreiche Immunisierung bezweifeln. Da die Homologie der verwendeten murinen und humanen Aminosäuresequenz für HS2 bzw. MS2 im überlappenden Bereich bei 97 % liegt (Kohlhase et al., 2000), wurde die Immunisierung von zwei Kaninchen nur mit dem HS2-FP durchgeführt. Dabei wurde angenommen, dass das erhaltene Antiserum aufgrund der hohen Homologie sowohl mit dem humanen SALL2- als auch mit dem murinen Sall2-Protein reagieren würde. Die Analyse

des Antiserums konnte nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.



**Abbildung 3.29: Test des Antiserums und des Antikörpers gegen das Fusionsprotein HS2.** Gezeigt ist ein mit NBT/BCIP-gefärbter Westernblot des Fusionsprotein HS2 nach PAGE und Elektrotransfer. Der mit 1 bezeichnete Membranstreifen wurde zur Kontrolle mit AP-konjugiertem Streptactin umgesetzt. Für die mit 2, 3 und 4 bezeichneten Filterstreifen diente das Antiserum als Erstantikörper in den Verdünnungen (von rechts nach links) 1:100, 1:500 und 1:1000. Der Zweitantikörper war mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Die drei letzten Spuren auf dem Filter waren mit dem aufgereinigten Antikörper in den Verdünnungen 1:100 (5), 1: 500 (6) und 1:1000 (7) inkubiert worden. HS2: humanes SALL2-Fusionsprotein; BCCP: biotinyliertes Bakterienprotein.

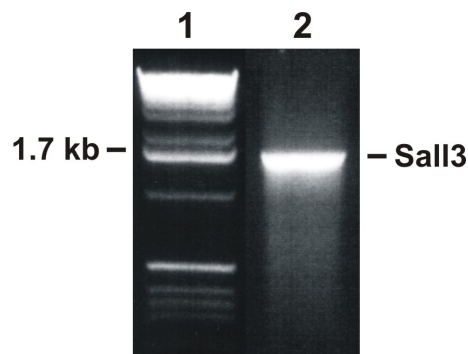
### 3.9 Untersuchungen zur Expression des *Sall3*-Gens der Maus

Aus der Publikation von [Ott et al. \(1996\)](#) ist bekannt, dass das murine *Sall3*-Gen (vormals *Msal*) im embryonalen Gehirn, im Neuralrohr und in den aus dem Mesoderm entstehenden Strukturen exprimiert wird. Um die Expression von *Sall1* und *Sall3* miteinander vergleichen bzw. gegeneinander abgrenzen zu können, sollten whole mount-*in situ*-Hybridisierungen mit einer DIG-markierten *Sall3*-Sonde an 7.5–12.5 dpc Embryonen durchgeführt werden.

#### 3.9.1 Generierung einer *Sall3*-Sonde

[Ott et al. \(1996\)](#) haben die Nukleotidsequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des *Sall3*-Gens beschrieben. Mit Hilfe dieser Daten wurden die Sequenzen für zwei Primer, MS3 F1 und MS3 R2 (s. [2.7.5](#)), abgeleitet, mit deren

Hilfe ein 1.7 kb großes *Sall3*-Fragment an genomischer DNA amplifiziert werden konnte (2.9.7.2; s. Abb. 3.30). Dieses als Sonde eingesetzte Fragment (*Sall3*) beinhaltet die für den C<sub>2</sub>HC-Zinkfinger und die ersten Doppelzinkfingerkomäne kodierende Sequenz am 5'-Ende von Exon 2 des *Sall3*-Gens. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-T kloniert und zur Herstellung einer DIG-markierten antisense-Sonde verwendet.

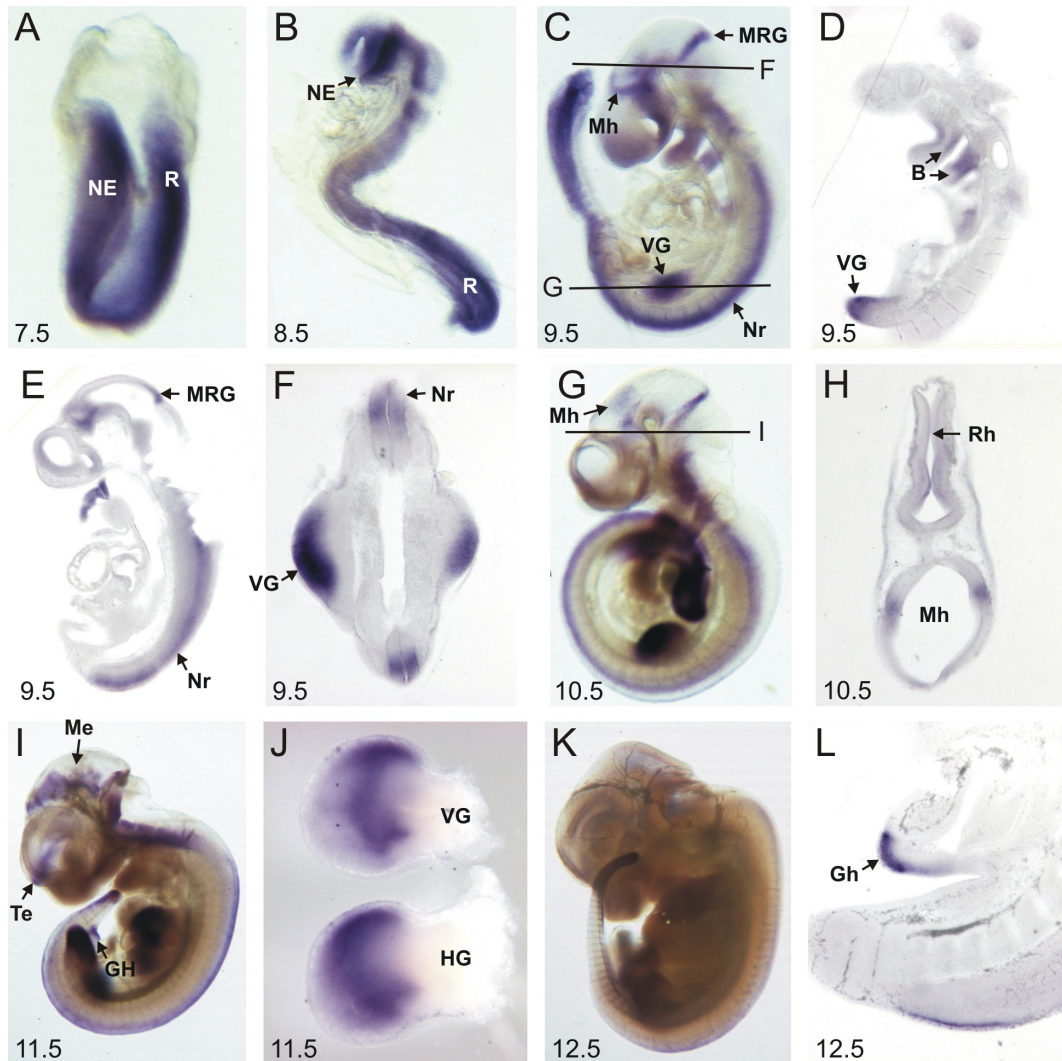


**Abbildung 3.30: Amplifikation der *Sall3*-Sonde.** Eine PCR mit den Primern MS3 F1 und MS3 R2 wurde an muriner genomischer DNA durchgeführt. Es konnte ein 1.7 kb-Fragment (*Sall3*) amplifiziert werden, das für whole mount-*in situ*-Hybridisierungen eingesetzt werden sollte.

### 3.9.2 Expression des *Sall3*-Gens in neuralen embryonalen Geweben

Abbildung 3.31.A zeigt eine Expression von *Sall3* bereits in den frühesten untersuchten Stadien (7.5 und 8.5 dpc) im gesamten neuralen Ektoderm (s. Abb. 3.31.B). An 9.5 dpc zeigen das Neuralrohr im dorsalen Bereich und die Mittel-Rautenhirn-Grenze ein starkes Signal (s. Abb. 3.31.C,E,F). Weitere Expressionsdomänen im Kopf sind ein anteriorer Bereich des Mittelhirns nahe der Grenze zum Vorderhirn und der ventrale Bereich dieser beiden Vesikel. Diese Expression kann in gleicher Form auch an 10.5 dpc detektiert werden (s. Abb. 3.31.G,H). Die Anfärbung des Neuralrohrs und der Mittel-Rautenhirn-Grenze lässt ab Tag 11.5 pc nach, die des anterioren Mittelhirn-Bereichs ab 12.5 dpc. Der 11.5 dpc-Embryo weist eine zusätzliche *Sall3*-Expressionsdomäne im medianen Telencephalon auf (s. Abb. 3.31.I).





**Abbildung 3.31: Expression des *Sal/3*-Gens während der Embryonalentwicklung der Maus.**

A, B, C, G, I und K zeigen whole mount-*in situ*-Hybridisierungen, in D, E, F, H und L sind Vibratom-Schnitte von whole mount-*in situ*-gefärbten Embryonen abgebildet. Von den Gliedmaßenknospen in J, die von einem whole mount-gefärbten Embryo abgetrennt wurden, ist die vordere Gliedmaßenknospe oben abgebildet und die hintere Gliedmaßenknospe unten gezeigt. Die Gliedmaßen sind orientiert mit der dorsalen Seite zum Betrachter und der anterioren Seite nach oben. Die jeweiligen Altersstadien sind angegeben. B: dritter und vierter Branchialbogen; Gh: Gentialhöcker; HG: hintere Gliedmaßenknospe; Me: Mesencephalon; Mh: Mittelhirn; MRH: Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze; NE: neurales Ektoderm; Nr: Neuralrohr; R: Rumpfregeion; Rh: Rautenhirn; Te: Telencephalon; VG: vordere Gliedmaßenknospe.

### 3.9.3 Expression des *Sall3*-Gens in anderen embryonalen Geweben

Von 7.5 dpc bis mindestens 10.5 dpc der Embryonalentwicklung wird *Sall3* im posterioren Bereich und neu formierten Mesoderm der Embryonen exprimiert (s. Abb. 3.31.A,B,C,G). In 9.5 dpc-Embryonen sind Transkripte im Bereich des ersten und zweiten Branchialbogens zu finden (s. Abb. 3.31.C,D). Eine Expression in den Gliedmaßenknospen findet sich von 9.5 dpc bis mindestens 11.5 dpc, wobei die Transkripte zunächst posterior lokalisiert sind (s. Abb. 3.31.C,D,F,G) und nachfolgend in einer breiten mittleren Domäne der sich entwickelnden Gliedmaßen zu finden sind (s. Abb. 3.31.I,J). Der Bereich grenzt anterior direkt an die ERL. An 11.5 und 12.5 dpc-Embryonen sind Signale im distalen Epithel des Genitalhöckers festzustellen.

## 3.10 Untersuchungen zur Expression muriner *spalt*-Gene in *sonic hedgehog*-Mutanten

Homozygote *sonic hedgehog* (*shh*)-defiziente Embryonen von 9.5–11.5 dpc wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. S. Mundlos, Berlin, zur Verfügung gestellt. Durch whole mount-*in situ*-Hybridisierungen der Mutanten, die durch gezielte Genunterbrechung mittels homologer Rekombination *shh*-defizient sind (Chiang et al., 1996), sollte überprüft werden, ob die murinen *spalt*-Gene *Sall1*, *Sall2* und *Sall3* downstream-targets von *shh* sind. Dazu wurden die Deletionsmutanten mit DIG-markierten antisense-Sonden für die jeweiligen Gene hybridisiert und die Signale mit dem Wildtyp-Hybridisierungsmuster verglichen. *shh*-Deletionsmutanten sind embryonal letal, zeigen einen stark gedrungenen Rumpf, einen extrem verlängerten Vorderhirnbereich, eine reduzierte Mittelhirnentwicklung und kaum proximodistales Wachstum der Gliedmaßenknospen (Chiang et al., 1996). In Abb. 3.32 sind jeweils die *shh*-defizienten Embryonen und Wildtyp-Embryonen des desselben Embryonalstadiums zum Vergleich nebeneinander gestellt.

### 3.10.1 *Sall1*-Expression in *shh*-defizienten Embryonen

Drei verschiedene Altersstadien der *shh*-Deletionsmutanten wurden mit einer DIG-markierten *Sall1*-Sonde hybridisiert. Zunächst soll die Expression in den sich entwickelnden Neuronalgeweben verglichen werden. Die Expression im anterioren

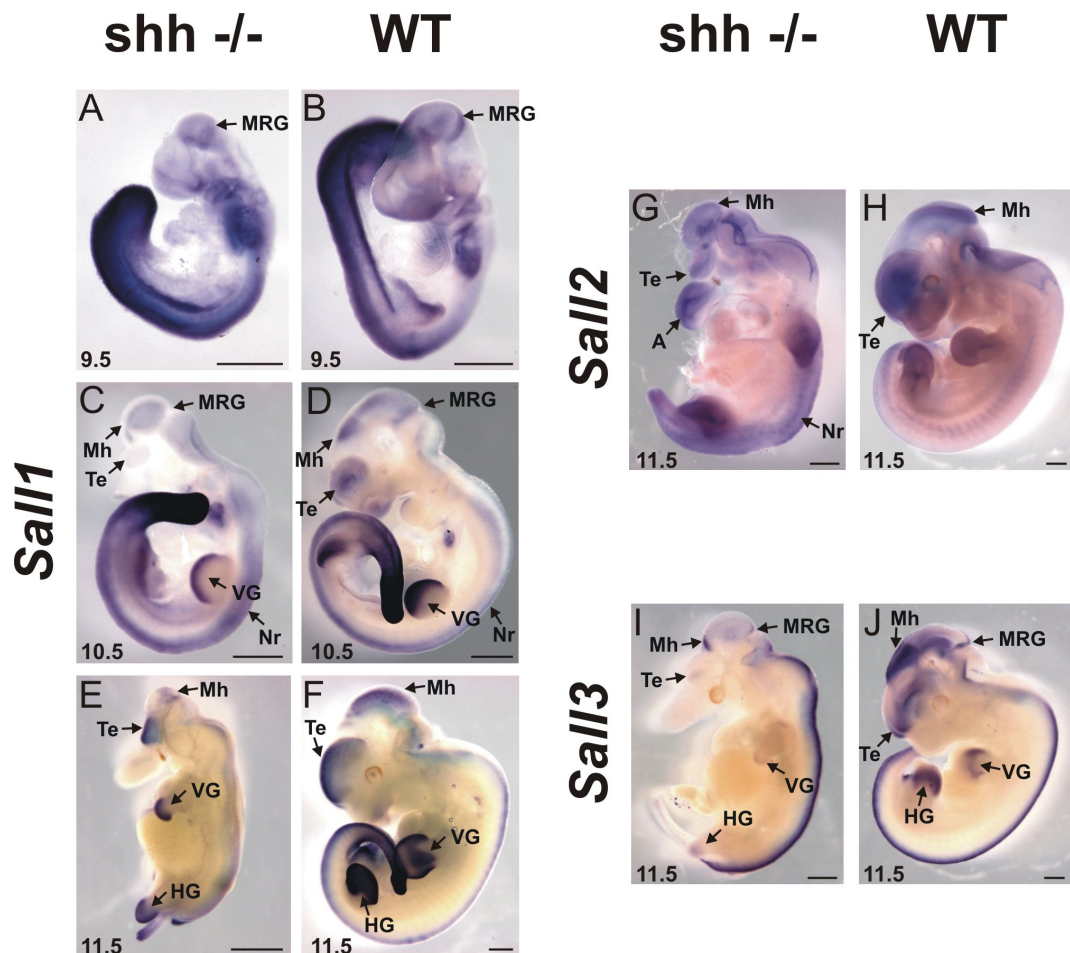


Bereich des Mittelhirns stellt sich in den *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen wesentlich schwächer und diffuser dar als in den Wildtyp (WT)-Embryonen, die an 9.5 und 10.5 dpc eine distinkte Domäne im anterioren Mittelhirnbereich aufweisen (s. Abb. 3.32.A–D). In den 9.5 dpc-*shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen kann im Vergleich mit den WT-Embryonen ein schwächeres Signal in der Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze (MRG) beobachtet werden, und an 10.5 dpc sind keine *Sall1*-Transkripte in der MRG mehr festzustellen. In den Vergleichsembryonen wird im Telencephalon ab 10.5 dpc eine Expression detektiert, in den *shh*-Deletionsmutanten können Transkripte im Telencephalon erst ab 11.5 dpc beobachtet werden (s. Abb. 3.32.C–F). Im Neuralrohr scheint die Expression der im WT-Embryo sehr ähnlich zu sein, das Signal stellt sich jedoch etwas diffuser dar. Die Expression in den olfaktorischen Plakoden bzw. Bulbi lässt sich schwer vergleichen, da die Kopfstrukturen insbesondere durch die Zyklopie und den verlängerten Vorderhirnbereich stark verändert sind. Die Expression in den vorderen und hinteren Gliedmaßenknospen zeigt den gleichen zeitlichen Verlauf wie die in den WT-Embryonen, die Transkripte in den *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen können jedoch nur im distalen Bereich der Gliedmaßenknospen gefunden werden (s. Abb. 3.32.C,E). Im Gegensatz zu den Vergleichsembryonen ist keine verbreiterte posteriore Expressionsdomäne zu sehen. In den übrigen *Sall1*-exprimierenden Strukturen, wie die Branchialbögen, dem Mesonephros und der Schwanzspitze, lässt in allen untersuchten Stadien der Embryonalentwicklung ein identische Expressionsmuster von Wildtyp- und *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen feststellen.

In den *shh*-Deletionsmutanten kann ein den Wildtyp-Embryonen ähnliches *Sall2*-Expressionsmuster detektiert werden (s. Abb. 3.32.G,H). Transkripte wurden in allen Gehirnbereichen festgestellt, wobei die Expression im Mittelhirn und Telencephalon jedoch etwas geringer erscheint als im Vergleichsembryo. Zudem kann im anterioren Bereich des Telencephalons, der charakteristisch ist für *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen, eine Expression beobachtet werden, für die keine entsprechende Expressionsdomäne im WT-Embryo vorhanden ist. In der Deletionsmutante ist eine großflächige, diffuse Expression von *Sall2* im Bereich des Neuralrohrs zu sehen, die keine Entsprechung im Vergleichsembryo hat. Sowohl die *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen als auch die Vergleichsembryonen zeigen eine schwache Expression in den Gliedmaßenknospen.

In den *shh*-defizienten Embryonen, die mit der *Sall3*-Sonde hybridisierten wurden, zeigen sich Abweichungen im Kopfbereich von dem im WT-Embryo festgestellten Hybridisierungsmuster (s. Abb. 3.32.I,J). Die Expressionsdomäne im Telencephalon scheint im Vergleich zu dem Wildtyp-Embryo stark verkleinert und

wesentlich schwächer zu sein. Dies trifft auch für die anteriore Expressionsdomäne im Mittelhirn zu. In der MRG ist kein *Sall3*-Transkript zu finden. Im Neuralrohr kann ein zur Expression im Vergleichsembryo sehr ähnliches Expressionsmuster festgestellt werden. Das Signal in den Gliedmaßenknospen des *shh*<sup>-/-</sup>-Embryo ist sehr schwach und eher distal lokalisiert, somit unterscheidet es sich sehr von dem Signal im Vergleichsembryo, in dem eine breite Domäne im medianen Bereich der Gliedmaßenknospen vorhanden ist.



**Abbildung 3.32: Expression verschiedener *spalt*-Gene in *dsh*-Deletionsmutanten.** Die Abbildung zeigt whole mount-*in situ*-Hybridisierungen verschiedener Embryonalstadien von *shh*-defizienten Mäusen. Die jeweiligen Altersstadien sind angegeben. In der ersten und dritten Reihe (A,C,E,G,I) sind die *dsh*-Mutanten abgebildet, in der zweiten und vierten Reihe die Vergleichs-Embryonen (B,D,F,H,J). Die schwarzen Balken entsprechen 0.5 mm. A: Anteriore Domäne im Telencephalon; HG: hintere Gliedmaßenknospe; Mh: Mittelhirn; MRG: Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze; Nr: Neuralrohr; Te: Telencephalon; VG: vordere Gliedmaßenknospe.

## 4 Diskussion

In den letzten Jahren wurden insgesamt zehn *spalt* (*sal*)-homologe Gene aus Vertebratenspezies isoliert und charakterisiert (Farrell und Munsterberg, 2000; Farrell et al., 2001; Hollemann et al., 1996; Köster et al., 1997; Kohlhase et al., 1996, 1999a, 2000; Onuma et al., 1999; Ott et al., 1996). Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Charakterisierung eines dritten *sal*-homologen Gens der Maus, die Herstellung von zwei knock out-Mauslinien und Studien zur Expression der drei nunmehr bekannten murinen *sal*-Gene *Sall1*, *Sall2* und *Sall3*.

### 4.1 Das Gen *Sall1*

#### 4.1.1 Zur Struktur des *Sall1*-Gens

Aus zwei durch mittelstringente Hybridisierung mit einer humanen *SALL1*-Sonde isolierten Cosmidklonen wurde eine genomische Sequenz von 16 410 bp ermittelt (s. Abb. A.1). Die genomische Größe dieses Gens ohne regulatorische Regionen beträgt ca. 15.2 kb. Der offene Leserahmen umfasst 3 975 bp und kodiert für ein putatives Protein von 1 325 Aminosäuren. Die kodierende Sequenz wird von zwei Introns unterbrochen, wobei Intron 1 73 bp nach dem Startkodon beginnt und eine Länge von 9 079 bp umfasst. Das Intron 2 beginnt 3 464 bp nach der splice-Akzeptorstelle von Intron 2 und umfasst 1 129 bp. Die Exon/Intron-Übergänge entsprechen den Konsensussequenzen eukaryotischer Gene (Breathnach und Chambon, 1981). Bei der Suche nach dem 3'-Ende des Transkripts (s. 3.1.3) wurden zwei Polyadenylierungssignale (Poly-AS) gefunden, von denen eines die Konsensus-Sequenz AATAAA (Lewin, 1997), das zweite die abgewandelte Sequenz AATACA (Burfeind und Hoyer-Fender, 1991) zeigt. Durch die Identifizierung zweier entsprechender EST-Klone und Nachweis der jeweiligen Transkripte mittels Northern-Blot-Analyse (s. 3.1.3) kann gefolgert werden, dass beide Poly-

AS genutzt werden.

Mittels FISH wurde das isolierte Gen auf Chromosom 8D der Maus lokalisiert. Bei dieser Region handelt es sich um einen zum humanen *SALL1*-Lokus auf Chromosom 16q12 (Kohlhase et al., 1996) synthänen Bereich. Aufgrund der hohen Homologie des isolierten Gens, der chromosomalen Lokalisation sowie der im folgenden Kapitel erläuterten Strukturdaten des abgeleiteten Proteins wurde angenommen, dass das isolierte Gen das gesuchte *SALL1*-homologe Mausgen darstellt, welches im Folgenden *Sall1* genannt wurde.

#### 4.1.2 Zur Struktur des Sall1-Proteins

Das Sall1-Protein entspricht in seiner Struktur dem eines *sal*-ähnlichen Vertebratengens. Im offenen Leserahmen finden sich mehrere für Zinkfinger kodierende Regionen. Im 5'-Bereich von Exon 2 konnte eine für einen C<sub>2</sub>HC-Einzelzinkfinger (EZF) kodierende Sequenz identifiziert werden, weiter 3'-wärts finden sich in diesem Exon vier für C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Doppelzinkfinger (DFZ) kodierende Bereiche, wobei sich an den zweiten ein weiterer EZF anschließt und der vierte DZF von Intron 2 unterbrochen wird. Der Vergleich mit dem humanen *SALL1*-Gen ergab auf der Ebene der Aminosäuresequenz eine Homologie von 90 % (s. Abb. 4.1).

Bei genauerer Betrachtung der strukturellen Eigenschaften des Sall1-Proteins im Vergleich zu *SALL1* zeigt sich eine partielle Konservierung von mit bestimmten Aminosäuren angereicherten Regionen (s. 3.1.2). Nur teilweise konserviert ist eine Prolin-reiche Region im 5'-Bereich der AS-Sequenz (s. Tab. 4.1), sie enthält in der Maus zwei dieser Aminosäuren weniger als die entsprechende Region im Menschen. Prolin-reiche Regionen können als Aktivatoren oder als Repressordomänen wirken, abhängig davon, ob sie Threoninreste oder Histidine enthalten (Han und Manley, 1993). Demnach könnte diese Domäne eine Aktivatorfunktion übernehmen. Glutamin- und Serin-reiche Regionen können als Transkriptions-Aktivatoren fungieren (Courey und Tjian, 1988; Gashler et al., 1993). Im *SALL1*-Protein befindet sich eine Serin-reiche Region (Kohlhase, 1996), die nicht zwischen Maus und Mensch konserviert ist (s. Tab. 4.1). Ist diese Domäne im humanen Protein funktionell, wäre anzunehmen, dass die putativen Transkriptionsfaktoren Sall1 und *SALL1* unterschiedliche Effekte auf ihre Zielgene ausüben können. Eine zweite Serin-reiche Region in *SALL1* ist dagegen auch im murinen Protein vorhanden (s. Tab. 4.1), so dass ein regulativer Einfluss auf die Transkription der Zielgene durch diese Region vermutet werden kann. Die Glutamin-reiche Region

1	MSRRKQAKPQ	HFQSDPEVAS	LPRRDGDTEK	GQPSRPTKSK	DAHVCGRCCA	<u>EFFELSDLLL</u>	60
1	MSRRKQAKPQ	HFQSDPEVAS	LPRRDGDTEK	GQPSRPTKSK	DAHVCGRCCA	<u>EFFELSDLLL</u>	60
61	<u>HKKSCTKNQL</u>	VLIVNESPAS	PAKTFFPGPS	LNDPDDQMKD	AANKADQEDC	SDLSEPKGLD	120
61	<u>HKKNCTKNQL</u>	VLIVNENPGS	PPETFSPSP	PDNPDEQMND	TVNKTDQVDC	SDLSEHNGLD	120
121	REESMEVEVP	VATTTTGTG	GSGGSGGSTL	SGVTNITTPS	CHSGCSSGTS	AITTSPLQLG	180
121	REESMEVEAP	VANKSGSGTS	SGSHSSTAPS	SSSSSSSSSG	GGSSSSTGTS	AITTSPLQLG	180
181	DLTTLGNFVS	INSNVNIENL	QSTKVAVAQF	SQEARCGGAS	GGKLLISTLM	EQLLALQQQQ	240
181	DLTTLGNFVS	INSNVNIENL	QSTKVAVAQF	SQEARCGGAS	GGKLAVPALM	EQLLALQQQQ	240
241	IHQQLIEQI	RHQILLASQ	SADLPAAPSI	PSQGLRTSA	NPLTTLSSHL	SQQLAVAAGL	300
241	IHQQLIEQI	RHQILLASQ	NADLPTSSS	PSQGLRTSA	NPLSTLSSHL	SQQLAAAAGL	299
301	AQSLASQSAN	ISGVKQLPHV	QLPQSSSGTS	IVPPSGGTSP	NMSIVTAAVP	TPSSEKVASN	360
300	AQSLASQSAS	ISGVKQLPPI	QLPQSSSGNT	IIPNSNGSSP	NMNILAAAVT	TPSSEKVAAS	359
361	AGASHVSSPA	VSASSPAPA	ISSLLSPESN	PLLPOPTPAN	AVFPTPLPNI	ATTAEDLNSL	420
360	AGASHVSNPA	VSSSSPAPA	ISSLLSPASN	PLLPOQASAN	SVFSPPLPNI	GTTAEDLNSL	419
421	SALAQQRKSK	PPNVTAFAEK	STSDEAFFKH	<u>KCRFCAKVFG</u>	<u>SDSALOIHRL</u>	<u>SHTGERPFKC</u>	480
420	SALAQQRKSK	PPNVTAFAEK	STSDEAFFKH	<u>KCRFCAKVFG</u>	<u>SDSALOIHRL</u>	<u>SHTGERPFKC</u>	479
481	<u>NICGNRFSTK</u>	<u>GNLKVHFQRH</u>	KEYPHIQMN	PYPVPEHLDN	VPTSTGIPYG	MSIPSEKPV	540
480	<u>NICGNRFSTK</u>	<u>GNLKVHFQRH</u>	KEYPHIQMN	PYPVPEHLDN	IPTSTGIPYG	MSIPPEKPV	539
541	SWLDTKPVLP	TLTTSVGLPL	PPTLPSLTPF	IKTEEPAPIP	ISHSAASPQG	SVKSDSGAPD	600
540	SWLDTKPVLP	TLTTSVGLPL	PPSLPSLIPF	IKTEEPAPIP	ISHSATSPPG	SVKSDSGGPE	599
601	LATRNPSPGP	EEVEGSAVPP	FGGKGEESNM	ASSAVPTAGN	STLNSPVDAG	GGG_TTFT	658
600	SATRNLGGLP	EEAEGSTLPP	SGGKSEESGM	VTNSVPTASS	SVLSSPAADC	GPAGSATTFT	659
659	NPLLPLMSEQ	FKAKFPFGGL	LDSAQASETS	KLQQLVENID	KKATDPNECI	<u>ICHRVLSCOS</u>	718
660	NPLLPLMSEQ	FKAKFPFGGL	LDSAQASETS	KLQQLVENID	KKATDPNECI	<u>ICHRVLSCOS</u>	719
719	<u>ALKMHYRTH</u>	<u>GERPFKCKIC</u>	<u>GRAFTTKGNL</u>	<u>KTHYSVHRAM</u>	<u>PPLRVQHSCP</u>	<u>ICOKKFTNAV</u>	778
720	<u>ALKMHYRTH</u>	<u>GERPFKCKIC</u>	<u>GRAFTTKGNL</u>	<u>KTHYSVHRAM</u>	<u>PPLRVQHSCP</u>	<u>ICOKKFTNAV</u>	779
779	<u>VLQOHIRMHM</u>	GGQIPNTPVP	DNYPESMESD	TGSFDEKNFD	DLDNFSDENM	EECPEGSIPD	838
780	<u>VLQOHIRMHM</u>	GGQIPNTPVP	DSYSESMESD	TGSFDEKNFD	DLDNFSDENM	EDCPEGSIPD	839
839	TPKSADASQD	SLSSSPLPLE	MSSIAALENQ	MKMINAGLAE	QLQASLKSVE	NGSMEGDVL	898
840	TPKSADASQD	SLSSSPLPLE	MSSIAALENQ	MKMINAGLAE	QLQASLKSVE	NGSIEGDVL	899
899	NDSSSVGGDM	ESQSAGSPAI	SESTSSMQAL	SPSNSTQEFH	KSPGMEEKPQ	RVGPGEFANG	958
900	NDSSSVGGDM	ESQSAGSPAI	SESTSSMQAL	SPSNSTQEFH	KSPSIEEKPQ	RAVPSEFANG	959
959	LSPTPVNGGA	LDLTSSHAEK	IIKEDSLGIL	FPPFRDRGKFK	<u>NTACDICGKT</u>	<u>FACOSALDIH</u>	1018
960	LSPTPVNGGA	LDLTSSHAEK	IIKEDSLGIL	FPPFRDRGKFK	<u>NTACDICGKT</u>	<u>FACOSALDIH</u>	1019
1019	<u>YRSHTKERPF</u>	<u>ICTVCNRGFS</u>	<u>TKGNLQOHL</u>	<u>THQMRDLPSQ</u>	LFEPSSNLGP	NQNSAVIPAN	1078
1020	<u>YRSHTKERPF</u>	<u>ICTVCNRGFS</u>	<u>TKGNLQOHL</u>	<u>THQMRDLPSQ</u>	LFEPSSNLGP	NQNSAVIPAN	1079
1079	SLSSLIKTEV	NGFVHVSPQD	SKDAPTSHVP	QGPLSSSATS	PVLLPALPRR	TPKQHYCNTC	1138
1080	SLSSLIKTEV	NGFVHVSPQD	SKDPTSHVP	SGPLSSSATS	PVLLPALPRR	TPKQHYCNTC	1139





Zielgen selbst abhängig. In weiteren Versuchen dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das humane SALL1-Protein an einem eukaryotischen Promotor eine reprimierende Wirkung entfaltet (Rieger, 2001).

### 4.1.3 Expression des *Sall1*-Gens

#### 4.1.3.1 Expression des *Sall1*-Gens in adulten Geweben der Maus

Die Expression des *Sall1*-Gens wurde zunächst mittels Northern-Blot-Analyse mit RNA aus adulten Geweben der Maus (s. 3.2.1) untersucht. Dabei zeigte sich eine Expression in abnehmender Stärke in Gehirn, Niere, Leber, Herz und Testis. Dies steht größtenteils im Einklang mit den für das humane *SALL1*-Gen festgestellten Expressionsdomänen (Kohlhase et al., 1996). Für das humane Gen wurde die stärkste Expression im Nierengewebe, die zweitstärkste für das Gehirn beschrieben. Es konnte keine Expression im Herzgewebe gefunden werden. Die Untersuchungen bezüglich der Expression beim Menschen wurden an kommerziell erwerblichen Northern-Blots durchgeführt, für die Poly-A<sup>+</sup>-RNA verwendet wird und eine automatisierte Auftragung gleicher RNA-Mengen erfolgt. Die Rehybridisierung des in dieser Arbeit verwendeten Northern-Blots mit muriner Gesamt-RNA weist auf unterschiedlich hohe eingesetzte RNA-Mengen hin, wobei die Konzentration der RNA aus Herzgewebe und Testis im Vergleich zu den anderen Geweben erhöht ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die *SALL1*-Transkriptmenge der Herzgewebe-RNA im Northern-Blot mit humaner Poly-A<sup>+</sup>-RNA unterhalb der Detektionsgröße lag. Möglich ist auch, dass sich die Expression der Gene durch Veränderungen in den Regulationsmechanismen leicht verschoben hat.

Die weitere Analyse der *Sall1*-Expression erfolgte mit *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Embryonen (whole mounts) und an Paraffinschnitten von Geweben und Embryonen.

#### 4.1.3.2 Expression des *Sall1*-Gens in embryonalen Neuralgeweben

Es zeigte sich in allen untersuchten Stadien der sich entwickelnden Mausembryonen eine ausgeprägte Expression im Zentralen Nervensystem (ZNS, s. 3.2.2). Die Entwicklung des Nervensystems beginnt mit der Formierung des Neuralrohrs aus dem Ektoderm. Dieser Prozess kann in vier Stadien unterteilt werden, die zeitlich und räumlich überlappen. Zunächst wird die Neuralplatte formiert, nachfolgend

wird sie geformt. Im dritten Stadium erfolgt die Formierung der Neuralfurche durch das Hochwölben der Neuralplatte, abschließend fusionieren die seitlichen Ränder der Neuralfurche und bilden das Neuralrohr (Schoenwolf, 1991). Die Epidermis und das Neuralrohr sind durch die Neuralleiste verbunden (Gilbert, 1997).

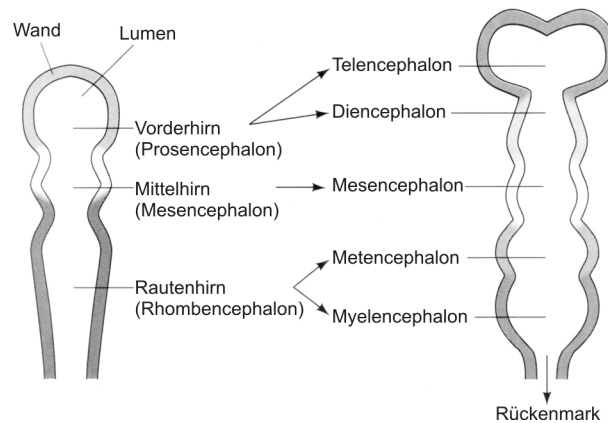
Bereits im Stadium der Neuralplattenformierung lässt sich eine *Sall1*-Expression im gesamten neuralen Ektoderm feststellen. An 8.5 dpc finden sich *Sall1*-Transkripte in der Neuralfurche des noch offenen rostralen Neuroporus, so dass eine Bedeutung von *Sall1* in der dorso-ventralen Organisation möglich scheint. Dafür spricht auch, dass in 9.5 dpc-Embryonen *Sall1*-Transkripte nur im dorsalen Bereich des Neuralrohrs zu finden sind. An Tag 12.5 der Embryonalentwicklung wird *Sall1* sowohl in dorsalen als auch in ventralen Bereichen des Neuralrohrs exprimiert. Die Transkripte sind dabei auf die ventrikuläre Zone begrenzt. In der ventrikulären Zone reifen die neuronalen Vorläuferzellen heran. Mit ihrer letzten Teilung migriert ein Teil der Zellen in die subventrikuläre Zone, wo sie letzte Differenzierungsteilungen durchlaufen, um schließlich zu Neuronen in lateralen Regionen heranzureifen (Scotting und Rex, 1996). Die Entwicklung der Neuronen hängt von der präzisen Positionierung der Vorläufer innerhalb des ZNS ab und involviert lokale Umgebungsfaktoren (Scotting und Rex, 1996). Folglich könnte das *Sall1*-Gen an der neuronalen Differenzierung beteiligt sein.

Für eine wichtige Rolle des Gens bei der Entwicklung des ZNS spricht auch die Expression in der Mittel-Rautenhirn-Grenze (MRG, auch Isthmus genannt). Diese Struktur entsteht im Übergang vom Mes- zum Rhombencephalon durch im Vergleich zu den angrenzenden Gehirnbereichen langsames Wachstum, so dass eine Verengung zwischen Mes- und Rhombencephalon entsteht. Von der MRG ausgehend entwickeln sich das Mittelhirn und das Cerebellum (Wassef und Joyner, 1997). Die Entwicklung und/oder Aktivität der MRG hängt von der spezifischen Expression sezernierter Proteine (Wnt1, Fgf8) und von Transkriptionsfaktoren (Otx2, Gbx2, En1, En2, Pax2, Pax5) ab (Simeone, 2000; Wassef und Joyner, 1997). Die Expression von *Sall1* in der MRG lässt also eine Funktion im Zusammenspiel mit einem oder mehreren dieser Gene in der Entwicklung oder Aktivität der MRG vermuten, da Transkripte direkt mit der ersten Ausbildung der MRG (9.5 dpc) detektiert werden können.

Eine weitere Expressionsdomäne des *Sall1*-Gens umfasst einen Bereich im anterioren Mittelhirn. In diesem Bereich wird später das Diencephalon ausgebildet (s. Abb. 4.2), in dem ebenfalls *Sall1*-Transkripte lokalisiert sind. Zudem wird *Sall1* in der aus dem Vorderhirn entwickelten Struktur des Telencephalons expri-



miert. Also spielt das *Sall1*-Protein vermutlich nicht nur eine Rolle in der frühen Differenzierung des ZNS, sondern könnte auch an der Spezialisierung von Zellen für sich später bildende Strukturen beteiligt sein.



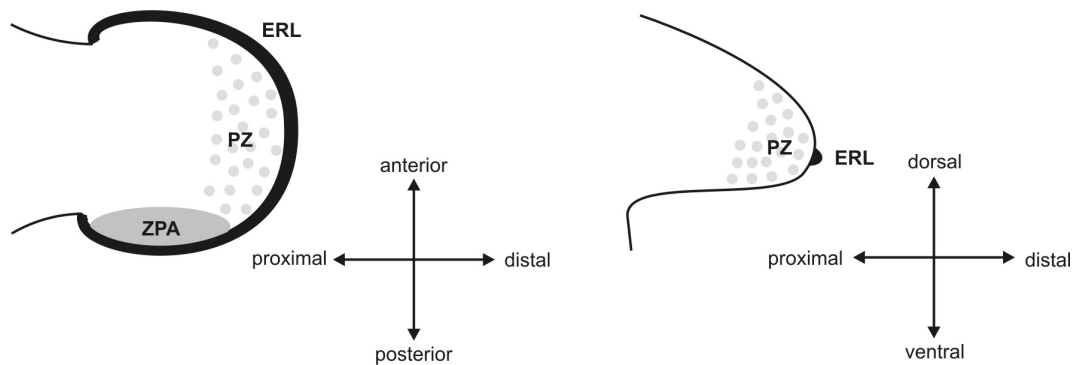
**Abbildung 4.2: Die frühe Gehirnentwicklung bei Vertebraten.** Links sind die drei primären Gehirnvakuolen schematisch dargestellt, rechts die Unterteilung der Strukturen in der voranschreitenden Entwicklung. (Nach Gilbert (1997))

Im anterioren Bereich des Telencephalons entwickelt sich der Bulbus olfactorius (primäres olfaktorisches Areal) als doppelt angelegte ovale Ausstülpung, in denen das *Sall1*-Gen stark exprimiert wird. Die sehr differenzierte Anlage der Schaltzellen im Bulbus olfactorius benötigt ein komplexes Zusammenspiel der beteiligten Gene, welches die sensorischen Rezeptorzellen der olfaktorischen (Geruchsinne) und der vomeronasalen Epithelien (Pheromonsinn) sowie die zugehörigen Nerven entstehen lässt (Buck, 2000; Demski, 1993; Farbman, 1994). Die Expression von *Sall1* bis über den Tag 14.5 pc hinaus macht eine Beteiligung des Gens an den geschilderten Prozessen wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang könnte es interessant sein, TBS-Patienten in Bezug auf ihren Geruchsinne zu untersuchen, da dieser bisher bei der Anamnese nicht beachtet wurde (Powell und Michaelis, 1999).

#### 4.1.3.3 Expression des *Sall1*-Gens in den Gliedmaßenknospen

Eine starke und spezifische Expression des *Sall1*-Gens zeigt sich auch in den Gliedmaßenknospen (s. 3.2.4). Die Entwicklung der Gliedmaßen muss in drei Richtungen koordiniert werden. Dabei bestimmt die proximo-distale Achse das Längenwachstum, die anterior-posteriore Achse determiniert die Unterscheidung

von Daumen und kleinem Finger bzw. großem und kleinem Zeh, und entlang der dorso-ventralen Achse werden Hand- und Fußrücken bzw. Hand- und Fußfläche ausgebildet (s. Abb. 4.3). Diese Prozesse werden durch komplexe Interaktionen von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren gesteuert (Chen und Johnson, 1999; Johnson und Tabin, 1997; Schwabe et al., 1998; Tickle, 1995, 1996). Bei einer Störung dieses Systems z. B. durch Mutationen in bestimmten Genen können eine Reihe von kongenitalen Fehlbildungen auftreten (Cohn und Bright, 1999), wie es auch bei TBS der Fall ist.



**Abbildung 4.3: Die Organisationszentren und Achsen der Gliedmaßenknospen von Vertebraten.** ERL: Epidermale Randleiste; PZ: Progress-Zone; ZPA: Zone polarisierender Aktivität.

In welchem der oben genannten Prozesse zur Steuerung der Gliedmaßen-Entwicklung könnte das *Sall1*-Gen involviert sein? Die Expressionsstudien deuten auf eine Beteiligung an zumindest zwei der drei genannten Prozesse hin. Zunächst zum proximo-distalen Wachstum: *Sall1* wird in der epithelialen Randleiste (ERL, s. Abb. 4.3) exprimiert. Diese entsteht aus ektodermalen Zellen an der Grenze zwischen der dorsalen und ventralen Oberfläche des Embryos, induziert durch das Mesoderm. Die ERL verläuft entlang des distalen Randes der Gliedmaßenknospen und stellt eines der wichtigsten Zentren für ihre Entwicklung dar (Johnson und Tabin, 1997; Schwabe et al., 1998). Ihre Rolle beinhaltet (1) die Aufrechterhaltung des unter ihr liegenden Mesoderms in der Proliferationsphase, die das proximo-distale Wachstum ermöglicht, (2) die Aufrechterhaltung der Expression von Molekülen, die die anterior-posteriore Achse generieren, und (3) die Interaktion mit den Proteinen, die die anterior-posteriore und dorsal-ventrale Achse spezifizieren, so dass jede Zelle Instruktionen über ihre Differenzierung erhält. Die Aktivität der ERL wird hauptsächlich durch Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fgfs; Niswander et al. (1993, 1994)) gesteuert. Das Längenwachstum der Glied-

maßenknospen erfolgt durch die Proliferation der Mesenchymzellen unterhalb der ERL, der sogenannten Progress-Zone (PZ). Das Modell der PZ erklärt die Bestimmung der proximo-distalen Identität durch die Verweildauer der Zellen in dieser Zone. Je später eine Zelle sie verlässt, desto distaler ist ihre Identität ([Summerbell et al., 1973](#)).

*Sall1* wird zunächst in der ERL und einem mit der PZ überlappenden Bereich des darunterliegenden Mesenchyms exprimiert. Zumindest in der ERL und weiteren distalen Mesenchymzellen bleibt die Expression lange erhalten. Selbst nach der fast vollständigen Anlage der Gliedmaßen in eine Struktur mit fünf voneinander getrennten Fingern bzw. Zehen und den Hand- und Fußplatten exprimieren die Zellen in den Spitzen der Finger bzw. Zehen noch stark das *Sall1*-Gen. Dies macht eine Beteiligung des Gens bei der proximo-distalen Entwicklung der Gliedmaßen sehr wahrscheinlich, die so geartet sein könnte, dass das *Sall1*-Protein die Differenzierung der Zellen im distalen Bereich in der frühen Gliedmaßen-Entwicklung verhindert. Die nachfolgende Herabregulierung von *Sall1*, dessen distale Expressionsdomäne sich verkleinert und schwächer wird, könnte dann im distalen Bereich die Formierung der entsprechenden Strukturen erlauben.

Eine weitere wichtige Rolle in der Gliedmaßenentwicklung ist die Spezifizierung der anterior-posterioren Achse. Hier übernimmt die sogenannte Zone polarisierender Aktivität (ZPA, s. Abb. 4.3) die Organisation. Dabei handelt es sich um eine kleine Gruppe mesodermaler Zellen nahe der posterioren Verbindung zwischen Gliedmaßenknospe und Körperwand ([Saunders und Gasseling, 1968](#); [Summerbell, 1979](#); [Tickle et al., 1975](#)), deren Lokalisation von mehreren Faktoren kontrolliert wird ([Masuya et al., 1997](#)). Die Identität der gebildeten Finger bzw. Zehen wird durch den Grad der Entfernung zur ZPA bestimmt ([Tickle et al., 1975](#)). Die Zone ist identisch mit der Expressionsdomäne von *sonic hedgehog* (*shh*), dessen sezerniertes Signalmolekül allein ausreicht, um die anterior-posteriore Achse in den Gliedmaßen festzulegen ([Riddle et al., 1993](#)). Die Expressionsdomäne von *Sall1* überlappt in den frühen Stadien der Gliedmaßenentwicklung mit der ZPA. Demnach könnte *Sall1* als mögliches Zielgen von Shh posterior induziert werden, allerdings wahrscheinlich nur in der frühen anterior-posterioren Organisation eine Bedeutung haben.

Die dorso-ventrale Determinierung der Gliedmaßen wird u. a. durch das Gen *Wnt7a*, das im dorsalen Ektoderm exprimiert wird ([Dealy et al., 1993](#)), und weiteren Faktoren festgelegt ([Chen und Johnson, 1999](#)). Ab 11.5 dpc zeigt *Sall1* eine ausgeprägte Expression im Bereich der Hand- bzw. Fußplatte, wobei die Domä-

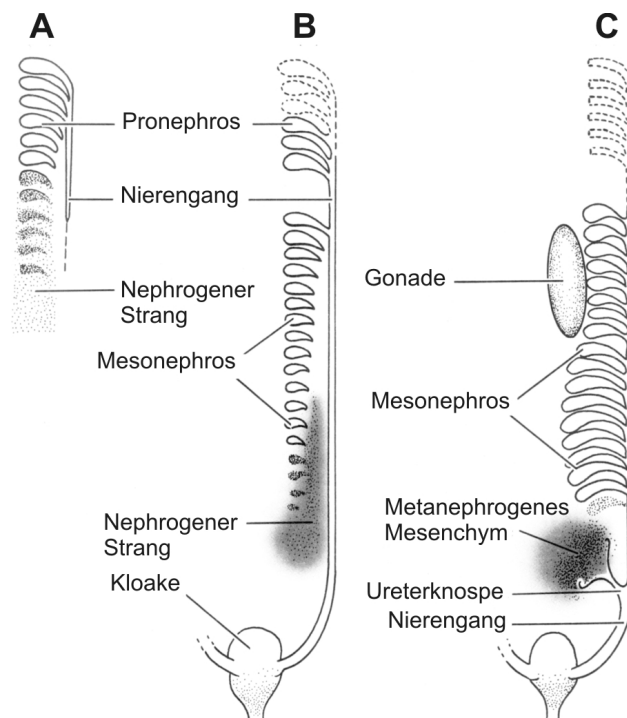
nen der dorsalen und ventralen Seite sehr unterschiedlich ausgeprägt sind. Die dorsale Expressionsdomäne ist wesentlich größer, bildet sich aber sehr schnell zurück, wohingegen die ventrale, kleinere Domäne noch bis mindestens 14.5 dpc bestehen bleibt. Dies lässt vermuten, dass dem *Sall1*-Gen unterschiedliche Bedeutungen in der jeweiligen Region zukommen, und da die Expressionszentren eher epidermal angesiedelt sind, könnten diese z. B. in der Ausbildung der sehr unterschiedlichen Hautstruktur von Ober- und Unterseite liegen. Eine Funktion bei der Determinierung von Ober- bzw. Unterseite der Gliedmaßen hat *Sall1* dagegen vermutlich nicht, da schon zu Beginn der Knospung sowohl ventral als auch dorsal Transkripte vorhanden sind.

Die Gliedmaßenknospen werden während der Embryonalentwicklung zunächst paddelförmig ausgebildet, ab ca. 12.5 dpc beginnen dann Einbuchtungen im distalen Bereich die Finger- bzw. Zehenstrahlen voneinander zu trennen (Dolle et al., 1989, 1990; Mendelsohn et al., 1991, 1992), und ab 15.0 dpc ist die Separation der individuellen Finger bzw. Zehen der Maus vollständig. Dieser Vorgang geschieht durch den programmierten Zelltod in Zonen zwischen den Finger- und Zehenknorpeln (Alles und Sulik, 1989; Saunders und Fallon, 1966). Eine schwache Expression von *Sall1* ist zu Beginn der apoptotischen Vorgänge an 12.5 dpc festzustellen. Somit könne das Gen bei der Festlegung der dem programmierten Zelltod zugedachten Bereiche eine Rolle spielen.

#### 4.1.3.4 Expression des *Sall1*-Gens während der Nierenentwicklung

Fehlgebildete Nieren finden sich bei ca. 100 genetischen Syndromen (Piscione und Rosenblum, 1999), so auch beim TBS (Newman et al., 1997). *Sall1* wird sowohl in der adulten Niere wie auch in früheren Stadien der Nierenentwicklung exprimiert. Die Entwicklung der Säugerniere durchläuft drei Hauptphasen reziproker induktiver Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben aus dem intermediolateralen Mesoderm (Burrow, 2000; Lipschutz, 1998; Vainio und Muller, 1997). In der Maus entsteht an Tag 8.0 der Embryonalentwicklung im intermediären Mesoderm ventral der anterioren Somiten der Pronephros (s. Abb. 4.4), der in Säugern nicht funktionell ist. In diesen frühen Entwicklungsprozess scheint *Sall1* nicht involviert zu sein, da es nicht in diesem Gewebe exprimiert wird. Die pronephrischen Gänge initiieren die Bildung neuer Nierengänge im angrenzenden Mesenchym und degenerieren. Die neuen Gänge stellen den Mesonephros dar, welcher *Sall1*-Expression zeigt. In der Maus übernimmt auch der Mesonephros keine Ausscheidungsfunktionen (Kaufman, 1992). In kaudaler Richtung wird durch kom-

plexe Interaktionen zwischen epithelialen und mesenchymalen Komponenten des intermediären Mesoderms der Metanephros gebildet, in dem das *Sall1*-Gen in den sich entwickelnden Glomeruli und Tubuli exprimiert wird. Das *Sall1*-Protein könnte daher ein Faktor für die Differenzierung der Tubuli und Glomeruli sein.

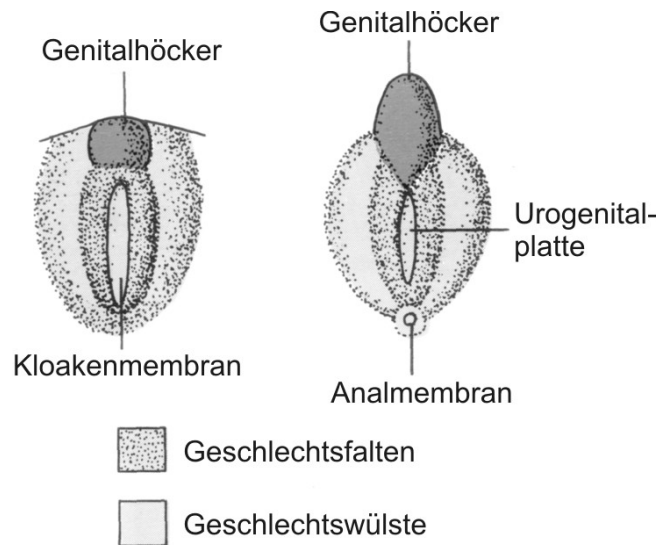


**Abbildung 4.4: Die Entwicklung der Vertebratenniere.**Das Schema zeigt die generellen Abläufe während der Nierenentwicklung von Vertebraten. A: Während seiner caudalen Migration induziert der Nierengang die Bildung weiterer Tubuli. B: Die mesonephrischen Tubuli bilden sich während die pronephrischen Tubuli degenerieren. C: Die endgültige Säugetierniere, der Metanephros, wird durch die Ureterknospe induziert. (Nach Gilbert (1997))

#### 4.1.3.5 Expression des *Sall1*-Gens im Genitalhöcker

Eine *Sall1*-Expression findet sich ab 11.5 dpc auch im Genitalhöcker und dem Bereich der Kloakenmembran mit den angrenzenden Geschlechtswälten. Der Genitalhöcker ist am kranialen Ende der Kloakenmembran lokalisiert und verlängert sich im Verlauf der Embryonalentwicklung (s. Abb. 4.5). Danach beginnt die Differenzierung in männliche oder weibliche äußere Genitalien (Moore, 1996).

Die molekularen Mechanismen der Formierung des Genitalhöckers sind nur wenig erforscht, es existieren jedoch Vermutungen, dass die Entwicklung des Ge-



**Abbildung 4.5: Die frühe Entwicklung der äußeren Genitalien.** Das Schema zeigt die frühen Stadien, die bei beiden Geschlechtern gleich sind. (Nach Moore (1996))

nitalhöckers Ähnlichkeiten zur Entwicklung der Gliedmaßenknospen aufweist (Dolle et al., 1991; Yamaguchi et al., 1999). Bisher konnten weder ERL-ähnliche Strukturen noch Kandidaten-Moleküle für ERL-Funktionen identifiziert werden (Dolle et al., 1991; Murakami, 1986), jedoch wird den (*Fgf*)-Genen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Genitalhöckers zugedacht (Haraguchi et al., 2000). Im distalen Plattenepithel exprimiert, steuern sie vermutlich die mesenchymale Genexpression und das Wachstum des Genitalhöckers und erfüllen damit die Funktion eines Signalzentrums für die Entwicklung. *Sall1* zeigt eine größere Expressionsdomäne, die sich von der Spitze des Genitalhöckers nach caudal bis über die Kloakenmembran erstreckt. Damit könnte das Gen eine Rolle bei der Differenzierung der Zellen und/oder beim proximo-distalen Wachstum der Struktur einnehmen. Des Weiteren wäre eine Funktion bei der Anlage der Kloakenmembran und der morphologischen Veränderungen der Geschlechtsfalten möglich.

#### 4.1.3.6 Expression des *Sall1*-Gens in der Augenentwicklung

*Sall1* wird ebenfalls im sich entwickelnden Auge der Maus exprimiert. Die Formierung des Vertebratenauges involviert die koordinierte Morphogenese verschiedener embryonaler Gewebe, darunter das Oberflächenektoderm, das aus der Neuralfalte entstandene Kopfmesenenchym und das anteriore Neuralrohr (Grainger,

1992; Graw, 1996; Jean et al., 1998). Das optische Vesikel kontaktiert das darüberliegende Ektoderm, dessen Zellen sich daraufhin aus Linsenplakoden-Zellen in Zellen des optischen Vesikels differenzieren (s. Abb. 4.6). Das Linsenvesikel invaginiert und das optische Vesikel wird zur neuralen bzw. pigmentierten Retina. Nachfolgend induziert das Linsenvesikel das darüberliegende Ektoderm zur Differenzierung in die Cornea (Gilbert, 1997). Eine *Sall1*-Expression findet im Linsenvesikel statt, so dass *Sall1* bei der Invagination des Vesikels oder bei der Cornea-Induktion benötigt werden könnte.

#### 4.1.3.7 Expression des *Sall1*-Gens in den Branchialbögen

*Sall1*-Transkripte sind auch in den Branchialbögen (Schlundbögen, Kiemenbögen) zu finden. In der frühen Entwicklung der Branchialbögen wird *Sall1* im ersten und zweiten Branchialbogen, auch Mandibular- und Hyalbogen genannt, exprimiert. Am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung sind die *Sall1*-Transkripte in epithelialen Bereichen lokalisiert. Aus dem ersten Branchialbogen entstehen u. a. der Maxillarfortsatz und der Mandibularfortsatz, die beide wichtig für die Entwicklung des Gesichts sind. Von dem ersten und zweiten Branchialbogen werden zudem verschiedene Muskeln und Arterien gebildet (Hinrichsen, 1990; Moore, 1996). An 9.5 dpc wird *Sall1* im Bereich des dritten und vierten Kiemenbogens sowie in den beiden nicht auf der Oberfläche sichtbaren fünften und sechsten Branchialbögen exprimiert. Die Knorpel des vierten und sechsten Branchialbogens sind die Ursprünge des späteren Schildknorpels. Aus den Knorpeln des ersten Branchialbogens bilden sich zwei Gehörknöchelchen, Malleus und Incus. In den dorsalen Abschnitten des Mandibular- und Hyalbogens bilden sich die Auricularhöcker. Diese und tiefere Gewebsabschnitte bilden das Gewebe der späteren Ohrmuschel (Hinrichsen, 1990).

Teile dieser Daten wurden in Buck et al. (2001) publiziert. Parallel wurde von Ott et al. (2001) eine Arbeit publiziert, in der die Autoren ebenfalls Expressionsdaten zu *Sall1* beschreiben. Das Gen wurde unter dem nicht mit der offiziellen Nomenklatur übereinstimmenden Namen *Msal-3* publiziert.

#### 4.1.4 *Sall1*-Expression in der Maus und das TBS

Die große Homologie zwischen dem murinen *Sall1*-Gen und dem humanen *SALL1*-Gen (90 %, s. Abb. 4.1) lässt auch eine funktionelle Konservierung zwischen diesen beiden Genen vermuten. Die Expression in adulten Geweben ent-



spricht sich zudem größtenteils. Dies lässt vermuten, dass auch die embryonale Expression vergleichbar ist, und die Maus somit einen geeigneten Modellorganismus zur Erforschung der molekularen Grundlagen des TBS darstellt. Die große Übereinstimmung der bei TBS-Patienten betroffenen Organe mit den in diesen Untersuchungen festgestellten Expressionsorten des *Sall1*-Gens der Maus erhärtet diese Vermutung noch.

Eine Aufstellung der beim TBS mehr oder weniger häufig betroffenen Organe und eine mögliche Entsprechung in Expressionsdomänen des murinen *Sall1*-Gens findet sich in Tabelle 4.2. Dieser Vergleich zeigt, dass in vielen der beim TBS betroffenen Organe das *Sall1*-Gen während der Embryonalentwicklung der Maus exprimiert wird. Nimmt man eine ähnliche Expression des *SALL1*-Gens während der Embryonalentwicklung des Menschen an, finden sich viele Ansatzpunkte zur Klärung der beim TBS auftretenden Fehlbildungen.

Fehlbildung bei TBS	Embryonale Expression von Sall1
Anorektale und Urogenitale Fehlbildungen	Kloakenbereich und Genitalhöcker
Daumenanomalien	Gliedmaßenknospen
Nierenfehlbildungen	Meso- und Metanephros
Schwerhörigkeit	Branchialbögen
Geistige Behinderung	Zentrales Nervensystem
Iriskolobom und Katarakt	Linsenvesikel
Äußeres Ohr	Keine Entsprechung
Keine Entsprechung	Bulbus olfactorius

**Tabelle 4.2: Vergleich der betroffenen Organe beim TBS und der Expressionsdomänen des murinen *Sall1*-Gens.**

Der Phänotyp der triphalangealen Daumen könnte dadurch entstehen, dass das zu Beginn der Gliedmaßen-Entwicklung vornehmlich posterior exprimierte *Sall1*-Gen durch eine verminderte Transkript-Dosis bei Heterozygotie einem Faktor für posteriore Determinierung nicht mehr genug entgegenwirken kann. So könnte durch die ausbleibende Begrenzung eines Signals auf den posterioren Bereich durch *Sall1* der anteriore Bereich Signale zur Ausbildung einer posterioren Struktur erhalten. [Riddle et al. \(1993\)](#) zeigten, dass das *Shh*-Molekül in der Zone polarisierender Aktivität (ZPA, s. Abb. 4.3) für die anterior-posteriore Determinie-



rung von Gliedmaßen ausreicht. Als mögliches Zielgen des Shh-Signals in dieser Region könnte *Sall1* einer der signalvermittelnden Faktoren sein. Das Fehlen des *Sall1*-Transkripts könnte folglich eine gestörte anterior-posteriore Determinierung hervorrufen. Zusätzlich könnte es durch die verminderte Transkriptmenge zu einer eingeschränkten Regulation im proximo-distalen Wachstum kommen, die in den beobachteten triphalangealen Daumen resultieren könnte.

Eine reduzierte *SALL1*-Expression in den Branchialbögen könnte die Ausbildung der Gehörknöchelchen einschränken und zu konduktiven Komponenten der beschriebenen Schwerhörigkeit führen. Es konnte zwar keine konkrete Expressionsdomäne im Bereich der Aurikularhöcker festgestellt werden, die an der Ausbildung des äußeren Ohrs teilhaben, jedoch sind auch tiefer liegende Gewebereiche an der Ausbildung beteiligt (Moore, 1996), die hier eventuell nicht detektiert werden konnten. Teilweise wurde bei TBS-Patienten auch von Iriskolobomen (Rossmiller und Pasic, 1994) und Katarakten (Kohlhase, 2000a) berichtet. Die Expression des *Sall1*-Gens im Auge während der Embryonalentwicklung der Maus lässt vermuten, dass diese Fehlbildungen durch die reduzierte *SALL1*-Transkriptmenge verursacht werden.

Unter der Annahme, dass wie bei der Maus das *SALL1*-Gen auch im Genitalhöcker und im weiter caudal liegenden Epithel im Bereich der Kloakenmembran exprimiert wird, ist vorstellbar, dass durch ein vermindertes *SALL1*-Signal die Entwicklungsvorgänge nicht mehr ausreichend koordiniert ablaufen. Ein fehlgesteuertes Wachstum des Sinus urogenitalis könnte eine Verschiebung des Darmausgangs hervorrufen, eine ausbleibende Auflösung der Analmembran eine Analtresie. Die Fehlbildungen der Niere bzw. die einseitig fehlenden Nieren lassen vermuten, dass das *Sall1*-Gen sowohl bei der Induktion des Metanephros durch die Ureterknospe als auch in der Organisation des Nierenmesenchyms, in dem die nephrogenen Tubuli und Glomeruli gebildet werden, eine Rolle spielt. Die starke Expression in zahlreichen Regionen des ZNS macht vorstellbar, dass bei einer Verminderung der Gendosis Störungen der neuronalen Entwicklung auftreten, welche zu der bei etwa 10 % der TBS-Patienten festgestellten mentalen Retardierung (Kohlhase, 2000a) führen könnten. Eine Störung des Geruchsinns wurde bei TBS-Patienten bisher nicht untersucht, dies könnte jedoch im Hinblick auf die prominente Expression von *Sall1* im Bulbus olfactorius interessant sein.

### 4.1.5 Funktionsanalyse des *Sall1*-Gens

Die Erzeugung von Funktionsverlustmutanten durch das *gene targeting* bietet die Möglichkeit, anhand des Phänotyps der gendefizienten Mäuse genauere Kenntnisse über Wirkungsort und -weise des entsprechenden Gens zu gewinnen (Strachan und Read, 1996). Mittels Deletion des *Sall1*-Gens in einer knock out-Maus sollte ein Modellorganismus für das Townes-Brocks-Syndrom (TBS, s. 1.3) geschaffen werden, um weitere Erkenntnisse über die Pathogenese des Syndroms und die Funktion und Regulation des Gens *Sall1* bzw. des humanen Homologs *SALL1* zu gewinnen. Die Mäuse sollten anschließend im Hinblick auf ihre Embryonalentwicklung und postnatale Entwicklung mit besonderer Beachtung der Strukturen, die beim TBS fehlgebildet sind, analysiert werden. Zudem können für die Deletion heterozygote oder homozygote Embryonen mit Sonden verschiedener Gene, die ebenfalls in den betroffenen Strukturen exprimiert werden und eventuell in den *Sall1*-Regulationsweg involviert sind, untersucht werden.

Zur Erzeugung einer *Sall1*-defizienten Maus wurden das gesamte Exon 2, ein Teil von Exon 3 sowie das dazwischenliegende Intron mit Hilfe eines knock out-Konstrukts durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen deletiert (s. 3.7). Die Stammzellen wurden zur Generierung von Chimären in 2.5 Tage alte Mausembryonen injiziert und die erhaltenen Chimären mit Mäusen der Stämme C57BL und 129/SvJ verpaart. Die Analyse der F1-Generation konnte aus zeitlichen Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr erfolgen.

Mit der gewählten Strategie sollte das *Sall1*-Gen vollständig inaktiviert, also eine Nullmutante erzeugt werden. Beim TBS liegt der Mutations-*hot spot* im *SALL1*-Gen vor dem ersten DZF (Kohlhase, 2000b). Die meisten Mutationen führen durch Insertion oder Deletion einer oder mehrerer Basen zu einem *frameshift* und durch das verschobene Leseraster zu einem frühzeitigen Translationsabbruch, wobei Transkripte, die ein vorzeitiges Stoppkodon in ihrem Leseraster enthalten, präferenziell abgebaut werden (Hentze und Kulozik, 1999). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das verkürzte Protein noch einen Einfluss unbekannter Art ausübt. Daher könnte die vollständige Deletion des *Sall1*-Gens eine andere Situation herstellen als es bei den TBS-Patienten der Fall ist. Als Beispiel soll hier kurz ein Mausmodell für das Renal-Coloboma-Syndrom herangezogen werden, das zu Veränderungen am Nervus opticus und Störungen der Nierenfunktion führt. Es ist auf Mutationen im *Pax2*-Gen zurückzuführen. Das aus den bekannten Mutationen resultierende Protein ist vermutlich, wie das *SALL1*-Protein beim TBS, nicht funktionell, da ihm mit der *paired*- und der Homeodomäne alle funktionellen Domänen fehlen. In der *Pax2*-knock out-Maus kommt es zu einem ausgepräg-

ten Phänotyp mit schweren Abnormalitäten im Meso- und Metanephros, die zu einem Fehlen des Genitaltrakts und der metanephrischen Niere führen (Torres et al., 1995). Favor et al. (1996) analysierten eine Maus mit einer zum Menschen identischen Mutation (Sanyanusin et al., 1995). Die Maus-Mutante zeigt neben anderen Fehlbildungen zwar eine schwere Störung der Nierenanlagen, aber nicht den selben Phänotyp wie die knock out-Mäuse. Ein zweiter Schritt bei der Analyse des *Sall1*-Gens könnte also sein, in Mäuse ein knock in-Konstrukt einzubringen, in welchem das *Sall1*-Gen eine TBS-typische Mutation trägt. Dies wäre insbesondere dann interessant, wenn die knock out-Mäuse einen vom TBS abweichenden Phänotyp zeigen.

## 4.2 Das Gen *Sall2*

*Sall2* ist ein weiteres *spalt*-ähnliches Gen der Maus. Wie in Kohlhase et al. (2000) gezeigt, handelt es sich um das murine Homolog zu dem humanen Gen *SALL2*. Es besteht aus drei Exons, wobei die beiden Exons, die im 5'-Bereich des Zinkfinger-kodierenden Exons liegen, alternativ gespleißt werden. Auf genomischer Ebene umfasst das Gen 17 140 bp vom Exon 1 bis zum Polyadenylierungssignal, wobei der Transkriptionsstartpunkt im 5'-Bereich nicht identifiziert wurde (Kohlhase et al., 2000). Die 3'-UTR umfasst 1 545 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist die typischerweise über einen großen Bereich verteilten Zinkfingerdomänen auf: im 5'-Bereich von Exon 2 befindet sich der in allen bisher isolierten *sal*-ähnlichen Vertebratengenen vorhandene, jedoch nicht im *sal*-Gen selbst vorliegende C<sub>2</sub>HC-Einzelzinkfinger (EZF), darauf folgen drei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Doppelzinkfinger (DZF), wobei der zweite von einem weiteren EZF charakteristischer Struktur gefolgt ist. Der carboxyterminale DZF enthält ungewöhnlicher Weise 51 statt der üblichen 49 Aminosäuren. Nur das humane *SALL2*-Gen weist dieselbe Struktur auf (Kohlhase et al., 1996).

### 4.2.1 Charakterisierung des Intron 1 und der 3'-UTR von *Sall2*

Mit Hilfe von Subklonierungen und Sequenzierungen eines bereits vorliegenden murinen Cosmidklons konnte das ca. 9 kb lange Intron 1 vollständig sequenziert werden. Durch die Isolierung eines weiteren das *Sall2*-Gen enthaltenden Cosmidklons konnte zudem der 3'-Bereich weiter kartiert werden. Die genomische Sequenz von 20 332 bp ohne die regulatorischen Regionen ist im Anhang dargestellt.

### 4.2.2 Expression des *Sall2*-Gens in adulten Geweben

Die Northern-Blot-Analyse an adulten Mausgeweben zeigte eine Expression des *Sall2*-Gens in abnehmender Stärke in Gehirn, Niere, Lunge, Ovar und Milz. Damit entspricht das Expressionsmuster größtenteils dem des humanen *SALL2*-Gens, wobei für letzteres Transkripte im Herzgewebe detektiert wurden (Kohlhase et al., 1996), jedoch nicht für *Sall2* (Kohlhase et al., 2000). Eine RT-PCR zeigte die frühe Expression beider alternativer Transkripte (ab 8.5 dpc für Exon 1a, ab 9.5 dpc für Exon 1). Die genaue Analyse der embryonalen Expression von *Sall2* wurde in dieser Arbeit durchgeführt.

### 4.2.3 Expression des *Sall2*-Gens im embryonalen ZNS

Das *Sall2*-Gen der Maus wird stark im ZNS exprimiert (s. Abb. 3.16). Die frühe (spätestens am 7.5 dpc) und auf das gesamte neurale Ektoderm ausgedehnte Expression lässt vermuten, dass *Sall2* bei der Differenzierung der verschiedenen ZNS-Bereiche vom neuralen Ektoderm zum Gehirn, Neuralrohr und weiteren Strukturen eine Rolle spielt. Während der Entwicklung der drei zuerst im Kopfbereich gebildeten Gehirnarealen (Prosencephalon oder Vorderhirn, Mesencephalon oder Mittelhirn, Rhombencephalon oder Rautenhirn, s. Abb. 4.2) wird das Gen im gesamten dorsalen Bereich dieser Strukturen exprimiert. Auch die Expression im dorsalen Bereich des Neuralrohrs ist sehr prominent. Im gesamten ZNS finden sich *Sall2*-Transkripte bis zum ältesten untersuchten Embryonalstadium von 12.5 dpc. Daher lässt sich eine Beteiligung von *Sall2* an der Ausbildung des ZNS bei der Maus vermuten. Im adulten Gehirn der Maus ist eine hohe Transkriptmenge vorhanden (Kohlhase et al., 2000), so dass eine Bedeutung von *Sall2* für die Funktion der Zellen wahrscheinlich ist. Auch das humane *SALL2*-Gen wird im Gehirn exprimiert und im fetalen menschlichen Gehirn konnten Transkripte in Neuronen gezeigt werden (Kohlhase et al., 1996). Beide Gene scheinen also auch an der Funktion bestimmter Zellen im adulten Zustand beteiligt zu sein, wobei bislang unklar ist, welche Zellen *Sall2* bzw. *SALL2* exprimieren.

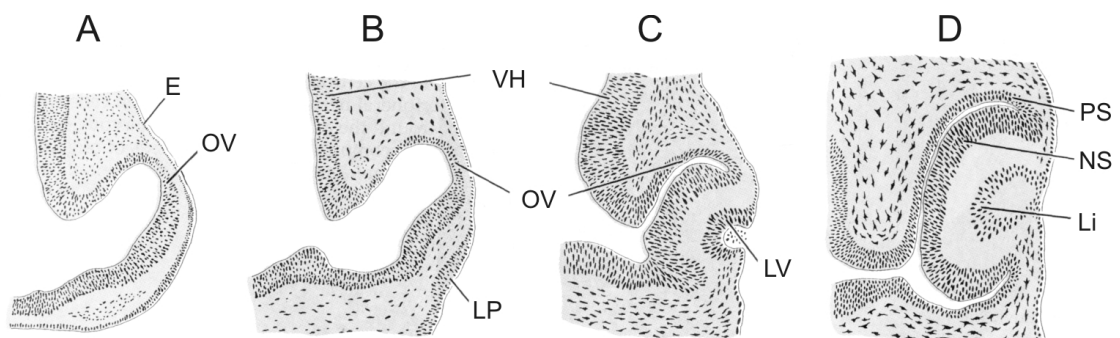
Zudem wird *Sall2* in den otischen Vesikeln exprimiert. Diese entstehen durch die Invagination der otischen Plakode, die wiederum eine Region von Oberflächen- und neuralem Ektoderm auf dem lateralen Rhombencephalon darstellt (Baker und Bronner-Fraser, 2001; Hinrichsen, 1990). Elongationen und Verwindungen lassen dann die sechs separaten Organe des inneren Säugetierohrs entstehen. Die Regulation dieses Prozesses wird durch komplizierte Interaktionen einer Vielzahl

von Faktoren gewährleistet (Fekete, 1996, 1999; Fritsch et al., 1997; Torres und Giraldez, 1998). Die starke Expression von *Sall2* im sehr frühen Stadium der Innenohrentwicklung lässt eine Rolle dieses Gens bei den Entstehungsprozessen vermuten.

#### 4.2.4 Expression des *Sall2*-Gens in anderen Embryonalgeweben

Eine weitere *Sall2*-exprimierende Struktur stellt der Mesonephros dar. Er ist bei der Maus nicht funktionell, von ihm geht jedoch die Induktion des Metanephros aus, der zur adulten Niere weiter differenziert (s. Abb. 4.4). Auch in der adulten Niere sind Transkripte vorhanden (Kohlhase et al., 2000), des Weiteren wird in der adulten humanen Niere das *SALL2*-Gen exprimiert (Kohlhase et al., 1996). Es lässt sich somit eine Beteiligung dieser Gene bei der Differenzierung und der späteren Funktion der Niere annehmen.

Das *Sall2*-Gen wird lateral im optischen Vesikel exprimiert, zudem ist eine Expression im Linsenvesikel während der Einfaltung zur Linse (s. Abb. 4.6) zu beobachten. Durch den Kontakt des optischen Vesikels zum Ektoderm wird die Bildung des Linsenvesikels aus der Linsenplakode induziert. An diesem Prozess könnte das *Sall2*-Protein möglicherweise beteiligt sein, indem es bei der Vermittlung der Signale oder der folgenden Reaktion der Gewebe beteiligt ist.



**Abbildung 4.6: Die Entwicklung des Vertebratenauges.** A: Das optische Vesikel invaginiert und kontaktiert das darüber liegende Ektoderm. B,C: Das Ektoderm differenziert zu Linsenzellen und bildet das Linsenvesikel. Aus dem eingefalteten optischen Vesikel bildet sich die pigmentierte und die neurale Schicht. E: Ektoderm; Li: Linse; LP: Linsenplakode; LV: Linsenvesikel; NS: Neurschicht; OV: Optisches Vesikel; PS: Pigmentschicht; VH: Vorderhirn. (Nach Gilbert (1997))

### 4.2.5 Funktionsanalyse des *Sall2*-Gens

Bislang ist keine durch *SALL2*-Mutationen verursachte Erkrankung bekannt. Aufgrund der starken Konservierung des Gens und der Identifizierung von *SALL1* als TBS-verursachendes Gen scheint es jedoch möglich, dass auch *SALL2* eine ähnlich große Bedeutung in der menschlichen Entwicklung einnimmt. Zur Erzeugung *Sall2*-defizienter Mäuse wurden Exon 1a und Exon 2 mit Hilfe eines knock out-Konstrukts durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen deletiert (s. 3.7). Die Stammzellen wurden zur Generierung von Chimären in Blastocysten injiziert und die erhaltenen Chimären mit Mäusen der Stämme C57BL und 129/SvJ verpaart. Heterozygote *Sall2*<sup>+/-</sup>-Mäuse der F1-Generation wurden untereinander verpaart und brachten homozygote *Sall2*<sup>-/-</sup>-Mäuse hervor.

Außer im Genotyp unterschieden sich diese Tiere nicht von den heterozygoten und den Wildtyp-Mäusen, ihre Nachkommenzahl war jedoch unterdurchschnittlich (s. 3.7.5). Bei der Präparation von Embryonen aus Verpaarungen homozygoter Mäuse auf dem Hintergrund 129/SvJ zeigten sich bei einem Teil der Embryonen schwere Deformationen im Kopfbereich (s. Abb. 3.25), die ein ähnliches Bild zeigen wie es für die Anencephalie beim Menschen beschrieben wird (Norman et al., 1995). Da alle geborenen Mäuse völlig normal waren, muss davon ausgegangen werden, dass diese Fehlbildungen zum pränatalen Absterben führen oder betroffene Tiere aufgrund ihrer geringeren Vitalität im Vergleich zu den normalen Tieren von der Mutter durch Kannibalismus aus dem Wurf entfernt werden. Da das *Sall2*-Gen während der Embryonalentwicklung stark im Kopfbereich exprimiert wird, könnte es sich um einen aus der Deletion des Gens resultierenden Phänotyp handeln.

Fehlbildungen des Neuralrohrs, zu denen die Spina bifida, die Enzephalozele und die Anencephalie gerechnet werden, betreffen eines von 1 000 Neugeborenen (Jorde et al., 1995). Die Anencephalie führt in den meisten Fällen kurz nach der Geburt zum Tod (Norman et al., 1995). Der Phänotyp präsentiert sich zumeist in dem Fehlen des Schädeldaches, einer fehlenden oder nach hinten gewölbten Stirn, hervorstehenden Augen, congenitalen Herzfehlbildungen und verlängerten Armen (Norman et al., 1995). Fälle von Anencephalie wurden in Fällen von Trisomie 18 (Nisani et al., 1981), Trisomie 20 (Zumel et al., 1989), partieller Deletion von Chromosom 13 (Rudelli, 1987) und einer Duplikation von Chromosom 2 (Singer et al., 1987) beschrieben. Es konnte bisher kein konsistentes Muster einer chromosomalen Anomalie im Zusammenhang mit Anencephalie beschrieben werden. Es existieren also keine Daten zu einer Kopplung mit 14q, dem Lokus



des humanen *SALL2*-Gens.

Die Schließung des Neuralrohrs involviert ein komplexes Zusammenspiel von extrinsischen und intrinsischen Faktoren (Copp et al., 1990; Schoenwolf und Smith, 1990; Smith und Schoenwolf, 1991; van Straaten et al., 1993). In Säugtieren wird die Schließung des Neuralrohrs an verschiedenen Stellen entlang der anterior-posterioren Achse initiiert, wobei die nicht erfolgte Schließung einer dieser Stellen zu bestimmten Neuralrohrdefekten führt (Van Allen et al., 1993). Einige Gene wie *Pax3* (Gruss und Walther, 1992; Strachan und Read, 1994) und *shh* (Chiang et al., 1996; Roessler et al., 1996) sind als notwendig für die Formierung des Neuralrohrs der Maus beschrieben worden. Da eine Rolle von *Sall2* bei diesen Prozessen aufgrund des Expressionsmusters möglich ist, könnte durch die fehlende Gendosis ein entsprechender Entwicklungsdefekt auftreten.

Die Deformation betrifft immer nur einen Teil des Wurfs. Dies ist nicht verwunderlich, da Neuralrohrdefekte beim Menschen polygen und multifaktoriell bedingt sind (Gelehrter et al., 1998). Zum einen werden diese Fehlbildungen also durch mehrere verschiedene Gene verursacht, die einzeln betrachtet nur geringe oder keine Auswirkungen auf den Phänotyp haben, zum anderen von multiplen Umgebungsfaktoren, die in Wechselwirkung mit vielen Genen den Phänotyp beeinflussen. Es könnte also unter den Nachkommen eines Wurfs eine unterschiedliche genetische Prädisposition zur Ausbildung der Deformation vorliegen. Zudem könnte der Phänotyp durch unterschiedliche Umgebungsfaktoren entstehen oder von ihnen verstärkt werden. Diese könnten während der Embryonalentwicklung der Maus z. B. dadurch gegeben sein, dass die Plazenten der einzelnen Nachkommen unterschiedlich gut durchblutet werden.

Durch die Polygenie ließe sich auch erklären, weshalb die analysierten adulten Mäuse keinen Phänotyp zeigen, obwohl durch einen Northern-Blot gezeigt werden konnte, dass in den heterozygoten Nachkommen eine verringerte Transkriptmenge vorliegt und die für die Deletion homozygoten Mäuse keine *Sall2*-Transkripte mehr aufweisen. Der Verlust oder die Mutation eines Gens, welches an der Steuerung eines so wichtigen Prozesses wie die Schließung des Neuralrohrs beteiligt ist, könnte durch weitere Gene kompensiert werden. In den *Sall2*<sup>-/-</sup>-Mäusen könnten also andere Entwicklungsgene die fehlende *Sall2*-Aktivität ersetzen. Eine Erklärung hierfür wäre, dass durch Genduplikationen ohne Funktionsverluste im Verlauf der Evolution eine Art Absicherung entstanden ist, um die Sensibilität der Organismen Mutationen gegenüber zu senken. Das Auftreten dieser Entwicklungsstörungen als Resultat der Spontanmutation eines anderen Gens ist fast aus-

zuschließen, da bei einem rezessiven Erbgang der Anteil betroffener Embryonen bei 25 % liegen sollte. Dies ist hier nicht gegeben.

Um zu prüfen, ob die Funktion des Gens durch ein anderes Gen der Familie muriner *sal*-ähnlicher Gene übernommen wird und dieses entsprechend verstärkt oder ektopisch exprimiert wird, wurden whole mount-*in situ*-Hybridisierungen mit einer *Sall1*-Sonde an *Sall2*<sup>-/-</sup>-Embryonen durchgeführt. Sowohl in den adulten Tieren wie auch während der Embryonalentwicklung entspricht die Expression jedoch dem Muster in Wildtyp-Tieren.

Die partielle Überlappung der *Sall2*- und *Sall1*-Expressionsdomänen allein könnte eventuell schon ausreichen, um die Ausprägung eines Phänotyps in den *Sall2*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu unterdrücken. Dies vermuteten auch [Chu et al. \(2000\)](#) bei der knock out-Mauslinie für das *FHL2* (*SLIM2*)-Gen, das spezifisch im Cardio-vaskularsystem exprimiert wird. Es wurde jedoch weder ein Phänotyp noch eine verstärkte Expression *FHL2*-homologer Gene, deren Expressionsmuster teilweise überlappen, festgestellt ([Chu et al., 2000](#)).

Das Auftreten dieses Defekts konnte bisher nur auf dem 129/SvJ-Hintergrund festgestellt werden. Da auf dem C57BL-Hintergrund eine normale Anzahl von Nachkommen zu beobachten ist, ist anzunehmen, dass die Embryonalentwicklung dort normal verläuft. Auf dem Hintergrund 129/SvJ scheint also eher eine genetische Veranlagung zur Anencephalie vorzuliegen als auf dem Hintergrund C57BL. Dies ist noch eingehend durch die weitere Präparation von Embryonen und die Auswertung der durchschnittlichen Nachkommenzahl zu untermauern. Es wurde bereits mehrfach von einem Einfluss des genetischen Hintergrunds auf den Phänotyp einer Deletion oder Mutation bei der Maus berichtet ([Bonyadi et al., 1997](#); [LeCouter et al., 1998](#); [Liu et al., 1993](#)). Die Ursache hierfür liegt in der unterschiedlichen Kompetenz des genetischen Hintergrunds zum Ausgleich bestimmter Genverluste.

Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass das *Sall2*-Gen für die entwicklungsbiologischen Prozesse der Strukturen, in denen es spezifisch exprimiert wird, keine wesentliche Rolle spielt. Dies wäre entgegen aller Erwartungen, betrachtet man den hohen Grad der Konservierung dieses Gens im Verlauf der Evolution sowie das spezifische Expressionsmuster und die hohen Transkriptmengen. Es wurden jedoch bereits verschiedene erfolglose knock out-Versuche geschildert, bei denen ähnlich gute Hinweise auf eine wichtige Funktion des entsprechenden Gens vorlagen ([Finkenzeller et al., 2000](#); [Harroch et al., 2000](#); [Rojo et al., 2000](#)). Eventuell ist auch bei der Duplikation der Gene bei der Entstehung dieser Familie



ein Gen entstanden, das keine essentielle Funktion erfüllt, aber zur Optimierung einer Funktion dient, die unter natürlichen Bedingungen wichtig ist.

### 4.3 Embryonale Expression des Gens *Sall3*

Ott et al. (1996) publizierten eine Arbeit mit Daten zur Expression des *Sall3*-Gens, beschränkten sich dort jedoch hauptsächlich auf das ZNS. Für den Vergleich mit den anderen murinen *sal*-ähnlichen Genen *Sall1* und *Sall2* wurden daher whole mount-*in situ*-Hybridisierungen zur Betrachtung weiterer *Sall3*-Expressionsdomänen durchgeführt.

Das murine *Sall3*-Gen wird stark im ZNS in allen untersuchten Embryonalstadien exprimiert (s. Abb. 3.31). Im frühesten analysierten Stadium (7.5 dpc) ist das Transkript im gesamten neuralen Ektoderm sehr prominent. Zudem wird das Gen am Tag 9.5 und 10.5 der Embryonalentwicklung in der MRG exprimiert, die ein wichtiges Organisationszentrum in der Gehirnentwicklung darstellt. Weitere Expressionsdomänen sind im anterioren Mittelhirn und im ventralen Bereich von Mittel- und Vorderhirn lokalisiert. Die Expression des Gens begrenzt sich im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung vom gesamten neuralen Ektoderm auf distinkte Bereiche des ZNS, so dass *Sall3* eine Bedeutung bei der Differenzierung zu bestimmten neuronalen Strukturen tragen könnte. Im Neuralrohr, das mindestens am Tag 12.5 der Embryonalentwicklung deutliche *Sall3*-Expression zeigt, könnte dem Gen eine Bedeutung bei der Differenzierung der Neuroblasten und/oder Glioblasten zukommen.

Zu Beginn des Knospungsprozesses der Gliedmaßen wird das Gen *Sall3* im posterioren Bereich, überlappend mit der Zone polarisierender Aktivität (ZPA, s. Abb. 4.3), exprimiert. Dem *Sall3*-Gen könnte daher eine Bedeutung in der frühen anterior-posterioren Determinierung zukommen. Anschließend ist die Expression in einer relativ regelmäßig verlaufenden Zone im Bereich der Hand- bzw. Fußplatte von anterior nach posterior lokalisiert. In dieser Phase könnte das Gen Funktionen beim proximo-distalen Wachstum erfüllen. Dafür spricht die partiell mit der PZ überlappende Expressionsdomäne. Das *Sall3*-Gen könnte also an zwei wichtigen Prozessen der Gliedmaßenentwicklung beteiligt sein. Dies trifft jedoch nur für den Beginn des Wachstums der Gliedmaßen zu, da ab 12.5 dpc keine Transkripte mehr in den Gliedmaßenknospen gefunden werden können.

Neben den Gliedmaßenknospen wird *Sall3* in einer weiteren aus dem Mesoderm entstandenen Struktur exprimiert, den Branchialbögen. Von 9.5 dpc bis 10.5

dpc sind Transkripte im Hyal- und Mandibularbogen zu finden, aus denen wichtige Bestandteile der Gesichtsmuskulatur und des Kopfskeletts gebildet werden. Eine weitere Struktur, in der das *Sall3*-Gen exprimiert wird, ist der Genitalhöcker (s. Abb. 4.5). Die Lokalisierung der Expressionsdomäne im distalen Bereich lassen eine Bedeutung im proximo-distalen Wachstum vermuten.

Parallel zu Durchführung der hier dargestellten Expressionsstudien wurde eine Beschreibung des *Sall3*-Expressionsmusters anhand von whole mount-*in situ*-Hybridisierungen von Ott et al. (2001) publiziert, wobei die Autoren wie bei der Erstbeschreibung des Gens (Ott et al., 1996) hauptsächlich das ZNS betrachten. Es konnte in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den von Ott et al. (1996) publizierten Daten keine Expression im Auge oder im Mesonephros nachgewiesen werden. Die Autoren berichten jedoch von einer schwachen Expression in diesen Strukturen. Eventuell ist die Transkriptmenge des *Sall3*-Gens so gering, dass die Expression nur mit der von Ott et al. (1996) angewandten Methode der radioaktiven Hybridisierung von Paraffinschnitten nachgewiesen werden kann.

## 4.4 Vergleich der drei *sal*-ähnlichen murinen Gene

### 4.4.1 Strukturvergleich

Die in der vorliegenden Arbeit behandelten Gene aus der Maus (s. 3.1, Kohlhasse et al. (2000); Ott et al. (1996)) weisen alle Charakteristika für ein *sal*-ähnliches Vertebratengen auf ( $\geq 3$  weit auseinander liegende DZF-Motive in der abgeleiteten Aminosäuresequenz, interne Sequenzähnlichkeiten zwischen diesen Motiven, ein EZF am aminoterminalen Ende, ein am zweiten DZF angehängter EZF). Ihre Ähnlichkeit untereinander ist jedoch größtenteils auf die Homologien in diesen konservierten Bereichen beschränkt. Die hier angegebenen Daten wurden durch einen Vergleich mit Hilfe des Programms *Complign* der Software MacMolly® Tetra (Soft Gene, Berlin) ermittelt. Dabei wurden jeweils die gesamten abgeleiteten AS-Sequenzen betrachtet, nicht jedoch einzelne konservierte Domänen. Daher ergeben die Vergleiche relativ geringe Homologiewerte (s. Tab. 4.3). Die relativ geringe Homologie von *Sall2* zu *Sall1* und *Sall3* lässt sich zum einen durch die Struktur des *Sall2*-Proteins erklären, das eine DZF-Domäne weniger aufweist und wesentlich kürzer ist als die anderen beiden Proteine, zum anderen sind auch die DZF weniger homolog als zwischen *Sall1* und *Sall3*.

AS-Sequenzen	Homologie
Sall1 / Sall2	14 %
Sall1 / Sall3	26 %
Sall2 / Sall3	14 %

**Tabelle 4.3: Homologievergleich der murinen *sal*-ähnlichen Gene.** Deutlich wird die größere Homologie zwischen Sall1 und Sall3, die Sall2-Sequenz weist im Vergleich eine weniger hohe Konservierung auf.

#### 4.4.2 Expressionsvergleich

Die verschiedenen *sal*-ähnlichen Gene der Vertebraten sind wahrscheinlich durch Duplikationsvorgänge entstanden, wie es für viele Gene von weiteren Genfamilien bekannt ist (Greer et al., 2000; Mansouri et al., 1996). Die Gene einer Familie können trotz hoher Homologie in der Sequenz sehr unterschiedliche Funktionen erfüllen, wenn sie verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegen. Eine funktionelle Äquivalenz verschiedener Gene einer Gruppe konnte z. B. für *Hoxa3* und *Hoxd3* gezeigt werden, die identische biologische Funktionen erfüllen können und deren unterschiedliche Rollen in der Entwicklung das Resultat quantitativer Modulationen in der Genexpression sind (Greer et al., 2000). Das Gen *Otx1* kann die meisten Funktionen des *Otx2*-Gens in der Maus-Embryogenese ersetzen (Suda et al., 1999). *Pax2* und *Pax5* haben ebenfalls seit ihrer Duplikation zu Beginn der Vertebratenevolution gleiche biochemische Funktionen beibehalten (Bouchard et al., 2000). Zwischen *En-1* und *En-2* entsteht der funktionelle Unterschied nur durch ihr divergierendes Expressionsmuster (Hanks et al., 1995).

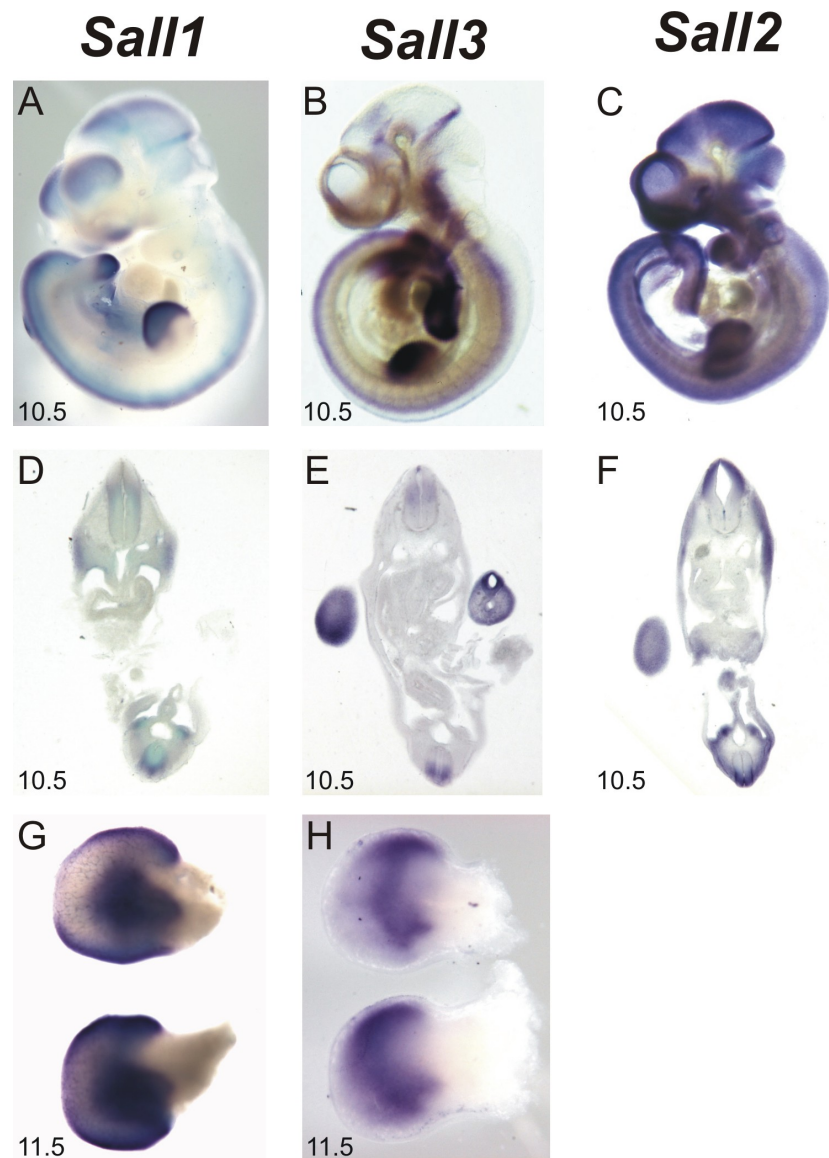
Um Hinweise auf Ähnlichkeiten oder Unterschiede in ihren Funktionen zu erhalten, wurden die Expressionsmuster der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *sal*-ähnlichen Gene der Maus verglichen. Dabei zeigte sich eine größere Ähnlichkeit im Expressionsmuster zwischen *Sall1* und *Sall3*. Alle drei Gene zeigen eine prominente Expression im ZNS. Mit Beginn der Entstehung des neuralen Ektoderms können alle drei Transkripte dort nachgewiesen werden. Dabei zeigen *Sall2* und *Sall3* eine ausgedehntere Expression, die sich später als bei *Sall1* auf bestimmte Strukturen begrenzt. Alle drei Gene werden sowohl in unterschiedlichen wie auch überlappenden Bereichen der Gehirnvesikel zu Beginn der Kopfentwicklung exprimiert. *Sall2* wird im Gegensatz zu den anderen beiden Genen nicht in der MRG exprimiert, die ein wichtiges Organisationszentrum der Gehirn-

entwicklung darstellt. Die Expression von *Sall2* im otischen Vesikel ist dagegen sehr ausgeprägt, *Sall1* und *Sall3* werden dort nicht oder nur schwach exprimiert. *Sall1* wird als einziges der drei Gene in den Bulbi olfactorii exprimiert. Sehr prominent und bis in spätere Stadien hinein detektierbar ist bei allen drei Genen die Expression im Neuralrohr. Dabei wird zunächst nur *Sall2* im dorsalen Bereich exprimiert. Die Transkripte von *Sall1* und *Sall2* sind zunächst in einer medianen Region angesiedelt und erst später verlagert sich ihre Expression nach dorsal.

*Sall2* zeigt die stärkste Expression im optischen Vesikel, also in der frühen Phase der Augenentwicklung. Die *Sall1*-Expression in der Augenanlage tritt erst später im Linsenvesikel auf, *Sall3* wird gar nicht im Auge exprimiert. Das *Sall2*-Gen zeigt eine Expression in den Gliedmaßenanlagen, es findet sich dort jedoch keine bestimmte Expressionsdomäne. *Sall1* und *Sall3* dagegen werden zu Beginn der Gliedmaßenentwicklung in sehr spezifischen Regionen exprimiert und überlappen zu Anfang beide mit der ZPA. Die Expression von *Sall1* gliedert sich nachfolgend in einen distalen Bereich, der die ERL mit einschließt, und eine proximale Domäne im Bereich der Hand- bzw. Fußplatte. *Sall3* wird nur in einer proximalen Domäne exprimiert und ist an 12.5 dpc nur noch sehr schwach zu detektieren. Die Expression des *Sall1*-Gens ist bis mindestens 14.5 dpc noch stark in den Finger- bzw. Zehenspitzen vorhanden.

Alle drei Gene werden in verschiedenen und überlappenden Bereichen der Branchialbögen exprimiert. In der Urogenitalleiste werden *Sall1* und *Sall2* stark in den mesonephrogenen Tubuli exprimiert. Das Epithel des Genitalhöckers koexprimiert *Sall1* und *Sall3*.

Die drei *sal*-ähnlichen Gene der Maus werden einerseits in vielen gemeinsamen Strukturen exprimiert, unterscheiden sich andererseits jedoch in der genauen Lokalisierung oder dem Zeitpunkt der Expression. Diese unterschiedliche Regulation könnte dadurch entstehen, dass bei den vermutlich aufgetretenen Genduplikationen im Verlauf der Evolution zunächst die Promotorbereiche mit dupliziert wurden, nachfolgend aber unterschiedlich mutierten. Ob die verschiedenen *sal*-ähnlichen Gene der Maus eine funktionelle Äquivalenz beibehalten haben, ließe sich durch knock in-Mäuse untersuchen, in denen ein Gen durch ein anderes ersetzt wird. Dies ist z. B. für *En-1* und *En-2* beschrieben ([Hanks et al., 1995](#)).



**Abbildung 4.7: Vergleich der embryonalen Expressionsmuster von *Sall1*, *Sall2* und *Sall3*.** Gezeigt sind Embryonen der embryonalen Entwicklungsstadien 10.5 und 11.5 dpc, die mit DIG-markierten Sonden für *Sall1*, *Sall2* oder *Sall3* hybridisiert wurden. Aufgrund der größeren Ähnlichkeit zwischen der Expression der Gene *Sall1* und *Sall3* sind diese nebeneinander gestellt. A, D und G zeigen Embryonen, die mit der Sonde gegen *Sall1* hybridisiert wurden. B, E und H zeigen Hybridisierungen mit der Sonde gegen *Sall3*. Die Embryonen in C und F wurden mit der Sonde gegen *Sall2* hybridisiert.

## 4.5 *sal*-ähnliche Vertebratengene lassen sich in Homologiegruppen einteilen

Zwei der drei isolierten murinen *sal*-ähnlichen Gene konnten aufgrund ihrer Homologie zu einem humanen *sal*-ähnlichen Gen isoliert werden (Buck et al., 2000; Kohlhase et al., 2000). Zwischen diesen beiden Spezies scheint also ein hoher Konservierungsgrad von *sal*-ähnlichen Genen vorzuliegen. Fast alle anderen isolierten *sal*-ähnlichen Gene aus Vertebraten (Farrell und Munsterberg, 2000; Farrell et al., 2001; Hollemann et al., 1996; Köster et al., 1997) zeigen eine große Homologie zu einem der murinen *sal*-Gene und somit auch zu den humanen *sal*-Genen. *sal*-ähnliche Vertebratengene lassen sich daher in Gruppen einteilen und sollen im Folgenden kurz untereinander im Hinblick auf ihre Struktur und ihre Expression verglichen werden.

### 4.5.1 Strukturvergleich

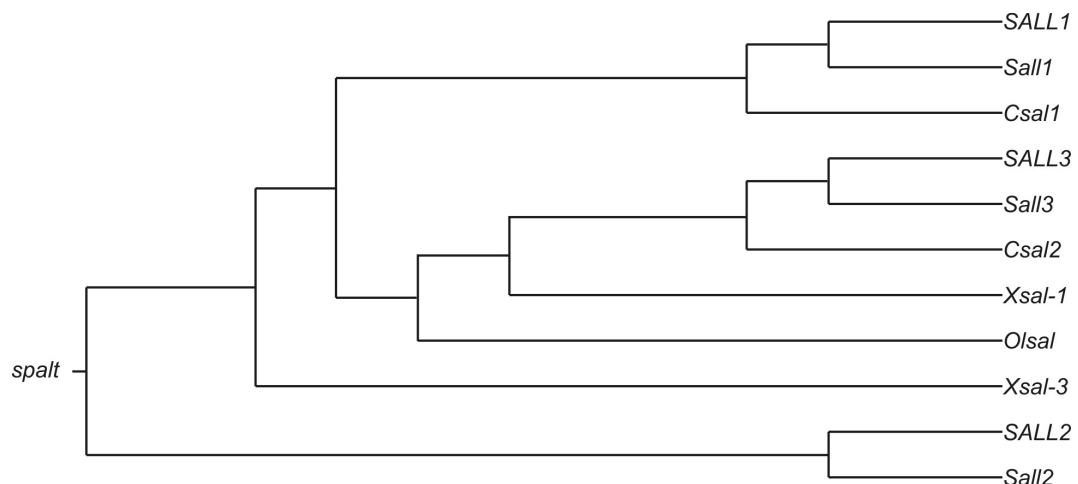
Gene aus einem in der Evolution früh von der Entwicklungslinie der höheren Säugetiere abgetrennten Organismus wie *Xenopus* weisen eine erstaunliche Homologie zu den neueren Vertebratengen auf. Tabelle 4.4 zeigt eine Aufstellung der mit Hilfe des Programms *Complign* der Software MacMolly® Tetra gewonnenen Homologiedaten. Die Werte sind auf die gesamte AS-Sequenz oder die präferierte Spleißvariante bezogen. Der deutlichste Unterschied zwischen der Gruppe der *Sall1*-ähnlichen und der *Sall3*-ähnlichen Gene besteht darin, dass hauptsächlich oder ausschließlich die Spleißvariante ohne den dritten DZF translatiert wird (Farrell et al., 2001; Hollemann et al., 1996; Köster et al., 1997; Kohlhase et al., 1999a; Ott et al., 1996). Dieser Gruppe gehören die meisten der bisher isolierten *sal*-ähnlichen Vertebratengene an. *Csal2* und *Medaka-sal* (*Olsal*) wurden daher mit dieser Spleißvariante des *Sall3*-Gens verglichen. Die Aminosäuresequenzen wurden aus der NCBI Genbank (zugänglich über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ermittelt. Die Zugangsnummern sind im Anhang dargestellt (s. Tab. A.1).

Ein weiteres aus *Xenopus* isoliertes Gen, das *Xsal-3*-Gen (Onuma et al., 1999), ist wahrscheinlich einer vierten Gruppe zuzuordnen, da die ungewöhnliche Prozessierung keinem anderen *sal*-ähnlichen Vertebratengen ähnelt. Es wurde bisher kein weiteres Gen isoliert, das in die Gruppe von *Sall2* und *SALL2* einzuordnen ist. Ein phylogenetischer Vergleich, in ähnlicher Form von Farrell et al. (2001) vorgeschlagen, ist in Abbildung 4.8 gezeigt. Das Modell basiert auf der

Sall1-Gruppe		Sall2-Gruppe		Sall3-Gruppe	
AS-Sequenzen	Homologie	AS-Sequenzen	Homologie	AS-Sequenzen	Homologie
Sall1 / SALL1	90 %	Sall2 / SALL2	88 %	Sall3 / SALL3	78 %
Sall1 / Csal1	82 %			Sall3 / Csal2	70 %
				Sall3 / Xsal-1	67 %
				Sall3 / Olsal	46 %

**Tabelle 4.4: Homologievergleich zwischen den einer Gruppe zugerechneten Vertebratenproteinen.** Es wurden die aus der NCBI Genbank erhältlichen Aminosäuresequenzen zugrunde gelegt.

Annahme, dass zunächst durch eine Duplikation zwei Linien entstanden, die sich unterschiedlich weiterentwickelten. Aus einer entstand die Gruppe der *SALL2*-Gene, die das vermutlich vorher durch intragenische Duplikation o.ä. erworbene vierte DZF-Motiv wieder verloren haben (Kohlhase, 1996). Die andere Linie veränderte sich weiter und brachte drei verschiedene Gruppen hervor, die alle für vier DZF-Domänen kodieren und dennoch charakteristische Unterschiede aufweisen.



**Abbildung 4.8: Phylogenetischer Vergleich aller sal-ähnlicher Vertebratengene.** Die Gene können aufgrund ihrer Homologie Gruppen zugeordnet werden.



### 4.5.2 Vergleich der embryonalen Expression

Der Embryo vom Huhn ist ein wichtiges Untersuchungsobjekt für die Gliedmaßenentwicklung bei Vertebraten, da er während der Embryonalentwicklung *in vivo* manipuliert werden kann, z. B. durch Transplantationsexperimente oder Applikation synthetischer Signalmoleküle (Gilbert, 1997). Die Expression von *Csa11* in den Gliedmaßenknospen des Huhns (Farrell und Munsterberg, 2000) ähnelt sehr dem für *Sall1* festgestellten Expressionsmuster. Ein erheblicher Unterschied besteht jedoch darin, dass die Transkriptmenge ab dem Hamburger-Hamilton- (HH; (Hamburger und Hamilton, 1951)) Stadium 24/25 im Mesenchym von Flügel- und Beinknospen herunterreguliert wird und die Expression in der ERL im HH 26 endet. Das Huhn zeigt also nicht die bei der Maus festgestellte hohe Transkriptmenge in den Finger- und Zehenspitzen. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die beiden homologen Gene trotz der großen Überlappung der Expressionsdomänen in späteren Stadien der Embryonalentwicklung unterschiedlichen Regulationsmechanismen bzw. unterschiedlichen Regulatorgenen unterworfen sind. Das frühe Expressionsmuster ist jedoch sehr ähnlich, so dass einige Beobachtungen aus dem Huhn auf die Maus abgeleitet werden können. Farrell und Munsterberg (2000) stellten für das Huhn fest, dass Sonic hedgehog (Shh) die *Csa11*-Expression nur zusammen mit weiteren Faktoren aus der epithelialen Randleiste (ERL) erhöhen kann. Zudem vermuten die Autoren eine Kooperation von Wnt3a und Wnt7a mit Fgf-Signalen zur Induktion und Aufrechterhaltung der *Csa11*-Expression. Die *Sall1*-Expression könnte also unter der Kontrolle verschiedener Signalmoleküle stehen. Die mögliche Regulation von *Sall1* durch *shh* wird in 4.6 ausführlicher diskutiert. Die embryonale Expression des *SALL1*-Gens wurde an Schnitten aus fetalem Gehirngewebe untersucht (Kohlhase et al., 1996), dazu liegen keine vergleichbaren Daten von anderen Genen dieser Gruppe vor. Zumindest lässt sich feststellen, dass alle bisher bekannten Gene der Gruppe *Sall1*-ähnlicher Gene während der Embryonalentwicklung in Gehirnstrukturen exprimiert werden.

Die embryonale Expression des humanen *SALL2*-Gens wurde ebenfalls an fetalen Gehirnschnitten untersucht (Kohlhase et al., 1996), zu denen keine vergleichbaren Daten bei der Maus vorliegen. Weitere Gene, die zur Gruppe *Sall2*-ähnlicher Gene gehören, wurden bisher nicht isoliert.

Wie in Tabelle 4.4 gezeigt, gehören die meisten bisher isolierten *sa*-ähnlichen Vertebratengene der Gruppe der *Sall3*-ähnlichen Gene an. Die Homologie dieser Gene spiegelt sich auch in ihren embryonalen Expressionsmustern wider. So wer-



den *Sall3*, *SALL3*, *Csal2*, *Xsal-1* und *Medaka-sal* im sich entwickelnden ZNS des Embryos exprimiert (Farrell et al., 2001; Hollemann et al., 1996; Köster et al., 1997; Kohlhase et al., 1999a; Ott et al., 1996). Wiederum wurden die Daten des humanen *Sall3*-Gens an fetalen Gehirnschnitten gewonnen (Kohlhase et al., 1999a), die nicht mit den Daten aus whole mount-*in situ*-Hybridisierungen vergleichbar sind. Im Huhn beginnt die Expression des *Csal2*-Gens wie bei *Sall3* in den frühen Stadien der Neuralplatte, in *Xenopus* in parallelen Streifen der Neuralplatte. Wie *Sall3* werden auch *Csal2* und *Medaka-sal* in der MRG exprimiert, nicht jedoch das *Xsal-1*-Gen. Auch im weiteren Verlauf der ZNS-Entwicklung entsprechen sich die Expressionsdomänen der homologen Gene aus verschiedenen Spezies partiell.

Die Expression des *Csal2*-Gens in den Gliedmaßenknospen des Huhns ist wie bei dem *Sall3*-Gen nur vorübergehend und beginnt im posterioren Bereich (Farrell et al., 2001), jedoch ist die Expressionsdomäne stets auch auf diesen Bereich der sich entwickelnden Gliedmaßenknospen begrenzt. Bei *Xenopus* wird *Xsal-1* in einer der PZ entsprechenden Region exprimiert (Hollemann et al., 1996). Ein identisches Expressionsmuster beschreiben Köster et al. (1997) bei Medaka. Farrell et al. (2001) berichten von einer Expression des *Csal2*-Gens im Genitalhöcker des Huhns, wie sie auch bei *Sall3* festzustellen ist. In Medaka liegen *Medaka-sal*-Transkripte im exkretorischen System vor (Köster et al., 1997). *Csal2* wird im Augenbecherstiel exprimiert, *Medaka-sal* im Augenbecherstiel und im optischen Vesikel. *Sall3* wird dagegen nicht während der Augenentwicklung exprimiert. *Medaka-sal* wird im Pronephros exprimiert, *Xsal-1* im Opisthonephros und *Csal2* sowie *Sall3* im Mesonephros.

Die mit dem *Sall3*-Gen verglichenen *sal*-homologen Gene aus Vertebraten, die aufgrund ihrer Homologie in einer Gruppe zusammengefasst wurden, zeigen in vielen Bereichen der sich entwickelnden Organismen ein übereinstimmendes Expressionsmuster. Somit scheint die Bedeutung, die diese Gene bei der Steuerung von Entwicklungsprozessen einnehmen, über die weite evolutionäre Spanne von Fisch zu Mensch bemerkenswert gleich geblieben zu sein.

## 4.6 Zur Regulation des murinen *sal*-ähnlichen Gene durch Sonic hedgehog

In einem multizellulären Organismus ist die Ausbildung der Strukturen von Positionierungsinformationen abhängig, die durch vorübergehende Gradienten sekre-

tierter Signalmoleküle generiert werden (Lawrence und Struhl, 1996). Diese abgestufte Aktivität wird durch die differenzielle Expression von Zielgenen dauerhaft etabliert. In *Drosophila* wird eines dieser Signalmoleküle zur Positionierung und Musterbildung von dem Segment-Polaritätsgen *hedgehog* (*hh*) kodiert. Es vermittelt die Musterbildung während der Segmentierung (Lee et al., 1992) und während der Determinierung der Imaginalscheiben (Tabata und Kornberg, 1994). Das diffundierende Hh-Protein vermittelt die Musterbildung im Embryo sowohl über kurze als auch über lange Distanzen (Chuang und Kornberg, 2000; Johnson et al., 1996; McMahon, 2000).

In Säugetieren konnten bisher drei *hh*-homologe Gene isoliert werden: *desert hedgehog* (*dhh*), *indian hedgehog* (*ihh*) und *sonic hedgehog* (*shh*), alle Eche-lard et al. (1993)). Es existiert also eine *hedgehog*-Genfamilie von sekretierten Signalmolekülen (Zardoya et al., 1996). Aus dieser Familie ist *sonic hedgehog* (*shh*) am besten charakterisiert. Zunächst wird *shh* im Embryonalknoten exprimiert, ist dann während der Achsenformierung in der ventralen Mittellinie lokalisiert und nachfolgend im Notochord, in der Bodenplatte und im anterioren Bereich im prächordalen Mesoderm angesiedelt. Später findet sich *shh*-Expression in der ZPA der sich entwickelnden Gliedmaßenknospen und im exkretorischen System (Hammerschmidt et al., 1997).

Die Strukturierung des Vertebratenauges wird durch Shh, das vom darunterliegenden prächordalen Mesoderm der embryonalen Mittellinie sezerniert wird, vermittelt. *shh*-defiziente Mäuse zeigen Zyklopie (Chiang et al., 1996), was die Vermutung nahelegt, dass Mittelliniensignale von Shh für die richtige Separation der anterioren Augendomäne benötigt werden. Shh spielt eine wichtige Rolle bei der Musterbildung des Zentralen Nervensystems (Goodrich und Scott, 1998; Hammerschmidt et al., 1997; McMahon, 2000), da es für die Differenzierung verschiedener Zelltypen im ventralen Rückenmark benötigt wird. Zudem kontrolliert die laterale Diffusion von Shh aus den Mittellinienstrukturen die Strukturierung des paraxialen Mesoderms (Fan und Tessier-Lavigne, 1994; Fan et al., 1995; Johnson et al., 1994). Im exkretorischen System bewirkt Shh zahlreiche Musterbildungsprozesse und Induktionsereignisse (Chiang et al., 1996). Während der Gliedmaßenentwicklung wird Shh in der ZPA generiert und ist an der Organisation der anterior-posterioren Polarität der Gliedmaßen beteiligt (Kraus et al., 2001; Wang et al., 2000; Yang et al., 1997).

Alle Mitglieder der Hh-Familie agieren vermutlich über das Transmembranprotein Patched (*ptc*), das als Hh-Rezeptor dient. In der Abwesenheit eines Hh-

Liganden inaktiviert Ptc das Transmembranprotein Smoothed (Smo; (Alcedo und Noll, 1997; Chen und Struhl, 1998; Marigo et al., 1996; Murone et al., 1999; Stone et al., 1996)). Die Inhibierung von Smo wird durch die Bindung von Hh an Ptc aufgehoben und Smo kann das Hh-Signal transduzieren. Dieser Vorgang resultiert in der Produktion einer aktiven Form des Transkriptionsfaktors Cubitus interruptus (Ci) oder dessen homologen Vertebraten-Faktoren, kodiert von Mitgliedern der Gli-Genfamilie (Aza-Blanc et al., 1997; Chen et al., 1999; Methot und Basler, 1999; Ohlmeyer und Kalderon, 1998; Sasaki et al., 1999; Wang et al., 2000).

Es besteht eine große Ähnlichkeit zwischen den embryonalen Expressionsdomänen muriner *sal*-ähnlicher Gene und denjenigen des *shh*-Gens. *Sall1* und *Sall3* werden wie *shh* in der Mittel-Rautenhirn-Grenze (MRG), dem Neuralrohr, den Gliedmaßenknospen sowie in Bereichen des exkretorischen Systems (Mesonephros, Metanephros) exprimiert. In *Drosophila* wird *sal* in der Flügel-Imaginalscheibe durch hh aktiviert (Sturtevant et al., 1997). Im Fisch Medaka wird *sal* durch ektopische Shh-Signale aktiviert, und die Reduktion der hh-Signale durch den Antagonisten Proteinkinase A resultiert in verminderter *sal*-Expression (Köster et al., 1997).

Um die Abhängigkeit der Expression *sal*-ähnlicher Gene in der Maus vom Shh-Signal zu prüfen, wurden *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen mit Sonden für *Sall1*, *Sall2* und *Sall3* hybridisiert (s. Abb. 3.32). Dabei zeigt sich zunächst ein recht ähnliches Expressionsmuster zwischen den Deletionsmutanten und den Wildtyp-Embryonen, bei einer genaueren Analyse lassen sich dann jedoch signifikante Unterschiede in bestimmten Domänen feststellen. Das trifft besonders für den Kopfbereich zu, wo bei allen drei Genen mehrere Expressionsdomänen kleiner und/oder diffuser erscheinen als bei den Wildtyp-Embryonen. So ist die Transkription von *Sall1* in der MRG der *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen schon an 10.5 dpc nicht mehr detektierbar, und die aneinander angrenzenden und überlappenden Expressionsdomänen der drei Gene im Mittelhirn sind in den Deletionsmutanten stark eingeschränkt. Hier könnte man also eine Abhängigkeit der *Sall1*-Expression vom Shh-Signal vermuten. Im Neuralrohr ist die Expression nicht reduziert, sondern scheint, eventuell aufgrund des fehlenden Shh-Signals, diffuser zu sein. In dem Fall würde die Rolle von *shh* nicht darin liegen, die Transkription von *Sall1* zu induzieren, sondern auf bestimmte Gewebe zu lokalisieren. Die Expression in den Gliedmaßenknospen ist ebenfalls in den *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen beeinträchtigt. *Sall1*-Transkripte sind nur in den distalen Bereichen festzustellen, und das vornehmlich im mittleren Bereich

exprimierte *Sall3* lässt eine wesentlich reduzierte Transkription erkennen. Eventuell werden also *Sall1* und *Sall3* in den mittleren Regionen der Gliedmaßenknospen durch Shh reguliert. Weitere Expressionsdomänen wie der Genitalhöcker, die Branchialbögen und die Schwanzspitze scheinen in den knock out-Mäusen unbeeinflusst zu sein.

Die Auswertung dieser Ergebnisse unterliegt der Problematik, dass sich das äußere Erscheinungsbild der *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen stark von dem der Wildtyp-Embryonen unterscheidet (Chiang et al., 1996). Es muss daher die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Unterschiede in der Expression der drei Gene nicht oder nicht allein daraus resultieren, dass durch das fehlende Shh-Signal ihre Expression vermindert aktiviert wird. Die Expression eines Gens ist meist auch von Umgebungsfaktoren wie dem entsprechenden Gewebe abhängig. Ist also die entsprechende Region wie z. B. ein Mittelhirn-Bereich nicht oder nur rudimentär vorhanden, bleibt auch die Expression der für diese Region spezifischen Gene aus oder ist auf den verkleinerten Bereich beschränkt. Weitere Untersuchungen können diese Problematik beheben, indem für bestimmte Gewebsbereiche bekannte Markergene zur Hybridisierung von *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen verwendet werden und so festgestellt werden kann, ob die Umgebungsfaktoren zur Expression der murinen *sal*-Gene gegeben sind oder nicht.

## 4.7 Weiterführende Arbeiten

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eröffnen vielfältige Möglichkeiten für weitere Forschungsarbeiten. Ein bedeutender Schritt wird dabei die Analyse der *Sall1*-knock out-Mäuse sein. Hieraus können Rückschlüsse auf die Funktion des Gens bei der Maus und beim Menschen gezogen werden. Dabei könnten genaue Untersuchungen der beim TBS betroffenen Organe Erkenntnisse über die Entstehung der Fehlbildungen liefern. Bei einem Phänotyp, der auf eine ähnliche funktionelle Bedeutung des *Sall1*- und *SALL1*-Gens bei der Maus und beim Menschen schließen lässt, würde durch die Herstellung einer knock in-Maus, in welche ein Konstrukt mit einer TBS-typischen Mutation eingebracht wird, ein idealer Modellorganismus für das TBS geschaffen werden. Über die gegen das murine *Sall1*- und das humane *SALL1*-Protein erzeugten Antikörper könnte sich klären lassen, ob durch die zum TBS führenden Mutationen ein trunkiertes *SALL1*-Protein, das über den Dominant-Negativen Effekt eine Haploinsuffizienz bewirkt, entsteht, oder das verkürzte Protein durch Proteolyse wieder abgebaut wird. Auch wird es dann

möglich sein, die Lokalisation des Proteins im Gewebe zu bestimmen.

Für die *Sall2*-knock out-Linie sind in nächster Zeit weitere Ergebnisse zu erwarten. Sollte sich die Vermutung, mit *Sall2* ein wichtiges Signal zur Gehirnentwicklung identifiziert zu haben, bestätigen, würden weitere Untersuchungen z. B. die Hybridisierung der Embryonen mit bekannten Markergenen für die Gehirnentwicklung einschließen. Sollte damit die Einordnung des Gens in die Signalkaskade gelingen, wäre ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Bedeutung des Gens in den Säugetieren getan. Eine Kreuzung der *Sall1*- und *Sall2*-knock out-Linien könnte neue Anhaltspunkte für eine partielle Redundanz der biologischen Funktionen der beiden Gene liefern. Langfristig sollte auch eine *Sall3*-knock out-Maus hergestellt werden, um die Erkenntnisse über die Bedeutung der *sal*-ähnlichen Gene in Säugetieren zu komplettieren.

## 5 Zusammenfassung

Das zu dem humanen *SALL1*-Gen homologe *Sall1*-Gen der Maus wurde durch die mittelstringente Hybridisierung einer murinen Cosmid-Bibliothek mit einer *SALL1*-Sonde isoliert. Die genaue Charakterisierung erfolgte über die Herstellung einer Restriktionskarte, Klonierungen und Sequenzierungen. Anhand einer Northern-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass das *Sall1*-Gen am stärksten in Nieren- und Gehirngeweben der Maus exprimiert wird. Mittels whole mount-*in situ*-Hybridisierungen von Embryonen und Paraffinschnitten von Embryonen wurde gezeigt, dass das Gen im zentralen Nervensystem, im Mesonephros, in den Gliedmaßen und in weiteren Strukturen der Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien exprimiert wird. Mit Hilfe des pTKneo-Vektors wurde ein Konstrukt zur Generierung einer *Sall1*-knock out-Maus hergestellt. Durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen wurde das vollständige Exon 2 und ein Teil des Exon 3 auf einem Allel der positiven ES-Zellen durch das Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Aus den ES-Zellen hergestellte Chimären werden zur Zeit mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt. Ein Antiserum aus Kaninchen, das gegen ein humanes *SALL1*-Peptid hergestellt worden war, wurde durch das Binden des Peptids an eine Säule aufgereinigt. Anhand des aufgereinigten Antikörpers konnte das homologe *Sall1*-Protein der Maus in Kernproteinextrakten nachgewiesen werden.

Mittels whole mount-*in situ*-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass das *Sall2*-Gen im zentralen Nervensystem im Mesonephros sowie im optischen und otischen Vesikel exprimiert wird. Zu dem bereits isolierten und größtenteils charakterisierten murinen *Sall2*-Gen wurden weitere Daten durch die Isolierung eines weiteren Cosmidklons, Klonierungen und Sequenzierungen gewonnen. Mit Hilfe dieser Daten wurde ein *Sall2*-knock out-Konstrukt hergestellt und zur Deletion des Exon 1a und Exon 2 in embryonalen Stammzellen eingesetzt. Positive ES-Zellen wurden in Blastocysten injiziert und die daraus entstandenen Chimären mit Wildtyp-Mäusen verpaart. Mittels Genotypisierung über PCR identifizierte he-

terozygote *Sall2*<sup>+/-</sup>-Mäuse der F1-Generation wurden weiter verpaart und die in der F2-Generation auftretenden für die Deletion homozygoten Mäuse auf einen Phänotyp hin untersucht. Die adulten Mäuse zeigten keine Auffälligkeiten, die durchschnittliche Anzahl an Nachkommen bei Verpaarungen von homozygoten *Sall2*<sup>-/-</sup>-Mäusen war jedoch geringer als normal. Durch die Präparation von Embryonen konnte gezeigt werden, dass mehrere Embryonen Defekte in der Schließung des Neuralrohrs aufwiesen, die wahrscheinlich zum pränatalen Absterben der Tiere führen. Ein Bereich aus Exon 2 wurde für die Herstellung eines *Strep*-tag-Fusionsproteins zur Produktion eines Antiserums ausgewählt. Anhand des *Strep*-tag-spezifischen StrepTactin-Moleküls wurde die Überexpression des Fusionsproteins in Bakterienkulturen nachgewiesen und nach einer Aufreinigung des Proteins mit der Immunisierung von Kaninchen begonnen.

Anhand der in der Genbank veröffentlichten Nukleotidsequenz des *Sall3*-Gens wurden Primer hergestellt und ein Fragment aus genomischer Maus-DNA amplifiziert. Das DIG-markierte Fragment wurde zur whole mount-*in situ*-Hybridisierung von Embryonen eingesetzt. Alle drei isolierten *sal*-ähnlichen Gene der Maus wurden anhand ihrer Expressionsdaten verglichen. Durch die whole mount-*in situ*-Hybridisierung von *shh*<sup>-/-</sup>-Embryonen mit den drei Sonden für *Sall1*, *Sall2* und *Sall3* konnte gezeigt werden, dass die für andere Vertebraten gezeigte Abhängigkeit der *sal*-Expression von *Sonic hedgehog* für die Maus nur in bestimmten Organen zutrifft. Es wurde gezeigt, dass die murinen *sal*-Gene für ihre Expression nicht generell auf das Shh-Signal angewiesen sind.

# Literaturverzeichnis

Adham I.M., Nayernia K. und Engel W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization, *Mol Reprod Dev* **46**: 370–376.

Alcedo J. und Noll M. (1997). Hedgehog and its patched-smoothened receptor complex: a novel signalling mechanism at the cell surface, *Biol Chem* **378**: 583–590.

Alles A.J. und Sulik K.K. (1989). Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism, *Teratology* **40**: 163–171.

Altmann M.E. (1998). Mündliche Mitteilung.

Altschul S.F., Koonin E.V., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., Gish W. und Myers E.W. (1998). Iterated profile searches with PSI-BLAST—a tool for discovery in protein databases Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs Basic local alignment search tool, *Trends Biochem Sci* **23**: 444–447.

Archangelo L. (1999). Mündliche Mitteilung.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. und Struhl K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., USA.

Aza-Blanc P., Ramirez-Weber F.A., Laget M.P., Schwartz C. und Kornberg T.B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor, *Cell* **89**: 1043–1053.

Baker C.V. und Bronner-Fraser M. (2001). Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction, *Dev Biol* **232**: 1–61.

Birnboim H.C. und Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523.

Blanck C. (2000). Mündliche Mitteilung.

Bonyadi M., Rusholme S.A., Cousins F.M., Su H.C., Biron C.A., Farrall M. und Akhurst R.J. (1997). Mapping of a major genetic modifier of embryonic lethality in TGF beta 1 knockout mice, *Nat Genet* **15**: 207–211.



- Bouchard M., Pfeffer P. und Busslinger M. (2000). Functional equivalence of the transcription factors Pax2 and Pax5 in mouse development, *Development* **127**: 3703–3713.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Breathnach R. und Chambon P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins, *Annu Rev Biochem* **50**: 349–383.
- Buck A., Archangelo L., Dixkens C. und Kohlhase J. (2000). Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of the murine SALL1 ortholog Sall1, *Cytogenet Cell Genet* **89**: 150–153.
- Buck A., Kispert A. und Kohlhase J. (2001). Embryonic expression of the murine homologue of SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, *Mech Dev* **104**: 143–146.
- Buck L.B. (2000). The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals, *Cell* **100**: 611–618.
- Bullock W.O., Fernandez J.M. und Short J.M. (1987). XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection, *Biotechniques* **5**: 376–378.
- Burfeind P. und Hoyer-Fender S. (1991). Sequence and developmental expression of a mRNA encoding a putative protein of rat sperm outer dense fibers, *Dev Biol* **148**: 195–204.
- Burrow C.R. (2000). Regulatory molecules in kidney development, *Pediatr Nephrol* **14**: 240–253.
- Cameron T.H., Lachiewicz A.M. und Aylsworth A.S. (1991). Townes-Brocks syndrome in two mentally retarded youngsters, *Am J Med Genet* **41**: 1–4.
- Capecchi M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination, *Science* **244**: 1288–1292.
- de Celis J.F., Barrio R. und Kafatos F.C. (1996). A gene complex acting downstream of dpp in Drosophila wing morphogenesis, *Nature* **381**: 421–424.
- de Celis J.F., Barrio R. und Kafatos F.C. (1999). Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the Drosophila thorax, *Development* **126**: 2653–2662.
- Celis J.F.d., Barrio R. und Kafatos F.C. (1996). A gene complex acting downstream of dpp in Drosophila wing morphogenesis, *Nature* **381**: 421–424.

- Chen C.H., von Kessler D.P., Park W., Wang B., Ma Y. und Beachy P.A. (1999). Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression, *Cell* **98**: 305–316.
- Chen C.K., Kühnlein R.P., Eulenberg K.G., Vincent S., Affolter M. und Schuh R. (1998). The transcription factors KNIRPS and KNIRPS RELATED control cell migration and branch morphogenesis during *Drosophila* tracheal development., *Development* **125**: 4959–4968.
- Chen H. und Johnson R.L. (1999). Dorsoventral patterning of the vertebrate limb: a process governed by multiple events, *Cell Tissue Res* **296**: 67–73.
- Chen Y. und Struhl G. (1998). In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex, *Development* **125**: 4943–4948.
- Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K.E., Corden J.L., Westphal H. und Beachy P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function, *Nature* **383**: 407–413.
- Chien A., Edgar D.B. und Trela J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*, *J Bacteriol* **127**: 1550–1557.
- Chu P.H., Bardwell W.M., Gu Y., Ross J. J. und Chen J. (2000). FHL2 (SLIM3) is not essential for cardiac development and function, *Mol Cell Biol* **20**: 7460–7462.
- Chuang P.T. und Kornberg T.B. (2000). On the range of hedgehog signaling, *Curr Opin Genet Dev* **10**: 515–522.
- Clark J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases, *Nucleic Acids Res* **16**: 9677–9686.
- Clark K.L., Halay E.D., Lai E. und Burley S.K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5, *Nature* **364**: 412–420.
- Cohn M.J. und Bright P.E. (1999). Molecular control of vertebrate limb development, evolution and congenital malformations, *Cell Tissue Res* **296**: 3–17.
- Copp A.J., Brook F.A., Estibeiro J.P., Shum A.S. und Cockcroft D.L. (1990). The embryonic development of mammalian neural tube defects, *Prog Neurobiol* **35**: 363–403.
- Costa G.L. und Weiner M.P. (1994). Polishing with T4 or Pfu polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments, *Nucleic Acids Res* **22**: 2423.
- Courey A.J. und Tjian R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains including a novel glutamine-rich activation motif, *Cell* **55**: 887–898.

- Dagert M. und Ehrlich S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells, *Gene* **6**: 23–28.
- Dealy C.N., Roth A., Ferrari D., Brown A.M. und Kosher R.A. (1993). Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes, *Mech Dev* **43**: 175–186.
- Demski L.S. (1993). Terminal nerve complex, *Acta Anat* **148**: 81–95.
- Denhardt D.T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA, *Biochem Biophys Res Commun* **23**: 641–646.
- Dolle P., Izpisua-Belmonte J.C., Brown J.M., Tickle C. und Duboule D. (1991). HOX-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia, *Genes Dev* **5**: 1767–1767.
- Dolle P., Ruberte E., Kastner P., Petkovich M., Stoner C.M., Gudas L.J. und Chambon P. (1989). Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse, *Nature* **342**: 702–705.
- Dolle P., Ruberte E., Leroy P., Morriss-Kay G. und Chambon P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis, *Development* **110**: 1133–1151.
- Echelard Y., Epstein D., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. und McMahon A. (1993). Sonic Hedgehog, a Member of a Family of Putative Signaling Molecules, Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity, *Cell* **75**: 1417–1430.
- El-Baradi T. und Pieler T. (1991). Zinc finger proteins: what we know and what we would like to know, *Mech Dev* **35**: 155–169.
- Elstob P.R., Brodu V. und Gould A.P. (2001). spalt-dependent switching between two cell fates that are induced by the *Drosophila* EGF receptor, *Development* **128**: 723–732.
- Fan C.M., Porter J.A., Chiang C., Chang D.T., Beachy P.A. und Tessier-Lavigne M. (1995). Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway, *Cell* **81**: 457–465.
- Fan C.M. und Tessier-Lavigne M. (1994). Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog, *Cell* **79**: 1175–1186.

- Farbman A.I. (1994). Developmental biology of olfactory sensory neurons, *Semin Cell Biol* **5**: 3–10.
- Farrell E.R. und Munsterberg A.E. (2000). *csal1* is controlled by a combination of FGF and Wnt signals in developing limb buds, *Dev Biol* **225**: 447–458.
- Farrell E.R., Tosh G., Church E. und Munsterberg A.E. (2001). Cloning and expression of CSAL2, a new member of the spalt gene family in chick, *Mech Dev* **102**: 227–230.
- Favor J., Sandulache R., Neuhauser-Klaus A., Pretsch W., Chatterjee B., Senft E., Wurst W., Blanquet V., Grimes P., Sporle R. und Schughart K. (1996). The mouse Pax2(1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13870–13875.
- Fekete D.M. (1996). Cell fate specification in the inner ear, *Curr Opin Neurobiol* **6**: 533–541.
- Fekete D.M. (1999). Development of the vertebrate ear: insights from knockouts and mutants, *Trends Neurosci* **22**: 263–269.
- Finkenzeller D., Fischer B., McLaughlin J., Schrewe H., Ledermann B. und Zimmermann W. (2000). Trophoblast cell-specific carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 9 is not required for placental development or a positive outcome of allotypic pregnancies, *Mol Cell Biol* **20**: 7140–7145.
- Fritsch B., Barald K.F. und Lomax M.I. (1997). Early embryology of the vertebrate ear., *Development of the Auditory System* (Hrsg. Rubel E.W., Popper A.N. und Fay R.R.), Springer Verlag, New York.
- Gashler A.L., Swaminathan S. und Sukhatme V.P. (1993). A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1, *Mol Cell Biol* **13**: 4556–4571.
- Gelehrter T., Collins F. und Ginsburg D. (1998). *Principles of Medical Genetics*, 2nd Edn., Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.
- Gerwin N., Rosée A.L., Sauer F., Halbritter H.P., Neumann M., Jäckle H. und Nauer U. (1994). Functional and conserved domains of the Drosophila transcription factor encoded by the segmentation gene knirps, *Mol Cell Biol* **14**: 7899–7908.
- Gilbert S.F. (1997). *Developmental Biology*, 5th edition Edn., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Goodrich L.V. und Scott M.P. (1998). Hedgehog and patched in neural development and disease, *Neuron* **21**: 1243–1257.

- Grainger R.M. (1992). Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination, *Trends Genet* **8**: 349–355.
- Graw J. (1996). Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates, *Dev Genet* **18**: 181–197.
- Greer J.M., Puetz J., Thomas K.R. und Capecchi M.R. (2000). Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution, *Nature* **403**: 661–665.
- Gruss P. und Walther C. (1992). PAX in development, *Cell* **69**: 719–722.
- Hamburger V. und Hamilton H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo., *J Morphol* **88**.
- Hammerschmidt M., Brook A. und McMahon A.P. (1997). The world according to hedgehog, *Trends Genet* **13**: 14–21.
- Han K. und Manley J.L. (1993). Transcriptional repression by the Drosophila even-skipped protein: definition of a minimal repression domain, *Genes Dev* **7**: 491–503.
- Hanahan D. (1985). *Techniques for transformation of Escherichia coli*, DNA cloning. A practical approach., IRL Press, Oxford.
- Hanks M., Wurst W., Anson-Cartwright L., Auerbach A.B. und Joyner A.L. (1995). Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2, *Science* **269**: 679–682.
- Haraguchi R., Suzuki K., Murakami R., Sakai M., Kamikawa M., Kengaku M., Sekine K., Kawano H., Kato S., Ueno N. und Yamada G. (2000). Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation, *Development* **127**: 2471–2479.
- Harroch S., Palmeri M., Rosenbluth J., Custer A., Okigaki M., Shrager P., Blum M., Buxbaum J.D. und Schlessinger J. (2000). No obvious abnormality in mice deficient in receptor protein tyrosine phosphatase beta, *Mol Cell Biol* **20**: 7706–7715.
- Hentze M.W. und Kulozik A.E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay, *Cell* **96**: 307–310.
- Hinrichsen K.V. (1990). Gesichtsentwicklung, *Humanembryologie* (Hrsg. Hinrichsen K.V.), Springer-Verlag, Berlin, 650–692.
- Hodge R. (1994). Preparation of RNA gel blots, *Methods Mol Biol* **28**: 49–54.

- Holleman T., Schuh R., Pieler T. und Stick R. (1996). *Xenopus Xsal-1*, a vertebrate homolog of the region specific homeotic gene *spalt* of *Drosophila*, *Mech Dev* **55**: 19–32.
- Hu G. (1993). DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment, *DNA Cell Biol* **12**: 763–770.
- Ishikiriyama S., Kudoh F., Shimojo N., Iwai J. und Inoue T. (1996). Townes-Brocks syndrome associated with mental retardation, *Am J Med Genet* **61**: 191–192.
- Jean D., Ewan K. und Gruss P. (1998). Molecular regulators involved in vertebrate eye development, *Mech Dev* **76**: 3–18.
- Johnson G.D. und Nogueira Araujo G.M. (1981). A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy, *J Immunol Methods* **43**: 349–350.
- Johnson J.P., Poskanzer L.S. und Sherman S. (1996). Three-generation family with resemblance to Townes-Brocks syndrome and Goldenhar/ oculoauriculo-vertebral spectrum, *Am J Med Genet* **61**: 134–139.
- Johnson R., Laufer E., Riddle R. und Tabin C. (1994). Ectopic expression of Sonic Hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites, *Cell* **79**: 1165–1173.
- Johnson R.L. und Tabin C.J. (1997). Molecular models for vertebrate limb development, *Cell* **90**: 979–990.
- Jorde L., Carey J. und White R. (1995). *Medical Genetics*, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, Missouri, USA.
- Joyner A.L. (2000). *Gene Targeting*, 2nd Edn., A Practical Approach, Oxford University Press, New York.
- Jürgens G. (1988). Head and tail development of the *Drosophila* embryo involves *spalt*, a novel homeotic gene, *EMBO J* **7**: 189–196.
- Jürgens G. und Weigel D. (1988). Terminal versus segmental development in the *Drosophila* embryo: the role of the homeotic gene fork head, *Roux's Archives of Developmental Biology* **197**: 345–354.
- Kaufman M.H. (1992). *The Atlas of Mouse Development*, Academic Press, London.
- Kaufman T.C., Lewis R. und Wakimoto B. (1980). Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A, B, *Genetics* **94**: 115–133.
- Kessel M. und Gruss P. (1990). Murine developmental control genes, *Science* **249**: 374–379.

- Koehler M.R., Bosserhoff A., von Beust G., Bauer A., Blesch A., Buettner R., Schlegel J., Bogdahn U. und Schmid M. (1996). Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-q13.33 by fluorescence in situ hybridization (FISH), *Genomics* **35**: 265–267.
- Kohlhase J. (1996). *Isolierung und Charakterisierung einer humanen Genfamilie mit Ähnlichkeit zu spalt, einem regionsspezifischen homöotischen Gen von Drosophila melanogaster*, Med. diss., Universität Göttingen.
- Kohlhase J. (2000a). Mündliche Mitteilung.
- Kohlhase J. (2000b). SALL1 mutations in townes-brocks syndrome and related disorders, *Hum Mut* **16**: 460–466.
- Kohlhase J., Altmann M., Archangelo L., Dixkens C. und Engel W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2, *Mamm Genome* **11**: 64–68.
- Kohlhase J., Hausmann S., Stojmenovic G., Dixkens C., Bink K., Schulz-Schaeffer W., Altmann M. und Engel W. (1999a). SALL3, a new member of the human spalt-like gene family, maps to 18q23, *Genomics* **62**: 216–222.
- Kohlhase J., Köhler A., Jäckle H., Engel W. und Stick R. (1999b). Molecular cloning of a SALL1-related pseudogene and mapping to chromosome Xp11.2, *Cytogenet Cell Genet* **84**: 31–34.
- Kohlhase J., Schuh R., Dowe G., Kühnlein R.P., Jäckle H., Schroeder B., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H.A., Köhler A., Müller U., Raab-Vetter M., Burkhardt E., Engel W. und Stick R. (1996). Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the Drosophila gene spalt, *Genomics* **38**: 291–298.
- Kohlhase J., Taschner P.E.M., Burfeind P., Pasche B., Newman B., Blanck C., Breuning M.H., Kate L.P.t., Maaswinkel-Mooy P., Mitulla B., Seidel J., Kirkpatrick S.J., Pauli R.M., Wargowski D.S., Devriendt K., Proesmans W., Gabrielli O., Coppa G.V., Wesby-vanSwaay E., Trembath R.C., Schinzel A.A., Reardon W., Seemanova E. und Engel W. (1999c). Molecular analysis of SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome, *Am J Hum Genet* **64**: 435–445.
- Kohlhase J., Wischermann A., Reichenbach H., Froster U. und Engel W. (1998). Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome, *Nat Genet* **18**: 81–83.
- Köster R., Stick R., Loosli F. und Wittbrodt J. (1997). Medaka spalt acts as a target gene of hedgehog signaling, *Development* **124**: 3147–3156.
- Kraus P., Fraidenraich D. und Loomis C.A. (2001). Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling, *Mech Dev* **100**: 45–58.

- Kühnlein R.P., Frommer G., Friedrich M., Gonzalez-Gaitan M., Weber A., Wagner-Bernholz J.F., Gehring W., Jäckle H. und Schuh R. (1994). spalt encodes an evolutionary conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo, *EMBO J* **13**: 168–179.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature* **227**: 680–685.
- Lai E., Prezioso V.R., Smith E., Litvin O., Costa R.H. und Darnell J. E. J. (1990). HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally, *Genes Dev* **4**: 1427–1436.
- Lai E., Prezioso V.R., Tao W.F., Chen W.S. und Darnell J. E. J. (1991). Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head, *Genes Dev* **5**: 416–427.
- Laird P.W., Zijderveld A., Linders K., Rudnicki M.A., Jaenisch R. und Berns A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure, *Nucleic Acids Res* **19**: 4293.
- Lawrence P.A. und Struhl G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*?, *Cell* **85**: 951–961.
- LeCouter J.E., Kablar B., Whyte P.F., Ying C. und Rudnicki M.A. (1998). Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene, *Development* **125**: 4669–4679.
- Lee J.J., von Kessler D.P., Parks S. und Beachy P.A. (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog, *Cell* **71**: 33–50.
- Lewin B. (1997). *Genes*, vi Edn., Oxford University Press Inc., New York.
- Lewis E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, *Nature* **276**: 565–570.
- Licht J.D., Grossel M.J., Figge J. und Hansen U.M. (1990). Krüppel is a transcriptional repressor, *Nature* **346**: 76–79.
- Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L. und Ward D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries., *Hum Genet* **80**: 224–234.
- Lin M.S., Comings D.E. und Alfi O.S. (1977). Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes, *Chromosoma* **60**: 15–25.



- Lipschutz J.H. (1998). Molecular development of the kidney: a review of the results of gene disruption studies, *Am J Kidney Dis* **31**: 383–397.
- Liu J.P., Baker J., Perkins A.S., Robertson E.J. und Efstratiadis A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r), *Cell* **75**: 59–72.
- Manak J.R. und Scott M.P. (1994). A class act: conservation of homeodomain protein functions, *Dev Suppl* : 61–71.
- Mansouri A., Hallonet M. und Gruss P. (1996). Pax genes and their roles in cell differentiation and development., *Curr Opin Cell Biol* **8**: 851–857.
- Marigo V., Davey R.A., Zuo Y., Cunningham J.M. und Tabin C.J. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor, *Nature* **384**: 176–179.
- Marlin S., Blanchard S., Slim R., Lacombe D., Denoyelle F., Alessandri J.L., Calzolari E., Drouin-Garraud V., Ferraz F.G., Fourmaintraux A., Philip N., Toubanc J.E. und Petit C. (1999). Townes-Brocks syndrome: detection of a SALL1 mutation hot spot and evidence for a position effect in one patient, *Hum Mutat* **14**: 377–386.
- Masuya H., Sagai T., Moriwaki K. und Shiroishi T. (1997). Multigenic control of the localization of the zone of polarizing activity in limb morphogenesis in the mouse, *Dev Biol* **182**: 42–51.
- McMahon A.P. (2000). More surprises in the Hedgehog signaling pathway, *Cell* **100**: 185–188.
- Mendelsohn C., Ruberte E. und Chambon P. (1992). Retinoid receptors in vertebrate limb development, *Dev Biol* **152**: 50–61.
- Mendelsohn C., Ruberte E., LeMeur M., Morriss-Kay G. und Chambon P. (1991). Developmental analysis of the retinoic acid-inducible RAR-beta 2 promoter in transgenic animals, *Development* **113**: 723–734.
- Methot N. und Basler K. (1999). Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of *Cubitus interruptus*, *Cell* **96**: 819–831.
- Miller J., McLachlan A.D. und Klug A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor TFIIIA from *Xenopus* oocytes, *EMBO J* **4**: 1609–1614.
- Moore K.L. (1996). *Grundlagen der medizinischen Embryologie*, 2nd Edn., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Murakami R. (1986). Development of the os penis in genital tubercles cultured beneath the renal capsule of adult rats, *J Anat* **149**: 11–20.

- Murone M., Rosenthal A. und de Sauvage F.J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex, *Curr Biol* **9**: 76–84.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W. und Roder J.C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 8424–8428.
- Nellen D., Burke R., Struhl G. und Basler K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient, *Cell* **85**: 357–368.
- Newman W.G., Brunet M.D. und Donnai D. (1997). Townes-Brocks syndrome presenting as end stage renal failure, *Clin Dysmorphol* **6**: 57–60.
- Nisani R., Chemke J., Cohen-Ankori H. und Nissim F. (1981). Neural tube defects in trisomy 18, *Prenat Diagn* **1**: 227–231.
- Niswander L., Tickle C., Vogel A., Booth I. und Martin G.R. (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb, *Cell* **75**: 579–587.
- Niswander L., Tickle C., Vogel A. und Martin G. (1994). Function of FGF-4 in limb development, *Mol Reprod Dev* **39**: 83–88; discussion 88–89.
- Norman M., Mc Gillivray B., Kalousek D., Hill A. und Poskitt K. (1995). *Congenital Malformations of the Brain - Pathological, Embryological, Clinical and Genetic Aspects*, Oxford University Press, New York, USA.
- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. und Kluding H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. - I. Zygotic loci on the second chromosome, *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**: 267–282.
- O'Callaghan M. und Young I.D. (1990). The Townes-Brocks syndrome, *J Med Genet* **27**: 457–461.
- Ohlmeyer J.T. und Kalderon D. (1998). Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator, *Nature* **396**: 749–753.
- Onuma Y., Nishinakamura R., Takahashi S., Yokota T. und Asashima M. (1999). Molecular cloning of a novel *Xenopus* spalt gene (Xsal-3), *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 151–156.
- Ott T. (1995). *Isolierung und Charakterisierung eines zum Drosophila spalt-Gen homologen Gens der Maus*, Naturwiss.-math. diss., Heidelberg.
- Ott T., Kaestner K.H., Monaghan A.P. und Schütz G. (1996). The mouse homolog of the region specific homeotic gene spalt of *Drosophila* is expressed in the developing nervous system and in mesoderm-derived structures, *Mech Dev* **56**: 117–128.

- Ott T., Parrish M., Bond K., Schwaeger-Nickolenko A. und Monaghan A.P. (2001). A new member of the spalt like zinc finger protein family, Msal-3, is expressed in the CNS and sites of epithelial/mesenchymal interaction, *Mech Dev* **101**: 203–207.
- Pieler T. und Theunissen O. (1993). TFIIIA: nine fingers-three hands?, *Trends Biochem Sci* **18**: 226–230.
- Pinkel D., Straume T. und Gray J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2934–2938.
- Piscione T.D. und Rosenblum N.D. (1999). The malformed kidney: disruption of glomerular and tubular development, *Clin Genet* **56**: 341–356.
- Powell C.M. und Michaelis R.C. (1999). Townes-Brocks syndrome, *J Med Genet* **36**: 89–93.
- Rapp G., Klaudiny J., Hagendorff G., Luck M.R. und Scheit K.H. (1989). Complete sequence of the coding region of human elongation factor 2 (EF-2) by enzymatic amplification of cDNA from human ovarian granulosa cells., *Biol Chem Hoppe Seyler* **370**: 1071–1075.
- Riddle R.D., Johnson R.L., Laufer E. und Tabin C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA, *Cell* **75**: 1401–1416.
- Rieger L. (2001). Mündliche Mitteilung.
- Rigby P.W., Dieckmann M., Rhodes C. und Berg P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, *J Mol Biol* **113**: 237–251.
- Roessler E., Belloni E., Gaudenz K., Jay P., Berta P., Scherer S., Tsui L. und Muenke M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly, *Nat Genet* **14**: 357–360.
- Rojo S., Stebbins C.C., Peterson M.E., Dombrowicz D., Wagtmann N. und Long E.O. (2000). Natural killer cells and mast cells from gp49B null mutant mice are functional, *Mol Cell Biol* **20**: 7178–7182.
- Rossmiller D.R. und Pasic T.R. (1994). Hearing loss in Townes-Brocks syndrome, *Otolaryngol Head Neck Surg* **111**: 175–180.
- Rudelli R. (1987). Anencephalic phenotype in the 13q-syndrome, *Arch Pathol Lab Med* **111**: 896–897.

- Rusten T.E., Cantera R., Urban J., Technau G., Kafatos F.C. und Barrio R. (2001). Spalt modifies EGFR-mediated induction of chordotonal precursors in the embryonic PNS of *Drosophila* promoting the development of oenocytes, *Development* **128**: 711–722.
- Said K., Jaqart T., Montgelard C., Sonjaya H., Helal A.N. und Britton-Davidian J. (1986). Robertsonian house mouse population in Tunisia: a karyological and biochemical study, *Genetica* **68**: 151–156.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. und Erlich H.A. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* **239**: 487–491.
- Salinovich O. und Montelaro R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal Biochem* **156**: 341–347.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with the chain terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463–5467.
- Sanyanusin P., McNoe L.A., Sullivan M.J., Weaver R.G. und Eccles M.R. (1995). Mutation of PAX2 in two siblings with renal-coloboma syndrome, *Hum Mol Genet* **4**: 2183–2184.
- Sasaki H., Nishizaki Y., Hui C., Nakafuku M. und Kondoh H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling, *Development* **126**: 3915–3924.
- Saunders J.W. und Fallon F. (1966). Cell death in morphogenesis, *Major problems in developmental biology*. (Hrsg. Locke M.), Academic Press, New York, 298–314.
- Saunders J.W. und Gasseling M.T. (1968). Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry., *Epithelial-Mesenchymal Interactions*. (Hrsg. R. F. und R.E. B.), Williams & Wilkins, Baltimore, 78–97.
- Schmidt T.G. und Skerra A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment, *Protein Eng* **6**: 109–122.
- Schoenwolf G.C. (1991). Cell movements driving neurulation in avian embryos, *Development Suppl*: 157–168.
- Schoenwolf G.C. und Smith J.L. (1990). Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances, *Development* **109**: 243–270.

- Schuh R., Aicher W., Gaul U., Côté S., Preiss A., Maier D., Seifert E., Nauber U., Schröder C., Kremler R. und Jäckle H. (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a *Drosophila* segmentation gene, *Cell* **47**: 1025–1032.
- Schwabe J.W., Rodriguez-Esteban C. und Izpisua Belmonte J.C. (1998). Limbs are moving: where are they going?, *Trends Genet* **14**: 229–235.
- Scotting P.J. und Rex M. (1996). Transcription factors in early development of the central nervous system, *Neuropathol Appl Neurobiol* **22**: 469–481.
- Simeone A. (2000). Positioning the isthmic organizer where Otx2 and Gbx2 meet, *Trends Genet* **16**: 237–240.
- Singer N., Gersen S. und Warburton D. (1987). The value of chromosome analysis in cases of neural tube defects: A case of anencephaly associated with fetal dup (2) (p24-pter), *Prenat Diagn* **7**: 567–571.
- Smith J.L. und Schoenwolf G.C. (1991). Further evidence of extrinsic forces in bending of the neural plate, *J Comp Neurol* **307**: 225–236.
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol* **98**: 503–517.
- Stone D.M., Hynes M., Armanini M., Swanson T.A., Gu Q., Johnson R.L., Scott M.P., Pennica D., Goddard A., Phillips H., Noll M., Hooper J.E., de Sauvage F. und Rosenthal A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog, *Nature* **384**: 129–134.
- van Straaten H.W., Hekking J.W., Consten C. und Copp A.J. (1993). Intrinsic and extrinsic factors in the mechanism of neurulation: effect of curvature of the body axis on closure of the posterior neuropore, *Development* **117**: 1163–1172.
- Strachan T. und Read A.P. (1994). PAX Genes, *Curr Opin Genet Dev* **4**: 427–438.
- Strachan T. und Read A.P. (1996). *Molekulare Humangenetik*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Sturtevant M.A., Biehs B., Marin E. und Bier E. (1997). The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing, *Development* **124**: 21–32.
- Suda Y., Nakabayashi J., Matsuo I. und Aizawa S. (1999). Functional equivalency between Otx2 and Otx1 in development of the rostral head, *Development* **126**: 743–757.
- Summerbell D. (1979). The zone of polarizing activity: evidence for a role in normal chick limb morphogenesis, *J Embryol Exp Morphol* **50**: 217–233.

- Summerbell D., Lewis J.H. und Wolpert L. (1973). Positional information in chick limb morphogenesis, *Nature* **244**: 492–496.
- Tabata T. und Kornberg T.B. (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs, *Cell* **76**: 89–102.
- Theunissen O., Rudt F., Guddat U., Mentzel H. und Pieler T. (1993). RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TFIIIA, *Cell* **71**: 679–690.
- Tickle C. (1995). Vertebrate limb development, *Curr Opin Genet Dev* **5**: 478–484.
- Tickle C. (1996). Genetics and limb development, *Dev Genet* **19**: 1–8.
- Tickle C., Summerbell D. und Wolpert L. (1975). Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis, *Nature* **254**: 199–202.
- Torres M. und Giraldez F. (1998). The development of the vertebrate inner ear, *Mech Dev* **71**: 5–21.
- Torres M., Gomez-Pardo E., Dressler G.R. und Gruss P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development, *Development* **121**: 4057–4065.
- Townes P.L. und Brocks E.R. (1972). Hereditary syndrome of imperforate anus with hand, foot and ear anomalies, *J Pediatr* **8**: 321–326.
- Vainio S. und Muller U. (1997). Inductive tissue interactions, cell signaling, and the control of kidney organogenesis, *Cell* **90**: 975–978.
- Van Allen M.I., Kalousek D.K., Chernoff G.F., Juriloff D., Harris M., McGillivray B.C., Yong S.L., Langlois S., MacLeod P.M., Chitayat D. und et al. (1993). Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans, *Am J Med Genet* **47**: 723–743.
- Vogelstein B. und Gillespie D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 615–619.
- Wang B., Fallon J.F. und Beachy P.A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb, *Cell* **100**: 423–434.
- Wassef M. und Joyner A.L. (1997). Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum, *Perspect Dev Neurobiol* **5**: 3–16.
- Wischermann A. und Holschneider A.M. (1997). Townes-Brocks-Syndrom, *Monatsschr Kinderheilkd* **145**: 382–386.
- Yamaguchi T.P., Bradley A., McMahon A.P. und Jones S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo, *Development* **126**: 1211–1223.

- Yang Y., Drossopoulou G., Chuang P.T., Duprez D., Marti E., Bumcrot D., Vargesson N., Clarke J., Niswander L., McMahon A. und Tickle C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb, *Development* **124**: 4393–4404.
- Zardoya R., Abouheif E. und Meyer A. (1996). Evolutionary analyses of hedgehog and Hoxd-10 genes in fish species closely related to the zebrafish, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13036–13041.
- Zörnig M., Klett C., Loav H., Hameister H., Winking H., Adolph S. und Möroy T. (1995). Establishment of permanent wild-mouse cell lines with readily identifiable marker chromosomes., *Cytogenet Cell Genet* **71**: 37–40.
- Zumel R., Darnaude M., Delicado A., Diaz de Bustamante A., de Torres M. und Lopez Pajares I. (1989). Trisomy 20p from maternal translocation and anencephaly. Case report and genetic review, *Ann Génét* **32**: 247–249.

# Anhang

Gen	Genbank-Zugangsnummer
<i>Sall1</i>	NM021390
<i>Sall2</i>	AJ007396
<i>Sall3</i>	X97581
<i>SALL1</i>	NM002968
<i>SALL2</i>	X98834
<i>SALL3</i>	AJ007421
<i>Csa1</i>	AF288697
<i>Csa2</i>	AF304358
<i>Xsa1-1</i>	L46583
<i>Xsa1-3</i>	AB030827
<i>Medaka-sal</i>	U77376

**Tabelle A.1: Genbank-Zugangsnummern der verglichenen *sal*-ähnlichen Gene von Vertebraten.** Diese Nummern werden von der *genebank*-Datenbank als *accession numbers* vergeben. Die Datenbank ist über die entsprechenden www Server (z. B. NCBI Blast Notebook, <http://www.ncbi.nlm.nih/>) zugänglich.



1	tagtaat	ttattctg	ccagctgat	tttgagcCAG	<b>CATGTCGGG</b>	AGGAAGCAAG	60
61	CGAAGCCTCA	ACATTTC	TCCGACCCCG	AAGTGGCCTC	GCTCCCCCGG	CGAGATG <b>gtg</b>	120
121	agtgtccgg	cgccg	acacagacac	gcactcacac	gcacactcgg	accacgcac	180
181	acgcggcggg	ccccgcgccc	accgcccgtt	tcgccttctg	cactcggcgc	gtctgatttt	240
241	atttcatgct	tcctcgattt	aatttgccgg	gccaggtcc	cctgtcccgg	gagagccagc	300
301	ctatcccggc	tggagctttc	cggagttccg	tgtcctcgac	tgggcccggagt	agggtcgact	360
361	ggccggctcg	ctcctccgcc	cagagggtcg	gaggagcccg	ggccacgacc	ctgccgcccc	420
421	gagggcgat	ctctcgggca	gagggcatct	ggagctgccc	acgcgagctc	tctcccgtc	480
481	cccgcgcgcc	accgggtcc	ccgggctggg	cctctgtcgc	ctgggcctca	ccgcccagcc	540
541	ctggagccaa	cgtaaagaa	gtttacttcg	tccgggtggc	tgaacgccga	aggcatgggg	600
601	aactctccgt	accaccccc	ccaaactctc	gttcccactt	ggctagcggg	cgaaatatgg	660
661	tacctttggg	ggttccgagc	cgtgagaact	gggggttggg	gtggaggagc	gacatcctgg	720
721	ggtcgcggcc	gagtgtctgc	ggtcgtctctg	gagactggct	tagggacagg	gaagtgtcgc	780
781	ttggtccggc	ttcccaagtt	tgttctcctg	tcgtttcttt	ccacacttgc	accataacc	840
841	cgtaaaagt	gggcttggat	gtgtgcacc	cacgtattat	ggagtcccat	ccttcgggac	900
901	ccgttctggt	aagggtcatt	agacactttc	ttgggtccc	ggtattagcc	cgccagacc	960
961	ctggagccag	ccgagcaatg	aaggcaggg	tccgaaagga	ctgaatgagt	agggaaaagt	1020
1021	ttgtgtcgg	gaactgtggc	ctagaatggg	agagaccgc	gcagggaact	ggggtcactg	1080
1081	agggaagacc	cccctccgac	cccagcttga	cctgaactgt	tctagggcag	agtttccgag	1140
1141	ctcccaggcc	agaggctacg	ctcgttccg	gggtcaccgg	actttgtgcc	tgactctccg	1200
1201	ctgcgtaggt	tggagagtga	ccagaccoga	ggctcggcgg	ccccggctgc	ccttcgggaa	1260
1261	tcctctgat	ccgggcgtgg	aggaaggagc	tgaccccag	cagagctcgg	aagcgtgacc	1320
1321	tgatctcgc	acctctggcc	actacgtctc	gcggcgcctg	gagcccaca	tctgcaggct	1380
1381	ccgtccccag	aggcctggct	ctgagcggct	ctgggtcggg	gtacgcgcag	gcagagccag	1440
1441	agcgacaagg	gatcgacagc	ttacttcctc	ctcgtgtttg	ggagagggca	atcctggcgt	1500
1501	gagacacctg	gacatTTTT	caggcgatct	gagagccatt	aaggcactgt	tttcccagc	1560
1561	acctttgaaa	gctgaagcct	caccagtgtg	attctctgag	tcctctggaa	ggatcccctg	1620
1621	aaacacacc	agtttcccac	cccaaaagaa	ccggtttgag	ggtaaaacca	gatgaaatta	1680
1681	gccaaggccg	cagcaaccac	tcggactatt	tttgggggt	ttctcagcta	gtttcttagg	1740
1741	ctttctgccg	ccccacaaac	aatctttcct	aaagtgaggc	ctttgcaccg	gagtgctgtt	1800
1801	aaaacttaac	aatttgcata	cgggggtggg	ggtgggagaa	aaacaacctg	gggaaagaga	1860
1861	ggtgtTTTT	ggtttttgtt	ttttaaattt	atactggttg	tttgtatTTT	ccacgcaaag	1920
1921	aatttcaaaa	ctaacaacca	ccacctcgag	cttcggaaga	aaagaccctt	gctagtctct	1980
1981	cgctttgagt	ctagagctgg	aatttttaat	agttaaggct	tctcataaag	cgatagcatt	2040
2041	aaaggagttc	actgcctctt	actattatta	tttattagta	caattTTTT	ttagtTTatt	2100
2101	tgagctttga	ggtaagttaa	ttaaggaact	taatcaagtt	tcctttcttt	ttttctcttc	2160
2161	tttttttca	cttaatttct	ccttttttct	tcctaaaagc	tggttcattg	tcgacaaagc	2220
2221	agtgattatc	ccgaacacc	taggaaacac	ccctcccagg	ccagctcctt	actccctcct	2280
2281	tttcttcagt	agtaaatggt	ttaggttatg	actgttttta	catggctgaa	caataagttt	2340
2341	gggagaagtt	gcctagaggg	caggttttgt	aataggggta	caggatttag	tgtgctgtaa	2400
2401	tagtactcta	cacaagcagc	cctcccagc	agctgacagt	caggagggcc	cgccataacc	2460
2461	cgaatctttt	catttgggaa	tagttgtgag	agacatacag	aggaaagtgc	atgacacagc	2520
2521	tcacgtttgc	tttttaaaag	tcgactcttc	tgcaacgagt	ccagccatct	ccatccattt	2580
2581	ccctaccag	aacagaacat	gtgcctgagg	agccgctgct	gttgggcgtt	tggtgggttt	2640
2641	tttgtttttg	ttttgtttt	ttttacttt	ggaaggcaac	cccttactca	gatgccagct	2700
2701	ttacactttc	tcttgtctca	agagggtctt	actacacaca	gcatatgaaa	tatcaggcat	2760
2761	taccaagta	gatcttgttt	agacccttcc	ccctcccttg	ttgtccccc	gactgtctga	2820
2821	cttctacaca	gaggaaaacc	ttagaaaagt	tttcagagcc	acagtggccc	tgaagcagcc	2880
2881	tctctaattc	tatgttctgt	ggccccatcc	tgtagtatgt	gtcgtgtttg	agttttacaa	2940
2941	agaaagctac	gccttgctaa	gcaccatcc	caacacctcc	attcaatttt	taaaaaaaaat	3000
3001	gattatttag	ttgatcttag	aagttaatct	tagaaccttg	atagtTTatt	ctacttgagt	3060
3061	attcctataa	ggtatTTTT	tgttccttat	gaaaactggg	attgtggtga	gtagggttca	3120
3121	tctcttaaaa	gatattcaac	aagtctccag	ttactttag	agagataagt	agccttggaa	3180
3181	gaattattta	ccatgatgga	taaactctgg	aaaagggaat	gtgcaaatct	aatgatttaa	3240
3241	tttgtgggta	cttttcttt	gagtttggat	ttccaggtgc	gtgcctgtgt	gtgtgtgtgt	3300
3301	gtgtgtctgt	gtgtctgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	ctgtgtgtgt	3360
3361	gtgtgtgtat	ctgtgtgtgt	gtgtctgtgt	gtgtgtctgt	gtgtgtgttg	ggttttttgg	3420
3421	tgggttgggt	cactccattt	ggtggtgatg	gtttcaagat	tcctgcagct	tctgacagcc	3480
3481	cccatccga	ctccattcgt	ttaacaattt	tgctgctcag	ctttttaaag	gaaaggataa	3540
3541	tgttggaaaga	aacttagaac	atcgggaatt	acagagaaag	cattgactct	cctaaggaat	3600

3601	acctgaaaac	cccttcttac	tcatattaat	aaagaaatcc	tattatttac	caaagtaatt	3660
3661	tactcattgt	aagcagctta	atggccacac	attgattttct	gggcccacaa	ggttagagaa	3720
3721	aactataatg	aattctctta	taaaacaaaa	acaaacaaat	aaacaaaaaa	aaaaaaaaaa	3780
3781	aacaagaaaa	gaaccctgac	acctgcaaga	taaggcagtt	ggaagaatt	catgtttcat	3840
3841	caagcccatt	tttaagttg	gcataataga	agattctaga	tgagaaaatg	tgaactgttt	3900
3901	tttggtcttg	ttttgtttg	ttgcgattg	cttcaggctg	caaatacttt	ctaaatgtta	3960
3961	aaaaacaagc	acccgggaaa	gcctgctgag	gcaggagata	aactgggaag	gtagcttttc	4020
4021	ggcattgagc	aattgttggg	gtattttaca	tccagtttct	gcaatggctc	agggcacaag	4080
4081	taccaaatta	taggggtgctg	tttgggaaac	cgtttctttt	ctctaagggt	ggagactttc	4140
4141	agttgtcttt	ttaccaacaa	tatccttcag	aaggcaaaag	cccacatttt	tctggtagcg	4200
4201	aatctggagg	gcatggggag	gagggaaatc	aggcaggttc	cgggtttcaa	aacttagcca	4260
4261	agctcactca	gtgtgaagta	accagaaaaa	aatcgaaatt	cttctgcagc	ttaaatgtgt	4320
4321	ttttttccaa	cacagtccct	agtgcagaaa	acctgtgttc	taaaatattc	tttgaggaga	4380
4381	gaaagagaat	attaacctga	ggcttgacac	tcctccccc	agaaggaaaa	aaagtgggtg	4440
4441	tgccaggctt	tagaaaacct	ggcgtgtgag	agctgtttta	acctttgcca	gcctcctccc	4500
4501	atgcagaggt	gacaaggtcc	agatcataat	gtgtccttca	gtgtcctccc	ggtgaccccc	4560
4561	aatttgagtc	ttgctagtca	cttagcagga	acttggtagt	ttattttagt	ttctccttat	4620
4621	cagcttggtc	tcttttccca	accttattcc	cccgccacc	cccagatgcc	agacccccaa	4680
4681	aggggaagat	tgacaggtag	ttcccacggc	tcagcttcac	cctccaacaa	cagggattta	4740
4741	gtttctgtg	actttgccaa	tgtttgtgta	gtcagtggtt	agatctcgcc	ttaaggagtc	4800
4801	tctcttttac	gcgtcactgg	aataggaaa	ccacagagta	gtttgtgaac	aaaccttgc	4860
4861	tgttggatcc	ccatctagtg	ttcactttaa	ttctccatag	ggaagacatt	ttccccttca	4920
4921	ttgtgagccg	agggtgggtc	tgaccagaa	ctttaaatgg	agtatcttgt	ccatgttatt	4980
4981	ttttttccag	agggttttct	tgtctccttc	cacacaatca	gggctggcac	tgtaaacttg	5040
5041	aaggggacca	gttcatttgt	catttggttg	tatgctgcat	aaaaggaact	tcagacatta	5100
5101	cagaaaatat	gcgcagcata	tgttgtat	acagcttttt	ttttttctgg	aaccttaagt	5160
5161	tggacattcg	gatcctgctt	ttaaaaaata	aaacataaaa	agataaaagca	cactcaatca	5220
5221	aatatgttca	tgatcgctc	tgcaagcagg	cctgtgggaa	ggaacagcct	gttaaaaata	5280
5281	ggggcccaaa	gtccactatt	gtttgagttc	tattaagaaa	tgctaatgta	gtcttaaggt	5340
5341	actggcaagt	aggttaagt	gtctttctga	ggcctccca	aagagaaaa	taaatctggg	5400
5401	agagcctggt	ggttggtttc	tacttttttg	ttttgttttg	ctttgctttg	ttttctgttt	5460
5461	tgtttttggt	ttcccctcct	cttctctcct	ggctggctga	acctttctgt	gcgaggcata	5520
5521	gtttttatat	ttttgctttc	tgagttagaga	ggctgcaacg	cttcgttttc	ctgcttccaa	5580
5581	attctgctgt	gtttggttaa	gaggataaaa	agtgcacaa	ttgaattggg	tacctagata	5640
5641	gttcagccag	agcttaaa	tctggaatt	aagtgcacaa	ttggtaatga	ttcaacatct	5700
5701	ccttcaaaaa	aagaacagaa	attctaagca	ctttttgggg	gggttgctga	ggggaaaaaa	5760
5761	gggctcttgc	tttgtaaatg	ttcctatctg	gctggaatta	cgagatttgt	gtgaatgcaa	5820
5821	aatccataga	aaagaatctg	gaatgtgatt	ttcactacaa	taggaggaac	aagggaaactg	5880
5881	tagttactaa	aaggaggtca	ccagttgcca	tcctgtgtaa	cagattattt	aaagagatac	5940
5941	aagaacacag	ggctctgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtttctgcct	6000
6001	gctcgttatc	taattgtaac	ttttagtcat	tccttttagt	aactgggcta	aagatccatg	6060
6061	ctggtttccc	tggaattctg	ttcaccatgc	agaatgggtt	aaagttaggc	actgtagagt	6120
6121	gtagcaaac	ctgcttctga	gccgaatcaa	aatagatgcc	aggatttggg	agggagcaga	6180
6181	ttgttcataa	acatcaggaa	attaaattag	ctgatggtac	agtgcgatca	aatgtcagct	6240
6241	tgctaaattg	tgaaaatcga	agctcaaata	tggccaactt	ttataaaggg	tctctctctc	6300
6301	tctctctctc	tctctctctc	tctctctctc	tctctcaaaa	gcaagcaggc	atttattttc	6360
6361	aagcgtcttt	attttccatc	taattagcat	aatcctaaat	ataaaaatgt	tcaggtagaa	6420
6421	aaacttaaaa	attctctcaa	gtgagtcttg	aagcggcacg	aatgcaaaac	cccagtgacg	6480
6481	ggaagtagaa	atcagtgtaa	ccttcgaaag	taacctagct	tttatttttt	ttctatata	6540
6541	tatgagaata	tcagatgttt	gcaagttata	aagaattaaa	atgcccttta	accgtgagca	6600
6601	cagatgtgct	aaatatttga	agcaaccaca	ttgtaatgtg	tacaattgat	gaagttagct	6660
6661	ttctgatttc	ccttgctggt	tatttagttc	tgaatctgtc	attatttgtc	taagcccagc	6720
6721	tgaccaagca	aaactgtggt	ttaaagtggc	tttatgtttt	gataaatgtg	agctggttga	6780
6781	aaagtatttt	ccactgaatg	cagagcttaa	tagaacatgc	tgacataata	gttttaatgc	6840
6841	attttggtga	aatgtgtgta	acaaacagaa	tagcttttgt	tccttcataa	ttggctgtaa	6900
6901	aagtagatgg	aaacatagcc	attacataty	gaaatgtgca	aagagaaaga	ataaacattt	6960
6961	ctgttgaaata	tattaggaat	tgcatttcct	agttttaa	aagcatctga	aatgggggat	7020
7021	cattttaa	cagttgtcaa	aatacgaagc	tttactctga	atttttgtca	catcattttt	7080
7081	ttttgtccc	gcgtgaggca	ggataacttt	agcaaatttc	atttaatttt	ttgtttgtag	7140
7141	tatttcaagt	caggagaaga	gacagaaagt	gcttaaaa	gcaccttcag	cgagcatggg	7200

7201	aatctggtgc	caattaggat	gattaaacat	taaattaaaa	ctggatcatt	attggtat	7260
7261	tctgctacaa	ctgcgatttg	tttgggtgtg	ttaatgcatg	ttgactata	accccgtgta	7320
7321	gatttaaaga	tgggatttag	gaaagctggc	ttattaaata	taactcagcc	actaaaacta	7380
7381	tgccagtgag	gagagtgcac	gcgtcccctc	tctcctctgg	ccagcagact	ttaccagggg	7440
7441	ccctaatcaa	cttctcctc	actccaggca	gatagagtta	aggaatttca	caagtgacta	7500
7501	tttaggtgtt	aattgtat	tctgaaatgc	aaaactcttc	cgagcttttt	agatgcttaa	7560
7561	tccaaaagga	taacctctgg	ctcttctgaa	tgtgctctgg	gttgactggg	atttctgggg	7620
7621	taggcagcat	tttgattttc	catgtattca	tatctgcaat	tacttttttt	tttctcctg	7680
7681	caagttttct	agaagattca	atgtggaagt	catggaaact	acctattatc	tgattcagct	7740
7741	ctgtagaaaa	gcatacgggg	aggcaatcct	tgaattaaac	agtttttttt	tttcaacagc	7800
7801	ctttggagat	gaccacacac	accattcgta	caacaggagc	tggtgttccc	catgctgagc	7860
7861	aaacaagggg	acgccattct	gtctttgaat	aggatgttag	cttggagtgt	gagatttgat	7920
7921	gtttaattta	caaatggatc	ttagttagaa	gacatctgag	caaccagtaa	agcctaaaca	7980
7981	tcaagggata	tgaatagggg	gatggatgga	tggatggatg	gatggatgga	tggatggatg	8040
8041	gatgtgtgtg	tgtgggtgtg	tgtgggtgtg	tgtgtgatgt	atatgtatat	gtatatgtat	8100
8101	atgcaatgta	ttcaggacaa	tctgttagac	aatcgataac	accaaagggc	aaagtatttt	8160
8161	taaaaggcatt	cagacaagaa	tttccaaact	ctcccctggg	tgggcatgat	tttcaagga	8220
8221	agggaggacc	tctcagcacc	ttcttcttca	gctagcattt	agcagaactg	tagatgccac	8280
8281	gccaattttt	agagacagaa	agaccacttt	tgaggattat	ttagaacctc	gccacgtgga	8340
8341	gcatggtggc	atatattctt	tacctaggag	aatgtagcag	cagagctcaa	tcctgaaatt	8400
8401	gaaaaattca	cgtctggggg	gggggtgata	cataggtacc	agacaggcct	gtgagggata	8460
8461	accatcctgc	attcttttca	ttttgcctgt	gaggggtgtg	ctttctggtt	tgaagtcgaa	8520
8521	acgggtctgt	tactgattgg	actgaaactgt	gtttgtcacc	actgggcccc	caagctcagg	8580
8581	atccaggcag	ggacttgagg	tgattctgaa	gtcatcagtc	cccagctggg	tgatatgcat	8640
8641	tttccccctt	tgtcaacaac	tgattggaac	ctgaacgact	acaaattagt	ttagtgcacg	8700
8701	aacagactgt	cacagatata	tttgcacag	ttgaaatga	ataaggttga	cagaaactca	8760
8761	agagcctaata	aagtccctcag	tgtgctggag	ggaccctctc	ccggcaagta	gacaatcggg	8820
8821	gtataaaaata	ttgaaaatca	atattttgct	atggaatttc	attatgtacc	aatgtccacc	8880
8881	cttcattgga	ttttatattt	tgatgaatta	tctaaaggcc	ttaactatcc	aaaataccag	8940
8941	ctagtccagta	gttcctcggc	atcccaggaa	atacagcctg	gctttggggg	ggtcacattt	9000
9001	ggagtttagc	agatagaaaag	catttatggc	cctttctatc	aatttcaagt	cattactgac	9060
9061	agtctgtcct	cgcttcactt	ttaaccctgc	accttttgat	gtttgtaggg	GACACAGAGA	9120
9121	AGGGTCAACC	AAGTCGCCCC	ACTAAGAGCA	AGGATGCCCA	TGCTGTGGC	CGGTGCTGCG	9180
9181	CTGAATTCTT	TGAATTATCA	GACCTTCTGC	TCCATAAAAA	GAGCTGCACT	AAAAATCAAT	9240
9241	TAGTTTTGAT	TGTC AATGAA	AGTCCAGCCT	CCCCAGCAA	AACCTTCCCT	CTGGCCCCGT	9300
9301	CTCTCAATGA	TCCCGATGAC	CAAAATGAAAG	ACGCGGCGAA	TAAAGCAGAC	CAAGAAGACT	9360
9361	GCAGCGACCT	TTCAGAACCC	AAGGGCTTGG	ACAGGGAAGA	GTCCATGGAG	GTGGAGGTCC	9420
9421	CAGTTGCCAC	CACCACCACC	ACCACCCTG	GCGGCAGCGG	CGGGAGTGGT	GGCAGCACTC	9480
9481	TGAGCGGTGT	CACCAACATC	ACCACCCCGA	GCTGCCACAG	CGGCTGTTCC	TCGGGTACCT	9540
9541	CAGCGATCAC	AACCTCTCTA	CCTCAACTGG	GGGACCTGAC	GACACTGGGC	AACCTTCTCGG	9600
9601	TGATCAACAG	CAACGTCATC	ATTGAGAATC	TCCAGAGCAC	CAAGGTAGCG	GTGGCCCCAGT	9660
9661	TCTCCAGGA	GGCAGGTGT	GGGGGGCCCT	CCGGAGGCAA	GCTGCTCATC	TCAACCTTCA	9720
9721	TGGAACAAC	CCTGGCTCTG	CAGCAGCAGC	AGATTCACCA	GCTGCAGCTC	ATAGAGCAAA	9780
9781	TACGTCACCA	AATACTGCTG	CTGGCCTCTC	AGAGCGCAGA	CCTGCCGGCA	GCACCCTCTA	9840
9841	TCCCGTCTCA	AGGTACTCTG	CGAACATCTG	CCAACCCCTT	GACCACACTG	AGTCCCATC	9900
9901	TGTC CAACA	GCTGGCGGTG	GCAGCTGGAT	TAGCACAGAG	CCTTGCTAGC	CAATCTGCCA	9960
9961	ACATCAGCGG	TGTGAAGCAG	CTTCCCCACG	TCCAGCTACC	TCAGAGCAGC	TCCGGCACCT	10020
10021	CCATCGTCCC	GCCCAGTGGT	GGCACTTCTC	CCAACATGAG	CATAGTGACG	GCTGCAGTGC	10080
10081	CCACCCCGTC	CTCAGAAAAA	GTGGCTTCCA	ATGCTGGTGC	CTCCCATGTC	AGTCCCCCGG	10140
10141	CCGTCTCAGC	ATCGTCTCA	CCAGCATTCTG	CAATAAGCAG	TCTGTTGAGT	CCTGAATCTA	10200
10201	ACCCACTTCT	ACCTCAGCCG	ACCCAGCTA	ACGCTGTTTT	CCCTACCCCT	TTGCCAACA	10260
10261	TTGCAACAAC	CGCAGAAGAT	TTGAACTCCC	TGTCTGCCTT	GGCCAGCAA	AGAAAAAGCA	10320
10321	AGCCACCAAA	TGTCACTGCC	TTTGAAGCGA	AAAGTACTTC	AGACGAGGCG	TTCTTTAAAC	10380
10381	ACAAGTGCAG	GTTCTGTGCG	AAGTCTTTCG	GGAGCGACAG	TGCCTTGCAG	ATCCACTTGC	10440
10441	GCTCCATAC	TGGAGAGAGG	CCGTTCAAGT	GCAACATCTG	TGGGAACAGG	TTCTCTACTA	10500
10501	AGGGCAATCT	GAAAGTCCAC	TTTCAGCGCC	ACAAAGAGAA	GTACCCCCAC	ATCCAGATGA	10560
10561	ACCCCTACCC	TGTACCGGAG	CACTTGGACA	ATGTCCCCAC	GAGCACCGGC	ATTCCCTACG	10620
10621	GCATGTCCAT	CCCTTCAGAG	AAGCCAGTTA	CCAGCTGTCT	AGACACCAAG	CCAGTCTTGC	10680
10681	CCACTCTGAC	CAC TPCGTC	GGCCTACCAT	TGCTCCAAC	TCTCCAAGC	CTCAGCCCT	10740
10741	TCATCAAGAC	GGAAGAGCCA	GCCCCATCC	CTATTAGCCA	TTCTGCTGCC	AGTCCCCAAG	10800

10801	GCTCAGTCAA	AAGTGACTCT	GGGGCCCTG	ATTTGGCCAC	AAGAAACCCA	AGCGGCGTCC	10860
10861	CCGAGGAAGT	GGAAGGGTCT	GCTGTGCCAC	CCTTTGGTGG	CAAGGGTGAA	GAGAGTAACA	10920
10921	TGGCAAGCTC	CGCCGTCCCG	ACAGCGGGCA	ACAGTACTCT	GAACTCCCCA	GTGGCTGACG	10980
10981	GTGGTCCAGG	AGGGACCACC	TTCACCAACC	CTCTGTTGCC	CCTCATGTCT	GAGCAGTTCA	11040
11041	AGGCCAAGTT	TCCTTTTGGG	GGACTCTTAG	ATTCTGCCCA	GGCCTCAGAG	ACATCCAAGC	11100
11101	TGCAGCAACT	GGTAGAAAAC	ATTGACAAGA	AGGCCACGGA	TCCAATGAG	TGTATCATCT	11160
11161	GCCACCGGGT	TCTCAGCTGC	CAGAGCGCCT	TGAAAATGCA	CTACCGGACA	CACACTGGGG	11220
11221	AGAGGCCCTT	CAAGTGTAAG	ATCTGCGGCC	GGGCTTTCAC	CACGAAAGGG	AACCTCAAGA	11280
11281	CCCATTACAG	CGTCCATCGG	GCTATGCCTC	CACTCAGAGT	CCAGCATTCC	TGCCCCATCT	11340
11341	GTCAGAAGAA	GTTCACAAAC	GCCAGTGGTC	TCCAGCAGCA	TATTCGTATG	CACATGGGAG	11400
11401	GCCAGATCCC	CAACACCCCA	GTCCTTGACA	ACTACCCTGA	GTCCATGGAG	TCTGACACAG	11460
11461	GCTCCTTTGA	TGAGAAAAAT	TTCGACGACT	TAGACAACTT	CTCAGATGAG	AATATGGAAG	11520
11521	AGTGTCTTGA	GGGCAGCATC	CCAGACACAC	CCAAGTCAGC	GGACGCTTCC	CAAGATAGCC	11580
11581	TGTATCTTTC	GCCTCTGCCC	CTCGAGATGT	CGAGCATCGC	TGCTCTGGAA	AATCAGATGA	11640
11641	AGATGATCAA	TGCTGGCCTG	GCGGAGCAGC	TGCAGGCCAG	CCTGAAGTCT	GTGGAGAACG	11700
11701	GATCCATGGA	AGGGGATGTG	CTGACCAACG	ACTCTTCCTC	AGTGGGTGGC	GACATGGAGA	11760
11761	GCCAGAGTGC	AGGCAGCCCA	GCCATCTCAG	AGTCTACCTC	TTCCATGCAG	GCTCTGTCCC	11820
11821	CGTCCAACAG	CACCCAAGAA	TTTCAACAAGT	CACCCGGCAT	GGAGGAAAAG	CCACAGCGAG	11880
11881	TGGGGCCAGG	CGAGTTCGCC	AATGGTCTAT	CTCCCACCCC	AGTGAACGGA	GGTGTCTTGG	11940
11941	ACTTGACTTC	TAGTCATGCA	GAGAAAATCA	TCAAAGAAGA	TTCTCTGGGA	ATCCTCTTTC	12000
12001	CTTTCAGAGA	CCGGGGTAAA	TTTAAAAACA	CTGCTTGCGA	CATTTGTGGC	AAGACCTTTG	12060
12061	CTTGTCTAGG	TGCCTTGGAC	ATTCACTACA	GAAGTCATAC	CAAAGAGAGA	CCGTTCAATT	12120
12121	GCACAGTTTG	CAATCGTGGC	TTTTCCACAA	AGGGTAATTT	GAAGCAGCAC	ATGTTGACAC	12180
12181	ATCAGATGCG	AGATCTGCCA	TCGCAGCTCT	TTGAGCCAG	TTCCAACCTC	GGCCCCAATC	12240
12241	AGAACTCTGC	AGTGATTCCC	GCCAACTCGC	TGTCATCTCT	CATCAAAAACA	GAGGTCAACG	12300
12301	GCTTGTACAA	CGTTTCTCCT	CAGGACAGTA	AGGACGCCCC	CACTAGTCAT	GTCCCTCAGG	12360
12361	GGCCTCTGTC	GTCCTCTGCG	ACATCCCCAG	TTCTGCTCCC	AGCTCTGCCC	CGGAGAACTC	12420
12421	CCAAACAGCA	CTATTGTAAC	ACGTGTGGTA	AAACCTTCTC	TTCTTCGAGT	GCCTTCGAGA	12480
12481	TCCACGAGAG	AATCACAATC	GGAGAGAAGC	CCTTTGCTTG	CACTATCTGT	GGAAAGCAT	12540
12541	TCACAACAAA	AGGCAATCTG	AAGgtacc	aaattattcaa	ggcgttggga	caggcagcaa	12600
12601	gctacaggct	gcccttgtcc	ctgccatgat	cctgacctca	caaggctcct	ccatgtctcc	12660
12661	ccacctcagc	tacgtggagc	aggtcccctt	tccagaacct	tctcccctggc	tacgcagctg	12720
12721	agggctccag	gaccatgtgc	aatcatcaac	caagggcatg	gggaagggct	gaggggcggt	12780
12781	aggggtcggg	cagagcgggt	acctaagcga	agcagcaggc	ctctttctgc	tgtctagctt	12840
12841	aagtgcatac	aatgaattgc	tttacctacc	aaatcagaca	gcctggcggt	gccatggggt	12900
12901	attgattaaa	gacctccgtg	tgccctgcac	ttcaccataa	tcacttaata	attacagctc	12960
12961	tctacggctc	tcttcggcgt	atgcagctat	ttttcataac	cccagctag	catggtttat	13020
13021	ttttctagca	acagtaacgt	cactcctcac	ctaattgggt	ttatgataat	tgattacacg	13080
13081	acatttccta	ctgatatgtg	ttgaaatat	aagccaatat	gcacggtcta	gagcaacagt	13140
13141	tgagactctc	cgctgtgtac	atthttctgt	tgacagagta	ttcctcggga	ggttgctgcc	13200
13201	agtaatgtgg	gatgaataat	tactttctgt	gthtttctct	ctgcgcaagg	ccctccaatg	13260
13261	ggcaatcagt	gagggttact	ttcttcccat	ctgaaaagga	catctacagg	gtaaagagtg	13320
13321	tcagatacaa	tacttaccac	tgcaatgaga	gtggacataa	caattctaac	cctgcgagga	13380
13381	gctatctatg	actgcctggc	ttgcttgagg	ccattataag	ctaaatacag	gtaataaaaa	13440
13441	cagagtaagt	aagggcagtt	agccaggaag	aagagagcca	accagcact	gcagagagca	13500
13501	aacacgttat	tactagacca	tgggagtgg	tggctcctgg	tgtcttttcc	cctgtctgtc	13560
13561	ctgtaataag	aatagacatt	cgggtcactt	gctttgtcga	gtgttgggat	atgaagttga	13620
13621	gacagaaatc	ggctattaag	ctccctggct	ctctcttgtt	tctctctctt	cccccaacc	13680
13681	acatta <b>cag</b> G	TCCACATGGG	CACCCATATG	TGGAACAGCA	CCCCGCACG	CCGGGCCCG	13740
13741	CGGCTCTCAG	TGGATGGCCC	CATGACATTT	CTAGGAGGCA	ATCCTGTCAA	GTTCCAGAA	13800
13801	ATGTTCCAGA	AGGATCTAGC	GGCGAGGTCA	GGAAGCGGGG	ATCCGTCCAG	CTTTTGGAAC	13860
13861	CAGTATACAG	CAGCACTGTC	CAACGGGCTG	GCCATGAAGG	CCAACGAGAT	CTCTGTCTATT	13920
13921	CAGAACGGCG	GCATCCCTCC	AATTCCTGGA	AGCCTGGGCA	GTGGGAGCTC	ACCTATCAGT	13980
13981	GGGCTGACTG	GGAACGTGGA	AAAACCTGGC	AATTCGGAAC	CCAGTGCTCC	TCTGGCTGGC	14040
14041	CTGGAGAAAA	TGGCGAGCAG	CGAGAACGGA	ACCAACTTCC	GTTTCACCCG	CTTCGTGGAG	14100
14101	GACAGCAAAG	AGATCGTCAC	AAGC <b>TAA</b> AG	TGCCAGAGTG	CTTCTCTCA	GAATGTCGCC	14160
14161	CCGAGGTTGG	CCTCCTGCCC	CTCCCCCGC	CCTTTACCTT	CTGGCCCTG	GGACTATGAA	14220
14221	CTACACTATG	AAGACATTCT	TTTGTATGTT	GTTCAACCTC	TAGAGTTCTA	AGAAAAGCTTA	14280
14281	TTTATTAGTG	CTATAACCTT	GCTTTGCAAA	CAGAGTGCAG	GCATTAACCT	TGGTCTTCTG	14340
14341	TATTTTGGAC	TAAATACTAA	TGGACTAGAG	TGCTCCTAGC	TTGCTGTAAC	ATTTATGGCA	14400

```

14401 ATCGCAAGTT GCCCTGCTAG GCGGTCTTAA TCCGGCATTACTTATTTTC TATATCCAGT 14460
14461 TTAATATGAA TCTGGTGTTC GATGCAATGC CTCCCGTGAT ACGTTAGATC TCTAATAAAG 14520
14521 TTGTATATAA ATGTACACTT TGATCCGCTT GGAAAATTTT ATCAGCGAAC ACATTGTCTA 14580
14581 ATCTTTCCAA ACAGATTTAA GGAAGGACTT TTAAGTACAG GCTGAACATT TGGGAAGGCTT 14640
14641 AGGGTTTGTG GTTGTGTTG TTTGTTTGTG TGTGTTTGTG TTTTGGTTT GGTTCATT 14700
14701 TGATCTAAA CTTCAACCTG CTTTTTTTTT TTTGGTTTGT TTTTAGAGAG TTAACCATT 14760
14761 CCGTTTTGAA CTATTTGTAT TGTGCTTTT ACTTGAGTCG TCTTCAATGT TAATACGTT 14820
14821 TCTGTACAGT AATAAGCACG CAGAATCTT TAGCAGGAAA AAAAAACCA CAAGTGTGT 14880
14881 TTTGGTAGTT GAAACTGAGA CGTAGCATT TGGCCTTGT GGGTATATC ACAGTAGAAA 14940
14941 ACGTGTGCTG GAATTCACA ATGCTGCTAA CGATAGCATC TTGAACGACC TTCAGTGGAG 15000
15001 AAATGTAGAT GCTCTTCTAT ATACAATAAG AAATATCACT TTCATTAATA TGTACATATG 15060
15061 TTCCTTACAA GAGCAAATGC CTCTTGATCA AGAGCAGGTA TAGTGTGGT TTATTTTGT 15120
15121 TTAGGTATGG AAGGAAAAA ATGGACTGTT ACATGCACTT TCTTGAAAG TTGAAGGGG 15180
15181 GGTTCCAATT TCTTTAACAT TTAATACTTA CTAACAACAG AGATACTGTA ATTTTACTCA 15240
15241 AGTAATCAAAAC TACAttttt ttgccacaga taacagagtg cttcctctca gaatgtcgcc 15300
15301 ccgaggttgc ctcctgcccc tcccccgcc ctttacctc tggcccctgg gactatgaac 15360
15361 tacactatga agacattctt ttgtatgtt ttcaacctc agagttctaa gaaagcttat 15420
15421 ttattagtgc tataacctg ctttgcaaac agagtgcagg cattaacttt ggtctctgt 15480
15481 attttgact aaatactaat ggactagagt gctcctagct tgctgtaaca tttatggcaa 15540
15541 tcgcaagtgc ccctgctagg cggctttaat ccggcattaa cttatttct atatccagt 15600
15601 taatatgaat ctggtgttga tgcaatgcct ccgtgatagc ttagatctc aataaagtct 15660
15661 gtatataaat gtacactttg atcctgctgg aaaatttat cagcgaacac attgtetaat 15720
15721 ctttccaaac agatttaagg gaaggacttt aagtacaggc tgaacattg gaaggcttag 15780
15781 ggtttgttgt tgttgttgtt tgttgttgt tttgttgtt ttggtttgg tttcattttg 15840
15841 attctaaact tcaacctgct ttttttttt ttggtttgtt ttagagagt aaccatttcc 15900
15901 gttttgact atttgtatt tgctttttac ttgagtcgtc ttcaatgta atactgttct 15960
15961 gtacagtaat aagcacgcag aattccttag caggaaaaa aaaaccacaa gtgttgttt 16020
16021 ggtagttgaa actgagacgt agcattttgg ccttgtaggg tatattcaca gtagaaaacg 16080
16081 tgtgctggaa tttcacaatg ctgctaacga tagcatctt aacgacctc agtggagaaa 16140
16141 tgtagatgct cttctatata caataagaaa tatcactttc attaaaatgt acatagtctc 16200
16201 cttacaagag caaatgcctc ttgatcaaga gcaggatag tgttggttta ttttgtatta 16260
16261 ggtatggaag gaaaaaatg gactgttaca tgcacttctc tggaaagtgt aaggggggt 16320
16321 tccaatttct ttaacattta atacttacta acaacagaga tactgtaatt ttactcaagt 16380
16381 aatcaaatac attttttttg ccacagataa 16410

```

**Abbildung A.1: Genomische Nukleotidsequenz des *Sall1*-Gens.** Dargestellt ist der in der vorliegenden Arbeit sequenzierte Bereich des *Sall1*-Gens ohne regulatorische Regionen und Exon 1a. Die DNA-Sequenz des kodierenden Stranges der cDNA ist in Großbuchstaben angeführt, die intronische Sequenz in Kleinbuchstaben. Das Translationsstart- und Stoppkodon sowie die Exon/Intron-Übergänge sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die Nummerierungen für die Nukleotidsequenz ist auf beiden Seiten angegeben.

1	aagctttata	cacaaatgag	ggaactggct	tatgctcaag	cagtctgact	tgggggaact	60
61	agcgacctta	acaatactat	aaaccagtgc	tagaactcat	tagaccgata	gacaataagg	120
121	aaacccaac	tgaaatgct	gataaatatt	agaaaatatic	gtatagaatc	tcaaaactac	180
181	cagcttctca	tctagaatat	ccctcaaacc	tcaggctgcc	aggaggatca	aatagtgccca	240
241	gagggtgaaa	aagtctcatt	ttcctattgt	gtatcatttc	cagtgccctt	gagtacctct	300
301	tcagggtctt	ggaaactaag	tccttagtta	cattttccaa	gaattagatc	acagattgaa	360
361	ggagaagat	tgctacactc	atgttttctt	gtcacaggtc	tcttcctttt	ttccatttct	420
421	atctctcctt	tcattctttc	tctcctgtcc	tttctttcct	tctccctccc	tctttcccct	480
481	tcccctcccc	tctccacttc	accacacaca	gaaatccctt	ttgaaagggg	ctttttttcc	540
541	aactcagtga	agtaaagtct	ttgccccttt	gtggggaagg	ctcattaaca	ttcccctcagc	600
601	agcatctctt	caaggattct	acttttgtaa	ttccgaaggg	aggccaagag	gccacaatgg	660
661	agaggtaaaa	aagagaaaaa	aaaatgtggt	aaagaggagg	agggtggaaga	atggagagga	720
721	ggggaagag	accttccttt	cataataagg	ccggcaaaaa	gagggaaaat	aggaaaagat	780
781	gaagatggcc	gagactcaaa	aaaaaagaca	aatacgggtc	cccaagtatg	cccttttaga	840
841	tgtcacacag	atgtctgaga	aaagcagaat	gctgtgtgtg	tgtcttctt	tttcttctc	900
901	acgaagggaa	taaacggtgc	aaacaacagg	aagagggtaa	caggacacag	tccatttctc	960
961	tgaaaagcta	gaatctttcc	tgccctacct	acaatgttcc	actaaaaat	gtgttaaaat	1020
1021	gtgaggagcg	ggacttcgaa	aaacagagag	tgaggcagcc	gctcaggacc	tgaaactaaa	1080
1081	catctggtaa	aatagcagag	attctgggaa	ctccacaaac	ggggagcaat	gagttgccaa	1140
1141	acatctccac	aagtggcatc	ttcctcctcc	tcaatgctag	catcgcttct	agcaccagct	1200
1201	gccttctttc	tcttttttag	tatttgtcac	actagcccgg	acttgtcgag	acaacagagc	1260
1261	tttgcacat	caacataaaa	ggaaaaaata	atgcttttct	aattgggtgt	tcaaatgttg	1320
1321	tcctgcctga	gccagaagag	aaaatgtata	cacagttaaa	caaggaatt	cgatatact	1380
1381	gactagagga	tagggcatga	ctgggatatt	ctagacccaa	tactactcgc	ccggggaaga	1440
1441	cgccataatt	agaagttaaa	gaacaaagcc	gggctgatg	gctcacacct	ttagtcccag	1500
1501	cactcaggag	gcagaggcag	gcagatttct	gagctgagg	ccagcctgga	ctacaagtg	1560
1561	agttccagga	cagccagggc	tacacagaga	aacctgtct	tgaaaaacaa	aaaagaagaa	1620
1621	gaagaagaag	gagaagaaga	agaagaagaa	gaagaagaag	aagaagaaga	agaagaagaa	1680
1681	gaagaagaag	aagaagaaga	agaagaagaa	aagaagaaga	aagaaggggt	atggctgagg	1740
1741	ctgacttaat	tttttaaaat	tagtgggtgg	tggtttatgc	tgataaatat	tgtgctctaa	1800
1801	tggccaaggg	aggaggactg	ctgtgagttc	caggccagtt	tagattgcag	agtgaattcc	1860
1861	aagttagcct	gggctacgga	gtaaaagtc	tatctcaaaa	caacaacaac	aacaacaacc	1920
1921	tgttattggt	tttctgacta	agcatctata	cgtgtagctg	gtgctaacct	taaatttagg	1980
1981	agctcctaaa	ttcttgggta	ttaagaatgc	agatacacia	cagtgtgccc	agctgggtga	2040
2041	attccttctt	tttgtttttc	ccttatgggt	atggggatta	aactaaagcc	attcactgcg	2100
2101	ctaggcaaat	gctctgctgg	taaactgcag	cacagcctac	ctgccagatt	atttaaaagg	2160
2161	tctaatttga	caccacaag	cagtcttttc	cacagaacct	ttgactgta	tttctacct	2220
2221	gtgaagacgt	taaagaggat	ccacggattc	agcacagcct	cctctcagac	tttattctga	2280
2281	agcgcagaag	gaaatcatct	gctctcctgt	cttctcacia	gcataccttc	cactgaaaga	2340
2341	cctggacagg	accaggagag	acagctgtcc	acagcagagc	attcttataa	aaacctgctg	2400
2401	tggatgttgt	atgtggtgac	acacacacct	gtaaatctta	gcgcttgaga	ggcagaggca	2460
2461	ggcaggtcta	tgtgaatttg	aggccaacct	gtctatacag	tgagtccag	gccagccaga	2520
2521	gctacaaaa	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtatg	gggggagggg	2580
2581	cgctgctgtg	ggctggcaca	aattgtctca	gcccttgctg	atcaagtctg	acaaactgag	2640
2641	ttggattccc	aaaactggga	tccagatgta	aggagaaac	caactcccca	caaagttgtc	2700
2701	tttggatttc	cacgttcggt	cattcatgtc	ggatcaggaa	tgctattca	cacatgaatc	2760
2761	atgcacacat	acacagtaat	aactttttca	ttaaaaaatt	taaaagctgc	tgagctaat	2820
2821	tcaagaattt	tagtactaaa	atacatcata	gaagtggaga	tctgtataaa	ttattaaagc	2880
2881	tatatctaca	tgattattat	aatgtctatg	tgtactcagt	ctaccaatct	ttacatattc	2940
2941	cattttcatc	tggcaatagc	tgacttcttg	cctgaaaaaa	aatcaatata	tatgagaaag	3000
3001	tttgtgttga	agtttctaac	ccagaagctg	agcttcgtca	aggcacaatt	atggaaaaat	3060
3061	caaaaggctc	cgaaaggaag	atattgggag	aagAGTTAGA	ACAGCAAGCC	TTGGGCAGTC	3120
3121	CCAGAGAGGC	CGGCAGAGTC	CTGGCAGGGA	GGAGAGGGTT	AAATCCCTTC	CTCTGCAGTA	3180
3181	CAAAAGAAAA	GAGTGTGCGG	AAAGATTAGG	ATTTTTGCTT	TTACAATAGG	AGCTGCAGGA	3240
3241	GCGTTGGGAA	GAAGCTGAAG	GGAAAAAAG	GGGGCGTCTC	TCCTTTAAAG	ACTTGGGAGA	3300
3301	TTGAGAGAGA	AAGGGAGTCG	GGAAAGAGTC	ACACTAGTCA	GTCCGGCTCT	GGGACGGGAG	3360
3361	AATTCCTCTG	CTCCTCAGTG	GTTTGCCTG	GGGTACCGAT	ACCCGTTGGC	CTCAGGCTAG	3420
3421	ACAGGGTGAT	CGGACCAGGT	CACCCATTA	AAACTCAGTG	CGCGGTGAGG	TGCCCTCCCT	3480
3481	CTCTTACCGC	TCACTACTCG	GGAATGTCTC	GGCGAAAGCA	ACGGAGACCC	CAACAGTTAA	3540
3541	TCTCGGACTG	TGAAGGTCCC	AGCGCATCTG	AGAACGgtgg	gtgctggggg	caggaggtag	3600

3601	cggggattcg	gggggtgggg	gggggggagg	tgtaggattc	aaagcctgca	tggttcaggc	3660
3661	cagggcaatg	gagggcacct	cggccaagag	ccaaacctga	gcaggacttg	gtcactgggg	3720
3721	atgtgaagga	ctctagactt	gaggatgagg	agagggctcg	tgcaaaggag	ataccccccc	3780
3781	ttggctgttg	tcgggattca	ttctgtttgt	gttttccttg	cttttctccg	gatgaaatgt	3840
3841	agttttcaaa	ctggctctgt	ctctctaccc	aagagttttc	tctccaagtc	cttctttgct	3900
3901	cgctggtctt	tgtgccgttg	ctaagtaacg	tcctcagacc	tgaagaccgt	ctcttaNggg	3960
3691	tgggatttcc	ccctcttctt	tctggagaga	gttgggttgc	aagagaatga	attggataaa	4020
4021	cgtgaaggtt	cccctgaggg	gggaagagaa	taaagtttct	cattgttgcg	ctgggctgag	4080
4081	agcagaactc	ccagaggaag	aaagctaata	tcggtcagaa	tgcaaggctag	cttgggggtg	4140
4141	tgctcctcct	tatccgaagg	gaaactgaaa	gacagccctg	taaaaggact	caggtttgtg	4200
4201	ttttaagggg	ggcaaagatg	gtatttaacg	tgcgagttaa	cataactggt	catatagcgt	4260
4261	atcactgtat	aaggatcttg	ctatttattt	attttttag	tttctgggac	gatctgctta	4320
4321	tgttgcccag	actagctcta	tagtcaactat	acagccctgg	ttggcctgga	acttttggca	4380
4381	attctcctgt	ctcagacatc	tgaacaaatg	tgacacatca	tgctaagttg	ctgtattttt	4440
4441	ttttttttta	atcaacaaat	ttcctttggg	agaagagaac	aggctatatg	gagctgtagc	4500
4501	caagctggcc	ttaaactggt	aatcctccag	cccctctacc	ttctgtgtgc	tgtgattaca	4560
4561	gccatgcact	ggcacagcag	aatgcaaaag	tctgtgcagt	cttagacaac	tccagcaggt	4620
4621	gaaagccgt	gagaggaaga	ggaggacatt	aggaaactgat	tgttcaacgc	ctccgagata	4680
4681	accgaagacg	tggtcagcgg	gaaaaaatt	atgtatctgg	atgcttatat	ccctaaggct	4740
4741	ggtgatactc	actgtctgag	gctgagccag	gaataggat	ctatgtctag	atgagtctga	4800
4801	gactcaagac	agttttggat	taagtagtat	agctacatgt	gtgcctacaa	catggaagtc	4860
4861	agaaagttca	accctggggc	cagtcttttg	cttagcaaac	acatggtatg	cctcaaaata	4920
4921	tataaaataa	ggttatgcat	aagggttctg	aagtcataatt	tttaggattg	gttttttttt	4980
4981	ggacaaaacc	agttccccct	ctatgctagc	tatacaagct	tggttttgct	tctctgtgcc	5040
5041	tcagtttctt	catctgttag	acagagatgg	ataagtaaaa	tagttacctt	attaacctgg	5100
5101	gtaagctctt	tggggaaatg	gccagcataa	atggcatttc	ttagagacat	acttaccata	5160
5161	agtacttagt	gagaaggaat	attgcagtta	tcacatgtga	gggcagtgac	cactcagggg	5220
5221	cctcagtatg	cctttataag	acacgcaggg	ctctggggga	ctgtatttgt	ggcagctaga	5280
5281	actaattatg	aactgaactt	gtttccactc	tacaaaaatg	actttcggtc	gagtcagtg	5340
5341	agcatgcaca	atgaaacctt	aacaaacaag	ttaagtgttg	ggtaggacca	tcttcccaag	5400
5401	ccattgcttg	gctgagatcc	cactgtgccc	atatttagag	gttctatggt	gatggcatcc	5460
5461	ttccccctg	agacacatta	agccttctta	atgctgctat	aggccgatg	tttcttctg	5520
5521	gagctctata	ggagatttcc	cctagagcct	gagagttgcc	tctcagctct	gcttccctgc	5580
5581	tggtaaatg	tggaaactgt	ctgaacgcca	cccccaaccc	ccaagaggca	tgttctcctc	5640
5641	gecttcttcc	catctgctca	cccattcccc	acaccgtggc	tgagggaaag	ttttctgcac	5700
5701	aagtccagg	gtgtccagca	gctggattct	caagcctttt	agggtacagt	ttcactagga	5760
5760	gggctctgga	tacctggaag	tgtagtacg	ctgctgtaga	tccattccta	tagaaaccgg	5820
5820	aaaggcttac	accctatgaa	gcaagaaaat	ttaggtagat	aaactttgca	ttggtaggag	5880
5881	aggccaaagg	taacataggg	atctgcctta	agcagaagga	aagtgcctgac	cagctctctg	5940
5941	tccgtggcag	tggctcctcag	ccttcctaata	gctgcaaccc	tttaacacag	ttcctcatga	6000
6001	tgtggtggcc	ccaaccataa	catttgtggt	gctactgcat	aactttaatt	ttgctactgt	6060
6061	tatgaatcat	catgtaagta	tctgttttct	gatggtctta	ggcgaccctt	gtgcaagggt	6120
6121	catttgggtct	ctaagaggtc	ggtccaaaca	cacaggttga	gaaacagttg	gtccatggca	6180
6181	tatgcacacg	cacataaata	ctactactcc	tacaataata	ataaatcata	aacaatcttt	6240
6241	ttttttttga	gatggggttt	ctctgtgtag	ttttggctgt	cctagaactt	gaatctgtaa	6300
6301	actcgccctag	ccttgattgt	tgttgatttt	ttttgcttgt	ttgtttgttt	gcttgtttta	6360
6361	aagatttgct	ctaaggcata	agagcacaga	ttgctttatc	agaggaccca	atttagattc	6420
6421	acagtaccaa	catggcagct	cacaaccatc	tgtaattcta	gtgccagggt	accatttgcc	6480
6481	ctcttctggc	ttccatgggt	accaggtcca	aaagtgggtg	gtatacatag	atgcatgcaa	6540
6541	gacactcata	gctataaaaat	aaaaataaat	acattttaaa	gaaaatattt	atttatttta	6600
6601	tgtatatgag	tacactgtag	ctgtcttcaa	acacaccaga	ggagagtatc	agatcccatt	6660
6661	acagaagggt	gtgagccgcc	atgtggttgc	tgggaattga	actcgggacc	tctggaagag	6720
6721	cagtcaagtgc	tcttaagccc	ctgagccacc	tatacagccc	aataaataaa	ttttttttta	6780
6781	aaatctacct	taagaactcc	taaagttctg	ggcatggtgg	tactctaate	ccagtgtctga	6840
6841	ggagacagag	acaggtcgat	ctctgtgaga	ccaagaccat	caaagaaaag	agaaagaacg	6900
6901	aaagaacgaa	agaacgaaag	aacgaaagaa	agaagaaag	aaagaaagaa	agaaagaaag	6960
6941	aaaggaagga	aggaaggaag	gaaggaagga	aggaaggaag	gaaggaagga	acggaggggag	7020
7021	ggaagggagg	gagggagcag	aaagaactcc	taagggtttt	tatatcagaa	ctccttggag	7080
7081	attttcttat	ctagtctcct	ttcatgacct	gaatagaggc	ctgttggttc	tctcctgcaa	7140
7141	ttgacatggc	tatctaaaac	tctctccttt	cttataagca	tgtaacatat	aaattctcat	7200

7201	tctctcctct	tcataggggt	gtctctaaaa	ggattgggct	atagtagaaa	gctaaagaga	7260
7261	ttgcctggca	ttcatgggga	gccttgccct	atcatttaca	cagaatccac	taatacccat	7320
7321	gccatcatta	tgtttctaac	cttgccctcc	accccagagc	atggcccaga	gtagacagg	7380
7381	aaggattcgg	gatgtaactc	agggaaagag	cgtgtgtgag	gcccttggtt	ttatctacac	7440
7441	acaaagcaat	gattacacta	aataagacct	gcctgccgtc	catcctttgc	ttatctgtaa	7500
7501	acttagagtg	catttctatt	gtgcctttaa	gaaacagccc	cgagaaacct	atthtcccac	7560
7561	tttcttcttg	cacagctccc	tgatgagaac	atcaaaacct	aacagaatac	ttcccacaca	7620
7621	taagtgatga	gcaggaaaga	ggctacttac	tcaaaaactc	gggagaaaga	agaagagtct	7680
7681	ctccccaca	gagtctagat	atcagaatta	gagggcataa	gggacatcac	cggaggaaat	7740
7741	gttaactggg	acatctgggg	aatgatcaga	agcccagata	tttagtgagg	agaaaccagg	7800
7801	acaacagcca	cgcagacctg	gaggagagaga	agggagctgg	caaacagcaa	gaatagcaga	7860
7861	ggcaaggaag	gcaaaaaata	gggcacctta	cacatgaaag	agagggtca	tctctcaggc	7920
7921	ttctgaacct	acagagactt	cagttttagg	tacctgctgc	agtggccgctc	agaaagaata	7980
7981	tatctctaag	tagacagaaa	gtaattcagg	agtctgtggt	gtcgtggaag	caggatgatc	8040
8041	atgagttcaa	ggccagtctg	agcaactcta	gactgtcaag	aaaggatggg	agacagggag	8100
8101	agagactgac	tgacttagcc	ttggctagaa	cttgggataa	gaaacagaa	aaccacctt	8160
8161	ttctttttct	ttctttcttt	tgtttttggt	cgttcgtttg	tttgtttgtc	cttgagacag	8220
8221	gttttctctg	tttgttttgc	tatcactctg	tagaccaggg	tagcctcaag	ctcaaagaga	8280
8281	tctgcttgtc	tctgcctcct	aatgctggg	attaaaggca	tgagcacac	tgcccttcgc	8340
8341	ccttctttgg	agtaaactgg	gttttcaaat	taaagggagc	tgggcagtgg	tgcatgcttt	8400
8401	taatcccagc	acttgggagg	cagaggcagg	tggatttctg	atthcagagg	cagcctggctc	8460
8461	tcacagtgga	gttccaggac	agctagggct	acacagagaa	acctgtccc	agaaaaaaa	8520
8521	aaaaattaaa	ctagtctggc	gctcaaggat	atatgatatg	accttttaac	cctgaacaaa	8580
8581	ttcttttttc	ccaagttttc	aaggaagggg	aaccaccca	ccccccactc	ctcattttgt	8640
8641	tttgtgtttt	ggtgtgtttg	tttgttttgg	tgatggcatc	actgtagctc	agactggctc	8700
8701	tctgtgaatc	cctgatcctt	ctgcttcagc	ctcccagcc	ctgggatcag	aagcctatgc	8760
8761	caatattcat	accatgtgg	atctcagggt	tggctgccca	gaccatagtg	ctcaccaggg	8820
8821	acacatgcag	tggctgtgct	ccgctgttct	gttcttgca	ttccttcatt	ttattccttc	8880
8881	ccactcctcc	atcatcagct	gcctacaat	aacttgtttg	tttgtttggt	gtttattctg	8940
8941	agacagggtc	tcactaagta	gccttagctg	gccttgaact	cacaagagat	ctgtctgcct	9000
9001	cagtcacctg	aatgctgaga	ttaaaggcat	gtgctaccac	atctagctgt	cttcatattca	9060
9061	ttatttttat	tttagcgtct	ttattttatt	ttatgtgat	gggtgtttta	cctgcatata	9120
9121	tgccagtgtt	ctacatgtgt	gcttgggtgt	tgtagaggcc	agaagagggg	gtcagagggg	9180
9181	gtcagatcct	gtagaactgg	ggttacagtc	agtgtgatg	tgggtgctgg	gaaccaaacc	9240
9241	tgggtcctct	gcaagaacag	caaatgcata	catttgatcc	aaaacttggg	ggcagagggg	9300
9301	ggcagatctc	tgagtttgag	gccaacctag	gtccacagag	ccagtttcag	gacagccaag	9360
9361	gctactcagt	aacctgtct	taaaaaaaaa	aaaaaaaaagg	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	9420
9421	taagaataag	aagaataagg	catggtggca	cacaattaca	cagttttaat	ctttgcactc	9480
9481	agaagaaaaa	gataaatgga	tctctgtgag	ttccaggtag	cctggtatatac	agaatgagtt	9540
9541	tcaagccatc	cagggtctaca	gagagacctt	gtttcaagat	gaaagaaaga	aaggaagaga	9600
9601	gacagacaga	cagagagaca	gagtcagaga	ttctcctcaa	gttgaaaaga	gaaaaaaacc	9660
9661	ctttaattga	ctatttgtgc	tcagtgaagg	gtcagatctc	taaaatacct	ttgagcttca	9720
9721	agacagtgtc	tgcatctctac	acaaatgtct	tcctcacttg	gtatctggta	tctgagtcac	9780
9781	cttgccctctc	atctactgcg	tggaacaggc	catgggtgca	tctgcagggt	tcagtatagc	9840
9841	agtttggttt	gacaaagaac	gacgtgtatg	agtttagtaa	agaagactga	gaaaagagac	9900
9901	agtgaacag	tctctaaaaa	gtgatcttgg	caacatttac	aagtctatth	ctatttaccg	9960
9961	aggctgccga	tgagcagcga	tttaattcag	gtagcacttg	tgaggaacag	gggaagggtt	10020
10021	gaagagcata	gtccttgaag	ctctattatt	ggagtacttg	cctcttcttg	tgtgctgtgg	10080
10081	gatgggattg	tgtgtgtgct	ggacacggaa	cccaggcct	gtggactgat	aatactttgc	10140
10141	cactggacag	cagcagcagc	agaccatagt	ttcaacacgt	cattgatatac	tgtaatatata	10200
10201	atcagggtct	tactctatgt	agctcagaaa	ttaaatagtg	gcacagccag	acactggagt	10260
10261	gacaggcact	catgcccact	ctgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	10320
10321	gtgtgtgtat	acatgcatgg	ttcacttagg	attaaactca	gagcctcaat	ttgtattagg	10380
10381	taagtgtctc	tccactgaaa	ggtccttccc	agccttcagc	agtacaatgg	aataagtgg	10440
10441	gagcttcata	aaacactaat	gcttaggctg	gagagatggc	tcagcgggta	agagcactga	10500
10501	ctgctcttcc	agaggtcctg	agttcaaatc	ccagcaacca	catgggtggc	cacaaccatc	10560
10561	tgtaattggg	tctgcccctt	agggcctttg	aatgtattht	agccttgaga	tgggtttttt	10620
10621	tgtttggttg	gtttgggggtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgttttgt	10680
10681	tgtttactct	ttctttcttt	ctttctttct	ttctttcttt	ctttctttct	ttctttctct	10740
10741	ccctccttcc	ttccctcctt	ccttccctcc	ttccttccct	ccttccctcc	ttccttccct	10800



10801	cctccctccc	tcctccctcc	ccttccttct	tctgtttgtg	attgaactca	gggactcctt	10860
10861	ttgagttata	gtcccagccc	aagacatcag	aatgtcctaa	aagctctaaa	ggcagtccta	10920
10921	atgacagtaa	aggctgagag	ccactgttta	gatacaccac	tctgtctgcc	agggcctatg	10980
10981	tggttttgac	tgtgttcttc	ctaaccattc	tctcccgaagc	ctgaagcagc	ttatcgggggt	11040
11041	accaggtttt	ttgcttattt	ctcagatagt	gtcttatata	gttcaggcta	gccactaact	11100
11101	tatgttgaag	tcaataagga	tacccttgac	cttctgattc	agctgcctcc	gactccaaag	11160
11161	tgctgggggt	aaggtgtgtg	tgccctggtt	atgttgggga	ttgaaaccca	ggggtttgtg	11220
11221	cttgtgccag	actctctgcc	tactgaacta	gacccttagc	ttctggatag	caggcctaga	11280
11281	agagaagcta	cttggctttt	tttgtttggt	tattttattt	tattttattt	tattttttca	11340
11341	gctcttcgta	aatttgaaca	accatgtgca	ggccacatc	catcacagac	cccctttctg	11400
11401	ctacctaggt	gtcacctgct	tagcatgtcc	ctgtgttcta	tgacttttagc	cctgtctgca	11460
11461	cgagaatctc	gctctctttt	tcaggatcgg	cactgagtga	aaaggggtgc	caaggagtgg	11520
11521	gtggttcctc	ttacagtggc	tgctgatata	tcacctttca	ccagggacta	aacttacctt	11580
11581	aaaggtgta	gatcaaatga	cacatcagaa	agcacatttc	attacaaagc	aagaaagggg	11640
11641	acactgtttc	ccaggagaag	aagaaaagaa	aaggattttc	tttcttgtcc	aaggacttga	11700
11701	cagaacagca	actggatata	aaatgttcgg	tgctaattaa	cgactgctcg	gtagaagtc	11760
11761	tccatctgat	tccctctctc	tgacttgagg	gcaggagga	gccacacagc	ctcctttctc	11820
11821	cagctttagg	atacgcattg	gaaactggac	aggagccaga	gtgggtgactg	ctgctccatt	11880
11881	gaattactct	gtggacttga	aaaagtcgct	taacctctgt	gagcttcagt	ttccttatct	11940
11941	gtaacactaa	agcttagctg	tgtctcaaac	aaactgaaac	cctgaactcc	atctccgttt	12000
12001	gcaggggtca	ggtcttagaa	aaacagagtt	agctcatcca	tttcagtgtc	ctgattcatg	12060
12061	aggcttataa	ggctaaatct	tttcttctct	tttttttttt	tttaagattt	attttatgta	12120
12121	aatgagtgtc	ctatctatat	atacaactgc	atccagaag	agggcatcag	atcccagggg	12180
12181	tagatgtttg	tgtgccccca	tgtggttgct	gggaattgaa	ctcaggacct	ctggatgctc	12240
12241	ttaaccactg	agccatcttt	cagccctggg	attattccaa	ggtttaaaac	ataagatggg	12300
12301	tattattatt	aattatttga	ccagagtggg	ctcaaacctc	gagagtcatt	cacttgccctc	12360
12361	tgcttgtatt	gctgggatta	aagacatgcg	ccacaactgc	ccggctattt	tcagtttata	12420
12421	aatacagtag	ctgtttactc	tttttttttt	tttttttttt	ttttttttta	aagacagggg	12480
12481	ctcactatat	aaccaagat	ggtctggagc	tctctatgta	gaccaggctg	gctttgaact	12540
12541	aattgcctcc	tgagtgtggg	ggtcaaaggt	atgtgccacc	actctcaagt	atgtactgaa	12600
12601	attttgatta	gattggggca	catactcccc	ttcctaaggc	tctttaacct	agacataggg	12660
12661	cagtataacc	actcagaaat	taacaagggt	ggggagctga	aggacgaggc	tggcgctcag	12720
12721	gaggagagct	cttgccttag	catttgtggg	atcctagggt	caatccccac	aatgttggga	12780
12781	tgcaagtggc	atggtgaatc	aggtttataa	taatctgagt	ccatgggtag	taggagcagg	12840
12841	aagagctctag	ccagtctgtg	ctatgtagta	agtttgaggc	cagcctggtc	tacagagtga	12900
12901	gttccaggac	agccaggggc	tacacagaga	aacctgtct	cgaagaaaaa	aaaaaaaga	12960
12961	caaccaacaa	gcaaaaagat	attattttag	ttgtatgtgt	attttagggt	ctcttattaa	13020
13021	aaatataaat	ttcctaatac	ataatattta	aggatcttca	aatttaaaaa	agttcctaata	13080
13081	ttatattctc	ttttggaggg	gaaaaagtc	cacatattgt	aatactttgc	ttcaagcatt	13140
13141	ccctagtctg	ggcatacagc	tcggtggtgg	gtcacttggt	acaagttcc	attgccagca	13200
13201	ccacaaaaac	aaacggtttg	caatttgtct	gctttcaaaa	tattttttct	gatagtgtat	13260
13261	gtaaaaatatt	gtctctttat	aaaaaggggg	atggggcatt	ttccgtgcaa	ctggctccag	13320
13321	cttatcagcc	aggcaaaaac	agaagtggga	agactgtgat	tgtagaattt	gaggaaggct	13380
13381	gtgagcttac	cactagactc	aggtaaaaag	accatgtttc	aaaatcaaac	agaaccgagg	13440
13441	aagccatagt	tggagcccta	gcatttggga	agctgaggca	ggaaggttgc	tgattcaaa	13500
13501	tcaacttggg	ttacaccgaa	catttcaaaa	agaaaaagaa	aagaaaaaga	caaaaagaaa	13560
13561	aagaaaggaa	caatatgagt	ttatttattg	ctaccaccaa	aacacaaatc	caagacctga	13620
13621	gatcactttt	ttttccatg	taaaaatacg	ggatttgggg	ctggtgagat	ggctcagtgg	13680
13681	gtaagaatac	ctgactgtc	ttccaaggt	ccagtgttca	agtcccagca	accacatggt	13740
13741	ggtccacaac	catccgtaac	aagatctgac	gccctcttct	ggtgtgtctg	aagacagcta	13800
13801	cagtgtactt	acataataa	aataaatctt	acaaaaacaa	aaaaacaaaa	acgggatttt	13860
13861	gccgggcagt	ggtggcgcac	gcctttagtt	ccagcaattg	ggaggcagag	gcagacggat	13920
13921	ttctgagttc	gaggtcagcc	tggtctacaa	agtgagttcc	aggacagcca	ggccataca	13980
13981	gagaaacctt	gtcttgaaga	aaaaaataaa	taaacaaggg	attttaggaa	gtaggggacc	14040
14041	ctttaaatct	cagttcaagg	aagaaaaaga	atgcagaata	cctggtctgc	ggtacttact	14100
14101	ccctctgaat	aaaaggcagg	gccgatgga	ggtgagcagg	tgctcagtctt	gttagggaat	14160
14161	tgaatccgc	ttggggcccg	ttaggagctt	tggatcctga	gctgcagaca	gtgaaagccc	14220
14221	attccgcata	ttccccattg	tttcagaagg	agctcccctc	cccccagggg	tggagctggg	14280
14281	tggacctcct	taggcctttg	taagctaata	tcttatttaa	ttgtccacat	tagggacggg	14340
14341	gtgggttgga	aagaggttac	cgaaccggaa	agaagggctt	ttttaaaagt	aggaactctg	14400

14401	catttggtat	atggccgggtg	gcctgtggac	tagcttgtgt	tgaactctgg	gggaagggct	14460
14461	tggtgttct	caagaagggg	ccctcaaatg	actcccttgg	gaattctatc	ttgcaatcca	14520
14521	ccccctccc	caaatctctt	ttgtgaaaag	agatgagggg	aagatgggag	taggggtgaa	14580
14581	gacaaaactt	gagatcattc	tgcggtgtgc	gagctggtaa	ggggtgggtg	tttgaggtcg	14640
14641	ctcttcccat	tcttgtcttc	cgacctctga	ggcgagctga	gcaccctttg	gaatccacgt	14700
14701	tttccgagct	cagcagatcc	tttatccaaa	gaaaaattac	tgaagcctat	cgcttaatc	14760
14761	tattgagcgg	gcaatgtttc	ccactgtggg	cttgaggctg	acccagtggg	agcagctagg	14820
14821	ataaaagacat	ctgggggtggg	gagctggcag	aggatagggc	acagtggggc	cctaaggtgc	14880
14881	ctcactgaca	ccTGACCCAG	AGCCGGAGTA	AAGCTTCCTA	GACTTGCCCC	CTCCCCGCTC	14940
14941	CCCCCTCCC	CCCTCCCCC	CGCACTCTCC	GCTCTCGCCT	CCTCCAGCTT	TCGTCTCCCT	15000
15001	CCCTGGAGCT	TCTCCCCACA	AACTCTCCTC	CCCCATCTCC	CCACTACCAG	CTTTCGCCGC	15060
15061	TCCAGCTCCT	CCCCTCCTCC	GCGCCTTCTC	GCTTCCCTCC	CCCCTCCGCC	GCTGCTCCCT	15120
15121	GCCCCCGCCA	CCGCCGTCT	CCTCCGCAGT	CTGGGTCGCT	GGGTGCAAAG	ACTGCCGCAG	15180
15181	CGCCGGCGGC	CTCCCCAGAC	CGGATACCCA	TTGTGTCTTA	ACCCATCCCG	CCTTCCAATT	15240
15241	CCCACGGCCA	<b>TGGCGCAGGA</b>	AACCGGGAGC	AGCTCTCGAC	TCGGGGGACC	CTGCGGGGAG	15300
15301	CCTGCGGAGC	GCGGAGgtgc	ggtagggcc	ggcttgggca	gagatggggg	cctaggggaa	15360
15361	actcgtgtgt	aaggacttta	agtggggegga	taaaatgtgt	gattctgcac	ataggcccca	15420
15421	ggtctcgc	ccattctcac	ccttctctggg	ccagaggagg	gggaggggta	acggaggagg	15480
15481	ctgggagagt	gcgcgcccta	tcccccaacc	cccgttttgc	tggtctgcca	ggaaccacga	15540
15541	gagtcggatc	tggtctgaga	gctagcttcc	tgcaggggtc	gactgtaagc	ttaaattccg	15600
15601	accctaaccg	gaggttctct	ggccgcccgt	tcttttagagc	ctccgttatc	caacactgtg	15660
15661	gcattaccca	cacttttctc	cttgtcttct	<b>ccccagGTGA</b>	TGCTAGCGAG	GAACACCACC	15720
15721	CCCAAGTCTG	TGCCAAATGC	TGCGCACAAAT	TCTCTGACCC	GACCGAATTC	CTCGCTCACC	15780
15781	AGAATCATG	TTGCACTGAC	CCACCGGTAA	TGGTGATAAT	TGGAGGCCAG	GAGAATCCCA	15840
15841	GCAACTCTTC	AGCCTCCTCT	GCGCCCCGAC	CAGAGGGCCA	CAGTAGGTCC	CAGGTCATGG	15900
15901	ATACAGAGCA	CAGCAATCCC	CCAGATTCTG	GGTCTCTGG	GCCCCGGAT	CCCACTTGGG	15960
15961	GGCCAGAGCG	GAGGGGAGAG	GAATCTTCTG	GGCAATTCTT	GGTCGCTGCC	ACAGGTACAG	16020
16021	CGGCTGGGGG	AGGTGGGGGG	CTTATCTTGG	CCAGTCCCAA	GCTGGGAGCA	ACCCCATTC	16080
16081	CTCCAGAATC	CACCTCTGCA	CCCCCTCCTC	CCCCACCTCC	CCCTCCCCCT	CCAGGTGTAG	16140
16141	GCAGTGGCCA	CTTGAACATT	CCTCTGATCT	TGGAAGAGTT	GCGGGTCTG	CAGCAGCGCC	16200
16201	AGATTCACCA	GATGCAGATG	ACTGAACAAA	TCTGCCGCCA	GGTGTGCTA	CTTGGCTCCT	16260
16261	TGGGGCAGAC	CGTGGGTGCC	CCTGCCAGTC	CCTCAAAGCT	ACCTGGGACA	GGGGCTGCCT	16320
16321	CTTCCACCAA	GCCCTACTG	CCTCTCTTCA	GTCCCATCAA	GCCAGCGCAA	ACTGGCAAGA	16380
16381	CACTGGC	ATCTCTTCG	TCATCCTCCT	CCTCTGGAGC	TGAACCGCCT	AAGCAGGCTT	16440
16441	TCTTCCACCT	TTACCATCCA	CTGGGATCAC	AGCATCCCTT	CTCTGTAGGA	GGGGTTGGGG	16500
16501	GGAGCCACAA	ACCCACCCCT	GCCCTTCCC	CTGGCTGCC	AGGCAGTACG	GATCAGCTGA	16560
16561	TTGCTTACC	TCATCTGGCA	TTCCAGGCA	CCACTGGACT	CCTGGCAGCT	CAGTGTCTTG	16620
16621	GGGCAGCAAG	GGGCCTTGAG	GCTGTGCCT	CCCCAGGGCT	CCTGAAGCCA	AAGAACGGAA	16680
16681	GTGGTGA	ACTTATGGG	GAAGTGATCA	GTTCTTGGG	GAAACCCGGT	GGAAGGCACA	16740
16741	AATGCCGCTT	TTGTGCAAAA	GTATTCGGCA	GTGACAGCGC	CCTGCAGATC	CACCTTCGTT	16800
16801	CCCACACTGG	TGAGAGGCC	TATAAGTGCA	ACGTCTGTGG	TAACCGTTTC	ACAACCTCGGG	16860
16861	GCAACCTCAA	AGTACATTTT	CACCGGCATC	GTGAGAAGTA	CCCACATGTG	CAAAATGAATC	16920
16921	CACATCCAGT	ACCTGAGCAC	CTAGACTACG	TCATCACCAG	CAGTGGGCTG	CCTTACGGAA	16980
16981	TGTCTGTGCC	ACCAGAGAAA	GCAGAAGAGG	AGGCAGGCAC	ACCAGGCGGA	GGTGTGGAAC	17040
17041	GCAAACCCCT	AGTGGCCTCC	ACCACAGCAC	TCAGTGCCAC	AGAGAGCCTG	ACACTGCTCT	17100
17101	CCACTGGCAC	AAGCACAGCA	GTGGCTCCTG	GGCTCCCTAC	TTTCAACAAG	TTTGTGCTCA	17160
17161	TGAAGGCAGT	GGAACCCAAG	AGTAAAGCGG	ATGAGAACAC	GCCCCCAGGG	AGTGAGGGCT	17220
17221	CCGCCATCGC	TGGAGTAGCA	GACAGTGGCT	CAGCAACCCG	AATGCAGCTA	AGTAAGCTGG	17280
17281	TGACGTCACT	ACCGAGTTGG	GCACTGTCTA	CTAATCACTT	GAAGTCAACT	GGAAGTTTCC	17340
17341	CCTTCCCTTA	TGTGCTAGAA	CCCTTGGGGG	CTTCCGCTTC	TGAGACCTCA	AAGCTGCAGC	17400
17401	AGCTAGTAGA	AAAGATTGAC	CGCCAAGGAG	CTGTGGCGGT	GGCATCTACT	GCCTCGGGAG	17460
17461	CTCCACCAC	TTCTGCCCC	GCACCTTCT	CCTCCGCTTC	TGGACCTAAC	CAGTGTGTGA	17520
17521	TCTGTCTTCG	GGTCTGAGC	TGCCCTCGGG	CTCTACGCTT	GCATTATGGC	CAACATGGAG	17580
17581	GTGAGCGGCC	CTTCAAGTGT	AAAGTGTGTG	GCCGAGCTTT	CTCCACAAGG	GGCAATTTGC	17640
17641	GCGCACATTT	CGTGGGTCA	AAGACCAGTC	CAGCTGCCCG	GGCTCAGAAC	TCCTGCCCCA	17700
17701	TTTGTGAGAA	GAAGTTC	AATGCTGTCA	CTCTGCAGCA	ACATGTTCGG	ATGCACCTGG	17760
17761	GGGGCCAGAT	CCCCAATGGG	GGTCCGCAC	TTTCTGAAGG	TGGGGGAGCT	GCCAGGAAA	17820
17821	ACAGCTCTGA	GCAGTCTACA	GCCTCTGGAC	CAGGGAGTTT	CCCCAGCCG	CAGTCCAGC	17880
17881	AGCCATCTCC	AGAAGAGGAG	ATGTCTGAGG	AAGAGGAAGA	GGATGAGGAA	GAGGAGGAAG	17940
17941	ACGTGACAGA	TGAAGATTC	CTAGCAGGAA	GAGGCTCTGA	GAGTGGGGGA	GAGAAGGCCA	18000

```

18001 TATCAGTACG AGGTGACTCA GAAGAGGTAT CTGGGGCAGA GGAAGAAGTG GCAACATCAG 18060
18061 TAGCAGCACC CACCACTGTG AAGGAGATGG ACAGTAATGA GAAAGCCCCT CAACACACTC 18120
18121 TGCCGCCACC TCCGCCACCA CCCGACAACC TGGATCATCC CCAACCCATG GAGCAGGGAA 18180
18181 CCAGTGATGT TTCCGGAGCC ATGGAGGAAG AAGCCAAACT GGAGGGAATC TCAAGCCCGA 18240
18241 TGGCAGCCCT CACCCAAGAA GGGGAGGGCA CCAGCACCCC TTTGGTGGAA GAGCTGAAC 18300
18301 TACCGGAAGC CATGAAGAAG GATCCAGGAG AGAGCAGCGG CAGGAAGGCC TGTGAAGTAT 18360
18361 GTGGCCAGAG CTTTCTACC CAGACAGCTC TGGAGGAGCA TCAGAAGACC CATCCCAAGG 18420
18421 ATGGGCCACT CTTCACTTGT GTCTTCTGCA GGCAGGGCTT CTTGACCCGT GCTACCCCTCA 18440
18441 AGAAGCACAT GCTGTTGGCT CACCACCAGG TACCGCCCTT TGCACCCCAT GGCCCTCAGA 18500
18501 ATATTGCTAC TCTTCCTTG GTCCCTGGCT GTCCCTCCTC CATCCCTTCT CCAGGGCTCT 18560
18561 CCCCATTCCC TCGAAAAGAT GACCCACCA TGCCATGAGC CTGCTTCTG TACCTGGTCC 18620
18621 TCTATGACCC AGAGAGCAGA AACCTGAGAG CTTCATAGAG GAACCTCAA GATTTACTCA 18680
18681 CCCTCCTCTT GTCCTTTCTC AAGTCTGAC ATGATGTTTC TAGTGGCTTC TTCTCTAGTC 18740
18741 CCTGAGCTTG ACAATTGCCT TTGAAAGAGA ATGTCCCCTT AAGAAATTT TATCACCTTT 18800
18801 TTGTTCTGTG TAACTAAGGG AAACAAATTC CCTATAGCTT TTACATCTC AAGGGGGAGC 18860
18861 TCTCTCTTCT TCTCCCTTTC CCTTTGGCAG GTATACTAGA ACCCCCATCC TTGGAGTGGC 18920
18921 AGCCTTGGTC CAAGGGGCTG GCAACTGTAC CATGGAAGGC CCAGCGTTAC TCCTTGGTGA 18980
18981 TCTTGACCAC CCTGCAAGAC TTTCTAGGGC CGGGACCTTC TTGAGAAGCT TGTAAAGGGT 19040
19041 GGTAGGTTTC TTTCTGCAAC CACTACCAG TTTTCCACTG AGCCCTGGAG TTCTGGACCT 19100
19101 ACCTGCATTG CCACTCGGGC CCTAGTACCA TCATTGCTGT GAAAGCCCAG GAACTGTGTT 19160
19161 TCACAAGGTG ACTCCAGTGA CATGATCCAG AGAGGCAAAG AACATAGCCT CCGGAAGTTG 19220
19221 AGGCTGTGCC CAACAAGCAC ACCGGAAGAA AGAAGAACT ATAACTTCTT TCTCCTTCCC 19280
19281 CCCTGCTCCA GAGAGTGCTG GCAATAAAGA TATTCTAGCA ATTGGTGACT CACCCTAGAA 19340
19341 GGTAGGGACA AGTGAAGGAC TGGGATCCTT TTTGCAGTAT GTTCCTTGAC TCGCCACATT 19400
19401 GAGGCAAAGA TAGTGGCTGG TCAAGATGCC AGGACTACTC CAGCTTCCCA TCATGTCTC 19460
19461 TCAACCAACA AGCAGGTTTC CTACCAAGAC GTCTCTCGTG TGATAGTTTA GGGAGTATGA 19520
19521 AGTTTCTAAC TCTAAAGAAT CCTGTTGGTG AGGATGATTA TTTAAGCAAT GATGGGGAGT 19580
19581 TGAGGGTGTG TGCTAAAACA GGCATTGCTG GGAATCTATT TGATGAAGAA CAGGACTTGA 19640
19641 TGTAAGGGGA CTCGATGTTT AGCTCTGTG AGTATGAAC TTTTCTTTGA GCTAATGGTG 19700
19701 ATGTGGTATG CAGAGGTACC AGGGGCCATG GGGGTGTGTG TGCTTCTGT CACTAGAATG 19760
19761 TTTTGTAGTT TAGATGACTC CCTATTTTAT TCCCTCACC CTTGTATTTT CTTGCTGTG 19820
19821 TTCTCAAAC CCCTTCTCTC CCCAGTTTT GCCTGACCAT GGGCCAGAGC TTATGTCTTA 19880
19881 TTTTTTTTCT AGAAGTTGAG AGACAGAGCT TCAAGTGGTT TCCCCCGTC TCTGTCTTGT 19940
19941 AGTGAGATGT AGTATTTACT CTTAACATAG GATCCTGTGG AACAGGTGTT CTGAGAAGAC 20000
20001 TGAATTTTGC TGTAGCTGT TGTCAATGAT GATTCTCTAA AGTAGTGGC TCCAGAGCTC 20060
20061 CCTAACACAG TGAATGTGT AAGAGCCGAG AGGGGAGATA CTAGAATTTT TTCCTTCATC 20120
20121 ATTAAGGTG TTTTGGCCAA GTTTTTTTTG TGTGTTTCT CTTATTTTAT GACTAAATAG 20180
20181 CCAGATGGGG TGTGATGTTG GCATTCCCGA ATTCAGAGAT TCTCTCCCA CCCTTTTCTC 20240
20241 CTGCCAAAGC TGAACATATG GTGTAATAAT ACTTAACTTC CTCAGTCAGC CTCATTCCCA 20300
20301 AACAACTCC AATGGATGTC ATTTCACTGG GG 20332

```

**Abbildung A.2: Genomische Nukleotidsequenz des *SalI2*-Gens.** Dargestellt ist der kodierende Bereich des *SalI2*-Gens und die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Sequenzdaten aus Intron 1. Der Beginn der 5'-UTR und das Ende der 3-UTR sind nicht enthalten. Die DNA-Sequenz des kodierenden Stranges der cDNA ist in Großbuchstaben angeführt, die intronische Sequenz in Kleinbuchstaben. Die beiden alternativen Translationsstartpunkte, das Stoppkodon sowie die Exon/Intron-Übergänge sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die Nummerierungen für die Nukleotidsequenz ist auf beiden Seiten angegeben.

## Publikationen

Buck A., Archangelo L., Dixkens C. und Kohlhase J. (2000). Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of the murine SALL1 ortholog Sall1, *Cytogenet Cell Genet* **89**: 150-153.

Buck A., Kispert A. und Kohlhase J. (2001). Embryonic expression of the murine homologue of SALL1, the gene mutated in Townes-Brocks syndrome, *Mech Dev* **104**: 143-146.

## Danksagung

Herrn Professor Dr. W. Engel danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen. Seine stetige Diskussionsbereitschaft und die zügigen Korrekturen haben wesentlich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Bei Frau Professor Dr. S. Hoyer-Fender bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt auch Dr. Jürgen Kohlhase für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit, weitgehend unabhängig zu arbeiten und die Unterstützung besonders in der Endphase der Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich für die großzügige finanzielle Unterstützung beim Besuch von Tagungen bedanken.

Prof. Dr. Andreas Kispert danke ich für die Möglichkeit, in seinem Labor die Technik der *in situ*-Hybridisierung erlernen zu können, sowie für die Unterstützung beim Publizieren, Dr. Walter Schulz-Schaeffer für die histologischen Untersuchungen und Dr. Christa Dixkens für die Anleitung bei der FISH-Hybridisierung. Dank auch an Sonja Bingemann und Manuela Liebers für die gewissenhafte Assistenz und Einsatzbereitschaft bei der Durchführung der Arbeit, sowie an René Heise und Karl Rücker für die zuverlässige Sequenzierarbeit.

Einen herzlichen Dank an Dr. Peter Burfeind, der stets mit Rat und Tat beiseite stand und dessen Korrekturen sehr hilfreich waren, sowie an meinen Bruder Thomas, der mich mit der Einführung in die  $\text{\LaTeX}$ -Welt vor einer Menge Computer-Terror bewahrte und immer Zeit hatte, wenn's mal wieder brannte.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung für ihre Unterstützung und das gute Arbeitsklima. Besonders hervorgehoben sei hier die 105er-Party-Crew Goran, Leticia, Meike und Saskia, die von Laborkollegen zu Freunden wurden.

Vielen Dank meinen (weit mehr als) Mitbewohnerinnen Susanne und Sandra, den Grellis und allen Freundinnen und Freunden für Anlehnung, Aufmunterung, Abwechslung und vieles mehr.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihr unerschütterliches Vertrauen den Grundstein für diese Arbeit legten.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Anja Buck  
Geburtsdatum: 02. 03. 1972  
Geburtsort: Kiel  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1978–1979 Grundschule: „Fröbelschule“ in Kiel  
1979–1982 Grundschule: „Theodor Möller Schule“ in Kiel  
1982–1992 Gymnasium: „Gymnasium im Schulzentrum Elmschenhagen“ in Kiel  
Mai 1992 Abitur

## Studium

Oktober 1992 Aufnahme des Studiums der Biologie an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel  
November 1994 Diplomvorprüfung in den Fächern Botanik, Zoologie, Chemie und Mathematik  
September 1995 Aufnahme des Studiums der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen  
Februar 1997 Diplomhauptprüfung in den Fächern Organische Chemie, Biochemie und Botanik  
Februar 1997 – Juni 1998 Experimentelle Arbeiten zur Diplomarbeit am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Tischner über das Thema „Veränderungen im Phosphorylierungsgrad der Nitratreduktase in Wurzeln von Gerstenkeimlingen (*Hordeum vulgare* L.)“  
Juni 1998 Abschluss des Studiums der Biologie mit dem Diplom  
ab Juli 1998 Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation