

**Generierung und Charakterisierung von
konditionalen *Bdp1-knockout*-Mausmodellen**

-

Analysen des Transkriptionsfaktor IIB-Komplexes

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Miriam Jakubik

aus Wipperfürth

Köln 2011

Die hier vorliegende Dissertation wurde mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
am Institut für Humangenetik, am Institut für Genetik und am
Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK)
der Universität zu Köln angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Sigrun Korsching
Prof. Dr. rer. nat. Brunhilde Wirth

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2011

*„Das Glück kommt nicht von außen,
es beginnt im Allerheiligsten der Seele“*

nach K. Gibran

meinen Eltern, Katja & Joachim

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1.	Einleitung.....	1
1.1	Die DNA-abhängige RNA Pol III.....	1
1.1.1	Promotorklassen und Transkriptionsfaktoren.....	1
1.1.2	Die Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren und der RNA Pol III.....	4
1.1.3	Die TFIIB-Untereinheit <i>BDP1</i>	5
1.1.4	Regulation des TFIIB-Komplexes.....	7
1.2	Das BDP1-Protein und die spinale Muskelatrophie (SMA).....	9
1.2.1	Die autosomal rezessive proximale spinale Muskelatrophie (SMA).....	9
1.2.2	Molekulare Grundlagen der SMA.....	10
1.2.3	SMA und die Ausbildung atypischer Symptome.....	11
1.2.4	Das <i>Bdp1</i> -Gen und die murine SMA-Region.....	13
1.3	Mausgenetik.....	14
1.3.1	Die Embryonalentwicklung der Maus.....	14
1.3.2	Die frühe Gehirnentwicklung der Maus und das Ventrikelsystem.....	17
1.3.3	Manipulationen des Mausgenoms.....	19
1.3.4	<i>Gene targeting</i>	19
1.3.5	Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme.....	20
1.3.5.1	Das Cre/loxP-System.....	20
1.3.5.2	Das Flp/FRT-System.....	21
1.3.6	SMA-Mausmodelle.....	21
2.	Zielsetzung der Arbeit.....	23
3.	Material und Methoden.....	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Chemikalien.....	24
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.3	Geräte und Zubehör.....	25
3.1.3.1	Allgemeine Geräte und Zubehör.....	25
3.1.3.2	Geräte und Zubehör zur Analyse von Nukleinsäuren.....	26
3.1.3.3	Geräte und Zubehör zur Analyse von Proteinen.....	27
3.1.3.4	Geräte und Zubehör für die Zellkultur.....	27
3.1.3.5	Geräte und Zubehör für die Immunhistologie.....	27
3.1.3.6	Geräte und Zubehör für die Arbeit mit Mäusen.....	28
3.1.4	Substanzen und Chemikalien.....	28
3.1.4.1	Allgemeine Substanzen und Chemikalien.....	28
3.1.4.2	Substanzen und Chemikalien zur Analyse von Nukleinsäuren.....	29
3.1.4.3	Substanzen und Chemikalien zur Analyse von Proteinen.....	30
3.1.4.4	Substanzen und Chemikalien für die Zellkultur.....	30
3.1.4.5	Substanzen und Chemikalien für die Immunhistologie.....	31
3.1.4.6	Substanzen und Chemikalien für die HTN-Cre-Expression und Isolation.....	31

3.1.5	Lösungen, Medien und Puffer	32
3.1.5.1	Lösungen zur Analyse von Nukleinsäuren	32
3.1.5.2	Lösungen zur Analyse von Proteinen	35
3.1.5.3	Lösungen für die Zellkultur	36
3.1.5.4	Lösungen für die Immunhistologie	37
3.1.5.5	Lösungen für die HTN-Cre-Expression	38
3.1.6	<i>Kits</i>	39
3.1.6.1	<i>Kits</i> zur Analyse von Nukleinsäuren	39
3.1.6.2	<i>Kits</i> zur Analyse von Proteinen	40
3.1.6.3	<i>Kits</i> für die Immunhistochemie.....	40
3.1.7	<i>Primer</i>	40
3.1.8	Enzyme	43
3.1.8.1	Restriktionsenzyme.....	43
3.1.8.2	Sonstige Enzyme	43
3.1.9	Antikörper.....	43
3.1.10	Mauslinien und Zellen	45
3.1.11	Gentechnisch veränderte Organismen (GVO)	46
3.1.12	Sonstiges.....	47
3.1.12.1	Verwendete Größenmarker	47
3.1.12.2	Verwendete <i>software</i>	47
3.1.12.3	Verwendete Datenbanken	48
3.2	Methoden	48
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	48
3.2.1.1	Isolierung genomischer DNA	48
3.2.1.1.1	DNA-Isolation aus Mäuseschwanzspitzen	48
3.2.1.1.2	DNA-Isolation mittels <i>Charge Switch gDNA Mini Tissue Kit</i>	49
3.2.1.1.3	DNA-Isolation aus Geweben (Phenol-Chloroform-Extraktion).....	49
3.2.1.1.4	DNA-Isolation aus murinen embryonalen Fibroblasten.....	49
3.2.1.2	Die Polymerase Kettenreaktion.....	50
3.2.1.2.1	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	51
3.2.1.3	Amplifikation genomischer DNA (Blastozysten)	51
3.2.1.4	Spektrophotometrische Quantifizierung von DNA	51
3.2.1.4.1	Quantifizierung mittels <i>NanoDrop</i> -Gerät	51
3.2.1.4.2	Quantifizierung mittels <i>PicoGreen</i> -Methode	52
3.2.1.5	Gelelektrophoretische Separierung von DNA-Fragmenten	52
3.2.1.6	<i>Realtime</i> -Analysen zur Bestimmung der <i>SMN2</i> -Kopienanzahl	53
3.2.1.7	Southern Blot-Analysen (Southern 1975)	55
3.2.1.7.1	Restriktionspaltung und gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	55
3.2.1.7.2	Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Trägermembran	56
3.2.1.7.3	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	56
3.2.1.7.4	Prähybridisierung, Hybridisierung und Autoradiographie	56
3.2.1.8	Isolierung von RNA.....	57
3.2.1.8.1	Isolierung von RNA aus Geweben	57
3.2.1.8.2	Isolierung von RNA aus murinen embryonalen Fibroblasten.....	58

3.2.1.9	Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA	58
3.2.1.9.1	Quantifizierung mittels <i>NanoDrop</i> -Gerät	58
3.2.1.9.2	Quantifizierung mittels <i>RiboGreen</i> -Methode	58
3.2.1.10	Reverse Transkription (RT)	59
3.2.1.11	<i>Realtime</i> -Analysen zur Bestimmung von Transkriptmengen	59
3.2.1.12	Northern Blot-Analysen (Alwine et al. 1977).....	60
3.2.1.12.1	Gelelektrophoretische Auftrennung und Transfer von RNA	60
3.2.1.12.2	Radioaktive Markierung von RNA-Fragmenten und Hybridisierung	60
3.2.2	Methoden zur Proteinanalysen	60
3.2.2.1	Isolierung von Proteinen.....	60
3.2.2.1.1	Isolierung von Proteinen aus Geweben	61
3.2.2.1.2	Isolierung von Proteinen aus murinen embryonalen Fibroblasten.....	61
3.2.2.2	Spektrophotometrische Quantifizierung von Proteinen (<i>BCA-kit</i>)	61
3.2.2.3	Western Blot-Analysen	62
3.2.2.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
3.2.2.3.2	Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western Blot)	63
3.2.2.3.3	Immunhistologischer Nachweis von Proteinen.....	63
3.2.2.4	HTN-Cre-Expression	64
3.2.2.5	HTN-Cre-vermittelte <i>in vitro</i> -Deletion	65
3.2.2.6	MTT-Analysen	65
3.2.3	Zellbiologische Methoden	66
3.2.3.1	Allgemeine zellbiologische Arbeiten.....	66
3.2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	66
3.2.3.3	Bestimmung der Zellzahl.....	67
3.2.3.4	Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten	67
3.2.3.4.1	Präparation von MEF.....	67
3.2.3.4.2	Mitomycin C (MMC)-Behandlung.....	68
3.2.3.5	Kultivierung von ES-Zellen	69
3.2.3.6	Genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).....	69
3.2.3.6.1	Transfektion von ES-Zellen	70
3.2.3.6.2	Selektion transfizierter ES-Zellklone.....	70
3.2.3.6.3	Isolierung von ES-Zellklonen.....	71
3.2.3.6.4	Analyse von ES-Zellen auf <i>96-well</i> -Mikrotiterplatten.....	72
3.2.3.6.5	Auftauen und Expandieren von Klonen auf <i>96-well</i> -Mikrotiterplatten	72
3.2.3.6.6	Blastozysteninjektion und -transfer	73
3.2.4	Immunhistologische Methoden.....	73
3.2.4.1	Fixieren, Einbetten und Schneiden von Gewebe und Embryonen	73
3.2.4.2	HE-Färbung von Paraffinschnitten	74
3.2.4.3	Immunhistologischer Nachweis von Proteinen	74
3.2.4.4	Immunfluoreszenz Färbungen von murinen embryonalen Fibroblasten	75
3.2.5	Arbeiten mit Mäusen.....	76
3.2.5.1	Mausexperimente.....	76
3.2.5.2	Generierung verschiedener <i>Bdp1</i> -Mauslinien	76
3.2.5.3	Markierung und Genotypisierung von Mäusen	79

3.2.5.4	Altersbestimmung pränataler Mausembryonen	79
3.2.5.5	Isolation pränataler Mausembryonen	80
3.2.5.5.1	Isolierung von Morulae (E2,5 p.c.) und Blastozysten (E3,5 p.c.)	80
3.2.5.5.2	Isolierung älterer Embryonen (E14,5 p.c.-E18,5 p.c.)	80
3.2.5.6	Präparation von adulten Mäusen und Organentnahme.....	81
3.2.6	Statistische Auswertungen	81
4.	Vorarbeiten	82
4.1	Vorarbeiten anderer Arbeitskollegen	82
4.2	Eigene Vorarbeiten	85
5.	Ergebnisse	89
5.1	<i>Screening</i> von chimären Nachkommen	89
5.2	Injektion homolog rekombinanter ES-Zellen in Blastozysten und Generierung chimärer Mäuse	91
5.3	Identifizierung einer Keimbahntransmission und Verifizierung des rekombinanten <i>Bdp1</i> -Allels	91
5.4.	Generierung eines ubiquitären heterozygoten <i>Bdp1-knockouts</i>	93
5.4.1	Analysen heterozygoter <i>Bdp1-knockouts</i>	94
5.4.1.1	Genexpressionsanalysen von <i>Bdp1^{wt/wt}</i> und <i>Bdp1^{ko/wt}</i> -Tieren	95
5.4.1.2	Genexpressionsanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEF).....	97
5.4.1.3	Northern Blot-Analysen von <i>Bdp1^{wt/wt}</i> und <i>Bdp1^{ko/wt}</i> -Tieren	98
5.4.1.4	Proteinexpressionsanalysen von <i>Bdp1^{wt/wt}</i> und <i>Bdp1^{ko/wt}</i> -Tieren	99
5.5	Generierung eines ubiquitären homozygoten <i>Bdp1-knockouts</i>	101
5.5.1	Analysen homozygoter <i>Bdp1-knockouts</i>	102
5.5.1.1	Isolierung und Genotypisierung verschiedener Embryonalstadien.....	102
5.5.1.2	<i>In vitro</i> -Kultivierung und makroskopische Untersuchung von <i>Bdp1^{ko/ko}</i> -Embryonen:	
	Bestimmung des Zeitpunktes der Letalität	104
5.5.1.3	Generierung und Analysen von <i>Bdp1^{fl/fl}</i> -MEF	105
5.5.1.3.1	<i>In vitro</i> -Deletion und Analysen des <i>Bdp1</i> -Gens.....	105
5.5.1.3.2	MTT-Analysen von HTN-Cre-behandelten <i>Bdp1^{fl/fl}</i> -MEF	107
5.6	Generierung eines konditionalen <i>Bdp1-knockouts</i>	108
5.6.1	Generierung und Verifizierung der homozygot geflochten <i>Bdp1</i> -Linie	108
5.6.2	Generierung eines ZNS-spezifischen <i>Bdp1-knockouts</i>	110
5.6.3	Analysen des ZNS-spezifischen <i>Bdp1-knockouts</i>	111
5.6.3.1	Makroskopische Untersuchungen des ZNS-spezifischen <i>Bdp1-knockouts</i>	111
5.6.3.2	Immunhistologische Untersuchungen.....	114
5.6.3.2.1	Übersichtsfärbungen	114
5.6.3.2.2	Spezifische immunhistologische Färbungen	116
5.7	Der Einfluss von <i>Smn</i> -Deletionen auf <i>Bdp1</i> -Expressionen	119
5.8	Generierung eines <i>Bdp1</i> -spezifischen Antikörpers	121
5.8.1	Proteinbiochemischer Nachweis des <i>Bdp1</i> -Proteins.....	122
5.8.2	Immunhistologischer Nachweis des <i>Bdp1</i> -Proteins	124
6.	Diskussion	127
6.1	Die Auswirkungen einer Haploinsuffizienz und die Umlagerung von chromosomalen Abschnitten....	127
6.2	Die Generierung eines <i>Bdp1</i> -Mausmodelles.....	129
6.3	Der Phänotyp von <i>Bdp1^{ko/wt}</i> -Tieren.....	130

6.4	Analysen des TFIIIB-Komplexes und Interaktionspartner von <i>Bdp1</i> ^{ko/wt} -Tieren und murinen embryonalen Fibroblasten (MEF).....	132
6.5	U6 snRNA-Expression im <i>Cerebellum</i> von <i>Bdp1</i> ^{ko/wt} -Tieren	134
6.6	Der Einfluss von <i>Smn</i> -Deletionen auf <i>Bdp1</i> -Expressionen	136
6.7	Analysen des homozygoten <i>Bdp1-knockouts</i>	138
6.8	Analysen eines konditionalen <i>Bdp1-knockouts</i>	139
6.9	Verifizierung eines <i>Bdp1</i> -spezifischen Antikörpers.....	142
7.	Ausblick	145
8.	Zusammenfassungen	147
8.1	Zusammenfassung	147
8.2	Summary	149
9.	Veröffentlichungen	151
9.1	Publikationen	151
9.2	Poster	151
10.	Literaturverzeichnis	153
11.	Anhang	i
11.1	Abbildungen	i
11.2	Sequenz des rekombinanten <i>Bdp1</i> -Allels (<i>Bdp1</i> ^{fineo}) nach homologer Rekombination (bis Exon 6)....	v
11.3	<i>Bdp1</i> : Transkript und Aminosäuresequenz	ix
11.4	Danksagung	xv
12.	Erklärung	xvi
13.	Lebenslauf	xvii

II. Abkürzungsverzeichnis

5'	Orientierung DNA/RNA	ColP	<i>coimmunoprecipitation</i>
3'	Orientierung DNA/RNA	Cre	<i>cyclization recombination, Cre recombinase</i>
A	A-Box		
a	Atto-	C _t	<i>cycle threshold</i>
amol	Attomol	d	Tage
α-	anti- (bei Antikörpern)	Da	Dalton
α ³² P dCTP	Desoxycytosin-5'-[α ³² P]-triphosphat	DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ALPS	autoimmun lymphoproliferatives Syndrom	ddH ₂ O	Milliporwasser (vollentsalzt)
APS	Ammoniumpersulfat	DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>ad</i>	auf	d.h.	das heißt
ATP	Adenosin-Triphosphat	DH5α	<i>E.Coli</i> -Stamm
B	B-Box	D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>BDP1/Bdp1/</i>	<i>B double prime 1</i>	DMF	Dimethylformamid
<i>sBdp1</i>	(human, murin, Hefe)	DMSO	Dimethylsulfoxid
BL/6NCrl	C57BL/6NCrl	DNA	Desoxyribonukleinsäure
βME	β-Mercaptoethanol	dNTPs	Desoxyribonukleosid-triphosphate
bp	Basenpaare	DSE	distales Sequenzelement
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>	DTT	Dithiothreitol
<i>BIRC/Birc</i>	<i>baculoviral IAP repeat-containing protein 1</i>	E	Embryonalstadium
(ehemals <i>NAIP</i>)		<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>BRF1/Brf1</i>	<i>TFIIB related factor 1</i>	EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
<i>BRF2/Brf2</i>	<i>TFIIB related factor 2</i>		
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	<i>ERK/Erk</i>	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
bzw.	beziehungsweise	ESMS	<i>electrospray mass spectrometry</i>
C	C-Box	ESE	<i>exonic splicing enhancer</i>
°C	Grad Celsius	ESS	<i>exonic splicing silencer</i>
ca.	zirka	ES-Zellen	embryonale Stammzellen
CAMII	<i>CaM kinase II</i>	<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
<i>Cartpt</i>	<i>CART prepropeptide</i>	EtBr	Ethidiumbromid
CDC 2	<i>cyclin-dependent protein kinase 2</i>	EtOH	Ethanol
cDNA	<i>complementary DNA</i>	Ex	Exon
CKII	<i>casein kinase II</i>	fl	<i>floxed (loxP flanked)</i>
CNV	<i>copy number variation</i>	flneo	<i>floxed neo (loxP flanked)</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid		

Flp/FLPe	Flipase, <i>Flp recombinase</i>	M	Molar
FKS	fetales Kälberserum	m	Milli-
FRT	<i>Flp recombinase target</i>	MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption</i>
fw	<i>forward</i>		<i>ionization</i>
G	<i>relative centrifugation force</i>	<i>Mccc2</i>	<i>Methylcrotonyl-CoA</i>
g	Gramm		<i>carboxylase 2</i>
G-418	Genitacin	MEF-Zellen	Murine embryonale
Ganc	Ganciclovir		Fibroblasten
<i>GTF2H2/</i>	<i>generall transcription factor</i>	mg	Milligramm
<i>Gtf2h2</i>	<i>IIH</i>	MGI	<i>Mouse genome informatics</i>
GVO	gentechnisch veränderte Organismen	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
H	Histidin	min	Minute
h	Stunde	mind.	mindestens
HCl	Salzsäure	ml	Milliliter
hCMV	<i>human cytomegalo virus</i>	mM	Millimolar
HE	Hämatoxylin-Eosin	mm	Millimeter
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)- ethansulfonsäure	MMC	Mitomycin C
<i>high conc.</i>	<i>high concentration</i>	mmol	Millimol
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	MOPS	3 (N-Morpholino)- Propansulfonsäure
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
HTC-Cre	His-TAT-NLS-Cre	MRT	Magnetresonanztomographie
ICR	<i>internal control region</i>	MS	Massenspektrometrie
IE	intermediäres Element	<i>Mtap2</i>	<i>microtubule-associated protein 2</i>
IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium- bromide
K	Lysin	MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
k	Kilo-	MYB-Domäne	<i>myeloblastosis-Domäne</i>
kb	Kilobasen	<i>MYC/Myc</i>	<i>Myelocytomatosis</i>
KCl	Kaliumchlorid	(<i>c-MYC/c-Myc</i>)	<i>oncogene homolog</i>
kDa	Kilodalton	n	Nano-
ko	<i>knockout</i>	ng	Nanogramm
l	Liter	nm	Nanometer
LB	Luria Bertani	nM	Nanomolar
LCR	<i>low copy repeats</i>	nmol	Nanomol
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>	NaAcetat	Natriumacetat
loxP	<i>locus of x-ing over of phage P1</i>	NaCitrat	Natriumcitrat
		NaCl	Natriumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogen- phosphat	RB/Rb	<i>Retinoblastoma</i>
		rev	<i>reverse</i>
NaOH	Natriumhydroxid	rk	Rekombinant
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	RNA	Ribonukleinsäure
NEAA	<i>non essential amino acids</i>	RNase A	<i>ribonuclease A</i>
NEB5α	<i>E. Coli</i> -Stamm	RNAi	<i>RNA interference</i>
neg.	negativ	RNA Pol III	RNA Polymerase III
Neo ^R /neo	Neomycin-Resistenzgen	<i>Rplp0</i>	<i>ribosomal protein large P0</i>
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>	rpm	<i>revolutions per minute</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>	RT	Raumtemperatur
Nr.	Nummer	rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
n.s.	nicht signifikant	S	Serin
<i>OCLN/Ocln</i>	<i>Occludin</i>	SANT-Domäne	SWI2/ADA2/N-CoR/TFIIIB
OD	optische Dichte	SDS	Natriumdodecylsulfat
OH	Hydroxygruppe	Sek.	Sekunde
ORF	<i>open reading frame</i>	SEM	<i>standard error of the mean</i>
P	<i>post natal</i>	<i>SERF/Serf</i>	<i>small EDRK-rich factor 1</i>
p	Piko-	SINE	<i>short interspersed nuclear elements</i>
P1	Bakteriophage <i>P1</i>	SMA	<i>spinal muscular atrophy</i>
PAA	Polyacrylamid	<i>SMN1/Smn</i>	<i>survival motor neuron gene 1 (human/murin)</i>
PAGE	PAA Gelelektrophorese	<i>SMN2</i>	<i>survival motor neuron gene 2</i>
<i>p53</i>	<i>tumor protein 53</i>	<i>SNAP_c</i>	<i>snRNA activating protein complex</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline Dulbecco</i>	SSC	Trinatriumcitrat
p.c.	<i>post coitum</i>	STH	Somatropin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	s.u.	siehe unten
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin	T	Threonin
PFA	Paraformaldehyd	t	Telomer
pg	Pikogramm	TATA	TATA-Box
pH	negativer dekadischer Logarithmus der [H ⁺]	TBE	Tris-Borat-EDTA
PKA/PKC	<i>protein kinase A/C</i>	<i>TBP/Tbp</i>	<i>TATA-binding protein</i>
pM	Pikomol	TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
pmol	Pikomol	TBS-T	TBS-Tween
pos.	Positiv	TEMED	Tetramethyl-
pRF	Plasmid Rapidflirt		ethylenediamine
<i>Primer</i>	Oligostartermoleküle	TE-Puffer	(Tris-EDTA)-Puffer
PSE	proximales Sequenzelement		

TE ⁻⁴ -Puffer	(Tris-EDTA) ⁻⁴ -Puffer	µl	Mikroliter
TF	Transkriptionsfaktor	µm	Mikrometer
TFIIIA	Transkriptionsfaktor IIIA	µM	Mikromol
TFIIB	Transkriptionsfaktor IIB	µmol	Mikromolar
TFIIC	Transkriptionsfaktor IIC	ü.N.	über Nacht
tg	Transgen	UV	Ultraviolettes Licht
TK	Thymidinkinase-Gen	V	Volt
TOP10	<i>E.Coli</i> -Stamm	vgl.	vergleiche
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethat	<i>w</i> <i>w/o</i>	<i>with</i> <i>without</i>
tRNA	<i>transfer</i> RNA	wt	Wildtyp/wildtypisch
U	Units	z	Zentromer
u.a.	unter anderem	z.B.	zum Beispiel
µ	Mikro-	ZNF	<i>zinc finger protein</i>
µCi	Mikrocurie	ZNS	zentrales Nervensystem
µF	Mikrofarad	z.T.	zum Teil
µg	Mikrogramm		

1. Einleitung

DNA-abhängige RNA Polymerasen (RNA Pol) sind die Schlüsselenzyme der Transkription. In eukaryontischen Zellen kommen drei verschiedene RNA Polymerasen vor, die sich in ihrer Matrizenspezifität, in ihrer Lokalisation sowie in ihrer Sensibilität gegenüber Inhibitoren (z.B. α -Amitin) unterscheiden (Chambon 1975; Roeder and Rutter 1969). Aufgrund ihrer Auftrennung im Säulenchromatogramm werden sie als RNA Pol I, RNA Pol II und RNA Pol III bezeichnet (Schwartz and Roeder 1974). Zur Ausbildung eines Initiationskomplexes am Promotor ist die Bindung weiterer spezifischer Transkriptionsfaktoren (TF) notwendig, da die Transkription nicht alleine durch die RNA Polymerasen ausgeführt werden kann (Wang and Roeder 1996).

Im Folgenden wird spezifisch auf die DNA-abhängige RNA Pol III, deren Regulation, verschiedene Promotorklassen und benötigte TFs eingegangen. Im Fokus dieser Arbeit steht die TFIIB-Untereinheit *BDP1*, da eine Haploinsuffizienz des Gens mit der Ausbildung atypischer Formen der spinalen Muskelatrophie (SMA) in Verbindung gebracht wurde. Eventuelle kausale Zusammenhänge zwischen dem *BDP1*-Gen und der atypischen SMA sollten im Rahmen dieser Arbeit über die Generierung und Charakterisierung adäquater Mausmodelle umgesetzt werden.

1.1 Die DNA-abhängige RNA Pol III

1.1.1 Promotorklassen und Transkriptionsfaktoren

Die RNA Pol III ist im Nukleoplasma lokalisiert und für die Transkription von niedermolekularen, nicht-proteinkodierenden Genen verantwortlich (Geiduschek and Tocchini-Valentini 1988). Die Transkription der RNA Pol III ist zellzyklusabhängig und nur während der S- und G2-Phase aktiv (Fairley et al. 2003; Gottesfeld et al. 1994; Paule and White 2000). Die bekanntesten Transkripte wurden Anfang der 90iger Jahre von Willis und White beschrieben (Willis 1993). Dazu zählen verschiedene Typen an Transfer RNAs (tRNAs), die 5S ribosomale RNA (5S rRNA) und die U6-Untereinheit der snRNAs (Weinmann and Roeder 1974). Ebenso gehören die 7SK und die BC1 RNA, die viralen Gene VA-I und VA-II (Dieci et al. 2007) und eine Anzahl an *short interspersed nuclear elements* (SINE) zu den Produkten der RNA Pol III. In den letzten Jahren wurden mit Hilfe von zahlreichen

Transkriptomanalysen und genomweiten Lokalisationsstudien bisher unbekannte, durch die RNA Pol III-transkribierte nicht-proteinkodierende RNAs identifiziert (Hannon et al. 2006; Mattick and Makunin 2006). Mit der weitgehenden Identifizierung des RNA Pol III-Transkriptoms wurden parallel auch gewebe- und entwicklungsspezifische Regulationen der Transkription beschrieben (z.B. neuronal-spezifische Expressionen), die weiter verbreitet sind, als bisher angenommen. So wurde z.B. den Transkripten *GPR51* (GABA-Rezeptor 2) und *KCNIP4* (Kaliumkanal-interagierendes Protein) eine spezifische Expression im Gehirn nachgewiesen (Pagano et al. 2007; Pruunsild and Timmusk 2005).

Innerhalb RNA Pol III-abhängiger Gene werden drei verschiedene Promotorklassen unterschieden, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind. Die jeweiligen Initiationskomplexe werden in Abhängigkeit der Promotorklasse mit Hilfe unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren ausgebildet (Abbildung 2) (Geiduschek and Kassavetis 2001).

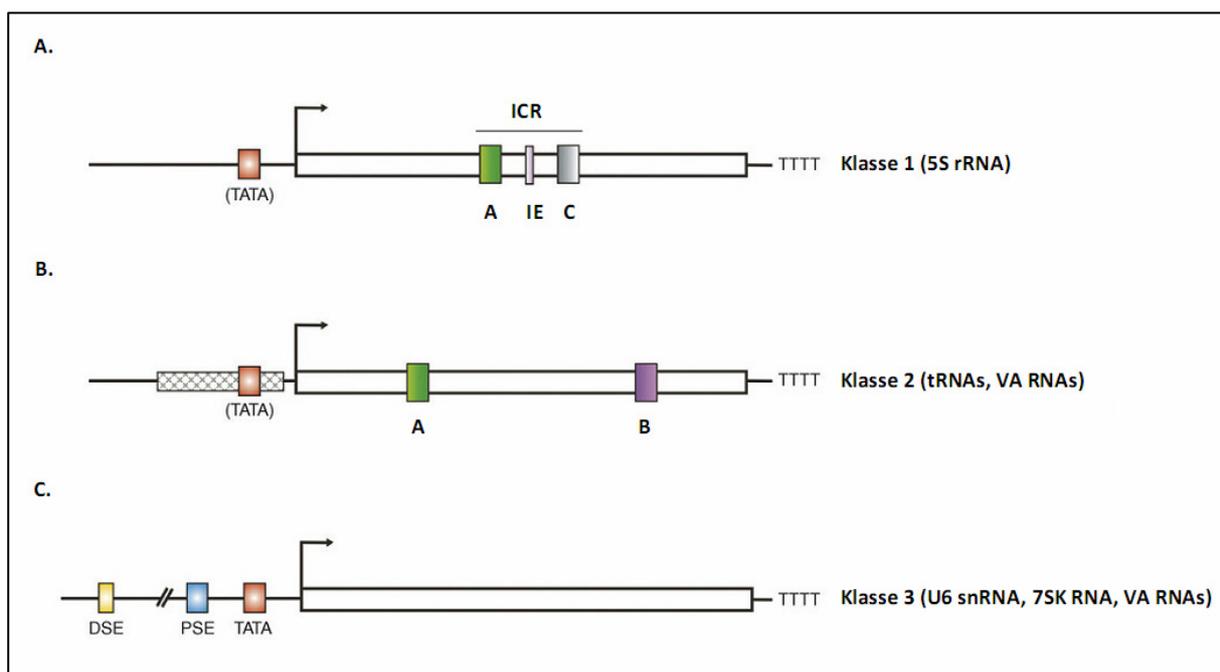


Abbildung 1: Schematische Darstellung der drei Hauptpromotorklassen der RNA Pol III

(A.–C.) Hauptpromotorklassen eins bis drei. Die Positionen der *upstream* und internen Kontrollelemente sind relativ zum Transkriptionsstartpunkt und Richtung (Pfeil). A: A-Box (grün), B: B-Box (lila), C: C-Box (grau), DSE: distales Sequenzelement (gelb), ICR: interne Kontrollregion, IE: intermediäres Element (flüchtig), PSE: proximales Sequenzelement (blau), TATA: TATA-Box oder TATA-Elemente (rot), TTTT: Terminationsignal (modifiziert nach Dieci et al., 2007).

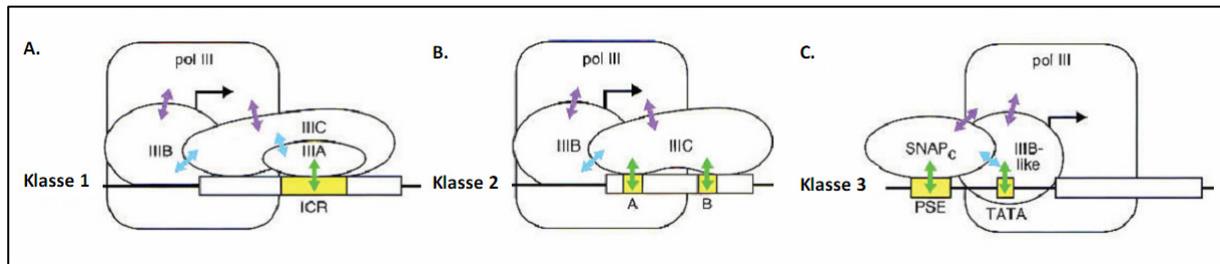


Abbildung 2: Ausbildung der Initiationskomplexe an den Hauptpromotorklassen

(A.–C.) Hauptpromotorklassen eins bis drei. Grüne Pfeile symbolisieren die Interaktionen von TFs und Promotorelementen, die blauen Pfeile deuten Protein-Protein-Interaktionen der TFs untereinander an. Die violettfarbenen Pfeile zeigen die Interaktion zwischen der RNA Pol III und den TFs. A: A-Box, B: B-Box, IIIA: TFIIA, IIIB: TFIIB, IIIC: TFIIC, ICR: interne Kontrollregion, pol III: RNA Pol III, PSE: proximales Sequenzelement, SNAP_C: *snRNA activating protein complex*, TATA: TATA-Box (modifiziert nach Schramm and Hernandez 2002).

Geninterne Promotoren (Abbildung 1A und 1B) können sogenannte A- und B-Boxen enthalten, die erstmals bei tRNA-Genen identifiziert wurden (Abbildung 1B) (Geiduschek and Tocchini-Valentini 1988; Sharp et al. 1985). Dabei kann der Abstand beider Elemente sehr variabel sein. In einigen Spezies wurde sogar eine doppelte B-Box in Kombination mit einer A-Box beschrieben (Schramm and Hernandez 2002). Der Faktor TFIIC bindet direkt an der A- und B-Box, rekrutiert so den Transkriptionsfaktor TFIIB, der die RNA Pol III zu dem Initiationskomplex führt (Abbildung 2B). Die RNA Pol III wiederum interagiert mit dem Transkriptionsfaktor IIIC (Geiduschek and Kassavetis 2001).

Statt der B-Box werden für die Transkription der 5S rRNA-Gene eine C-Box sowie intermediäre Elemente, die spezifisch von TFIIA erkannt werden, benötigt (Abbildung 1A und 2A). TFIIA rekrutiert direkt TFIIC, der wiederum TFIIB an den Initiationskomplex führt.

Die dritte Promotorklasse von RNA Pol III-transkribierten Genen findet sich erst in höheren Eukaryonten (Abbildung 1C) (Willis 1993). Anstatt interner Elemente sind hier *upstream*-gelegene regulatorische Elemente vorhanden, wie sie z.B. bei der U6 snRNA gefunden wurden. Eine Schlüsselkomponente spielt dabei die TFIIB-Untereinheit TBP (*TATA-binding protein*), welche spezifisch an die TATA-Box binden kann. Somit verleiht erst die TATA-Box dem Promotor der RNA Pol III die Spezifität (Lobo and Hernandez 1989; Mattaj et al. 1988). Die Effizienz der Transkription kann durch die Anwesenheit proximaler und distaler Sequenzelemente beeinflusst werden, die aber nicht unbedingt notwendig sind. Beim Menschen wird z.B. die Bindung von TFIIB an die TATA-Box durch die Interaktion von SNAP_C (*snRNA activating protein complex*) an das proximale Sequenzelement (PSE) gefördert

(Abbildung 2C). (Schramm and Hernandez 2002). Die Genexpression kann darüber hinaus durch distale Sequenzelemente (DSE) beeinflusst werden. Diese besitzen Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren *STAF* und *OCT1* (Schramm and Hernandez 2002), welche inhibierend auf die Transkription Pol III-abhängiger Gene wirken.

1.1.2 Die Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren und der RNA Pol III

Mit Ausnahme von TFIIIA bestehen die einzelnen Transkriptionsfaktoren aus mehreren Untereinheiten. Beim Menschen sind zwei verschiedene TFIIIB-Komplexe bekannt: TFIIIB α und TFIIIB β . TFIIIB α besteht aus den Untereinheiten TBP (*TATA-binding protein*), BDP1 (*B double prime 1*) und BRF2 (*TFIIB related factor 2*) und agiert bei der dritten Promotorklasse, wie z.B. für die Transkription der U6 snRNA (Abbildung 1C) (Buratowski and Zhou 1992; Kassavetis et al. 1992; Kassavetis et al. 1995; Roberts et al. 1996; Weser et al. 2000). Im Vergleich dazu besteht TFIIIB β aus TBP, BDP1 und BRF1 (*TFIIB related factor 1*) und wird bei geninternen Promotoren - wie die für die tRNA- und 5S rRNA-kodierenden Gene - benötigt (Abbildung 1A und 1B) (Schramm et al. 2000). Aus Untersuchungen mit *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die Bindung von TFIIIB die Beugung der DNA fördert, um diese besser für die RNA Pol III zugänglich zu machen (Braun et al. 1992). Desweiteren erhöht die Bindung von *sBdp1* die Stabilität des TFIIIB-Komplexes und führt so zum Öffnen des Promotors (Kassavetis et al. 1990; Kassavetis et al. 1998). Der TFIIIC-Komplex hingegen besteht aus zwei Fraktionen (C1 und C2), die wiederum auch aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind (Dean and Berk 1987; Wang and Roeder 1998; Yoshinaga et al. 1987). Die Funktionen der C1-Untereinheiten sind nicht genau beschrieben. Sie spielen jedoch bei der Rekrutierung der RNA Pol III an den Promotor eine wichtige Rolle und interagieren mit der TFIIIB-Untereinheit BDP1. Dabei ist BDP1 in der Lage, die Funktionen von TFIIIC1 zu übernehmen (Schramm and Hernandez 2002; Weser et al. 2004). Die C2-Einheiten TFIIIC63 und TFIIIC220 binden an der A- bzw. B-Box der Promotoren, wohingegen TFIIIC102 mit der TFIIIB-Untereinheit BRF1 interagiert und so den Faktor zum Aufbau des Initiationskomplexes rekrutiert. In der Hefe wurde weiterhin eine Interaktion von TFIIIC102 mit *sBdp1* beschrieben (Geiduschek and Kassavetis 2001).

Ebenso wie die einzelnen Transkriptionsfaktoren ist auch die RNA Pol III aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Acht von insgesamt 17 Untereinheiten sind an

DNA-Interaktionen am Initiationskomplex beteiligt (Bartholomew et al. 1993; Wang and Roeder 1996, 1997). Von diesen Acht spielt der Faktor RPC39 eine entscheidene Rolle: die TFIIB-Untereinheit BRF1 bindet direkt an die RPC39-Untereinheit der RNA Pol III und rekrutiert so das Enzym zum Initiationskomplex (Brun et al. 1997). Weiterhin soll die TBP-Untereinheit des TFIIB-Komplexes mit der RPC39-Untereinheit der RNA Pol III in Verbindung stehen (Wang and Roeder 1997). Ob auch BRF2 mit der RNA Pol III interagiert, ist bisweilen nicht bekannt.

1.1.3 Die TFIIB-Untereinheit *BDP1*

Das Gen für die humane TFIIB-Untereinheit *BDP1* (***B double prime 1***, *TFNR*, Gen ID: 55814) liegt auf dem chromosomalen Abschnitt 5q13 und wird ubiquitär exprimiert (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5A) (Kassavetis et al. 1995; Kelter et al. 2000; Teichmann and Seifart 1995). Mit Hilfe von Northern Blot-Analysen wurden neben einem Volllängetranskript von 12-15 kb (neueste Angaben NCBI: 11097 bp; siehe Kapitel 1.2.4, Tabelle 1) verschiedene Spleißvarianten identifiziert (4,4 kb, 3,4 kb, 2,2 kb und 1,1 kb), wobei die Stärke der Expression gewebeabhängig ist (Kelter et al. 2000). So werden z.B. im Herzmuskel alle Spleißvarianten exprimiert, wogegen in der Plazenta vorwiegend das Volllängetranskript und in der Leber die 1,9 kb Spleißvariante vorliegen. Eine erhöhte Expression des Volllängetranskriptes und der 2,2 kb-Variante wurden außerdem in der Körnerzellschicht des *Cerebellums* detektiert (Kelter et al. 2000). Die unterschiedlichen Transkriptgrößen sind auf alternative Spleißprozesse zurückzuführen, welche für die *BDP1*-prä-mRNA beschrieben wurden (*BDP1* Δ 15: alternatives Spleißen von Exon 15 (Kelter et al. 2000), *BDP1* Δ 18-39: alternatives Spleißen von Exon 18 bis Exon 39 (Schramm et al. 2000), *BDP1* Δ 33-39: alternatives Spleißen von Exon 33 bis Exon 39 (Kelter et al. 2000). Die verschiedenen Spleißvarianten findet man auch auf Proteinebene. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte das Volllängeprotein bei 283 kDa nachgewiesen werden (neueste Angaben NCBI: 293 kDa; siehe Kapitel 1.2.4, Tabelle 1). Weitere Signale waren bei 150 kDa, 100 kDa, 90 kDa, 75 kDa und 70 kDa zu detektieren und entsprachen weiteren Isoformen, die teilweise gewebespezifisch exprimiert wurden (Kelter 2000). Welche dieser Spleißvarianten im Menschen für die RNA Pol III-abhängige Transkription verantwortlich ist, ist zurzeit noch nicht geklärt (Schramm and Hernandez 2002).

Im Menschen umfasst das BDP1-Volllängetranskript eine Größe von insgesamt 39 Exons. Ein offenes Leseraster von 7874 bp kodiert für ein im Zellkern lokalisiertes Protein von 2624 Aminosäuren (Protein ID: NP_060899) (siehe Kapitel 1.2.4, Tabelle 1). Insgesamt konnten 32 dieser Exons, die für ein Transkript von 7208 bp kodieren und ein Protein von 2254 Aminosäuren umfassen, in unserer Arbeitsgruppe identifiziert werden (Kelter et al. 2000).

Funktionell kann das BDP1-Protein in drei Bereiche unterteilt werden. Der N-terminale Bereich (Aminosäuren 298-345) kodiert für eine SANT/Myb-DNA-Bindedomäne. Aus Analysen in *S. cerevisiae* ist bekannt, dass diese Domäne absolut essentiell für die TFIIC-abhängige RNA Pol III-Transkription ist und den TFIIB-Komplex stabilisieren kann (Kumar et al. 1997; Shah et al. 1999). Außerdem sind in diesem Bereich eine ATP-abhängige DNA-Ligase (Aminosäuren 344-352) sowie ein zweigeteiltes Kernlokalisationsignal (Aminosäuren 380-396) vorhanden (Kelter et al. 2000). Weiterhin konnte innerhalb unserer Arbeitsgruppe mittels *yeast two hybrid*-Analysen ein N-terminaler Interaktionspartner (ZNF297B, *zinc finger protein 297B*) identifiziert werden (Schoenen and Wirth 2006). Im mittleren Bereich des BDP1-Proteins befindet sich ein neunfach wiederholtes 55-Aminosäurenmotiv (Aminosäuren 822-1353) (Schramm et al. 2000), welches ausschließlich von Exon 17 kodiert wird (Kelter et al. 2000). Im C-terminalen Bereich wurden neben einem zweigeteilten Kernlokalisationsignal (Aminosäuren 1834-1850) noch homologe Sequenzbereiche zur Topoisomerase II (Aminosäuren 1969-1983) und zum Elongationsfaktor 1 β (Aminosäuren 1873-1892) nachgewiesen (Kelter et al. 2000).

Das BDP1 Protein wird posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert (PKC, PKA, CAMII, CDC2 und CKII) (Schramm et al. 2000). Insgesamt sind elf potenzielle Phosphorylierungsstellen beschrieben, von denen einige als PEST-Motive innerhalb von Exon 17 vorliegen (Phosphorylierung von Serin- oder Threoninresten) (Geiduschek and Kassavetis 2001). Dabei ist die Phosphorylierung des BDP1-Proteins zellzyklusabhängig (Fairley et al. 2003; Hu et al. 2004; Schramm et al. 2000). Durch eine Hyperphosphorylierung während der Mitose dissoziiert das BDP1-Protein von der Promotorregion und inhibiert so die RNA Pol III-abhängige Transkription. Phosphorylierung der PEST-Motive ermöglichen weiterhin einen geregelten Proteinabbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (Rechsteiner and Rogers 1996).

1.1.4 Regulation des TFIIIB-Komplexes

Im Jahre 1974 wurde erstmals eine erhöhte RNA Pol III-Aktivität in Myelomen von Mäusen beschrieben (Schwartz et al. 1974). Heutzutage ist bekannt, dass viele Typen von transformierten Zellen eine Überexpression von RNA Pol III-abhängigen Transkripten aufweisen. Dazu zählen sowohl durch DNA- (z.B. Hepatitis B-Virus) oder RNA-Viren (z.B. humanes T-lymphotropes Virus 1, HTLV-1) transformierte Zellen als auch Zellen, die durch chemische karzinogene Substanzen transformiert wurden (Felton-Edkins and White 2002; Scott et al. 1983; Wang et al. 1995; White et al. 1990). Im Rahmen einer Studie von 1997 wurden in 19 von insgesamt 80 verschiedenen Tumorproben erhöhte Transkriptmengen der 7SL RNA nachgewiesen (Chen et al. 1997). Die Entstehung von Krebs scheint daher mit einer erhöhten Transkription von RNA Pol III-abhängigen Genen in Verbindung zu stehen, die oft mit Akkumulationen der Transkripte im Nukleolus einhergehen (Wang et al. 2003; White 2004).

Letztendlich lässt sich der molekulare Mechanismus einer erhöhten RNA Pol III-Transkription in drei Klassen unterteilen: (a) die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, (b) die Aktivierung von Onkogenen und (c) die direkte Überexpression RNA Pol III-abhängiger Transkriptionsfaktoren (Abbildung 3).

Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, die den Zellzyklus regulieren. Mutationen oder Deletionen in diesen Genen erhöhen die Gefahr einer Tumorbildung. TFIIIB stellt ein direktes Ziel der Tumorsuppressoren p53, RB und RB-ähnlicher Proteine wie p107 und p130 dar. Diese binden direkt an den TFIIIB-Komplex und verhindern so dessen Rekrutierung zum Promotor (Chesnokov et al. 1996; Sutcliffe et al. 2000). So kann z.B. p53 direkt die TFIIIB-Untereinheit TBP binden und letztlich den gesamten Komplex regulieren (Crighton et al. 2003). Die Bindung von RB an TFIIIB unterbindet die Interaktionen zu TFIIIC2 und zur RNA Pol III (Larminie et al. 1997; Sutcliffe et al. 2000). Desweiteren ist bekannt, dass RB mit zwei Untereinheiten von SNAP_c interagiert und so den TFIIIB Komplex reguliert (Hirsch et al. 2000). Generell können andere Tumorsuppressorgene wie INK4A indirekt - durch Inhibierung der Phosphorylierung des TFIIIB-Komplexes - in diese Regulation eingreifen (Scott et al. 2001). Darüberhinaus kann PTEN die RNA Pol III-abhängige Transkription über seine Lipidphosphataseaktivität inhibieren (Woiwode et al. 2008). Ebenso kann MAF1 direkt an TFIIIB binden und so den Komplex inhibieren (Willis and Moir 2007) - MAF1 gehört zwar nicht zu den Tumorsuppressorproteinen, hat jedoch ähnliche Wirkungen

auf den TFIIB-Komplex. Ein Verlust dieser Proteine kann somit die Transkription der meisten Transkripte der RNA Pol III aktivieren.

Im Gegensatz zu Tumorsuppressorgenen haben Onkoproteine eine aktivierende Wirkung auf den TFIIB-Komplex. Onkoproteine üben meist unterschiedliche zelluläre Funktionen aus und stehen in Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren bzw. Rezeptoren oder sind allgemein an der Signaltransduktion und Transkriptionsregulation beteiligt. Onkogene können dabei den TFIIB-Komplex direkt oder indirekt regulieren. So bindet z.B. die MAP-(*mitogen activated protein*) Kinase ERK direkt an BRF1 und reguliert diese durch Phosphorylierung (Felton-Edkins et al. 2003). Onkogene wie E6 und E7 des humanen Papillomavirus inhibieren die Tumorsuppressorgene p53 und RB und aktivieren so TFIIB (Stein et al. 2002; Sutcliffe et al. 1999). Andere dieser Proteine, wie z.B. MYC, können den Komplex auch direkt aktivieren (Gomez-Roman et al. 2003).

Die direkte Überexpression von RNA Pol III-abhängigen Transkriptionsfaktoren stellt den dritten Mechanismus dar, der letztlich in einer erhöhten Transkription RNA Pol III-abhängiger Gene resultiert. Dies wurde z.B. für TFIIC beschrieben, der verstärkt in von DNA-Viren transformierten Zellen exprimiert wird (z.B. Adenovirus, Epstein-Barr-Virus) (Felton-Edkins et al. 2006; Felton-Edkins and White 2002). Desweiteren wurden erhöhte TFIIC-Level im humanen Ovarial- und Nasopharynxkarzinom nachgewiesen (Felton-Edkins et al. 2006; Winter et al. 2000). Ebenso konnte eine Überexpression des TFIIB-Komplexes im Zervix- und Kolonkarzinomen gezeigt werden (Daly et al. 2005; Johnson et al. 2003).

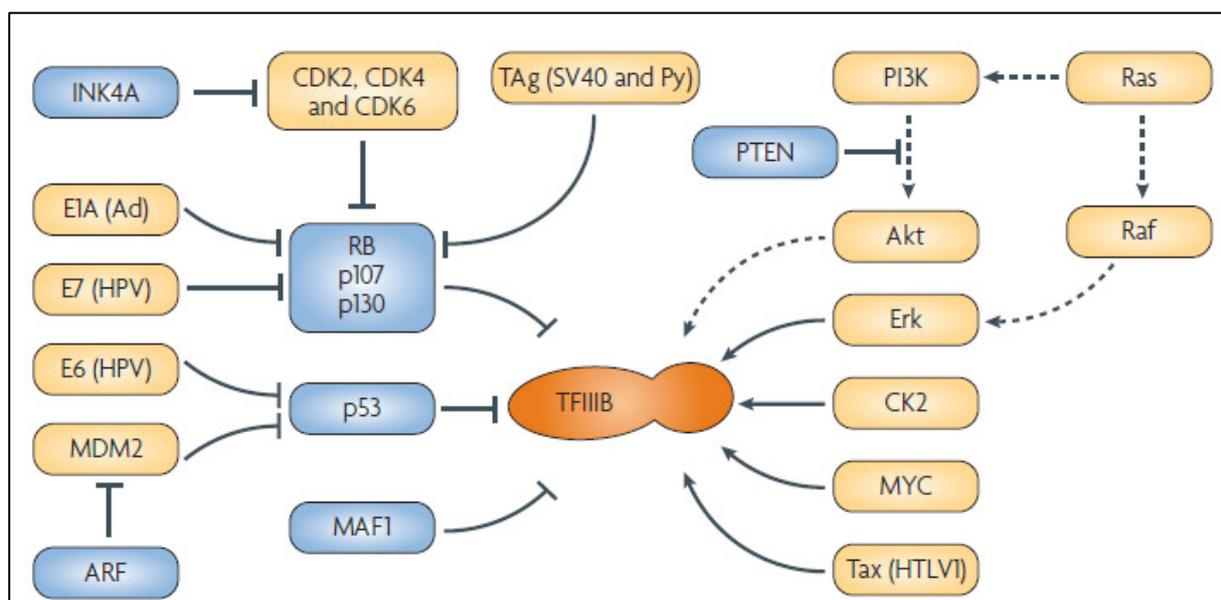


Abbildung 3: Einfluss von Tumorsuppressoren und Onkogenen auf den TFIIB-Komplex

Verschiedene Proteine inhibieren (blau) oder stimulieren (orange) den TFIIB-Komplex (rot). Direkte Repressoren sind Tumorsuppressorgene wie RB, p107, p130, p53 und MAF1. Diese wiederum können durch verschiedene Faktoren (E1A, E7, E6, MDM2) oder durch Phosphorylierung (CDK2, CDK4, CDK69) inhibiert werden und TFIIB somit aktivieren. Im Gegensatz dazu kann TFIIB direkt durch die Bindung der Onkoproteine ERK, CK2, MYC und HTLV1 aktiviert werden. ERK selbst wird durch den RAS/RAF-Signalweg reguliert. Durchgezogene Linien deuten direkte, gestrichelte Linien indirekte Interaktionen an (Marshall and White 2008).

1.2 Das BDP1-Protein und die spinale Muskelatrophie (SMA)

Wie bereits unter 1.1.3 beschrieben, ist das *BDP1*-Gen auf dem chromosomalen Abschnitt 5q13 lokalisiert. In der unmittelbaren Umgebung befindet sich das *SMN1*-Gen (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5A). Der Verlust des *SMN1*-Gens führt zur proximalen spinalen Muskelatrophie (SMA) - dem Forschungsschwerpunkt unserer Arbeitsgruppe. Bei Proben von zwei Patienten wurde neben der SMA eine atypische Gehirnatrophie diagnostiziert. Da dieser Phänotyp mit einem deletierten Marker für das *BDP1*-Gen korrelierte, wurde die Ausbildung einer Gehirnatrophie hypothetisch mit der Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens in Verbindung gebracht. Im Folgenden sollen zunächst die Grundlagen der SMA erläutert werden, bevor im darauffolgenden Absatz der eventuelle Zusammenhang zwischen dem *BDP1*-Gen und der atypischen Form der SMA näher erläutert wird.

1.2.1 Die autosomal rezessive proximale spinale Muskelatrophie (SMA)

Die spinalen Muskelatrophien sind eine genetisch heterogene Gruppe von neuromuskulären Erkrankungen, zu denen auch die SMA zählt. Die SMA ist eine autosomal rezessive Erkrankung und die häufigste Todesursache im Kindesalter (Crawford and Pardo 1996; Pearn 1978; Roberts et al. 1970). Innerhalb der westeuropäischen Bevölkerung liegt die Inzidenz bei 1:6000 bis 1:10000 und in Deutschland wird die Heterozygotenfrequenz auf 1:25 bis 1:35 geschätzt (Feldkotter et al. 2002). Die SMA ist durch die Degeneration der α -Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks gekennzeichnet. Die Degeneration führt in erster Linie zu einer Muskelschwäche, die sich progressiv zu einer Muskelatrophie entwickelt. Die beginnende Atrophie der proximalen Arm- und Beinmuskulatur breitet sich im weiteren Verlauf auf die gesamte Rumpfmuskulatur aus.

1.2.2 Molekulare Grundlagen der SMA

Das mit der SMA korrelierende Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q11.2-13.3) innerhalb einer 500 kb-großen duplizierten und invertierten Region lokalisiert. So können mehrere Genkopien vorliegen, die man je nach Lokalisation als *SMN1* (telomerisch) oder *SMN2* (zentromerisch) bezeichnet (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5A) (Brzustowicz et al. 1990; Lefebvre et al. 1995; Melki et al. 1990; Wirth et al. 2006). Da die SMA durch die Degeneration der α -Motoneuronen charakterisiert ist, wurde das Gen als „*survival motor neuron gene*“ (*SMN*-Gen) bezeichnet.

In über 96 % der Fälle wird die SMA durch eine homozygote Deletion bzw. Genkonversion des *SMN1*-Gens ausgelöst (Lefebvre et al. 1995; Wirth 2000). Alle Patienten besitzen jedoch mindestens eine Kopie des zentromerischen *SMN2*-Gens. Obwohl *SMN1* und *SMN2* für identische Proteine kodieren (neun Exons, 38 kDa-Protein (Lefebvre et al. 1995)), unterscheiden sie sich auf DNA-Ebene in fünf Nukleotiden, wobei drei von diesen intronisch und eine im 3'-nicht-translatierten Bereich liegen (Burglen et al. 1996). Eine C- zu T-Transition in Exon 7 (Position +6) führt zwar nicht zu einem Aminosäureaustausch, generiert jedoch aberrante Transkripte, bei denen Exon 7 deletiert ist (*SMN Δ 7*) (Burglen et al. 1996; Lefebvre et al. 1995; Monani et al. 1999). Zwei Theorien versuchen das alternative Spleißen von Exon 7 zu erklären, wobei eine auf der Zerstörung eines exonischen Spleißverstärkers (*exonic splicing enhancer*, ESE) beruht (Lorson and Androphy 2000; Lorson et al. 1999). Die andere Theorie befürwortet hingegen die Bildung eines *exonic splicing silencer* (ESS) (Kashima and Manley 2003).

Vom *SMN1*-Gen werden fast ausschließlich Volllängetranskripte generiert, wohingegen von *SMN2* zu 90 % Transkripte ohne Exon 7 generiert werden. Lediglich 10 % der *SMN2*-prä-mRNA werden korrekt zum Volllängetranskript gespleißt (Gennarelli et al. 1995; Lefebvre et al. 1995; Lorson et al. 1999). Das aberrante Proteinprodukt (*SMN Δ 7*) kann die Funktion des Volllänge Proteins nicht übernehmen (Lorson and Androphy 2000). Da das *SMN2*-Gen dennoch 10 % an Volllängeprotein generiert und SMA-Patienten keine *SMN1*-Kopie tragen, korreliert der Schweregrad der SMA mit der *SMN2*-Kopienanzahl. Aus diesem Grund kann die klinische Verlaufsform der SMA in vier Typen unterteilt werden (SMA Typ I: Werdnig-Hoffmann, SMA Typ II: intermediäre SMA, SMA Typ III: Kugelberg-Welander, SMA Typ IV: adulte Form der SMA) (Feldkotter et al. 2002; Lefebvre et al. 1995; Wirth 2000).

1.2.3 SMA und die Ausbildung atypischer Symptome

Neben den vier klassischen Typen der SMA existieren Formen, bei denen atypische Symptome auftreten können. Zu diesen zählen axonale Neuropathien und zerebelläre Hypoplasien (Korinthenberg et al. 1997; Omran et al. 1998; Wirth et al. 1997). Mit Hilfe von SMN-Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, dass einige dieser Formen 5q-gekoppelt sind (Rudnik-Schoneborn et al. 1996; Rudnik-Schoneborn et al. 1995). Es ist bislang nicht geklärt, ob es sich dabei um eigenständige Symptomkomplexe handelt oder ob noch andere - dem *SMN* benachbarte - Gene für die Ausbildung mitverantwortlich sind (*contiguous gene syndrom*).

Eine Anzahl der Patienten mit einem atypischen SMA-Phänotyp weist große homozygote Deletionen innerhalb der SMA-Region auf – hier sind zusätzlich zum *SMN1* die Gene *SERF1* und *BIRC* (ehemals *NAIP*) betroffen. Große Deletionen sind eher ungewöhnlich, da zuvor nur kleinere *de novo-rearrangements* beschrieben wurden (Capon et al. 1995; Melki et al. 1994; Rodrigues et al. 1995; Wirth et al. 1995). Als Kandidatengene für die Ausbildung zusätzlicher Symptome kommen die oben genannten Gene nicht in Frage, da bereits homozygote Deletionen von *SERF1*, *BIRC* und *GTF2H2* bei SMA-Patienten ohne atypischen Verlauf beschrieben wurden (Burglen et al. 1997; Carter et al. 1997; Roy et al. 1995; Scharf et al. 1998). So wurden z.B. bei 15 % der SMA-Patienten vom Typ I und 6 % vom Typ II Mutationen im *BIRC*-Gen beschrieben (Wirth et al. 1995). Jedoch scheint das Ausmaß benachbarter Gendelektionen den Schweregrad der SMA zu beeinflussen (Arkblad et al. 2009; Jedrzejowska et al. 2009; Liang et al. 2009; Omrani et al. 2009). Somit ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass ein weiteres Gen in der direkten Nachbarschaft für die Ausbildung atypischer Symptome verantwortlich ist.

Bei Proben von zwei Patienten (Nr. 353 und Nr. 6432) wurde neben der SMA eine atypische Gehirnatrophie diagnostiziert. Bei der Patientin Nr. 353 wurde innerhalb der SMA-Region ein große *de novo* aufgetretene *large scale*-Deletion nachgewiesen (Wirth et al. 1997). Anhand von Markeranalysen konnte gezeigt werden, dass zusätzlich distal gelegene Gene der SMA-Region auf Chromosom 5q13 deletiert sind – darunter auch ein Marker in der Nähe des *BDP1*-Gens (Abbildung 4). Das *BDP1*-Gen liegt außerhalb der duplizierten SMA-Region, flankiert diese jedoch auf der telomerischen Seite (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5A). Anhand von experimentellen Daten konnte darauf geschlossen werden, dass durch die aufgetretene *de novo*-Deletion des beschriebenen Markers bei Patientin Nr. 353 eine

hemizygoter Deletion eines *BDP1*-Allels vorlag (Herchenbach, Dissertation 2002). Somit könnte eine Deletion des *BDP1*-Gens für die Ausbildung der Gehirnatrophie verantwortlich gewesen sein. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die verstärkte Expression von *BDP1* im Kleinhirn, so dass eine zerebelläre Entwicklungsstörung durch eine *BDP1*-Haploinsuffizienz denkbar wäre (Kelter, Dissertation 2006). Mit Hilfe von Southern Blot-Analysen konnte bei der beschriebenen Patientin die heterozygote Deletion des *BDP1*-Gens nachgewiesen werden, die auf den Verlust einer *BDP1*-Kopie innerhalb der deletierten Region hinweisen könnte (Herchenbach, Dissertation 2002). Weiterhin wurde mittels quantitativer PCR eine schwächere Signalstärke des Amplifikats der Patientin im Vergleich zu Kontrollpersonen detektiert (Herchenbach, Dissertation 2002).

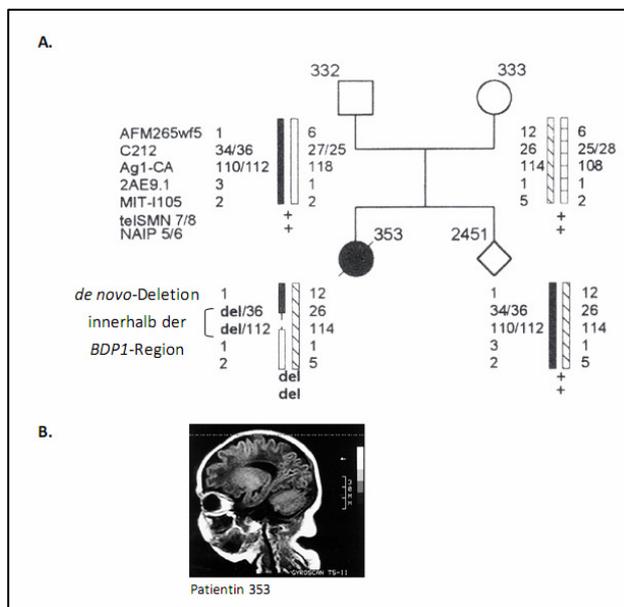


Abbildung 4: Stammbaum der Patientin Nr. 353

(A.) Stammbaum der Familie mit *de novo*-Deletion innerhalb der SMA-Region. Die für die Analysen verwendeten Marker sind dargestellt. Die Tochter mit der Nr. 353 zeigt eine *de novo*-Deletion auf dem paternalen Chromosom, die eventuell die Deletion des Markers in der Nähe des *BDP1*-Gens einschließt. (B.) Magnetresonanztomographie (MRT) der Patientin Nr. 353 mit diagnostizierter Gehirnatrophie (von Rudnik-Schoneborn zur Verfügung gestellt) (modifiziert nach Wirth et al., 1997).

Bei einem weiteren SMA-Patienten mit Gehirnatrophie (Nr. 6432) wurde ebenfalls eine große Deletion benachbarter Gene innerhalb der SMA-Region festgestellt, die jedoch nicht *de novo* aufgetreten war. Ob auch bei diesem Patienten eine eventuelle Deletion des *BDP1*-Gens vorlag, konnte mittels Markeranalysen nicht geklärt werden.

Zur vergleichenden Analyse beider Patienten (Nr. 353 und Nr. 6432) wurden Daten zur Bestimmung der *BDP1*-Kopienanzahl und -Expression ermittelt. Die Ergebnisse quantitativer Western Blot-Analysen, semi-quantitativer RT-PCRs und *Realtime*-Analysen ergaben jedoch weder Hinweise auf eine reduzierte Proteinmenge noch auf einen verminderten RNA- oder DNA-Gehalt (Schönen, Dissertation 2006). Diese neueren Ergebnisse standen somit im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen. Zur Klärung des

Zusammenhangs zwischen dem *BDP1*-Gen und den atypischen Formen der SMA sollte ein Tiermodell weitere Aufschlüsse bringen.

1.2.4 Das *Bdp1*-Gen und die murine SMA-Region

Vergleicht man das humane BDP1 und das murine Bdp1, so findet man auf Aminosäurenebene eine 98 %-99 %ige Identität (Tabelle 1). Somit bestanden beste Voraussetzungen, um mit Hilfe eines *Bdp1*-Mausmodelles eventuelle Zusammenhänge zwischen Deletionen des *BDP1*-Gens und der Ausbildung atypischer SMA-Formen zu klären.

Die murine SMA-Region ist auf Chromosom 13 lokalisiert (Abbildung 5B) (DiDonato et al. 1997). In dieser Region befindet sich nur eine homologe Kopie zum humanen *SMN1*-Gen (*Smn*) (DiDonato et al. 1999; DiDonato et al. 1997; Viollet et al. 1997). Im Jahre 1999 konnte Endrizzi durch die Sequenzierung eines BAC-Klones - welcher die gesamte murine SMA-Region der Maus beinhaltet - zeigen, dass das murine Homolog zum *BDP1* am proximalen Ende des *Serf*-Gens auf Chromosom 13 lokalisiert ist (BAC 149m19) (Endrizzi et al. 1999). Im Menschen flankiert das *BDP1*-Gen distal die duplizierte Region, die auch das *SMN*-Gen beinhaltet (Endrizzi et al. 2000; Kelter et al. 2000).

Tabelle 1: Vergleich *BDP1* und *Bdp1* (ID-Nummern: NCBI)

	Mensch	Maus
Gen	<i>BDP1</i> Gene ID: 55814	<i>Bdp1</i> Gene ID: 55971
Lokalisation	5q13	13
Transkript	Volllängentranskript: 12-15 kb, Spleißvarianten: 4,4 kb; 3,4 kb; 2,2 kb; 1,9 kb; 1,1 kb (Kelter et al. 2000) neueste Angaben: 11097 bp, NM_018429	9921 bp NM_001081061
ORF	7874 bp	7403 bp
Protein/Exon	2624 Aminosäuren/ 39 Exons, NP_060899	2467 Aminosäuren/ 39 Exons, NP_001074530
Größe	283 kDa, Isoformen: 150 kDa, 100 kDa, 90kDa, 75kDa, 70 kDa (Kelter et al. 2000), neueste Angaben: 293 kDa	270 kDa
Homologie	98 %-99 % auf Proteinebene	

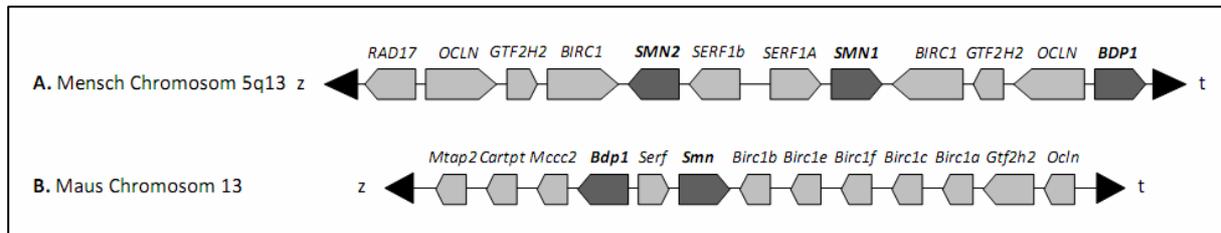


Abbildung 5: Schematische Übersicht der SMA-Region im Menschen und in der Maus

(A.) Humanes Chromosom 5, (B.) murines Chromosom 13. *BDP1/Bdp1* (*B double prime 1*), *BIRC/Birc* (*baculoviral IAP repeat-containing protein 1*; ehemals *NAIP: neuronal apoptosis inhibitory protein*), *Cartpt* (*CART prepropeptide*), *Mtap2* (*microtubule-associated protein 2*), *GTF2H2/Gtf2h2* (*generall transcription factor II H*, ehemals *p44*), *Mccc2* (*methylcrotonyl-CoA carboxylase 2*), *OCLN/Ocln* (*Occludin*), *SERF/Serf* (*small EDRK-rich factor 1*, ehemals *H4F5*), *SMN1/SMN2*, *Smn* (*survival motor neuron gene*) z: Zentromer, t: Telomer.

1.3 Mausgenetik

Die Maus ist einer der wichtigsten Modellorganismen zur Untersuchung der vergleichenden Pathogenese im Menschen. Mäuse sind relativ leicht zu züchten, haben eine kurze Generationszeit sowie relativ große Wurfgrößen. Da im Rahmen dieser Arbeit ein Mausmodell zur funktionellen Analyse von *Bdp1* generiert werden sollte, werden im Folgenden die wichtigsten Stadien der Embryonal- und Gehirnentwicklung sowie Techniken zur Manipulation des Mausgenoms erklärt.

1.3.1 Die Embryonalentwicklung der Maus

Die Embryonalentwicklung der Maus umfasst 19-21 Tage (je nach Mausstamm). Postnatal vergehen bis zur Geschlechtsreife sechs bis acht Wochen, so dass die Gesamtentwicklungsphase ca. drei Monate umfasst. Die einzelnen Embryonalstadien werden je nach Entwicklungstag als E0,5-21 p.c. (*post coitum*) bezeichnet. Ausgehend von einer Verpaarung in der zweiten Nachthälfte, wird das erste Embryonalstadium am Morgen nach der Befruchtung als E0,5 p.c. bezeichnet. Mit der Geburt an Tag 0 werden alle postnatalen Stadien mit P bezeichnet. Im Folgenden wird die frühe Embryonalentwicklung der Maus bis E7,5 p.c. beschrieben, die auch in Abbildung 6 dargestellt ist. Tabelle 2 zeigt zusätzlich einen Gesamtüberblick der Entwicklung.

Die Eizelle wird im Ovidukt befruchtet, wo sie von einer äußeren Zellschicht - der *Zona pellucida* - umhüllt und so geschützt wird. Unmittelbar nach der Befruchtung kommt es erst zum Abschluss der Meiose, der zweite Polkörper wird gebildet, woraufhin erste frühe

Furchungsprozesse stattfinden. Die erste Teilung erfolgt 24 Stunden nach der Befruchtung, alle weiteren folgen in einem Abstand von 10-12 Stunden, so dass schließlich eine kompakte Zellkugel - die sogenannte Morula (E2,5 p.c.) - entsteht (Schenkel 1995). Im 8-16-Zell-Stadium vergrößern sich die einzelnen Blastomeren, die ihre Oberfläche verdichten. Durch tangentielle und radiale Furchungsprozesse entstehen zwei Zellgruppen: aus den äußeren Zellen der Morula geht das Trophoektoderm hervor, die inneren Zellen bilden die sogenannte innere Zellmasse (IZM). Das Trophoektoderm ist für die Ausbildung extraembryonaler Strukturen verantwortlich, die der Versorgung des Embryos dienen (z.B. Plazenta). Der eigentliche Embryo entwickelt sich aus einer kleinen Anzahl von Zellen der IZM (Beddington and Robertson 1999; Gardner 1983; Johnson and Ziomek 1981). In diesem Stadium wird der Embryo als Blastozyste bezeichnet (E3,5 p.c.). Das Trophoektoderm pumpt Flüssigkeit in das Innere der Blastozyste, wodurch ein flüssigkeitsgefüllter Vesikel (Blastozoele) entsteht.

Dreieinhalb bis viereinhalb Tage nach der Befruchtung teilt sich die IZM in zwei Bereiche auf: aus der obersten Schicht, die in Kontakt mit der flüssigkeitsgefüllten Höhle der Blastozyste steht, entwickelt sich das primitive Endoderm. Dieses ist an der Bildung extraembryonaler Strukturen beteiligt. Die übrigen Zellen der IZM werden zum primitiven Ektoderm (Epiblast), woraus letztendlich der eigentliche Embryo sowie einige andere extraembryonale Strukturen hervorgehen. In diesem Stadium löst sich der Embryo aus der *Zona pellucida* und nistet sich in der Uterusschleimhaut ein. Dabei replizieren die Zellen der muralen Trophoektodermwand, ohne sich zu teilen (Endoreduplikation). Die so entstehenden sogenannten Riesenzellen des Trophoblasten dringen in die Uterusschleimhaut ein. Der restliche Teil des Trophoektoderms wächst zum ekto-plazentalen Kegel und dem extraembryonalen Ektoderm heran – diese Strukturen tragen schließlich zur Ausbildung der Plazenta bei. Zusätzlich bedecken einige Zellen des primitiven Endoderms die innere Oberfläche des muralen Trophoektoderms (parietales Endoderm). Die verbleibenden Zellen des primitiven Endoderms umhüllen den Eizylinder (viscerales Endoderm), der sich in die Länge zieht und den Epiblasten enthält (Gardner 1983). Durch diese Vorgänge entsteht etwa sechs Tage nach der Befruchtung eine innere Höhle im Epiblasten (proamniotische Höhle), welche U-förmig ist. Die zukünftigen Körperachsen werden durch Bildung des Primitivstreifens beim Einsetzen der Gastrulation sichtbar.

Ab E6,5 p.c. beginnt die Gastrulation, welche nach achteinhalb Tagen abgeschlossen ist. In dieser Zeit werden die Keimblätter und die Körperachsen des Embryos angelegt. Weiterhin kommt es zur Ausbildung der *Chorda dorsalis* und der Somiten. Die Anlegung zusätzlicher extraembryonaler Strukturen umfasst Strukturen der Plazenta (*Amnion*, visceraler Dottersack, *Allantois* und *Chorion*).

Gegen Ende der Gastrulation entstehen die Neuralwülste und durch eine Anzahl an Faltungsprozessen wird der Darm gebildet. Desweiteren bilden sich Herz, Leber und Kopf. Mit Abschluss der Gastrulation setzt die Organogenese ein (Wolpert 1999).

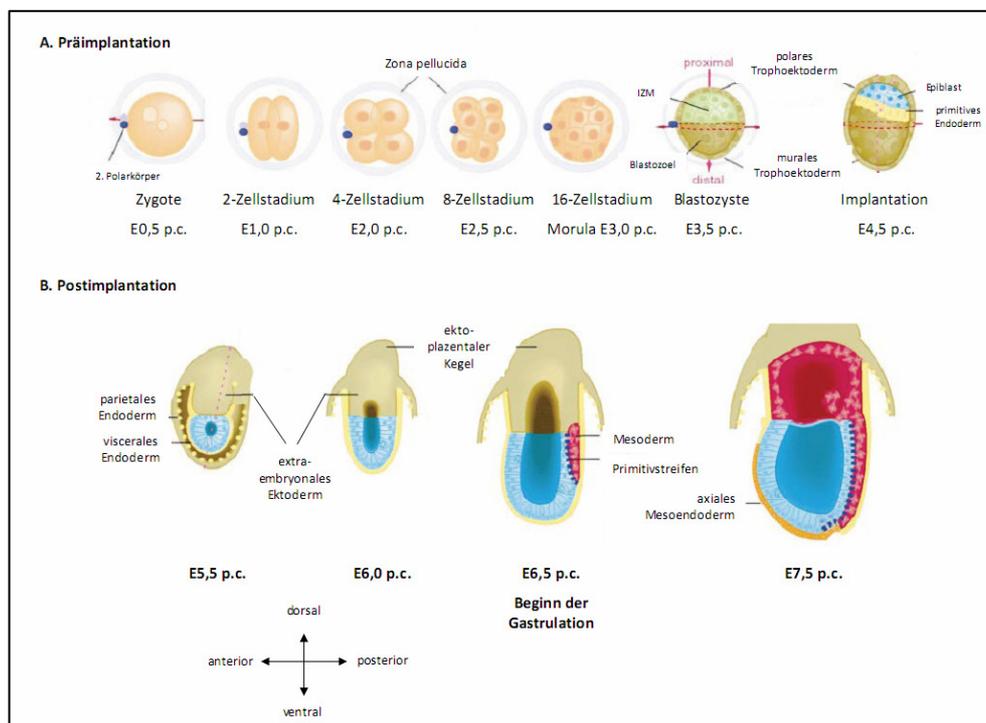


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Mausentwicklung bis E7,5 p.c.

(A.) Übersicht der Präimplantationsstadien bis E4,5 p.c. Nach der Befruchtung der Eizelle wird die Meiose abgeschlossen, der zweite Polkörper wird gebildet und durch mehrere Zellteilungprozesse entsteht die Morula (E2,5 p.c.). Durch Verdichtung der Blastomeren sowie weiteren Furchungsprozessen entsteht eine Blastozyste, die aus einer inneren Zellmasse (IZM) und einer äußeren Zellschicht (Trophoektoderm) besteht. Durch Aufnahme von Flüssigkeit entsteht ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum (Blastozoele). Am Embryonaltag 4,5 p.c. findet die Implantation (Nidation) statt, wobei Riesenzellen der muralen Trophoektodermwand in die Uterusschleimhaut eindringen. Während aller Präimplantationsstadien ist der Embryo von der *Zona pellucida* umhüllt. **(B.)** Übersicht einiger Postimplantationsstadien bis E7,5 p.c. Das Trophoektoderm bildet den ekto-plazentalen Kegel sowie das extraembryonale Ektoderm. Ausbildung des parietalen und visceralen Endoderms. Ab E6,5 p.c. Beginn der Gastrulation und Bildung von Meso- und Endoderm. E: Embryonalstadium, p.c.: *post coitum* (modifiziert nach Beddington and Robertson, 1999).

Tabelle 2: Die Embryonalentwicklung der Maus (Schenkel 2006)

Alter p.c. (Tage)	Stadium	Entwicklung
0,5	1-Zellstadium	Befruchtung der Eizelle im Ovidukt
1,5	2-Zellstadium	Proliferation
2,5	Morula	Proliferation, Ausbildung des Trophoektoderms
3,5	Blastozyste	Embryo mit innerer (IZM) und äußerer (Trophoektoderm) Zellmasse
4,5-6	Implantation	Freie Blastozyste ohne <i>Zona pellucida</i> und Implantation in der Uterusschleimhaut, Ausbildung und Differenzierung des Eizylinders
6,5-9,5	Gastrulation	Differenzierung in Endo-, Meso- und Ektoderm, Anlegung der embryonalen Achsen, Beginn der Herz- und Lungenentwicklung, Drehung des Embryos
10-19	Organogenese	Entwicklung der Organe sowie sexuelle Differenzierung
19-21		Wurf

1.3.2 Die frühe Gehirnentwicklung der Maus und das Ventrikelsystem

Die Ausbildung der Neuralfalte bildet das erste Anzeichen einer Gehirnentwicklung in der Maus um E7,5 p.c. Die Vorstufen der einzelnen Hirnabschnitte - die sogenannten Hirnbläschen - bilden sich ab E8,5 p.c. am vorderen Ende des Neuralrohrs und bestimmen die ersten Unterteilungen des Gehirns (Vorderhirn [*Prosencephalon*], Mittelhirn [*Mesencephalon*] und Rautenhirn [*Rhombencephalon*]). Aus diesen Anlagen werden schließlich die verschiedenen Gehirnareale ausgebildet (Großhirn [*Telencephalon*], Zwischenhirn [*Diencephalon*], Mittelhirn [*Mesencephalon*], Brücke [*Pons*], Kleinhirn [*Cerebellum*] und verlängertes Mark [*Medulla oblongata*]) (Abbildung 7).

Das Lumen des Neuralrohrs entwickelt sich im Bereich des Gehirns zu einem Hohlraumsystem (Ventrikelsystem). Dieses besteht insgesamt aus vier Hohlräumen, die miteinander verbunden sind. Beide Großhirnhemisphären des *Telencephalon* weisen je einen Lateralventrikel auf. Des Weiteren werden ein dritter Ventrikel im *Diencephalon* und ein vierter Ventrikel im *Rhombencephalon* ausgebildet (Abbildung 7) (Faller and Schünke 1995). Das Ventrikelsystem ist mit einer Gehirnflüssigkeit (*Liquor*) gefüllt, der von Epithelzellen des *Plexus choroideus* produziert wird. Der *Liquor* schützt Gehirn und Rückenmark vor Erschütterungen. Durch Diffusion und aktiven Transport fließt der *Liquor* in

die einzelnen Ventrikel, gelangt von den Lateralventrikeln aus über das Aquädukt in den Dritten und schließlich in den vierten Ventrikel. Von dort aus verlässt der *Liquor* die inneren Räume und erreicht ein äußeres System, von wo aus er letztendlich zurück in das Lymphsystem gelangt.

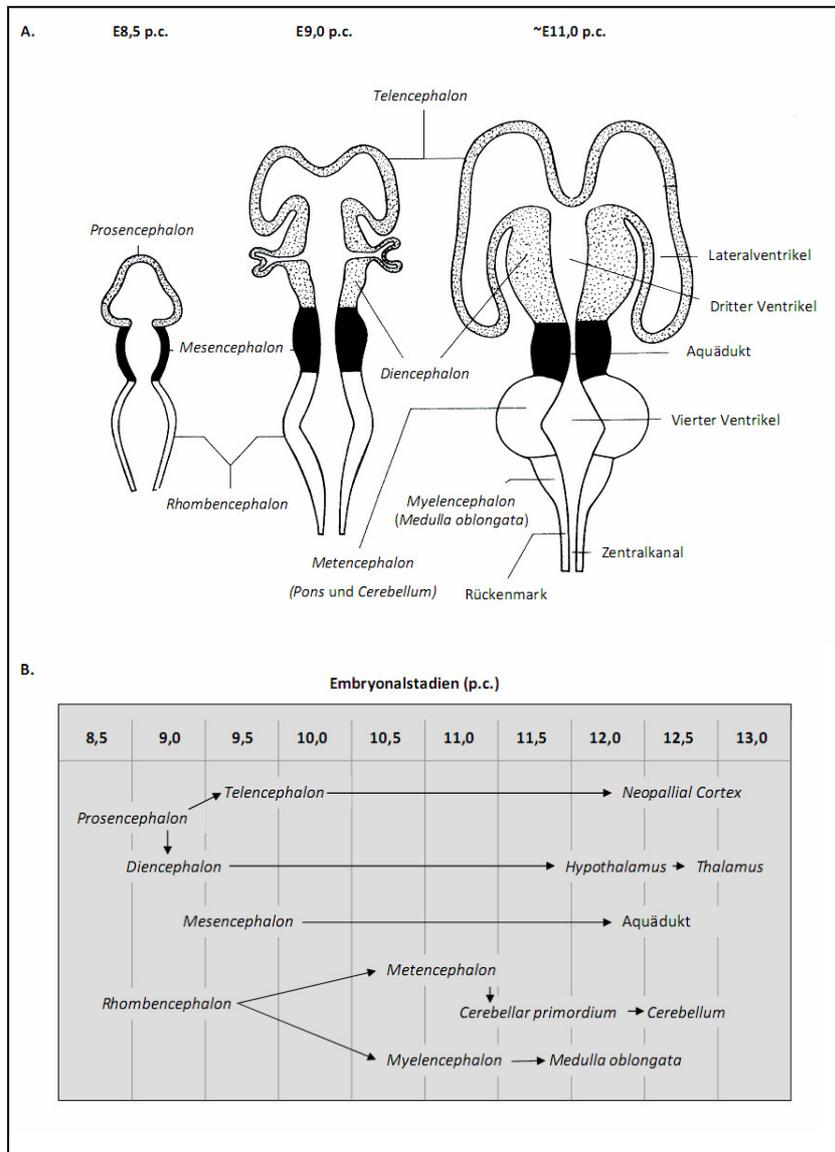


Abbildung 7: Die frühe Gehirnentwicklung in der Maus

(A.) Erste Anzeichen einer Gehirnentwicklung um E8,5 p.c. und Bildung der drei Hirnbläschen (*Prosencephalon*, *Mesencephalon* und *Rhombencephalon*). Ab E9,5 p.c. entwickelt sich aus dem *Prosencephalon* das *Telencephalon* und *Diencephalon*. Um E11,0 p.c. werden die Anlagen der Lateralventrikel sowie des dritten und vierten Ventrikel sichtbar. Weiterhin entwickelt sich aus dem *Mesencephalon* das Aquädukt und aus dem *Rhombencephalon* das *Met-* und *Myelencephalon* **(B.)** Vereinfachte Darstellung der frühen Gehirnentwicklung in der Maus. Gezeigt sind die Embryonalstadien E8,5 p.c. bis E13,0 p.c. Die Abbildung ist auf die Hauptgehirnareale begrenzt (modifiziert nach Kaufman and Bard 1999).

1.3.3 Manipulationen des Mausgenoms

Nach neuesten Angaben umfasst das Mausgenom 20.210 proteinkodierende Gene (Church et al. 2009). Von 15.187 humanen und murinen Genen existieren Orthologe, die etwa 75 % des murinen und 80 % des humanen Genoms repräsentieren. In der Maus konnten in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Methoden zur Manipulation des Genoms entwickelt werden, wodurch die *in vivo*-Funktionsanalyse bestimmter Gene ermöglicht wird. Durch die beschriebenen Eigenschaften ist die Maus ein idealer Modellorganismus zur vergleichenden Pathogenese. So können mit Hilfe einer Pronukleus-Injektion (Gordon et al. 1980; Palmiter et al. 1982) oder durch die Transfektion von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) (Robertson et al. 1986) Tiere generiert werden, in welche eine heterologe Expression möglich ist oder die endogene Gene überexprimieren. Desweiteren ist es möglich, durch sogenanntes *gene targeting* murine Gene gezielt zu modifizieren.

1.3.4 *Gene targeting*

Mit Hilfe des *gene targeting* können gezielte Modifikationen mittels homologer Rekombination in das Mausgenom eingebracht werden (Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986; Thomas and Capecchi 1987). Dabei werden ES-Zellen verwendet, die *in vitro* genetisch manipuliert werden können. ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste (E3,5 p.c.) gewonnen und *in vitro* kultiviert (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Aufgrund ihrer Pluripotenz sind sie in der Lage, nach einer genetischen Manipulation zur Generierung sogenannter chimärer Mäuse beizutragen (Bradley et al. 1984; Gossler et al. 1986). Entscheidend für die Modifikation der ES-Zellen ist die homologe Rekombination des sogenannten *targeting*-Konstruktes, das über Elektroporation in die Zellen gebracht wird (Thomas and Capecchi 1987). Wegen der geringen Frequenz einer homologen Rekombination ($1:10^6$ bis $1:10^9$) (Schenkel 2006) beinhaltet das Konstrukt neben der eigentlichen genetischen Modifikation möglichst lange, homologe Sequenzabschnitte zu der genomischen Region, in die es eingebracht werden soll. Selektionsmarker im *targeting*-Konstrukt ermöglichen außerdem die Identifizierung homolog rekombinanter ES-Zellklone (Mansour et al. 1988).

1.3.5 Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme

Das dauerhafte, vollständige Ausschalten einer Genfunktion kann zu einer frühen embryonalen Letalität führen, wodurch postnatale Untersuchungen nicht mehr möglich sind. Bei einem sogenannten konditionalen *gene targeting* werden sequenz-spezifische Rekombinationssysteme verwendet, die es erlauben, Gene zeit- oder gewebespezifisch auszuschalten (Marth 1996; Rajewsky et al. 1996). Die beiden am besten charakterisierten und am weitesten verbreiteten sequenz-spezifischen Rekombinationssysteme sind das Cre/loxP (Hamilton and Abremski 1984) und das Flp/FRT-System (Andrews et al. 1985), die beide erfolgreich in der Maus angewendet werden (Farley et al. 2000; Rodriguez et al. 2000).

1.3.5.1 Das Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System stammt aus dem Bakteriophagen *P1* und ist sowohl für die Integration als auch für die Exzision des Phagengenoms in dessen Wirtsorganismus zuständig (Abremski et al. 1983; Hoess and Abremski 1985; Sternberg and Hamilton 1981). Die 38 kDa große Cre-Rekombinase (*causes recombination*) gehört zur Familie der λ -Integrasen und vermittelt ohne Hilfe von Co-Faktoren die basenpaargenaue Rekombination zwischen zwei sogenannten loxP-Stellen (*locus of crossing over (x) in P1*). Diese bestehen aus 13 bp langen, invertierten Wiederholungssequenzen (*inverted repeats*), die von einem 8 bp langen *spacer* separiert werden. Die Cre-induzierte Rekombination zwischen zwei loxP-Stellen gleicher Orientierung führt zur Exzision eines dazwischen liegenden DNA-Fragments, so dass nur eine intakte loxP-Stelle verbleibt (Kilby et al. 1993). LoxP-Stellen kommen im endogenen *Mammalia*-Genom nicht vor, dennoch kann eine Cre-vermittelte Rekombination durch entsprechende Modifikationen des Genoms induziert werden (Gu et al. 1993; Sauer and Henderson 1988).

Die Expression eines Cre-Transgens unter der Kontrolle eines zeit- oder gewebespezifischen Promotors ermöglicht konditionale *gene targetings* in der Maus (Gu et al. 1993; Hamilton and Abremski 1984; Utomo et al. 1999). Dafür wird die Zielsequenz im *targeting*-Vektor 5' und 3' von loxP-Stellen flankiert (gefloxt) und über homologe Rekombination in das Genom der ES-Zellen gebracht. Im Tier werden diese Zielsequenzen zunächst normal exprimiert und erst durch das Einkreuzen transgener Cre-exprimierender Mäuse wird die Deletion des Gens induziert (Lakso et al. 1992; Orban et al. 1992; Rajewsky et al. 1996).

1.3.5.2 Das Flp/FRT-System

Das Flp/FRT-Rekombinationssystem stammt aus *S. cerevisiae* und beinhaltet die 46 kDa große DNA-Rekombinase Flp-Rekombinase (Flp) sowie deren Zielsequenz FRT (*Flp recombinase target*) (Dymecki 1996; Huang et al. 1991). Eine FRT-Sequenz besteht aus einem 8 bp langen *spacer*, der von 13 bp langen *inverted repeats* flankiert ist. Der Mechanismus der Flp-vermittelten Rekombination verläuft ähnlich der Cre/loxP-vermittelten Rekombination, allerdings ist das System aufgrund der Thermolabilität des Enzyms bei physiologischen Bedingungen in *Mammalia* wenig effizient (Rodriguez et al. 2000). Mittlerweile wurden Proteine mit verbesserter Rekombinationseffizienz bei 37°C generiert (Schaff et al. 2001). Eine Flp-vermittelte Deletion von FRT-flankierten Zielsequenzen kann durch das Einkreuzen von transgenen Flp-Rekombinase-exprimierenden Mäusen induziert werden, welche die Rekombinase unter der Kontrolle des *ROSA26*-Promotors ubiquitär exprimieren (Farley et al. 2000; Rodriguez et al. 2000).

1.3.6 SMA-Mausmodelle

In den letzten Jahren wurden verschiedene Tiermodelle zur Analyse der Pathogenese der SMA generiert. Diese Tiermodelle umfassen sowohl ubiquitäre, transgene als auch konditionale SMA-Mausmodelle.

Ein ubiquitärer *knockout* des *Smn*-Allels führt zur embryonalen Letalität. Der Zeitpunkt der Letalität hängt sowohl von der *knockout*-Strategie als auch von dem genetischen Hintergrund der verwendeten Mausstämmen ab (Hsieh-Li et al. 2000; Schrank et al. 1997).

Mit der Generierung transgener Mäuse, die neben dem ubiquitären *Smn-knockout* eine unterschiedliche Kopienanzahl des humanen *SMN2*-Transgens tragen, wurden adäquate Mausmodelle für die SMA generiert (*Smn^{ko/ko}*; *SMN2^{tg/tg}*). Wie beim ubiquitären *Smn-knockout* hängt der Phänotyp von dem genetischen Hintergrund des verwendeten Mausstammes ab und korreliert - wie beim Menschen - mit der *SMN2*-Kopienanzahl (Hsieh-Li et al. 2000; Michaud et al. 2010; Monani et al. 2000). Doppelt transgene Mausmodelle, die zusätzlich zum *SMN2*-Transgen ein weiteres Transgen (z.B. mit einer Mutation im *SMN*-Gen oder eine trunkierte *SMN2Δ7* cDNA) tragen, zeigen einen wesentlich milderen SMA-Phänotyp (Le et al. 2005; Monani et al. 2003; Workman et al. 2009).

Um die gewebespezifischen Funktionen des *SMN*-Gens zu untersuchen, wurden weiterhin eine Anzahl von konditionalen SMA-Mausmodellen - basierend auf dem Cre/loxP-System (1.3.5) - generiert (Cifuentes-Diaz et al. 2001; Frugier et al. 2000; Vitte et al. 2004).

Um die funktionellen Analysen des *Bdp1*-Gens im Zuge dieser Arbeit auszuweiten, sollte das *Bdp1*-Mausmodell mit einem SMA-Mausmodell verpaart werden. Dafür wurde ein SMA-Mausmodell verwendet (Hsieh-Li et al. 2000), das auf einen reinen FVB/NCrI-Hintergrund zur Verfügung stand (Riessland et al. 2010). Homozygote *Smn-knockout*-Tiere mit vier *SMN2*-Kopien (*Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg}) sind überlebensfähig. Die Tiere entwickeln nekrotisches Gewebe an Schwanz und Ohren und zeigen somit ähnliche phänotypische Eigenschaften, wie sie bei einer geringen Anzahl von SMA-Patienten beschrieben wurden (Araujo Ade et al. 2009). Nachkommen, die eine homozygote Deletion für das *Smn*-Gen, jedoch das Transgen heterozygot tragen (*Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/wt}), überleben etwa 10 Tage (Riessland et al. 2010). Dieses SMA-Mausmodell wurde in unserer Arbeitsgruppe mindestens sieben Generationen auf C57BL/6NCrI zurückgekreuzt. So generierte Tiere zeigen eine erhöhte Lebensdauer von 14,5 Tagen im Vergleich zu Tieren auf 100 % FVB/NCrI-Hintergrund, wenn sie das *SMN2*-Transgen heterozygot tragen (Ackermann et al., nicht veröffentlicht). Da das *Bdp1*-Mausmodell ebenfalls auf einem C57BL/6NCrI-Hintergrund basieren sollte, wären - nach erfolgter Verpaarung der Tiere - Analysen des *Bdp1*-Gens auf einen reinen genetischen Hintergrund durchführbar.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse von kausalen Zusammenhängen zwischen Deletionen des *BDP1*-Gens und der Ausbildung atypischer SMA-Formen, wie sie bei den Patienten Nr. 353 und Nr. 6432 diagnostiziert wurden (siehe Kapitel 1.2.3). Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, ob eine Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens für die Ausbildung der Gehirnatrophien dieser Patienten verantwortlich war. Bei Patientin Nr. 353 sprach ein deletierter Marker in der SMA-Region für eine Involvierung des *BDP1*-Gens bei der Ausprägung einer Gehirnatrophie. Daten aus Southern Blot-Analysen und quantitativer PCRs unterstützen die Theorie einer *BDP1*-Deletion. Ergebnisse neuerer Analysen (Western Blot-Analysen, semi-quantitative RT-PCRs, *Realtime*-Analysen) standen jedoch im Gegensatz zu dieser Theorie.

Um diese geschilderten Fragestellungen endgültig zu klären, sollte ein adäquates Mausmodell generiert werden. Zu diesem Zweck wurde in Vorarbeiten eine Strategie für einen konditionalen *knockout* des murinen *Bdp1*-Gens entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit umgesetzt. Dazu zählte die Transfektion von murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mit dem in eigenen Vorarbeiten klonierten *Bdp1-targeting*-Konstrukt sowie die Selektion und Verifizierung der homolog rekombinanten ES-Zellklone. Über die Generierung von chimären Mäusen sollten verschiedene *Bdp1*-Linien generiert und weitmöglichst charakterisiert werden. Dabei sollte zunächst durch Einkreuzen einer entsprechenden transgenen Cre-Linie eine ubiquitäre Deletion des *Bdp1*-Gens induziert werden. Nach Möglichkeit sollte hier zusätzlich die *Bdp1*-Expression in Abhängigkeit von *Smn*-Deletionen untersucht werden, indem entsprechende Linien miteinander verpaart werden. Je nach phänotypischer Ausprägung der ubiquitären *Bdp1*-Deletion sollte weiterhin ein gewebespezifischer *Bdp1-knockout* generiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Für die hier beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Chemikalien mit der Qualitätsbezeichnung *pro analysis* verwendet. Alle Standardchemikalien, organische Substanzen sowie Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham (GE Healthcare)	Freiburg	Deutschland
AppliChem	Darmstadt	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
Perkin-Elmer	Waltham (MA)	USA
Qiagen	Hilden	Deutschland
Roche	Mannheim	Deutschland
Roth	Karlsruhe	Deutschland
Serva	Heidelberg	Deutschland
Sigma-Aldrich (Fluka)	Taufkirchen	Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien (Glas- und Plastikwaren) wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applied Biosystem	Carlsbad (CA)	USA
Axygen	Union City (CA)	USA
BD	Heidelberg	Deutschland
Bioplastics	Landgraaf	Niederlande
Brand	Wertheim	Deutschland
Braun	Melsungen	Deutschland
Corning Incorporated GmbH	Kaiserslautern	Deutschland
Duran	Wertheim/Main	Deutschland
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland

Hartenstein	Würzburg	Deutschland
Hartmann Analytik	Braunschweig	Deutschland
Nunc	Wiesbaden	Deutschland
Pechiney Plastic Packaging	Chicago (IL)	USA
Roth	Mannheim	Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
VWR	Darmstadt	Deutschland

3.1.3 Geräte und Zubehör

3.1.3.1 Allgemeine Geräte und Zubehör

Autoradiographiefilme	Hyperfilm MP	Amersham
	Hyperfilm ECL	Amersham
Autoradiographiekassetten	X-Ray	Kisker Biotech
	DUPONT Cronex III	Sigma-Aldrich
Blottingpapier	GB3M/GB40	Hartenstein
Bunsenbrenner	gasprofi 2	WLD Tec
Einwegspritzen		Braun
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa
Geldokumentationssystem	ChemiDoc XRS	BioRad
Gewebehomogenisator	Basis Ultra Turrax	IKA
Heizblöcke	HBT-2-131	HLC
	HTMR-132	HLC
	HTMR-133	HLC
Kühlschränke		AEG, Liebherr
Kreisschüttler	GFL 3015	GFL
Magnetrührer	MR3001	Heidolph
Membranen	Hybond XL	Amersham
	Nitrocellulose	Whatman
	PVDF	Millipore
Mikroskope	Leica DMIL	Leica
	S8APO	Leica
	Axioplan 2	Zeiss

Mikrowelle		Bosch
Netzgeräte	PowerPac 1000/HC	BioRad
pH-Meter	inolab level 1	WTW
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
	NanoDrop ND-1000	Peqlab
Pipetten/Multipipetten		Eppendorf
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Reagenzglasschüttler	Vortexer	Heidolph
Reinstwasseranlage	Mili-Q-System	Millipore
Rollenmischer	RM 5	Hartenstein
Rotator	LD79	Kisker
Schweißgerät	Vacumaster	Ismet
Skalpell (chirurgisch)	5518040	Aesculap
Tiefkühlschränke		Liebherr, Bosch
Waagen	ARJ 120-4M	Sartorius
	EW 6000-1M	Kern
Wasserbäder	GFL 1083	GFL
	Hi1210	Leica
Zentrifugen	Allegra X22-R	Beckman Coulter
	Avanti J-20XPI	Beckman Coulter
	5415D	Eppendorf
	5415R	Eppendorf
	5804	Eppendorf
	Galaxy Mini	VWR

3.1.3.2 Geräte und Zubehör zur Analyse von Nukleinsäuren

Elektrophoresekammern	MGV-620T	C.B.S & Scientific
	SGE-020-02	C.B.S & Scientific
	E-H6	Febicon
Geigerzähler	LB 1210B	Berthold
Hybridisierungsöfen	Typ 30 (Hyb 6.88)	Bachofer GmbH
Hybridisierungsröhren	732-1822	VWR

Inkubationsofen		Memmert/Fastnacht
Mikrotiterplatten	<i>Realtime</i> , B70501	Bioplastic
	TECAN, Fluotrac200	Greiner
Mikrotiterplatten Lesegerät	Safire ²	Tecan
Thermozykler	ABI 7500 Taqman	Applied Biosystem
	GeneAmp 9700	Applied Biosystem
	TETRAD2	MJ Research

3.1.3.3 Geräte und Zubehör zur Analyse von Proteinen

Dialyseschläuche	D0405-100FT	Sigma-Aldrich
Elektrophoresekammer (SDS-PAA)	MiniProtean 3 cell	BioRad
Glasplatten (MiniProtean)	0,75 mm	BioRad
Säulen	89898	Thermo Scientific
Sonifikator	Bioruptor	Diagenode
Transferkammer	MiniProtean 3 cell	BioRad

3.1.3.4 Geräte und Zubehör für die Zellkultur

Elektroporator	GenePulserXcell	BioRad
Elektroporationsküvetten	GenePulser (0,4 cm)	BioRad
Flüssigkeitsbehälter (Reservoir)	21007-970	Labcor Products
Sterilbänke	Hera Safe	Heraeus
	HA 2448	Heraeus
Sterilfilter	0,2 µm	FP30/0,2 CA-S
	HTN-Cre-Filtration	Filtropur S
		Sarstedt
Vakuumpumpe	BVC 21	VWR
Zellinkubatoren	BBD 6620	Heraeus
	Hera Cell 150	Heraeus
Zellsieb	REF352350	BD Falcon
Zellzählkammer	Neubauer	Optik Labor

3.1.3.5 Geräte und Zubehör für die Immunhistologie

Deckgläser	DK60, DKR2	Hartenstein
Einbettkästen		Roth

Einbettstation	EG1150H	Leica
Entwässerungsapparat	TP1028	Leica
Färbekammer	Rotilabo HA51.5	Roth
Färbekästen		Faust GmbH
Färberahmen		Faust GmbH
Heizplatte	Hi1220	Leica
Kanadabalsamglas	KG60	Hartenstein
Mikrotom	RM2255	Leica
<i>mounting</i> -Medium	H-1400/1500	VECTOR laboratories
Objektträger	Polysine	Hartenstein
Objektträgerbox	A10	Hartenstein

3.1.3.6 Geräte und Zubehör für die Arbeit mit Mäusen

Applikator für Ohrmarken	1005-s1	National Band & Tag Co.
Mikropinzette	FM002R	Aesculap
Mikropipetten	100 µl, blau	Blaubrand
Ohrmarken (Metall, nummeriert)	1005-1	National Band & Tag Co.
Pinzette (anatomisch)	BD047R	Aesculap
Scheren	BC321R	Aesculap
	BC8641R	Aesculap
	BC100R (fein)	Aesculap
	BC341R (stumpf)	Aesculap
Schlauch (Blastozystenisolierung)		Biomedical Instruments
Splitterpinzetten	BD312 (gekrümmt)	Aesculap
	BD302 (spitz)	Aesculap

3.1.4 Substanzen und Chemikalien

3.1.4.1 Allgemeine Substanzen und Chemikalien

Bacillol	Bode Chemie
β-Mercaptoethanol	AppliChem/Merck
<i>bovine serum albumin</i>	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem

Ethanol		AppliChem
Gelatine	pulverisiert	AppliChem
	2 %	Sigma-Aldrich
Glycerin	99 %	AppliChem
Magermilchpulver		AppliChem
Natriumzitat		AppliChem
Natriumchlorid		AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat		AppliChem
Natriumdodecylsulfat		AppliChem
PBS	w/o CaCl ₂ , MgCl ₂	Biochrom/PAA
Seren	fetales Kälberserum	Biochrom
	Ziegenserum	PAA
Tris		AppliChem/Roth

3.1.4.2 Substanzen und Chemikalien zur Analyse von Nukleinsäuren

[α - ³² P]dCTP		Amersham/Perkin Elmer
Agarose		Cambrex, Invitrogen
Bromphenolblau		AppliChem
Chloroform-Isoamylalkohol	24:1	AppliChem
<i>count-off</i> -Lösung	6NE9422	Perkin Elmer
Desoxyribonukleosidtriphosphate		Peqlab
Diethylpyrocarbonat		AppliChem
Dithiothreitol		AppliChem
Ethidiumbromid	1 %	AppliChem
Formaldehyd	37 %	Sigma-Aldrich
Isopropanol		AppliChem
3(N-Morpholino)-Propansulfonsäure		AppliChem
Natriumhydroxid		AppliChem
Magnesiumsulfat		Merck
Phenol		AppliChem
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	AppliChem
RNA-Ladepuffer	2 x	Fermentas

RNase A	10 mg/ml	Sigma-Aldrich
Salzsäure		AppliChem
Spermidin		AppliChem
SSC-Puffer	20 x	AppliChem
<i>salm sperm-DNA</i>		AppliChem
<i>SYBR Green PCR Master Mix</i>		Applied Biosystem
TBE-Puffer	10 x	AppliChem

3.1.4.3 Substanzen und Chemikalien zur Analyse von Proteinen

<i>Aqua plus</i> Acrylamid	30 %, 29:1	AppliChem
Ammoniumpersulfat		AppliChem
Protease Inhibitoren (<i>mini complete</i>)		Roche
Ponceau S		Sigma-Aldrich
RIPA-Puffer		Sigma-Aldrich
TEMED		AppliChem
Tris-Base		Sigma-Aldrich
Tween20		AppliChem
Western Blot- <i>stripping buffer</i>		Pierce

3.1.4.4 Substanzen und Chemikalien für die Zellkultur

Amphotericin B	250 µg/ml	Promocell
D-MEM (für Fibroblasten)	41966	Invitrogen
D-MEM (für ES-Zellen)	41965	Invitrogen
Dimethylformamid		Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid		AppliChem
Ganciclovir	50 mg/ml	Hoffmann-La Roche
G418 (Geneticin)		Roche
L-Glutamin	200 mM	Invitrogen
<i>leukemia inhibitory factor</i>	1000 x	Embl
M2-Medium		Sigma-Aldrich
M16-Medium		Sigma-Aldrich
Mineralöl		Sigma-Aldrich
Mitomycin C		Sigma-Aldrich

Natriumpyruvat	1000 x	Invitrogen
Nicht-essentielle Aminosäuren	100 x	Invitrogen
Penicillin/Streptoymycin		Invitrogen
RPMI	w/o Phenolrot	Gibco
<i>thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>		Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	1 x	Invitrogen

3.1.4.5 Substanzen und Chemikalien für die Immunhistologie

Entellan/Eukitt		Fluka
Essigsäure		AppliChem
Formalin		AppliChem
HE-Färbelösung	Eosin Y-Lösung	Sigma-Aldrich
	Hämatoxylinlösung	Sigma-Aldrich
Paraffin		Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd		Sigma-Aldrich
Xylol		AppliChem
Zitronensäure		AppliChem

3.1.4.6 Substanzen und Chemikalien für die HTN-Cre-Expression und Isolation

Ampicillin		AppliChem
Benzonase		Novagen/Merck
Carbenecillin		AppliChem
Chloramphenicol		Sigma-Aldrich
Hefeextrakt		AppliChem
HEPES		AppliChem
Glucose		AppliChem
Imidazol		AppliChem
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid		AppliChem
Lysozym (aus Huhn)		Sigma-Aldrich
Natriumbicarbonat		AppliChem
Natriumtartrat dibasisch Dihydrat		Fluka
Nickel-NTA-Agarose		Qiagen
Trypton		AppliChem

3.1.5 Lösungen, Medien und Puffer

Die für die jeweiligen Lösungen, Medien und Puffer angegebenen Molaritäten bzw. Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentrationen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde zum Ansetzen der Lösungen und Puffer autoklaviertes Reinstwasser (Milliporwasser, ddH₂O) verwendet.

3.1.5.1 Lösungen zur Analyse von Nukleinsäuren

NaH₂PO₄- und EDTA-Lösungen vor Gebrauch autoklavieren, SDS-Lösung in autoklavierten ddH₂O unter Erhitzen lösen.

Agarosegele (Northern Blot)		ad 200 ml
○ Agarose	1,5 %	3 g
○ DEPC-H ₂ O		174 ml
○ Lösen durch Aufkochen, unter Rühren auf 60°C abkühlen lassen		
○ Formaldehyd	3 %	6 ml 37 % Formaldehyd
○ MOPS-Puffer	10 %	20 ml 10 x MOPS-Puffer
○ EtBr	1 µg/ml	20 µl 1 % EtBr
DEPC-H₂O		ad 1 l
○ DEPC		1 ml
○ über Nacht rühren, autoklavieren		
Desoxyribonukleosidtriphosphate		ad 5 ml
○ dNTP-Mix	1,25 mM	62,5 µl pro 100 mM dNTP
Ladepuffer (10 x)		ad 50 ml
○ EDTA	100 mM	10 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
○ SDS	1 %	2,5 ml 20 % SDS
○ Glycerin	50 %	28,7 ml
○ Bromphenolblau	0,1 %	0,05 g

Lysispuffer, pH 8,5 (für Gewebe und Zellen)		ad 500 ml
○ Tris	100 mM	50 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0
○ EDTA	5 mM	5 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
○ SDS	0,2 %	5 ml 20 % SDS
○ NaCl	200 mM	20 ml 5 M NaCl
○ Proteinase K	200 µg/ml	frisch zugeben
 MOPS-Puffer, pH 7,0 (10 x)		 ad 1 l
○ MOPS	200 mM	41,9 g
○ NaAc	50 mM	4,1 g
○ EDTA	10 mM	20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
 PCR-Puffer (10 x)		 ad 100 ml
○ Tris	100 mM	10 ml 1 M Tris, pH 8,2
○ KCl	500 mM	50 ml 1 M KCl
○ MgCl ₂	15 mM	1,5 ml 1 M MgCl ₂
○ Gelatine	0,1 %	10 ml 1 % Gelatine
 (Prä-) Hybridisierungsmix		
(Northern und Southern Blot)		ad 20 ml
○ NaH ₂ PO ₄	0,5 M	10 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
○ EDTA	1 mM	40 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0
○ SDS	7 %	7 ml 20 % SDS
○ ddH ₂ O		2 ml
○ <i>salm sperm</i> -DNA	0,5 mg/ml	1 ml 1 % <i>salm sperm</i> -DNA
 <i>salm sperm</i>-DNA, pH 8,0		 ad 100 ml
○ <i>salm sperm</i> -DNA 1 %, sonifiziert		1 g
○ über Nacht bei 37°C in TE-Puffer unter Rühren lösen, Lagerung bei 4°C		

strip-Lösung (Northern und Southern Blot)

ad 1 l

- | | | |
|------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------|
| ○ NaH ₂ PO ₄ | 40 M | 40 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0 |
| ○ EDTA | 1 mM | 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 |
| ○ SDS | 0,1 % | 5 ml 20 % SDS |

TE-Puffer

ad 1 l

- | | | |
|-----------------|-------|-------------------------|
| ○ Tris | 10 mM | 10 ml 1 M Tris, pH 8,0 |
| ○ EDTA | 1 mM | 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 |
| ○ autoklavieren | | |

TE⁻⁴-Puffer

ad 1 l

- | | | |
|--------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------|
| ○ Tris | 10 mM | 10 ml 1 M Tris, pH 8,0 |
| ○ EDTA | 0,1 mM | 0,2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 |
| ○ autoklavieren | | |
| ○ für DNA aus Geweben: Zugabe RNase A (Endkonzentration: 50 µg/ml) | | |

Transferpuffer (Northern Blot)

ad 1 l

- | | | |
|-------|------|-------------------------|
| ○ SSC | 10 x | 500 ml 20 x SSC, pH 7,0 |
|-------|------|-------------------------|

Transferpuffer (Southern Blot)

ad 1 l

- | | | |
|--------|-------|---------|
| ○ NaOH | 0,5 M | 20 g |
| ○ NaCl | 1,5 M | 87,66 g |

Waschpuffer (Northern und Southern Blot)

ad 1 l

- | | | |
|------------------------------------|--------|------------------------------------------------------|
| ○ NaH ₂ PO ₄ | 0,15 M | 100 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0 |
| ○ EDTA | 1 mM | 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 |
| ○ SDS | 0,1 % | 5 ml 20 % SDS |

3.1.5.2 Lösungen zur Analyse von Proteinen

Elektrophoreselaufpuffer, pH 8,0 (10 x)		ad 1 l
○ Tris	0,25 M	30,29 g
○ Glycin	1,92 M	144,13 g
○ SDS	1 %	10 g
Laemmli-Puffer (2 x)		ad 50 ml
○ Tris-Base	62,5 mM	0,378 g
○ Glycerin	10 %	10 ml
○ Bromphenolblau	0,01 %	5 mg
○ SDS	3 %	3 g
○ vor Gebrauch mit 1/10 Volumen β -ME versetzen		

SDS-PAA-Gele

Tabelle 3: verschiedene Konzentrationen an SDS-PAA-Gelen

	Trenngel 8 % 2 Gele	Trenngel 12 % 2 Gele	Sammelgel 2 Gele
ddH ₂ O	4,6 ml	3,3 ml	1,4 ml
Acrylamid (30 %, 29:1)	2,7 ml	4,0 ml	330 μ l
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	---
1,5 M Tris pH 6,8	---	---	250 μ l
10 % SDS	100 μ l	100 μ l	20 μ l
10 % APS	100 μ l	100 μ l	20 μ l
TEMED	6 μ l	4 μ l	2 μ l

TBS-Tween-Puffer (TBST-Puffer), pH 7,56 **ad 5 l**

○ Tris	20 mM	12,1 g
○ NaCl	137 mM	40 g
○ Tween	0,5 %	25 ml

Transferpuffer **ad 5 l**

○ Tris-Base	15 mM	12,1 g
○ Glycin	150 mM	56,3 g
○ Methanol	20 %	1 l

3.1.5.3 Lösungen für die Zellkultur

Einfriermedium für embryonale Stammzellen (ES-Zellen) und murine embryonale Fibroblasten (MEF)

○ FKS	80 %	ES-Zellen
	90 %	MEF
○ DMSO	10 %	

Medium für ES-Zellen **ad 600 ml**

○ D-MEM 41965		500 ml
○ FKS	15 %	75 ml
○ L-Glutamin	1 %	6 ml
○ Pen/Strep	1 %	6 ml
○ NEAA (100 x)	1 %	6 ml
○ LIF	1 %	6 ml
○ β-ME	1 %	6 ml

Medium für MEF **ad 600 ml**

○ D-MEM 41966		500 ml
○ FKS	10 %	50 ml
○ Pen/Strep	1 %	5 ml
○ Amphotericin B	250 µg/ml	1,4 ml

Ganciclovir (Selektionsmedium)

- 50 mg/ml
- 86 µl in 80 µl PBS lösen (= 1. Verdünnung)
- 10 µl aus 1. Verdünnung in 1 ml ES-Medium aufnehmen, sterilfiltrieren (= 2. Verdünnung)
- 10 µl aus 2. Verdünnung pro 10 ml ES-Medium (2×10^{-6} M)

Gelatine**ad 250 ml**

- Gelatine 0,1 % 12,5 ml 2 % Gelatine
- Lösen durch Erwärmen im Wasserbad, Verdünnung in PBS

leukemia inhibitory factor (LIF)

- 1 ml LIF (10^7 units) in 9 ml ES-Medium lösen
- *aliquots* bei -20°C lagern

Mitomycin C (MMC)

- 2 mg MMC in 2 ml MEF-Medium lösen, sterilfiltrieren
- Endkonzentration: 10 µg/ml MEF-Medium
- *aliquots* bei -20°C lagern

MTT-Stocklösung

- 50 mg MTT in 10 ml PBS lösen (1 mg/ml)

Solubilisierungslösung, pH 4,0

- 40 % SDS unter Erhitzen in H_2O lösen, rühren
- 40 % SDS-Lösung 1:2 mit DMF mischen

3.1.5.4 Lösungen für die Immunhistologie**Zitrat-Puffer, pH 6,0****ad 1 l**

- Zitronensäure 0,01 M 2,1 g
- Lagerung bei 4°C

Paraformaldehyd, pH 7,4

ad 100 ml

- PFA 4 % 4 g
- in 30 ml ddH₂O unter Erwärmen (60°C) lösen
- Lösung mit 1 M NaOH klären, erkalten lassen und filtrieren
- Zugabe von 50 ml PBS (2 x), pH-Wert einstellen und auf 100 ml auffüllen
- *aliquots* bei -20°C lagern

TBS-Puffer, pH 7,6 (10 x)

ad 1 l

- Tris 0,1 M 12,114 g
- NaCl 1,5 M 87,66 g

3.1.5.5 Lösungen für die HTN-Cre-Expression

Antibiotika und Imidazol stets frisch ansetzen, HEPES- und NaCl-Lösungen autoklavieren.

Antibiotika

- Ampicillin 100 mg/ml in H₂O
- Carbenicillin 100 mg/ml in H₂O
- Chloramphenicol 34 mg/ml in 100 % EtOH

Elutionspuffer, pH 7,4

ad 100 ml

- Imidazol 250 mM 25 ml 1M Imidazol
- NaCl 500 mM 10 ml 5 M NaCl
- PTB-Puffer 1 x 10 ml 10 x PTB-Puffer

Glycerinpuffer, pH 7,4

ad 2 l

- Glycerin 50 % 1 l
- HEPES 20 mM 40 ml 1 M HEPES
- NaCl 500 mM 200 ml 5 M NaCl

high salt-Puffer, pH 7,4

ad 2 l

- HEPES 20 mM 40 ml 1 M HEPES
- NaCl 600 mM 240 ml 5 M NaCl

LB-Medium, pH 7,0		ad 2 l
○ Hefeextrakt	10 %	10 g
○ Natriumchlorid	20 %	20 g
○ Trypton	20 %	20 g
○ autoklavieren		
PTB-Puffer, pH 7,8 (10 x)		ad 500 ml
○ NaH ₂ PO ₄	500 mM	44,49 g
○ Tris	50 mM	3,03 g
TSB-Puffer, pH 7,4		ad 120 ml
○ Imidazol	20 mM	2,4 ml 1 M Imidazol
○ Natriumtartrat	2 M	55,4 g
○ PTB-Puffer	1 x	12 ml 10 x PTB-Puffer
Waschpuffer, pH 7,4		ad 200 ml
○ Imidazol	20 mM	4 ml 1 M Imidazol
○ NaCl	500 mM	20 ml 5 M NaCl
○ PTB-Puffer	1 x	20 ml 10 x PTB-Puffer

3.1.6 Kits

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die folgenden *kits* nach Angaben Herstellerangaben verwendet.

3.1.6.1 Kits zur Analyse von Nukleinsäuren

<i>Charge Switch gDNA Mini Tissue Kit</i>	CS11204	Invitrogen
<i>Phase Lock Gel (Heavy 2 ml)</i>	2302830	5 Prime
<i>Power SYBR green PCR Master Mix</i>	4367659	Applied Biosystems
<i>Probe Quant G-50 Micro Columns</i>	28-9034-089	Amersham
<i>Rediprime II RandomPrimeLabeling Kit</i>	RPN1633	Amersham
<i>Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit</i>	P7589	Invitrogen
<i>Quant-iT RiboGreen RNA Quantification Kit</i>	Q33140	Invitrogen
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i>	205311	Qiagen

<i>QIAshredder</i>	79656	Qiagen
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	28106	Qiagen
<i>QIAzol</i>	79306	Qiagen
<i>Repli-g whole genome amplification Kit</i>	150025	Qiagen
<i>RNase-free DNase I Set</i>	79254	Qiagen
<i>RNeasy Mini Kit</i>	74106	Qiagen

3.1.6.2 Kits zur Analyse von Proteinen

<i>BCA Protein Assay Reagent</i>	LF146254	Pierce
<i>SuperSignal West Pico ECL Substrate</i>	LH146985	Pierce

3.1.6.3 Kits für die Immunhistochemie

<i>Peroxidase Substrate Kit DAB</i>	SK-4100	Linaris
<i>Vectastain ABC Kit</i>	PK-6100	Linaris

3.1.7 Primer

Alle benötigten *Primer* wurden von der Firma Metabion synthetisiert, im lyophilisierten Zustand geliefert und in entsprechenden Volumina ddH₂O gelöst (Konzentration: 100 pmol)

Tabelle 4: Verwendete *Primer* und PCR-Bedingungen für die Genotypisierung der verschiedenen *Bdp1*-Linien

Bezeichnung		Nr.	Sequenz (5'→3')	bp	°C
<i>Bdp1^{flneo}</i>-Allel	<i>fw</i>	2158	GGC GGA AAG AAC CAG CTG GGG	659	60
	<i>rev</i>	2645	GTC GAC CCA TGG AGG ATG GAC TGG ACT ACA GTT		
<i>Bdp1</i> <i>knockout-Box</i>	<i>fw</i>	2093	GTC GAC TTG TAG TTA CTC ATG GCA GTC GG	567	60
	<i>rev</i>	2645	GTC GAC CCA TGG AGG ATG GAC TGG ACT ACA GTT		
<i>Bdp1^{wt}</i>- und <i>Bdp1^{fl}</i>-Allel	<i>fw</i>	3718	GTG TGC AGG AGC CAG AAA GTG	wt 733	58
	<i>rev</i>	2645	GTC GAC CCA TGG AGG ATG GAC TGG ACT ACA GTT	fl 893	
<i>Bdp1^{wt}</i>- und <i>Bdp1^{ko}</i>-Allel	<i>fw</i>	3719	GTG TTT GTG AAT ACC ACA TGT G	fl 1265	59
	<i>rev</i>	3707	CTC AAA TAT ACA ACT GAA CTA TC	wt 1031 ko 570	

<i>Smn</i>^{wt}- und <i>Smn</i>^{ko}-Allel	<i>fw</i>	3370	ATA ACA CCA CCA CTC TTA CTC	wt 1150 ko 950	59
	<i>rev</i>	3371	GTA GCC GTG ATG CCA TTG TCA		
	<i>rev</i>	3372	AGC CTG AAG AAC GAG ATC AGC		
SMN2- Trangen	<i>fw</i>	3375	CGA ATC ACT TGA GGG CAG GAG TTT G	476	60
	<i>rev</i>	3376	AAC TGG TGG ACA TGG CTG TTC ATT G		
Cre- Transgen	<i>fw</i>	3104	CGC ATA ACC AGT GAA ACA GCA T	600	60
	<i>rev</i>	3105	GAA AGT CGA GTA GGC GTG TAC G		
Nestin- Transgen	<i>fw</i>	3478	CGC TTC CGC TGG GTC ACT GTC G	300	58
	<i>rev</i>	3479	TCG TTG CAT CGA CCG GTA ATG CAG GC		
Flp- Rekombinase	<i>fw</i>	3099	TTA GTT CAG CAG CAC ATG ATG	350	54
	<i>rev</i>	3100	GGA GGA TTT GAT ATT CAC CTG		

Tabelle 5: Verwendete *Primer* und PCR-Bedingungen für die Genotypisierung von isolierten Blastozysten

Bezeichnung		Nr.	Sequenz (5'→3')	bp	°C
<i>Bdp1</i>^{wt}- und <i>Bdp1</i>^{ko}-Allel	<i>fw</i>	3719	GTG TTT GTG AAT ACC ACA TGT G	wt 1031 ko 570	59
	<i>rev</i>	3707	CTC AAA TAT ACA ACT GAA CTA TC		
<i>Bdp1</i>^{wt}-Allel	<i>fw</i>	2093	GTC GAC TTG TAG TTA CTC ATG GCA GTC GG	wt 513	58
	<i>rev</i>	3789	CTC AGT TCC TCA TTC AAC ATC TC		
<i>Bdp1</i>^{ko}-Allel	<i>fw</i>	3838	CTC TTA ACC TTG AGT TCA TGA CTC	ko 791	58
	<i>rev</i>	3101	CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CG		

Tabelle 6: Verwendete *Primer* und PCR-Bedingungen für die Sondengenerierung

Bezeichnung		Nr.	Sequenz (5'→3')	bp	°C
5'-Sonde Southern Blot	<i>fw</i>	3084	ACG TGT GGG AGG GTG AGA GTG TC	378	62
	<i>rev</i>	3085	AAA AGC TTG TTG CAG GAG AGG TG		
3'-Sonde Southern Blot	<i>fw</i>	2629	GGC CTT GAA CTG CTG ACC AGT C	676	57
	<i>rev</i>	3057	CGC AGG GGC CTT TTG TTC TC		
Neo-Sonde Southern Blot	<i>fw</i>	3220	TGA ATG AAC TGC AAG ACG AGG CA	533	58
	<i>rev</i>	3221	GCC GCC AAG CTC TCA GCA ATA T		
<i>fl</i>-Sonde Southern Blot	<i>fw</i>	2093	GTC GAC TTG TAG TTA CTC ATG GCA GTC GG	573	58
	<i>rev</i>	2645	GTC GAC CCA TGG AGG ATG GAC TGG ACT ACA GTT		

knockout-Sonde Southern Blot	<i>fw</i>	3271	GGC TGC CAA TCT CTC TTC ACT AAG G	502	58
	<i>rev</i>	2405	CAC TTT CAG TGT GTC CAA GGC		
U6-Sonde Northern Blot	<i>fw</i>	4101	CAG AGA AGA TTA GCA TGG CC	303	58
	<i>rev</i>	4103	ACT GTG GAA GGC ACA CTT ATA CA		
5S-Sonde Northern Blot	<i>fw</i>	4104	GTC TAC GGC CAT ACC ACC CTG	118	58
	<i>rev</i>	4105	AGC CTA CAG CAC CCG GTA TTC CC		
18S-Sonde Northern Blot	<i>fw</i>	4194	GGT AGT CGC CGT GCC TAC CAT GGT	180	58
	<i>rev</i>	4195	CCG CGG TCC TAT TCC ATT ATT CC		

Tabelle 7: Verwendete Primer und PCR-Bedingungen für Realtime-Analysen (cDNA)

Bezeichnung		Nr.	Sequenz (5'→3')	bp	°C
β-Aktin	<i>fw</i>	123	AAC GGC TCC GGC ATG TGC AA	108	55
	<i>rev</i>	254	TAC CCA CCA TCA CAC CCT GG		
Rplp0	<i>fw</i>	4009	GGT GCC ATC GCC CCG TGT G	230	58
	<i>rev</i>	4010	TGG ATG ATC AGC CCG AAG GAG AAG		
Bdp1	<i>fw</i>	3379	TCC CGG GAG CAG TGA TGA AA	151	62
	<i>rev</i>	3380	AAC TGT AGA TAA GGG GCG ACT C		
Brf1	<i>fw</i>	4005	CAG CCT GGG CAT CTC CGA CTC C	195	60
	<i>rev</i>	4006	TCC CGC AGG TAC TCA GCA TTC TCC		
Erk	<i>fw</i>	4015	CTC TCC CGC ACA AAA ATA AGG T	215	60
	<i>rev</i>	4016	GTC GTC CAA CTC CAT GTG AAA CT		
Gapdh		QT 00199388	Mm_Gapdh_3_SG Qiagen, keine weitere Angaben	136	55
Myc	<i>fw</i>	4001	CCT AGT GCT GCA TGA GGA GAC AC	159	60
	<i>rev</i>	4002	GGT TTG CTG TGG CCT CGG GAT GG		
p53	<i>fw</i>	4011	CGC CGA CCT ATC CTT ACC ATC ATC	160	60
	<i>rev</i>	4012	GGG GCA GTT CAG GGC AAA GGA C		
Rb	<i>fw</i>	4013	GAC GAC CCC GCG CAG GAC AGC	222	60
	<i>rev</i>	4014	AAA GAT GCA GAT GCC CCA GAG TTC		
Tbp	<i>fw</i>	4003	CCT CAG GCC AGA CCC CAC AAC	188	58
	<i>rev</i>	4004	ACA GCC AAG ATT CAC GGT AGA TA		
TFIIIC102	<i>fw</i>	4007	AGT GAT TTG GCT CGG TTC C	195	58
	<i>rev</i>	4008	GCT GGG GCT TAT TGA CAT T		

Tabelle 8: Verwendete *Primer* und PCR-Bedingungen für *Realtime*-Analysen (DNA)

Bezeichnung		Nr.	Sequenz (5'→3')	bp	°C
SMN2	<i>fw</i>	2952	AAA TGC TCA AGA GGT AAG GAT ACA AGAA GTT AAA	111	55
	<i>rev</i>	2953	TCT CAA CAT TTT AAA T		
Apo B	<i>fw</i>	158	CAC GTG GGC TCC AGC ATT	55	54
	<i>rev</i>	159	TCA CCA GTC ATT TCT GCC TTT G		

3.1.8 Enzyme

Alle Enzyme wurden mit den von den entsprechenden Firmen empfohlenen Puffern verwendet.

3.1.8.1 Restriktionsenzyme

BamH I	100 U/μl	NEB
Hind III	10 U/μl	NEB
Eam1105	20 U/μl	Fermentas
Nde I	20 U/μl	NEB
Nco I	50 U/μl	NEB

3.1.8.2 Sonstige Enzyme

Proteinase K	10 mg/ml	AppliChem
RNase A	10 mg/ml	Sigma-Aldrich
Taq DNA Polymerase <i>recombinant</i> (10342020)	5 U/μl	Invitrogen

3.1.9 Antikörper

Tabelle 9: Primäre Antikörper zur Analyse von Proteinen

Antikörper	Nr.	Herkunft	<i>blocking</i>	Verdünnung	Inkubation	kDa	Firma
α-β-Aktin	A5316	Maus, monoklonal	Milch	1:20,000	1h, 4°C	42	Sigma- Aldrich
α-Bdp1	6619α 215/216	Kaninchen, polyklonal	BSA oder Milch	1:500	ü.N., 4°C	~270	Eurogentec

α-Brf1	A301-228A	Kaninchen, polyklonal	BSA	1:1,000	ü.N., 4°C	90	Bethyl
α-Erk	sc-153	Kaninchen, polyklonal	Milch	1:40,000	ü.N., 4°C	42	Santa Cruz
α-Myc	ab32	Maus, monoklonal	Milch	1:1,000	ü.N., 4°C	41	Abcam
α-p53	ab16465	Maus, monoklonal	Milch	1:1,000	ü.N., 4°C	53	Abcam
α-Rb	BS1310	Kaninchen, monoklonal	Milch	1:1,000	ü.N., 4°C	110	Biozol
α-Tbp	Sc-201	Kaninchen, polyklonal	Milch	1:1,000	ü.N., 4°C	38	Santa Cruz
α-TFIIC102	A301-238A BS2381	Kaninchen, polyklonal	Milch	1:500/ 1:1,000	ü.N., 4°C	102	Bethyl Biozol

Tabelle 10: Sekundäre Antikörper zur Analyse von Proteinen

Antikörper	Nr.	Herkunft	Blocking	Verdünnung	Inkubation	kDa	Firma
α-mouse IgG	115-35-000	Ziege	BSA/Milch	1:10,000	1h, 4°C	--	Dianova
α-rabbit IgG	NA934V S	Esel	BSA/Milch	1:5,000	1h, 4°C	--	GE Healthcare

Tabelle 11: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Nr.	Herkunft	Blocking	Verdünnung	Inkubation	kDa	Firma
α-Bdp1	6619α 215	Kaninchen, polyklonal	3.2.4.4	1:500	ü.N., 4°C	-	Eurogentec
α-Caspase3	AF835	Kaninchen, polyklonal	BSA	1:1,000	ü.N., 4°C	--	R&D System
α-Ki67	ab15580	Kaninchen, polyklonal	BSA	1:1,000	ü.N., 4°C	--	Abcam

Tabelle 12: Sekundäre Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Nr.	Herkunft	Blocking	Verdünnung	Inkubation	kDa	Firma
α -rabbit IgG Alexa 488	11034	Ziege	3.2.4.4	1:2,000	1h, 4°C	-	Invitrogen

3.1.10 Mauslinien und Zellen

Tabelle 13: Zur Verfügung gestellte Mauslinien

Linie	Quelle	Beschreibung
C57BL/6NCrI	Charles River	Inzuchtstamm, <i>H-2^b</i> -Haplotyp (schwarze Fellfarbe)
CB20	Erhaltungszucht Institut für Genetik	F1 einer C57BL/6 x BALB/c-Verpaarung, 20 Generationen auf BALB/c zurückgekreuzt (weiße Fellfarbe)
<i>Flp-deleter</i> (Rodriguez et al. 2000)	Erhaltungszucht Institut für Genetik	<i>FLPe</i> -Transgen unter der Kontrolle von hACTB-regulatorischer Sequenzen, C57BL/6NCrI
<i>Cre-deleter</i> (Schwenk et al. 1995)	Erhaltungszucht Institut für Genetik	Ubiquitäre Expression des Cre-Transgens unter der Kontrolle des hCMV Minimalpromotors, X-chromosomal gekoppelt, C57BL/6NCrI
<i>Nestin-Cre</i> (Tronche et al. 1999)	Erhaltungszucht Institut für Genetik	Expression des Cre-Transgens in Vorläuferzellen von Neuronen und Gliazellen ab E11,0 p.c.; unter der Kontrolle des Ratten- <i>Nestin</i> -Promotors und <i>enhancer</i> -Elementen, C57BL/6NCrI
SMA-Hung (Hsieh-Li et al. 2000; Riessland et al. 2010)	Jackson Laboratory Stock #005058	FVB.Cg-Tg(<i>SMN2</i>)2Hung <i>Smn1^{tm1}</i> Hung/J 1,6 kb Deletion des murinen <i>Smn</i> Exon 7 durch einen 115 kb BAC-Klon, 2 <i>SMN2</i> -Kopien, 7 Generation auf C57BL/6NCrI zurückgekreuzt

Tabelle 14: Generierte *Bdp1*-Mauslinien

Linie	Beschreibung	Ausgangsvektor
<i>Bdp1^{flneo/wt}</i>	Mauslinie mit heterozygot geflochten <i>Bdp1 flneo</i> -Allel, auf 100 % C57BL/6NCrl-Hintergrund zurückgekreuzt	pRapidflirt (pRF)
<i>Bdp1^{fl/wt}</i> oder <i>Bdp1^{fl/fl}</i>	Mauslinie mit heterozygot oder homozygot geflochten <i>Bdp1</i> -Allel, auf 100 % C57BL/6NCrl-Hintergrund zurückgekreuzt	pRapidflirt (pRF)
<i>Bdp1^{ko/wt}</i>	Mauslinie mit heterozygoten <i>Bdp1-knockout</i> , auf 100 % C57BL/6NCrl-Hintergrund zurückgekreuzt	pRapidflirt (pRF)
<i>Bdp1^{fl/wt}</i> ; <i>Nestin^{tg/wt}</i>	Mauslinie mit geflochten <i>Bdp1</i> -Allel und <i>Nestin</i> -Transgen, <i>Bdp1</i> -Allel und Transgen heterozygot, auf 100 % C57BL/6NCrl	pRapidflirt (pRF)

Tabelle 15: Verwendete Zellen

Name	Zelltyp	Kreuzung/ Stamm	Hersteller
V6.5	murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen), zur Verfügung gestellt von der AG Prof. Dr. Brüning	♂ 129/Sv x ♀ BL/6	(Eggan et al. 2002)
pEB.II:neo	murine embryonale Fibroblasten (MEF), Neomycin-resistent, Wachstumsschicht für ES-Zellen, zur Verfügung gestellt vom Zentrum für Mausgenetik	♂ IL-4 x ♀ BL/6	(Muller et al. 1991)

3.1.11 Gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Tabelle 16: Zellen und Bakterienstämme

Zellen	Beschreibung/Verwendung	Klone	GVO Nr.
V6.5- <i>Bdp1</i>	Homologe Rekombination mit <i>Bdp1-targeting</i> -Konstrukt, Bestätigung in Southern Blot-Analysen, Keimbahntransmission mit beiden Klonen	#A6, #G8	529
<i>Bdp1^{fl/fl}</i> - Fibroblasten	Murine embryonale Fibroblasten (MEF), Embryonen einer ♂ <i>Bdp1^{fl/fl}</i> x ♀ <i>Bdp1^{fl/fl}</i> -Verpaarung (E13,5 p.c.) <i>in vitro Bdp1</i> -Deletion mittels HTN-Cre	#1-8	530
<i>Bdp1^{wt/wt}</i> , <i>Bdp1^{ko/wt}</i> - Fibroblasten	Murine embryonale Fibroblasten (MEF), Embryonen einer ♂ <i>Bdp1^{ko/wt}</i> x ♀ <i>Bdp1^{wt/wt}</i> -Verpaarung (E13,5 p.c.)	#2, #4, #6, #9, #11, #12	532

HTN-Cre	<i>E. Coli</i> Stamm, Expression der HTN-Cre nach IPTG-Induktion, HTN-Cre: His-TAT-NLS-Cre (Peitz et al. 2002)	-	524
---------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---	-----

3.1.12 Sonstiges

3.1.12.1 Verwendete Größenmarker

Tabelle 17: Verwendete Größenmarker für DNA, RNA und Proteinanalysen

Firma	Größenmarker	Anwendung	Einheit	Fragmente
AppliChem	100 bp A3470	DNA	bp	1000, 900, 800, 700, 600, 500 (x2), 400, 200, 150, 100
AppliChem	1 kb A2667	DNA	bp	10000, 8000, 6000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500
Fermentas	<i>low range</i> SM1831r	RNA	bp	1000, 800, 600, 400, 300, 200, 100
Gibco	0,24-9,5 kb 15620-016	RNA	kb	9,49; 7,46; 4,40; 2,37; 1,35; 0,24
Invitrogen	0,5-10 kb 15623-200	RNA	kb	10; 8; 6; 4; 3; 2; 1,5; 1; 0,5
Fermentas	<i>PageRuler Plus</i> <i>Prestained</i> 1811	Protein	kDa	250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10
Fermentas	<i>Spectra High Range</i> 1851	Protein	kDa	300, 250, 180, 130, 100, 70, 50, 40

3.1.12.2 Verwendete software

software	Anwendung	Firma
AxioVision Rel.4.7	Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
BioEdit	DNA-Analyse	Tom Hall
EndNote9/X2	Literaturverwaltung	Thomson Research
Lasergene Package	Sequenzanalysen	DNASTAR Inc.
Mausoleum	Mausverwaltung	H.E. Stöffler
Office 2003/2007	<i>Word, Excel, Power Point</i>	Microsoft
Quantity One 4.5.1	densitometrische Analysen	Biorad

Sequence Detection	qRT-PCR-Analysen	Applied Biosystems
Vektor NTI	Planung <i>Bdp1-targeting</i> Strategie	Invitrogen
XFluor4Safire ²	Plattenlesegerät	Tecan

3.1.12.3 Verwendete Datenbanken

Ensembl	http://www.ensembl.org
HUSAR	http://www.genome.dkfz-heidelberg.de
MGI	http://www.informatics.jax.org
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Im Folgenden werden verschiedene Methoden zur DNA-Isolation beschrieben, wobei die Auswahl der jeweiligen Methode in Abhängigkeit der nachfolgenden Versuche stand. Alle isolierten DNAs wurden bei -20°C gelagert.

3.2.1.1.1 DNA-Isolation aus Mäuseschwanzspitzen

Die hier beschriebene Methode diente der Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwanzspitzen. Die DNA wurde routinemäßig für alle Genotypisierungs-PCRs eingesetzt.

Die Schwanzspitzen wurden direkt nach der Entnahme (oder nach Lagerung bei -20°C) in 500 µl Lysispuffer überführt und über Nacht bei 55°C im Schüttelheizblock inkubiert. Dabei dient das im Puffer vorhandene SDS der Zellyse, Tris und Natriumchlorid stabilisieren den pH-Wert bzw. den Salzgehalt der Lösung und EDTA als Chelator zweiwertiger Metallionen schützt die DNA vor dem nukleolytischen Abbau. Die jeweils frisch zugegebene Proteinase K baut zelluläre Proteine ab. Die Lysate wurden am kommenden Tag 20 min bei 13.000 rpm sedimentiert, der Überstand in 500 µl Isopropanol überführt und die DNA für 10-20 min bei Raumtemperatur präzipitiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und das Präzipitat mit 70 %igen Ethanol gewaschen.

Abschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in einem adäquaten Volumen an TE⁻⁴-Puffer (50-80 µl + RNase A) resuspendiert.

3.2.1.1.2 DNA-Isolation mittels *Charge Switch gDNA Mini Tissue Kit*

Um die *SMN2*-Kopienanzahl von transgenen Mauslinien zu bestimmen (3.2.1.6), musste die aus den Mäuseschwanzspitzen isolierte DNA einen hohen Reinheitsgrad aufweisen. Zu diesem Zweck wurde das *Charge Switch gDNA Mini Tissue Kit* angewandt. Die Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.1.1.3 DNA-Isolation aus Geweben (Phenol-Chloroform-Extraktion)

Die Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde bei der Isolation von genomischer DNA aus Organen angewandt und fand in Southern Blot-Analysen Verwendung.

Der Überstand des Zelllysats (3.2.1.1.1) wurde mit einem 1:2-Gemisch aus Phenol und Chloroform (Chloroform 1:24 mit Isoamylalkohol) versetzt und in ein *Phase Lock Gel* überführt - diese enthalten eine separierende Gelphase, so dass die obere DNA-haltige Phase leicht von der unteren organischen Phase getrennt werden kann. Die Lösung wurde 5 min auf einem Rotator ausgeschüttelt und anschließend für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die DNA-haltige Phase wurde zum Auswaschen verbliebener Phenolreste in ein neues *Phase Lock Gel*-Gefäß überführt, mit Chloroform vermischt, ausgeschüttelt und zentrifugiert.

Die Präzipitation der DNA erfolgte durch Zugabe von Isopropanol. Alle weiteren Schritte sind unter 3.2.1.1.1 beschrieben. Das DNA-Pellet wurde je nach Größe in 100-500 µl TE⁻⁴-Puffer (+ RNase A) aufgenommen.

3.2.1.1.4 DNA-Isolation aus murinen embryonalen Fibroblasten

Die hier beschriebene Methode diente der DNA-Isolierung aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) nach einer vorangegangenen *in vitro*-Deletion mittels HTN-Cre (3.2.2.4). Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert (3.2.3.4). Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 13.000 rpm sedimentiert und erneut mit PBS gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in einem adäquaten Volumen an Lysispuffer resuspendiert (200 µl). Der weitere Ablauf ist 3.2.1.1.1 zu entnehmen.

3.2.1.2 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde Mitte der achtziger Jahre von Kary B. Mullis entwickelt (Mullis and Faloona 1987; Saiki et al. 1988) und beschreibt eine *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der DNA-Polymerase. Diese benötigt zur Replikationsinitiation freie Hydroxygruppen, die durch die Zugabe von sequenzspezifischen *Primern* vorliegen.

Die PCR diene in der vorliegenden Arbeit der Genotypisierung von Mäusen und Zelllinien, der Synthese von cDNAs sowie der Generierung von Northern Blot- und Southern Blot-Sonden.

Der Ablauf einer PCR verläuft zyklisch und kann in drei Schritte unterteilt werden:

- Denaturierung der Matrizen-DNA (95°C) Denaturierung
- *Primer*-Hybridisierung Annealing
- Synthese der Komplementärstränge (72°C) Elongation

Das folgende Schema zeigt einen allgemeinen PCR-Ansatz sowie allgemeine PCR-Bedingungen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden:

Allgemeiner PCR-Ansatz

- *template* DNA 20-200 ng 1 µl
- *Primer fw* 10 pmol 1 µl (100 pmol)
- *Primer rev* 10 pmol 1 ml (100 pmol)
- PCR-Puffer (10 x) 1 x 2,5 µl
- dNTPs 200 µM 4 µl (dNTPs je 1,25 mM)
- Taq Polymerase 1 U 0,4 µl (5 U/µl)
- *ad* 25 µl mit ddH₂O

Allgemeine PCR-Bedingungen

- Initiale Denaturierung 10 min 95°C
 - Denaturierung 30 sek 95°C
 - Hybridisierung 30 sek 54-62°C
 - Elongation 30-70 sek 72°C
 - Finale Elongation 10 min 72°C
- } 32-38 Zyklen

3.2.1.2.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die als Sonden in Northern Blot- und Southern Blot-Analysen dienen, wurden mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification-Kit* aufgereinigt. Die Methode dient der Entfernung von PCR-Rückständen, die auf nachfolgende Anwendungen inhibierend wirken können. Das *kit* wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der Sonden erfolgte in einem adäquaten Volumen an TE⁻⁴-Puffer (ca. 20-40 µl).

3.2.1.3 Amplifikation genomischer DNA (Blastozysten)

Für die Genotypisierung von isolierten Blastozysten (E3.5 p.c.) wurde die genomische DNA einer Blastozyste vorab mittels *Repli-g whole genome amplification-Kit* amplifiziert. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Somit stand nach der Amplifikation genügend Ausgangsmaterial für eine Genotypisierungs-PCR zur Verfügung (3.2.1.2). Für die PCR wurden 2,5 µl genomische DNA als *template* eingesetzt und eine Zyklenzahl von 45 verwendet.

3.2.1.4 Spektrophotometrische Quantifizierung von DNA

Bei der Konzentrationsbestimmung von DNA wird die Eigenschaft der Basen, im ultravioletten Licht zu absorbieren, ausgenutzt. (Kaiser and Hogness 1960). Dabei absorbiert DNA zwischen einer Wellenlänge von 258 und 260 nm, Proteine hingegen bei 280 nm. Mit der Ermittlung des Quotienten der Messungen bei 260 und 280 nm ($OD_{260/280}$, optische Dichte) kann der Verunreinigungsgrad einer Lösung bestimmt werden. Eine nahezu proteinfreie DNA-Lösung zeigt einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0. Der Wert ist kleiner, wenn Verunreinigungen mit Proteinen vorliegen. Ein Quotient größer 2,0 deutet auf RNA-Rückstände hin. Je nach Abhängigkeit des Versuchsvorhabens wurden verschiedene Methoden der DNA-Quantifizierung in dieser Arbeit eingesetzt.

3.2.1.4.1 Quantifizierung mittels *NanoDrop*-Gerät

Die Konzentration einer DNA-haltigen Lösung konnte spektrophotometrisch am *NanoDrop*-Gerät bestimmt werden. Dabei wurden 1,5 µl der DNA-haltigen Lösung eingesetzt. Als Leerwert diente der Elutionspuffer.

Diese Methode eignet sich nur für eine weitere Anwendung im nicht-quantitativen Bereich, z.B. für die einzusetzenden Mengen an DNA für Southern Blot-Analysen (3.2.1.7). Bei nachfolgenden quantitativen Bestimmungen wurde die Konzentration der DNA mittels

PicoGreen-Methode (3.2.1.4.2) gemessen (z.B. Bestimmung der *SMN2*-Kopienanzahl, 3.2.1.6).

3.2.1.4.2 Quantifizierung mittels *PicoGreen*-Methode

Um die *SMN2*-Kopienanzahl von transgenen Mauslinien zu bestimmen (3.2.1.6), wurde die DNA mit Hilfe des *ChargeSwitch gDNA Mini Tissue Kit* (3.2.1.1.2) isoliert. Für die anschließenden *Realtime*-Analysen musste die Konzentration der DNA exakt bestimmt werden. Dazu wurde das *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* nach Herstellerangaben angewandt. Dabei bindet der Fluoreszenzfarbstoff *PicoGreen* spezifisch an doppelsträngige DNA.

Zu Beginn wurde mit Hilfe einer λ DNA eine Standardreihe erstellt. Dabei wurden folgende Verdünnungen angesetzt:

Konzentration	λ DNA bzw. Verdünnung		TE ⁻⁴ -Puffer
40 ng/ μ l	16 μ l (100 mg/ μ l)	+	24 μ l
20 ng/ μ l	20 μ l (40 ng/ μ l)	+	20 μ l
10 ng/ μ l	20 μ l (20 ng/ μ l)	+	20 μ l
5 ng/ μ l	20 μ l (10 ng/ μ l)	+	20 μ l
2,5 ng/ μ l	20 μ l (5 ng/ μ l)	+	20 μ l

Für eine Konzentrationsbestimmung wurden sowohl vom Standard als auch von den zu messenden Proben je 5 μ l in Triplikaten eingesetzt. Das *PicoGreen*-Reagenz wurde 1:200 in TE-Puffer (20 x) verdünnt und je 95 μ l/well eingesetzt. Die Detektion des DNA-*PicoGreen*-Komplexes wurde an einem Mikrotiterplattengerät bei einer Emission von 520 nm gemessen.

3.2.1.5 Gelelektrophoretische Separierung von DNA-Fragmenten

Bei einer Elektrophorese wandern geladene Moleküle im elektrischen Feld. Als Matrix dient Agarose, welche aufgrund ihrer Porenstruktur einen Siebeffekt ausübt und so die Wanderungseigenschaften der Moleküle beeinflusst. DNA-Fragmente bewegen sich mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zu dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, dessen Ringsystem zwischen den Basen der DNA interkaliert, werden diese unter dem UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Konzentration der Agarosegele wurde in Abhängigkeit der nachzuweisenden Fragmentgrößen (0,7-3 %) gewählt. Das Agarosepulver wurde in TBE-Puffer (1 x) in der Mikrowelle zu einer klaren Lösung aufgekocht und - vor Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml) - auf dem Magnetrührer abgekühlt. Anschließend wurde die Agarose in einen Gelträger mit Kämmen gegossen, welche die späteren *slots* für die DNA-Proben bildeten, und nach Erstarrung vollständig mit TBE-Puffer (1 x) bedeckt. Die DNA-Proben wurden vor der Auftrennung mit 1/10 Volumen Ladepuffer versehen. Das im Ladepuffer vorhandene Glycerin dient zum Absinken der Proben und das Bromphenolblau zur Visualisierung der Lauffront. Die Stärke der Spannung sowie die Laufzeit standen in Abhängigkeit der Fragmentgrößen (25-140 V, 1-16 h). Abschließend wurden die Ethidiumbromid-DNA-Komplexe an einem UV-Licht-Transluminator sichtbar gemacht.

Die Elektrophorese diente z.B. der Auftrennung amplifizierter Fragmente (siehe 3.2.1.2, PCR) im Rahmen der Genotypisierungen verschiedener Mauslinien.

3.2.1.6 Realtime-Analysen zur Bestimmung der *SMN2*-Kopienanzahl

Die Echtzeit-PCR (*Realtime*) basiert auf dem Prinzip einer PCR (3.2.1.2), die der quantitativen Bestimmung der eingesetzten Matrize dient. Der Vorteil besteht in der Messung der Amplifikatmenge nach jedem Zyklus während des Laufs (in Echtzeit).

Die Quantifizierung erfolgte durch den speziellen Reporterfarbstoff *SYBR Green*. Dabei handelt es sich um einen Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff, der in doppelsträngige DNA sequenzunabhängig interkaliert. Der so entstehende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert bei 498 nm und emittiert bei 522 nm. Die Lichtemissionen werden am Ende eines jeden PCR-Zyklus gemessen, wobei die Intensität proportional zur vorhandenen Menge an doppelsträngiger DNA ist (gültig während der exponentiellen Phase). Da der Farbstoff sequenzunabhängig bindet, muss am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Die entstehende Schmelzkurve gibt Aufschluss über die Spezifität der PCR.

Um die *SMN2*-Kopienanzahl transgener Mäuse zu bestimmen, wurde die DNA mit dem *ChargeSwitch gDNA Mini Tissue-Kit* isoliert (3.2.1.1.2) und die Konzentration anschließend mit Hilfe der *PicoGreen*-Methode (3.2.1.4.2) bestimmt. Die DNA-Lösungen wurden auf 5 ng/µl in TE⁻⁴-Puffer verdünnt, wobei 10 ng DNA als *template* eingesetzt wurden. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte im dritten Schritt eines jeden PCR-

Zyklus. Die Analysen wurden in einem *thermocycler* durchgeführt. Für alle Proben wurde folgender Ansatz verwendet:

Allgemeiner Ansatz einer *Realtime*-PCR

- *template* DNA 2 µl (10 ng/µl)
- *SYBR Green* (2 x) 1 x 25 µl
- *Primer fw* 10 pmol 1 µl (100 pmol)
- *Primer rev* 10 pmol 1 µl (100 pmol)
- *ad 50 µl mit ddH₂O*

Verwendete *Primer*: *ApoB fw* (158), *ApoB rev* (159), *SMN2 fw* (2713), *SMN2 rev* (2953), alle weiteren Angaben sind Kapitel 3.1.7, Kapitel 8 zu entnehmen.

Die Proben wurden auf eine *96-well* Mikrotiterplatte (B70501) pipettiert, anschließend mit einer Klebefolie verschlossen und herunter zentrifugiert. Für die PCR wurden folgenden Bedingungen gewählt:

<i>stage 1</i>	<i>stage 2</i>			<i>stage 3</i>		
95°C	95°C	54°C	68°C	95°C	60°C	95°C
10 min	(30 sek 30 sek 45 sek)			15 sek	1 min	15 sek
	40 Zyklen					

Alle Messungen erfolgten in Triplikaten und die Quantifizierung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der entsprechenden *software*. Die relative Bestimmung der Kopienanzahl erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode: der C_T -Wert (*cycle threshold*) gibt denjenigen PCR-Zyklus an, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der von der Software berechnete C_T -Wert wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulations-Programmes *Excel* weiter verarbeitet. Aus den Mittelwerten der C_T -Werte von Referenz- und Zielgen wurde zunächst der ΔC_T -Wert berechnet. Dieser beschreibt die Differenz aus dem C_T -Wert des Zielgens und dem C_T -Wert des Referengens einer Probe. Zur Bestimmung der *SMN2*-Kopienanzahl wurde stets *ApoB* als Referenzgen eingesetzt, da es sich um ein *single copy gene* handelt. Die Differenz aus dem ΔC_T -Werten zweier Proben bezeichnet man als $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Ein positiver $\Delta\Delta C_T$ -Wert von 1 entspricht einer Verdoppelung der Amplikonmenge in

der entsprechenden Probe. Ein $\Delta\Delta C_T$ -Wert von -1 entspricht einer halbierten Amplikonmenge des Zielgens in der Probe relativ zum Referenzgen.

3.2.1.7 Southern Blot-Analysen (Southern 1975)

Als Southern Blot-Analysen bezeichnet man ein Verfahren, bei dem DNA fragmentiert, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert wird. Mittels Hybridisierung spezifischer Sonden und abschließendem Autoradiogramm lassen sich bestimmte Fragmente visualisieren. Die Methode wurde zur Detektion positiv transfizierter embryonaler Stammzellklone (ES-Zellklone) und zur Genotypisierung von Mauslinien verwendet.

3.2.1.7.1 Restriktionspaltung und gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Für eine Southern Blot-Analyse wurden genomische DNA (3.2.1.1.1. und 3.2.1.4.1) mittels Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Diese erkennen spezifische Nukleotidsequenzen in der DNA und spalten zwei Basen mittels Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen (Nathans and Smith 1975).

Genomische DNA (5-20 μg) wurde über Nacht bei der dem Enzym entsprechenden adäquaten Temperatur im Wasserbad inkubiert. Im Folgenden ist ein Restriktionsansatz aufgelistet, wie er in dieser Arbeit angewandt wurde:

Allgemeiner Restriktionsansatz

- | | | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|
| ○ <i>template</i> | 5-20 μg DNA | x μl |
| ○ Enzym | 10 U/ μg DNA | x μl |
| ○ Puffer | 1 x | 5 μl Puffer (10 x) |
| ○ DTT | 1 mM | 0,05 μl DTT (1 M) |
| ○ Spermidin | 1 mM | 0,05 μl Spermidin 1 M) |
| ○ BSA | 1 x | 0,5 μl 100 x BSA |
| ○ <i>ad</i> 50 μl mit ddH ₂ O | | |

Das gesamte Volumen des Restriktionsansatzes wurde mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und auf ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen (3.2.1.5). Die Proben wurden zu Einlaufen in die Matrix für 15 min bei einer Spannung von 70 V belassen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über Nacht bei 28-32 V.

3.2.1.7.2 Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Trägermembran

Die aufgetrennten Fragmente wurden am nächsten Tag unter dem UV-Licht visualisiert und der Größenstandard mit einer Pipettenspitze im Gel markiert. Im Folgenden wurde das Gel für 10 min in 0,125 M HCl depuriniert und anschließend mindestens 20 min im Transferpuffer (0,5 M NaOH/1,5 M NaCl) denaturiert.

Die fragmentierte DNA wurde mittels Kapillartransfers auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde mit ddH₂O angefeuchtet und sowohl Membran als auch Blottingpapier vor Gebrauch im Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Die Position der einzelnen *slots* wurde auf der Membran markiert und diese anschließend in SSC-Puffer (2 x) geschwenkt. Die transferierte DNA wurde abschließend durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C auf der Membran fixiert.

3.2.1.7.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Zur Detektion spezifischer DNA-Fragmente wurden DNA-Sonden mittels PCR amplifiziert (3.2.1.2) und anschließend aufgereinigt (3.2.1.2.1). Die Spezifität der Sonden musste vor Anwendung evaluiert werden.

Die Markierung der Sonden erfolgte radioaktiv nach Angaben des Herstellers (*Rediprime II Random Labeling-Kit*), als Radioisotop wurde [α -³²P]dCTP verwendet (pro Sonde 50 μ Ci). Das Prinzip beruht auf dem sogenannten *Random-primed Oligolabeling* (Feinberg and Vogelstein 1984). Um nicht markierte Oligonukleotide und überschüssige [α -³²P]dCTPs zu entfernen, wurde ein Reinigungsschritt der Sonden über eine Sephadex-Säule (*Probe Quant G50 micro columns*) vorgenommen (3 min, 3.000 rpm). Abschließend wurde die Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die radioaktiv markierte Sonde konnte anschließend dem Prähybridisierungsmix beigelegt werden.

3.2.1.7.4 Prähybridisierung, Hybridisierung und Autoradiographie

Vor Beginn der radioaktiven Hybridisierung wurden freie Bindungsstellen abgesättigt. Zu diesem Zweck wurde die Membran mit SSC-Puffer (2 x) angefeuchtet, in eine Glasröhre transferiert und mindestens 2 h mit der Prähybridisierungslösung bei 64°C inkubiert. Zur Denaturierung der in der Prähybridisierungslösung enthaltenen *salm sperm*-DNA wurde diese vorab für 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung diente gleichzeitig als Hybridisierungslösung (3.2.1.7.3). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 64°C im Hybridisierungssofen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Sonde abgenommen und unspezifisch an die Membran gebundene Radioaktivität durch einen einmaligen kurzen und mehrmalige längere (10-20 Minuten) Waschschriffe (Waschpuffer auf 64°C vorgewärmt) entfernt. Zwischen den einzelnen Waschschriffen wurde die Signalstärke der Membran mit einem Geigerzähler kontrolliert. Die gemessene Radioaktivität war abhängig von der Größe der Membran bzw. von der Anzahl der Proben. Bei Erreichen der gewünschten Signalstärke wurde die Membran in Folie eingeschweißt, in eine Röntgenkassette eingeklebt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Autoradiographie erfolgte für 2 bis 7 Tage bei -80°C.

Sollte die gleiche Membran mit einer anderen Sonde markiert werden, wurde die bereits hybridisierte Sonde durch zweimaliges Erhitzen auf 100°C für jeweils 30 min in einer Southern Blot-*strip*-Lösung entfernt. Nach erneuter Prähybridisierung konnte die Membran mit einer neuen, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden.

3.2.1.8 Isolierung von RNA

Bei der Arbeit mit RNA wurden stets RNase-freie Materialien und Geräte verwendet (gestopfte Pipettenspitzen, RNase-freies Wasser).

3.2.1.8.1 Isolierung von RNA aus Geweben

Gewebe, die der RNA-Isolation dienten, wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für die RNA-Isolation wurde das *RNeasy Mini-Kit* nach Herstellernangaben verwendet. Dazu wurden bis maximal 20 mg eines Gewebestückes in RLT-Lysispuffer mit einem Gewebehomogenisator homogenisiert. Zwischen den einzelnen Proben musste das Gerät gespült werden (1 % SDS, 70 % EtOH, ddH₂O). Die weitere Homogenisierung und die Entfernung von DNA-Rückständen wurden mit *QIAshredder*-Säulen durchgeführt. Um die vollständige Entfernung von DNA zu gewährleisten, wurde nach dem ersten Waschschriff ein DNase I-Verdau nach Angaben des Herstellers durchgeführt (*RNase-free DNase I Set*). Die Elution der RNA erfolgte in einem adäquaten Volumen an RNase-freiem Wasser (50-300 µl).

Für die RNA-Isolation aus fetthaltigen Geweben (z.B. *Cerebrum*, *Cerebellum*) erfolgte die Homogenisierung in 1 ml *QIAzol*. Dieses Verfahren basiert auf der Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Durch Zugabe von einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1-Gemisch) und anschließender Zentrifugation

erfolgte die Phasentrennung (3.2.1.1.3). Die RNA in der wässrigen Phase wurde anschließend mit 70 %igen EtOH präzipitiert. Der weitere Verlauf erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.8.2 Isolierung von RNA aus murinen embryonalen Fibroblasten

Die RNA-Isolierung aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) fand nach vorangegangener *in vitro*-Deletion mittels HTN-Cre (3.2.2.5) statt. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen ohne Waschschrift direkt trypsinisiert (3.2.3.4). Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 13.000 rpm sedimentiert und das Zellpellet in Lysispuffer resuspendiert. Der Puffer wurde vorab mit β -ME versetzt. Für den weiteren Verlauf wurde das *RNeasy Mini-Kit* nach Herstellerangaben angewandt. Weiterhin wurde für die RNA-Isolation aus Zellen *QIAshredder* und das *RNase-free DNase I Set* verwendet (3.2.1.8.1).

3.2.1.9 Spektrophotometrische Quantifizierung von RNA

Wie schon unter 3.2.1.4 beschrieben, nutzt man auch für die Konzentrationsbestimmung von RNA die Absorptionseigenschaft der Basen im ultravioletten Bereich aus. Die Reinheit einer RNA-haltigen Lösung ergibt sich aus dem Verhältnis der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm. Reine RNA zeigt dabei einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf Proteinkontaminationen, höhere auf RNA-Degradierung oder freie Nukleotide hin.

3.2.1.9.1 Quantifizierung mittels *NanoDrop*-Gerät

Die Konzentration von RNA für nicht-quantitative Anwendungen wurde, wie schon für die DNA beschrieben (3.2.1.4.1), spektrophotometrisch am *NanoDrop*-Gerät bestimmt. Dabei wurden 1,5 μ l der RNA-haltigen Lösung eingesetzt. Um RNA im quantitativen Bereich einzusetzen, wurde die Konzentration mit Hilfe der *RiboGreen*-Methode gemessen.

3.2.1.9.2 Quantifizierung mittels *RiboGreen*-Methode

Die fluorimetrische Bestimmung der RNA-Konzentration machte diese für quantitative Bestimmungen einsetzbar (z.B. *Realtime*-Analysen). Dabei wurde die Quantifizierung mit dem *Quant-iT RiboGreen RNA Quantification-Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff *RiboGreen* bindet selektiv an Nukleinsäuren und fluoresziert im grünwelligen Bereich. Die Detektion des RNA-*RiboGreen*-Komplexes wurde an einem Mikrotiterplattengerät bei einer Emission von 673 nm gemessen.

3.2.1.10 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird einzelsträngige mRNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese kann in weiteren Analysen - z.B. zur Quantifizierung von Transkripten - genutzt werden.

Für die cDNA-Synthese wurde das *QuantiTect Reverse Transcription-Kit* nach Herstellerangaben angewandt. Dabei wurden 150 ng RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl umgeschrieben.

3.2.1.11 Realtime-Analysen zur Bestimmung von Transkriptmengen

Die Methode der Echtzeit-PCR (*Realtime-PCR*) wurde bereits unter 3.2.1.6 beschrieben. Als Matrize wurde cDNA eingesetzt.

Um die Expressionsrate verschiedener Gene zu bestimmen, wurde aus unterschiedlichen Geweben RNA isoliert (3.2.1.8.1) und die Konzentration mit Hilfe der *RiboGreen*-Methode bestimmt (3.2.1.9.2). Anschließend wurden je Probe 150 ng RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl in cDNA umgeschrieben (3.2.1.10). Abschließend wurden je 4 µl cDNA in 56 µl TE⁻⁴-Puffer verdünnt (Vorverdünnung) und in *Realtime*-Analysen eingesetzt. Für alle Proben wurde folgender Ansatz verwendet:

Allgemeiner Ansatz einer *Realtime-PCR*

- | | | |
|----------------------------------------|---------|--------------------------|
| ○ <i>template</i> | cDNA | 4 µl (der Vorverdünnung) |
| ○ <i>SYBR Green (2 x)</i> | 1 x | 12,5 µl |
| ○ <i>Primer fw</i> | 10 pmol | 1 µl (100 pmol) |
| ○ <i>Primer rev</i> | 10 pmol | 1 µl (100 pmol) |
| ○ <i>ad 25 µl mit ddH₂O</i> | | |

Alle verwendeten *Primer* und deren Bedingungen sind in Kapitel 3.1.7, Tabelle 7 aufgelistet.

Für den Lauf wurden folgenden PCR-Bedingungen gewählt:

<i>stage 1</i>	<i>stage 2</i>	<i>stage 3</i>
95°C	95°C xx°C 72°C	95°C 60°C 95°C
10 min	15 sek 30 sek 35 sek	15 sek 1 min 15 sek
	40 Zyklen	

3.2.1.12 Northern Blot-Analysen (Alwine et al. 1977)

Mit der Northern Blot-Methode wird gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA auf eine Membran transferiert. Durch die Hybridisierung mit spezifischen Sonden und abschließender Autoradiographie lassen sich spezifische RNA-Sequenzen nachweisen. In der hier vorliegenden Arbeit diente die Northern Blot-Analyse der Detektion von RNA Polymerase III-abhängigen Transkripten.

3.2.1.12.1 Gelelektrophoretische Auftrennung und Transfer von RNA

Jeweils 2 µg der zu analysierenden RNA (3.2.1.9.1) und eine adäquate Menge des RNA-Größenstandards (siehe Kapitel 3.1.12, Tabelle 17) wurden mit RNA-Ladepuffer (2 x) versehen, für 10 min bei 70°C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (3.2.1.5). Die Auftrennung erfolgte in MOPS-Puffer (1 x) bei 80 V über 4 h. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht visualisiert und die Lage des Größenstandards mit einer Pipettenspitze im Gel markiert. Eine ausreichende Auftrennung der RNA war durch das Bandenmuster ribosomaler RNA (18S: 1,8 kb; 28S: 4,8 kb) erkennbar. Das Gel wurde anschließend zweimal für je 15 min in Transferpuffer (10 x SSC-Puffer) geschwenkt und die RNA anschließend mittels Kapillartransfers auf eine Nylonmembran übertragen. Der Transfer sowie die nachfolgenden Schritte gleichen denen einer Southern Blot-Analyse und sind unter 3.2.1.7.2 beschrieben.

3.2.1.12.2 Radioaktive Markierung von RNA-Fragmenten und Hybridisierung

Für Northern Blot-Analysen wurden DNA-Sonden verwendet. Die Generierung der Sonden sowie die Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran mit abschließender Autoradiographie sind mit denen der Southern Blot-Analysen identisch und bereits unter 3.2.1.7.3. und 3.2.1.7.4 beschrieben.

3.2.2 Methoden zur Proteinanalysen

3.2.2.1 Isolierung von Proteinen

In der hier vorliegenden Arbeit wurde RIPA-Puffer (*radioimmuno precipitation assay buffer*) zur Extraktion von membranassoziierten, zytosolischen oder nukleären Proteinen

verwendet. RIPA-Puffer ermöglicht die effiziente Zelllyse und Solubilisierung von Proteinen bei gleichzeitiger Vermeidung von Proteindegradierung.

3.2.2.1.1 Isolierung von Proteinen aus Geweben

Für die Proteingewinnung aus Geweben wurden diese in RIPA-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Der Puffer wurde vorab mit Protease Inhibitoren versetzt. Das Homogenat wurde für 20 min auf Eis inkubiert und Zelltrümmer für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C sedimentiert. Der proteinhaltige Überstand konnte anschließend spektrophotometrisch quantifiziert (3.2.2.2) oder bei -80°C gelagert werden.

3.2.2.1.2 Isolierung von Proteinen aus murinen embryonalen Fibroblasten

Die Proteinisolierung aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) fand nach vorangegangener *in vitro*-Deletion mittels HTN-Cre (3.2.2.5) statt. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert (3.2.3.4). Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 13.000 rpm sedimentiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in RIPA-Puffer resuspendiert und für 40 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden verbleibende Zelltrümmer für 20 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand konnte anschließend spektrophotometrisch quantifiziert (siehe 3.2.2.2) oder bei -80°C gelagert werden.

3.2.2.2 Spektrophotometrische Quantifizierung von Proteinen (BCA-kit)

Die Proteinquantifizierung mittels Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) ist eine Kombination aus einer Biuret- und einer Komplexbildungsreaktion mit BCA. Dabei wird im ersten Reaktionsschritt, der Biuret-Reaktion, Cu^{2+} in alkalischer Lösung zu Cu^+ reduziert. Bestimmte Aminosäuren sowie Peptidbindungen führen diese Reaktion aus, so dass die Proteinmenge proportional zur Reduktionsreaktion ist. Im zweiten Schritt bilden zwei BCA-Moleküle mit einem Cu^+ -Ion einen Chelatkomplex. Dieser ist wasserunlöslich, zeigt bei 562 nm eine starke Absorption und kann spektrophotometrisch analysiert werden.

Das *BCA-kit* wurde in dieser Arbeit nach Herstellerangaben verwendet. Die photometrische Messung wurde einem Mikrotiterplattengerät durchgeführt.

3.2.2.3 Western Blot-Analysen

Als Western Blot-Analysen bezeichnet man den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran. Die Übertragung kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden, z.B. mittels Elektrophorese. Der Nachweis der transferierten Proteine findet mit Hilfe einer Immundetektion, also mit der Anwendung spezifischer Antikörper gegen ein Antigen, statt.

3.2.2.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine SDS-PAGE ist eine denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen zur Separation nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und des umgebenden pH-Wertes ist die Ladung von Proteinen unterschiedlich. Durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS werden sie denaturiert, wobei jedes Protein eine zu seiner Größe proportionale negative Ladung erhält, die nicht mehr von Tertiärstrukturen beeinflusst wird.

Weiterhin ist eine SDS-PAGE eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, das aus einem Zweiphasensystem besteht: das Sammelgel enthält eine geringe Konzentration an Polyacrylamid und demzufolge einen geringen Vernetzungsgrad – somit wandern alle Proteine nahezu gleich schnell. Der pH-Wert im Sammelgel von 6,8 verhindert eine Nettoladung der Aminosäure Glycin und die Proteinfront bewegt sich zwischen Glycin und den negativ geladenen Chloridionen (Sammeleffekt). Beim Übergang zum Trenngel wird dieser Sammeleffekt aufgehoben: das Trenngel enthält eine höhere Konzentration an Acrylamid, was zu einer stärkeren Vernetzung führt. Bei einem pH-Wert von 8,8 liegt Glycin negativ geladen vor und wandert im elektrischen Feld entsprechend. Das Wanderungsverhalten von Proteinen ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Die Gele (siehe Kapitel 3.1.5.2, Tabelle 3) wurden direkt in den dafür vorgesehenen Glasplatten präpariert. Zuerst wurde das Trenngel, dann das Sammelgel präpariert. Das Trenngel wurde bis zur Polymerisierung mit 70 %igen Ethanol überschichtet. Nach Entfernung des Alkohols wurde das Sammelgel, unter Aussparung von *slots*, gegossen. Pro *slot* wurden 15 µg Protein aufgetragen, welche mit je 5 µl Laemmli-Puffer (2 x) versehen wurden. Das Gemisch wurde vorab für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt, wobei β-ME zur Reduktion der Disulfidbrücken beitrug.

Die Elektrophoresekammer wurde mit den Gelen und dem Elektrophoreselaufpuffer (1 x) gefüllt und die Proben zusammen mit einem Größenmarker aufgetragen. Zunächst wurde bis zum Einlaufen in das Trenngel eine Spannung von 50 V angelegt, die dann auf 80-100 V erhöht wurde. Der Lauf wurde beendet, wenn die zu detektierende Fragmentgröße des Größenmarkers den unteren Teil des Trenngels erreicht hatte.

3.2.2.3.2 Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western Blot)

Die durch die SDS-PAGE (3.2.2.3.1) gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels *wet blot*-Technik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin et al. 1979). Der Transfer erfolgte über Nacht bei 30 V und 4°C unter Rühren.

3.2.2.3.3 Immunhistologischer Nachweis von Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe von primären Antikörpern, die spezifisch ihr Zielprotein/-epitop erkennen. Die Bindung wurde anschließend mit Hilfe eines sekundären Antikörpers in einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Dabei regt die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) das in der Lösung enthaltene Luminol durch Spaltung von Wasserstoffperoxid zur Lumineszenz an.

Unspezifische Bindestellen auf der Membran wurden für 2 h bei 4°C durch Inkubation mit 6 %igen Milchpulver oder BSA in TBST-Puffer auf einen Schüttelinkubator geblockt. Darauf folgte eine 1-16stündige Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe Kapitel 3.1.9, Tabelle 9) auf dem Rollinkubator in 2 %igen Milchpulver oder BSA in TBST-Puffer. Anschließend wurde die Membran fünfmal für 5 Minuten mit TBST-Puffer auf einem Schüttelinkubator gewaschen, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation des sekundären Antikörpers (siehe Kapitel 3.1.9, Tabelle 10) in 2 %igen Milchpulver oder BSA in TBST-Puffer erfolgte für 1 h bei 4°C auf dem Rollinkubator. Nach weiteren Waschschritten (fünfmal 5 min in TBST-Puffer) wurde die Membran mit der Chemilumineszenzlösung versetzt. Die Proteinbanden der Autoradiographie wurden an einem Geldokumentationssystem densitometrisch quantifiziert und mit Hilfe des Tabellenkalkulations-Programmes *Excel* bearbeitet. Dabei wurde das Zielprotein mit einem konstant gleich stark exprimierten Haushaltsgen verglichen.

Für eine Rehybridisierung wurde die Membran für 10-15 min im *Western Blot-stripping buffer* unter Schütteln inkubiert. Durch erneute Anwendung der

Chemilumineszenzlösung wurde die vollständige Entfernung des Antikörpers mit Hilfe einer Autoradiographie kontrolliert.

3.2.2.4 HTN-Cre-Expression

Mit Hilfe des rekombinanten, zellpermeablen Proteins HTN-Cre (His-TAT-NLS-Cre), welches in einem modifizierten *E. Coli* nach IPTG-Induktion exprimiert wird, lassen sich *in vitro*-Deletionen eines geflochten Allels generieren (Peitz et al. 2002).

Für die Vorkultur wurden 250 ml LB-Medium (+ Glukose [1 %], + Carbenecillin [50 µg/ml], + Chloramphenicol [34 µg/ml]) mit der Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die Expressionskultur wurden am kommenden Tag insgesamt 12 l LB-Medium (+ Glukose [1 %], + Ampicillin [100 µg/ml], + Chloramphenicol [34 µg/ml]) zu je 2 l abgefüllt und mit jeweils 40 ml der Übernachtskultur versehen. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 37°C unter Schütteln, dabei wurde in regelmäßigen Abständen eine Probe zur Bestimmung der optischen Dichte (OD_{600}) genommen. Bei einer $OD_{600} = 0,8$ (nach ca. 2½-3½ h) befand sich die Kultur im exponentiellen Stadium und die Proteinexpression wurde mittels IPTG (0,5 mM) induziert. Etwa 3-4 Stunden nach erfolgter Induktion wurde die Expressionkultur (6 x 2 l) für 20 min bei 6.000 G und 4°C sedimentiert. Für die Resuspension des Pellets wurde der Überstand bis auf 50 ml verworfen. Abschließend wurden die Zellsuspensionen gemischt und für 10 min bei 6.000 G und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde nun vollständig entfernt, das zellhaltige Pellet im flüssigen Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Um das exprimierte HTN-Cre-Protein zu isolieren, wurde das gefrorene Zellpellet in 120 ml PTB-Puffer (10 ml pro 1 l Kultur) resuspendiert, der Suspension je 1 mg/ml Lysozym (Zellaufschluss) für 20 min hinzugefügt, gefolgt von 120 µl Benzonase für 15 min. Die Inkubationen fanden bei Raumtemperatur unter Rühren der Zellsuspension statt. Danach wurde das proteinhaltige Lysat für 2 min sonifiziert und im Anschluss mit 120 ml eiskaltem TSB-Puffer (je 1 ml pro ml Suspension) für 5 min unter Rühren vermischt. Bei der nachfolgenden Zentrifugation für 30 min bei 35.000 G und 4°C wurden Zelltrümmer sedimentiert und der proteinhaltige Überstand vorsichtig abgenommen.

Die Aufreinigung des HTN-Cre-Proteins wurde mittels Nickel-NTA-Agarose durchgeführt. Je 2 ml 50 %iger Nickel-NTA-Agarose wurden pro Liter Expressionskultur dem isolierten Überstand beigefügt und für 1 h bei 4°C unter Rühren inkubiert. Die anschließende

Aufreinigung erfolgte über Chromatographiesäulen. Dabei wurde der Nickel-NTA-Agarosehaltige Überstand auf drei Säulen verteilt und der Durchfluss verworfen. Jede Säule wurde zweimal mit je 20 ml Waschpuffer gewaschen und das HTN-Cre-Protein mit je 12 ml Elutionspuffer von der Säule gelöst.

Zur weiteren Aufreinigung wurden die Eluate von je 12 ml gemischt und erst für ein paar Stunden, dann über Nacht, gegen einen *high salt*-Puffer dialysiert (12400 MWCO). Der Dialyseschlauch wurde vorab in 2 %igen Natriumbicarbonat und 1 mM EDTA für 3-4 h aufgekocht und anschließend in ddH₂O gespült. So vorbereitet, konnte der Schlauch in 20 %igen EtOH bei 4°C gelagert werden.

Die HTN-Cre-Proteinkonzentration wurde mit der Warburg-Formel bestimmt (mg Protein/ml: $1,55 \times A_{280}^{1\text{cm}} - 0,76 \times A_{260}^{1\text{cm}}$). Dazu wurde die proteinhaltige Lösung 1:100 in PBS verdünnt. Der Proteinstock kann ohne Aktivitätsverlust der HTN-Cre bei -20 bis -70°C gelagert werden. Die effektiv einzusetzende Konzentration für eine *in vitro*-Deletion ist von der Zelllinie abhängig und musste vorab in Zellkultur getestet werden (3.2.2.5). Während der gesamten HTN-Cre-Expression und Aufreinigung wurden regelmäßig Stichproben entnommen und diese auf einer SDS-PAGE in Bezug auf das HTN-Cre-Protein kontrolliert.

3.2.2.5 HTN-Cre-vermittelte *in vitro*-Deletion

Zur Anwendung dieser Technik wurden MEF generiert (3.2.3.4.1), welche das *Bdp1*-Allel homozygot gefloxt trugen (*Bdp1^{fl/fl}*) (siehe Kapitel 3.1.11, Tabelle 16 und 3.2.5.2). Die so generierten Zellen wurden vier Stunden vor der HTN-Cre-Behandlung in 6-well-Mikrotiterplatten plattiert (2×10^5 Zellen/well). Dabei wurde jeder Ansatz in Triplikaten gemessen. Unmittelbar vor der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit der zuvor steril filtrierten HTN-Cre in D-MEM 41966/PBS (1:1) (bzw. die Kontrollzellen [*Mock*] nur mit D-MEM 41966/PBS [1:1]) inkubiert. Die effiziente HTN-Cre-Konzentration zur vollständigen Deletion des *Bdp1*-Allels wurde zuvor titriert. Nach 16-18 h Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal gewaschen und für weitere Analysen nach unterschiedlichen Zeitpunkten (7d, 14d) für die Isolierung von DNA (3.2.1.1.4), RNA (3.2.1.8.2) und Proteinen (3.2.2.1.2) geerntet.

3.2.2.6 MTT-Analysen

Mit Hilfe von MTT-Analysen lassen sich Zytotoxizitäts-Tests durchführen. Dafür werden Zellen *in vitro* mit dem namensgebenden Farbstoff, einem gelben Tetrazoliumsalz,

behandelt, um ihre Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil lebender Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe von Zellen zu messen.

Der Nachweis der Zellvitalität beruht dabei auf der Reduktion des wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blauviolettes, wasserunlösliches Formazan, welches als Kristalle sichtbar und photospektrometrisch nachweisbar ist. MTT-Analysen wurden nach einer vorangegangenen HTN-Cre Behandlung durchgeführt, um Auswirkungen der Gendeletion auf die Zellvitalität verschiedener Zelllinien zu überprüfen.

Für eine MTT-Analyse wurden MEF für 16-17 h mittels HTN-Cre *in vitro*-deletiert (3.2.2.5). Nach der Inkubation wurde das Cre-haltige Medium abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für weitere 3 h nach Zugabe von MEF-Medium in Kultur gehalten. Im weiteren Verlauf wurde das Medium erneut abgenommen, die Zellen gewaschen und das Medium mit der MTT-Lösung versetzt (pro 1 ml Medium 100 µl MTT-Lösung). Die Zellen wurden im Anschluss für 2-3 h im Brutschrank inkubiert. Lebende Zellen metabolisierten in dieser Zeit das MTT zu Formazan-Kristallen.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden pro Vertiefung 1,1 ml Solubilisierungslösung zugefügt und die Zellen für 30 min unter Schütteln inkubiert. Die abschließende Absorptionmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von λ 550 nm. Die Daten wurden anschließend mit dem Tabellenkalkulations-Programm *Excel* ausgewertet.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Allgemeine zellbiologische Arbeiten

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die hier beschriebenen Techniken wurden nach Torres und Kühn modifiziert (Torres 1997).

3.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Als Einfrieremedium wurde FKS mit 10 % Dimethylsuloxid (murine embryonale Fibroblasten, MEF) (embryonale Stammzellen, ES-Zellen: 20 % DMSO) verwendet. DMSO wirkt als Kryoprotektionsmittel und verhindert die Ausbildung von Eiskristallen innerhalb der Zellen. Da DMSO zelltoxisch wirkt, werden sowohl MEF als auch ES-Zellen langsam eingefroren, jedoch schnell aufgetaut.

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert (3.2.3.4) und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 1-2 Wochen bei -80°C gelagert, bevor sie zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurden (Ure et al. 1992).

Das Auftauen von Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Nachdem die Zellen leicht angetaut waren, wurden diese in einem großzügigen Volumen an Medium (mind. 10 ml) aufgenommen und direkt auf vorbereitete Kulturschalen ausplattiert.

3.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zellzählkammer (Neubauer) bestimmt. Dabei wurden je vier Großquadrate, die aus jeweils 16 Kleinquadraten bestanden, ausgezählt. Die Zellzahl ergab sich aus der durchschnittlichen Zellzahl pro Quadrant ($\times 10^4$). Die Gesamtzellzahl ergab sich aus dem Verdünnungsfaktor und dem Gesamtvolumen der Zellsuspension.

3.2.3.4 Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Die Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) in MEF-Medium erfolgte bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre bei einer konstanten CO_2 -Konzentration (5 %) auf gelatinebeschichteten Petrischalen. Dazu wurden die Platten mit einer 0,1 %igen Gelatinelösung bedeckt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen, so dass die Zellen auf den behandelten Platten ausplattiert werden konnten.

Bei Erreichen der Vollkonfluenz wurden die Zellen *gesplittet*. Dafür wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und für 3-4 min bei 37°C trypsinisiert. Trypsin ermöglicht durch die Spaltung von Arginin und Lysin das Ablösen der Zellen vom Boden. Die Reaktion wurde mit demselben Volumen an MEF-Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einer Pipette von der Petrischale gespült, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette entfernt, das Zellpellet in MEF-Medium resuspendiert und die Suspension auf neue Kulturschalen ausplattiert.

3.2.3.4.1 Präparation von MEF

MEF werden am Tag E13,5 p.c. gewonnen. Zu diesem Zweck wurden Mäuse entsprechender Genotypen verpaart und die Begattung am kommenden Morgen anhand von Vaginalpfropfen (3.2.5.4) überprüft. Weibchen mit einem vorhandenen Pfropf (sogenannte

plug-positive Weibchen) wurden nach 13 Tagen mittels zervikaler Dislokation getötet, die Embryonen unter sterilen Bedingungen dem Uterus entnommen (3.2.5.5.2) und in PBS gewaschen. Im weiteren Verlauf wurden den Embryonen Leber, Herz und Kopf entfernt, wobei der Kopf zur Gewinnung von DNA zur Genotypisierung diente (3.2.1.1.1). Das verbliebene Gewebe wurde in ein Zellsieb transferiert und mit Hilfe der Kolbenstange einer sterilen Einwegspritze homogenisiert. Das Sieb wurde mit 20 ml MEF-Medium gespült und der Durchfluss in einem 50 ml Reaktionsröhrchen aufgefangen. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt. Abschließend wurde das homogenisierte Gewebe 5 min bei 1.200 rpm sedimentiert, das zellhaltige Pellet in 6 ml MEF-Medium resuspendiert und auf gelatinisierte 6 cm Petrischalen plattiert (3.2.3.4). Am kommenden Tag wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Zellen wurden bei täglichem Mediumwechsel expandiert, bis eine adäquate Anzahl eingefroren werden konnte (3.2.3.2). In der hier vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien generiert: $Bdp1^{wt/wt}$, $Bdp1^{fl/fl}$ und $Bdp1^{ko/wt}$ (siehe Kapitel 3.1.11, Tabelle 16 und 3.2.5.2).

MEF (pEB.II:neo), die für die Kultivierung von ES-Zellen (3.2.3.5) eingesetzt wurden, wurden freundlicherweise vom Zentrum für Mausgenetik des Instituts für Genetik, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

3.2.3.4.2 Mitomycin C (MMC)-Behandlung

Um die Differenzierung von ES-Zellen zu vermeiden, werden diese auf einer Schicht von mitotisch inaktivierten MEF kultiviert (Doetschman et al. 1985). Die MEF wurden zu diesem Zweck mit Mitomycin C (MMC) behandelt, welches zwischen den Strängen der DNA interkaliert. Somit ist eine Dissoziation, wie sie zur Replikation benötigt wird, nicht mehr möglich.

Da eine Positivselektion der ES-Zellklone mit Geneticin (3.2.3.6.2) stattfand, wurden für die ES-Zellkultur MEF (3.2.3.4.1) aus transgenen Mäusen verwendet (pEB.II:neo; siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 15) (Muller et al. 1991). Für Transfektionsexperimente wurden MEF höchstens bis zur dritten Passage verwendet und entsprechend MMC behandelt. Dafür wurde der Mitoseinhibitor in MEF-Medium vorverdünnt und steril filtiert (1 mg/ml). Die Zellen wurden für 3 h mit MMC-haltigen MEF-Medium (10 µg/ml) behandelt und abschließend dreimal mit PBS gewaschen, um sämtliche Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert, in ES-Medium resuspendiert und auf

gelatinisierte Petrischalen ausplattiert. Nach ca 2-4 Stunden hatten sich die MMC-behandelten MEF abgesetzt und die ES-Zellen konnten ausplattiert werden.

3.2.3.5 Kultivierung von ES-Zellen

ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste (E3,5 p.c.) gewonnen und *in vitro* kultiviert (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Dabei handelt es sich um pluripotente Zellen, die sich potentiell zu allen Zelltypen entwickeln können.

ES-Zellen wurden bei 37°C und 10 % CO₂-Sättigung in ES-Medium kultiviert. Da eine zu große Zelldichte zur Differenzierung führen kann, wurden die Zellen nur bis zur Subkonfluenz kultiviert. Das *splitten* ist unter 3.2.3.4 beschrieben und das ES-Medium wurde täglich gewechselt.

Um den undifferenzierten Zustand von ES-Zellen zu gewährleisten, wurden diese auf mitotisch arretierten MEF kultiviert (pEB.IL:neo-MEF, 3.2.3.4.2) (Evans and Kaufman 1981), die zuvor auf gelatinebeschichteten Petrischalen (3.2.3.4) ausplattiert wurden. Zusätzlich wurde dem Medium das Cytokin LIF (*leukemia inhibitory factor*) beigefügt, welches gleichzeitig von den Zellen sekretiert wurde (Evans and Kaufman 1981; Smith et al. 1988) (Williams et al. 1988).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden hybride V6.5 ES-Zellen (C57BL/6 und 129/Sv) (Eggan et al. 2002) verwendet (siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 15).

3.2.3.6 Genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

ES-Zellen können mit Hilfe molekularbiologischer Methoden *in vitro* genetisch manipuliert (Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986) und in Blastozysten reinjiziert werden. Die innere Zellmasse der Blastozyste besteht danach sowohl aus zelleigenen als auch aus manipulierten Zellen. Die Blastozyste wird anschließend in den Eileiter einer scheinträchtigen Maus implantiert. Die manipulierten ES-Zellen können an der Bildung des Embryos beitragen, wodurch chimäre Mäuse generiert (Bradley et al. 1984; Gossler et al. 1986; Robertson et al. 1986). Diese Tiere bestehen sowohl aus wildtypischen als auch aus manipulierten ES-Zellen. Ziel einer genetischen Manipulation ist das Erreichen einer Keimbahntransmission der rekombinanten Zellen, die an die folgenden Generationen vererbt werden kann (Schwartzberg et al. 1989; Zijlstra et al. 1989).

Im Folgenden werden einzelne Schritte der genetischen Manipulation von ES-Zellen beschrieben.

3.2.3.6.1 Transfektion von ES-Zellen

ES-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50-70 % mittels Elektroporation transfiziert (Neumann et al. 1982; Potter et al. 1984). Das *Bdp1-targeting*-Konstrukt (4.1.2) wurde über Nacht mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Eam1105* linearisiert (3.2.1.7.1), mit einem Gemisch aus drei Volumina eiskaltem 100 %igen EtOH und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat präzipitiert und bei -20°C gelagert. Am Tag der Transfektion wurde das DNA-Pellet mit 70 %igen EtOH gewaschen und unter einer Sterilbank getrocknet. Das Pellet wurde abschließend in PBS resuspendiert. Je 30 µg des linearisierten *Bdp1-targeting*-Konstruktes wurden für die Transfektion von ES-Zellen ($1,25 \times 10^7$ Zellen pro Transfektion) eingesetzt.

Etwa zwei bis vier Stunden vor der Transfektion wurde das ES-Medium gewechselt. Für die Transfektion wurden die ES-Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS pro 10 cm Kulturschale resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (3.2.3.3). Abschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert und in einer finalen Konzentration von $1,25 \times 10^7$ Zellen pro Transfektionsansatz in PBS resuspendiert.

Die Elektroporation wurde mit dem *GenePulserXcell* bei 230 V und 500 µF durchgeführt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die transfizierten ES-Zellen in ES-Medium aufgenommen und auf gelatinisierte, MMC-behandelte MEF-Kulturplatten überführt (3.2.3.4.2).

3.2.3.6.2 Selektion transfizierter ES-Zellklone

Etwa 24 h nach erfolgter Transfektion wurden diejenigen ES-Zellklone, die das linearisierte *Bdp1-targeting*-Konstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten, zunächst mittels Positivselektion angereichert. Dafür diente das im *targeting*-Konstrukt vorhandene Neomycin-Resistenzgen. Für die Selektion wurde das Neomycin-Analogon G418-Sulfat (Geneticin) eingesetzt. G418 gehört zu der Familie der Aminoglykoside und hemmt die Proteinbiosynthese. Dabei wurde dem ES-Medium eine finale Konzentration von 250 µg/ml beigelegt. Dieser Selektionsschritt wurde bis zur Isolierung der ES-Zellklone (3.2.3.6.3) beibehalten.

Fünf Tage nach der Transfektion erfolgte zusätzlich eine Negativselektion mit Hilfe des Selektionsmarkers für das Thymidinkinase-Gen des *Herpes simplex*-Virus. Bei einer korrekten homologen Rekombination des *targeting*-Konstruktes mit dem genomischen

Lokus geht dieser Marker verloren, bleibt jedoch bei zufälligen Integrationen meist erhalten (Folger et al. 1982). Für die Negativselektion wurde dem ES-Medium Ganciclovir (2 μM) zugesetzt. Wird die Thymidinkinase exprimiert, führt dies zur Triphosphorylierung von Ganciclovir und inhibiert letztendlich als Nukleosid-Analagon die zelluläre Replikation. Wie auch für die Positivselektion wurde die Negativselektion bis zur Isolierung der ES-Zellklone durchgeführt.

3.2.3.6.3 Isolierung von ES-Zellklonen

Etwa acht Tage nach der Transfektion waren die nach den Selektionsschritten überlebenden Klone als runde Kolonien sichtbar, so dass sie isoliert und anschließend expandiert werden konnten.

Die Isolierung wurde unter sterilen Bedingungen am Stereomikroskop durchgeführt. Die Klone wurden vor der Isolation zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit PBS bedeckt. Jede einzelne Kolonie wurde mit einer Pipette gelöst, in einem Volumen von 20 μl aufgenommen und anschließend in eine Vertiefung auf einer 96-*well*-Mikrotiterplatte (Rundboden) mit je 25 μl Trypsin überführt. Während der Isolation standen die Platten auf Eis. Nach etwa 20-30 min wurden die Mikrotiterplatten für 3-4 min bei 37°C inkubiert, die Trypsinisierung mit je 100 μl ES-Medium (+G418) abgestoppt und die Klone zu Einzelzellsuspensionen vereinzelt. Die Zellen wurden anschließend auf 96-*well*-Mikrotiterplatten (Flachboden) überführt, die am Tag zuvor mit 0,1 %iger Gelatine und MMC-behandelten MEF (pEB.II:neo-MEF) beschichtet wurden.

Die Zellklone wurden für zwei bis drei Tage auf den Mikrotiterplatten expandiert. Dabei wurde das Medium täglich gewechselt. Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellkolonien trypsinisiert (50 μl), die Reaktion mit ES-Medium (+G418) abgestoppt, die Zellen vereinzelt und anschließend auf je drei weitere vorbereitete 96-*well*-Mikrotiterplatten (Flachboden) überführt. Das Medium wurde abschließend auf 150 μl aufgefüllt und die Klone für weitere zwei bis drei Tage expandiert.

Von diesen Platten wurden zwei in einem Abstand von 24 Stunden als *back up*-Platten eingefroren (3.2.3.2). Dazu wurden die Klone auf jedem *well* für 3-4 min bei 37°C trypsinisiert und anschließend in je 50 μl Einfriermedium resuspendiert. Zusätzlich wurde jedes *well* mit 100 μl Mineralöl überschichtet, die Platten mit Parafilm dicht verschlossen und zur Archivierung in einer Styroporbox bei -80°C gelagert.

Die Klone der dritten Platte wurden erneut auf drei weitere, nur mit Gelatine beschichteten 96-*well*-Mikrotiterplatten (Flachboden) passagiert, die der späteren DNA-Isolation dienen (3.2.3.6.4). Dafür wurden die Klone bis zur Vollkonfluenz gehalten. Zum Einfrieren dieser Platten wurden die Klone zweimal mit PBS gewaschen und ohne Einfriermedium bei -20°C (bzw. bei -80°C für längere Lagerzeiten) eingefroren. Dabei wurden die Platten mit Parafilm versiegelt.

3.2.3.6.4 Analyse von ES-Zellen auf 96-*well*-Mikrotiterplatten

Die korrekte Integration des transfizierten *Bdp1-targeting*-Konstruktes wurde mittels Southern Blot-Analysen bestimmt (3.2.1.7). Zu diesem Zweck wurden die Klone auf den 96-*well*-Mikrotiterplatten (Flachboden) bei Raumtemperatur aufgetaut und mit je 50 µl/*well* Lysispuffer versehen. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet, mit feuchten Tüchern umwickelt und in einer verschließbaren Dose (=feuchte Kammer) bei 55°C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Nach einstündiger Abkühlung der Platten auf Raumtemperatur wurde zur Präzipitation der DNA jedes *well* mit 100 %igem Ethanol versehen und für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand durch vorsichtiges Invertieren der Mikrotiterplatten entfernt, das DNA-Pellet dreimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und 20-30 min bei 37°C im Inkubator getrocknet. Die anschließende Restriktionsfragmentierung ist unter 3.2.1.7.1 zu entnehmen. Pro *well* wurden 35 µl Gesamtvolumen verwendet. Im Anschluss wurde die fragmentierte DNA von jedem Klon in Southern Blot-Analysen untersucht (3.2.1.7).

3.2.3.6.5 Auftauen und Expandieren von Klonen auf 96-*well*-Mikrotiterplatten

Nachdem die ES-Zellklone in Southern Blot-Analysen als positiv im Hinblick auf die homologe Rekombination mit dem *Bdp1-targeting*-Konstrukt getestet worden waren, wurden diese von den archivierten 96-*well*-Mikrotiterplatten (3.2.3.6.3) aufgetaut. Um Verwechslungen zu vermeiden, wurden parallel die den homolog rekombinanten Klonen benachbarte Klone aufgetaut. Dazu wurden die archivierten Mikrotiterplatten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und der gesamte Inhalt eines *well*s (=resuspendierte Zellen in Einfriermedium und Mineralöl) für 5 min bei 1.200 rpm sedimentiert. Das Öl konnte anschließend vorsichtig mit einer Glaskapillare abgenommen werden. Da das Zellpellet aufgrund der geringen Zelldichte nicht zu erkennen war, wurden die Zellen im Überstand resuspendiert und auf am Tag zuvor beschichtete 24-*well*-Mikrotiterplatten überführt.

Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen auf beschichtete 6-*well*-Mikrotiterplatten passagiert. Von dort aus wurden die Zellen auf je 2x10 cm-Kulturschalen (Gelatine+MMC-behandelte pEB.IL:neo-MEF) transferiert sowie auf je zwei *well* einer gelatinisierten 24-*well*-Mikrotiterplatte. Die Zellen auf den 10 cm-Kulturschalen wurden bei Subkonfluenz zu je $\frac{1}{4}$ Volumen eingefroren (3.2.3.2). Die Zellen auf den 24-*well*-Mikrotiterplatten wurden bis zur Vollkonfluenz belassen und dienten der DNA-Isolation (3.2.3.6.4), um die Ergebnisse der Southern Blot-Analysen zu verifizieren.

3.2.3.6.6 Blastozysteninjektion und -transfer

Die Vorbereitung der ES-Zellen für die Reinjektion in Blastozysten und letztendlich die Implantation dieser in Ammentiere wurde im Zentrum für Mausgenetik des Instituts für Genetik der Universität zu Köln durchgeführt.

3.2.4 Immunhistologische Methoden

3.2.4.1 Fixieren, Einbetten und Schneiden von Gewebe und Embryonen

Um verschiedene Gewebe (3.2.5.6) oder isolierte Embryonen (3.2.5.5.2) vor der Autolyse zu schützen, wurde das Gewebe bzw. wurden die Embryonen in 4 % PFA fixiert. Dies geschah für 1-7 Tage bei 4°C. Um eine optimale Fixierung von Embryonen ab dem Embryonaltag E17.5 p.c. zu gewährleisten, musste die Haut der Tiere vorsichtig mit einer Pinzette entfernt werden, da ansonsten das Fixiermittel nicht komplett eindringen konnte.

Um das fixierte Gewebe im Anschluß mikrometerdünn schneiden zu können, wurde es mit Hilfe eines Gewebeeinfiltrationsautomaten vollautomatisch dehydriert und anschließend in Paraffin infiltriert.

Abschließend wurde das Gewebe eingebettet und die Paraffinblöcke am Rotationsmikrotom geschnitten. Die Schnittdicke betrug 7 μm . Um die Schnittqualität zu erhöhen, wurden die Blöcke vorgekühlt. Die Paraffinschnitte wurden nach dem Schneiden in einem auf 37°C erwärmtes Wasserbad gestreckt und anschließend auf einen Objektträger aufgezogen. Nachdem die Schnitte am Wasserbadrand angetrocknet waren, fand die vollständige Trocknung über Nacht bei 37°C statt.

3.2.4.2 HE-Färbung von Paraffinschnitten

Die HE-Färbung (**H**ämatoxylin, **E**osin) ist eine Übersichtsfärbung, bei der Zellkerne und basophile Substanzen blau, andere Zellbestandteile in verschiedenen Abstufungen rot angefärbt werden.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (Xylol 2 x 15 min, 100 % EtOH 2 min, 96 % EtOH 2 min, 70 % EtOH 2 min, kurz in PBS waschen, Leitungswasser 1 min). Für die Färbung wurde das Hämatoxylin vorab filtriert und das Eosin (200 ml) mit 1 ml konzentrierter Essigsäure aktiviert.

Kernfärbung

- Hämatoxylin 3-6 min
- kurz in Leitungswasser waschen
- Leitungswasser 15 min
- kurz in ddH₂O waschen (bläuen)

Plasmafärbung

- Eosin 30 sek-1 min
- kurz in Leitungswasser

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol geklärt und eingedeckt (70 % EtOH 1 min, 96 % EtOH 1 min, 100 % EtOH 1 min, Xylol 2 x 30 sek, eindecken mit Eukitt).

3.2.4.3 Immunhistologischer Nachweis von Proteinen

Zu Beginn einer immunhistologischen Färbung wurden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und anschließend mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (Xylol 2 x 1 h, 100 % EtOH 2 x 2 min, 96 % EtOH 1 min, 70 % EtOH 1 min, ddH₂O 10 min).

Um Antikörperbindestellen besser zugänglich zu machen, wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in Zitrat-Puffer bei 600 W in der Mikrowelle aufgekocht (thermische Antigen-Demaskierung) und für weitere 45 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach einmaligem 5minütigen Waschen in TBS-Puffer wurden die Präparate zum Absättigen unspezifischer Bindestellen für 45 min bei Raumtemperatur mit der Blocklösung (20 %

Ziegen Serum, 1 % BSA in TBS-Puffer) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Blocklösung wurde direkt auf die einzelnen Schnitte pipettiert. Nach dreimaligem Waschen über je 5 min mit TBS-Puffer wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert (siehe Kapitel 3.1.9, Tabelle 11). Der Antikörper wurde in 3 %igen Milchpulver/TBS-Puffer verdünnt. Als Negativkontrolle diente stets ein Präparat, bei dem die Schnitte nur mit der Hybridisierungslösung inkubiert wurden.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit TBS-Puffer gewaschen und für 30 min mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (3 % Milchpulver/TBS-Puffer) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-Puffer wurden die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur mit einem Avidin-biotinylierten Peroxidase Komplex inkubiert. Dabei wurde das *ABC-kit* nach Herstellerangaben verwendet.

Anschließend wurden die Objektträger dreimal je 5 min mit TBS-Puffer gewaschen, bei jeweils individueller Inkubationszeit mit einer DAB-Färbelösung inkubiert (Anwendung nach Herstellerangaben) und schließlich in TBS-Puffer abgestoppt. Das Prinzip der Färbung beruht auf der spezifischen Bindung von Streptavidin an den biotinmarkierten sekundären Antikörper. Das Streptavidin ist mit einer Peroxidase gekoppelt, welche das in der DAB-Färbelösung enthaltene H_2O_2 spaltet und Protonen freisetzt. Diese reduzieren das DAB-Reagenz, was durch eine bräunliche Färbung sichtbar wird. Abschließend wurden die Schnitte rehydriert, in Xylol geklärt und eingedeckt (3.2.4.2).

3.2.4.4 Immunfluoreszenz Färbungen von murinen embryonalen Fibroblasten

Die Methode der Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Untersuchung der interzellulären Verteilung eines Proteins. Sie beruht auf der Kopplung der sekundären Antikörper mit Fluorophoren, die unter Verwendung von UV-Licht angeregt und mit entsprechenden Filtern am Mikroskop sichtbar gemacht werden können.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) auf gelatinebeschichtete Deckgläschen (rund) in 12-*well*-Mikrotiterplatten ausplattiert (3×10^4 Zellen/*well*) und über Nacht kultiviert (3.2.3.4). Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min in 4 % PFA fixiert. Nach einem einmaligen Waschschriff von 5 min wurden die Zellen für weitere 5 min permeabilisiert (PBS+0,2 % Tween) und zum Absättigen unspezifischer Bindestellen für 45 min mit der Blocklösung bedeckt (PBS+0,2 % Tween+5 % BSA+5 % FKS). Die Inkubation mit dem primären

Antikörper fand (Verdünnung in Blocklösung) in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C statt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für je 15 min in PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung in Blocklösung) in einer feuchten Kammer für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Abschluss wurden die Präparate dreimal für je 15 min in PBS gewaschen, kurz in Leitungswasser geschwenkt und mit *mounting*-Medium eingedeckt.

3.2.5 Arbeiten mit Mäusen

3.2.5.1 Mausexperimente

Sämtliche Arbeiten mit Mäusen wurden nach dem Tierschutzgesetz entsprechend durchgeführt. Für die Tierversuche lag eine Genehmigung und eine Anzeige der Bezirksregierung Köln vor (Aktenzeichen Tierversuchsgenehmigung: 50.203.2-K 38, 13/05, Aktenzeichen Anzeige: 20.10.105).

Die in dieser Arbeit generierten Mauslinien wurden in der SPF-Tierhaltung des Instituts für Genetik der Universität zu Köln gehalten. Die Mäuse wurden mit 3-5 Tieren in einem Mikroisoliationskäfig bei Temperaturen zwischen 22-24°C sowie einen Tag/Nacht-Zyklus von 12 h untergebracht. Für Verpaarungen wurden die Tiere stets 1:1 gehalten, für Verpaarungen mit *plug*-Checks 1:2 (ein Männchen, zwei Weibchen), wobei *plug*-positive Weibchen am kommenden Tag einzeln gesetzt wurden.

3.2.5.2 Generierung verschiedener *Bdp1*-Mauslinien

Als Ausgangslinie für alle in dieser Arbeit generierten *Bdp1*-Linien diente die Linie *Bdp1*^{*f*neo/wt}. Diese waren Nachkommen der chimären Mäuse, die durch die Transfektion des *Bdp1-targeting*-Konstruktes (*pRF-Bdp1*; siehe Kapitel 4.2) in V6.5 ES-Zellen (3.2.3.6.1) und anschließender Injektion von homolog rekombinanten ES-Zellen in Blastozysten (3.2.3.6.2-3.2.3.6.6) generiert wurden.

Durch eine Verpaarung der *Bdp1*^{*f*neo/wt}-Linie mit einer transgenen *Cre-deleter*-Maus (Schwenk et al. 1995) wurde Exon 2 des *Bdp1*-Gens deletiert und somit die *Bdp1*^{ko/wt}-Linie generiert. Da in dieser *Cre*-Linie das Transgen ubiquitär unter der Kontrolle des hCMV-Minimalpromotors exprimiert wird, erfolgte eine ubiquitäre Deletion des geflochtenen *Bdp1*-Exon 2. Durch die Verpaarung von heterozygot deletierten *Bdp1-knockout*-Tieren (*Bdp1*^{ko/wt} x *Bdp1*^{ko/wt}) wurde die homozygote Deletion des *Bdp1*-Gens erreicht (*Bdp1*^{ko/ko}).

Die $Bdp1^{ko/wt}$ -Linie war außerdem Startpunkt für die Untersuchung der $Bdp1$ -Expressionen in Abhängigkeit von Smn -Deletionen. Zu diesem Zweck wurden heterozygote $Bdp1$ -Tiere ($Bdp1^{ko/wt}$) mit einer SMA-Linie verpaart (SMA-Hung, $Smn^{ko/ko}$; $SMN2^{tg/tg}$, siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 13) (Hsieh-Li et al. 2000; Riessland et al. 2010). So generierte Nachkommen ($Bdp1^{ko/wt}$; $Smn^{ko/wt}$; $SMN2^{tg/wt}$) wurden - im Hinblick auf die Homozygotie des Smn -Gens und $SMN2$ -Transgens - untereinander oder erneut mit $Bdp1^{ko/wt}$ -Tieren verpaart.

Um die homozygot gefloxtete $Bdp1$ -Linie zu generieren ($Bdp1^{fl/fl}$), wurde zu Beginn das Neomycin-Resistenzgen, welches der Positivselektion transfizierter ES-Zellklonen diente (3.2.3.6.2) und mit FRT-Stellen flankiert war, mit Hilfe einer Flp-*deleter*-Linie (Rodriguez et al. 2000) deletiert. Das Neomycin-Resistenzgen wurde deletiert, da der starke Promotor die Funktion des $Bdp1$ -Gens und die benachbarter Gene hätte beeinflussen können. Zudem inserierte das Gen mitten im $Bdp1$ -Lokus und hätte so auch *per se* die Genfunktion stören können. Um eine verringerte Keimbahntransmission zu vermeiden, wurde das Neomycin-Resistenzgen erst *in vivo*-deletiert. Die so generierte $Bdp1^{fl/wt}$ -Linie wurde anschließend auf Homozygotie des gefloxteten Allels verpaart ($Bdp1^{fl/fl}$).

Die $Bdp1^{fl/fl}$ -Linie war Ausgangspunkt für die Generierung verschiedener $Bdp1$ -*knockout*-Linien in spezifischen Geweben. So wurde z.B. durch die Verpaarung mit einer transgenen *Nestin-Cre*-exprimierenden Maus eine Deletion des $Bdp1$ -Allels im zentralen Nervensystem (ZNS) erreicht (siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 13) (Tronche et al. 1999). Die *Nestin-Cre*-Linie deletiert spezifisch die Vorläuferzellen von Neuronen und Gliazellen (Mignone et al. 2004).

Alle transgenen Linien (*Cre-deleter*, *Flp-deleter*, *Nestin-Cre*) (siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 13) befanden sich auf C57BL/6NCrI-Hintergrund und wurden im heterozygoten Zustand belassen, um falsch-positive Phänotypen im Hinblick auf die Homozygotie dieser Transgene zu vermeiden. Die Cre-Rekombinase und Flp-Rekombinase wurden nach der Deletion des $Bdp1$ -Allels bzw. des Neomycin-Resistenzgens über weitere Verpaarungen herausgekreuzt.

Alle generierten $Bdp1$ -Linien wurden auf C57BL/6NCrI zurückgekreuzt, da die verwendeten ES-Zellen einen hybriden Hintergrund trugen (V6.5: 50 % C57BL/6, 50 % 129/Sv). Eine Übersicht aller generierten $Bdp1$ -Mauslinien sowie verwendeter transgener Linien ist unter Kapitel 3.1.10, Tabelle 14 zusammengefaßt. Abbildung 8 zeigt ein Ablaufschaubild zur Generierung der verschiedenen $Bdp1$ -Mauslinien.

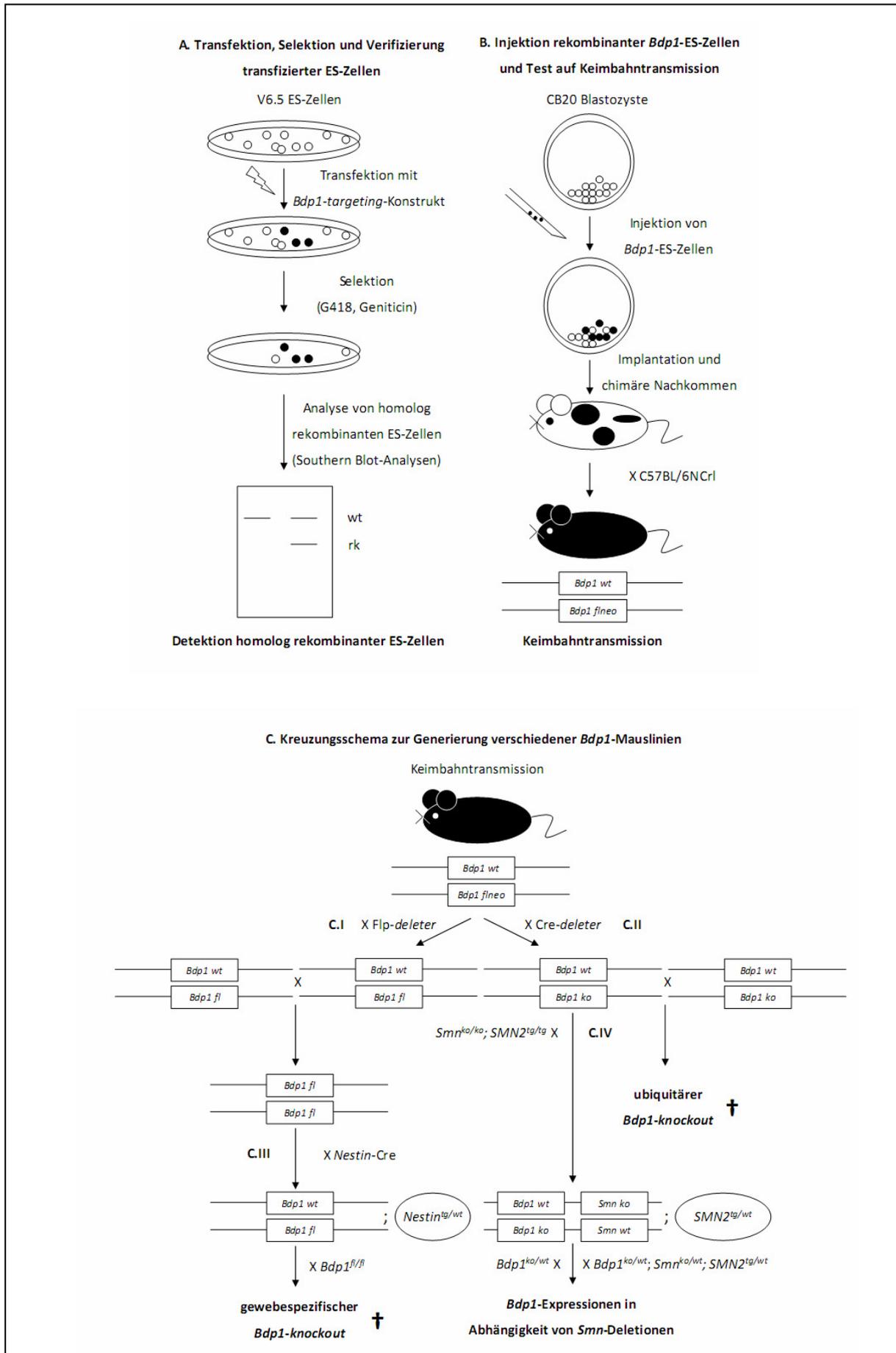


Abbildung 8: Vom *Bdp1-targeting*-Konstrukt zu den verschiedenen *Bdp1*-Mauslinien

(A.) Nach der Transfektion von V6.5-ES-Zellen mit dem *Bdp1-targeting*-Konstrukt wurden mittels Positiv- und Negativselektion homolog rekombinante ES-Zellen angereichert und diese in Southern Blot-Analysen verifiziert.

(B.) Durch die Injektion von positiven ES-Zellen in eine CB20-Blastozyste und anschließender Implantation in eine Ammenmutter wurde chimäre Nachkommen generiert. Wenn rekombinante ES-Zellen zur Bildung der Keimbahnzellen beitrugen (Keimbahntransmission), entstanden bei einer Verpaarung der entsprechenden Chimäre mit einem wildtypischen Tier (C57BL/6NCrl) Nachkommen, die heterozygot das rekombinante *Bdp1*-Allel ($Bdp1^{f/neo/wt}$) trugen. (C.I) Mäuse dieser Ausgangslinie wurden mit einer Flp-*deleter*-Maus (Rodriguez et al. 2000) verpaart, so daß das Neomycin-Resistenzgen deletiert und das gefloxtete *Bdp1*-Allel heterozygot vorlag ($Bdp1^{fl/wt}$). Durch Kreuzung der Tiere untereinander wurden homozygot gefloxtete Tiere generiert ($Bdp1^{fl/fl}$). (C.II) Die $Bdp1^{f/neo/wt}$ -Linie wurde mit einer ubiquitären Cre-*deleter*-Maus (Schwenk et al. 1995) verpaart, so dass ein heterozygoter *knockout* des *Bdp1*-Gens induziert wurde ($Bdp1^{ko/wt}$). Die Interkreuzung dieser Tiere diente der Generierung des homozygoten *Bdp1-knockouts*. Da dieser zur embryonalen Letalität führte, sind die Tiere entsprechend nicht aufgelistet. (C.III) Tiere der $Bdp1^{fl/fl}$ -Linie dienten durch Verpaarung mit entsprechenden spezifischen Cre-Mäusen der Generierung gewebespezifischer *Bdp1-knockouts*. Durch Einkreuzen einer transgenen *Nestin-Cre*-exprimierenden Maus (Tronche et al. 1999) wurde ein *Bdp1-knockout* in den Vorläuferzellen der Neuronen und Gliazellen im gesamten Zentralnervensystem (ZNS) induziert (Mignone et al. 2004). Diese Deletion lag zunächst in heterozygoter Form vor und wurde durch Verpaarung mit $Bdp1^{fl/fl}$ -Mäusen auf Homozygotie gekreuzt. (C.IV) Die $Bdp1^{ko/wt}$ -Linie war Ausgangslinie, um *Bdp1*-Expressionen in Abhängigkeit von *Smn*-Deletionen zu untersuchen. $Bdp1^{ko/wt}$ -Tiere wurden mit SMA-Tieren (Hsieh-Li et al. 2000; Riessland et al. 2010) verpaart, um $Bdp1^{ko/wt}$, $Smn^{ko/wt}$, $SMN2^{tg/wt}$ -Nachkommen zu generieren. Diese wurden entweder – im Hinblick auf Homozygotie des *Smn*-Gens und *SMN2*-Transgens – untereinander oder erneut mit $Bdp1^{ko/wt}$ -Tieren verpaart. Wt: wildtypisch, rk: rekombinant, flneo: gefloxtes *Bdp1*-Allel mit Neomycin-Resistenzgen, fl: gefloxtes *Bdp1*-Allel, ko: *knockout*, tg: Transgen, ES-Zellen: embryonale Stammzellen.

3.2.5.3 Markierung und Genotypisierung von Mäusen

Die Nachkommen einer Verpaarung wurden drei Wochen nach der Geburt von der Mutter nach Geschlecht separiert. Um jede Maus eindeutig zuordnen zu können, wurde jedes Tier mit einer Ohrmarke markiert und parallel eine Schwanzspitzenbiopsie (0,3-0,5 cm) entnommen, welches der Genotypisierung diente (3.2.1.1.1 und 3.2.1.2). Die dafür verwendeten *Primer* sind Kapitel 3.1.7, Tabelle 13 zu entnehmen. Bei erstmaliger Genotypisierung einer Mauslinie wurden die jeweiligen Genotypen zusätzlich mittels Southern Blot-Analysen verifiziert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 6 und 3.2.1.7).

3.2.5.4 Altersbestimmung pränataler Mausembryonen

Um das spezifische embryonale Entwicklungsstadium zu bestimmen, wurden zeitlich kontrollierte Verpaarungen angesetzt. Aufgrund der Nachtaktivität der Mäuse und einem

Tag/Nacht-Zyklus von 12 h geht man davon aus, dass sich die Tiere in der zweiten Nachthälfte verpaaren. Am nächsten Morgen wird das Stattfinden der Begattung anhand des Vorhandenseins von Vaginalpfröpfen festgestellt. Vaginalpfröpfe sind koagulierte Proteine des männlichen Ejakulats, die nach der Kopulation bis zu 24 h lang vorhanden sein können. Weibchen mit vorhandenen Pfröpfen wurden als *plug*-positiv bewertet. Das Embryonalstadium wird an diesem Tag als 0,5 p.c. (E0,5 p.c.) angenommen.

3.2.5.5 Isolation pränataler Mausembryonen

Für die Isolation pränataler Mausembryonen wurden zeitlich kontrollierte Verpaarungen (1:2) angesetzt und am kommenden Morgen ein *plug*-Check durchgeführt (3.2.5.4). *Plug*-positive Weibchen wurden von den Männchen separiert und die Embryonen dann entsprechend dem Embryonaltag präpariert.

3.2.5.5.1 Isolierung von Morulae (E2,5 p.c.) und Blastozysten (E3,5 p.c.)

Zur Isolation von Morulae und Blastozysten wurden Weibchen an den entsprechenden Tagen nach Vorhandensein des *plug* getötet und die Embryonen dem Eileiter entnommen.

Zur Gewinnung von Morulae wurde der Eileiter zusammen mit einem Stück des Uterus abgetrennt, in PBS gesäubert und in M2-Medium überführt. Anschließend wurde eine spitze Kanüle in das *Infundibulum* eingeführt und der Eileiter mit M2-Medium gespült.

Für die Isolation von Blastozysten wurde der gesamte Uterus entnommen und in PBS gelegt. Mit einer Pinzette wurden das Gewebe von Blut und Fett gesäubert und in M2-Medium überführt. Mit dem Medium wurden beide Uterushörner mit Hilfe einer scharfkantigen Kanüle durchgespült. Das Medium wurde tropfenförmig auf eine Petrischale gebracht und unter einem Stereomikroskop auf Morulae bzw. Blastozysten abgesucht. Diese wurden schließlich mit einer feinen Kanüle angesaugt, dreimal in M2-Medium gewaschen und auf gelatinisierte 24-well-Mikrotiterplatten mit M16-Medium überführt. Zur weiteren Analyse wurden Morulae und Blastozysten über ein bis mehrere Tage bei 37°C (5 % CO₂) kultiviert.

3.2.5.5.2 Isolierung älterer Embryonen (E14,5 p.c.-E18,5 p.c.)

Zur Präparation von Embryonen zwischen E14,5 p.c. und E18,5 p.c. wurden trächtige Weibchen an den entsprechenden Tagen getötet, der Uterus entnommen und die Embryonen in PBS überführt. Dabei wurde eine Schwanzspitzenbiopsie für die

Genotypisierung verwendet (3.2.1.1.1). Die Embryonen wurden für Paraffinschnitte fixiert und entsprechend behandelt (3.2.4.1).

3.2.5.6 Präparation von adulten Mäusen und Organentnahme

Nach der Tötung der Tiere wurde die Bauchhöhle geöffnet und die zu analysierenden Organe entnommen. Diese wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die längere Aufbewahrung bei -80°C gelagert. Alternativ konnten die Organe auch direkt weiteraufbereitet werden (z.B. DNA/RNA oder Isolation von Proteinen.)

3.2.6 Statistische Auswertungen

Die Signifikanz von RNA- und Proteinexpressionsdaten unabhängiger Proben wurde mit Hilfe des Studentschen-t-Test (Excel) ermittelt. Dabei wurden folgende Klassen an Signifikanz unterschieden: $P > 0,05$: nicht signifikant (n.s.), $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***)).

Um die prozentuale Verhältnismäßigkeit der beobachteten Genotypen in den Nachkommen von $Bdp1^{ko/wt}$ -Interkreuzungen und $Bdp1^{fl/fl} \times Bdp1^{fl/wt}$; $Nestin^{tg/wt}$ -Verpaarungen mit der der zu erwartenden Genotypen zu vergleichen, wurde ein Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) angewandt.

.

4. Vorarbeiten

Als Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIIB nimmt das BDP1-Protein (Protein ID: NP_060899.2) eine wichtige Funktion in der Initiation der Transkription von RNA Polymerase III-abhängigen Genen ein (Paule and White 2000). Dabei wird die Regulation des TFIIIB-Komplexes sowohl von Onko- als auch von Tumorsuppressorproteinen beeinflusst (Marshall and White 2008).

Das humane *BDP1*-Gen liegt auf dem chromosomalen Abschnitt 5q13 (Kelter et al. 2000) und flankiert die duplizierte SMA-Region telomerisch. Bei Proben von zwei SMA-Patienten (Nr. 353, Nr. 6432) wurden neben der klassischen SMA atypische Symptome diagnostiziert, wobei beide Patienten große Deletionen innerhalb der SMA-Region zeigten. Bei Patient Nr. 353 konnte weiterhin eine *de novo* Deletion nachgewiesen werden, wodurch eine hemizygoten Deletion eines *BDP1*-Allels vorlag. Um eine eventuelle Korrelation des deletierten *BDP1*-Gens und dem Auftreten atypischer SMA Symptome klären zu können, sollte ein Mausmodell generiert werden. In vorangegangenen *knockdown* Experimenten konnte bereits die essentielle Bedeutung des BDP1-Proteins gezeigt werden - entsprechend RNAi behandelte Zellen waren apoptotisch (Dissertation Kelter, 2006).

4.1 Vorarbeiten anderer Arbeitskollegen

Die ersten Arbeitsschritte wurden in der AG Wirth von Frank Schönen durchgeführt. In Kooperation mit Dr. Thorsten Buch (Institut für Genetik, Universität zu Köln) wurde eine Strategie für einen konditionalen *knockout* des *Bdp1*-Gens in der Maus konzipiert (Gene ID: 544971). Diese Strategie beruht auf der Deletion von Exon 2 (*knockout*-Region), was eine Leserasterverschiebung (*frameshift*) im nachfolgenden Exon 3 zur Folge hat. Dadurch bedingt wird ein vorzeitiges Stoppkodon gebildet, was zu einem frühzeitigen Kettenabbruch bei der Proteinsynthese führt und somit zum Funktionsverlust des Bdp1-Proteins. Diese Theorie ist in der nachfolgenden Abbildung 9 schematisch dargestellt.

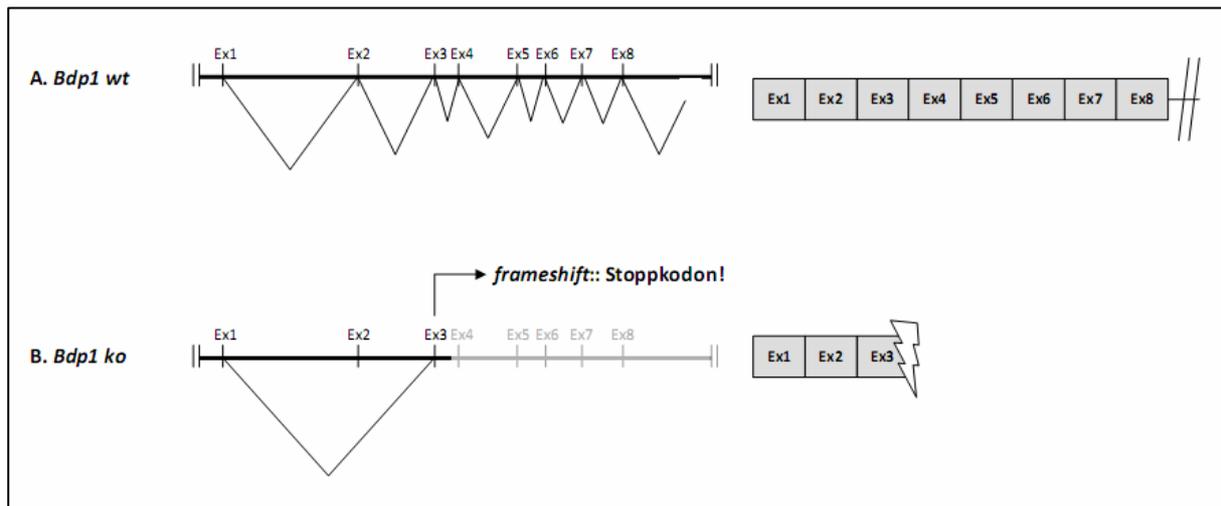


Abbildung 9: Konzept der *Bdp1*-targeting-Strategie

(A.) Genomische Situation des *Bdp1*-Allels von Exon 1 bis Exon 8. Alternativ gespleißte murine Varianten in diesem Bereich sind bisher nicht bekannt. (B.) Konsequenzen eines *knockout* von Exon 2: innerhalb von Exon 3 kommt es zur Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons, was zum frühzeitigen Kettenabbruch bei der Translation führt. Somit kann kein funktionelles *Bdp1*-Protein generiert werden. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, Ex: Exon.

Um die konditionale Deletion des *Bdp1* Exon 2 zu gewährleisten, wurde dieses durch die Klonierung in einen *targeting*-Vektor an den 5'- und 3'-Enden mit loxP-Stellen modifiziert, welche eine Deletion durch die Cre-Rekombinase erlauben. Die benachbarten genomischen Bereiche der zu deletierenden Region (langer Homologiearm: 5'-Box, kurzer Homologiearm: 3'-Box) dienten der homologen Rekombination.

Als Ausgangsvektor für den konditionalen *Bdp1*-*knockout* wurde der schon mehrfach mit Erfolg verwendete pRapidflirt-Vektor (pRF, Anja Brühl und Ari Waisman, unveröffentlicht) verwendet. Dieser trug neben den loxP-Stellen ein Ampicillin-Resistenzgen, welches der Selektion transformierter Bakterien bei den einzelnen Klonierungsschritten diente. Eine FRT-flankiertes Neomycin-Resistenzgen und ein Thymidinkinase-Gen wurden für die Selektion und Anreicherung positiv homolog rekombinanter ES-Zellklone benötigt. Die FRT-Stellen ermöglichten eine spätere *in vivo*-Deletion des Neomycin-Resistenzgens mittels Flp-Rekombinase. In Abbildung 10 ist die gesamte *Bdp1*-*targeting*-Strategie schematisch dargestellt.

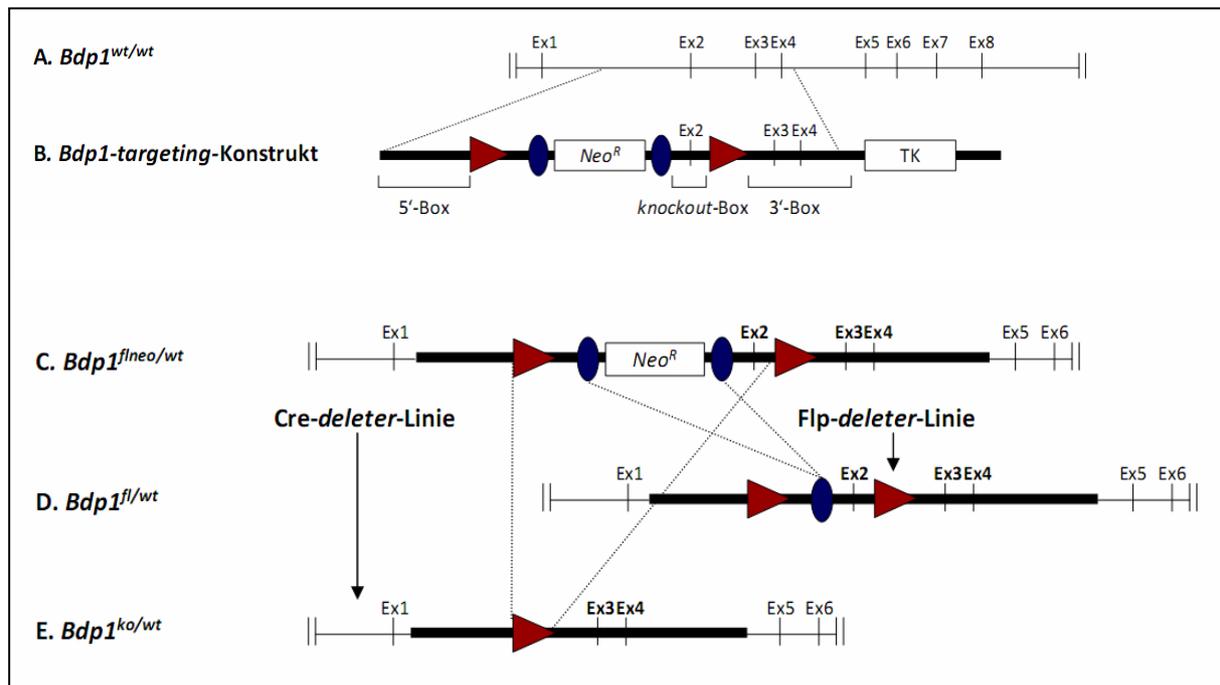


Abbildung 10: *Bdp1*-targeting-Strategie

(A.) Wildtypisches *Bdp1*-Allel von Exon 1 bis Exon 8. (B.) *Bdp1*-targeting-Konstrukt. Die einzelnen Boxen (5'-Box, *knockout*-Box, 3'-Box) sind markiert. Das zu deletierende Exon 2 ist von loxP-Stellen flankiert. Weiterhin befinden sich im Konstrukt das von FRT-Stellen flankierte Neomycin-Resistenzgen für die Positivselektion sowie das Thymidinkinase-Gen für die Negativselektion in ES-Zellen. (C.) Nach erfolgreicher homologer Rekombination und anschließender Kreuzung mit Flp-deleter-Mäusen (D.) kommt es zur Deletion des Neomycin-Resistenzgens. Die so entstehende gefloxtete Linie dient als Ausgangslinie für einen gewebespezifischen *Bdp1*-knockout. (E.) Die Verpaarung mit Cre-deleter-Mäusen führt zur Deletion des gefloxteten Exon 2, was zu einer Leserasterverschiebung in Exon 3 und somit zu einem vorzeitigen Stoppkodon führt. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, flneo: gefloxtes Allel mit Neomycin-Resistenzgen, fl: gefloxtes Allel, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, TK: Thymidinkinase-Gen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen.

Die Homologiearme als auch der zu deletierende Bereich um die *knockout*-Region wurden in Vorarbeiten anderer Kollegen mittels PCR amplifiziert und in TOPO-Vektoren (TOPO XL, TOPO 2.1) zwischenkloniert, wobei ein bereits sequenzierter BAC-Klon (149m19) (Endrizzi et al. 1999) als Matrize diente. Dieser enthielt den genomischen Bereich des *Bdp1*-Gens von Exon 1 bis Exon 11. Als ursprüngliche Matrize für diesen Klon diente isolierte DNA aus der Milz des Mausstammes 129/Sv. Gleichzeitig wurden den Homologiearmen und der *knockout*-Region mit Hilfe von spezifischen *Primern* entsprechende Schnittstellen für Restriktionsenzyme zur Klonierung in den Zielvektor angefügt. Tabelle 18 zeigt eine Übersicht der amplifizierten und in TOPO-Vektoren klonierten Elemente.

Tabelle 18: Amplifizierte und in TOPO-Vektoren klonierte Elemente zur Generierung des *Bdp1-targeting*-Konstruktes

Dargestellt sind die einzelnen Elemente zur Generierung des *Bdp1-targeting*-Konstruktes. Alle Boxen wurden in Vorarbeiten anderer Kollegen mittels PCR amplifiziert und in Zwischenvektoren (TOPOs) eingebracht. Angegeben sind die genomische Lagen und Größen der entsprechenden Boxen, die Zahl der Exons und Introns sowie die *Primer* für die Amplifikation der einzelnen Regionen. Weiterhin sind die entsprechenden Restriktionsenzyme für die Klonierung angegeben sowie die Spender- und Empfängerorganismen. Die so generierten GVOs sind nummeriert.

Element	Genomische Lage (bp) */ Größe (bp)	Exon(s)/ Intron(s)	Primer	Enzym	Spender	Empfänger	GVO# TOPO
5'-Box	544-4593/ 4049	-/ Intron 1	<i>fw</i> 2091 <i>rev</i> 2092	Cla I	PCR- Produkt BAC 149	TOP10-Zellen	TOPO XL # 351 (Klon 29)
<i>knockout</i> - Box	4594-5148/ 549	Exon 2/ Intron 1 und 2	<i>fw</i> 2093 <i>rev</i> 2645	Sal I	PCR- Produkt BAC 149	TOP10-Zellen	TOPO 2.1 # 352 (Klon 32)
3'-Box	5149-9733/ 4584	Exon 3 und 4/ Intron 2, 3 und 4	<i>fw</i> 2095 <i>rev</i> 2096	Xho I	PCR- Produkt BAC 149	TOP10-Zellen	TOPO XL # 353 (Klon 7)

* Die Angaben liegen der genomischen *Bdp1*-Sequenz (NCBI Gene ID: NC_000079) zugrunde.

4.2 Eigene Vorarbeiten

Während meiner Diplomarbeit wurden die weiteren Schritte zur Generierung einer konditionalen *Bdp1-knockout*-Maus durchgeführt. Dazu zählte die Klonierung des entsprechenden *Bdp1-targeting*-Konstruktes (*pRF-Bdp1*), wobei die einzelnen Boxen mit den adäquaten Restriktionsenzymen aus den TOPO-Vektoren isoliert und mit dem entsprechend linearisierten pRF-Vektor ligiert wurden (Tabelle 19 und Abbildung 11). Eine detaillierte Beschreibung dieser Arbeiten sind meiner Diplomarbeit zu entnehmen.

Tabelle 19: In pRF-klonierte Elemente zur Generierung des *Bdp1-targeting*-Konstruktes

Die in Zwischenvektoren klonierten Boxen wurden mittels spezifischer Restriktionsenzyme aus den TOPO-Vektoren ausgeschnitten und in den Zielvektor (pRF) eingebracht. Der kurze Homologiearm (3'-Box) lag bereits im pRF vor. Die so generierten GVOs sind nummeriert.

Element	Genomische Lage (bp) */ Größe (bp)	Exon(s)/ Intron(s)	Enzym	Spender	Empfänger	GVO# pRF
3'-Box	5149-9733/ 4584	Exon 3 und 4/ Intron 2, 3 und 4	Xho I	Xho I, 3'-Box aus TOPO XL-Vektor	<i>DH5α</i> -Zellen	pRF # 354 (Klon 19)
knockout- Box+3'- Box	4594-9733/ 5134	Exon 2, 3 und 4/ Intron 1, 2, 3 und 4	Sal I	Sal I, <i>knockout</i> -Box aus TOPO 2.1-Vektor	<i>DH5α</i> -Zellen	pRF # 355 (Klone 1,7 und 16)
5'-Box+ knockout- Box+3'- Box	544-9733/ 9189	Exon 2, 3 und 4/ Intron 1, 2, 3 und 4	Cla I	Cla I, 5'-Box aus TOPO XL-Vektor	<i>NEB5α</i> - Zellen	pRF # 356 (Klone 4, 5, 6[1], 9 und 12)

* Die Angaben liegen der genomischen *Bdp1*-Sequenz (NCBI Gene ID: NC_000079) zugrunde.

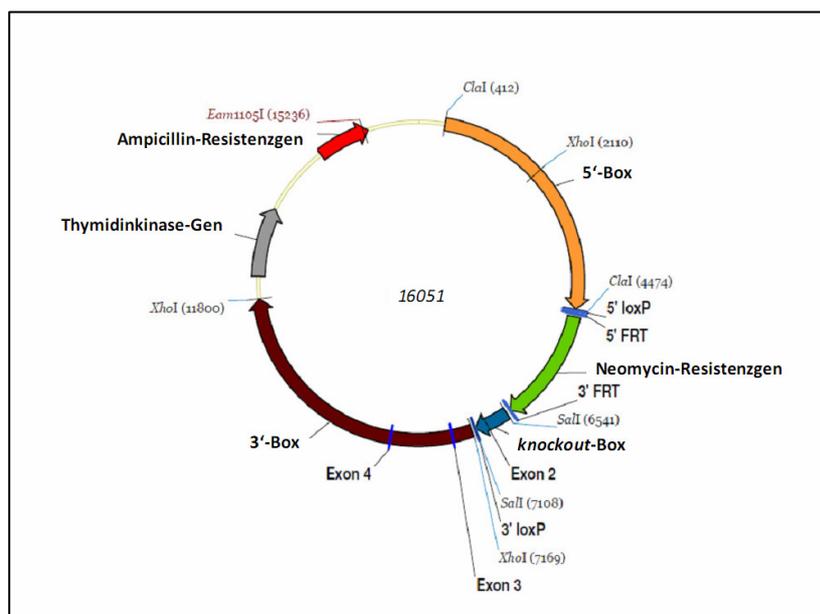


Abbildung 11: *Bdp1-targeting*-Konstrukt

Komplett kloniertes *Bdp1-targeting*-Konstrukt (16051 bp): pRF-Vektor (6869 bp); 5'-Box: orange (4049 bp), *knockout*-Box: blau (549 bp) mit Exon 2, flankiert von loxP-Stellen; 3'-Box: braun (4584 bp), mit Exon 4 und Exon 5; Neomycin-Resistenzgen: grün, flankiert von FRT-Stellen; Thymidinkinase-Gen: grau, Ampicillin-Resistenzgen: rot. Desweiteren sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme für die Klonierung (5'-Box: Cla I, *knockout*-Box: Sal I, 3'-Box: Xho I) sowie die Schnittstelle für die Linearisierung des Vektors (Eam1105 I) dargestellt. Die Abbildung (VNTI) stammt aus meiner Diplomarbeit.

Das *Bdp1-targeting*-Konstrukt (*pRF-Bdp1*) wurde nach verschiedenen Verifizierungsschritten in murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transfiziert. Für die Verifizierung wurde eine Strategie zur Detektion positiv rekombinanter ES-Zellklone entwickelt. Dazu zählte die methodische Etablierung geeigneter Sonden, durch die eine homologe Rekombination in Southern Blot-Analysen detektiert werden konnte (Abbildung 12).

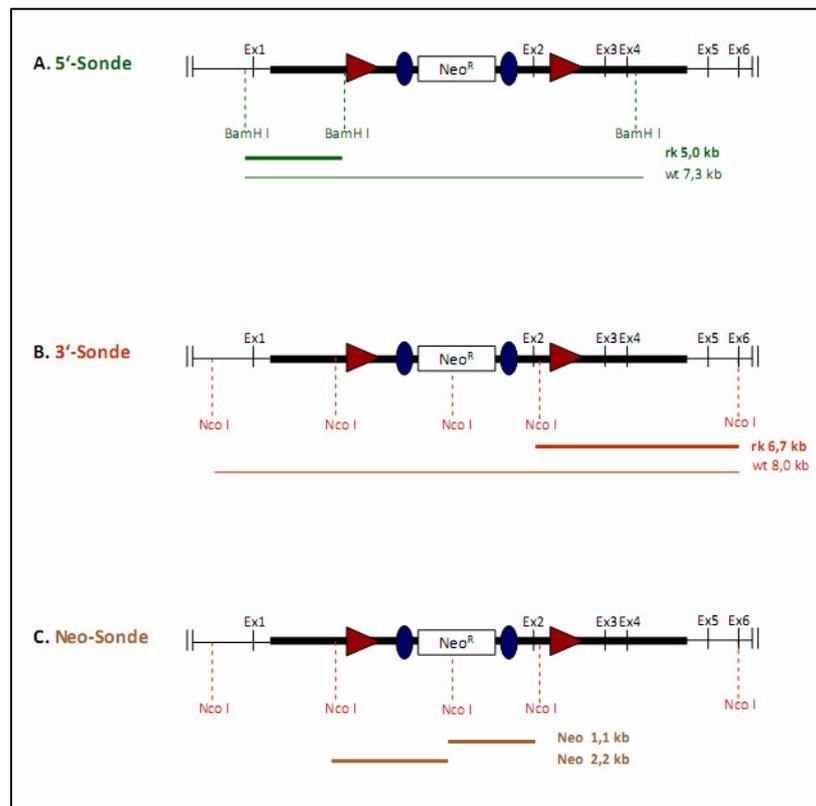


Abbildung 12: Strategie zur Detektion homolog rekombinanter *Bdp1*-ES-Zellklone mittels Southern Blot-Analysen

(A.) Für die Verwendung der 5'-Sonde (grün) wurde die ES-Zell-DNA mit BamH I, im Fall der (B.) 3'-Sonde (rot) mit Nco I, inkubiert. Die Schnittstellen sind sowohl vor als auch nach der Rekombination angegeben. Anschließend wurde die fragmentierte DNA auf einem Agarosegel separiert, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den spezifischen Sonden hybridisiert. Positive Klone zeigen jeweils zwei Fragmentbanden (BamH I: rk 5,0 kb, wt 7,3 kb; Nco I: rk 6,7, wt 8,0 kb) und sind somit heterozygot für das geflochte *Bdp1*-Allel. Für die Hybridisierung mit der (C.) Neo-Sonde (braun) konnte der Nco I-*blot* mit der Neo-Sonde rehybridisiert werden. Wt: wildtypisch, rk: rekombinant, Ex: Exon, *Neo^R*: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen, Restriktionsschnittstellen: gestrichelte Linien.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden drei ES-Zellklone als positiv im Hinblick auf eine homologe Rekombination mit dem *Bdp1-targeting*-Konstrukt identifiziert (*Bdp1*^{f^{neo}/wt}-ES-Zellen, V6.5). Anschließend wurde einer dieser Klone expandiert und Blastozysten der Mauslinie CB20 injiziert. Diese wurden in Anschluss in die Uteri scheinträchtiger Mäuse transferiert. Insgesamt wurden 24 Jungtiere geboren, von denen sieben am Ende meiner Diplomarbeit als chimär identifiziert wurden. An diesem Punkt beginnt die hier vorliegende Doktorarbeit.

5. Ergebnisse

5.1 *Screening* von chimären Nachkommen

Zu Beginn meiner Doktorarbeit standen sieben chimäre Mäuse zur Verfügung, die durch die Injektion homolog rekombinanter embryonaler Stammzellen in CB20-Blastozysten generiert wurden (*Bdp1*^{flneo/wt}-ES-Zellen, V6.5). Eine Vererbung des rekombinanten *Bdp1*-Allels war nur möglich, wenn die rekombinanten ES-Zellen zur Ausbildung von Keimzellen beitrugen (Keimbahntransmission). Um dies zu überprüfen, wurden die Tiere mit wildtypischen C57BL/6NCrl-Tieren verpaart. Die Genotypen der Nachkommen wurden mit einer spezifischen PCR für das rekombinante *Bdp1*-Allel überprüft (3.2.1.2) (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Dabei diente ein Schwanzspitzenbiopsat der DNA-Isolation (3.2.1.1.1). Bei acht Würfen einer jeden Verpaarung konnte keine Keimbahntransmission nachgewiesen werden. Somit wurde davon ausgegangen, dass die rekombinanten ES-Zellen nicht zur Ausbildung der Keimzellen beigetragen hatten. Aus diesem Grund wurde eine erneute Transfektion des *Bdp1-targeting*-Konstruktes in V6.5 ES-Zellen vorgenommen.

Wie unter 4.2 beschrieben, wurde das *Bdp1-targeting*-Konstrukt mittels Sequenzierung und Testrestriktionen verifiziert. Für eine erneute Transfektion wurden pro Ansatz je 40-50 µg des *targeting*-Vektors mit dem Restriktionsenzym Eam1105 linearisiert, das Plasmid aufgereinigt und V6.5 ES-Zellen damit transfiziert (3.2.3.6.1). Nach den verschiedenen Selektionsschritten (Positivselektion: G418, Negativselektion: Ganciclovir) (3.2.3.6.2) wurden verbleibende ES-Zellklone isoliert, expandiert (3.2.3.6.3) und homolog rekombinante Klone mittels Southern Blot-Analysen detektiert (3.2.3.6.4) (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 6).

Insgesamt wurden 480 Klone mittels Southern Blot-Analysen untersucht. Dazu wurde zu Beginn von allen Klonen die ES-Zell-DNA isoliert, mit Nco I fragmentiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Detektion homolog rekombinanter Klone mit Hilfe der 3'-Sonde. Dabei wurden drei Klone als positiv identifiziert (#A6, #B3, #G8,). Um Verwechslungen auszuschließen, wurden diese zusammen mit den jeweils direkt benachbarten Klonen expandiert (3.2.3.6.5). Alle expandierten Klone wurden erneut in Southern Blot-Analysen mit der 5', 3'- und der Neo-Sonde verifiziert (Abbildung 13). Dabei wurden die zuvor genannten ES-Zellklone als

eindeutig positiv im Hinblick auf eine homologe Rekombination identifiziert. Diese zeigten sowohl das wildtypische (5'-Sonde: 7,3 kb; 3'-Sonde: 8,0 kb) als auch das rekombinante Signal (5'-Sonde: 5,0 kb; 3'-Sonde: 6,4 kb). Negative Klone hingegen zeigten nur eine wildtypische Bande. Gleichzeitig konnte eine nicht-homologe Rekombination bzw. eine Mehrfachinsertion ausgeschlossen werden, da diese Klone nach der Hybridisierung mit der Neo-Sonde die exakten Fragmentgrößen aufwiesen (2,2 kb; 1,1 kb).

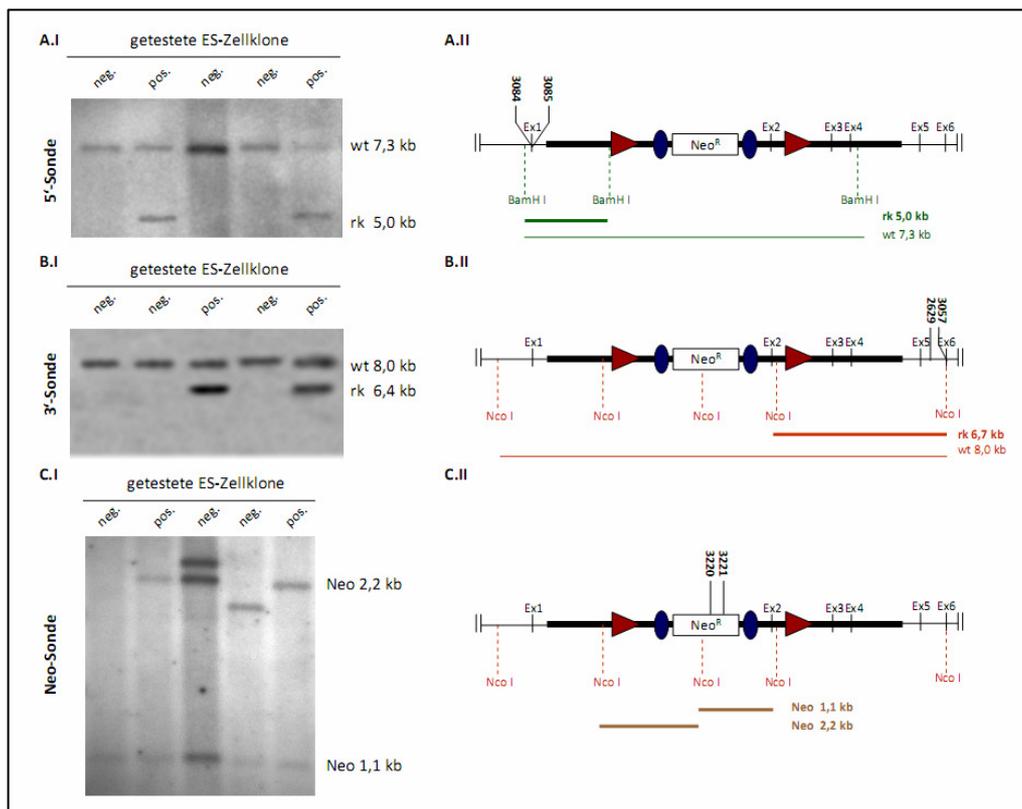


Abbildung 13: Identifizierung und Verifizierung homolog rekombinanter ES-Zellklone

(A.I) Mit BamH I-fragmentierte und transferierte ES-Zell-DNA, die Membran wurde mit der 5'-Sonde hybridisiert. Positiv identifizierte Klone zeigen ein wildtypisches (7,3 kb) und ein rekombinantes Signal (5,0 kb). **(A.II)** Southern Blot-Strategie und *Primer* (3084/3085) der 5'-Sonde. Die Fragmentgrößen sind mit grünen Linien dargestellt. **(B.I)** Mit Nco I-fragmentierte und transferierte ES-Zell-DNA, die Hybridisierung erfolgte mit der 3'-Sonde. Positiv identifizierte Klone zeigen ein wildtypisches (8,0 kb) und ein rekombinantes Signal (6,4 kb). **(B.II)** Southern Blot-Strategie und *Primer* (2629/3057) der 3'-Sonde. Die Fragmentgrößen sind mit roten Linien dargestellt. **(C.I)** Die Membran mit Nco I-fragmentierter ES-Zell-DNA wurde mit der Neo-Sonde rehybridisiert. Korrekt homolog rekombinante Zellen zeigen ein 2,2 kb- und ein 1,1 kb-Fragment. **(C.II)** Southern Blot-Strategie und *Primer* (3220/3221) der Neo-Sonde. Die Fragmentgrößen sind mit braunen Linien dargestellt. Wt: wildtypisch, rk: rekombinant, pos.: positiver Klon, neg.: negativer Klon, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen, Restriktionsschnittstellen: gestrichelte Linien.

5.2 Injektion homolog rekombinanter ES-Zellen in Blastozysten und Generierung chimärer Mäuse

Die unter 5.1. positiv identifizierten ES-Zellklone #A6 und #G8 wurden expandiert (3.2.3.6.5) und in CB20-Blastozysten injiziert (3.2.3.6.6). Dabei wurden die homolog rekombinanten ES-Zellen in 87 CB20-Blastozysten injiziert und abschließend in scheinträchtige Weibchen transplantiert. Von insgesamt 12 Jungtieren wurden zehn als chimär identifiziert. Dabei wurde der Grad des Chimärismus anhand der Fellfarbe bestimmt. Dies war möglich, da die verwendeten ES-Zellen von dunkelfarbigem, die Blastozysten für die Injektion jedoch von weißfarbigem Mäusen abstammten. Alle dunklen Farbanteile im Fell der chimären Tiere stammten somit von den rekombinanten ES-Zellen. Anhand dieser Kriterien wurde der Grad des Chimärismus der 12 Nachkommen zwischen 25 % und 85 % abgeschätzt (siehe Kapitel 5.3, Abbildung 14A).

5.3 Identifizierung einer Keimbahntransmission und Verifizierung des rekombinanten *Bdp1*-Allels

Um eine Keimbahntransmission in den chimären Nachkommen nachzuweisen, wurden diese - unabhängig vom Geschlecht oder vom Grad des Chimärismus - mit wildtypischen C57BL/6NCrl-Tieren verpaart. Von allen Nachkommen dieser Verpaarungen wurde im Absatzalter DNA aus den Schwanzspitzen isoliert und mit einer für das rekombinante *Bdp1*-Allel spezifischen PCR überprüft (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Bei der DNA von Tieren mit rekombinantem *Bdp1*-Allel wurde ein Fragment von 659 bp amplifiziert (Abbildung 14B). Da die beschriebene PCR nur das rekombinante Allel amplifizierte, wurde die Qualität der DNA mit Hilfe einer Kontroll-PCR überprüft, welche die *knockout*-Region des *Bdp1*-Allels von 567 bp amplifizierte (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4 und Kapitel 11, Abbildung 40). Als Positivkontrolle diente isolierte DNA der homolog rekombinanten ES-Zellen. Da chimäre Tiere sowohl wildtypische als auch rekombinante Keimzellen bilden können, müssen für eine sichere Aussage mehrere Generationen an Nachkommen in Hinblick auf das rekombinante Allel genotypisiert werden. Eine Fellfarbenselektion war aufgrund des genetischen Hintergrundes der V6.5 ES-Zellen (C57BL/6, 129/Sv) nicht möglich.

Bei insgesamt vier chimären Nachkommen (♂594 [45 %], ♂597 [70%], ♂598 [65%], ♂599 [65%]) konnte mittels PCR eine Keimbahntransmission des rekombinanten *Bdp1*-Allels

nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden der Genotyp dieser Tiere in Southern Blot-Analysen verifiziert. Nach der Hybridisierung mit der 5'- und 3'-Sonde wurde sowohl das wildtypische (5'-Sonde: 7,3 kb, 3'-Sonde: 8,0 kb) als auch das rekombinante Allel (5'-Sonde: 5,0 kb, 3'-Sonde: 6,4 kb) detektiert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 6) (Abbildung 14C und 14D).

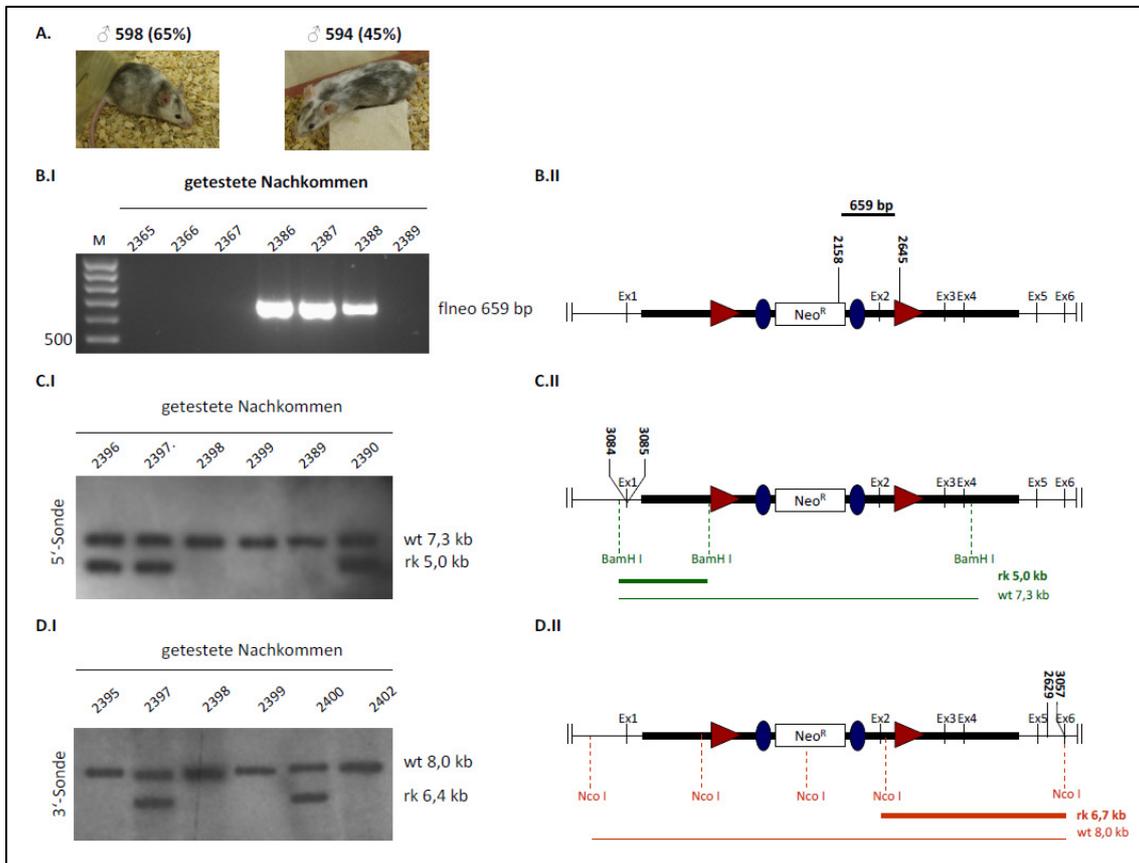


Abbildung 14: Identifizierung und Verifizierung einer Keimbahntransmission

(A.) Beispiele zwei chimärer Nachkommen mit einem unterschiedlichen Grad an Chimärismus (#598: 65 %, #594: 45 %). **(B.I)** Auf einem Agarosegel separierte PCR-Produkte zur Identifizierung einer Keimbahntransmission des rekombinanten *Bdp1*-Allels. Dabei wurden die *Primer* 2158/2645 verwendet, welche ein Produkt von 659 bp amplifizieren. **(B.II)** PCR-Strategie zur Detektion einer Keimbahntransmission. **(C.I+D.I)** Ausschnitte von Autoradiographien verschiedener Southern Blot-Analysen zur Verifizierung des Genotyps. Die DNA der Tiere wurde entweder mit **(C.I)** BamH I oder **(D.I)** Nco I fragmentiert und nach Transfer auf eine Membran mit der **(C.II)** 5'-Sonde (*Primer* 3084/3085) bzw. mit der **(D.II)** 3'-Sonde (*Primer* 2629/3057) hybridisiert. Tiere mit einer Keimbahntransmission zeigen sowohl das wildtypische (BamH I: 7,3 kb, Nco I: 8,0 kb) als auch das rekombinante Signal (BamH I: 5,0 kb, Nco I: 6,4 kb). Wt: wildtypisch, rk: rekombinant, pos.: positiv im Hinblick auf eine Keimbahntransmission, neg.: negativ im Hinblick auf eine Keimbahntransmission, M: Marker. Wt: wildtypisch, rk: rekombinant, pos.: positiver Klon, neg.: negativer Klon, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen, Restriktionsschnittstellen: gestrichelte Linien.

Diese Tiere mit dem Genotyp $Bdp1^{flneo/wt}$ dienten als Ausgangslinie für alle in dieser Arbeit generierten $Bdp1$ -Linien. Aufgrund der verwendeten konditionalen *targeting*-Strategie konnte sowohl ein ubiquitärer als auch ein gewebespezifischer *knockout* des $Bdp1$ -Gens induziert werden (siehe Kapitel 4.1, Abbildung 10).

5.4. Generierung eines ubiquitären heterozygoten $Bdp1$ -*knockouts*

Ein Mausmodell mit einer ubiquitären Deletion des $Bdp1$ -Allels sollte den möglichen Zusammenhang zwischen dem $BDP1$ -Gen und der atypischen Form der spinalen Muskelatrophie (SMA) aufklären. Die unter 5.3 beschriebene $Bdp1^{flneo/wt}$ -Linie diene als Ausgangslinie für die Generierung des ubiquitären $Bdp1$ -*knockouts*.

Aufgrund des verwendeten *targeting*-Vektors pRapidflirt (pRF) wurde die zu deletierende Region (Neomycin-Resistenzgen und Exon 2) von loxP-Stellen flankiert, wobei eine Deletion über die Cre-Rekombinase induziert werden konnte. Aus diesem Grund wurden $Bdp1^{flneo/wt}$ -Tiere mit transgenen Cre-*deleter*-Mäusen verpaart, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines hCMV-Minimalpromotors ubiquitär exprimieren (siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 14) (Schwenk et al. 1995).

Mittels PCR wurde die DNA der Nachkommen der beschriebenen Verpaarung untersucht (Abbildung 15A) (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Dabei wurde sowohl die *knockout*-Region amplifiziert als auch das Vorhandensein der Cre-Rekombinase untersucht. Tiere, welche das Cre-Transgen trugen, waren heterozygot in Hinblick auf den $Bdp1$ -*knockout* ($Bdp1^{ko/wt}$) und zeigten sowohl eine *knockout*- (570 bp) als auch eine wildtypische (1031 bp) Bande. Bei diesen Tieren wurde der gesamte loxP-flankierte Bereich deletiert.

Im weiteren Verlauf wurde der Genotyp dieser heterozygoten *knockout*-Mäuse in Southern Blot-Analysen verifiziert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 6) (Abbildung 15B). Dafür wurde die DNA dieser Tiere mit dem Restriktionsenzym Nde I fragmentiert, separiert und nach dem Transfer auf eine Membran mit einer spezifischen *knockout*-Sonde hybridisiert. Tiere mit einem heterozygot deletierten $Bdp1$ -Allel zeigten sowohl das wildtypische (4,7 kb) als auch das *knockout*-Signal (4,3 kb). Wurde die Region nicht deletiert, d.h. wenn keine Cre-Rekombinase vorhanden war, konnte sowohl das gefloخته Allel mit dem Neomycin-Resistenzgen (6,9 kb) als auch das wildtypische Signal (4,7 kb) detektiert werden. So generierte heterozygote $Bdp1$ -*knockout*-Tiere wurden im weiteren Verlauf mit wildtypischen

Mäusen (C57BL/6NCrl) verpaart, um heterozygot deletierte Mäuse ohne Cre-Transgen zu generieren.

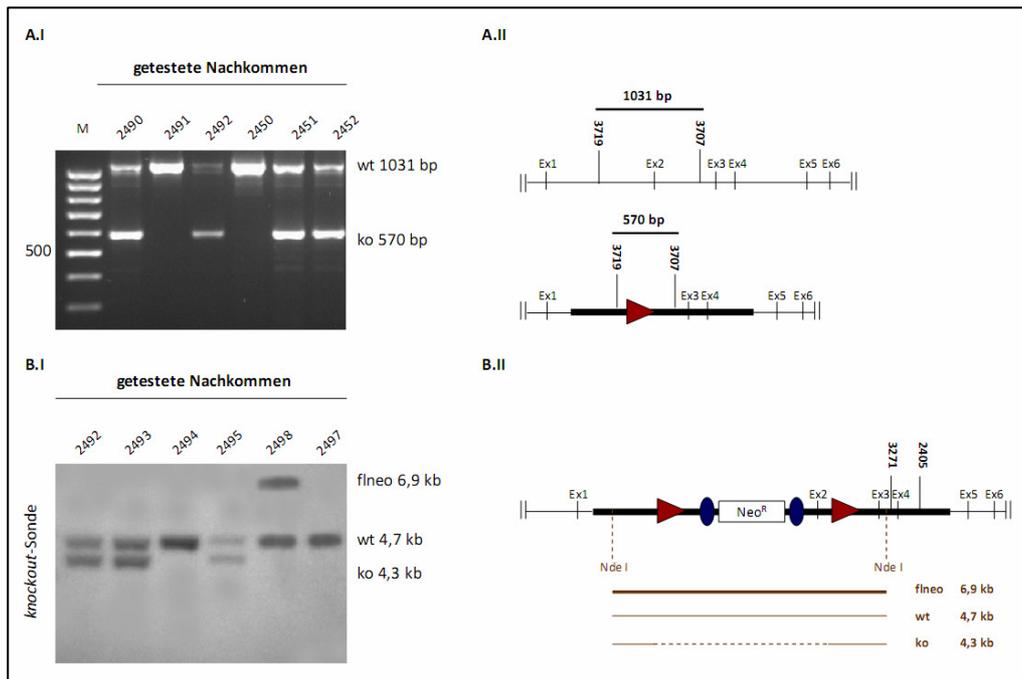


Abbildung 15: Identifizierung und Verifizierung von ubiquitären *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

(A.I) Auf einem Agarosegel aufgetrennte PCR-Produkte zur Identifizierung des deletierten *Bdp1*-Allels mit Hilfe der Primer 3719/3707. Bei heterozygoten Tieren wird sowohl das wildtypische (1031 bp) als auch ein *knockout*-Fragment (570 bp) amplifiziert. **(A.II)** PCR-Strategie zur Identifizierung eines heterozygoten *Bdp1*-*knockouts*. **(B.I)** Autoradiographie von Southern Blot-Analysen zur Verifizierung des deletierten *Bdp1*-Allels mit Hilfe einer spezifischen *knockout*-Sonde (Primer 3271/2405). Dabei wird die DNA mit Nde I fragmentiert und auf eine Membran transferiert. **(B.II)** Southern Blot-Strategie für die *knockout*-Sonde. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, flneo: gefloxtes Allel mit Neomycin-Resistenzgen, M: Marker, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen, Restriktionsschnittstellen: gestrichelte Linien.

5.4.1 Analysen heterozygoter *Bdp1*-*knockouts*

In unserem Patientenkollektiv befinden sich Proben von zwei Patienten, die zusätzlich zur SMA eine Gehirnatrophie entwickelt hatten. Eine Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens könnte ursächlich für die atypischen Symptome gewesen sein. Tiere mit einem heterozygot deletierten *Bdp1*-Allel (*Bdp1*^{ko/wt}) hingegen zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. Bei insgesamt 180 heterozygoten Nachkommen wurde weder eine verminderte Lebenserwartung noch eine Fertilitätsreduktion festgestellt.

5.4.1.1 Genexpressionsanalysen von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

Obwohl der Phänotyp von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren nicht dem Phänotyp der zwei beschriebenen SMA-Patienten entsprach und somit die Hypothese, dass eine Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens ursächlich für die Ausbildung einer Gehirnatrophie gewesen war, widerlegt wurde, bot das Mausmodell Möglichkeiten, die Funktionen des *Bdp1*-Gens *in vivo* zu untersuchen.

Das BDP1-Protein nimmt als eine von drei Untereinheiten des Transkriptionsfaktor TFIIB-Komplexes (BDP1, TBP, BRF1/BRF2) eine wichtige Funktion in der Rekrutierung der RNA Polymerase III (RNA Pol III) an den Initiationskomplex ein. TFIIB selbst wird von dem Faktor TFIIC102, einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIC, an die Promotorregion rekrutiert (Paule and White 2000). Weiterhin wird der gesamte TFIIB-Komplex sowohl von Onko- als auch von Tumorsuppressorproteinen beeinflusst (Marshall and White 2008). Proteine wie ERK und MYC wirken stimulierend auf den TFIIB-Komplex und somit positiv auf die Transkription RNA Pol III-abhängiger Gene. Repressoren wie RB und p53 hingegen haben auf den gesamten Komplex eine inhibierende Wirkung (siehe Kapitel 1.1.4, Abbildung 3).

Um die Auswirkungen einer heterozygoten *Bdp1*-Deletion näher zu untersuchen, wurde RNA aus *Cerebrum* und *Cerebellum* (3.2.1.8.1) sowohl von zwei wildtypischen (*Bdp1*^{wt/wt}) als auch von fünf heterozygot deletierten *Bdp1*-Mäusen (*Bdp1*^{ko/wt}) isoliert. Der Genotyp der Tiere wurde vorab mittels PCR bestimmt (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Mit Hilfe von quantitativen *Realtime*-Analysen (3.2.1.11) wurden die Transkriptmengen aller Proteine des TFIIB Komplexes (*Tbp*, *Brf1*, *Bdp1*), die ausgewählter Interaktionspartner (*TFIIC102*, *Erk*, *Myc*, *p53*, *Rb*) und von zwei Kontrollgenen (β -Aktin, *Gapdh*) bestimmt und zu *Rplp0* (*ribosomal protein large P0*) relativiert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 7) (Abbildung 16).

Die Ergebnisse der quantitativen *Realtime*-Analysen für den TFIIB-Komplex zeigten eine signifikante Reduktion der Expression von *Bdp1* sowohl im *Cerebrum* als auch im *Cerebellum* (50 %) von heterozygoten *Bdp1*-knockout-Tieren (*Bdp1*^{ko/wt}) (Abbildung 16A und 16B). Die Transkriptmengen der weiteren TFIIB-Untereinheiten *Brf1* und *Tbp* waren im *Cerebrum* von heterozygoten Tieren im Vergleich zu Wildtypen unverändert (Abbildung 16A). Im Gegensatz dazu wurde im *Cerebellum* eine verminderte Genexpression der TFIIB-Untereinheit *Tbp* von 40 % gemessen (Abbildung 16B).

Bei den Analysen der Interaktionspartner wurden teilweise quantitative Unterschiede an Transkriptmengen sowohl im *Cerebrum* als auch im *Cerebellum* festgestellt (Abbildung 16C und 16D). Der Faktor *TFIIC102* zeigte im *Cerebrum* eine schwache Reduktion der

Expression auf 80 %. Im Gegensatz dazu wurde im *Cerebellum* eine Transkriptmenge von 40 % detektiert. Bei den Onkogenen *Erk* und *Myc* wurden unterschiedliche Transkriptmengen in den untersuchten Geweben gemessen. Im *Cerebrum* von heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren wurde eine *Erk*-Expression von 70 %, im *Cerebellum* von 40 % detektiert. Im Gegensatz dazu wurde im *Cerebrum* heterozygoter *knockout*-Tiere eine um 20 %-erhöhte Expression von *Myc* gemessen, im *Cerebellum* hingegen wurde eine Abnahme auf 80 % detektiert. Die Tumorsuppressorgene *p53* und *Rb* zeigten sowohl im *Cerebrum* als auch im *Cerebellum* von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren eine Abnahme der Expression auf 70 % bzw. 40 %. Als Kontrollgene wurden β -Aktin und *Gapdh* verwendet, deren Transkriptmengen bei beiden Genotypen unverändert waren (Abbildung 16E und 16F).

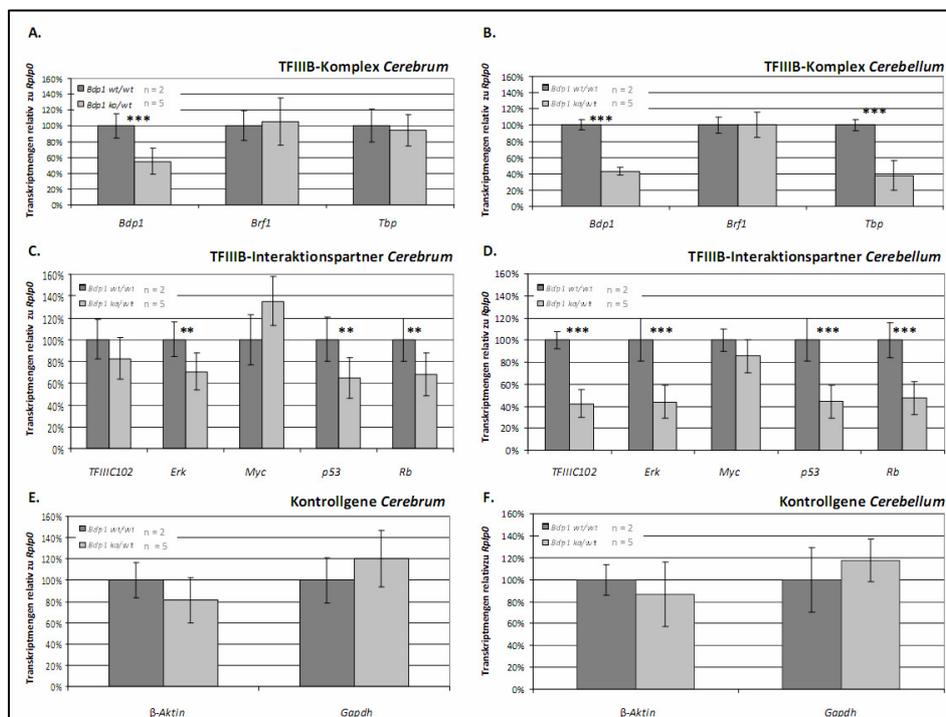


Abbildung 16: Quantitative *Realtime*-Analysen von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

Ergebnisse quantitativer *Realtime*-Analysen von *Cerebrum* (A.+C.+E.) und *Cerebellum* (B.+D.+F.) wildtypischer (*Bdp1*^{wt/wt}, n=2) und heterozygoter (*Bdp1*^{ko/wt}, n=5) Mäuse. Die Messungen erfolgten in Triplikaten und die Transkriptmengen wurden zu *Rplp0* relativiert. (A.+B.) Gemessene Transkriptmengen der TFIIIB-Untereinheiten (*Bdp1*, *Brf1* *Tbp*) im *Cerebrum* und *Cerebellum*. Dabei ist in *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren eine signifikante Abnahme der *Bdp1*-Transkriptmenge von 50 % zu erkennen. *Tbp* zeigt im *Cerebellum* eine Abnahme der Expression auf 40 %. (C.+D.) Gemessene Transkriptmengen der TFIIIB-Interaktionpartner (*TFIIIC102*, *Erk*, *Myc*, *p53*, *Rb*) im *Cerebrum* und *Cerebellum*. Mit Ausnahme von *Myc* sind bei *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren Herunterregulationen der Transkriptmengen zwischen 40 % und 80 % zu erkennen. (E.+F.) Gemessene Transkriptmengen der Kontrollgene β -Aktin und *Gapdh* im *Cerebrum* und *Cerebellum*. Die Säulenfarben markieren die unterschiedlichen Genotypen. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, Signifikanzklassen: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001.

5.4.1.2 Genexpressionsanalysen muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Um die Ergebnisse aus 5.4.1.1 in einem homogenen Zellsystem zu verifizieren, wurden MEF von *Bdp1*^{wt/wt}- (n=2) und *Bdp1*^{ko/wt}-Mäusen (n=4) generiert, kultiviert (3.2.3.4) und die Genotypen mittels PCR bestimmt (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Für die Expressionsanalysen wurde RNA aus Zellen isoliert (3.2.1.8.2) und mit Hilfe quantitativer *Realtime*-Analysen die Transkriptmengen der Proteine des TFIIIB Komplexes, die ausgewählter Interaktionspartner und von zwei Kontrollgenen bestimmt und zu *Rplp0* relativiert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 7) (Abbildung 17).

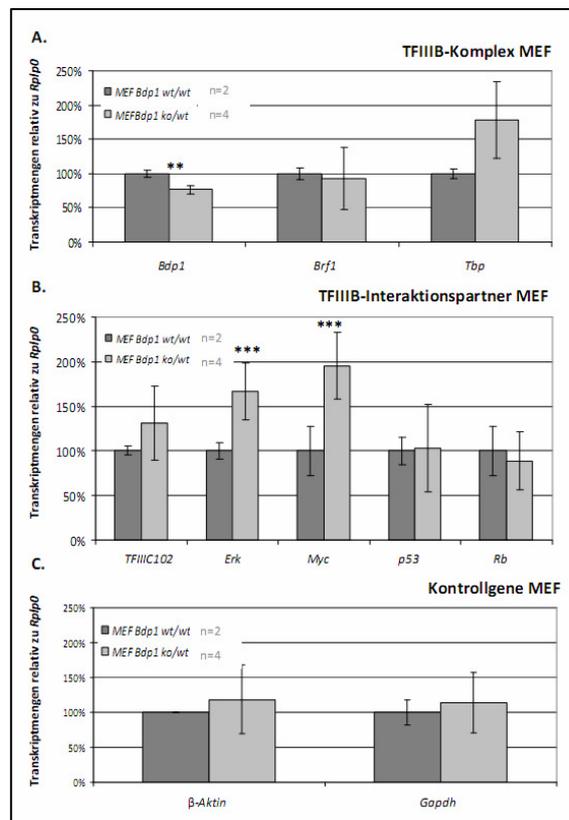


Abbildung 17: Quantitative *Realtime*-Analysen von *Bdp1*^{wt/wt}- und *Bdp1*^{ko/wt}-MEF

Ergebnisse quantitativer *Realtime*-Analysen von wildtypischen (n=2) und heterozygot deletierten MEF (n=4) für die Untereinheiten des TFIIIB-Komplexes (*Bdp1*, *Brf1*, *Tbp*), die der Interaktionspartner (*TFIIIC102*, *Erk*, *Myc*, *p53*, *Rb*) und der Kontrollgene (*β-Aktin*, *Gapdh*) (A.–C.). Die Messungen erfolgten in Triplikaten und die Transkriptmengen wurden zu *Rplp0* relativiert. (A.) Für die TFIIIB-Untereinheit *Bdp1* ist eine signifikante Abnahme der Expression auf 70 %, für *Tbp* eine um 70 %-erhöhte Transkriptmenge zu erkennen. (B.) Mit Ausnahme von *p53* und *Rb* zeigen die Interaktionspartner einen Anstieg der Expression um 30 % bis 90 %, welche für *Erk* und *Myc* signifikant sind. (C.) Gemessene Transkriptmengen der Kontrollgene *β-Aktin* und *Gapdh*. Die Säulenfarben markieren die unterschiedlichen Genotypen. MEF: murine embryonale Fibroblasten, wt: wildtypisch, ko: *knockout*, Signifikanzklassen: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001.

Die Ergebnisse der quantitativen *Realtime*-Analysen für den TFIIB-Komplex in MEF zeigten eine signifikant verminderte *Bdp1*-Expression von 70 % in *Bdp1*^{ko/wt}- im Vergleich zu *Bdp1*^{wt/wt}-Zellen. Für *Brf1* wurden keine Veränderungen in den verschiedenen Genotypen festgestellt, wohingegen für *Tbp* eine um 70 %-erhöhte Expression in *Bdp1*^{ko/wt}-MEF detektiert wurde (Abbildung 17A).

Die Analysen der Interaktionspartner *TFIIIC102* sowie die der Onkogene *Erk* und *Myc* zeigten eine um 30 % sowie eine signifikante Erhöhung der Expression um 60 % bzw. 90 % in *Bdp1*^{ko/wt}-MEF verglichen zu *Bdp1*^{wt/wt}-MEF (Abbildung 17B). Bei den Tumorsuppressorgenen *p53* und *Rb* hingegen wurden keine maßgeblichen Unterschiede an Transkriptmengen festgestellt. Als Kontrollgene wurden β -Aktin und *Gapdh* verwendet (Abbildung 17C).

5.4.1.3 Northern Blot-Analysen von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

Die nukleoplasmatische RNA Pol III transkribiert niedermolekulare, nicht-proteinkodierende Gene (Geiduschek and Tocchini-Valentini 1988; Willis 1993). Dazu zählen verschiedene Typen an Transfer-RNAs (tRNAs), die 5S ribosomale RNA (5S rRNA) und die U6-Untereinheit der *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNA). Für eine präzise Initiation der Transkription benötigt die RNA Pol III den Transkriptionsfaktor IIIB (BDP1, BRF1/2, TBP), der die Polymerase zum Initiationskomplex rekrutiert (Schramm and Hernandez 2002).

Um die Auswirkungen einer heterozygoten Deletion des *Bdp1*-Gens auf RNA Pol III-transkribierende Gene zu untersuchen, wurde RNA isoliert (5.4.1.1) und jeweils 2 μ g dieser in Northern Blot-Analysen (3.2.1.12) für die Hybridisierung mit spezifischen Sonden (5S rRNA, U6 snRNA und 18S rRNA) verwendet (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 6). In Abbildung 18 sind die Ergebnisse verschiedener Northern Blot-Autoradiographien von 5S rRNA und U6 snRNA in *Cerebrum* und *Cerebellum* von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren sowie die quantitative Auswertung relativ zu 18S rRNA gezeigt.

Mittels quantitativer Auswertungen der Northern Blot-Analysen von wildtypischen und heterozygoten *Bdp1*-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des *Bdp1*-Gens im *Cerebrum* keine Auswirkungen auf die Expression der 5S und U6 snRNA hatte. Gleiches wurde für die 5S-Expression im *Cerebellum* festgestellt. In diesem Gewebe wurde jedoch eine dreimal stärkere Expression der U6 snRNA detektiert.

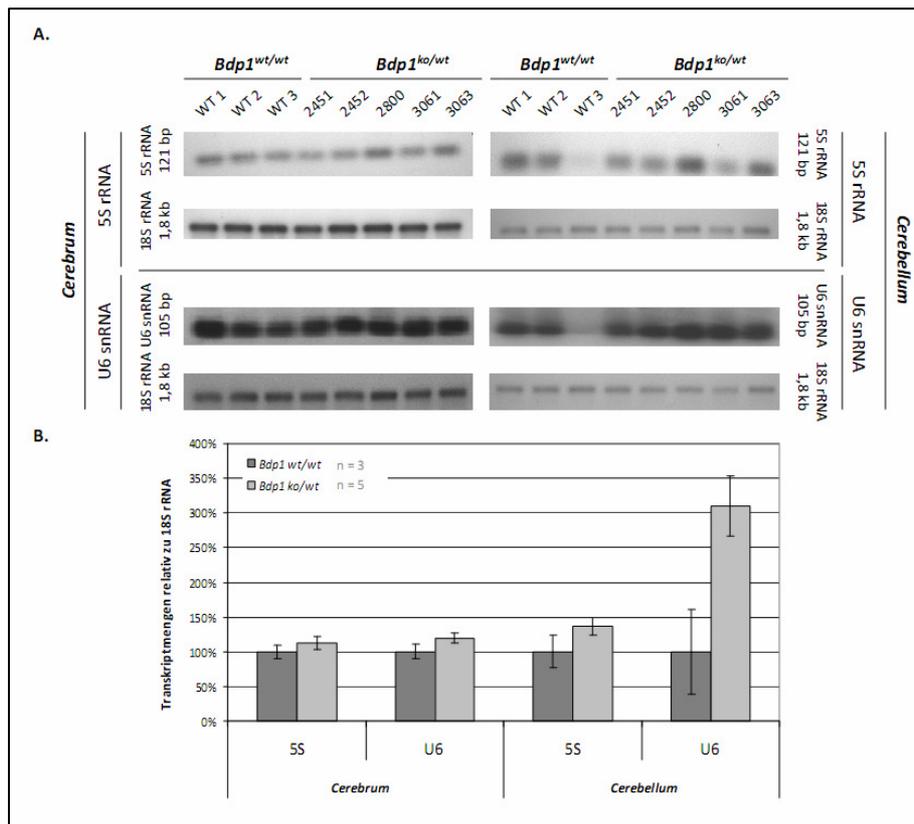


Abbildung 18: Northern Blot-Analysen von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

(A.) Autoradiographien verschiedener Northern Blot-Analysen von 5S rRNA (Primer 4104/4105, 121 bp), U6 snRNA (Primer 4101/4103, 105 bp) und 18S rRNA (Primer 4194/4195, 1,8 kb) in *Cerebrum* und *Cerebellum* von wildtypischen (*Bdp1*^{wt/wt}, n=3) und heterozygoten (*Bdp1*^{ko/wt}, n=5) *Bdp1*-Tieren. (B.) Quantitative Auswertungen der in (A.) gezeigten Autoradiographien von 5S rRNA und U6 snRNA relativ zu 18S rRNA. Dabei zeigt sich eine um 200 %-erhöhte Expression der U6 snRNA im *Cerebellum* von heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren. Die Säulenfarben markieren die unterschiedlichen Genotypen. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*.

5.4.1.4 Proteinexpressionsanalysen von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

Um die Proteinexpressionen wildtypischer und heterozygoter *Bdp1*-Tiere zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen (3.2.2.3) durchgeführt. Dafür wurden Proteine aus den bereits für die Genexpressionsanalysen verwendeten Geweben (*Cerebrum* und *Cerebellum*) von zwei wildtypischen und fünf heterozygoten adulten *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren gewonnen (3.2.2.1.1). Die Proteinmengen des TFIIB-Komplexes und die der Interaktionspartner wurden zu β -Aktin relativiert und abschließend quantifiziert (siehe Kapitel 3.1.9, Tabelle 9 und 10) (Abbildung 19). Analysen des Bdp1-Proteins waren nicht möglich, da kein adäquater Antikörper zur Verfügung stand (5.8).

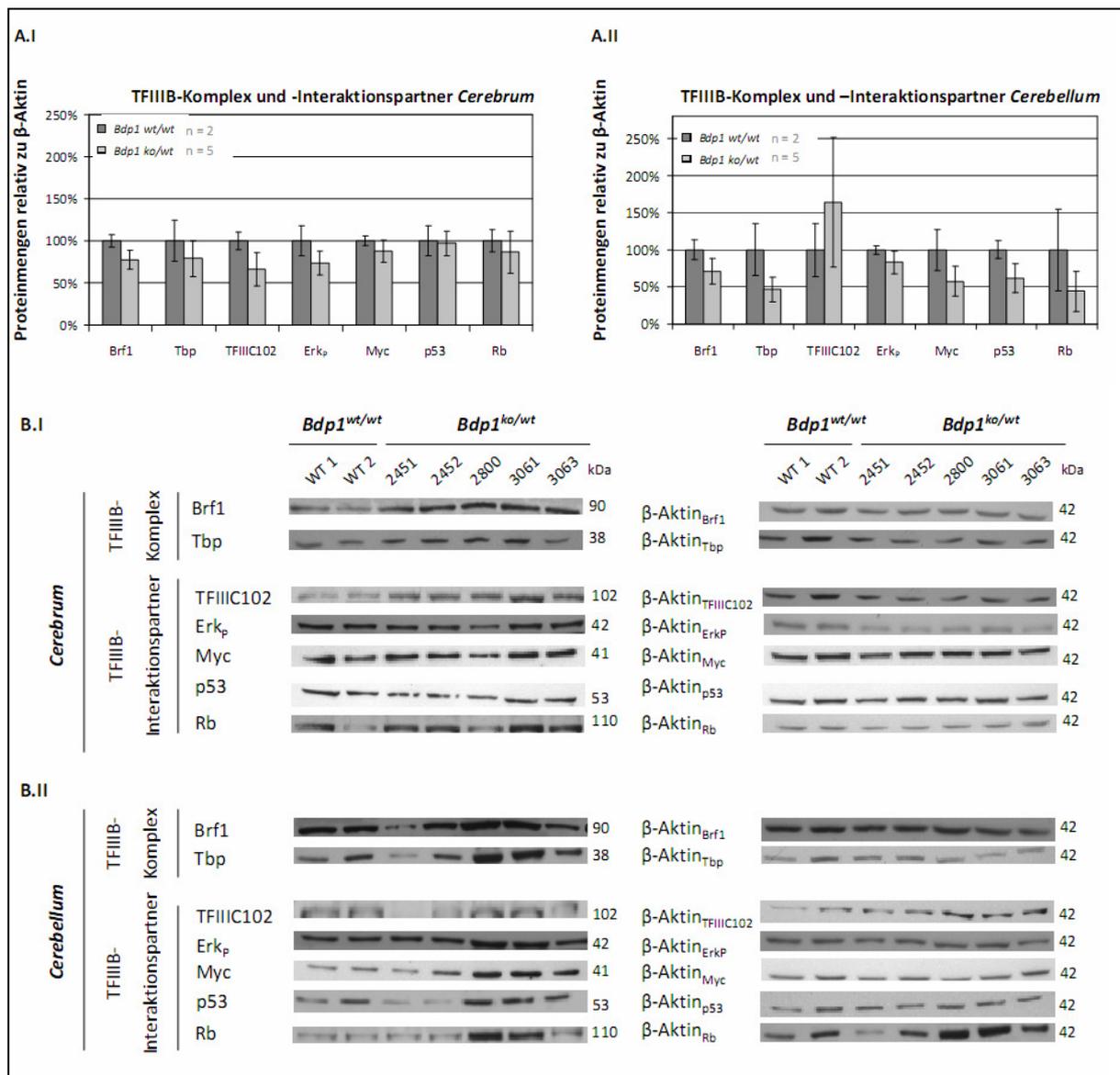


Abbildung 19: Western Blot-Analysen von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

Quantitative Auswertung der Western Blot-Analysen von (A.I) *Cerebrum* und (B.I) *Cerebellum* der Proteine des TFIIIB-Komplexes (Brf1, Tbp) sowie interagierender Proteine (TFIIIC102, Erk_p [phosphoriliert], Myc, p53, Rb) in wildtypischen (*Bdp1*^{wt/wt}, n=2) und heterozygoten (*Bdp1*^{ko/wt}, n=5) *Bdp1*-Tieren. *Bdp1*^{ko/wt}-Tiere zeigen verringerte Proteinmengen aller untersuchten Proteine sowohl im *Cerebrum* (zwischen 70 % und 85 %) als auch im *Cerebellum* (zwischen 50 % und 80 %, mit Ausnahme von TFIIIC102). (A.II+B.II) Autoradiographien der Western Blot-Analysen von *Cerebrum* und *Cerebellum* relativ zu β-Aktin. Die Säulenfarben markieren die unterschiedlichen Genotypen. Es wurden 12 %ige SDS-Gele verwendet. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*.

Die Quantifizierungen der Western Blot-Analysen ergaben verringerte Proteinmengen im *Cerebrum* von $Bdp1^{ko/wt}$ - im Vergleich zu $Bdp1^{wt/wt}$ -Tieren in den untersuchten TFIIB-Komplexpartnern sowie - mit Ausnahme von p53 - interagierender Proteine. Dabei schwankten die Expressionen zwischen 70 % und 85 %. Ähnliche Beobachtungen wurden im *Cerebellum* von $Bdp1^{ko/wt}$ -Tieren gemacht: mit Ausnahme von TFIIC102, wo ein Anstieg der Expression um etwa 50 % gemessen wurde, wurden verringerte Proteinmengen zwischen 50 % und 80 % detektiert.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass eine heterozygote *Bdp1*-Deletion Auswirkungen auf die Komponenten des TFIIB-Komplexes und auf interagierende Proteine hatte - diese Beobachtungen wurden sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gemacht. Weiterhin wurde eine Heraufregulation der RNA Pol III-abhängigen Transkription für die U6 snRNA im *Cerebellum* heterozygot deletierter *Bdp1*-Tiere beobachtet. Die Ergebnisse der *Realtime*-Analysen von $Bdp1^{ko/wt}$ -Tieren konnten in MEF entsprechender Genotypen nicht bestätigt werden.

5.5 Generierung eines ubiquitären homozygoten *Bdp1*-*knockouts*

Die unter 5.4 beschriebenen heterozygoten *Bdp1*-*knockout*-Tiere ($Bdp1^{ko/wt}$) wurden zur Generierung eines homozygoten *Bdp1*-*knockouts* ($Bdp1^{ko/ko}$) untereinander verpaart. Unter 95 Nachkommen konnten mittels PCR keine homozygot deletierten *Bdp1*- Tiere nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Dies führte zu der Annahme, dass eine homozygote Deletion des *Bdp1*-Gens zur embryonalen Letalität führte (Tabelle 20).

Tabelle 20: Genotypen und Anzahl postnataler Nachkommen $Bdp1^{ko/wt}$ -Interkreuzungen

♂ $Bdp1^{ko/wt}$ x ♀ $Bdp1^{ko/wt}$		
Genotyp (erwartet)	Anzahl	P-Wert (χ^2 -Test)
$Bdp1^{wt/wt}$ (25 %)	43 (45,2 %)	P<0,001
$Bdp1^{ko/wt}$ (50 %)	52 (54,8 %)	n.s.
$Bdp1^{ko/ko}$ (25 %)	0 (0 %)	P<0,001

5.5.1 Analysen homozygoter *Bdp1*-knockouts

5.5.1.1 Isolierung und Genotypisierung verschiedener Embryonalstadien

Um homozygot deletierte *Bdp1*-Embryonen in verschiedenen Embryonalstadien zu detektieren, wurden zeitlich kontrollierte Verpaarungen von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren durchgeführt (3.2.5.4). Um möglichst frühe Stadien zu untersuchen, wurden sowohl Morula- (E2,5 p.c.) als auch Blastula-Stadien (E3,5 p.c.) präpariert (3.2.5.5.1). Zusätzlich wurden Embryonen eines späteren Stadiums (E10,5 p.c.) isoliert.

Anschließend wurden die Embryonen genotypisiert. Zu diesem Zweck wurde zuvor das gesamte Genom amplifiziert, um genügend Ausgangsmaterial zu erhalten (3.2.1.3). Für die Genotypisierung wurden drei verschiedene PCR-Ansätze verwendet, wobei ein Ansatz sowohl das Wildtyp- (1031 bp) als auch das *knockout*-Fragment (570 bp) amplifizierte. Um sicherzustellen, dass nicht das kleinere Fragment bevorzugt amplifiziert wurde, wurden weitere PCRs angewandt, die entweder spezifisch für das Wildtyp-Allel (513 bp) oder für das *knockout*-Fragment (791 bp) waren. Mittels der Kombinationen der Ergebnisse dieser PCRs konnten die Genotypen der Embryonen eindeutig bestimmt werden (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 5). Die gleiche PCR-Strategie wurde auch für die Genotypisierung älterer Embryonalstadien (E10,5 p.c.) angewandt, wobei eine Schwanzspitzenbiopsie der DNA-Isolation diente. Mit Hilfe dieser PCR-Strategien wurden homozygot deletierte *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen sowohl im Morula- (E2,5 p.c.) als auch im Blastulastadium (E3,5 p.c.) nachgewiesen (Tabelle 21 und Abbildung 20).

Tabelle 21: Übersicht der präparierten Embryonalstadien von *Bdp1*^{ko/wt}-Interkreuzungen

♂ <i>Bdp1</i> ^{ko/wt} x ♀ <i>Bdp1</i> ^{ko/wt}			
Embryonalstadium	<i>Bdp1</i> ^{wt/wt} (25 %)	<i>Bdp1</i> ^{ko/wt} (50 %)	<i>Bdp1</i> ^{ko/ko} (25 %)
E2,5 p.c. (Morulae)	1 (50 %)	0 (0 %)	1 (50 %)
E3,5 p.c. (Blastozysten)	11 (23 %)	29 (60 %)	8 (17 %)
E10,5 p.c.	5 (55 %)	4 (45 %)	0 (0 %)

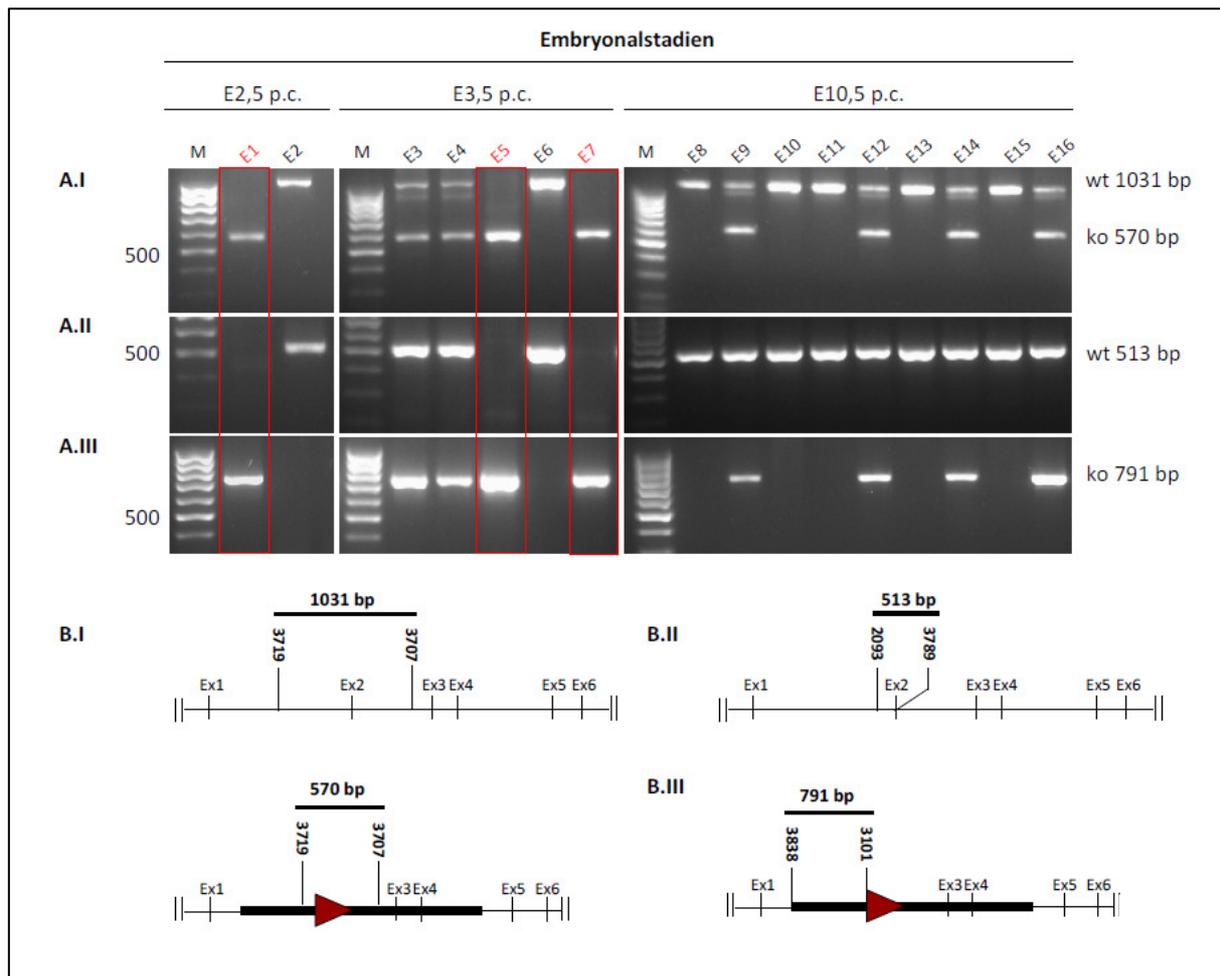


Abbildung 20: Genotypisierungs-PCRs verschiedener Embryonalstadien von $Bdp1^{ko/wt}$ Interkreuzungen

(A.I-III) Auf einem Agarosegel separierte PCR-Produkte verschiedener Genotypisierungsstrategien. Die entsprechenden Entwicklungsstadien sind angegeben und die Embryonen nummeriert (E1–E16). Drei $Bdp1^{ko/ko}$ -Embryonen (E1, E5 und E7) sind rot markiert. (A.I) PCR zur Amplifikation des wildtypischen (1031 bp) und des *knockout*-Fragments (570 bp) sowie der (B.I) PCR-Strategie (Primer 3719/3707). (A.II) PCR zur ausschließlichen Amplifikation des wildtypischen Fragments (513 bp) sowie der (B.II) PCR-Strategie (Primer 3838/3101). (A.III) PCR zur ausschließlichen Amplifikation des *knockout*-Fragments (791 bp) sowie der (B.III) PCR-Strategie (Primer 2093/3789). Die $Bdp1^{ko/ko}$ -Embryonen zeigen in allen drei PCRs eindeutig nur ein Signal für das *knockout*-Fragment und tragen den *Bdp1-knockout* somit homozygot. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, E: Embryonalstadium, p.c.: *post coitum*, M: Marker, Ex: Exon, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen.

5.5.1.2 *In vitro*-Kultivierung und makroskopische Untersuchung von *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen: Bestimmung des Zeitpunktes der Letalität

Um den Zeitpunkt der Letalität von *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen zu bestimmen und um die *in vitro*-Differenzierung bzw. die phänotypischen Veränderungen isolierter Embryonen näher zu untersuchen, wurden diese am Embryonaltag E3,5 p.c. isoliert, für zwei Tage kultiviert und anschließend genotypisiert (Abbildung 21).

Embryonen mit dem Genotyp *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt} hatten an E3,5 p.c. das Blastozystenstadium erreicht. In diesem Stadium besteht ein Embryo aus einer inneren Zellmasse (Embryoblast, IZM), und die äußere Zellmasse bildet das Trophektoderm aus. Letzteres ist später für die Ausbildung der Plazenta verantwortlich. Weiterhin entsteht durch die Aufnahme von Flüssigkeit das Blastozoel (Blastozystenhöhle) und die Blastozyste wird von der *Zona pellucida* (Glashaut) umhüllt (Beddington and Robertson 1999) (Abbildung 22A).

Homozygot deletierte *Bdp1*-Embryonen (*Bdp1*^{ko/ko}) waren zum Isolationszeitpunkt E3,5 p.c. noch im Morulastadium. Während der Kultivierung wurden keine Furchungsvorgänge der Blastomeren beobachtet, so dass weder eine innere, kompaktere Zellmasse noch eine äußere Zellschicht für die Ausbildung des Trophektoderms angelegt wurde. Weiterhin erschienen die Zellen disorganisiert und es wurde eine Volumenabnahme der einzelnen Blastomeren beobachtet (Abbildung 22B). Homozygot deletierte *Bdp1*-Embryonen starben nach zwei Tagen in Kultur. Demnach läge der Zeitpunkt der Letalität im Präimplantationsstadium (um E2,5 p.c.).

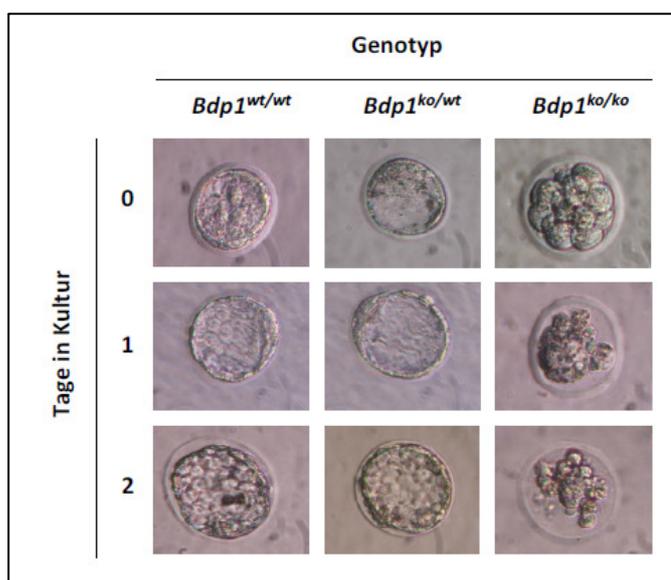


Abbildung 21: *In vitro*-Kultivierung von isolierten Embryonen am Tag E3,5 p.c.

Isolierte Blastozysten am Embryonaltag 3,5 p.c. und anschließender Kultivierung. Die entsprechenden Genotypen und Tage in Kultur sind angegeben. *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen haben zum Zeitpunkt der Isolation noch nicht das Blastozystenstadium erreicht. Die innere Zellmasse erscheint disorganisiert und zerfällt nach zwei Tagen in Kultur.

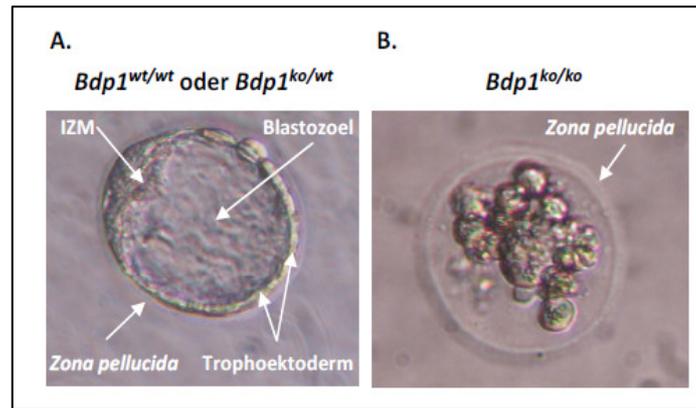


Abbildung 22: Übersicht der Strukturen von isolierten Embryonen

(A.) $Bdp1^{wt/wt}$ bzw. $Bdp1^{ko/wt}$ -Embryonen nach zwei Tagen in Kultur. Zum Zeitpunkt der Isolation liegen die Embryonen als Blastozyste mit innerer Zellmasse (IZM), Trophoektoderm und Blastozoele vor. (B.) $Bdp1^{ko/ko}$ -Embryonen befinden sich zum Isolationszeitpunkt im Morulastadium und entwickeln sich *in vitro* nicht zur Blastozyste. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, IZM: innere Zellmasse.

5.5.1.3 Generierung und Analysen von $Bdp1^{fl/fl}$ -MEF

Wie unter 5.5.1.1 und 5.5.1.2 gezeigt wurde, führte ein homozygoter *knockout* des $Bdp1$ -Gens zur embryonalen Letalität im des Präimplantationsstadiums (um E2,5 p.c.). Da dieser frühe Zeitpunkt aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Zellmaterials weitere Analysen ausschloß, wurden für nachfolgende Untersuchungen $Bdp1^{fl/fl}$ -MEF generiert. Diese stammten von $Bdp1^{fl/fl}$ -Tieren (5.6.1), die zu diesem Zweck zeitlich miteinander verpaart wurden (siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 16). Von jedem individuellen Embryo wurde eine Zelllinie generiert und die Genotypen aller Embryonen ($Bdp1^{fl/fl}$) mit Hilfe von spezifischen PCRs verifiziert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4).

5.5.1.3.1 *In vitro*-Deletion und Analysen des $Bdp1$ -Gens

Für eine *in vitro*-Deletion wurden $Bdp1^{fl/fl}$ -MEF mit rekombinanten HTN-Cre-Protein (Peitz et al. 2002) behandelt und für zwei Wochen kultiviert (3.2.2.5). Die adäquate HTN-Cre-Konzentration des aktuellen Stocks von 5 μ M zur effektiven Deletion des geflochtenen $Bdp1$ -Allels wurde in Vorversuchen titriert (siehe Kapitel 11, Abbildung 41). Dabei dienten *Mock*-behandelte Zellen als Kontrolle. Während der Versuchsreihe wurden die Zellen sowohl sieben als auch 14 Tage nach der HTN-Cre-Behandlung fotografiert und die Zellzahl bestimmt (3.2.3.3). Um die $Bdp1$ -Deletion auf DNA-Ebene zu bestätigen, wurden die Zellen an den entsprechenden Tagen genotypisiert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Gleichzeitig wurde die $Bdp1$ -Genexpression nach 14 Tagen mit Hilfe von quantitativen *Realtime*-Analysen

bestimmt und die Transkriptmenge zu *Rplp0* relativiert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 7) (Abbildung 23).

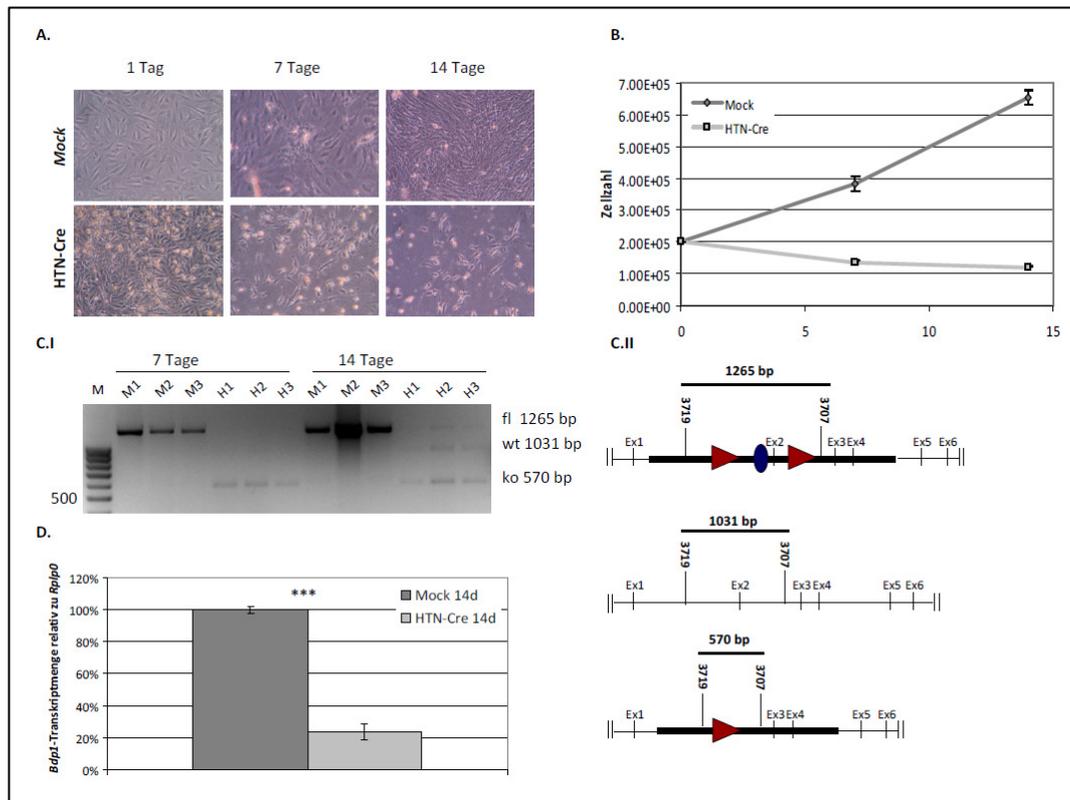


Abbildung 23: HTN-Cre-Behandlung von *Bdp1^{fl/fl}*-MEF

(A.) *Mock*- und HTN-Cre-behandelte MEF nach einem, sieben und 14 Tage nach der HTN-Cre Behandlung. **(B.)** Proliferationskurven von *Mock*- und HTN-Cre-behandelten Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen. Dabei sinkt die Zellzahl homozygot deletierter *Bdp1*-MEF bereits nach sieben Tagen. **(C.I)** Auf einem Agarosegel separierte PCR-Produkte zur Genotypisierung von *Mock*- bzw. HTN-Cre-behandelten *Bdp1^{fl/fl}*-MEF (Primer 3719/3707). Dabei wird ein Wildtypfragment von 1265 bp, ein gefloxtes Fragment von 1031 bp und ein *knockout*-Fragment von 570 bp amplifiziert. Abbildung C.II zeigt die entsprechenden PCR-Strategien. **(D.)** Quantitative *Realtime*-Analyse zur Bestimmung der *Bdp1*-Transkriptmenge relativ zu *Rplp0* 14 Tage nach erfolgter HTN-Cre-Behandlung. Die Säulenfarben markieren die unterschiedlichen Genotypen. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, fl: gefloxtes Allel, M1-3: *Mock* 1-3, H1-3: HTN-Cre 1-3, M: Marker, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen, Signifikanzklassen: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001.

Anhand der visuellen Betrachtungen von *Mock*- bzw. HTN-Cre-behandelten Zellen wurde bereits sieben Tage nach erfolgter Behandlung eine Abnahme der Zelldichte von homozygot deletierten *Bdp1*-MEF im Vergleich zu *Mock*-behandelten Zellen beobachtet. Diese Beobachtungen wurden auch durch das Auszählen der Zellen bestätigt (Abbildung 23A und

23B). Für weitere Aufschlüsse bezüglich der Zellviabilität wurden MTT-Analysen durchgeführt (5.5.1.3.2).

Mit der Genotypisierungs-PCR von *Mock*- und HTN-Cre-behandelten MEF konnte sieben Tage nach der Deletion ausschließlich das *knockout*-Signal von 570 bp amplifiziert werden (Abbildung 23C). In *Mock*-Zellen hingegen konnte nur das homozygot gefloxe Allel (1265 bp) nachgewiesen werden. Zwei Wochen nach der Behandlung wurden in den deletierten MEF sowohl das *knockout*- als auch das gefloxe Signal für das *Bdp1*-Allel detektiert, was auf eine Proliferation von nicht HTN-Cre-deletierten Zellen hinwies.

Zwei Wochen nach erfolgter HTN-Cre-Behandlung wurde mit Hilfe quantitativer *Realtime*-Analysen eine *Bdp1*-Expression des Wildtypallels von etwa 20 % in homozygot deletierten *Bdp1*-MEF detektiert (Abbildung 23 D). Die Restexpression ist auf die nicht 100 %ige Penetranz der HTN-Cre zurückzuführen.

5.5.1.3.2 MTT-Analysen von HTN-Cre-behandelten *Bdp1^{fl/fl}*-MEF

Um die Zellviabilität von HTN-Cre-behandelten *Bdp1^{fl/fl}*-MEF zu untersuchen, wurden MTT-Analysen durchgeführt. Dabei findet die Umwandlung des MTT-Reagenz zu Formazan nur in lebenden, stoffwechselaktiven Zellen statt (3.2.2.6) und ist damit ein Indiz für die Zellviabilität. Dafür wurden *Bdp1^{fl/fl}*-MEF *Mock*- bzw. HTN-Cre-behandelt und täglich über einen Zeitraum von vier Tagen MTT-Analysen durchgeführt (Abbildung 24).

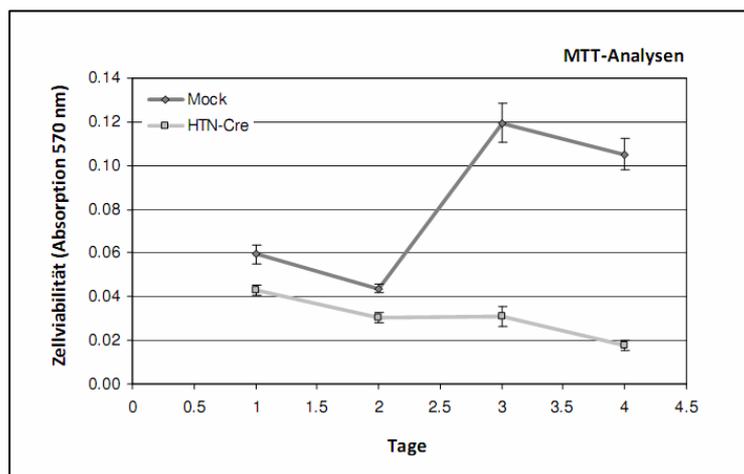


Abbildung 24: MTT-Analysen von *Mock*- und HTN-Cre-behandelten *Bdp1^{fl/fl}*-MEF

Graphische Darstellung der MTT-Analysen über einen Zeitraum von vier Tagen. Die Zellviabilität ist mit dem Absorptionsspektrum des Formazans gleichgestellt. Etwa zwei Tage nach erfolgter Behandlung zeigen *Mock*-Zellen einen Anstieg, HTN-Cre-behandelte Zellen eine Abnahme der Zellviabilität und somit der Proliferation. Dunkelgrau: *Mock*-Zellen, hellgrau: HTN-Cre-Zellen.

Sowohl in *Mock*- als auch in HTN-Cre-behandelten $Bdp1^{fl/fl}$ -MEF stagnierte die Stoffwechselaktivität bis zu zwei Tage nach erfolgter Behandlung. Diese Beobachtungen waren auf die Verwendung des Mediums während der Behandlung zurückzuführen. Ab dem dritten Tag wurde bei *Mock*-Zellen eine Zunahme des Stoffwechsels und somit ein Anstieg der Proliferation detektiert. Diese Beobachtungen wurden nicht in HTN-Cre-deletierten MEF gemacht und vier Tage nach erfolgter HTN-Cre-Behandlung wurde eine stark reduzierte Zellvitälität detektiert. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass der homozygote *Bdp1-knockout* zum Zelltod führte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine homozygote Deletion des *Bdp1*-Gens zu einem letalen Phänotyp im Präimplantationsstadium führte (um E2,5 p.c.). Aufgrund fehlender Entwicklungsprozesse erreichten $Bdp1^{ko/ko}$ -Embryonen nicht das Blastozystenstadium. Diese Beobachtungen wurden anhand von *in vitro*-Deletionen in MEF bestätigt.

5.6 Generierung eines konditionalen *Bdp1-knockouts*

5.6.1 Generierung und Verifizierung der homozygot geflochten *Bdp1*-Linie

Wie unter 5.5 beschrieben, führte die homozygote Deletion des *Bdp1*-Gens zu einem letalen Phänotyp im Präimplantationsstadium (um E2,5 p.c.). Da weitergehende funktionelle Analysen aufgrunddessen nicht möglich waren, wurde eine gewebespezifische Deletion des *Bdp1*-Gens durch die Verpaarung mit entsprechenden gewebespezifischen Cre-Linien induziert.

Als Ausgangslinie diente die unter 5.3 beschriebene $Bdp1^{fl^{neo}/wt}$ -Linie. Aufgrund des verwendeten *targeting*-Vektors (pRF) trug diese Linie noch das Neomycin-Resistenzgen, welches der Selektion von transfizierten ES-Zellen diente. Für die Generierung eines gewebespezifischen *Bdp1-knockouts* musste der Selektionsmarker deletiert werden, da dieser im *Bdp1*-Lokus vorlag und somit die Genfunktion hätte beeinflussen können. Durch die flankierenden FRT-Stellen wurde eine Flp-Rekombinase induzierte Deletion des Neomycin-Resistenzgens ermöglicht. Eine *in vitro*-Deletion des Selektionsmarkers in homolog rekombinanten ES-Zellen wurde nach der Transfektion dieser nicht durchgeführt,

um durch erneute Modifikationen die Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission nicht zu vermindern. Die Deletion des Neomycin-Resistenzgens erfolgte somit *in vivo* durch Kreuzungen der *Bdp1^{flneo/wt}*-Linie mit einer transgenen Flp-Rekombinase-Linie (siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 13) (Rodriguez et al. 2000). Mit Hilfe von spezifischen PCRs wurde die DNA der Nachkommen untersucht, wobei sowohl das gefloخته *Bdp1*-Allel als auch das Flp-Rekombinase-Transgen kontrolliert wurden (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). Das Neomycin-Resistenzgen wurde bei Tieren mit Flp-Rekombinase-Transgen deletiert. Somit lag das *Bdp1*-Gen heterozygot gefloخته vor (*Bdp1^{fl/wt}*) und sowohl das gefloخته (893 bp) als auch das wildtypische Fragment (733 bp) konnten nachgewiesen werden (Abbildung 25A). Bei Nachkommen ohne Flp-Rekombinase-Transgen wurde nur das Wildtypfragment amplifiziert. Die Genotypen heterozygot geflochter Mäuse wurden zusätzlich in Southern Blot-Analysen verifiziert, wobei bei *Bdp1^{fl/wt}*-Tieren das wildtypische (1,4 kb) und das gefloخته Allel (1,1 kb) detektiert werden konnte. Tiere, bei denen das Neomycin-Resistenzgen nicht deletiert wurde, zeigten anstelle des geflochten Allels ein Signal von 1,8 kb (flneo) (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 6) (Abbildung 25B).

Im weiteren Verlauf wurden heterozygot gefloخته Nachkommen untereinander verpaart, so dass schließlich die homozygot gefloخته Linie (*Bdp1^{fl/fl}*) generiert wurde, bei denen das Flp-Rekombinase-Transgen nicht mehr vorhanden war. Diese Linie diente als Ausgangslinie für gewebespezifische *Bdp1*-knockouts und für die Generation von *Bdp1^{fl/fl}*-MEF (5.5.1.3.1).

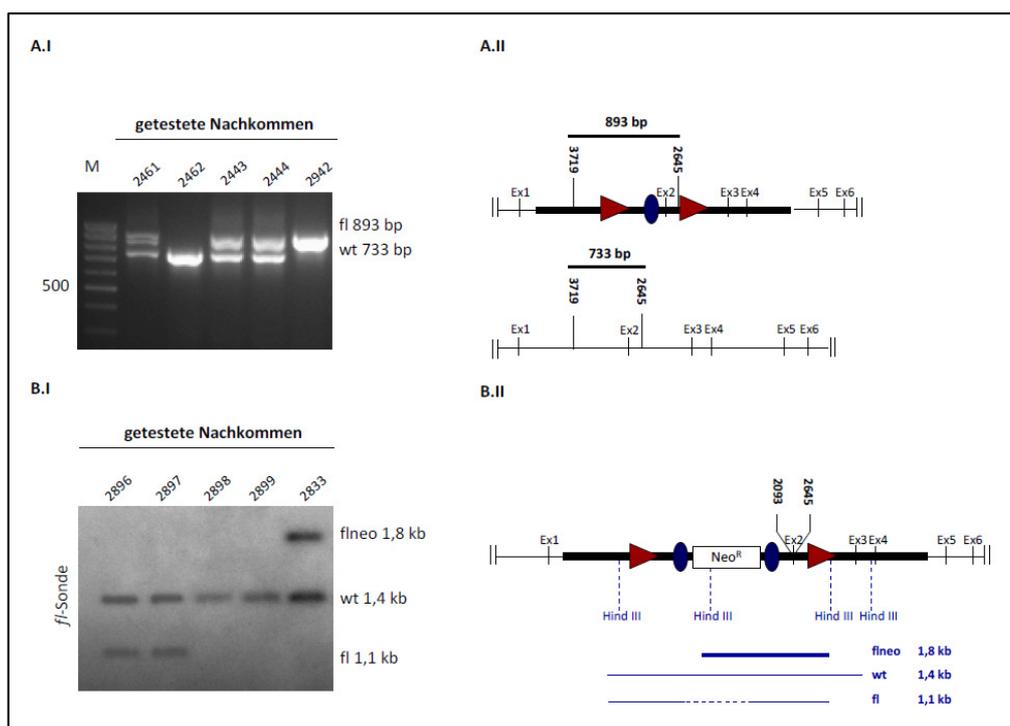


Abbildung 25: Identifizierung und Verifizierung des geflochten *Bdp1*-Allels

(A.I) Auf einem Agarosegel aufgetrennte PCR-Produkte zur Identifizierung des wildtypischen (733 bp) und des geflochten *Bdp1*-Allels (893 bp) mit Hilfe von spezifischen *Primern* (3718/2645). Abbildung A.II verdeutlicht die PCR-Strategie. (B.I) Ausschnitt einer Autoradiographie von Southern Blot-Analysen zur Verifizierung des geflochten *Bdp1*-Allels. Die DNA der Tiere wurde mit dem Restriktionsenzym Hind III fragmentiert, separiert und nach dem Transfer auf eine Membran mit einer spezifischen *fl*-Sonde (*Primer* 2093/2645) hybridisiert. Dabei wird ein Wildtypsignal (1,4 kb), ein gefloxtes Signal (1,1 kb) und ein *flneo*-Signal (1,8 kb) detektiert. Abbildung B.II verdeutlicht die Southern Blot-Strategie. Wt: wildtypisch, fl: gefloxtes Allel, *flneo*: gefloxtes Allel mit Neomycin-Resistenzgen, M: Marker, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen, Restriktionsschnittstellen: gestrichelte Linien.

5.6.2 Generierung eines ZNS-spezifischen *Bdp1*-knockouts

Die Analysen des ubiquitären *Bdp1*-knockouts hatten bereits gezeigt, dass das Gen eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung einnimmt. Aufgrund des frühen embryonalen letalen Phänotyps homozygoter *Bdp1*-knockout-Embryonen (um E2,5 p.c.) konnten keine Rückschlüsse auf die atypische Form der SMA gezogen werden, wie sie bei zwei Patienten beschrieben wurde – diese zeigten zusätzlich zur SMA eine Gehirnatrophie. Daher sollte ein konditionaler *Bdp1*-knockout im Zentralnervensystem (ZNS) - dem bei der atypischen SMA primär betroffenen Gewebe - weitere Erkenntnisse über eventuelle Zusammenhänge liefern.

Um Deletionen des *Bdp1*-Gens im ZNS zu induzieren, wurde eine transgene Mauslinie verwendet, welche die Cre-Rekombinase spezifisch in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Mignone et al. 2004). Diese *Nestin*-Cre-Mäuse exprimieren die Rekombinase unter der Kontrolle des Ratten-*Nestin*-Promotors sowie weiteren *enhancer*-Elementen ab dem Embryonaltag 11,0 p.c. (siehe Kapitel 3.1.10, Tabelle 13) (Tronche et al. 1999). *Nestin* gehört als Neurofilament der Familie der Intermediärfilamente an und ist in sogenannten neuroepithelialen Stammzellen lokalisiert (Michalczyk and Ziman 2005).

Zur Generierung des ZNS-spezifischen *Bdp1*-knockout-Mausmodelles wurden *Bdp1*^{fl/fl}-Tiere mit transgenen *Nestin*-Cre-Mäusen (*Nestin*^{tg/wt}) verpaart. Von den resultierenden Nachkommen dieser Verpaarung wurden sowohl für das geflochte *Bdp1*-Allel als auch für das Transgen heterozygote Tiere selektiert (*Bdp1*^{fl/wt}; *Nestin*^{tg/wt}) (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4). So generierte Tiere zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten und über weitere Verpaarungen mit *Bdp1*^{fl/fl}-Mäusen wurden schließlich Mäuse generiert, die einen spezifischen homozygoten *knockout* des *Bdp1*-Gens im ZNS trugen.

Unter 28 Nachkommen der $Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt} \times Bdp1^{fl/fl}$ -Verpaarung konnte kein homozygoter *knockout* des *Bdp1*-Gens nachgewiesen werden. Somit wurde davon ausgegangen, dass eine homozygote Deletion des *Bdp1*-Gens im sich entwickelnden ZNS zur embryonalen Letalität führte (Tabelle 22).

Tabelle 22: Genotypen und Anzahl postnataler Nachkommen von $Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt} \times Bdp1^{fl/fl}$ Verpaarungen

$Bdp1^{fl/fl} \times Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt}$		
Genotyp (erwartet %)	Anzahl	P-Wert (χ^2 -Test)
$Bdp1^{fl/wt}$ (25 %)	8 (28,6 %)	n.s.
$Bdp1^{fl/fl}$ (25 %)	9 (32,1 %)	n.s.
$Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt}$ (25 %)	11 (39,3 %)	P<0,05
$Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}$ (25 %)	0 (0 %)	P<0,001

5.6.3 Analysen des ZNS-spezifischen *Bdp1*-knockouts

5.6.3.1 Makroskopische Untersuchungen des ZNS-spezifischen *Bdp1*-knockouts

Um den genauen Zeitpunkt der embryonalen Letalität von $Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}$ -Embryonen zu bestimmen, wurden zeitlich kontrollierte Verpaarungen von $Bdp1^{fl/fl}$ -Tieren mit $Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt}$ -Mäusen durchgeführt. Da die Cre-Rekombinase unter dem *Nestin*-Promotor ab dem Embryonaltag 11,0 p.c. exprimiert und somit erst in diesem Stadium die ZNS-spezifische Deletion des geflochtenen *Bdp1*-Allels induziert, wurden Embryonen von E14,5 p.c. bis E18,5 p.c. präpariert (Tabelle 23) (Abbildung 26).

Tabelle 23: Präparierte Embryonen von $Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt} \times Bdp1^{fl/fl}$ Verpaarungen

$Bdp1^{fl/fl} \times Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt}$				
Embryonalstadium	$Bdp1^{fl/wt}$ (25 %)	$Bdp1^{fl/fl}$ (25 %)	$Bdp1^{fl/wt}; Nestin^{tg/wt}$ (25 %)	$Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}$ (25 %)
E14,5 p.c.	3 (17 %)	3 (17 %)	1 (5 %)	11 (61 %)
E15,5 p.c.	5 (28 %)	4 (22 %)	5 (28 %)	4 (22 %)
E16,5 p.c.	3 (14 %)	5 (24 %)	7 (33 %)	6 (29 %)
E17,5 p.c.	7 (32 %)	5 (23 %)	4 (18 %)	6 (27 %)
E18,5 p.c.	10 (32 %)	4 (13,5 %)	12 (39 %)	5 (16 %)

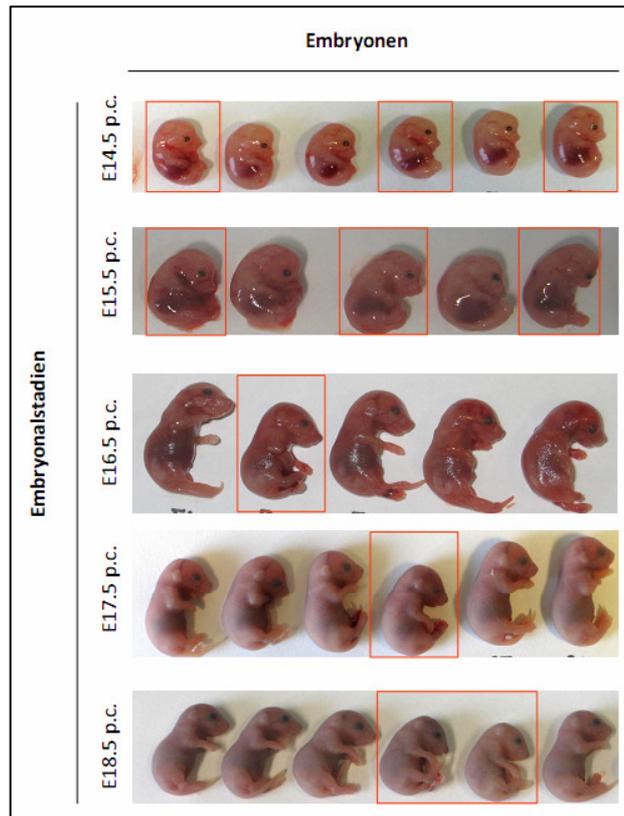


Abbildung 26: Isolierte Embryonen verschiedener Embryonalstadien von $Bdp1^{fl/fl}$ x $Bdp1^{fl/wt}$; $Nestin^{tg/wt}$ -Verpaarungen

Präparierte Embryonen von E14,5 bis E18,5 p.c. Homozygote $Bdp1$ -knockout-Tiere wurden in allen Stadien detektiert (rot umrandet) und zeigen ab E16,5 p.c. eine Wachstumsverzögerung. Die weiteren Embryonen sind entweder heterozygot für das gefloخته Allel und für das Transgen ($Bdp1^{fl/wt}$; $Nestin^{tg/wt}$) oder negativ für das Transgen und tragen das $Bdp1$ -Allel hetero- oder homozygot gefloخته ($Bdp1^{fl/wt}$, $Bdp1^{fl/fl}$). E: Embryonalstadium, p.c.: *post coitum*.

In allen untersuchten Embryonalstadien wurden $Bdp1^{fl/fl}$; $Nestin^{tg/wt}$ -Embryonen nachgewiesen. Die aus den Schwanzspitzen isolierte DNA diente der Genotypisierung der Embryonen und anschließend der Verifizierung mittels Southern Blot-Analysen (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4 und 6) (Abbildung 27). Eine spezifische *fl*-Sonde detektierte, nach Fragmentierung der DNA mit Hind III und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung sowie Transfer auf eine Nylonmembran, bei homozygot gefloختen Tieren ein Signal von 1,1 kb, heterozygote Mäuse zeigten ein zusätzliches wildtypisches Fragment von 1,4 kb (Abbildung 27A). Die deletierte Region hingegen wurde mit einer spezifischen *knockout*-Sonde nach Restriktion mit Nde I nachgewiesen. Dabei wurde bei der $Bdp1$ -

Deletion ein Fragment von 4,3 kb detektiert, wohingegen das wildtypische Allel ein Signal bei 4,7 kb und das gefloxtes Allel bei 4,9 kb detektiert wurde (Abbildung 27B).

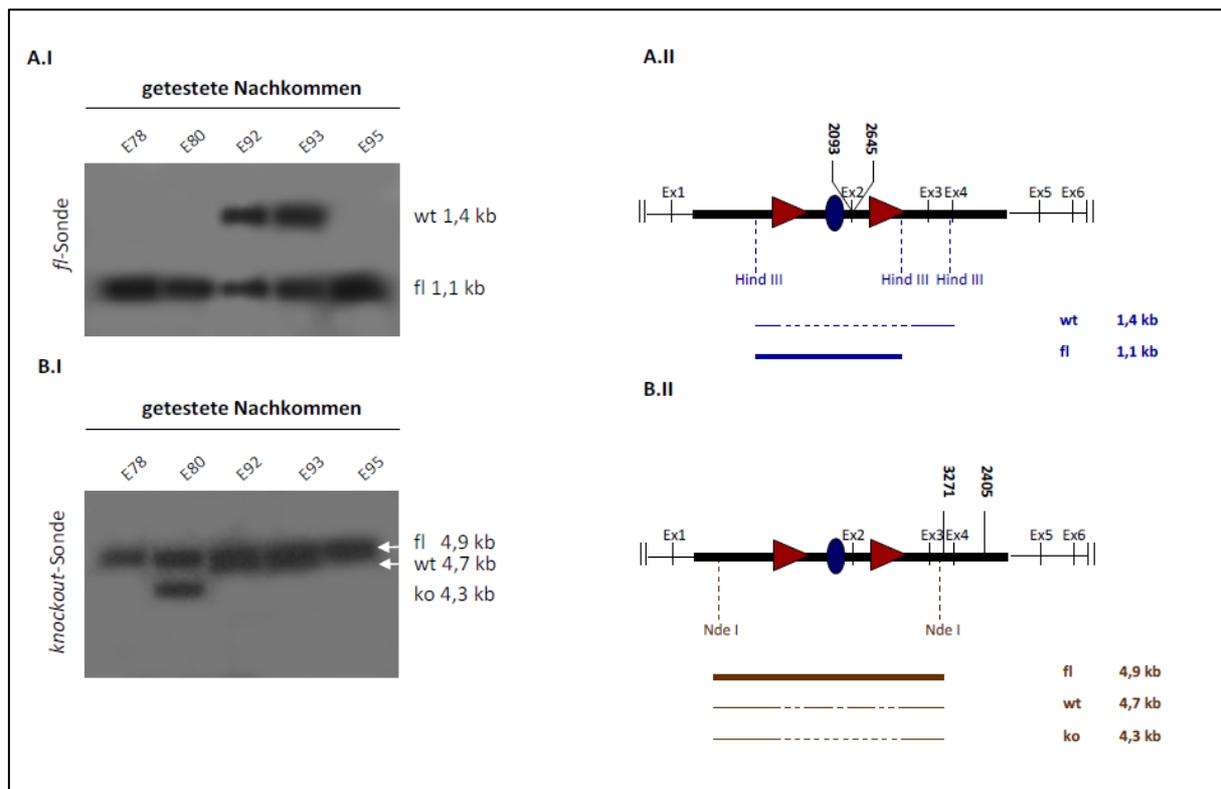


Abbildung 27: Verifizierung von ZNS-spezifischen *Bdp1*-knockout-Embryonen

Autoradiographien von Southern Blot-Analysen zur Verifizierung von ZNS-spezifischen *Bdp1*-knockout-Embryonen. Die DNA der Tiere wurde mit dem Restriktionsenzym **(A.I)** Hind III oder **(B.I)** Nde I fragmentiert, separiert und nach dem Transfer auf eine Membran mit einer spezifischen *fl*-Sonde (Primer 2093/2645) bzw. *knockout*-Sonde (Primer 3271/2405) hybridisiert. **(A.II)** Die *fl*-Sonde detektiert sowohl ein Wildtypsignal (1,1 kb) als auch ein Signal für das gefloxtes *Bdp1*-Allel (1,1 kb). **(B.II)** Die *knockout*-Sonde zeigt ein wildtypisches Signal von 4,7 kb, ein gefloxtes Signal von 4,9 kb und ein *knockout*-Signal von 4,3 kb. Wt: wildtypisch, fl: gefloxtes Allel, ko: *knockout*, tg: Transgen, E: Embryo, M: Marker, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen, Restriktionsschnittstellen: gestrichelte Linien.

Ab dem Embryonaltag 16,5 p.c. wurde bei *Bdp1*^{fl/fl}; *Nestin*^{tg/wt}-Embryonen eine Wachstumsverzögerung im Vergleich zu Embryonen der gleichen Präparation beobachtet werden. Letztere waren entweder heterozygot gefloxt sowohl für das *Bdp1*-Allel als auch für das Transgen (*Bdp1*^{fl/wt}; *Nestin*^{tg/wt}) oder trugen das *Bdp1*-Allel hetero- oder homozygot (*Bdp1*^{fl/wt} oder *Bdp1*^{fl/fl}).

Da keine lebenden *Bdp1*^{fl/fl}; *Nestin*^{tg/wt}-Tiere geboren, aber homozygot *Bdp1*-deletierte Embryonen bis E18,5 p.c. detektiert wurden, musste der Zeitpunkt der

embryonalen Letalität zwischen E18,5 p.c. und P1 liegen. Makroskopisch zeigten *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen zwar eine Verzögerung in Ihrem Wachstum, es wurden jedoch keine Anzeichen einer Autolyse festgestellt. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass Tiere mit den entsprechenden Genotypen zwar geboren, aber die Entwicklungsretardierung so weit vorangeschritten sein musste, dass die Mäuse tot geboren bzw. kurz nach Geburt starben und direkt vom Muttertier gefressen wurden. Versuche, *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Nachkommen direkt nach der Geburt zu identifizieren, hatten nicht funktioniert.

5.6.3.2 Immunhistologische Untersuchungen

5.6.3.2.1 Übersichtsfärbungen

Um die genauen Umstände der embryonalen Letalität von *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen in späten Embryonalstadien näher zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt. Um einen Überblick der Entwicklung und eventueller progressiver Entwicklungsstörungen zu gewinnen, wurden Embryonen verschiedener Genotypen (*Bdp1^{wt/wt}*, *Bdp1^{fl/wt}*; *Nestin^{tg/wt}*, *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*) und Stadien (E15,5 p.c. bis E18,5 p.c.) präpariert und eingebettet. Anschließend wurden Präparate von zwei unterschiedlichen Schnittebenen (sagittal, koronar) angefertigt und jeweils eine Übersichtsfärbung mit HE von vergleichbaren Präparaten durchgeführt (3.2.4.1 und 3.2.4.2) (Abbildung 28 sagittal, Abbildung 29 koronar). An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass aufgrund technisch begrenzter Möglichkeiten nicht alle Präparate exakt in der gleichen Schnittebene lagen. Indem jeder Embryo eingebettet, komplett geschnitten, jedes zweite bis dritte Präparat gefärbt und fotografiert wurde, wurde der bestmögliche Vergleich zwischen den verschiedenen Tieren aufgestellt. Jede Aufnahme wurde ausgewertet, um entwicklungsspezifische Vorgänge nicht mit phänotypischen Merkmalen zu verwechseln.

Anhand der HE-gefärbten sagittalen und koronaren Schnitte konnte eine progressive Fehlentwicklung des ZNS von *Bdp1^{fl/fl}*, *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen im Vergleich zu Embryonen anderen Genotyps (*Bdp1^{wt/wt}*, *Bdp1^{fl/wt}*; *Nestin^{tg/wt}*) beobachtet werden. Ab dem Embryonaltag 15,5 p.c. wurden stark erweiterte laterale Ventrikel beobachtet, die ein gemeinsames Ventrikelsystem ausbildeten. Desweiteren wurde ein komprimierter *Cortex* sowie rudimentär angelegte Regionen von *Cerebellum*, *Diencephalon* und *Mesencephalon* beobachtet.

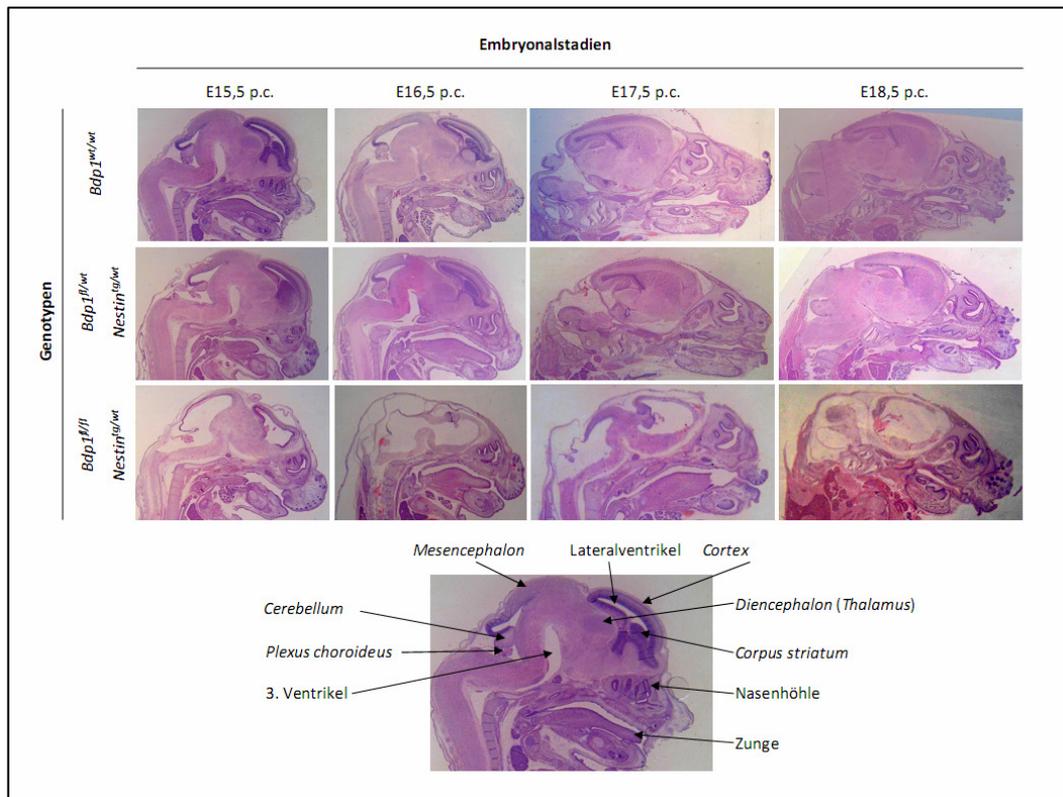


Abbildung 28: HE-Übersichtsfärbungen von sagittalen Schnitten

HE-gefärbte Sagittalschnitte von E15,5 p.c. bis E18,5 p.c. Die Legende beschreibt die wichtigsten Gehirnregionen. *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen zeigen im Verlauf der Entwicklung ein stark erweitertes Ventrikelsystem sowie rudimentär angelegte Regionen von *Cerebellum*, *Diencephalon* und *Mesencephalon*. Wt: wildtypisch, fl: gefloxtes Allel, tg: Transgen, E: Embryonalstadium, p.c.: *post coitum*.

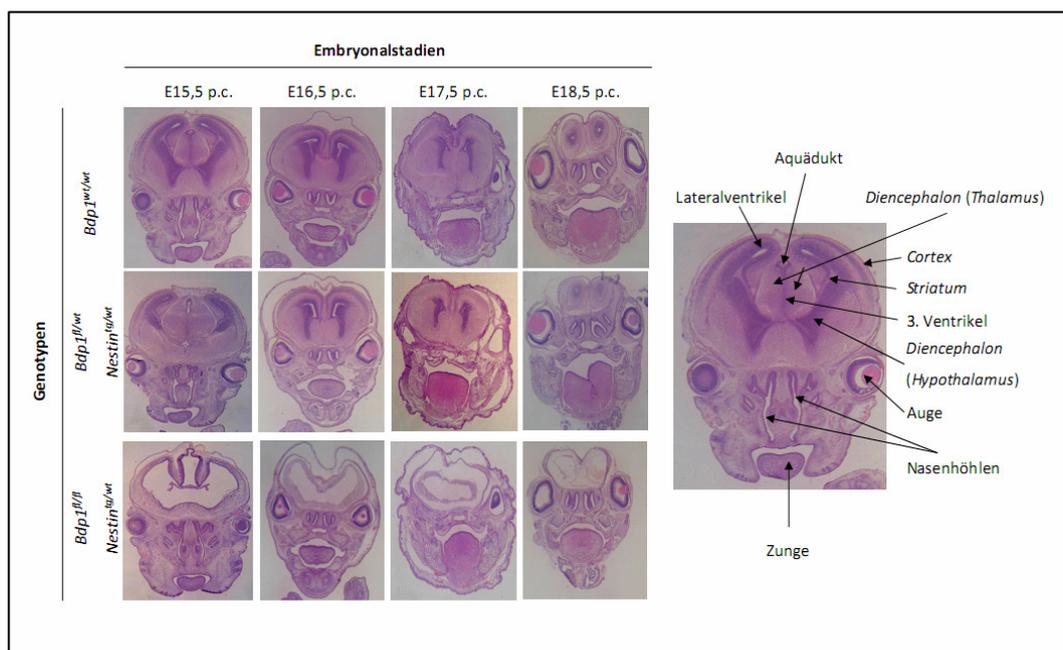


Abbildung 29: HE-Übersichtsfärbungen von koronaren Schnitten

HE-gefärbte Koronarschnitte von E15,5 p.c. bis E18,5 p.c. Die Legende beschreibt die wichtigsten Gehirnregionen. Die Ventrikel von *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen haben sich zu einem gemeinsamen Ventrikelsystem zusammengeschlossen, so dass einzelne Gehirnregionen kaum noch zu erkennen sind. Wt: wildtypisch, fl: gefloxtes Allel, tg: Transgen, E: Embryonalstadium, p.c.: *post coitum*.

5.6.3.2.2 Spezifische immunhistologische Färbungen

Um die makroskopischen Befunde von *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen (5.6.3.2.1) auf histologischer Ebene näher zu analysieren, wurden spezifische immunhistologische Färbungen koronarer Präparate der Embryonalstadien 15,5, 16,5 und 18,5 p.c. angefertigt (3.2.4.3). Aufgrund der Beobachtungen, dass *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen einen Zusammenschluss der Ventrikel zeigten, fiel der Fokus auf den linken und rechten Lateralventrikel. Der Schwerpunkt lag dabei in der Untersuchung der Zellproliferaton sowie im Nachweis apoptotischer Zellen.

Das Ki67-Antigen wird ausschließlich in proliferierenden Zellen (G1, S, G2 und M-Phase) exprimiert und ist somit ein Marker für die Zellteilung. Ruhende Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren das Antigen nicht (Scholzen and Gerdes 2000). Proliferativ aktive Zellen befinden sich in der ventrikulären Zone (Abbildung 30).



Abbildung 30: Übersichtsvergrößerung des lateralen linken Ventrikels

Verschiedene Zellschichten in den Lateralventrikeln (*Cortex*, intermediäre Zone, ventrikuläre Zone).

Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Ki67 wurden bei Schnitten vergleichbarer Ebene proliferativ aktive Zellen gefärbt und die Präparate verglichen (siehe Kapitel 3.1.9, Tabelle 11 und 12) (Abbildung 31). Anhand dieser Färbungen wurde gezeigt, dass sich in allen untersuchten Entwicklungsstadien von *Bdp1^{wt/wt}* und *Bdp1^{fl/wt}*; *Nestin^{tg/wt}*-Tieren

proliferativ aktive Zellen in der ventrikulären Zone der Lateralventrikel befanden. Allerdings zeigten $Bdp1^{fl/fl}$; $Nestin^{tg/wt}$ -Embryonen bereits ab dem Embryonaltag 15,5 p.c. eine nur schwach ausgeprägte Zone an teilungsaktiven Zellen, die im weiteren Verlauf der Entwicklung (E16,5 und E18,5 p.c.) augenscheinlich dünner wurde. Desweiteren erschien das Ventrikelgewebe am Embryonaltag 18,5 p.c. komplett zerstört, so dass kaum Ki67-positive Zellen nachgewiesen werden konnten.

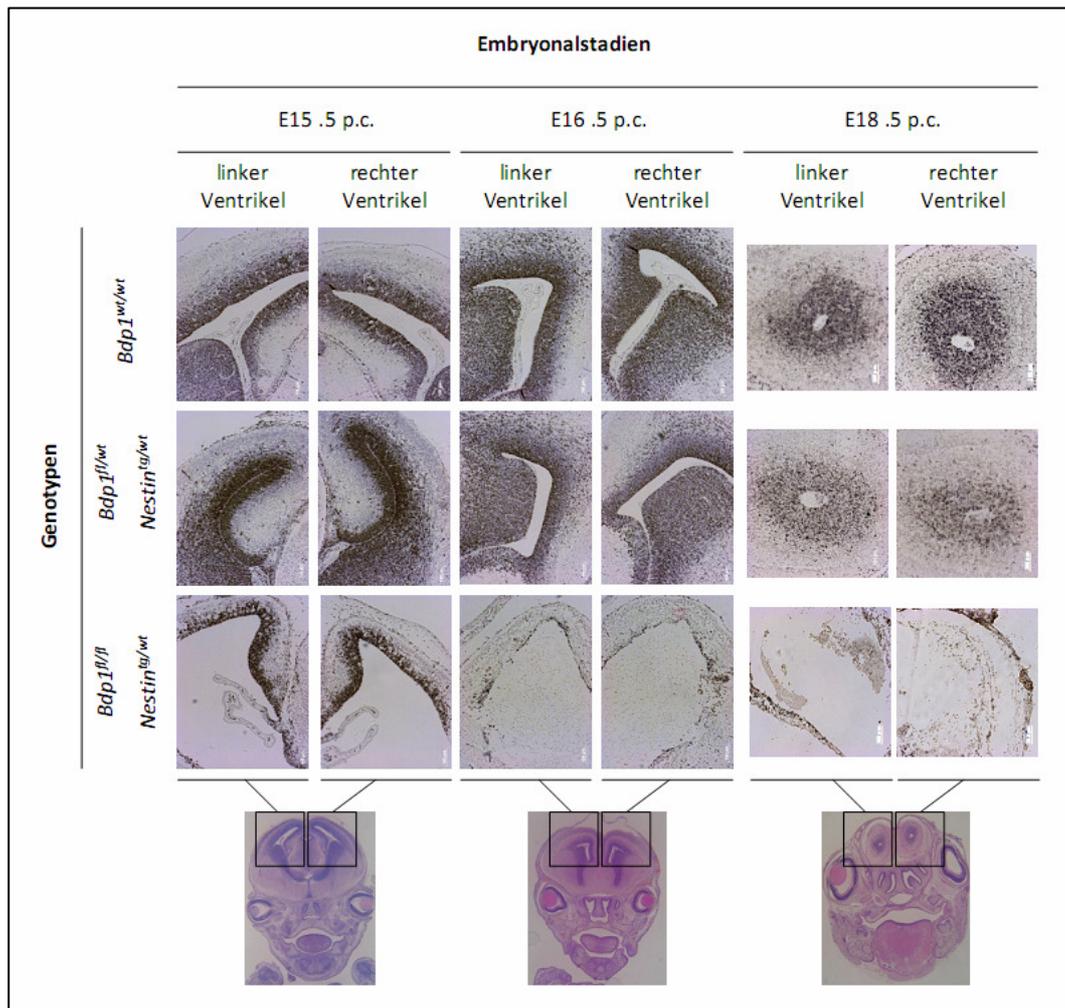


Abbildung 31: Ki67-Färbung koronarer Schnitte zur Visualisierung proliferativ aktiver Zellen

Ki-67-gefärbte Koronarschnitte der Stadien E15,5 p.c., E16,5 p.c. und E18,5 p.c.. Die Ausschnittsvergrößerung ist angedeutet. Die weißen Balken markieren jeweils 100 μm . In $Bdp1^{fl/fl}$; $Nestin^{tg/wt}$ -Embryonen ist nur eine geringe Anzahl an proliferativ aktiven Zellen detektierbar. Die einzelnen Zellschichten in den Lateralventrikeln sind nicht mehr zu erkennen und das Gewebe erscheint zerstört. Wt: wildtypisch, fl: gefloxtes Allel, tg: Transgen, E: Embryonalstadium, p.c.: *post coitum*.

Die ausgeprägte Dilatation der Ventrikel von *Bdp1^{fl/fl}*, *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen ließ vermuten, dass die in dieser Region befindlichen Zellen apoptotisch waren. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde eine spezifische Färbung für die aktivierte Caspase-3 durchgeführt. Diese zählt zu den sogenannten Effektorcaspasen und liegt in ihrer inaktiven Form als Procaspase-3 vor. In apoptotischen Zellen wird das Protein durch Spaltung aktiviert und ist mit anderen Proteinen in der Induktion Apoptose beteiligt (Slee et al. 1999). Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers wurden apoptotische Zellen in koronaren Präparaten vergleichbarer Schnittebenen nachgewiesen und verglichen (siehe Kapitel 3.1.9, Tabelle 11 und 12) (Abbildung 32). Dabei wurde ab dem untersuchten Embryonaltag 15,5 p.c. eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen in den Lateralventrikeln von *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen nachgewiesen und die Anzahl an apoptose-positiven Zellen schritt progressiv in der Entwicklung voran.

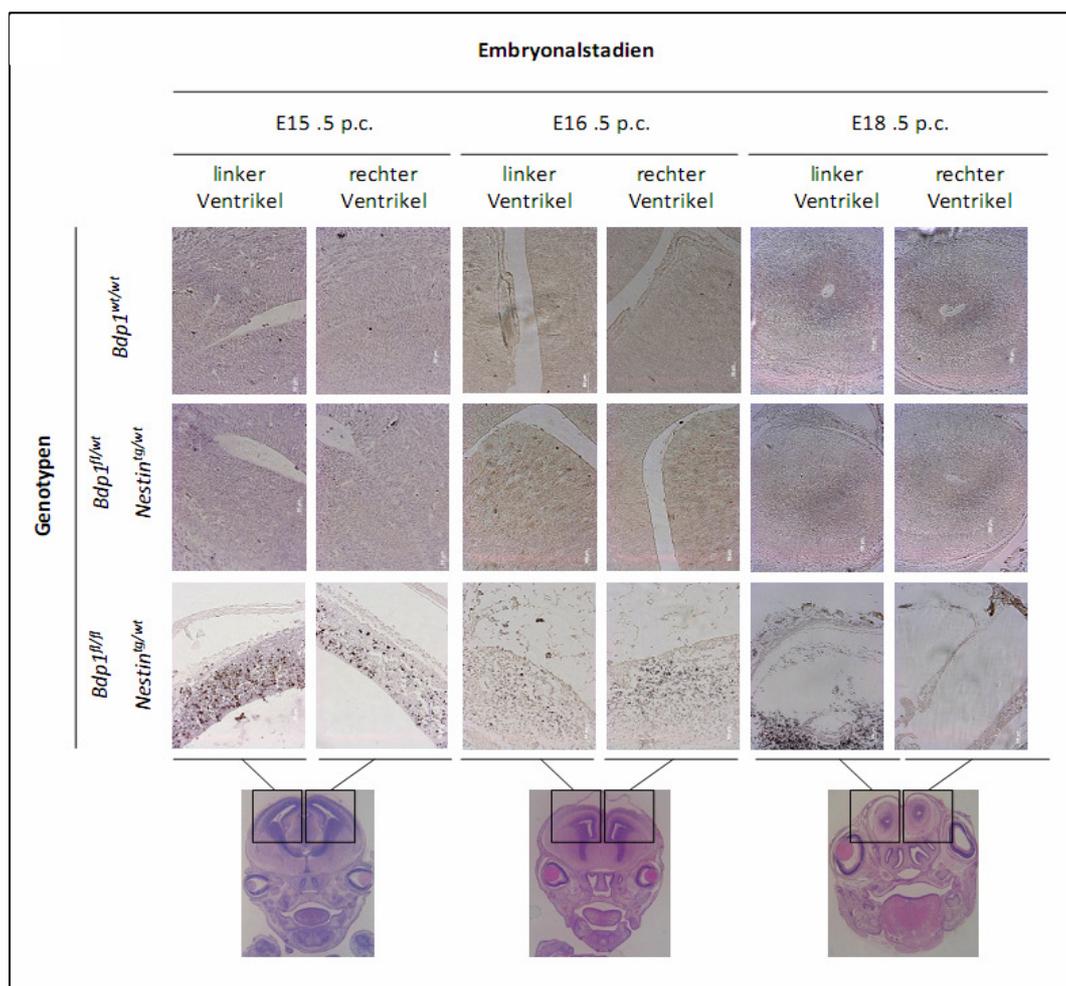


Abbildung 32: Aktivierte Caspase-3-Färbung koronarer Schnitte zur Visualisierung apoptose-positiver Zellen

Aktivierte Caspase-3-gefärbte Koronarschnitte der Stadien E15,5 p.c., E16,5 p.c. und E18,5 p.c. Die Ausschnittvergrößerung ist angedeutet. Die weißen Balken markieren jeweils 100 µm. In *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen ist eine erhöhte Anzahl an Caspase-3-positive Zellen in der proliferativ aktiven Zone der Ventrikel zu erkennen. Die positive Färbung gibt Hinweise auf eine Induktion der Apoptose. Wt: wildtypisch, fl: gefloxtes Allel, tg: Transgen, E: Embryonalstadium, p.c.: *post coitum*.

Die Ergebnisse einer ZNS-spezifischen Deletion des *Bdp1*-Gens spiegelten wichtige Funktionen des *Bdp1*-Gens während der Embryonalentwicklung des Gehirns wider. Der Verlust des *Bdp1*-Gens im ZNS führte zu Wachstumsverzögerungen, die mit schweren morphologischen Veränderungen in der gesamten Gehirnregion einhergingen und schließlich zur Letalität von *Bdp1^{fl/fl}*; *Nestin^{tg/wt}*-Embryonen zwischen E18,5 p.c. und P1 führte. Der Verlust der entsprechenden Gewebe durch Apoptose wurde mittels spezifischer immunhistologischer Färbungen bestätigt.

5.7 Der Einfluss von *Smn*-Deletionen auf *Bdp1*-Expressionen

Die Generierung eines *Bdp1-knockout*-Mausmodelles sollte weitere Erkenntnisse über einen eventuellen Zusammenhang zwischen *BDP1* und der atypischen Form der SMA liefern. Um *Bdp1*-Expressionen in Abhängigkeit von verschiedenen *Smn*-Deletionen zu untersuchen, wurde das *Bdp1^{ko/wt}*-Mausmodell (5.4) mit einem SMA-Mausmodell gekreuzt. Somit konnten die Auswirkungen einer hetero- oder homozygoten Deletion des *Smn*-Gens auf die *Bdp1*-Expression näher analysiert werden. Ein Genotyp, welcher die genomische Situation der Patienten Nr. 353 und Nr. 6432 hätte widerspiegeln können (*SMN1^{ko/ko}*; *BDP1^{ko/wt}*), konnte aufgrund der chromosomalen Anordnung des *Smn*- und des *Bdp1*-Gens nicht generiert werden (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5).

Das Genom der Maus weist nur ein Äquivalent zum humanen *SMN1* – das *Smn*-Gen – auf, nicht aber eines zu *SMN2* (DiDonato et al. 1999; DiDonato et al. 1997; Viollet et al. 1997). Für die hier beschriebenen Analysen wurde ein auf FVB/NCrl-basierendes transgenes SMA-Mausmodell verwendet, bei dem Tiere mit einem homozygoten *knockout* für das *Smn* und vier *SMN2*-Kopien überlebensfähig sind (*Smn^{ko/ko}*; *SMN2^{tg/tg}*) (Hsieh-Li et al. 2000;

Riessland et al. 2010). Die Tiere wurden in unserer Arbeitsgruppe sieben Generationen auf C57BL/6NCrl zurückgekreuzt (Ackermann, unveröffentlicht).

Für die Analysen wurden heterozygote *Bdp1*-knockout-Mäuse (*Bdp1*^{ko/wt}) mit SMA-Mäusen (*Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg}) verpaart und resultierende Nachkommen (*Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt}; *SMN2*^{tg/wt}) mit Hilfe spezifischer PCRs genotypisiert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 4 und Kapitel 11, Abbildung 42). Um Tiere mit verschiedenen Allelkombinationen bezüglich des *Bdp1*- und *Smn*-Gens bzw. des *SMN2*-Transgens zu generieren, wurden einerseits die oben beschriebenen Nachkommen untereinander verpaart, um das *Smn*-knockout-Allel und das *SMN2*-Transgen auf Homozygotie zu züchten. Andererseits wurden *Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt}; *SMN2*^{tg/wt}-Nachkommen erneut mit *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren verpaart, um Tiere ohne Transgen zu generieren. Um die *SMN2*-Kopienanzahl aller Nachkommen zu bestimmen, deren Eltern heterozygot für das Transgen waren, wurde die DNA dieser mit Hilfe des *Charge Switch gDNA Mini Tissue Kit* isoliert (3.2.1.1.2) und die Konzentration der DNA mit der *PicoGreen*-Methode bestimmt (3.2.1.4.2). Mittels quantitativer *Realtime*-Analysen konnte anschließend die *SMN2*-Kopienanzahl bestimmt werden (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 8).

Um die *Bdp1*-Transkriptmenge zu untersuchen, wurde RNA aus *Cerebrum* und *Cerebellum* von adulten Tieren verschiedener Genotypen isoliert (*Bdp1*^{wt/wt}; *Smn*^{ko/wt}, *Bdp1*^{wt/wt}; *Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg}, *Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt}, *Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt}; *SMN2*^{tg/wt}, *Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt}; *SMN2*^{tg/tg}) und die *Bdp1*-Expression zu *Rplp0* relativiert (siehe Kapitel 3.1.7, Tabelle 7) (Abbildung 33).

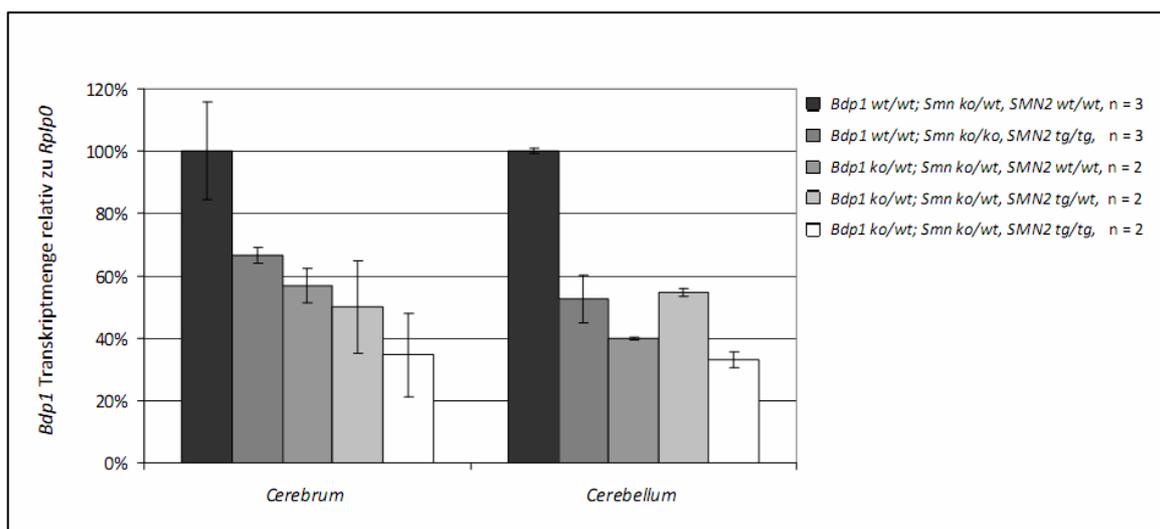


Abbildung 33: Quantitative *Realtime*-Analysen der *Bdp1*-Expressionen in hetero- und homozygot deletierten *Smn*-Tieren

Ergebnisse quantitativer *Realtime*-Analysen der *Bdp1*-Transkriptmenge von verschiedenen Genotypen (*Bdp1*^{wt/wt}; *Smn*^{ko/wt} (n=3), *Bdp1*^{wt/wt}; *Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg} (n=3), *Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt} (n=2), *Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt}; *SMN2*^{tg/wt} (n=2), *Bdp1*^{ko/wt}; *Smn*^{ko/wt}; *SMN2*^{tg/tg} (n=2)) in verschiedenen Geweben (*Cerebrum*, *Cerebellum*). Die Messungen erfolgten in Triplikaten und die Transkriptmengen wurden zu *Rplp0* relativiert. Bei allen Genotypen mit heterozygotem *Bdp1*-Allel wird in beiden Geweben eine Abnahme der *Bdp1*-Expression auf etwa 50 % gemessen. Ebenso zeigen Tiere, die wildtypisch für das *Bdp1*-Gen sind und einen homozygoten *knockout* für das *Smn*-Gen tragen (*Bdp1*^{wt/wt}; *Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg}), eine Herunterregulation der *Bdp1*-Transkription in *Cerebrum* und *Cerebellum* auf 65 % bzw. 50 %. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, tg: Transgen. Die Säulenfarben markieren die unterschiedlichen Genotypen. Signifikanzklassen: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001.

Die Ergebnisse quantitativer *Realtime*-Analysen der *Bdp1*-Expressionen ergaben bei allen untersuchten Genotypen mit einer heterozygoten Deletion für das *Bdp1*-Gen eine Herunterregulation der Transkription auf etwa 50 %. Diese Beobachtungen wurden sowohl im *Cerebrum* als auch im *Cerebellum* von heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren gemacht und entsprachen den Beobachtungen von 5.4.1.1. Tiere, die wildtypisch für das *Bdp1*-Gen, aber homozygot deletiert für das *Smn*-Gen waren, zeigten ebenfalls eine verringerte *Bdp1*-Transkriptmenge im *Cerebrum* und *Cerebellum* (65 % bzw. 50 %). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass der homozygote *knockout* des *Smn*-Gens einen regulativen Einfluss auf die *Bdp1*-Expression hatte.

5.8 Generierung eines *Bdp1*-spezifischen Antikörpers

Analysen des *Bdp1*-Gens auf Proteinebene waren aufgrund eines fehlenden Antikörpers nicht möglich. Versuche vorangegangener Arbeitskollegen, die Spezifität eines generierten *Bdp1*-Antikörpers zu bestätigen, hatten nicht funktioniert. Gegen Ende dieser Arbeit wurde die Generierung eines weiteren polyklonalen *Bdp1*-Antikörpers bei der Firma EUROGENTEC in Auftrag gegeben. Dazu zählten Epitopenalysen des *Bdp1*-Proteins und die Synthese entsprechender Peptide ($\alpha 215$, $\alpha 216$, siehe Kapitel 11, Abbildung 43). Die Epitope wurden so gewählt, dass die resultierenden Antikörper sowohl das murine als auch das humane Protein detektieren können. Jeweils zwei Kaninchen (Nr. 6620 und Nr. 6621) wurden dreimal in einem Abstand von je vier Wochen mit den Peptiden immunisiert. Zum Abschluss des Immunisierungsprogrammes (87 Tage) wurden die Tiere getötet, ausgeblutet und das Serum gewonnen. Die *Bdp1*-spezifischen Antikörper wurden abschließend von EUROGENTEC

mittels Affinitätschromatographie isoliert und die Qualität durch ELISA und SDS-PAGE bestimmt. Abschließend standen vier verschiedene Antikörper zur Verfügung (6619 α 215, 6619 α 216, 6620 α 215, 6620 α 216), die im Folgenden in Western Blot-Analysen und immunhistologischen Färbungen getestet wurden.

5.8.1 Proteinbiochemischer Nachweis des Bdp1-Proteins

Um die Spezifität der verschiedenen Antikörper zu testen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Dabei wurden sowohl verschiedene Blockingmethoden (BSA bzw. Milchpulver in TBST-Puffer) als auch unterschiedliche Membrantypen (Nitrocellulose- oder PVDF-Membran) ausgetestet (siehe Kapitel 11, Abbildung 44). Der Antikörper 6619 α 215 detektierte bei der Verwendung einer Nitrozellulosemembran und BSA zahlreiche Signale, die nicht spezifisch zugeordnet werden konnten. Da der Antikörper jedoch auch ein Signal auf Höhe des murinen Volllängeproteins von 270 kDa detektierte, wurde es für weitere Analysen verwendet.

Um die Spezifität des Antikörpers 6619 α 215 anhand muriner Proteinexpressionen von Tieren verschiedener Genotypen zu untersuchen, wurden erneut Western Blot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden Proteine aus *Cerebrum* und *Cerebellum* von adulten *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Mäusen isoliert und abschließend das Bandenmuster der Autoradiographie miteinander verglichen (Abbildung 34).

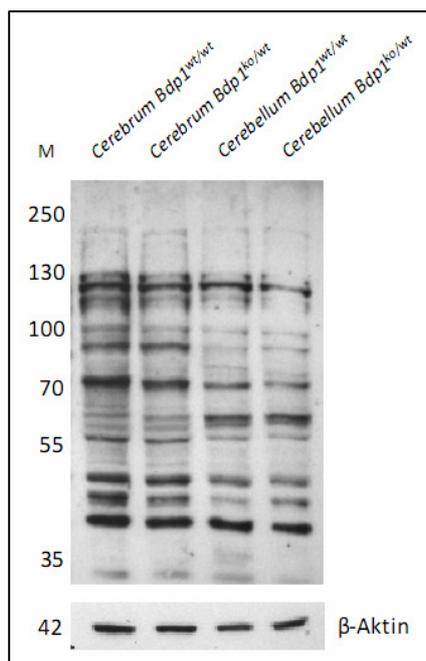


Abbildung 34: Bdp1-Antikörper 6619 α 215

Autoradiographie des Bdp1-Antikörpers 6619 α 215. Es wurde ein 8 %iges SDS-Gel verwendet. Die Gewebe sowie die Genotypen der getesteten Tiere sind angegeben. Für die Absättigung der Membran bzw. für die Verdünnung des Antiserums (1:500, ü.N.) wurde 6 % bzw. 2 % BSA in TBST verwendet. Sowohl innerhalb der Gewebe als auch zwischen den verschiedenen Genotypen ist ein identisches Bandenmuster zu erkennen. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, M: Marker

Anhand der Autoradiographie wurde sowohl ein identisches Bandenmuster zwischen den untersuchten Geweben als auch innerhalb der verschiedenen Genotypen festgestellt. Die Banden konnten keinen spezifischen murinen Isoformen zugeordnet werden, da diese in der Maus noch nicht beschrieben sind. Auf Höhe des Volllängeproteins wurde in den untersuchten Geweben kein Signal detektiert. Weiterhin wurde kein Expressionsunterschied zwischen Tieren mit verschiedenen Genotypen festgestellt.

Die Epitopanalysen wurden so konzipiert, dass sowohl das murine als auch das humane Protein detektiert werden konnte. Da von Analysen humaner Fibroblasten bereits Proteinisoformen beschrieben wurden (Kelter et al. 2000), wurden Proteinlysate von humanen und murinen Zelllinien erneut mittels Western Blot-Analysen analysiert und das Bandenmuster der Autoradiographie miteinander verglichen (die Proteinlysate der humanen Fibroblasten-Zelllinien wurden von Arbeitskollegen zur Verfügung gestellt) (Abbildung 35). Dabei wurde sowohl in humanen und als auch in murinen Zellen ein Signal entsprechend des BDP1/Bdp1-Volllängeproteins (293 kDa bzw. 270 kDa) detektiert (siehe Pfeil). Die bereits beschriebene humane Isoform von 75 kDa - die mit einem humanspezifischen BDP1-Antikörper nachgewiesen wurde - konnte nicht detektiert werden (Kelter et al. 2000).

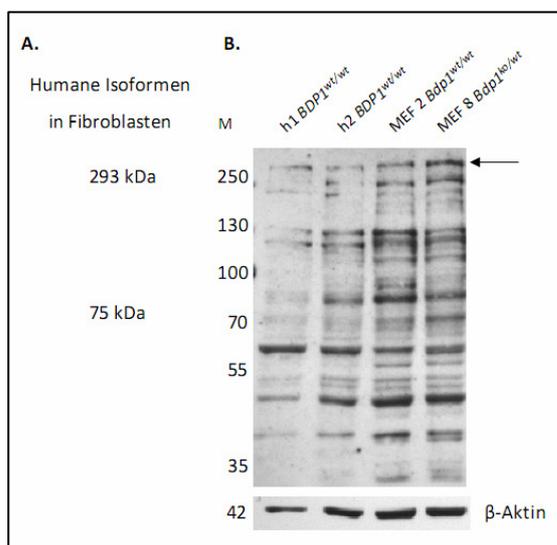


Abbildung 35: Vergleich humaner und muriner Bdp1-Proteine in Western Blot-Analysen

(A.) Bekannte BDP1-Isoformen in humanen Fibroblasten. Die Detektion erfolgte mit einem humanspezifischen Antikörper (Kelter et al. 2000).

(B.) Autoradiographie detektierter BDP1/Bdp1-Signale in humanen Fibroblasten und MEF mit Hilfe des Bdp1-Antikörpers 6619 α 215. In humanen und in murinen Zelllinien wurde ein Signal auf Höhe der Volllängeproteine detektiert (293 kDa bzw. 270 kDa)

(Pfeil). Die humane Isoform von 75 kDa konnte mit dem Antikörper 6619 α 215 nicht nachgewiesen werden. Für die Analysen wurde ein 8 % SDS-Gel verwendet. Die Zelllinien und Genotypen sind angegeben. Für die Absättigung der Membran bzw. für die Verdünnung des Antiserums (1:500, ü.N.) wurde 6 % bzw. 2 % BSA in TBST verwendet. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, h1: Fibroblasten-Zelllinie ML60, h2: Fibroblasten-Zelllinie ML67, MEF: murine embryonale Fibroblasten, M: Marker (kDa).

Um zwischen unspezifischen und spezifischen Signalen unterscheiden zu können, wurden *Bdp1^{fl/fl}*-MEF mittels HTN-Cre-Protein *in vitro*-deletiert und für zwei Wochen kultiviert. *Mock*-behandelte Zellen dienten dabei der Kontrolle. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen wurde erneut die Spezifität des Bdp1-Antikörpers 6619α215 getestet (Abbildung 36). Obwohl alle detektierten Banden in HTN-Cre-behandelten MEF schwächer erschienen als im Vergleich zu *Mock*-Zellen, wurden auf einer Höhe von 270 kDa und 80-90 kDa keine Signale mehr detektiert. Diese Größen könnten somit dem Volllängeprotein als auch einer murinen Isoform des Bdp1-Proteins entsprechen.

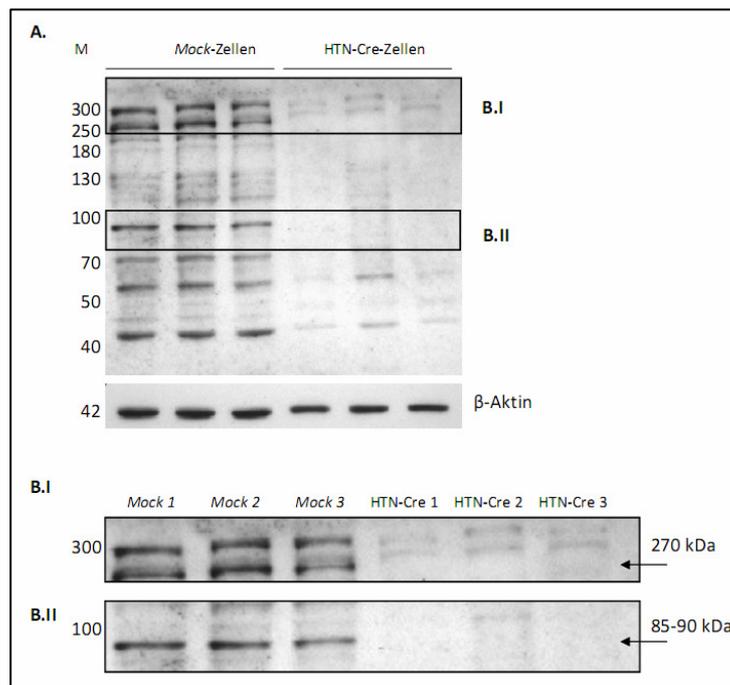


Abbildung 36: Nachweis des Bdp1-Proteins in HTN-Cre-behandelten *Bdp1^{fl/fl}*-MEF

(A.) Autoradiographie von *Mock*- bzw. HTN-Cre-behandelten *Bdp1^{fl/fl}*-MEF. Es wurde ein 8 %iges SDS-Gel verwendet. Für die Absättigung der Membran bzw. für die Verdünnung des Antikörpers (6619α215, 1:500, ü.N.) wurde 6 bzw. 2 % BSA in TBST verwendet. (B.I+B.II) Ausschnittsvergrößerungen aus der in A. gezeigten Autoradiographie. Im Gegensatz zu *Mock*-behandelten Zellen wird bei HTN-Cre-behandelten Zellen auf einer Höhe von 270 kDa und 85-90 kDa kein Signal detektiert. M: Marker (kDa).

5.8.2 Immunhistologischer Nachweis des Bdp1-Proteins

Bdp1 ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIB und somit als Komplex im Kern lokalisiert. Um immunhistologisch die Spezifität des Antikörpers 6619α215 zu untersuchen, wurden *Bdp1^{wt/wt}* und *Bdp1^{ko/wt}*-MEF fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Bdp1-Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:50) und das Protein mit Hilfe eines fluoreszierenden

sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 488, grün) visualisiert. Parallel erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (blau) (3.2.4.4). Aufgrund der Lokalisation des TFIIIB-Komplexes wurde eine Färbung der Zellkerne erwartet (Abbildung 37).

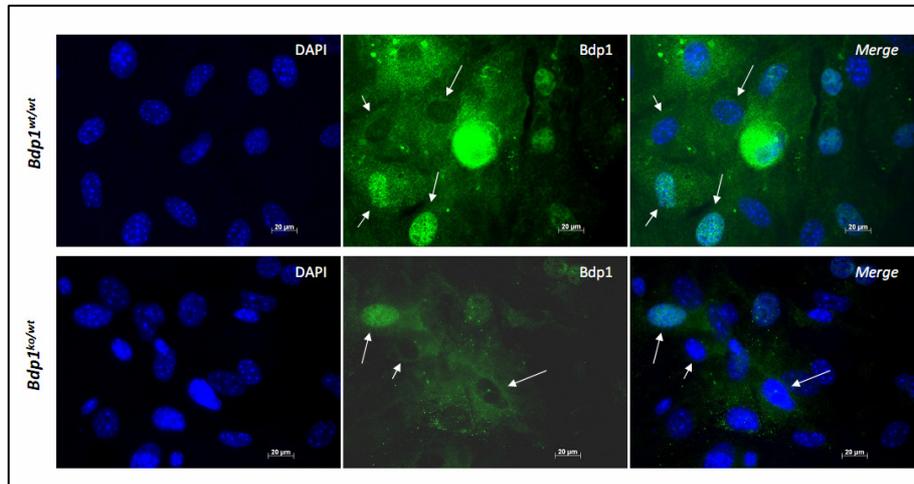


Abbildung 37: Fluoreszenzfärbungen von $Bdp1^{wt/wt}$ und $Bdp1^{ko/wt}$ -MEF

Immunhistologischer Nachweis des Bdp1-Proteins in MEF mit Hilfe des Antikörpers 6619 α 215. Gezeigt sind die Einzelfärbungen der Kerne (DAPI, blau), die Bdp1-Färbung (grün) sowie eine Überlagerung der einzelnen Aufnahmen (*merge*). Die Pfeile deuten Bdp1-gefärbte und ungefärbte Zellkerne an, die sowohl in $Bdp1^{wt/wt}$ als auch in $Bdp1^{ko/wt}$ -MEF zu finden sind. Die weißen Balken markieren jeweils 20 μ m. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*.

Die Fluoreszenzfärbungen zeigten eine deutliche Färbung der Zellkerne sowohl in $Bdp1^{wt/wt}$ als auch in $Bdp1^{ko/wt}$ -Zellen. Es wurde jedoch kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt. Bei Zellen beider Genotypen wurden zusätzlich nicht-gefärbte Kerne detektiert (Pfeile *merge*-Bilder).

Anhand von Analysen im humanen *Cerebellum* ist bekannt, dass das *BDP1*-Gen verstärkt in der Körnerzellschicht exprimiert wird (Kelter et al. 2000). Da das murine Bdp1 auf Proteinebene eine 98%-99 %ige Homologie zum humanen BDP1-Protein aufweist (siehe Kapitel 1.2.4, Tabelle 1), ist auch in der Maus von einer erhöhten Expression im *Cerebellum* auszugehen. Diese könnte somit zum Austesten der Spezifität des Bdp1-Antikörpers herangezogen werden. Zu diesem Zweck wurde das gesamte Gehirn von $Bdp1^{wt/wt}$ - und $Bdp1^{ko/wt}$ -Tieren isoliert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Sagittalpräparate vom *Cerebellum* angefertigt und spezifisch mit dem Antikörper 6619 α 215 inkubiert (Verdünnung 1:50) (3.2.4.1 und 3.2.4.3) (Abbildung 38).

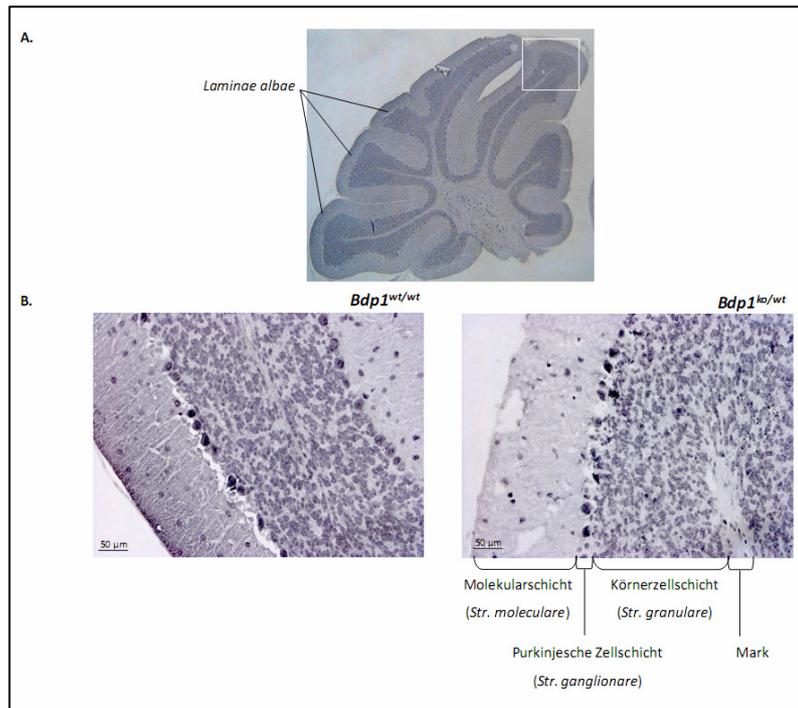


Abbildung 38: Bdp1-Färbung sagittaler Präparate des *Cerebellums* von *Bdp1^{wt/wt}* und *Bdp1^{ko/wt}*-Tieren

Immunhistologischer Nachweis des Bdp1-Proteins im murinen *Cerebellum* mit Hilfe des Antikörpers 6619α215 (A.) Sagittalschnitt des *Cerebellums* mit den einzelnen *Laminae albae*. Die weiße Umrandung deutet die in B. gezeigten Ausschnittsvergrößerungen an. (B.) Ausschnittsvergrößerung des in A. markierten Bereiches von *Bdp1^{wt/wt}* und *Bdp1^{ko/wt}*-Mäusen. Die Bdp1-Färbung ist bei beiden Genotypen verstärkt in der Körnerzellschicht zu erkennen. Schwarzen Balken markieren jeweils 50 µm. Wt.: wildtypisch, ko.: *knockout*, Str.: *stratum*.

Die mit dem Bdp1-Antikörper 6619α215 gefärbten Präparate des *Cerebellums* von *Bdp1^{wt/wt}* und *Bdp1^{ko/wt}*-Tieren zeigten eine erhöhte Expression des Bdp1-Proteins in der Körnerzellschicht. Zusätzlich wurden Purkinjenzellen angefärbt, wohingegen in der Molekularschicht nur einzelne Zellkerne angefärbt wurden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit Hilfe von Western Blot-Analysen die Spezifität des Bdp1-Antikörpers 6619α215 nicht bestätigt werden konnte. Immunhistologische Färbungen zeigten erste Hinweise darauf, dass der Antikörper mit hoher Wahrscheinlichkeit das Bdp1-Protein detektierte.

6. Diskussion

Grundlage dieser Arbeit waren zwei Patienten (Nr. 353, Nr. 6432), bei denen neben der SMA atypische Symptome in Form einer Gehirnatrophie diagnostiziert wurden. Beide Patienten zeigten große Deletionen innerhalb der SMA-Region, jedoch wurden benachbarte Gene wie *SERF1*, *BIRC* und *GTF2H2* als Kandidatengene ausgeschlossen (Burglen et al. 1997; Carter et al. 1997; Roy et al. 1995; Scharf et al. 1998). Bei Patientin Nr. 353 konnte zusätzlich eine *de novo*-aufgetretene Mutation nachgewiesen werden, die auch Marker für das *BDP1*-Gen einschlossen (Wirth et al. 1997) - dieses flankiert die SMA-Region auf der telomerischen Seite (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5). Somit lag die Vermutung nah, dass eine Deletion des *BDP1*-Gens bei beiden SMA-Patienten ursächlich für die Ausbildung einer Gehirnatrophie gewesen sein könnte. Im Zuge dieser Arbeit sollten die kausalen Zusammenhänge zwischen einer Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens und der Ausbildung atypischer Formen der SMA geklärt werden.

6.1 Die Auswirkungen einer Haploinsuffizienz und die Umlagerung von chromosomalen Abschnitten

Der Einfluss einer Genhaploinsuffizienz auf die Pathogenese ist für eine Reihe an Erkrankungen bzw. Genen beschrieben. So trägt z.B. die Haploinsuffizienz des *Fibrillin-1*-Gens (*FBN1*) zur komplexen Pathogenese des Marfan-Syndroms - einer Erkrankung des Bindegewebes - bei (Belsing et al. 2011; Judge et al. 2004). Mutationen im murinen *Shank3*-Gen eröffnen neue Möglichkeiten, die Haploinsuffizienz des Autismus assoziierten *SHANK3*-Gens im Menschen besser zu untersuchen (Bozdagi et al. 2010). Eine *FAS*-Haploinsuffizienz ist ursächlich bei Patienten mit autoimmunem lymphoproliferativem Syndrom (ALPS) (Kuehn et al. 2011) - hierbei handelt es sich um einen Defekt der Apoptose in Lymphozyten (Madkaikar et al. 2011). Die Haploinsuffizienz des murinen *Col3a1*-Gens bietet erstmals Möglichkeiten, die Pathogenese des Ehlers-Danlos Syndrom - einer Gruppe genetischer Bindegewebserkrankungen - genauer zu untersuchen (Callewaert et al. 2008; Smith et al. 2011). Weiterhin wird vermutet, dass die Haploinsuffizienz des *Jagged1*-Gens (*JAG1*) primär für die Entwicklung des Alagille Syndroms - einer Erkrankung, die vorwiegend die Gallengänge in der Leber betrifft - verantwortlich ist (McCright et al. 2002; Wen and Song 2010). Das Williams-Beuren Syndrom ist ein sehr gutes Beispiel dafür, dass auch größere

Deletionen auf einem chromosomalen Abschnitt eine Haploinsuffizienz zur Folge haben können (Sakurai et al. 2011) – hier liegt eine große Deletion auf dem chromosomalen Abschnitt 7q11.23 vor. Anhand dieser verschiedenen Beispiele wird deutlich, dass eine Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens durchaus ursächlich für die Bildung einer Gehirnatrophie, wie sie bei zwei SMA-Patienten beschrieben wurde, sein kann.

Bei Patientin Nr. 353 wurde zusätzlich eine *de novo*-Mutation beschrieben, die auf ein *rearrangement* - also auf eine Neuordnung chromosomaler Abschnitte - zurückzuführen war. Diese Neuordnung hatte letztlich wahrscheinlich die Deletion des *BDP1*-Gens zur Folge. Verschiedene Literaturbeispiele zeigen, dass sowohl *de novo*-Mutationen als auch *genomic rearrangements* kein ungewöhnliches Ereignis darstellen (Berkovic et al. 2006; Gauthier et al. 2010; Northup et al. 2011; Pellestor et al. 2011; Salahshourifar et al. 2011; Wieser et al. 2005). *Genomic rearrangements* - zu ihnen zählen Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Translokationen und andere Umlagerungen (Emanuel and Shaikh 2001; Stankiewicz and Lupski 2002) - haben oft Veränderungen in der Kopienanzahl von Genen zur Folge, was als *copy number variation* (CNV) bezeichnet wird. Diese sind in der Regel nicht pathogen und etwa 12 % des humanen Genoms gehören CNV-Regionen an (Hastings et al. 2009). Manchmal stehen *genomic rearrangements* und CNVs im Zusammenhang mit einer Reihe von neurologischen Entwicklungsstörungen (z.B. Williams-Beuren Syndrom, Angelman und Prader-Willi Syndrom, Miller-Dieker Syndrom) sowie neurodegenerativen Erkrankungen (SMA, Parkinson, Alzheimer) (Lee and Lupski 2006). CNVs treten an bestimmten Stellen im Genom auf, sogenannten *low copy repeats* (LCR) (Hastings et al. 2009). Größe, Orientierung und die Distanz zwischen den Kopien sind verantwortlich für die Häufigkeit eines *rearrangements* an den LCRs. Auch bei der humanen SMA-Region handelt es sich um eine invertierte und duplizierte Region, welche die Gene *SMN*, *SERF*, *BIRC*, *GTF2H2* und *OCLN* beinhaltet (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5A) (Lefebvre et al. 1995). Umlagerungen von chromosomalen Abschnitten wären in dieser Region durchaus möglich. Die chromosomale Anordnung der SMA-Region könnte somit ursächlich für den Verlust des *BDP1*-Gens bei beiden SMA-Patienten mit zusätzlicher Gehirnatrophie gewesen sein.

Ob eine Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens letztlich für die Ausbildung einer Gehirnatrophie verantwortlich war, sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von verschiedenen Mausmodellen geklärt werden. Im Folgenden Abschnitt soll kurz auf einige Problematiken während der Generierung dieser Tiere eingegangen werden.

6.2 Die Generierung eines *Bdp1*-Mausmodelles

Nach aktuellen Angaben konnten 15.187 Orthologe im humanen und murinen Genom nachgewiesen werden, die etwa 80 % des humanen und 75 % des murinen Genoms repräsentieren (Church et al. 2009). Das *Bdp1*-Gen repräsentiert das Ortholog zum humanen *BDP1*-Gen und ist im murinen Genom auf Chromosom 13 lokalisiert. Die Proteine zeigen eine 98 %-99 %ige Identität auf Aminosäureebene. Somit bestanden gute Voraussetzungen, um mit Hilfe eines Mausmodelles die phänotypischen Auswirkungen einer *Bdp1*-Deletion zu untersuchen (siehe Kapitel 1.2.4, Tabelle 1).

In Vorarbeiten wurde eine Strategie für einen konditionalen *knockout* des *Bdp1*-Gens in der Maus konzipiert. Das *Bdp1-targeting*-Konstrukt wurde weitestgehend in eigenen Vorarbeiten kloniert, verifiziert und in embryonale Stammzellen (ES-Zellen, V6.5) (Eggan et al. 2002) transfiziert. Nach Verpaarung chimärer Nachkommen mit wildtypischen C57BL/6NCrl-Tieren konnte keine Keimbahntransmission des rekombinanten *Bdp1*-Allels bestätigt werden. Daraufhin wurde das Transfektionsexperiment wiederholt - dabei lag die Rekombinationseffizienz mit 0,625 % relativ hoch im Vergleich mit Literaturangaben ($1:10^6$ bis $1:10^9$, Schenkel 2006). Nach der Verpaarung neu generierter Chimären mit wildtypischen C57BL/6NCrl-Mäusen konnte schließlich eine Keimbahntransmission des rekombinanten *Bdp1*-Allels nachgewiesen werden. So generierte Tiere mit dem Genotyp *Bdp1*^{*flneo/wt*} dienten als Ausgangslinie für alle in dieser Arbeit generierten *Bdp1*-Linien. Das *Bdp1-targeting*-Konstrukt erlaubte es, das Gen sowohl ubiquitär als auch konditional auszuschalten.

Trotz des ersten Fehlversuches wurde unter der Verwendung der genetisch hybriden V6.5 ES-Zellen (C57BL/6, 129/Sv) (Eggan et al. 2002) eine Keimbahntransmission des rekombinanten *Bdp1*-Allels erreicht, welche stabil an die nächsten Generationen vererbt wurde. Der Erfolg einer Keimbahntransmission hängt mitunter von den verwendeten ES-Zellen ab. Genetisch hybride Zellen besitzen oft eine höhere Transfektionseffizienz als jene mit einem genetisch reinen Hintergrund. Desweiteren haben hybride ES-Zellen häufig ein größeres Potential bei der Generierung von chimären Nachkommen, da sich die Zellen im Vergleich zu den ES-Zellen der Akzeptor-Blastozyste mindestens gleich schnell teilen. Bei hybriden Zellen erhöht sich die Anzahl an rekombinanten ES-Zellen innerhalb der Blastozyste und umso größer wird die Wahrscheinlichkeit, dass auch rekombinante Keimbahnzellen generiert werden. Die Unterschiede im Grad des Chimärismus der Tiere sind somit auf die

jeweilige Teilungsgeschwindigkeit der Donorzellen in der Akzeptorblastozyste zurückzuführen (Torres 1997).

Weiterhin ist der Erfolg einer Keimbahntransmission von der Anzahl der Passagen der ES-Zellen (Fedorov et al. 1997) und von der Qualität der expandierten ES-Zellklone am Injektionstag abhängig. Ebenso spielen die Anzahl und die Qualität der injizierten Blastozysten und der erfolgreiche Transfer der manipulierten Blastozysten in eine Ammenmutter eine wichtige Rolle (Carwright 2009). Letztlich könnten die hier aufgeführten Punkte den geschilderten ersten Fehlversuch mit V6.5 ES-Zellen erklären.

6.3 Der Phänotyp von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

Mit der Generierung von heterozygot deletierten *Bdp1*-Mäusen (*Bdp1*^{ko/wt}) sollte der Zusammenhang zwischen einer Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens und der Ausbildung einer Gehirnatrophie, wie sie bei zwei SMA-Patienten beobachtet wurde, geklärt werden. Entgegen der Erwartungen zeigten *Bdp1*^{ko/wt}-Tiere keine phänotypischen Auffälligkeiten. Die Tiere waren lebensfähig und fertil, womit sich der Phänotyp erheblich von dem Phänotyp der SMA-Patienten mit atypischen Symptomen unterschied.

Es ist nicht ungewöhnlich, dass ein generiertes Mausmodell nicht den vergleichbaren Phänotyp zeigt, wie er beim Menschen beobachtet wurde (Elsea and Lucas 2002). Bei Patienten mit Alagille Syndrom wurden entweder Mutationen im *Jagged1*- oder *Notch2*-Gen nachgewiesen. Die Patienten leiden neben Gallenstauungen auch an Erkrankungen des Auges bzw. des Sehnerven (Samejima et al. 2007). Heterozygot deletierte Mäuse für das *Jagged1*-Gen (*Jag1*^{ko/wt}) entwickeln zwar Augendefekte, zeigen jedoch keine weiteren charakteristischen Symptome der Erkrankung (McCright et al. 2002; Xue et al. 1999). Nicht immer repräsentiert das Mausmodell das gesamte Spektrum einer Erkrankung, wie im Fall der Chorea Huntington. Huntington zählt zu den Trinukleotiderkrankungen, bei denen das Basentriplett CAG bis zu 250mal wiederholt vorliegt (Walker 2007). Es existieren eine Reihe von Mausmodellen (Transgene Tiere, *knockin*-Mäuse), die alle ihren eigenen Phänotyp entwickeln und nicht die humane Pathogenese widerspiegeln (Crook and Housman 2011). Der homozygote Verlust des *PALB2*-Gens führt zu der Ausbildung der Fanconi Anämie - einer Erkrankung mit angeborenen Fehlbildungen (Daumen, Unterarme, Niere, Herz, Speiseröhre), Rückbildung des Knochenmarks, Pigmentanomalien und erhöhtem Leukämierisiko (Valeri et al. 2011). Im Gegensatz dazu führt eine homozygote Deletion des murinen Orthologs *Palb2*

zur embryonalen Letalität (Bouwman et al. 2011). Diese Beispiele verdeutlichen, dass die komplexe humane Pathogenese nicht immer mit Hilfe eines Mausmodelles reflektiert werden kann. Allerdings sollte dabei beachtet werden, dass der Phänotyp eines Mausmodelles von verschiedenen Faktoren, wie z.B. dem genetischen Hintergrund des verwendeten Mausstammes oder der *targeting*-Strategie, abhängt (Barthold 2004; Crusio 2002; Wolfer et al. 2002) - die verschiedenen SMA-Mausmodelle repräsentieren diesen Einfluss beispielhaft (siehe Kapitel 1.3.6) (Hsieh-Li et al. 2000; Michaud et al. 2010; Schrank et al. 1997).

Letztlich konnte der Zusammenhang zwischen einer Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens und der Ausbildung einer Gehirnatrophie nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse könnten einerseits darauf hinweisen, dass die großen Deletionen innerhalb der SMA-Region bei beiden Patienten mit atypischer Gehirnatrophie eine wichtige Rolle bei der Pathogenese gespielt haben könnten und es sich um ein *contiguous gene syndrom* gehandelt hat. Andererseits wäre es auch möglich, dass weitere Gene in der SMA-Region für die Ausbildung atypischer Symptome verantwortlich gewesen waren. Im Jahr 2010 wurden verschiedene Mutationen im *Occludin*-Gen (*OCLN*) mit der Ausbildung des Pseudo-TORCH-Syndroms beschrieben (O'Driscoll et al. 2010). Das Syndrom beschreibt eine kalzifizierende Enzephalopathie mit interkranialer Verkalkung. MRT-Aufnahmen von Patienten zeigen eine progressiv zunehmende Gehirnatrophie mit einhergehender Kalzifizierung der Basalganglien. *OCLN* selbst ist ein Plasmamembranprotein, gehört zur Gruppe der Claudine und ist somit eine der Hauptkomponenten von *tight junctions* (Ando-Akatsuka et al. 1996; Furuse et al. 1993). Das *OCLN*-Gen ist auf dem chromosomalen Abschnitt 5q13, distal zum *SMN1*-Gen und in direkter Nachbarschaft zum *BDP1*-Gen lokalisiert (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5A). Aufgrund der Lokalisation zum *SMN1*-Gen und der Ausbildung einer Gehirnatrophie bei neun Pseudo-TORCH Patienten mit Mutationen im *OCLN*-Gen, könnte auch *OCLN* ein Kandidatengen für die Ausbildung einer SMA mit Gehirnatrophie gewesen sein. Weiterführende Analysen hierzu werden zurzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

6.4 Analysen des TFIIB-Komplexes und Interaktionspartner von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren und murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

Zwar konnte mit Hilfe von heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren (*Bdp1*^{ko/wt}) der Zusammenhang zwischen einer *BDP1*-Haploinsuffizienz und der Ausbildung einer Gehirnatrophie nicht bestätigt werden, dennoch bot das Modell zahlreiche Möglichkeiten, die Funktionen des *Bdp1*-Gens *in vivo* zu untersuchen.

Das *BDP1*-Gen ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktor IIB-Komplexes (TFIIB; *BDP1*, *BRF1/2*, *TBP*) und zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren (TFIIIA, TFIIC) für den Aufbau des Initiationskomplexes der RNA Polymerase III (RNA Pol III) verantwortlich (Geiduschek and Kassavetis 2001). Diese transkribiert niedermolekulare, nicht-proteinkodierende Gene (Geiduschek and Tocchini-Valentini 1988), wie z.B. tRNAs, 5S rRNAs und U6 snRNAs (Weinmann and Roeder 1974). Die Bindung von TFIIB an den Initiationskomplex trägt zur Beugung der DNA bei und fördert somit die Zugänglichkeit für die RNA Pol III (Braun et al. 1992). Desweiteren stabilisiert die SANT-Domäne des *BDP1*-Proteins den TFIIB-Komplex und trägt zum Öffnen des Promotors bei (Kassavetis et al. 1990; Kassavetis et al. 1998; Shah et al. 1999).

Tumorsuppressorgene und Onkogene übernehmen wichtige regulatorische Funktionen der RNA Pol III-abhängigen Transkription – dies geschieht meistens über die Regulation des TFIIB-Komplexes (siehe Kapitel 1.1.4, Abbildung 3) (Marshall and White 2008). Die Tumorsuppressoren *p53* und *RB* binden an TFIIB und wirken inhibierend auf den gesamten Komplex (Crighton et al. 2003; Sutcliffe et al. 2000). Die Onkogene *ERK* und *MYC* hingegen wirken aktivierend auf TFIIB und somit auf die gesamte Transkription der RNA Pol III (Felton-Edkins et al. 2003; Gomez-Roman et al. 2003).

Mit Hilfe von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren wurden die Auswirkungen einer heterozygoten *Bdp1*-Deletion auf den TFIIB-Komplex und auf interagierende Tumorsuppressoren und Onkogene näher untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Transkript- und Proteinmengen aller Faktoren des TFIIB-Komplexes (*Tbp*, *Brf1*, *Bdp1*) und die ausgewählter Interaktionspartner (*TFIIC102*, *Erk*, *Myc*, *p53*, *Rb*) im *Cerebrum* und *Cerebellum* von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren mittels *Realtime*- und Western Blot-Analysen bestimmt.

In heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren wurde eine Herunterregulation der *Bdp1*-Transkriptmenge auf etwa 50 % detektiert. Somit war kein Dosiskompensationseffekt für die Aufrechterhaltung der Proteinfunktion verantwortlich (Chow and Heard 2010) und der Verlust eines *Bdp1*-Allels schien keine weiteren Auswirkungen auf die Funktion des Proteins *per se* zu haben. Diese Beobachtungen sprachen zusätzlich gegen eine pathologische Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens.

Weiterhin wurde eine Herunterregulation der TFIIB-Untereinheit *Tbp* auf Transkript- und Proteinebene im *Cerebellum* heterozygot deletierter *Bdp1*-Tiere beobachtet. So könnte z.B. durch den heterozygoten Verlust des *Bdp1*-Gens die stabilisierende Wirkung des *Bdp1*-Proteins auf den TFIIB-Komplex aufgehoben sein und die *Tbp*-Expression beeinflussen. Da eine Herunterregulation von *Tbp* jedoch nur im *Cerebellum*, und nicht im *Cerebrum* von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren beobachtet wurde, müsste man dem *Bdp1*-Protein eine gewebespezifische Funktion zuweisen. Unterstützt wird dieser Gedanke durch die Tatsache, dass im humanen *Cerebellum* eine erhöhte *BDP1*-Expression in der Körnerzellschicht vorliegt (Kelter et al. 2000) - somit könnte der heterozygote Verlust eines *Bdp1*-Allels im *Cerebellum* stärkere Auswirkungen als in anderen Geweben haben. Ebenso könnte die erst kürzlich für die RNA Pol III beschriebene gewebespezifische Regulation der Transkription einen Einfluss auf die *Tbp*-Expression haben (Nikitina et al. 2011).

Bei den Analysen ausgewählter Interaktionspartner (Erk, Myc, p53, Rb) des TFIIB-Komplexes im *Cerebrum* und *Cerebellum* heterozygot deletierter *Bdp1*-Tiere wurde weitestgehend von allen untersuchten Kandidaten eine Herunterregulation auf RNA- und Proteinebene beobachtet. Besonders auffällig war die starke Abnahme der Tumorsuppressoren p53 und Rb im *Cerebellum* von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren. Beide Proteine inhibieren die RNA Pol III-abhängige Transkription über den TFIIB-Komplex, indem z.B. p53 an die TFIIB-Untereinheit TBP bindet (Crighton et al. 2003). Die genauen Interaktionen von RB zu TFIIB sind bislang nicht beschrieben, jedoch unterbindet die Bindung von RB die Interaktionen zu TFIIC102 (Sutcliffe et al. 2000). Desweiteren ist bekannt, dass RB mit zwei Untereinheiten von SNAP_c wechselwirkt und so den TFIIB-Komplex reguliert (Hirsch et al. 2000).

Eine Herunterregulation der Tumorsuppressoren p53 und Rb hätte eine erhöhte Aktivität der RNA Pol III-Transkription zur Folge - und diese korreliert mit der Entstehung von Krebs (Wang et al. 2003; White 2004). In einer Reihe von Krebserkrankungen sind *p53* und

RB mutiert. So liegen z.B. beim weißen Hautkrebs über 90 % Mutationen im *p53*-Gen vor (Gervin et al. 2003). Mäuse mit einem heterozygot deletierten *p53*-Allel zeigen ein erhöhtes Risiko, an Hautkrebs zu erkranken (Jiang et al. 1999). Weiterhin finden sich *p53*-Mutationen bei verschiedenen Typen von Darmkrebs und anderen Tumoren (Levine et al. 1991). Mutationen im *RB*-Gen sind ursächlich für die Ausbildung eines Retinoblastom - einem bösartigen Tumor der Netzhaut (Friend et al. 1986; Fung et al. 1987). Eine Überexpression von *RB* kann die Transkription der RNA Pol III komplett inhibieren (Chu et al. 1997), wohingegen murine embryonale Fibroblasten (MEF) mit einem homozygoten *knockout* für das *Rb*-Gen (*Rb*^{ko/ko}) eine erhöhte Transkription der RNA Pol III aufweisen (Larminie et al. 1997; White et al. 1996).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Herunterregulation von *p53* und *Rb* in heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren ein Indiz für eine erhöhte RNA Pol III-Aktivität sein könnte - auf diesen Aspekt soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden. Außerdem könnte bei diesen Tieren ein erhöhtes Krebsrisiko vorliegen. Untersuchungen in diese Richtung wurden bislang nicht gemacht, stellen jedoch einen interessanten Aspekt für zukünftige Arbeiten dar.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen heterozygot deletierter *Bdp1*-Tiere zeigten Untersuchungen an *Bdp1*^{ko/wt}-MEF eine Heraufregulation der TFIIIB-Untereinheit *Tbp* auf Transkriptebeine und größtenteils der untersuchten Interaktionspartner. Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zu den Beobachtungen, die im *Cerebrum* und *Cerebellum* von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren gemacht wurden. Hier muss allerdings beachtet werden, dass die Gewebetypen nicht direkt vergleichbar sind. Da MEF aus Embryonen am Tag E13,5 p.c. gewonnen werden, könnten Unterschiede im Expressionsniveau entwicklungs- und gewebespezifische Ursachen haben, wie es bereits für eine Anzahl an Genen in der Maus gezeigt wurde (Yang et al. 2006). Um jedoch eine genaue Aussage treffen zu können, müssten Messungen der Transkriptmengen in verschiedenen Geweben von *Bdp1*^{wt/wt}- und *Bdp1*^{ko/wt}-Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien durchgeführt werden.

6.5 U6 snRNA-Expression im *Cerebellum* von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren

Aufgrund der verringerten Proteinmengen von *p53* und *Rb* in *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren lag die Vermutung nah, dass bei Tieren dieses Genotyps eine erhöhte Aktivität der RNA Pol III vorliegen könnte. Tatsächlich konnte mittels Northern Blot-Analysen eine dreimal stärkere

Expression der U6 snRNA im *Cerebellum* heterozygot deletierter *Bdp1*-Tiere im Vergleich zu wildtypischen Tieren nachgewiesen werden.

Die U6 snRNA ist eine von insgesamt fünf *small nuclear* RNAs, die zusammen im Zellkern mit spezifischen Proteinen assoziiert und einen snRNP-Komplex (*small nuclear ribonucleoprotein particle*) ausbilden. Dieser wiederum ist für die Ausbildung des Spleißosoms verantwortlich (Dunn and Rader 2010; Valadkhan and Jaladat 2010). Erkrankungen, die auf eine Überexpression von U6 snRNA-Transkripten zurückzuführen sind, wurden bislang nicht beschrieben (Marshall and White 2008). In verschiedenen Krebszelllinien konnte jedoch eine erniedrigte U6 snRNA-Expression nachgewiesen werden (Cabarcas et al. 2010). Mutationen in U4 snRNA-Transkripten wurden im Zusammenhang mit MOPD I (*microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I*) beschrieben (Edery et al. 2011; He et al. 2011). Die Krankheit zeichnet sich unter anderem durch eine postnatale Wachstumsverzögerung, Fehlbildungen des Skeletts sowie einer Mikrozephalie und weiteren Gehirnfehlbildungen aus.

Interessanterweise wurde ein Anstieg an U6 snRNA-Transkripten nur im *Cerebellum* von heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren detektiert - ähnlich den Beobachtungen, die unter 6.4 beschrieben wurden. Aufgrund dieser Tatsache wird die Hypothese verstärkt, dass dem *Bdp1*-Protein eine gewebespezifische Funktion zugeschrieben werden kann. Weiterhin könnte dem Protein auch eine promotorspezifische Regulation zugewiesen werden, da die U6 snRNA einen Promotor der Klasse 3 besitzt (Dieci et al. 2007). Aber auch hier sei nochmal erwähnt, dass die Transkription der RNA Pol III nicht nur gewebespezifisch reguliert, sondern auch von den Transkripten der Klasse 3-Promotoren bestimmt wird (Nikitina et al. 2011).

Fasst man nun die Beobachtungen aus 6.4 - Abnahme der Tbp-Proteinmenge durch eine eventuelle Destabilisierung des TFIIIB-Komplexes und verringerte Proteinmengen der Tumorsuppressoren p53 und Rb in *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren - mit den Ergebnissen diesen Kapitels - Zunahme an U6 snRNA-Transkripten in heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren - zusammen, ließe sich folgendes Modell postulieren (Abbildung 39):

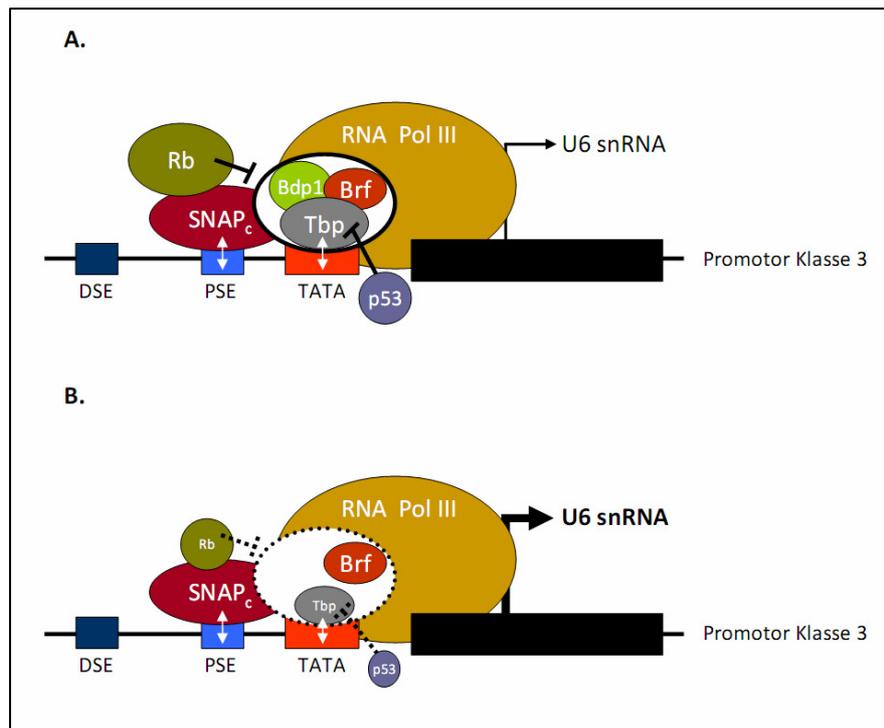


Abbildung 39: Auswirkung einer *Bdp1*-Deletion auf die U6 snRNA-Expression im *Cerebellum* heterozygot deletierter *Bdp1*-Tiere (hypothetisch)

(A.) Wildtypisches *Bdp1*-Allel. SNAP_c bindet an PSE und rekrutiert den TFIIB-Komplex mit seinen einzelnen Untereinheiten (Bdp1, Brf, Tbp; TFIIB-Komplex ist umrandet). Tbp bindet an die TATA-Box (Protein-DNA-Interaktionen sind durch weiße Pfeile dargestellt). Der Tumorsuppressor Rb bindet an SNAP_c und inhibiert den TFIIB-Komplex, p53 bindet an Tbp und wirkt ebenfalls inhibierend auf die RNA Pol III-abhängige Transkription.

(B.) Situation bei einem heterozygoten *Bdp1*-Allel. Aufgrund der Expressionsminderung liegt Bdp1 nicht im TFIIB-Komplex vor, der Komplex ist a.) instabil und b.) Tbp ist herunterreguliert (instabiler TFIIB-Komplex mit gestrichelter Linie umrandet). SNAP_c bindet an PSE (weißer Pfeil) - möglicherweise ist die Rekrutierung von TFIIB an den Initiationskomplex nicht mehr möglich. Rb bindet an SNAP_c, ist jedoch herunterreguliert (kleiner gezeichnet), so dass der TFIIB-Komplex nicht inhibiert wird. Ebenso ist p53 herunterreguliert (kleiner gezeichnet), so dass eine p53-vermittelte Inhibition über Tbp aufgehoben ist. Folglich könnte eine erhöhte U6 snRNA-Transkription die Folge einer *Bdp1*-Deletion sein. Die Positionen der einzelnen Elemente sind relativ zum Transkriptionsstartpunkt und zur Richtung angegeben (Pfeil). DSE: distales Sequenzelement, PSE: proximales Sequenzelement, TATA: TATA-Box oder TATA-Elemente. Proteine, Sequenzelemente und Relationen sind nicht massstabsgetreu gezeichnet.

6.6 Der Einfluss von *Smn*-Deletionen auf *Bdp1*-Expressionen

Bei zwei Patienten (Nr. 353, Nr. 6432), die neben der SMA atypische Merkmale in Form einer Gehirnatrophie entwickelten, lagen große Deletionen innerhalb der SMA-Region vor. Zwar konnte die Größe der Deletionen nicht im Mausmodell wiedergegeben werden, dennoch

wurden heterozygot deletierte *Bdp1*-Tiere (*Bdp1*^{ko/wt}) mit SMA-Mäusen verpaart (*Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg}) (Hsieh-Li et al. 2000; Riessland et al. 2010), um den Einfluss von *Smn*-Deletionen auf *Bdp1*-Expressionen zu untersuchen. Ein Genotyp, welcher die genomische Situation der Patienten hätte widerspiegeln können (*SMN1*^{ko/ko}; *BDP1*^{ko/wt}), konnte aufgrund der chromosomalen Anordnung des *Smn*- und *Bdp1*-Gens nicht generiert werden (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5A).

Sowohl im *Cerebrum* als auch im *Cerebellum* aller getesteten Genotypen, in denen das *Bdp1*- und *Smn*-Allel heterozygot deletiert vorlag, wurde - unabhängig von der Kopienanzahl des *SMN2*-Transgens - eine Reduktion der *Bdp1*-Transkriptmenge um etwa 50 % detektiert. Aufgrund der Expressionsanalysen von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren (6.4) waren diese Ergebnisse nicht unerwartet. Interessanterweise wurde jedoch auch im *Cerebrum* und *Cerebellum* von Tieren, die wildtypisch für das *Bdp1*-Gen und homozygot deletiert für das *Smn*-Gen waren und das *SMN2*-Transgen trugen (*Bdp1*^{wt/wt}; *Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg}), eine Herunterregulation der *Bdp1*-Transkriptmenge auf etwa 50 % detektiert. Demnach hatte die Deletion des *Smn*-Gens Einfluss auf die *Bdp1*-Expression.

Das die Deletion eines Gens Einfluss auf die Expression benachbarter, wildtypischer Gene haben kann, soll anhand des Williams-Beuren Syndrom verdeutlicht werden. Zu den Merkmalen der Erkrankung zählen kognitive Behinderungen und die Patienten leiden unter anderem an Minderwuchs, Fehlsichtigkeit, Skoliose und Nierenfehlbildungen (Burn 1986). Die Erkrankung wird durch eine heterozygote, etwa 1,6 Mb große Deletion auf dem chromosomalen Abschnitt 7q11.23 verursacht, die ein *contiguous gene syndrome* zur Folge hat (Bayes et al. 2003; Lee and Lupski 2006). In diesem deletierten Abschnitt sind etwa 25-30 Gene lokalisiert (DeSilva et al. 2002; Merla et al. 2002). Interessanterweise konnte von Genen, welche die deletierte Region flankieren, eine Herunterregulation der Genexpression gezeigt werden. Vermutlich wurden durch die Deletionen weitreichende, *cis*-regulatorische Elemente zerstört (Kleinjan and van Heyningen 2005; Merla et al. 2006).

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass auch bei Mäusen, die homozygot deletiert für das *Smn*-Gen sind, *cis*-regulatorische Sequenzen zerstört sein könnten, welche die wildtypische *Bdp1*-Expression beeinflussen. Mittels Proteomanalysen konnte bei dem von Monani generierten SMA-Mausmodell gezeigt werden, dass bei einer homozygoten Deletion des *Smn*-Gens 26 von insgesamt 144 untersuchten Proteinen des *Hippocampus* eine verringerte Expression vorlag (Monani et al. 2000; Wishart et al. 2010). Aufgrund der Nähe des *Smn*-

Gens zu dem *Bdp1*-Gen auf dem Chromosom 13 (siehe Kapitel 1.2.4, Abbildung 5B) könnte weiterhin die Möglichkeit bestehen, dass durch eine *Smn*-Deletion die Promotorregion des *Bdp1*-Gens verändert wurde. Weiterführende Analysen werden zurzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

6.7 Analysen des homozygoten *Bdp1*-knockouts

Bei allen untersuchten Nachkommen heterozygoter Verpaarungen ($Bdp1^{ko/wt} \times Bdp1^{ko/wt}$) wurden keine homozygot deletierten *Bdp1*-Nachkommen detektiert. Daraus schlussfolgernd führte der homozygote *knockout* des *Bdp1*-Gens zur Letalität im Embryonalstadium.

Homozygot deletierte *Bdp1*-Embryonen ($Bdp1^{ko/ko}$) wurden im Morula- (E2,5 p.c.) und im Blastozystenstadium (E3,5 p.c.) detektiert. Isolierte $Bdp1^{ko/ko}$ -Embryonen hatten sich am Tag E3,5 p.c. noch nicht zur Blastozyste ausgebildet. Nach zwei bis drei Tagen in Kultur wurden bei Embryonen dieses Genotyps keine Furchungsvorgänge beobachtet und die einzelnen Blastomeren erschienen disorganisiert. Durch die beschriebene fehlende *in vitro*-Differenzierung wurden bestimmte Zellgruppen (innere Zellmasse [IZM], Trophoektoderm) nicht ausgebildet. Der Zeitpunkt der Letalität von $Bdp1^{ko/ko}$ -Embryonen lag somit im Präimplantationsstadium (um E2,5 p.c.).

In der Literatur sind verschiedene Beispiele von Transkriptionsfaktoren beschrieben, deren homozygoter *knockout* zur embryonalen Letalität im Präimplantationsstadium führt. Der Transkriptionsfaktor *Tead4* übernimmt wichtige Funktionen in der *Cdx2*-Regulation. Homozygot deletierte *Tead4*-Embryonen ($Tead4^{ko/ko}$) sterben an E2,5 p.c., da *Cdx2* für die Differenzierung von Trophoblastenzellen in der sich entwickelnden Morula verantwortlich ist (Strumpf et al. 2005; Yagi et al. 2007). Ein homozygoter *knockout* für den Transkriptionsfaktor *Rfx1* führt zur embryonalen Letalität vor E2,5 p.c. (Feng et al. 2009a) - das Gen spielt eine wichtige Funktion in der Regulation des Glutamat-3- und des Interleukin-5-Rezeptors (Ma et al. 2006). Der Transkriptionsfaktor *Klf4* (Li et al. 2005) ist zusammen mit anderen Faktoren - unter anderem *Oct3/4* (Niwa et al. 2000), *Nanog* (Mitsui et al. 2003), *Sox2* (Avilion et al. 2003) und *Myc* (Cartwright et al. 2005) - für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) verantwortlich. Embryonen, die homozygot für *Klf4* deletiert sind, sterben vor der Implantation (vor E4,5 p.c.) (Ema et al. 2008).

Die oben aufgeführten Beispiele verdeutlichen, dass die Gründe einer embryonalen Letalität nach einem homozygoten Verlust eines bestimmten Gens vielseitig sein können. Im Fall einer sehr frühen Letalität bis E4,5 p.c. - wie bei *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen beobachtet - liegen oft generelle molekulare Defekte im Energiehaushalt und im RNA-Metabolismus vor oder es kommt zu Problemen während der Mitose (Copp 1995). Die Störungen können zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten, wie z.B. während der Furchungsprozesse im Morula- bzw. Blastozystenstadium. Meistens weisen solche Embryonen Chromosomenanomalien auf (Magnuson et al. 1985). Diese Anomalien stellen auch beim Menschen einen der Hauptgründe eines Aborts im Präimplantationsstadium dar (Alberman and Creasy 1977).

Betrachtet man die Funktionen des Bdp1-Proteins - Untereinheit des Transkriptionsfaktor III-B-Komplexes und essentiell für die RNA Pol III-abhängige Transkription sowie deren Regulation – und die phänotypischen Auswirkungen homozygoter Deletionen der weiteren TFIIIB-Untereinheiten (*Brf1*, *Tbp*), war die embryonale Letalität abzusehen. Embryonen mit einem homozygoten *Tbp-knockout* (*Tbp*^{ko/ko}) sterben im 30 bis 40-Zellstadium (Martianov et al. 2002). Heterozygot deletierte *Tbp*-Tiere (*Tbp*^{ko/wt}) hingegen entwickeln keine phänotypischen Auffälligkeiten – ähnlich den Beobachtungen von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren. Allerdings wurde eine Haploinsuffizienz des humanen *TBP*-Gens mit Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht (Rooms et al. 2006). Embryonen mit einem homozygoten *knockout* für die TFIIIB-Untereinheit *Brf1* sterben aufgrund der fehlenden Fusion von *Chorion* und *Allantois* um E10,5 p.c. (Stumpo et al. 2004). Somit scheint *Brf1* in der sehr frühen Embryonalentwicklung (vor Nidation) eine weniger wichtige Rolle wie *Bdp1* und *Tbp* einzunehmen. Jedoch reflektieren die phänotypischen Auswirkungen der einzelnen *knockouts* der TFIIIB-Untereinheiten die essentielle Bedeutung während der Entwicklung.

Die genauen Ursachen für die frühe embryonale Letalität von *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen konnten nicht abschließend geklärt werden. Analysen weiterführender Versuche (6.8) ließen jedoch vermuten, dass eine homozygote *Bdp1*-Deletion die Induktion einer Apoptose zur Folge hatte.

6.8 Analysen eines konditionalen *Bdp1-knockouts*

Eine homozygote Deletion des *Bdp1*-Gens führte zu einem letalen Phänotyp im Präimplantationsstadium (um E2,5 p.c.). Somit waren weiterführende funktionelle Analysen des *Bdp1*-Gens nicht möglich. Aufgrund des verwendeten *targeting*-Konstruktes (siehe

Kapitel 4.2, Abbildung 10) konnte jedoch eine konditionale Deletion des *Bdp1*-Gens induziert werden.

Um die Funktion des Bdp1-Proteins im Gehirn - dem bei SMA-Patienten mit atypischen Verlauf primär betroffenen Gewebe - näher zu untersuchen, wurde ein homozygoter *knockout* des *Bdp1*-Gens im sich entwickelnden Zentralnervensystem (ZNS) (ab E11,0 p.c.) (Tronche et al. 1999) induziert. Dieser führte zur embryonalen Letalität zwischen E18,5 p.c. und P1. Ab dem Embryonaltag 16,5 p.c. wurde bei *Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}*-Embryonen eine Wachstumsverzögerung beobachtet. Anhand von Übersichtsfärbungen verschiedener Embryonalstadien konnte bei *Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}*-Embryonen eine massiv gestörte Gehirnentwicklung gezeigt werden, die bis zum Embryonaltag 18,5 p.c. progressiv zunahm. Gehirnregionen wie *Cerebellum*, *Diencephalon* und *Mesencephalon* waren nur noch rudimentär zu erkennen. Somit lagen Fehlentwicklungen in allen Bereichen vor, die als Vorstufen der Gehirnentwicklung angesehen werden (siehe Kapitel 1.3.2, Abbildung 7).

Das *Diencephalon* entwickelt sich zusammen mit dem *Telencephalon* aus dem *Prosencephalon* (Yazici et al. 2011). Sowohl *Thalamus* als auch *Hypothalamus* sind Abkömmlinge des *Diencephalons*. Der *Hypothalamus* steuert die Hormonausschüttung der *Hypophyse*, zu denen verschiedene Wachstumshormone zählen (Epelbaum 1992). Aufgrund des rudimentär angelegten *Diencephalons* war davon auszugehen, dass sowohl *Hypothalamus* als auch *Hypophyse* in *Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}*-Embryonen nicht angelegt wurden und die Wachstumsverzögerung auf die fehlende Hormonausschüttung zurückzuführen war.

Zusätzlich zu den rudimentär angelegten Gehirnarealen wurden bei *Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}*-Embryonen stark erweiterte Lateralventrikel beobachtet, die sich - zusammen mit den anderen Ventrikeln - zu einem gemeinsamen Ventrikelsystem zusammenschlossen. Die pathologischen Ursachen für die Erweiterung von Ventrikeln gehen oft auf die Entwicklung eines *Hydrocephalus* zurück (Ulfig et al. 2004). Ein *Hydrocephalus* ist eine multifaktorielle Gehirnerkrankung, die entweder durch eine Überproduktion, gestörte Zirkulation oder fehlerhafte Absorption der Gehirnrückenmarksflüssigkeit (*Liquor, cerebrospinal fluid, CSF*) verursacht wird (Rekate 2008, 2009). Die Ursachen dafür sind sehr variabel und können genetischen Ursprungs sein. So führen z.B. Duplikationen im *L1CAM*-Gen zur Ausbildung eines X-Chromosomal-gekoppelten *Hydrocephalus* (Van Camp et al. 1993; Weller and Gartner 2001). Weiterhin kann die Pathophysiologie eines *Hydrocephalus* von Mutationen in den *Aquaporinen* abhängen (Filippidis et al. 2010) - *Aquaporine* sind Wasserkanäle, die den

Transport von verschiedenen Molekülen des CSF in das umliegende Gewebe gewährleisten (Tait et al. 2008; Verkman 2009). Mehrere Studien belegen den Zusammenhang zwischen Mutationen in den *Aquaporinen* und der Ausbildung eines *Hydrocephalus* (Bloch et al. 2006; Feng et al. 2009b; Oshio et al. 2005). Abgesehen von genetisch bedingten Ursachen kann ein *Hydrocephalus* auch die Folge einer Gehirnblutung sein, durch Erkrankungen wie Meningitis oder Tumorbildung und durch Kopfverletzungen verursacht werden (Crews et al. 2004).

Ob die Ausbildung eines *Hydrocephalus* bei *Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}*-Embryonen primär oder sekundär auf eine *Bdp1*-Deletion im ZNS zurückzuführen war, konnte nicht geklärt werden. Oft hat die homozygote Deletion eines spezifischen Gens im Gehirn die Ausbildung eines *Hydrocephalus* als sekundären Effekt zur Folge, wie z.B. die *Nestin*-Cre-vermittelte Deletion von *Pak4* (Tian et al. 2011). *Pak4* gehört zu der Familie B der Serin/Threonin-Kinasen und ist für die Organisation des Zytoskeletts mitverantwortlich (Jaffer and Chernoff 2002). Der homozygote Verlust des *Pak4*-Gens führt zu einer Abnahme der Proliferation in den neuronalen Vorläuferzellen des ZNS und hat sekundär die Ausbildung eines *Hydrocephalus* zur Folge. Allgemein wurden eine Reihe von Gen-*knockouts* beschrieben, die Defekte in der Proliferation oder die Induktion einer Apoptose zur Folge haben und mit Gehirnfehlbildungen einhergehen (Camarero et al. 2006; Cappello et al. 2006; Ke et al. 2007; McFarland et al. 2006). Anhand von spezifischen Färbungen wurde gezeigt, dass bei *Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}*-Embryonen keine proliferativen Defekte im Ventrikelgewebe vorlagen. Parallel wurde bei diesen Embryonen eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen nachgewiesen. Obwohl Apoptose auch während der normalen Entwicklung eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Geweben spielt (Meier et al. 2000), war die Anzahl an Caspase-positiven Zellen in *Bdp1^{fl/fl}; Nestin^{tg/wt}*-Embryonen im Vergleich zu Kontrollgenotypen stark erhöht. Interpretiert man die hier beschriebenen Beobachtungen im Zusammenhang mit Literaturangaben, wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die ZNS-spezifische Deletion des *Bdp1*-Gens primär den Untergang des ventrikulären Gewebes und sekundär die Ausbildung eines *Hydrocephalus* zur Folge hatte. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass das hier verwendete *Nestin*-Cre-Transgen (Tronche et al. 1999) stets im heterozygoten Zustand gehalten wurde, da die Homozygotie des Transgens selbst zur Ausbildung eines *Hydrocephalus* führt (Forni et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das *Bdp1*-Gen eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung des Gehirns einnimmt. Der homozygote Verlust des Gens im ZNS

fürte zu Wachstumsverzögerungen, die mit schweren morphologischen Veränderungen in der gesamten Gehirnregion einhergingen und schließlich zur Letalität der Embryonen zwischen E18,5 p.c. und P1 führte. Mit Hilfe von spezifischen Färbungen wurde eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen in der proliferativ aktiven Zone der Ventrikel nachgewiesen, was mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ausbildung eines *Hydrocephalus* zur Folge hatte.

6.9 Verifizierung eines Bdp1-spezifischen Antikörpers

Im Jahr 2000 wurden in unserer Arbeitsgruppe neben dem *BDP1*-Volllängetranskript verschiedene humane Spleißvarianten identifiziert, die teilweise gewebespezifisch exprimiert werden (Kelter et al. 2000). Außerdem wurde eine erhöhte Expression in der Körnerzellschicht des humanen *Cerebellums* detektiert (Kelter et al. 2000). Die unterschiedlichen Transkriptgrößen waren auf alternative Spleißprozesse zurückzuführen, welche für die *BDP1*-prä-mRNA beschrieben wurden (*BDP1* Δ 15: alternatives Spleißen von Exon 15 (Kelter et al. 2000), *BDP1* Δ 18-39: alternatives Spleißen von Exon 18 bis Exon 39 (Schramm et al. 2000), *BDP1* Δ 33-39: alternatives Spleißen von Exon 33 bis Exon 39 (Kelter et al. 2000)). Die identifizierten Spleißvarianten spiegelten sich auch auf Proteinebene wider und mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte das Volllängeprotein bei 283 kDa nachgewiesen werden (neueste Angaben NCBI: 293 kDa; siehe Kapitel 1.2.4, Tabelle 1,). Weitere Signale wurden bei 150 kDa, 100 kDa, 90 kDa, 75 kDa und 70 kDa detektiert und entsprachen anderen Isoformen (Kelter 2000).

In der Literatur ist für das murine Bdp1-Protein bislang nur das Volllängeprotein beschrieben (270 kDa; siehe Kapitel 1.2.4, Tabelle 1). Spleißvarianten des *Bdp1*-Gens und Proteinisoformen sind nicht bekannt, jedoch aufgrund der großen Homologie beider Proteine (98 %-99 % auf Aminosäurenebene) sehr wahrscheinlich. Ein entsprechender Antikörper, der das murine Bdp1-Protein detektiert, ist nicht verfügbar. Somit konnten proteinbiochemische Analysen nicht durchgeführt werden. Versuche früherer Arbeitskollegen, einen bei einer Firma generierten Bdp1-Antikörper zu etablieren, hatten nicht funktioniert. Aus diesem Grund wurde bei der Firma EUROGENTEC ein weiterer, polyklonaler Antikörper generiert und die Spezifität im Rahmen dieser Arbeit ermittelt. Die Epitopenalysen wurden so ausgelegt, dass der Antikörper sowohl das humane als auch das murine Protein detektieren kann (siehe Kapitel 11, Abbildung 43).

Zu Beginn standen vier verschiedene Antikörper zur Verfügung, deren Spezifität mittels Western Blot-Analysen getestet wurde. Da der Antikörper 6619α215 ein Signal auf der Höhe des vermuteten Volllängeproteins detektierte, wurde er für weitere Analysen verwendet. Diese Versuche umfassten Western Blot-Analysen, bei denen Proteinlysate verschiedener Spezies (human, murin), aus verschiedenen murinen Geweben (*Cerebrum*, *Cerebellum*) und von verschiedenen murinen Genotypen (*Bdp1^{wt/wt}*, *Bdp1^{ko/wt}*) verwendet wurden. Da zusätzliche Banden nicht zugeordnet werden konnten, konnte die Spezifität des Antikörpers nicht bestätigt werden. Lediglich bei der Verwendung von Proteinlysaten HTN-Cre-behandelter *Bdp1^{fl/fl}*-MEF zeigten sich erste Hinweise, dass der Antikörper ein Signal auf Höhe des Volllängeproteins (270 kDa) und einer murinen Isoform (80-90 kDa) detektierte. Somit konnte mit Hilfe von Western Blot-Analysen die Spezifität des Antikörpers 6619α215 nicht bestätigt werden.

Das Bdp1-Protein ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktor IIIB-Komplexes und im Kern lokalisiert (Schramm et al. 2000). Weiterhin ist bekannt, dass das humane *BDP1* verstärkt in der Körnerzellschicht des *Cerebellums* exprimiert wird (Kelter et al. 2000). Trotz fehlgeschlagener Western Blot-Analysen sollten immunhistologische Färbungen von MEF und Präparate des murinen *Cerebellums* die Spezifität des Antikörpers bestätigen. Bei der Verwendung von MEF wurden gefärbte und ungefärbte Zellkerne detektiert und auch gefärbte Präparate des *Cerebellums* zeigten eine stärkere Expression des *Bdp1*-Gens in der Körnerzellschicht.

Das Ausbleiben der Kernfärbung in *Bdp1^{wt/wt}* und *Bdp1^{ko/wt}*-MEF ist auf die Aktivität der RNA Pol III zurückzuführen. Die Polymerase ist hauptsächlich während der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv, wohingegen die Transkription während der M-Phase inhibiert wird (Gottesfeld et al. 1994; Leresche et al. 1996; Paule and White 2000; White et al. 1995). Die Inhibition wird unter anderem durch die Hyperphosphorylierung von BDP1 vermittelt, wodurch das Protein von der Promotorregion dissoziiert (Fairley et al. 2003). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass es sich bei den gefärbten Kernen in MEF wahrscheinlich um Zellen handelte, die sich in der Interphase befanden, wohingegen die Bdp1-Färbung bei in der M-Phase-befindlichen Zellen ausblieb. Weiterführende Analysen bezüglich der Bdp1-Färbung in Abhängigkeit des Zellzyklus sind zukünftig geplant.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, konnte mit Hilfe von Western Blot-Analysen die Spezifität des Bdp1-Antikörpers 6619α215 nicht bestätigt werden. Aufgrund fehlender

Literaturangaben war eine Zuordnung detektierter Banden nicht möglich. Immunhistologische Färbungen von MEF und Präparate des murinen *Cerebellums* unterstrichen jedoch die Spezifität des Antikörpers. Letztendlich wird nur eine Massenspektrometrie (MS) Aufschluss über Bdp1-Proteinisoformen in der Maus liefern können. Entsprechende Analysen sind in unserer Arbeitsgruppe bereits in Planung.

Die MS hat in der Proteomik eine essentielle Bedeutung. Mit dieser Technik ist es möglich, Proteine oder Makromoleküle zu identifizieren und zu charakterisieren. Weiterhin können das molekulare Gewicht sowie posttranslationale Modifikationen ermittelt werden (Mann et al. 2001). Die Ionisierung mittels *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) (Hillenkamp et al. 1991; Karas and Hillenkamp 1988) oder *electrospray mass spectrometry* (ESMS) (Fenn et al. 1989; Mann and Wilm 1995) erlaubt die Detektion von Peptiden im attomol-Bereich (amol) (Emmett et al. 1995; Mortz et al. 1994). So konnten z.B. durch den Einsatz der MS neue Isoformen des APP-Proteins (*amyloid-precursor-protein*) – ein Membranprotein, dass in Form des β -Amyloid neurotoxisch wirkt und in *Plaques* vorliegen kann (Matsui et al. 2007) - im *Liquor* von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden (Portelius et al. 2009).

7. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen einer *BDP1*-Haploinsuffizienz und der Ausbildung einer SMA mit atypischen Symptomen nicht bestätigt werden. Das generierte *Bdp1*-Mausmodell bietet jedoch zahlreiche Möglichkeiten, die Funktionen des *Bdp1*-Gens *in vivo* zu untersuchen.

Die Ergebnisse der *Realtime*- und Western Blot-Analysen von *Bdp1*^{wt/wt} und *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren, die den Einfluss einer heterozygoten *Bdp1*-Deletion in Bezug auf a.) die Stabilität des TFIIB-Komplexes und b.) die Inhibition interagierender Proteine gezeigt haben, müssen mit einer größeren Anzahl an Tieren bestätigt werden. Mit Hilfe der *coimmunoprecipitation* (CoIP) könnte der TFIIB-Komplex in *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren näher untersucht werden. Sollte sich weiterhin die Herunterregulation der Tumorsuppressoren *p53* und *Rb* bestätigen, müsste einerseits bei heterozygot deletierten *Bdp1*-Tieren ein erhöhtes Krebsrisiko vorliegen - hier könnten immunhistologische Untersuchungen von Tieren verschiedener Altersklassen hilfreich sein. Andererseits könnte ein kompensatorischer Effekt auftreten, wenn Tiere mit einem heterozygoten *Bdp1*-Allel mit Mäusen verpaart würden, die eine Überexpression der Tumorsuppressoren *p53* und *Rb* zeigen. So könnte z.B. bei *p53*-überexprimierenden Mäusen die erhöhte Tumorbildung (Lungenkarzinom, Osteosarkom) reduziert werden (Lavigne et al. 1989). *Rb*-überexprimierende Mäuse haben kein gesteigertes Krebsrisiko, sind jedoch aufgrund von Proliferationsstörungen kleinwüchsig – ein kompensatorischer Effekt des heterozygoten *Bdp1*-Allels könnte in diesem Mausmodell sehr gut analysiert werden (Bignon et al. 1993).

Die Ergebnisse der *Realtime*-Analysen von *Bdp1*^{ko/wt}-MEF, die widersprüchlich zu den Beobachtungen von *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren waren, müssen auf Proteinebene bestätigt werden. Um entwicklungs- und gewebespezifische Effekte miteinzuschließen, sind Analysen der *Bdp1*-Expression während der Embryonalentwicklung von Interesse.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) könnte einerseits die Spezifität der *Bdp1*-Antisera verifiziert, andererseits potentielle Proteinisoformen identifiziert werden - um einen Eindruck verschiedener *Bdp1*-Spleißvarianten zu erhalten, werden zurzeit in unserer Arbeitsgruppe geeignete Sonden für Northern Blot-Analysen etabliert. Mit der Identifizierung von Isoformen und der Verifizierung der Antikörper könnten

proteinbiochemische und immunhistologische Analysen durchgeführt werden – diese Ergebnisse würden die Daten des *Bdp1*-Wirkungsspektrums erweitern.

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analysen für die 5S rRNA und U6 snRNA müssen mit einem größeren Pool an Tieren bestätigt werden. Weiterhin wäre es von großem Interesse, die Auswirkungen einer heterozygoten *Bdp1*-Deletion auf andere, Promotorklasse 3-abhängige Transkripte (z.B. 7SK RNA) zu untersuchen. Hier sollte jedoch prinzipiell überlegt werden, ob anstatt von Northern Blot-Analysen die quantitativ sensiblere *Realtime*-PCR die bessere Methode der Wahl darstellt.

Der Einfluss einer homozygoten *Smn*-Deletion auf die wildtypische *Bdp1*-Expression stellt eine sehr interessante Fragestellung dar. Zurzeit werden Analysen weiterer Tiere entsprechender Genotypen durchgeführt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Sollte dies der Fall sein, sind nachfolgende Untersuchungen, z.B. im Hinblick auf die Deletion regulatorischer Sequenzen, geplant.

Obwohl der Genotyp von SMA-Patienten mit atypischen Symptomen nicht mit Hilfe des hier vorliegenden Mausmodells simuliert werden konnte, wäre es dennoch von großem Interesse, die Auswirkungen einer homozygoten *Smn*-Deletion auf die Expression des heterozygoten *Bdp1*-Allels zu untersuchen. Mit Hilfe der RNAi-Technologie (*RNA interference*) wird der *knockdown* spezifischer Gene ermöglicht (Acehan et al. 2011; Jordan et al. 2011; Premisrirut et al. 2011). Somit könnte zum Beispiel in *Bdp1*^{ko/wt}-Tieren *in vivo* ein *knockdown* des *Smn*-Gens induziert werden. Nach Angaben der Firma TACONIC ist seit kurzem auch ein *knockdown* von zwei Genen parallel möglich. Mit Hilfe dieser Technologie könnten große Deletionen innerhalb der murinen SMA-Region simuliert und die Auswirkungen auf umliegende Gene analysiert werden.

Die Analysen des letalen Phänotyps von *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen sollen mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen fortgeführt werden. Spezifische Färbungen im Hinblick auf Zelladhäsionsmoleküle, Zellproliferation bzw. Apoptose sollen die Ursachen der Letalität näher eingrenzen (Hara et al. 2006; Wang et al. 2006). Eine ähnliche Strategie ist auch für die weiterführende Analysen der *Bdp1*^{fl/fl}; *Nestin*^{tg/wt}-Embryonen geplant. Mit Hilfe von Färbungen spezifischer Marker für die verschiedenen Zellschichten der Ventrikel oder die Darstellung des Zellzyklus in den unterschiedlichen Gehirnregionen (Tian et al. 2011) sollen weitere Erkenntnisse über die Ausbildung eines *Hydrocephalus* und letztlich über die Funktionen des *Bdp1*-Proteins im Zentralnervensystem (ZNS) liefern.

8. Zusammenfassungen

8.1 Zusammenfassung

B double prime 1 (*BDP1*, *TFNR*) ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktor III-B-Komplexes und wird für die Transkription aller RNA Pol III-abhängigen Gene benötigt. *BDP1* wird ubiquitär, jedoch verstärkt im *Cerebellum* exprimiert. Das Gen liegt auf dem chromosomalen Abschnitt 5q13 und distal zum *survival motor neuron gene 1* (*SMN1*) - dem krankheitsverursachenden Gen der spinalen Muskelatrophie (SMA). Die SMA ist eine autosomal rezessive, neurodegenerative Erkrankung, die durch eine Muskelschwäche mit nachfolgender Muskelatrophie gekennzeichnet ist. In seltenen Fällen entwickeln SMA-Patienten ein atypisches Symptom in Form einer Gehirnatrophie. Dieser Phänotyp korreliert mit großen Deletionen innerhalb der SMA-Region. Markeranalysen deuteten auf weitere deletierte, distal zum *SMN1* gelegene Gene hin, zu denen auch ein Marker in der Nähe des *BDP1*-Gens zählte. Aus diesem Grund wurde eine Haploinsuffizienz des *BDP1*-Gens mit der Ausbildung einer Gehirnatrophie hypothetisch in Verbindung gebracht.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde ein konditionales *Bdp1*-Mausmodell mit Hilfe des Cre/loxP-Systems generiert. Tiere mit einer ubiquitären, heterozygoten *Bdp1*-Deletion (*Bdp1^{ko/wt}*) zeigten keine besonderen Auffälligkeiten. Um das Ausmaß einer Deletion in heterozygot deletierten *Bdp1*-Mäusen näher zu untersuchen, wurden die Transkript- und Proteinmengen aller Faktoren des TFIIIB-Komplexes (*Bdp1*, *Tbp*, *Brf1*) und die ausgesuchter Interaktionspartner (TFIIIC102, *Erk*, *Myc*, *p53*, *Rb*) mittels *Realtime*- und Western Blot-Analysen im *Cerebrum* und *Cerebellum* von *Bdp1^{wt/wt}* und *Bdp1^{ko/wt}*-Tieren bestimmt. Dabei wurde in *Bdp1^{ko/wt}*-Tieren eine Herunterregulation der *Bdp1*-Expression auf 50 % detektiert. Ebenso wurde von der TFIIIB-Untereinheit *Tbp* auf RNA und Proteinebene im *Cerebellum* heterozygot deletierter *Bdp1*-Tiere eine starke Herabregulation beobachtet, wodurch dem *Bdp1*-Protein eine gewebespezifische Funktion zugewiesen werden könnte. Weiterhin wurde bei fast allen Interaktionspartnern eine Herunterregulation der Transkript- bzw. der Proteinmengen detektiert. Somit hatte eine heterozygote *Bdp1*-Deletion Einfluss auf interagierende, den TFIIIB-Komplex regulierende Proteine. Mittels Northern Blot-Analysen wurden zusätzlich erhöhte Transkriptmengen der U6 snRNA im *Cerebellum* von *Bdp1^{ko/wt}*-Tieren nachgewiesen.

Die Ergebnisse der *Realtime*-Analysen wurden in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF, *Bdp1*^{ko/wt}) nicht bestätigt. Hier wurden weitestgehend erhöhte Transkriptmengen der Untereinheiten des TFIIIB-Komplexes und die der Interaktionspartner detektiert. Die abweichenden Genexpressionen haben wahrscheinlich entwicklungs- oder gewebespezifische Ursachen.

Der homozygote Verlust des *Bdp1*-Gens führte zur embryonalen Letalität im Präimplantationsstadium (um E2.5 p.c.). *In vitro*-kultivierte *Bdp1*^{ko/ko}-Embryonen (E3.5 p.c.) zeigten eine fragmentierte innere Zellmasse mit massiver Volumenabnahme. Somit scheint das *Bdp1*-Protein eine wichtige Funktion während der frühen Embryogenese einzunehmen. Über die Behandlung von *Bdp1*^{fl/fl}-MEF mit rekombinanter HTN-Cre wurde eine *in vitro*-Deletion des *Bdp1*-Gens induziert, welche zum Zelltod führte. Mittels MTT-Analysen wurde eine verringerte Zellvitalität in homozygot deletierten *Bdp1*-MEF nachgewiesen - diese Daten bestätigten die Ergebnisse homozygot deletierter *Bdp1*-Embryonen.

Da zwei Patienten zusätzlich zur SMA eine Gehirnatrophie entwickelten, sollte ein *Bdp1-knockout* im Zentralnervensystem (ZNS) generiert werden. Dieser wurde mit Hilfe einer transgenen *Nestin*-Cre-Linie induziert und führte bei *Bdp1*^{fl/fl}; *Nestin*^{tg/wt}-Embryonen erst zu einer Wachstumsverzögerung und anschließend zu einer embryonalen Letalität zwischen E18.5 p.c. und P1. HE-gefärbte Übersichtspräparate von Embryonen entsprechender Genotypen zeigten ein stark erweitertes Ventrikelsystem mit rudimentär angelegten Bereichen von *Cerebellum*, *Diencephalon* und *Mesencephalon*. Mittels immunhistologischer Färbungen wurde eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen in den Lateralventrikeln nachgewiesen. Der homozygote Verlust des *Bdp1*-Gens führte wahrscheinlich sekundär zur Ausbildung eines *Hydrocephalus*. Somit nahm das *Bdp1*-Protein eine wichtige Funktion innerhalb der frühen Gehirnentwicklung ein.

Schließlich wurden *Bdp1*^{ko/wt}-Tiere mit SMA-Tieren (*Smn*^{ko/ko}; *SMN2*^{tg/tg}) verpaart, um den Einfluss von *Smn*-Deletionen auf *Bdp1*-Expressionen näher zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte der Zusammenhang zwischen einer *BPD1*-Haploinsuffizienz und dem Auftreten einer Gehirnatrophie nicht gezeigt werden. Jedoch nimmt die TFIIIB-Untereinheit *Bdp1* selbst eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und speziell während der Entwicklung des ZNS ein. Das konditionale *Bdp1*-Mausmodell bietet weitere Möglichkeiten, die Funktionen des *Bdp1*-Gens *in vivo* zu untersuchen.

8.2 Summary

B double prime 1 (*BDP1*, *TFNR*) is a subunit of the transcription factor IIIB complex which is essential in transcription initiation of small RNAs transcribed by RNA pol III. The *BDP1* gene is ubiquitously expressed with notable abundance in the cerebellum. It maps on 5q13, distal to the duplicated region including the spinal muscular atrophy (SMA) determining gene “*survival motor neuron gene 1*” (*SMN1*). SMA is an autosomal recessive, neurodegenerative disorder characterized by muscle weakness and atrophy of proximal voluntary muscles. In rare cases SMA patients exhibit additional atypical features such as brain atrophy. These phenotypes have been shown to correlate with large deletions in the SMA region and marker analyses revealed deletions in genes distally to the SMA region including the *BDP1*. Therefore, we hypothesized that haploinsufficiency of *BDP1* may cause brain atrophy.

To test this hypothesis we generated conditional *Bdp1* knockout mice using the Cre/loxP system. Ubiquitous heterozygous deletion of the *Bdp1* allele (*Bdp1*^{ko/wt}) led to no obvious phenotype. To analyze the potential effect of heterozygous *Bdp1* deletion in those animals we isolated RNA and protein from cerebrum and cerebellum of *Bdp1*^{wt/wt} and *Bdp1*^{ko/wt} animals and measured the transcript and protein amount of different TFIIIB subunits (*Bdp1*, *Brf1* and *Tbp*) and of known interaction partners (TFIIIC102, *Erk*, *Myc*, *p53*, *Rb*) via quantitative realtime-PCR and western blot analysis. *Bdp1*^{ko/wt} animals showed in both tissues a downregulation of *Bdp1* expression of 50 %. Interestingly *Tbp* was highly decreased on RNA and protein level in cerebellum of *Bdp1*^{ko/wt} animals indicating an important role of *Bdp1* in this brain area. Furthermore, transcript and protein amount of all TFIIIB subunits and interaction partners were decreased indicating that *Bdp1* influences proteins interacting with TFIIIB. Via northern blot analysis increased expression of the RNA pol III-dependent gene U6 snRNA were measured in cerebellum of *Bdp1*^{ko/wt} animals.

In contrast, the results of the realtime-PCR and western blot analysis of *Bdp1*^{wt/wt} and *Bdp1*^{ko/wt} animals were not confirmed with mouse embryonic fibroblasts (MEF) heterozygously deleted for *Bdp1*, in which most of the interaction partners showed a transcriptional upregulation. These results indicate a possible development- or tissue-specific gene regulation.

The ubiquitous homozygous deletion of *Bdp1* resulted in embryonic lethality before nidation (E2,5 p.c.). *In vitro* cultured *Bdp1*^{ko/ko} embryos (E3,5 p.c.) presented fragmented inner cell mass and massive shrinkage, indicating an important role for *Bdp1* during very

early development. To analyze the effect of *Bdp1* deficiency in an *in vitro* model we generated homozygously floxed MEF (*Bdp1*^{fl/fl}) and deleted *Bdp1* using recombinant Cre (HTN-Cre). One week after treatment most of the cells died. A decreased cell viability of homozygously deleted MEF was shown via MTT assay which confirmed the data of homozygous *Bdp1* knockout embryos.

Since two patients with atypical SMA exhibited brain atrophy, the effect of a *Bdp1* deficiency in the central nervous system (CNS) was of particular interest. Neuronal specific knockout of *Bdp1* using *Nestin*-Cre transgenic mice caused growth retardation and embryonic lethality of *Bdp1*^{fl/fl}; *Nestin*^{tg/wt} embryos between E18,5 p.c. and postnatal day 1 (P1). HE staining of *Bdp1*^{fl/fl}; *Nestin*^{tg/wt} embryos revealed vastly dilated lateral ventricles. Furthermore cerebellum, diencephalon and mesencephalon could be detected only rudimentarily. Immunohistological analysis of the embryos revealed an increased number of apoptotic cells within the ventricular zone of the lateral ventricles. Taken together these results suggest that homozygous loss of *Bdp1* led secondary to development of a hydrocephalus and point towards an essential role of *Bdp1* during brain development.

Finally, we crossbred *Bdp1*^{ko/wt}-animals to an SMA mouse model to find out whether *Smn* knockouts influence *Bdp1* expression.

Taken together the hypothesis that *BDP1* haploinsufficiency caused brain atrophy could not be confirmed. Nevertheless the results of this work indicate an essential role of the TFIIIB subunit *Bdp1* during embryonic development per se and in CNS development in particular. The conditional *Bdp1* knockout mouse provides further possibilities to analyze *Bdp1* function *in vivo*.

9. Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

Mende Y, **Jakubik M**, Riessland M, Schoenen F, Rossbach K, Kleinridders A, Köhler C, Buch T, Wirth B. Hum Mol Genet. 2010 Jun 1;19(11):2154-67. Epub 2010 Feb 27

Deficiency of the splicing factor *Sfrs10* results in early embryonic lethality in mice and has no impact on full-length SMN/*Smn* splicing

Riessland M, Ackermann B, Förster A, **Jakubik M**, Hauke J, Garbes L, Fritzsche I, Mende Y, Blumcke I, Hahnen E, Wirth B. Hum Mol Genet. 2010 Apr 15;19(8): 1492-506. Epub 2010 Jan 22

SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy

9.2 Poster

Jakubik M, Mende Y, Rossbach K, Wirth B: Deficiency of the transcription factor III B subunit *Bdp1* leads to early embryonic lethality in mice

9th Transgenic Technologie Meeting; Transgenic Research, Volume 19, Number 2; Poster 65, Berlin, 2010

Jakubik M, Mende Y, Wirth B: Deficiency of the splicing factor *Sfrs10* results in early embryonic lethality in mice and in upregulation of *SmnΔ7* in vitro

13th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting, Cincinnati, Ohio, USA, 2009

Mende Y, **Jakubik M**, Wirth B: *Knockout* of the splicing factor *Sfrs10* results in early embryonic lethality in mice and in upregulation of *SmnΔ7* in vitro

Medgen Band 21, abstract P217; GfH-Tagung, Aachen, 2009

Jakubik M, Mende Y, Wirth B: *Bdp1* – a candidate gene causing atypical spinal muscular atrophy (SMA) with brain atrophy?

Medgen Band 21, abstract P221; GfH-Tagung, Aachen, 2009

Jakubik M, Mende Y, Schoenen F, Wirth B: Functional analysis of the transcription factor-like nuclear regulator (TFNR) protein by generating conditional *knock-out* mice
Medgen Band 19, abstract P280; GfH-Tagung, Bonn, 2007

Mende Y, **Jakubik M**, Anadol E, Wirth B: *SFRS10* – a splicing regulator of *SMN2* transcripts: functional studies in transgenic and *knock-out* mice
Medgen Band 19, abstract P232; GfH-Tagung, Bonn, 2007

Mende Y, **Jakubik M**, Anadol E, Wirth B: *SFRS10* – a splicing modulator of *SMN2* transcripts: Generation of a conditional *knock-out* mouse
11th Annual International Spinal Muscular Atrophy Research Group Meeting, Schaumburg, Illinois, USA 2007

10. Literaturverzeichnis

- Abremski K, Hoess R, Sternberg N (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32: 1301-11
- Acehan D, Vaz F, Houtkooper RH, James J, Moore V, Tokunaga C, Kulik W, Wansapura J, Toth MJ, Strauss A, Khuchua Z (2011) Cardiac and skeletal muscle defects in a mouse model of human Barth syndrome. *J Biol Chem* 286: 899-908
- Alberman ED, Creasy MR (1977) Frequency of chromosomal abnormalities in miscarriages and perinatal deaths. *J Med Genet* 14: 313-5
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-4
- Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S (1996) Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133: 43-7
- Andrews BJ, Proteau GA, Beatty LG, Sadowski PD (1985) The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* 40: 795-803
- Araujo Ade Q, Araujo M, Swoboda KJ (2009) Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy. *J Pediatr* 155: 292-4
- Arkblad E, Tulinius M, Kroksmark AK, Henricsson M, Darin N (2009) A population-based study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. *Acta Paediatr* 98: 865-72
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17: 126-40
- Barthold SW (2004) Genetically altered mice: phenotypes, no phenotypes, and Faux phenotypes. *Genetica* 122: 75-88
- Bartholomew B, Durkovich D, Kassavetis GA, Geiduschek EP (1993) Orientation and topography of RNA polymerase III in transcription complexes. *Mol Cell Biol* 13: 942-52
- Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA (2003) Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 73: 131-51
- Beddington RS, Robertson EJ (1999) Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96: 195-209
- Belsing TZ, Lund AM, Sondergaard L, Friis-Hansen L, Abildstrom SZ (2011) [Clinical aspects of Marfan syndrome]. *Ugeskr Laeger* 173: 337-42
- Berkovic SF, Harkin L, McMahon JM, Pelekanos JT, Zuberi SM, Wirrell EC, Gill DS, Iona X, Mulley JC, Scheffer IE (2006) De-novo mutations of the sodium channel gene SCN1A in alleged vaccine encephalopathy: a retrospective study. *Lancet Neurol* 5: 488-92
- Bignon YJ, Chen Y, Chang CY, Riley DJ, Windle JJ, Mellon PL, Lee WH (1993) Expression of a retinoblastoma transgene results in dwarf mice. *Genes Dev* 7: 1654-62
- Bloch O, Auguste KI, Manley GT, Verkman AS (2006) Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1527-37

- Bouwman P, Drost R, Klijn C, Pieterse M, Gulden H, Song JY, Szuhai K, Jonkers J (2011) Loss of p53 partially rescues embryonic development of Palb2 knockout mice but does not foster haploinsufficiency of Palb2 in tumour suppression. *J Pathol* 224: 10-21
- Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein DL, Takahashi N, Kajiwaru Y, Yang M, Katz AM, Scattoni ML, Harris MJ, Saxena R, Silverman JL, Crawley JN, Zhou Q, Hof PR, Buxbaum JD (2010) Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol Autism* 1: 15
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309: 255-6
- Braun BR, Kassavetis GA, Geiduschek EP (1992) Bending of the *Saccharomyces cerevisiae* 5S rRNA gene in transcription factor complexes. *J Biol Chem* 267: 22562-9
- Brun I, Sentenac A, Werner M (1997) Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *Embo J* 16: 5730-41
- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 344: 540-1
- Buratowski S, Zhou H (1992) A suppressor of TBP mutations encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB. *Cell* 71: 221-30
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32: 479-82
- Burglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J (1997) The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet* 60: 72-9
- Burn J (1986) Williams syndrome. *J Med Genet* 23: 389-95
- Cabarcas S, Watabe K, Schramm L (2010) Inhibition of U6 snRNA Transcription by PTEN. *Online J Biol Sci* 10: 114-125
- Callewaert B, Malfait F, Loeys B, De Paepe A (2008) Ehlers-Danlos syndromes and Marfan syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 165-89
- Camarero G, Tyrsin OY, Xiang C, Pfeiffer V, Pleiser S, Wiese S, Gotz R, Rapp UR (2006) Cortical migration defects in mice expressing A-RAF from the B-RAF locus. *Mol Cell Biol* 26: 7103-15
- Capon F, Lo Cicero S, Levato C, Novelli G, Dallapiccola B (1995) De novo deletions of the 5q13 region and prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy. *Prenat Diagn* 15: 93-4
- Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Brauninger M, Eilken HM, Rieger MA, Schroeder TT, Huttner WB, Brakebusch C, Gotz M (2006) The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat Neurosci* 9: 1099-107
- Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penchaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB, Kunkel LM, Gilliam TC (1997) A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet* 6: 229-36
- Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132: 885-96

- Carwright E.J. (2009), *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols*
- Chambon P (1975) Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu Rev Biochem* 44: 613-38
- Chen W, Bocker W, Brosius J, Tiedge H (1997) Expression of neural BC200 RNA in human tumours. *J Pathol* 183: 345-51
- Chesnokov I, Chu WM, Botchan MR, Schmid CW (1996) p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol Cell Biol* 16: 7084-8
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9
- Chow JC, Heard E (2010) Nuclear organization and dosage compensation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000604
- Chu WM, Wang Z, Roeder RG, Schmid CW (1997) RNA polymerase III transcription repressed by Rb through its interactions with TFIIB and TFIIC2. *J Biol Chem* 272: 14755-61
- Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M, Hlavina W, Kapustin Y, Meric P, Maglott D, Birtle Z, Marques AC, Graves T, Zhou S, Teague B, Potamouisis K, Churas C, Place M, Herschleb J, Runnheim R, Forrest D, Amos-Landgraf J, Schwartz DC, Cheng Z, Lindblad-Toh K, Eichler EE, Ponting CP (2009) Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 7: e1000112
- Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152: 1107-14
- Copp AJ (1995) Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet* 11: 87-93
- Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 3: 97-110
- Crews L, Wyss-Coray T, Masliah E (2004) Insights into the pathogenesis of hydrocephalus from transgenic and experimental animal models. *Brain Pathol* 14: 312-6
- Crighton D, Woiwode A, Zhang C, Mandavia N, Morton JP, Warnock LJ, Milner J, White RJ, Johnson DL (2003) p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIB. *Embo J* 22: 2810-20
- Crook ZR, Housman D (2011) Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? *Neuron* 69: 423-35
- Crusio WE (2002) 'My mouse has no phenotype'. *Genes Brain Behav* 1: 71
- Daly NL, Arvanitis DA, Fairley JA, Gomez-Roman N, Morton JP, Graham SV, Spandidos DA, White RJ (2005) Deregulation of RNA polymerase III transcription in cervical epithelium in response to high-risk human papillomavirus. *Oncogene* 24: 880-8
- Dean N, Berk AJ (1987) Separation of TFIIC into two functional components by sequence specific DNA affinity chromatography. *Nucleic Acids Res* 15: 9895-907
- DeSilva U, Elnitski L, Idol JR, Doyle JL, Gan W, Thomas JW, Schwartz S, Dietrich NL, Beckstrom-Sternberg SM, McDowell JC, Blakesley RW, Bouffard GG, Thomas PJ, Touchman JW, Miller W, Green ED (2002) Generation and comparative analysis of approximately 3.3 Mb of mouse genomic sequence orthologous to the region of human chromosome 7q11.23 implicated in Williams syndrome. *Genome Res* 12: 3-15

- DiDonato CJ, Brun T, Simard LR (1999) Complete nucleotide sequence, genomic organization, and promoter analysis of the murine survival motor neuron gene (*Smn*). *Mamm Genome* 10: 638-41
- DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR (1997) Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res* 7: 339-52
- Dieci G, Fiorino G, Castelnuovo M, Teichmann M, Pagano A (2007) The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet* 23: 614-22
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87: 27-45
- Dunn EA, Rader SD (2010) Secondary structure of U6 small nuclear RNA: implications for spliceosome assembly. *Biochem Soc Trans* 38: 1099-104
- Dymecki SM (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6191-6
- Edery P, Marcaillou C, Sahbatou M, Labalme A, Chastang J, Touraine R, Tubacher E, Senni F, Bober MB, Nampoothiri S, Jouk PS, Steichen E, Berland S, Toutain A, Wise CA, Sanlaville D, Rousseau F, Clerget-Darpoux F, Leutenegger AL (2011) Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. *Science* 332: 240-3
- Eggan K, Rode A, Jentsch I, Samuel C, Hennek T, Tintrup H, Zevnik B, Erwin J, Loring J, Jackson-Grusby L, Speicher MR, Kuehn R, Jaenisch R (2002) Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol* 20: 455-9
- Elsa SH, Lucas RE (2002) The mousetrap: what we can learn when the mouse model does not mimic the human disease. *Ilar J* 43: 66-79
- Ema M, Mori D, Niwa H, Hasegawa Y, Yamanaka Y, Hitoshi S, Mimura J, Kawabe Y, Hosoya T, Morita M, Shimosato D, Uchida K, Suzuki N, Yanagisawa J, Sogawa K, Rossant J, Yamamoto M, Takahashi S, Fujii-Kuriyama Y (2008) Kruppel-like factor 5 is essential for blastocyst development and the normal self-renewal of mouse ESCs. *Cell Stem Cell* 3: 555-67
- Emanuel BS, Shaikh TH (2001) Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* 2: 791-800
- Emmett MR, Andren PE, Caprioli RM (1995) Specific molecular mass detection of endogenously released neuropeptides using in vivo microdialysis/mass spectrometry. *J Neurosci Methods* 62: 141-7
- Endrizzi M, Huang S, Scharf JM, Kelter AR, Wirth B, Kunkel LM, Miller W, Dietrich WF (1999) Comparative sequence analysis of the mouse and human *Lgn1/SMA* interval. *Genomics* 60: 137-51
- Endrizzi MG, Hadinoto V, Growney JD, Miller W, Dietrich WF (2000) Genomic sequence analysis of the mouse *Naip* gene array. *Genome Res* 10: 1095-102
- Epelbaum J (1992) Intrahypothalamic neurohormonal interactions in the control of growth hormone secretion. *Ciba Found Symp* 168: 54-64; discussion 64-8
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-6
- Fairley JA, Scott PH, White RJ (2003) TFIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. *Embo J* 22: 5841-50

- Faller A., Schünke M. (1995), *Der Körper des Menschen*
- Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM (2000) Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 28: 106-10
- Fedorov LM, Haegel-Kronenberger H, Hirchenhain J (1997) A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res* 6: 223-31
- Feinberg AP, Vogelstein B (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Addendum. Anal Biochem* 137: 266-7
- Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70: 358-68
- Felton-Edkins ZA, Fairley JA, Graham EL, Johnston IM, White RJ, Scott PH (2003) The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. *Embo J* 22: 2422-32
- Felton-Edkins ZA, Kondrashov A, Karali D, Fairley JA, Dawson CW, Arrand JR, Young LS, White RJ (2006) Epstein-Barr virus induces cellular transcription factors to allow active expression of EBER genes by RNA polymerase III. *J Biol Chem* 281: 33871-80
- Felton-Edkins ZA, White RJ (2002) Multiple mechanisms contribute to the activation of RNA polymerase III transcription in cells transformed by papovaviruses. *J Biol Chem* 277: 48182-91
- Feng C, Xu W, Zuo Z (2009a) Knockout of the regulatory factor X1 gene leads to early embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 715-7
- Feng X, Papadopoulos MC, Liu J, Li L, Zhang D, Zhang H, Verkman AS, Ma T (2009b) Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice. *J Neurosci Res* 87: 1150-5
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71
- Filippidis AS, Kalani MY, Rekate HL (2010) Hydrocephalus and aquaporins: lessons learned from the bench. *Childs Nerv Syst* 27: 27-33
- Folger KR, Wong EA, Wahl G, Capecchi MR (1982) Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. *Mol Cell Biol* 2: 1372-87
- Forni PE, Scuoppo C, Imayoshi I, Taulli R, Dastru W, Sala V, Betz UA, Muzzi P, Martinuzzi D, Vercelli AE, Kageyama R, Ponzetto C (2006) High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly. *J Neurosci* 26: 9593-602
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-6
- Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000) Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9: 849-58
- Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 236: 1657-61
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-88

- Gardner RL (1983) Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol* 24: 63-133
- Gauthier J, Champagne N, Lafreniere RG, Xiong L, Spiegelman D, Brustein E, Lapointe M, Peng H, Cote M, Noreau A, Hamdan FF, Addington AM, Rapoport JL, Delisi LE, Krebs MO, Joobor R, Fathalli F, Mouaffak F, Haghghi AP, Neri C, Dube MP, Samuels ME, Marineau C, Stone EA, Awadalla P, Barker PA, Carbonetto S, Drapeau P, Rouleau GA (2010) De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7863-8
- Geiduschek EP, Kassavetis GA (2001) The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol* 310: 1-26
- Geiduschek EP, Tocchini-Valentini GP (1988) Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem* 57: 873-914
- Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B (1995) Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 342-8
- Gervin CM, McCulla A, Williams M, Ouhtit A (2003) Dysfunction of p53 in photocarcinogenesis. *Front Biosci* 8: s715-7
- Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ (2003) Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421: 290-4
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7380-4
- Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R (1986) Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9065-9
- Gottesfeld JM, Wolf VJ, Dang T, Forbes DJ, Hartl P (1994) Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIIB component. *Science* 263: 81-4
- Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993) Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73: 1155-64
- Hamilton DL, Abremski K (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178: 481-6
- Hannon GJ, Rivas FV, Murchison EP, Steitz JA (2006) The expanding universe of noncoding RNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 551-64
- Hara K, Nakayama KI, Nakayama K (2006) Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos. *Genes Cells* 11: 1281-93
- Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G (2009) Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* 10: 551-64
- He H, Liyanarachchi S, Akagi K, Nagy R, Li J, Dietrich RC, Li W, Sebastian N, Wen B, Xin B, Singh J, Yan P, Alder H, Haan E, Wiczorek D, Albrecht B, Puffenberger E, Wang H, Westman JA, Padgett RA, Symer DE, de la Chapelle A (2011) Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I. *Science* 332: 238-40
- Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT (1991) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 63: 1193A-1203A
- Hirsch HA, Gu L, Henry RW (2000) The retinoblastoma tumor suppressor protein targets distinct general transcription factors to regulate RNA polymerase III gene expression. *Mol Cell Biol* 20: 9182-91

- Hoess RH, Abremski K (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J Mol Biol* 181: 351-62
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24: 66-70
- Hu P, Samudre K, Wu S, Sun Y, Hernandez N (2004) CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA polymerase III transcription repression. *Mol Cell* 16: 81-92
- Huang LC, Wood EA, Cox MM (1991) A bacterial model system for chromosomal targeting. *Nucleic Acids Res* 19: 443-8
- Jaffer ZM, Chernoff J (2002) p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 713-7
- Jedrzejowska M, Milewski M, Zimowski J, Borkowska J, Kostera-Pruszczyk A, Sielska D, Jurek M, Hausmanowa-Petrusewicz I (2009) Phenotype modifiers of spinal muscular atrophy: the number of SMN2 gene copies, deletion in the NAIP gene and probably gender influence the course of the disease. *Acta Biochim Pol* 56: 103-8
- Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, Kripke ML (1999) p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* 18: 4247-53
- Johnson MH, Ziomek CA (1981) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24: 71-80
- Johnson SA, Dubeau L, Kawalek M, Dervan A, Schonthal AH, Dang CV, Johnson DL (2003) Increased expression of TATA-binding protein, the central transcription factor, can contribute to oncogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 3043-51
- Jordan SD, Kruger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Bronneke HS, Merkwirth C, Kashkar H, Olkkonen VM, Bottger T, Braun T, Seibler J, Bruning JC (2011) Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol* 13: 434-46
- Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC (2004) Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest* 114: 172-81
- Kaiser AD, Hogness DS (1960) The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J Mol Biol* 2: 392-415
- Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-301
- Kashima T, Manley JL (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34: 460-3
- Kassavetis GA, Braun BR, Nguyen LH, Geiduschek EP (1990) *S. cerevisiae* TFIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIA and TFIIC are assembly factors. *Cell* 60: 235-45
- Kassavetis GA, Joazeiro CA, Pisano M, Geiduschek EP, Colbert T, Hahn S, Blanco JA (1992) The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor, TFIIB. *Cell* 71: 1055-64
- Kassavetis GA, Kumar A, Letts GA, Geiduschek EP (1998) A post-recruitment function for the RNA polymerase III transcription-initiation factor IIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9196-201

- Kassavetis GA, Nguyen ST, Kobayashi R, Kumar A, Geiduschek EP, Pisano M (1995) Cloning, expression, and function of TFC5, the gene encoding the B" component of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III transcription factor TFIIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9786-90
- Kaufman M.H., Bard J.B.L. (1999), *The anatomical basis of mouse development*
- Ke Y, Zhang EE, Hagihara K, Wu D, Pang Y, Klein R, Curran T, Ranscht B, Feng GS (2007) Deletion of *Shp2* in the brain leads to defective proliferation and differentiation in neural stem cells and early postnatal lethality. *Mol Cell Biol* 27: 6706-17
- Kelter AR, Herchenbach J, Wirth B (2000) The transcription factor-like nuclear regulator (TFNR) contains a novel 55-amino-acid motif repeated nine times and maps closely to SMN1. *Genomics* 70: 315-26
- Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* 9: 413-21
- Kleinjan DA, van Heyningen V (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 76: 8-32
- Korinthenberg R, Sauer M, Ketelsen UP, Hanemann CO, Stoll G, Graf M, Baborie A, Volk B, Wirth B, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K (1997) Congenital axonal neuropathy caused by deletions in the spinal muscular atrophy region. *Ann Neurol* 42: 364-8
- Kuehn HS, Caminha I, Niemela JE, Rao VK, Davis J, Fleisher TA, Oliveira JB (2011) FAS Haploinsufficiency Is a Common Disease Mechanism in the Human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *J Immunol*
- Kumar A, Kassavetis GA, Geiduschek EP, Hambalko M, Brent CJ (1997) Functional dissection of the B" component of RNA polymerase III transcription factor IIIB: a scaffolding protein with multiple roles in assembly and initiation of transcription. *Mol Cell Biol* 17: 1868-80
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H (1992) Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6232-6
- Larminie CG, Cairns CA, Mital R, Martin K, Kouzarides T, Jackson SP, White RJ (1997) Mechanistic analysis of RNA polymerase III regulation by the retinoblastoma protein. *Embo J* 16: 2061-71
- Lavigne A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A (1989) High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 9: 3982-91
- Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Covert DD, Gavriline TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005) SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* 14: 845-57
- Lee JA, Lupski JR (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 52: 103-21
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-65
- Leresche A, Wolf VJ, Gottesfeld JM (1996) Repression of RNA polymerase II and III transcription during M phase of the cell cycle. *Exp Cell Res* 229: 282-8

-
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-6
- Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ (2005) Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105: 635-7
- Liang YH, Chen XL, Yu ZS, Chen CY, Bi S, Mao LG, Zhou BL, Zhang XN (2009) Deletion analysis of SMN1 and NAIP genes in Southern Chinese children with spinal muscular atrophy. *J Zhejiang Univ Sci B* 10: 29-34
- Lobo SM, Hernandez N (1989) A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA promoter into an RNA polymerase III promoter. *Cell* 58: 55-67
- Lorson CL, Androphy EJ (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet* 9: 259-65
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6307-11
- Ma K, Zheng S, Zuo Z (2006) The transcription factor regulatory factor X1 increases the expression of neuronal glutamate transporter type 3. *J Biol Chem* 281: 21250-5
- Madkaikar M, Mhatre S, Gupta M, Ghosh K (2011) Advances in Autoimmune Lymphoproliferative Syndromes (ALPS). *Eur J Haematol*
- Magnuson T, Debrot S, Dimpfl J, Zweig A, Zamora T, Epstein CJ (1985) The early lethality of autosomal monosomy in the mouse. *J Exp Zool* 236: 353-60
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70: 437-73
- Mann M, Wilm M (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem Sci* 20: 219-24
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336: 348-52
- Marshall L, White RJ (2008) Non-coding RNA production by RNA polymerase III is implicated in cancer. *Nat Rev Cancer* 8: 911-4
- Marth JD (1996) Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination. *J Clin Invest* 97: 1999-2002
- Martianov I, Viville S, Davidson I (2002) RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein. *Science* 298: 1036-9
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634-8
- Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, Irizarry MC, Hyman BT (2007) Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1161: 116-23
- Mattaj IW, Dathan NA, Parry HD, Carbon P, Krol A (1988) Changing the RNA polymerase specificity of U snRNA gene promoters. *Cell* 55: 435-42
- Mattick JS, Makunin IV (2006) Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1: R17-29
- McCright B, Lozier J, Gridley T (2002) A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency. *Development* 129: 1075-82

- McFarland KN, Wilkes SR, Koss SE, Ravichandran KS, Mandell JW (2006) Neural-specific inactivation of ShcA results in increased embryonic neural progenitor apoptosis and microencephaly. *J Neurosci* 26: 7885-97
- Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801
- Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M, et al. (1990) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 344: 767-8
- Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, et al. (1994) De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 264: 1474-7
- Merla G, Howald C, Henrichsen CN, Lyle R, Wyss C, Zobot MT, Antonarakis SE, Reymond A (2006) Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. *Am J Hum Genet* 79: 332-41
- Merla G, Ucla C, Guipponi M, Reymond A (2002) Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. *Hum Genet* 110: 429-38
- Michalczyk K, Ziman M (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 20: 665-71
- Michaud M, Arnoux T, Bielli S, Durand E, Rotrou Y, Jablonka S, Robert F, Giraudon-Paoli M, Riessland M, Mattei MG, Andriambeloso E, Wirth B, Sendtner M, Gallego J, Pruss RM, Bordet T (2010) Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 38: 125-35
- Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G (2004) Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 469: 311-24
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631-42
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8: 1177-83
- Monani UR, Pastore MT, Gavriliina TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH (2003) A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 160: 41-52
- Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9: 333-9
- Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P (1994) Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom* 23: 249-61
- Muller W, Kuhn R, Rajewsky K (1991) Major histocompatibility complex class II hyperexpression on B cells in interleukin 4-transgenic mice does not lead to B cell proliferation and hypergammaglobulinemia. *Eur J Immunol* 21: 921-5

- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
- Nathans D, Smith HO (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem* 44: 273-93
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1: 841-5
- Nikitina TV, Tischenko LI, Schulz WA (2011) Recent insights into regulation of transcription by RNA polymerase III and the cellular functions of its transcripts. *Biol Chem* 392: 395-404
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-6
- Northup JK, Matalon R, Lockhart LH, Hawkins JC, Velagaleti GV (2011) A Complex Chromosome Rearrangement, Der(6)Ins(6)(P21.1q25.3q27)Inv(6)(P25.3q27), In A Child With Cleidocranial Dysplasia. *Eur J Med Genet*
- O'Driscoll MC, Daly SB, Urquhart JE, Black GC, Pilz DT, Brockmann K, McEntagart M, Abdel-Salam G, Zaki M, Wolf NI, Ladda RL, Sell S, D'Arrigo S, Squier W, Dobyns WB, Livingston JH, Crow YJ (2010) Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria. *Am J Hum Genet* 87: 354-64
- Omran H, Ketelsen UP, Heinen F, Sauer M, Rudnik-Schoneborn S, Wirth B, Zerres K, Kratzer W, Korinthenberg R (1998) Axonal neuropathy and predominance of type II myofibers in infantile spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 13: 327-31
- Omrani O, Bonyadi M, Barzgar M (2009) Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Iranian spinal muscular atrophy patients. *Pediatr Int* 51: 193-6
- Orban PC, Chui D, Marth JD (1992) Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6861-5
- Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT (2005) Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *Faseb J* 19: 76-8
- Pagano A, Castelnovo M, Tortelli F, Ferrari R, Dieci G, Cancedda R (2007) New small nuclear RNA gene-like transcriptional units as sources of regulatory transcripts. *PLoS Genet* 3: e1
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-5
- Paule MR, White RJ (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28: 1283-98
- Pearn J (1978) Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 15: 409-13
- Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F (2002) Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4489-94
- Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hedon B, Sarda P (2011) Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. *Hum Reprod Update*
- Portelius E, Brinkmalm G, Tran AJ, Zetterberg H, Westman-Brinkmalm A, Blennow K (2009) Identification of novel APP/Abeta isoforms in human cerebrospinal fluid. *Neurodegener Dis* 6: 87-94

- Potter H, Weir L, Leder P (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 7161-5
- Premisrirut PK, Dow LE, Kim SY, Camiolo M, Malone CD, Miething C, Scuoppo C, Zuber J, Dickins RA, Kogan SC, Shroyer KR, Sordella R, Hannon GJ, Lowe SW (2011) A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell* 145: 145-58
- Pruunsild P, Timmusk T (2005) Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. *Genomics* 86: 581-93
- Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, Betz UA, Muller W, Roes J, Schwenk F (1996) Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98: 600-3
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71
- Rekate HL (2008) The definition and classification of hydrocephalus: a personal recommendation to stimulate debate. *Cerebrospinal Fluid Res* 5: 2
- Rekate HL (2009) A contemporary definition and classification of hydrocephalus. *Semin Pediatr Neurol* 16: 9-15
- Riessland M, Ackermann B, Forster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L, Fritzsche I, Mende Y, Blumcke I, Hahnen E, Wirth B (2010) SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19: 1492-506
- Roberts DF, Chavez J, Court SD (1970) The genetic component in child mortality. *Arch Dis Child* 45: 33-8
- Roberts S, Miller SJ, Lane WS, Lee S, Hahn S (1996) Cloning and functional characterization of the gene encoding the TFIIB90 subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIB. *J Biol Chem* 271: 14903-9
- Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323: 445-8
- Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE (1995) Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 4: 631-4
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25: 139-40
- Roeder RG, Rutter WJ (1969) Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* 224: 234-7
- Rooms L, Reyniers E, Scheers S, van Luijk R, Wauters J, Van Aerschot L, Callaerts-Vegh Z, D'Hooge R, Mengus G, Davidson I, Courtens W, Kooy RF (2006) TBP as a candidate gene for mental retardation in patients with subtelomeric 6q deletions. *Eur J Hum Genet* 14: 1090-6
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80: 167-78
- Rudnik-Schoneborn S, Forkert R, Hahnen E, Wirth B, Zerres K (1996) Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics* 27: 8-15
- Rudnik-Schoneborn S, Wirth B, Rohrig D, Saule H, Zerres K (1995) Exclusion of the gene locus for spinal muscular atrophy on chromosome 5q in a family with infantile olivopontocerebellar atrophy (OPCA) and anterior horn cell degeneration. *Neuromuscul Disord* 5: 19-23

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
- Sakurai T, Dorr NP, Takahashi N, McInnes LA, Elder GA, Buxbaum JD (2011) Haploinsufficiency of *Gtf2i*, a gene deleted in Williams Syndrome, leads to increases in social interactions. *Autism Res* 4: 28-39
- Salahshourifar I, Halim AS, Sulaiman WA, Ariffin R, Naili Muhamad Nor N, Zilfalil BA (2011) De Novo Interstitial Deletion of 1q32.2-q32.3 Including the Entire *IRF6* Gene in a Patient with Oral Cleft and Other Dysmorphic Features. *Cytogenet Genome Res*
- Samejima H, Torii C, Kosaki R, Kurosawa K, Yoshihashi H, Muroya K, Okamoto N, Watanabe Y, Kosho T, Kubota M, Matsuda O, Goto M, Izumi K, Takahashi T, Kosaki K (2007) Screening for Alagille syndrome mutations in the *JAG1* and *NOTCH2* genes using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genet Test* 11: 216-27
- Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5166-70
- Schaft J, Ashery-Padan R, van der Hoeven F, Gruss P, Stewart AF (2001) Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis* 31: 6-10
- Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM (1998) Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet* 20: 83-6
- Schenkel J (2006) *Transgene Tiere*, 2. Auflage
- Schoenen F, Wirth B (2006) The zinc finger protein ZNF297B interacts with BDP1, a subunit of TFIIB. *Biol Chem* 387: 277-84
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-22
- Schramm L, Hernandez N (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16: 2593-620
- Schramm L, Pendergrast PS, Sun Y, Hernandez N (2000) Different human TFIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev* 14: 2650-63
- Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9920-5
- Schwartz LB, Roeder RG (1974) Purification and subunit structure of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase I from the mouse myeloma, MOPC 315. *J Biol Chem* 249: 5898-906
- Schwartz LB, Sklar VE, Jaehning JA, Weinmann R, Roeder RG (1974) Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma, MOPC 315. *J Biol Chem* 249: 5889-97
- Schwartzberg PL, Goff SP, Robertson EJ (1989) Germ-line transmission of a *c-abl* mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* 246: 799-803
- Schwenk F, Baron U, Rajewsky K (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res* 23: 5080-1
- Scott MR, Westphal KH, Rigby PW (1983) Activation of mouse genes in transformed cells. *Cell* 34: 557-67

- Scott PH, Cairns CA, Sutcliffe JE, Alzuherri HM, McLees A, Winter AG, White RJ (2001) Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J Biol Chem* 276: 1005-14
- Shah SM, Kumar A, Geiduschek EP, Kassavetis GA (1999) Alignment of the B" subunit of RNA polymerase III transcription factor IIIB in its promoter complex. *J Biol Chem* 274: 28736-44
- Sharp SJ, Schaack J, Cooley L, Burke DJ, Soll D (1985) Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes. *CRC Crit Rev Biochem* 19: 107-44
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144: 281-92
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336: 688-90
- Smith LB, Hadoke PW, Dyer E, Denvir MA, Brownstein D, Miller E, Nelson N, Wells S, Cheeseman M, Greenfield A (2011) Haploinsufficiency of the murine Col3a1 locus causes aortic dissection: a novel model of the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome. *Cardiovasc Res* 90: 182-90
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17
- Stankiewicz P, Lupski JR (2002) Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18: 74-82
- Stein T, Crighton D, Boyle JM, Varley JM, White RJ (2002) RNA polymerase III transcription can be derepressed by oncogenes or mutations that compromise p53 function in tumours and Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* 21: 2961-70
- Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150: 467-86
- Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J (2005) Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 132: 2093-102
- Stumpo DJ, Byrd NA, Phillips RS, Ghosh S, Maronpot RR, Castranio T, Meyers EN, Mishina Y, Blackshear PJ (2004) Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Mol Cell Biol* 24: 6445-55
- Sutcliffe JE, Brown TR, Allison SJ, Scott PH, White RJ (2000) Retinoblastoma protein disrupts interactions required for RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 20: 9192-202
- Sutcliffe JE, Cairns CA, McLees A, Allison SJ, Tosh K, White RJ (1999) RNA polymerase III transcription factor IIIB is a target for repression by pocket proteins p107 and p130. *Mol Cell Biol* 19: 4255-61
- Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, Papadopoulos MC (2008) Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 31: 37-43
- Teichmann M, Seifart KH (1995) Physical separation of two different forms of human TFIIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene in vitro. *Embo J* 14: 5974-83
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51: 503-12

- Tian Y, Lei L, Minden A (2011) A key role for Pak4 in proliferation and differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol*
- Torres R.M., Kühn R. (1997), *Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting*
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schutz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* 23: 99-103
- Ulfig N, Bohl J, Neudorfer F, Rezaie P (2004) Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus. *Brain Dev* 26: 307-15
- Ure JM, Fiering S, Smith AG (1992) A rapid and efficient method for freezing and recovering clones of embryonic stem cells. *Trends Genet* 8: 6
- Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH (1999) Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 17: 1091-6
- Valadkhan S, Jaladat Y (2010) The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics* 10: 4128-41
- Valeri A, Martinez S, Casado JA, Bueren JA (2011) Fanconi anaemia: from a monogenic disease to sporadic cancer. *Clin Transl Oncol* 13: 215-21
- Van Camp G, Vits L, Coucke P, Lyonnet S, Schrandt-Stumpel C, Darby J, Holden J, Munnich A, Willems PJ (1993) A duplication in the L1CAM gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet* 4: 421-5
- Verkman AS (2009) Aquaporins: translating bench research to human disease. *J Exp Biol* 212: 1707-15
- Viollet L, Bertrand S, Bueno Brunialti AL, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Cruaud C, Guenet JL, Munnich A, Melki J (1997) cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (*Smn*). *Genomics* 40: 185-8
- Vitte JM, Davoult B, Roblot N, Mayer M, Joshi V, Courageot S, Tronche F, Vadrot J, Moreau MH, Kemeny F, Melki J (2004) Deletion of murine *Smn* exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. *Am J Pathol* 165: 1731-41
- Walker FO (2007) Huntington's disease. *Lancet* 369: 218-28
- Wang C, Politz JC, Pederson T, Huang S (2003) RNA polymerase III transcripts and the PTB protein are essential for the integrity of the perinucleolar compartment. *Mol Biol Cell* 14: 2425-35
- Wang HD, Yuh CH, Dang CV, Johnson DL (1995) The hepatitis B virus X protein increases the cellular level of TATA-binding protein, which mediates transactivation of RNA polymerase III genes. *Mol Cell Biol* 15: 6720-8
- Wang X, Chang Y, Li Y, Zhang X, Goodrich DW (2006) *Thoc1/Hpr1/p84* is essential for early embryonic development in the mouse. *Mol Cell Biol* 26: 4362-7
- Wang Z, Roeder RG (1996) TFIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIC2 binding to RNA polymerase III promoters. *Mol Cell Biol* 16: 6841-50
- Wang Z, Roeder RG (1997) Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev* 11: 1315-26

- Wang Z, Roeder RG (1998) DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell* 1: 749-57
- Weinmann R, Roeder RG (1974) Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 1790-4
- Weller S, Gartner J (2001) Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* 18: 1-12
- Wen F, Song YZ (2010) [A case report of Alagille syndrome.]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 12: 1005-1007
- Weser S, Bachmann M, Seifart KH, Meissner W (2000) Transcription efficiency of human polymerase III genes in vitro does not depend on the RNP-forming autoantigen La. *Nucleic Acids Res* 28: 3935-42
- Weser S, Gruber C, Hafner HM, Teichmann M, Roeder RG, Seifart KH, Meissner W (2004) Transcription factor (TF)-like nuclear regulator, the 250-kDa form of Homo sapiens TFIIB", is an essential component of human TFIIC1 activity. *J Biol Chem* 279: 27022-9
- White RJ (2004) RNA polymerase III transcription and cancer. *Oncogene* 23: 3208-16
- White RJ, Gottlieb TM, Downes CS, Jackson SP (1995) Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 15: 6653-62
- White RJ, Stott D, Rigby PW (1990) Regulation of RNA polymerase III transcription in response to Simian virus 40 transformation. *Embo J* 9: 3713-21
- White RJ, Trouche D, Martin K, Jackson SP, Kouzarides T (1996) Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. *Nature* 382: 88-90
- Wieser R, Fritz B, Ullmann R, Muller I, Galhuber M, Storlazzi CT, Ramaswamy A, Christiansen H, Shimizu N, Rehder H (2005) Novel rearrangement of chromosome band 22q11.2 causing 22q11 microdeletion syndrome-like phenotype and rhabdoid tumor of the kidney. *Hum Mutat* 26: 78-83
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336: 684-7
- Willis IM (1993) RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur J Biochem* 212: 1-11
- Willis IM, Moir RD (2007) Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends Biochem Sci* 32: 51-3
- Winter AG, Sourvinos G, Allison SJ, Tosh K, Scott PH, Spandidos DA, White RJ (2000) RNA polymerase III transcription factor TFIIC2 is overexpressed in ovarian tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12619-24
- Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15: 228-37
- Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006) Spinal muscular atrophy and therapeutic prospects. *Prog Mol Subcell Biol* 44: 109-32
- Wirth B, Hahnen E, Morgan K, DiDonato CJ, Dadze A, Rudnik-Schoneborn S, Simard LR, Zerres K, Burghes AH (1995) Allelic association and deletions in autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy: association of marker genotype with disease severity and candidate cDNAs. *Hum Mol Genet* 4: 1273-84

- Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Krawczak M, Muller-Myhsok B, Schonling J, Zerres K (1997) De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 61: 1102-11
- Wishart TM, Huang JP, Murray LM, Lamont DJ, Mutsaers CA, Ross J, Geldsetzer P, Ansorge O, Talbot K, Parson SH, Gillingwater TH (2010) SMN deficiency disrupts brain development in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 19: 4216-28
- Woiwode A, Johnson SA, Zhong S, Zhang C, Roeder RG, Teichmann M, Johnson DL (2008) PTEN represses RNA polymerase III-dependent transcription by targeting the TFIIIB complex. *Mol Cell Biol* 28: 4204-14
- Wolfer DP, Crusio WE, Lipp HP (2002) Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci* 25: 336-40
- Wolpert L (1999), *Entwicklungsbiologie*
- Workman E, Saieva L, Carrel TL, Crawford TO, Liu D, Lutz C, Beattie CE, Pellizzoni L, Burghes AH (2009) A SMN missense mutation complements SMN2 restoring snRNPs and rescuing SMA mice. *Hum Mol Genet* 18: 2215-29
- Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, Gendron-Maguire M, Rand EB, Weinmaster G, Gridley T (1999) Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 8: 723-30
- Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, Kaneko KJ, Vullhorst D, DePamphilis ML, Buonanno A (2007) Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134: 3827-36
- Yang X, Schadt EE, Wang S, Wang H, Arnold AP, Ingram-Drake L, Drake TA, Lusis AJ (2006) Tissue-specific expression and regulation of sexually dimorphic genes in mice. *Genome Res* 16: 995-1004
- Yazici N, Varan A, Akalan N, Soylemezoglu F, Zorlu F, Kutluk T, Akyuz C, Buyukpamukcu M (2011) Diencephalic tumors in children: a 30-year experience of a single institution. *Childs Nerv Syst*
- Yoshinaga SK, Boulanger PA, Berk AJ (1987) Resolution of human transcription factor TFIIIC into two functional components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 3585-9
- Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, Subramani S, Jaenisch R (1989) Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 342: 435-8

11. Anhang

11.1 Abbildungen

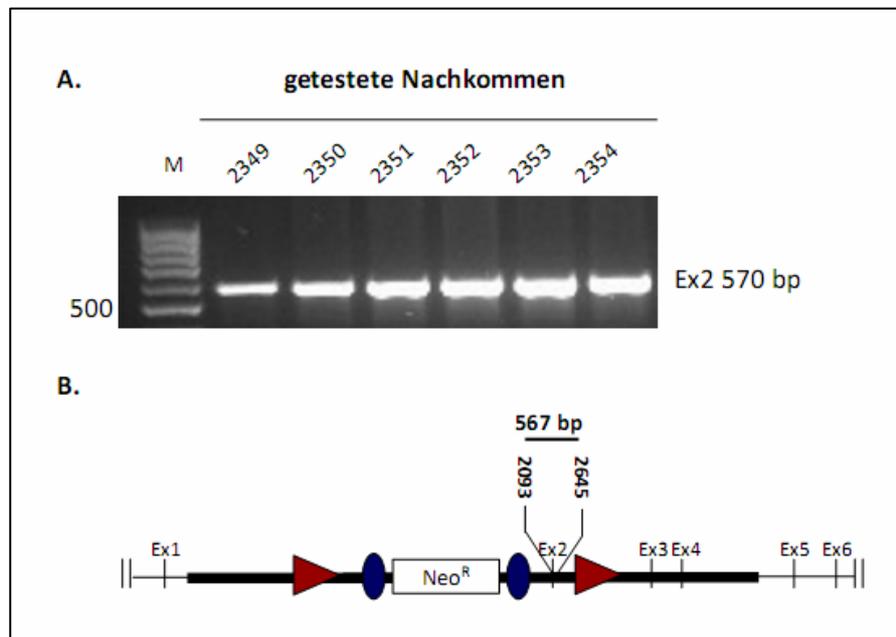


Abbildung 40: Kontroll-PCR zur Überprüfung der DNA-Integrität von Nachkommen chimärer Mäuse

(A) Auf einem Agarosegel separierte PCR-Produkte. Dabei wurden die *Primer* 2093/2645 verwendet, die bei allen Tieren – auch bei Nachkommen ohne Keimbahntransmission - ein Produkt von 570 bp amplifizieren. **(B.)** PCR-Strategie zur Detektion von *Bdp1* Exon 2. M: Marker, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen.

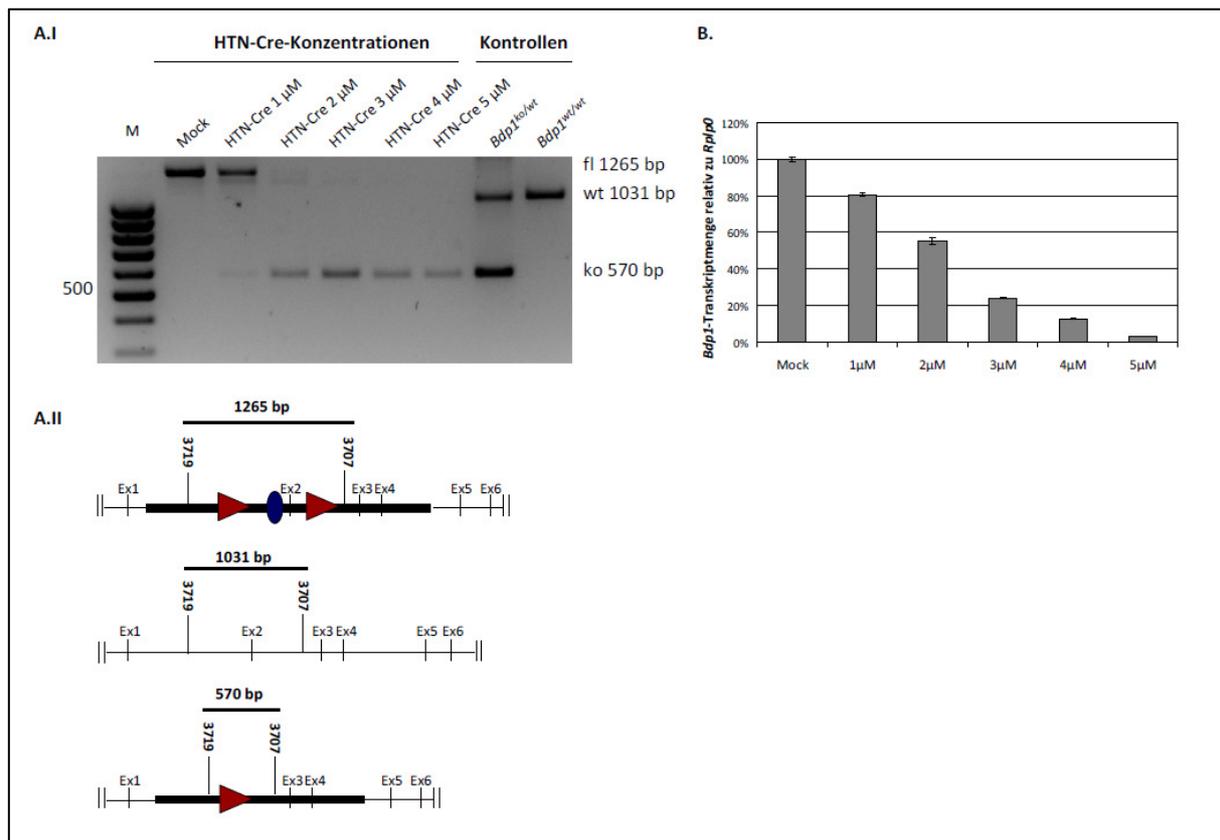


Abbildung 41: HTN-Cre-Titration von *Bdp1^{fl/fl}*-MEF

(A.I) Auf einem Agarosegel separierte PCR-Produkte, die nach Titration zur Ermittlung der adäquaten HTN-Cre-Konzentration von isolierter DNA amplifiziert wurden. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen an rekombinanten HTN-Cre-Protein getestet. Dafür wurden *Bdp1^{fl/fl}*-Zellen entweder *Mock* oder HNT-Cre-behandelt und für sieben Tage kultiviert (*Primer* 3719/3707; wt: 1265 bp, fl: 1031 bp, ko: 570 bp. **(A.II)** PCR-Strategie zur Detektion des *knockout*-Fragments. **(B)** Quantitative *Realtime*-PCR zur Bestimmung der *Bdp1*-Transkriptmenge nach erfolgter Behandlung mit unterschiedlichen HTN-Cre-Konzentrationen relativ zu *Rplp0*. Wt: wildtypisch, fl: gefloxtes Allel, ko: *knockout*, M: Marker, Ex: Exon, Neo^R: Neomycin-Resistenzgen, rote Dreiecke: loxP-Stellen, blaue Ovale: FRT-Stellen.

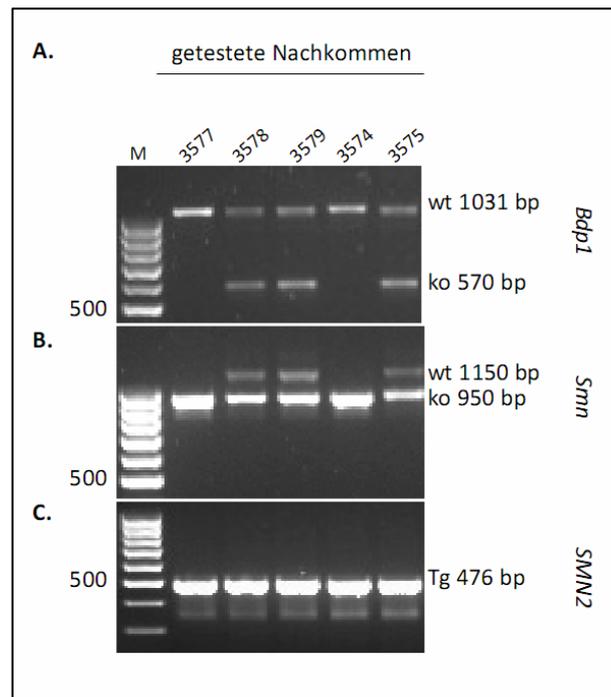


Abbildung 42: PCR von *Bdp1-SMA*-Tiere

Auf einem Agarosegel separierte PCR-Produkte zur Genotypisierung des **(A)** *Bdp1*-Genotyps (*Primer* 3719/3707). Dabei wird ein Wildtypfragment von 1031 bp und ein *Bdp1-knockout*-Fragment von 570 bp amplifiziert. **(B)** PCR zur Genotypisierung des *Smn*-Gens (*Primer* 3370, 3371, 3372), wobei ein Wildtypfragment von 1150 bp und ein *Smn-knockout*-Fragment von 950 bp amplifiziert wird. **(C)** PCR zur Genotypisierung des *SMN2*-Transgens (*Primer* 3375/3376), wobei ein Fragment von 476 bp detektiert wird. Das Transgen kann mittels PCR nicht auf Homozygotie getestet werden. Wt: wildtypisch, ko: *knockout*, Tg: Transgen, M: Marker

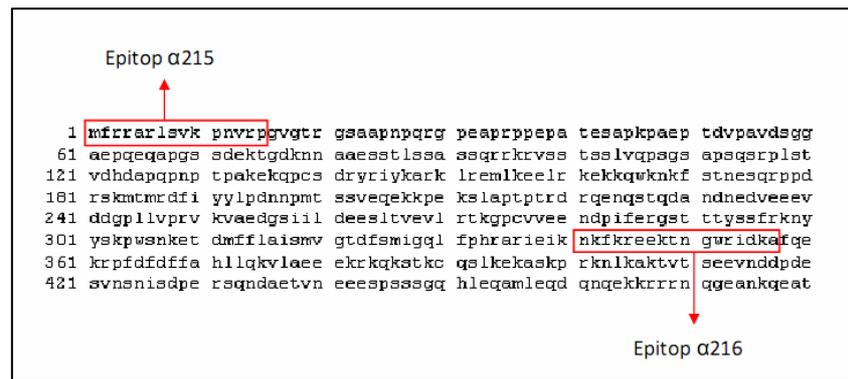


Abbildung 43: Epitope zur Generierung eines Bdp1-Antikörpers

Ausschnitt der Aminosäureabfolge des murinen Bdp1-Proteins. Die Epitope für die Generierung eines spezifischen Antikörpers wurden so gewählt, dass sowohl das murine als auch das humane Protein detektiert wird. Das Epitop α 215 liegt sowohl in der humanen als auch in der murinen Sequenz zu Beginn von Exon 1; Epitop α 216 liegt innerhalb des murinen Exon 8 bzw. innerhalb des humanen Exon 9. Die Epitope sind im murinen Protein rot umrandet.

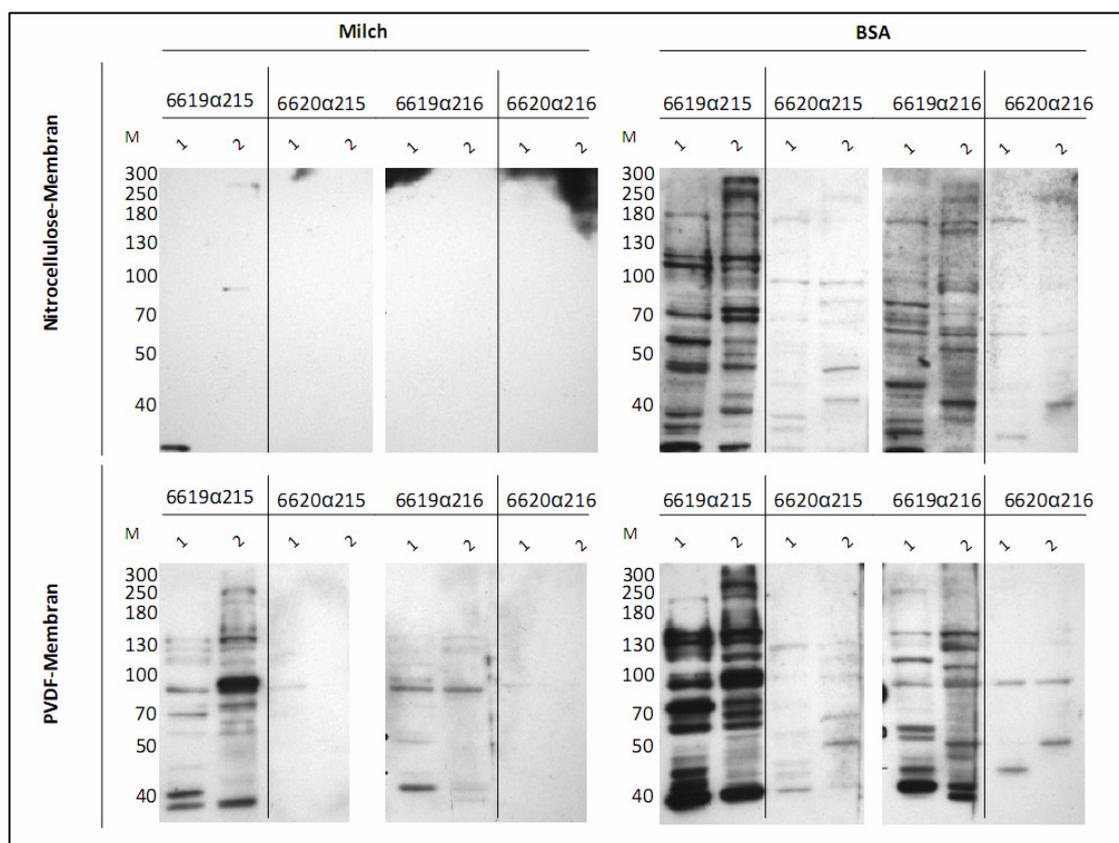


Abbildung 44: Austesten verschiedener Bdp1-Antikörper

Die Antikörper 6619 α 215, 6619 α 216, 6620 α 215, 6620 α 216 wurden mit verschiedenen Blockingmethoden (BSA bzw. Milch in TBST-Puffer) und auf unterschiedlichen Membrantypen (Nitrozellulose bzw. PVDF) getestet. Dabei wurde ein 8 % SDS-Gel verwendet und alle Antikörper 1:500 über Nacht inkubiert. 1: Proteinlysate *Bdp1*^{wt/wt}-MEF, 2: Proteinlysate *Cerebrum Bdp1*^{wt/wt}, M: Marker.

11.2 Sequenz des rekombinanten *Bdp1*-Allels (*Bdp1^{flneo}*) nach homologer Rekombination (bis Exon 6)

Gekennzeichnet sind: Exons (rot), loxP-Stellen (grün), FRT-Stellen (blau), *Primer* (Genotypisierung, Sonden; mit internen Nummern markiert), Neomycin-Resistenzgen (violett), Restriktionsschnittstellen (BamH I, Hind III, Nco I, Nde I), Sequenz: VNTI

1	TTATTTCTCA AATACTTATT TATTAATGAA GTCTTGATCT GTAACCTTAG CTGGCTTGGG ACTAGCTATT TAGAACAGGC TGTTTTCAAA CTCATGTAGT AATAAAGAGT TTATGAATAA ATAATTACTT CAGAACTAGA CATTGAAATC GACCGAACCT TGATCGATAA ATCTTGTCGG ACAAAAAGTTT GAGTACATCA
101	TCCCGTGTCT CAGCCTTGGC CTCTGGAGTG ATGAAATTAC AAGCATGTGC TATTATTACT CCGTGCAATTT TGAGATGTGG TGAGCATCTA CATCTATTTG AGGGGACAGA TGCGGAACCG GACGACTCAC TACTTTAATG TTCTCTACCG ATATAATAGA GGACCGTAAA ACTCTACAGC ACTCGTAGAT CATGATAAATC
201	ATGCTCAGTA CTAACCTGCA CTCCACCCTT CTTCCAGTTT CCGTGTGTTG TTCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCTG AAAAGGTTTC ATGTAGCAGA TACGAGTCAAT GATTTGACGT GAGGGTGGAA GAAGTCCAAA GGACACAAA AAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GAGAGAAAGAC TTTTCCAAAG TACATCGTCT
301	GGCTGTGTTG CAATCTGATA CCTATTTTTC TTGTCAAGTT CAGTACCGCA GACTCTTCCA TCACCCCTGA AATCTCATCA TATTTAATAT CCGACCAAC GTTAGACTAT GGATAAAAAG AACAGTTCAA CGGGATGACG GTCATGGCGT CTGAGAAAGT AGTGGGAAT TTAGAGTAGT ATAAATTTATA
401	ATTCCTGTGG ATCTGTGTTCA TTTATTTTGT ATTTTCTCCT CTGTACATA CAATGTCTTA TTTATTGCTC CGTGTGATAT TCTGGAAACA ATAAATTTTG TAAGAACAAC TAGAACAAAT AAATAAAAACA TAAAAGAGGA GACATTGTAT GTTACAGAAT AAATAACAGG GCAACTATAG AGACCTTCGT TATTTAAAAC
501	CAACATTCGT GTGCAAAAATG TGGAGTATAA TCATTTTGA CAGTTTTAT TTTAAAGTGT ACAAAGGCC ATATAGTGGG TGTCTGTGA AGTGTTCAT GTTGTAAAGCA CACGTTTTAC ACCTCATATT AGTAAAACCT GTCAAAAATA AATTTTCCAA TGTTTTCGGG TATATCACCT ACAGGACACT TCACAAAAGT
601	GGCTTCTCTT TGGCAATTTCC CCTTACCTTT TTTTCTACT CAATTAATAA TTTTCTGGCG GAGGTGTGGG GTTGGACAGA AATGCCAGTA TGATCAGTA CCGAAAGAAA ACGCTAAAAG AGTGTGTCTT AAGTGTGAAA AAAAAAATGA GTTAATTTTT AAAGAACCGC CTCCAACCCC CAACCTGTCT ACCGAGTCAAT
701	GATCCATTC CTGCTCTTCC AGTAGGTCCT AGTTTTGGTT CCCAGCACCA GCATCAGGAG TCTGATAACT ACCTGTAACT TTTCACTCT CCGCAAACT CTAGGTAAG GACGAGAAG TCATCCAGGA TCAAAAACCA GGCTCGTGTG CTGATCTCTC AGACTATTGA TGGACATTGA AAAGTCAGAG GCGCTTTGAG
801	GCCTCTTCCA TACTCATAGT TAAACTTTTT TTTTCTCCTA GCAGGGTATG GTAGCCTATA CATACCTGTA ATCTCAACAT TGAGCCCGTG CAGGCAGGAG CGAGAGAGT ATGAGTATCA ATTTTGA AAAAAGGAT CGTCCATAC CATGGATAT GTATGGACAT TAGAGTTGTA ACTCGGCCAC GTCCGCTCTC
901	GATCAAGAGT TGAAGGGCAG CCTTACCTAT AAGAGGCCCT CTCTCAAAAA CCCTAAAAACA AACAGGTTCT ATGCTCTGGG GATGCATGG TGCTAAGGCA CTAGTCTCA ACTTCCCGTC GGAATCGATA TTCTCCGGGA CAGATTTTT GGGATTTTT TGTCCAAAGA TACGAGACCC CTACGTCACC ACGATTCCCT
1001	CTACTCTCAT ACTATTTTAT CTTATTGTAA TTTTGAAGTA AGTCTGTCA GATAGTCCAG GCGTCGGAAC TTGTGACCTC TTTATTTCCG TTTCTCCAGT GATGAGAGTA TGATAAATA GAATAACATT AAAACTCCAT TCAGAACAGT CTATCAGGTC CCGAGCCCTG AACACTGGAG AAATAAGGCC AAGAGGCTCA
1101	GCTGGGATTG CAGGCACGCA CCACATGCT CTGCATTCT GCACACTTTG ACTCTTCTCG AAAACTCCTT AATAGTTCAT AAAAGATTCA GTTAAGTAGG CGACCTAAC GTCCGTGCGT GGTGTACGA GACGTAAAGA CGTGTGAAAC TGAGAAAGAG TTTTGAAGAA TTATCAAGTA TTTTCTAAGT CAATTCATCC
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>NcoI</p> <p>~~~~~</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>BamHI</p> <p>~~~~~</p> </div> </div>
1201	TTGGGGATGC ACGTTCATG GCAGTGTGCA TGCCGAGAAT GCAGGGTTTG TGAGGGATCC TGGGTTCAAA CCCTAGCACC ACTGGCGAGA AATTAATAAG AAACCCTAGC TGCAAGGTAC CGTACACAGT ACCGCTCTTA CTGCCCCAAT ACCCAAGTTT GGGATCCTGG TGACCCCGTG TGACCCCGTG
1301	TTGAGCCGGG CAGGCAGGGG TGCCGACAGC TTTTAAATCCC AGCACTTGGG AGGCAGAGGT AGGCAGATTT CTGAGTTCGA GGCACGCTG GTCCACAGAG AACTCGGCC GTCCGTCCCC ACCGCGTGGC AAAATTAGGG TCGTGAARCC TCCGTCTCCA TCCGTCTAAA GACTCAAGCT CCGCTCGGAC CAGCTGTCTC
1401	TGAGTTCAG GACAGCCAGG GCTACACAGA GAAACCCCTG CTTGAAAAGG CCCCCCCCC AAAAAAATAA AAAAAAAGT TTGACCTGGA GATTCAGTCT ACTCAAGGTC CTGTCCGTCC CGATGTGTCT CTTTGGGACA GAGCTTTGGC GGGGGGGGGG TTTTTTTTT TTTTTTTTCA AACTGCACT CCTAAGTCCA
1501	GCTTCCGCTC TCTTTTTCA AACTTCCCA AGGTCATTCA AAGGAAAGAA TATCTGTCTT CGAATCAAAA AAAAAAATAA AAAAAAATCT CTCTGGTTTA CGAAGCCGAG AGAAGAAATG TCAAAAATG TCCAGAAATG TTCTTTTTTT ATAGACAGAA GCTTAGTTTT TTTTTTTTT TTTTTTTTGA GAGACAAAAT
1601	CAGGTACACG AAGTACAGA GCGTGTGAGT TGCTATGGCT CCGCCGCCC GGGGTCTGAC GTCATCTGTC GCGCCGAATG ATTACGCAAT GCTTCCGGGG GTCCATGGC TTCCATGTCT CCGAACGTCA ACGATACCGA GGGCCCGGAC CCGCAGCTC CAGTACGAG CCGCGCTTAC TAATGCGTAA GAAAGGCCCG
1701	CCTTTCCGGA CCGGGAGGGA AACTTAGCTT TTAGTGTGGG AGGTCATGA AGAGAGGGG GTGGGGGGAG AGCGGGGGG AGCGGGGGG GGAAAGCGCT CCGCCCTGGC CCCCCTCTCT TTGAATCGAA AATCACACCG TCCCAAGTACT TCTCCTCCCG CACCCGCCCT TCGCCCTCTC CCGCTCCCC
1801	CGCAAAACTG CCGTAGCCAG CCGTGGACTG GTGGTTGTGG ACGTGTGGBA GBBTGAAGAT BTCACGCCCTC GGGCAGCGGC CCGGGCTCTG GCGTAGCGCC GCGTTTTGAC GCCATCGGTC GCGACCTGAC CACCAACACC TGCACACCTT CCACTCTCA CAGTGGAGC CCGCTCGCCG CCGCCGAGAC CCGACTCGCG
1901	GGCCCGGGAG CCGCCGCTCT CCGCCCCCTG GCTCCGCCAT GTTCCCGAGG GCACGCCCTA GCGTGAAGCC AAATGTCAAG CCGTGGTATG GGAACAGGGG CCGGCCGCTC GGGCCGGA GA CCGGGGAG CAGAGCCGTA CAAGCCGCTC CGTGGCGAAT CCGCACTCGG TTTACAGTCC GGACCAACT GCGCTGCCCC
2001	CTCCCGCGCT CCAATCCCC AGCGTGGACC AGAGGCTCCC AGGCCCTCCG AGCCTGCCAC CGAGTCACT CCGAAGCCAG CCGAGCCAC AGATGTGCGT GAGCGCGGGA GGGTTAGGGG TCCGACTGG TCTCCAGGGG TCCGGAGGCC TCGGACGGTG GCTCACTGGA GCGTCCGGTC GCTCCGGGTC TCTACACACT
2101	CGAAGTGGAT CCGGGGAGC AGAACCAGG CAGCAGGCTC CCGGGAGCAG AGGGCCCGCT CTATCAAGTT GAGCTGTGGG ATTTTATCCA CCGAGCACT GCTCACCTAA GGCCTCCG TCTTGGGGTC CTTGTCCGAG GGCCTCGTC CATTCCAGAA GATAGTTCGA CTGCAACAC TAAAAATGTT GCCTCTGGA
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>HindIII</p> <p>~~~~~</p> </div> </div>
2201	CTCCGCAAC AAGCTTTTTA TTTGAGCTGG ATGAAACCAC TTCTAGTGT AGTTTTATT CGTGATCTGA GGGTGGACT ACTATGACT GTCCACGATC GAGGACCTTG TTGAAAAA AAATCTGACC TACTTTGGTG AAGATCAACA TCAAAATAAG GCACTAGACT CCCACGCTGA TGATACTGAG ACGTGTCTAG
2301	TTAAGATTCC CGAGGAGACA GTGCTTTGCC TTATCTTACA GAGATGGGTA TCCAGGCTTA AGGATTTTGA AGTCAAGAAAT GTAGACGCCAC CATCACTGGC AATTCATAAG GCTCCTCTGT CACAGAACCG AATGAAGTT CTCTAAGTTT AGGTCGCAAT TCCTAAAACCT CATCTCGGTC CATCTGTAGG
2401	AAATTTAAT TATTGCTGCT GAGTACTTTA CACTGAAAAG ACTTTGGGAT TTCTATTTTG TGATATTTA TTTTGAAGAG GAGAGCACA CCGCTGATTT TTTTAAATTA TTAACAGGAC CTCTAGAAAT GTACATTTG TGAAAACCTA AAAGTAAAAA ACCTATAAAT AAAAACTTCT CTCTCGTGGT GAGCACTAAA
2501	TTTTTCTCC CTCCACGGG TGATGCGGTT GAAACCAAGG CCTCATGGAG TGTTAGGTA ACGCCCTGCC CCGTGTGCAA AGGGAAGAG CTTAGGTTAC AAAAAGGAGG GAGGTGGCC ACTACGCCAA CTTGGGTTCC GGAGTACCTC ACAAATCCATT TCGGGGACGG GACTCAGATT TCCCTTCTCC GAATCCAATG
2601	TTATTTTGGT TCGAGTGCAT ACTTTCTTAT TGAACACTAC TTCCCTGAAAT CAAGACGCCCT GCGTTTAGTG ACAAATACCA CATTGAAAT TAGGACGCTC AATAAAACA AGCTCACGTA TGAAGAAATA ACATGATGCT AAAGGACTTA GTTCTGGGGA CCGAAATCAC TGTTTATGTT GTAACCTTAA ATCTCGCGAG
2701	CTACTTAGCT TAGCAAGTTT AAGTAGTTG TTCTCAGAGA AAATTTGTTCT CTGGTGTCAA GTTAGTACTT CCTTTAGGAC AATATTGTA GATCAGATAG GATGAATCGA ATCGTTCAA TTAATCCAA AAGAGTCTCT TTTAAACAAG GACCACAGTT CAATCATGGA GGAATCTCT TATAACACT CTAGTCTATC
2801	GATTACATA ACTGCTTAC ATGCCACATG GTAGAATAG TCCCAAAAT TACTAAAAA AAAAAATTTG ATTACTTTCA AAAAAAGTG ATGAGACCGA CTAATGTATT TGACGAAATG TACGGTGTAC CATCTTATCA AGGGGGTTA AATGATTTTT TTTTTTAAAC TAATGAAAGT TTTTTTCCAC TACTCTGGCT
2901	GTATGGTGTG ACAACTTTAG TCCTAGCAAT AGGGAGGCCAG AGGCCACCCCT GCTTTAGGAC AGTCAGCCCC ATAGTGAGAA CCGCTCTCAA AAAAAAAC CATACACAGG TGTGAAATG AGGATCGTTA TCCCTCCGTC TCCGGTGGGA CGAAATCCTG TCACTCGGGG TATCACTCTT GGGCAGAGTT TTTGTTTTTG
3001	AGTGGAGAAA GGTGATGGTA CAATTAATAA ATGTGACGGG TTAATATGTT GACTGTAGTG TTTTAAATA TACAGAGGAA AAAAGCCAGTA AGTAATCAGT TCACTCTTTT CCTACTTCTA TACTTGCCC AATTAATACCA CTGACATCAC AAAAAATTTAT ATGCTCTCTT TTTCCGTTCT TTTCCGTTCT
3101	TTAAGTACGA GGGAGATGGT ACAATTTATG TTTGCATAGT AACAGCAATT CTCTGTGTTA TCAAGATTTG TGCTGTGTGT TATTTTGGCA TTCCAATAT AATTCAGTCT CCTCATCCA AATGAAATAC AAACGTATCA TTGTCGTAAG AAGACAAAT AGTCTCAAC ACACACACA ATAAACCGT AAGTTAATA
3201	GCAACCTGAT TTCAACATTT TTTTTTTTAA ACTTTGATCT TTTTGAATAA TTTCTGCTTA GAATAGAAAT ACCAGTATTG GTCAGTCTC CAATTTGGA CGTGGTACTA AAGTTGTAAA AAAAAAATTT TGAACCTAGA CAACCTTTTA AAAGACCAAT CTTATCTTTA TGGTCATAAC CAGTACAGG GTTTAAACCT
3301	AAATTTGTT AACTATATAG GAAAGCATAA TGTATGATG TTTTAAATTT CCAATGAGCC ATAGTCTGTA GACATGCTTG AGAATATTT TAGGACAAAT TTTTAAACAA TTGATATATC CTTCGATTT ACTAATATA AAATATTTAA GGGTATCCGG TATCAGGACT CTGTACGAACT TCTTATAAAA TCACTGTTA
3401	TAGATGATC CATATACTAT GCATATAAAC TATATGTGTG AATGTGTATA TACATACACA CATATAGTTT GTCTGTTTTG GGGGACAAAG ATTTAAGTAT ATCTCATGTA GTATATATCA CGTATATTTG TATACACAT ATGTATGTGT TATACATAT ATGTATGTGT GTATATCAA CAGACAAAAC CCCCCTGTTT TAAATGTATA
3501	GTAGCTTTGA CTGCTGGAAA GTCTCTTACC TCTGAGTGC TGCCATTTAA ACGATGAGCC ACCAGGCCCA CCAAGTTTTT TGTTGTTGTT TTTAAGGTA CATCGAAACT GAACGACCTT CAGAGAAATG AGGACTCAG ACCGTAATTT TCGTACTCGG TGCTCCGGGT GGGTCAAAAA ACAACACAA AATTTCCATG

Exon 1

3084

3085

3601	AGTTTCATCT AGCTCAGGTT GACCTAGAAC TCTCCATGCA TGAAAAAGACA CTTTAAAGTT TCTCATCCAC CTGCTTTACC TTCTGAATGC TGAGATTACA TCAAAGTAGA ATGTCAGTCCAA CTGGATCTTG AGAGGTACGT ACTTTTCTGT GGAAATTCAA AGAGTAGGTT GAGCAAAATGG AACACTTTAC ACTCTAATGT
3701	GATATGTGCC ATCATGCCTG GTGATGTAGT TGCTGAGTAT GAAAGCCAGG GCTCTGCGTG CCATTTCAGGC TCTGTGCCAG CTTAACTACA TCCCTGGTCC CTATACACGG TAGTACGGAC CACATACATC ACCGACTCATA CTTTCCGGTCC CGAGACGGCAC GGTAAAGTCCG AGACACGGTCC GAATTGATGT AGGGAGACCA
3801	TTGTTCCTTA TTTGATGAGA GCATTCAATC GTTTTGTGAT TTGTAAGAAC CAACGGAGTA TACATTTAAG ATATAAGATG CCAAGTATGT ATGTGTTACA AACAAAGGAA AACTACTCTCT CGTAAAGTAA CAAAACGATC AACATCTTTG GTTGCCCTCAT ATGTAATATG TATATTCTAC GGTCACCTAAC TACAAATGT
3901	TTCTAAGAGC TACACTAGAG TTCTAGGGAC CGAACCCTCAG GGCCTCGAGC ATGTCAGCCT GAGTTTTATC TATCTTCAGC TTTAAGGAGA GAGTTTAAAA AAGATTCCTC ATGTCAGTCCAA AAGATCCCTG GCTTGGAGTC CCGGAGCTCG TACAGTCCGA CTCAAAAATG ATAGAAATCG AAATTCCTCT CTCAAAATTT
4001	GAGATAATGT TATATGTTAA AGCAGCTTCT GTTTTATAT GGAACTAATA AAATATGATA AAGTACACT TAAATTTATC ATTCGTGTTT CTTTAAAAAT CTCTATTACA ATATACAAT TCGTCGAAGA CAAAAATATA CCTGTATTAT TTTATACTAT TITCATGTGA ATTTAATAAG TAAGACAAAG GAAAAATTTA
4101	TATCTATTAT TGTTGTATT TTATGTGCAT TGTTGTTTTT CCATATTTA TGCTGTGTG AGGATATTGG TTACCCTGGA ACTGGAATTA CAACAGCTG ATAGATAATA ACAACAATAA AATACACGTA ACCACAAAAA GGGTATAAAT ACAGACACAC TCCCATAACC AATGGGACCT TGACCTTAAT GTTTGTGCAC
4201	CTCTGTGGT TTTAGGAAT GAACCTGGC CCCTCTGGA GAAACGCCTT GCTCTTAACC ACTGAATCAT CTCTCCAGCC CCTATACTTC CTTTAAAAA GAGACGACCA AAATCTTAA CTTCGACCCG CTTTGGGGT CTTGTCGGGA CGAGAATGG TGACTTAGTA GAGAGGTCGG GGATATGAA GAAAAATTTG
4301	TTTTAAATTT CAACTAATC AAAGATTAAT TACATGTTAT GGAATCAAT GTGTACAAAT TGTTATTCA ATATGATTTT ACAATGTGTC AATGTAATGG AAAATTTAAA GTTGAATATG TTTCAATTAG ATGTACAATA CACTATAAA TGTTACACAG TACATTAACC
4401	TATCACTTTA AAAGTTTATT ATTTCTTTGT GTAAAAGACA TTTTAGATCA TTATTATTAT ATATTTTGTT AAGGTTTTTT TTTTTTTTAA ATTTTATGTA ATAGTAAAT TTTCAAATAA TAAAGAAAAC CATTTCCTGT AAAATCTAGT AATAATAATA TATAAACAAA TTCCAAAAAA AAAAAAATTT TAAAATACAT
4501	TATGAGTACA TTGTTGCTGT CTTACAGAC TCCAGAAAGG GAGATCAAGT CTCATTACAG ATGCCTGTGA GCCACCATGT GGTTGCTGGG AATGTAACAT ATACTCATGT GACAACGACA GAAGTCTGTG AGGTCTTCTC CCGTAGTCTA GAGTAAATGT TACGGACACT CGGTGGTACA CCAACGACCC TTAACCTGAG
4601	AGGACCTCTG GAAGAACAAT GCTTCTAAC ACTGAGTAT CTCTCCAGCT CATTCTAGAC TTTTTTAAAA TAAAGATTTA TTTATTGCT TTACTGTGT CTCTGGAGAC CTTCCTGTCA CGAGAATGG TGACTCAGTA GAGAGGTCGA GAAAGATCTG AAAAATTTT ATTTCTAAAT AAATAAACGA AATGTACACA
4701	GAGCACACTG TAGCTGTACA GATGTTTGT AGCCTTCATG TGTTTGTGG GAATTGCTCT GCTTGTCTG GACCCCACTT GGCCCTCTT GCTCTGTCA CTCGTGTGAC ATCGACATGT TACCAACAC TCGGAAGTAC ACCAACACCC CTTAACGAGA CGAACGAGAC CTGGGGTGAA CCGGGGAGAA CGAGACCACT
4801	ACCCTCTCT CTCAGTCCCG GCTTGTCTG GCCCAAAGAT TGATTTGATT ATTTGATTTT GGTTTTTCAA GATAGGGTTC CTCTGTGTAG CTTGTGCTG TGGGGCGAGA GAGTCAGGGG CGAACAGAC CCGGTTTCTA ACTAATCAAC TAACTAAAA CAAAAAGTT CTATCCAAA GAGACACATC GGAACCGACA
4901	CTTGGAACTC ACTCTGTAGA CCAGGCTGGC CTCAAAATCA GAAATCCCC TGCCCTTGCC TCCCGAGTGC TGGGATTTAA GGCCTGCGCC ACCACTGCCG GAACCTTGAG TGAGACTCAT GAGCTTTGAT CTTTAGCGCG ACCGAGACGG AGGGCTCAGC ACCCTAATTT CCGCAGCCGG TCCACTGCGG
5001	AGTGAATTA TATACATATG TACATTGTAG CTGACTTTAA ATGCACCA GAAGAGGAGT AGATCTCATT ACGGGTGTG GTGAGCCAC ACGTGTGTG TCATAAAATA ATATGATTC ATGTAACATC GACTGAAAT TACGTTACTT TCTTCCCTAG CTCAGATGA TGCCTAACAG CACTCGGCTG TGCACCAACG
5101	TGGGATTTGA ACTCAGGACT TCCGATGAG CACTCAAGTC TTTTAACCC TGAGCCACTT TGCCAGCCCC TAGATCTTTT TAATAACTCT CTCTGTGTA ACCCTAACT TGAGTCTCA AAGCCTACTC GTCAGTCAG AGAATTTGTT ACTCGCTAGA ACGGTCCGGG ATCTAGAAAA ATTTAGTGA GAACCAAAAT
5201	AAAAATGTTG CAACCAAGTT ACTCTACCC AATATAGTCC ATTTAGTAA ATAAATGTTA ACTCTAGTCA CTTATATTCC TGTTCTCTTT TTTTCTTTT TTTTACAACA GTTGGTTCAA TAGGATGGTG TTAATACAG TAATAACTTT TATTTACAT TGAGATCAGT CGATAAAGG ACAAGAGAAA GAAAAAGAAA
5301	CTTTGTCTGT TGTGTTCTTT TCTATTTTG AGACAGGGTT TCACCTGTGA ACTTTGGTGG CTCGGAACCT CTCTTTGTAG AGCAGCTGGC CTCAGTCTG AGAACAGACA ACAAAAAGAA AACTAAAAC TCTGTCCCAA AGTGACACAT TGAAAACACC GAGACCTTGA GAGAACACAT TCGTCGACCC TCGTACCACT
5401	TATCTGCTC CCCAGTGTG TGACTAGAG AGTGCCTCAG CCGTCTGGC TTTTCTTAC ACTTTCTAAA TGTTTATGT ATATGGGTGT TTTGCCTTT ATAGCGGAG GGGTCCAGC ACTGATCTCC TCACGCCAGT GCACGACCCG AAAAAGAAATG TGAAGATTT ACAAAAATACA TATACCACCA AAACGGAAAC
5501	TGTGTGTCAG TGCACCATAT GCCTGGTGC CATGTGTAAC AGAAGACTTT GGATCTCCTG GAACTAGAGT TATAGACAGT TGTGAGCGGC TATCTGGGTA ACACACAGTC ACGTGGTATA CGGACCCAGG GTACCATTTGA TCTTCTGAAA CBTAGAGGAC CTGTATCTCA ATATCTGTCA ACACCTCGCC ATAGACCCAT
5601	CTGGAATTTG AACCAGATT TTAATGTTAGA GCAGCCAGTG CTCTAACCT TGAGTTCTAG ACTCCAGTCT CATTCTGTAG CGATTTATAT CTAATCTGTA GACCTTTAAC TTGGTTCTAA ATATCCATCT CGTCGGTAC GAGAAATTTGA ACTCAAGTCA TGAGTCTGAG GTAAGACTC CTAATAATTA GATTAGACAT
5701	CTATAGCCAA TATTTGATTT AAAGTGATTA GATGCTTTGT TTGTTGTAGC TAGGGTCTCA TGTAAGTTAA GTTAGCTTCA GACTACTGTT GTTGTGAGG GATATCGGTT ATAAACTAAA TTTCACTAAT CTACGAAAATA AACAACTCG ATCCAGAGT ACATCGAAT CAATCGAAGT CTGAGTACA CAACCACTTC
5801	ACAAGTCTGA ACTTCCAAAT CTCTGCTCC CACTTCTGAG TATTTAGGTT ACAGACACTT AGCAAAAACA AATCCAATTT TCTACTAGT TATAAAATTT TGTCAGAACT TGAAGGTTAG GAAGACGGAG GTGAAGACTC ATAACCTCAA TGCTGTGAA TCGTTTTGTT TTAGGTTAAA AGATAGATCA ATAATTTTTA
5901	TGGCTTACTA AGCTTTGTTC TGTGACTTAA TTTTGTGTT GGGGGGTTTT TGTTTTTTTT TGTTACTTCA AAGAATTCAG CATATTGTTA ATGTTTTCTA ACCGAATGAT TCGAAAACAG ACTAGTAAAT AAAACAACAA CCCCCAAAAC ACCAAAAAAA ACCATGAAGT TTCTTAACTC GTATAACAAT TACAAAAGAT
6001	TTGTGCTTAG GAATTAAGTT TGAAAAAGAA TAACAATTTT CTTTGAATTT TACATATTCT GTATTGTAAA TTTGTTTACC CTTTAAAAAC ACGAGTTTAA AACACGAATC CTTGATTCAA ACTTTTTCTT ATTTGTTAAA GGAATCTTAA ATGTATATGA CATAACTATT AAACAAATGG AGAAAAATTT TGCTCAAGT
6101	TGTTGTTTTG TGATATCCAC ATGTGTCCAG GAGCCAGAAA GTTTCAGATC TTTGGAGTCA GAGTTACAGG TGTTTGTGAG CCACCTGATG TCAAGACTGG ACACCAACTC ACTTATGTTG TACACACGCT CTCGGTCTTT CACAGTCTAG AAACTCACT CTAATGTCC ACAAACTCTC GTGGACTAC AGTCTCGACC
6201	GAGTCTGAA AAGTAGACGT GCACCTAAGC CCAGAACCAG CTCTCTAGTC TCTGTTGCTT TGTTTGTAGA CAGTCTTACC TAGTAGGTAG CTCAAAGCTGG CTTCAAGACTT TTAATCTGCA CTGTGATTCG GCTTCTGTGC GAGAGATCAG AGACAAAGCA ACAAAACTCT GTCAGAAATG ATCATCCATC GAGTCTCGCC
6301	GGATCCATCG ATGGCCATAG CGGCCGCGGA TCCATAAATT GATATAATGT ATGCTATACG AAGTTATGAA TTGGCCGCTC GACGAAGTTC CTTATCCGAA CCTAGGTAGC TACGGTATG ATCGGCGCCT AGGTATTGAA GATATATACA TACGATATBC TTCATACTT AACCGCGGAG CTGCTTCAAG GATAAGCTTT
6401	GTTCCTATTC TCTGAAAATG ATCGAAGACT CTACCGGATA GGGGAGGCGC TTTTCCCAAG GCATCTGTGA GCATGCGCCT TAGCAGCCCC GCTGGCAATT CAAGGATAAG AGATCTTTCA TATCTTTGAA GATGGCCCAT CCCCCTCCGC AAAAGGGTTC CGTCAGACCT CGTACGGCAA ATCGTGGGGG GAAAGCCGCG
6501	GGCCGTACAC AAGTGGCCTC TGCCCTCGCA CACATTTCC ATCCACCGGT AGCCCAACC GGCCTCCGTT TTTGTGGCC CCTTCGCCC ACTTCTACTC CCGCATGTTG TITCACGGGAG ACCCGAGCCT GTGTAAAGTG TGGGTTGGCA TCGCGGTTGG AAACCAACGG GAAAGCCGCG TGAGATGTAG
6601	CTCCCTAGT CAGGAAGTGT CCCCCCGCC CCGCAGCTCG CGTCGTGAC GACGTGACAA ATGGAAGTAG CAGCTCTCAC TAGTCTGTG CAGATGGACA GAGGGATACA GTCCCTCAA GGGGGGCGCG GCGTCCGAC GCGACACTGT TACCCTCATC GTGCGAGGTG ATCAGACAGT ATCAGACAGT
6701	GCACCGCTGA GCAATGGAAG CGGGTAGGCC TTTGGGGCAG CGGCCAATAG CAGCTTTGCT CTTTCCGTTT CTGGGCTCAG AGGCTGGGAA GGGGTTGGTC CGTGGGCACT CGTACTCTC GCCATCCGG AAACCCCGTC GCCGGTTATC GTCGAAACGA GGAAGCGGAA GACCCGAGTC TCCGACCTTT CCCCACCCAG
6801	CGGGGCGCG CTCAGGGGCG GCTCAGGGG CGGGGCGGGC CGCCAAAGT CTTCCGGAGG CCGCGATTCC TGCAACGCTT AAAGAGCGAC AAAGCGCGCG GCCCCGCCC GAGTCCCGCG CCGAGTCCCC GCCCCGCCC GGGCTTCCA GGAGGCTCC GGGCCGTAAG ACGTGGGAA TTTTCCGCTG CAGACGGCGC
6901	CTGTTCTCT CTTCTCATC TCCGGGCTT TCGACCAATT CGCTGTGTC GAGGGCCAG TGTTGGGGTG AGTACTCCCT CTCAAAAGCG GGATGACTT GACAAAGAGA GAAGGAGTAG AGGCCTGGAA AGCTGGTTAA CGCAGACAGC CTCCCGTCC ACAACCCCACT CATGAGGGA GAGTTTTTGG CCGTACTGAA
7001	CTCCGCTAAG ATTTGCTAGT TCCAAAACG AGGAGGATT GATATTCCAG TGCCCGCGG TGATGCCTTT GAGGGTGGCC GCGTCCATCT GTTCAGAAAA GACCGGATTC TAACTAGTAA AGGTTTTTTC TCCCTCTAAA CTATAAGTGG ACCGGGCGCC ACTACGGAAA CTCCACCCGG CCGAGGTAGA CCAATCTTTT
7101	GACAATCTTT TTTGTTGCAA GTTTGAGGTG TGGCAGGCTT GAGATCTGGC CATACACTTG AGTGACAATG ACATCCACTT TGCTTTCTCT TCCACAGGTG CTGTTAGAAA AACAAAGTGT CGAATCCAC ACCGTCGAAA CTCTAGACCG GTATGTGAAC TCACGTGTAC TGTAAGTGAAC ACGGAAGAG AGGTGCCCAC
7201	TCCACTCCCA GTCCTAAGT CAGCCACCAT GATTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTT TCCGGGGAGA GGATTTGCG GGATTTGCG ATATGACTGG AGGTGAGGCT CCAAGTTGAC GTCCGTGGTA CTAACTGTTT CTACCTAAGC TGGCTCCAAG AGGCGCGGCA ACCCACTCTT CCGATAAGCC GATAGTGACC
7301	GCACACAGA CAATCGGCTC CTCTGATGCC CGCTGTGTC GGCTGTACG GCAGGGCGCC CCGGTTCTTT TTGTCAAAGC CGACTGTCC GGTGCCCTGA CGTGTGTTCT GTTAGCCGAC CAGCATACGG CCGCACAAAG CGTCCCGCG CGCCAAGAAA AACAGTTCTG GCTGGACAGG CCACGGAGCT
7401	ATGACTGCA AGACGAGGCA CGCGGGCTAT CGTGGCTGCC CAGCAGCGCC GTTCTTGGC CAGCTGTGCT CGACTGTGTC ACTGAAGCGG GAAAGGAGT TCTCTGCGT TCTCTGCGT GCGCGGATA GCACCGGACA GCGTCCGCC CAAGGAACCG GCTGCACCGA GCTGCAACAG TGACTTCCCG TCTCCGTAAG
7501	GCTGCTATTG GCGCAAGTGC CCGGGCAGGA TCTCTGTCA TCTCACCTTG CTCTCGCCA GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGGC GCGGCTGCAT CGACGATAAC CCGCTTCCAG CCGCCCTCTT AGAGGACAGT AGAGTGGAAC GAGGACGGCT CTTTCATAGG TAGTACCGAC TACGTTACG CAGGACGCTA
7601	ACGCTGATC CGGCTACCGT CCCCATTGAG CACCAAGCTA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAAGCGG TTTGTTGCTG CAGGATGATC TGGCAACTAG GCCGATGGC GGGTAAGCTG GTGGTTGCTT TTGTAAGCTA GCTCGCTGCT GCATGAGCCT ACCTTCGGCC AGAACAGCTA GTCTACTAG
7701	TGGACGAGA GCATCAGGGG CTCGGCCAG CCGAAGTGT CGCCAGGCT AAGGCGAGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTGCTGACCC ATGGGGATGC ACCTGCTTCT CGTAGTCCCG GAGCGCGGTC GGCTTGACAA GGGTCCGAG TCCGCTCGT ACGGCGCTCC GCTCCTAGAG CAGCACTGGG TACCGCTAGC

3838

3719 3718

5' loxP 3101

5' FRT

Neomycin-Resistenzgen

3220

7801	CTGCTTGGCG	AAATATCATGG	TGGAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTCACTG	ACTGTGGCCG	GCTGGGTGTG	GCGGACCGCT	ATCAGGACAT	AGCGTTGGCT	
7901	ACCCGGATA	TTGCTGAAGA	GCTTGGCCGC	GAATGGGGTG	ACCGCTTCTC	CGTGCCTTAC	GGTATGCGCG	CTCCCGATTG	GCAGCGCATC	GCCTTCTATC	
8001	GCCTTCTTGA	CGAGTCTTGA	AGCTCGCTGA	TCAGCCCTGA	CTGTGCCTTC	TAGTTCGCCG	CCATCTGTTG	TTTGCCCTCC	CCCGGCGCT	CCCGGCGT	
8101	TCCTTGACCC	TGGAAAGTGC	CATCCCCACT	GTCTTCTCCT	ATAAAAATGA	GGAAATTGCA	TGCATTGTC	TGAGTAGGTC	TCATTCTATT	CTGGGGGGTG	
8201	GGGTGGGGCA	GGACAGCAAG	GGGGAGGATT	GGGAAGACAA	TAGCAGGCAT	GCTGGGGATG	CGGTGGGCCT	TATGGCTTCT	GAGGCGAAA	GAACAGCTG	
8301	GGG GAAGTTC	CT ATTCCGAA	GT TTCATTTC	TCT AGAAAAT	AT AGGAACTT	CT CGACCTCG	CAG GGGGCCC	TAG AGTCCGAC	TTG TAGTTAC	TC ATGGCAGT	
8401	GGT TCTCCCT	TAG CCCCAGT	GCT AGGAAATG	GA AGTATGAG	CT ATCATTTA	AA GCTGAGAA	GGT TTTAAAG	AA ATGTTTAT	TG CAACTCTG	TT ATAATCAA	
8501	CATAACTCTG	AAAAGTTACT	GTTCCTTATG	TTTGTTTTC	TTTTGTCTCA	GTGAGACCTG	GCATCTTTAA	AACATAATA	TAAAAGAGAT	GAGTCATAGT	
8601	GTCTTCTTTC	TTTTTAATTC	CAATAGTGAT	GAAAAGACTG	GTG AAAAAAA	TA ATGCTGCA	GAG TCCAGCA	CAT TGTCCCT	TG CTTCTCA	CAG AGAAAG	
8701	ACCGAGTGC	AAGCACATTC	AGCTTGTTC	AGCTGCTCTG	AGTCCCTCTC	CACAGACTCG	CCCTTATCT	ACAGTTGATC	ACGATGCAC	ACGGCAAAAC	
8801	CCTACTCCAG	CTACAAAGGA	AGCAGCCGTG	TTGACAGAGA	TACCGAATCT	ATAAGGCCCG	AAAAGTGGG	GAG ATCTTGA	AAG AGGAAT	GAG AAAGAG	
8901	AAGGTAAAGT	AGTCAACTGT	AGT CCACTCC	ATC TCCCATG	GGT CGACATA	ACT TCCGATA	ATG TATGCTA	TAC GAAAGTTA	TAG CTTGCCG	GCC GGCCCGC	
9001	ACCTCGAGCC	TGACCCAGCC	TTGCTATGTA	CAGTTCRAAG	CATCCTGACC	CAGCCTTGCT	ATATACAATC	CAAGCCATCC	TCCTGACCCA	GCCTTCCAT	
9101	GTACAATCCA	AGCCATCTCC	CTGACCCAGC	TTGCTATGTA	CAATCCAAGC	CATCCTCCTG	ACCCAGCCTT	GCTATGTACA	ATCCAAGCCA	TCCCTCTGAC	
9201	CCAGCCTTGC	TATGTACAAT	CCAAGCCATC	CTCTGACCC	AGCCTTCTCA	TAGTCCAGCC	TTCTGATAGT	TC AGTTGAT	ATT CGAAT	ATG CTACTG	
9301	AAGTAAATCT	GTTTATAAAA	TGCTGTGATA	TAGAAACAAT	GG AAAAAACA	ATT TCTACA	AAT GAAAGCC	AG AGGCCACC	AG ATCGTTCA	AAA ATGACTA	
9401	TGAGAGACTT	CATATATTAC	CTTCCAGATA	ACAATCCAA	GACGTAAGTA	AAATTCATTT	ATGCTTTGTT	TCATTGGGTA	TGTAATGACA	TGCCACTTTT	
9501	AGAGTACAGT	TTATGTTTCA	GAAGCTTCTT	GAATAATTTA	TAACATTTGT	ATTATCTCTT	AAAAGATAAG	TTCTAACA	ATAAGTATG	GATACATTTG	
9601	GGTCAAGCC	TATGCAAGTA	CGTCTCTCT	TGGTGCCCT	CTTATCTCC	TAGAGCTAAA	GAGGCTTCTT	TTTTTAGTTA	TGGCCAGTA	CCAGATTCGG	
9701	GTGTAATTTT	TATTTCTTAT	GTGATATAAT	GTGATATAAA	GGAAATAGAT	TTTTATGCC	TATTTCAATG	GTAATGGTGT	AGTTTGGATC	ACAAGTCCCT	
9801	CATGAACAAA	GCTTTAATTC	TTTAATGTTA	GCCTGAGGTC	GAAGCCAGAC	ATCATAAATC	TGTTTTGGT	GGTGCCTAG	GTGGCCTAG	CATAGTCTTC	
9901	AGGATAGGCC	CTTTTTGCAT	TCGCCAGGTC	TTTGGCCATG	TTGAAGAAGG	TGCGGAGATG	AGGCCACTAG	CTTGCCTCAT	TTCCAAAGCC	TGCC AATCTG	
10001	CTCT CACTAA	GG AGTTAGTG	GGGGAAAAGT	ATTTCTTATT	TAGGGCCAGC	CAGGTTATTG	GTCTTGTATG	AGTTTTTAA	TAAAAAATTC	TTCTATTGTT	
10101	TTGTTTTTGG	CTGGTGTGTG	CTGGGAATCA	ATCCGTTCTC	AGCCTTCACG	GATCTAATTC	TCACTGGCTA	GCCATGACTG	AAAAAAAATA	AAAAGATTGT	
10201	TGAACATTC	TATGAAGTG	CTGTAGTATA	TTGTATGAAA	AATGGAGGCT	AAAGAAATTT	TTTTCTGGCT	ATAAAGAAA	TTGCTAAAAT	ATTAATTTGT	
10301	TAAAAGATAT	GCTTTTTATT	GTACTTAACA	GTCTTCTAGT	GG AACAAGAA	AGA AAACCTG	AGA AAATCCTT	GG CTCCACC	CCA ACGAGAG	AG TGAGACTC	
10401	TTATCGCTTC	TTTATGTTGA	TGCTTCTGTG	TGCTGTGCAC	CACCCTGAC	TTAGCCACAG	CTTCTTAAA	TATTTCTTTT	AACGATTTTA	TAATTAACA	
10501	TTCTTTGATT	TTCTTTTCT	TTCTGTTCTG	GCCTGTGCTT	TGTGATGTC	TTTTGTGTGC	ATGTGTTTGC	TGTGCATGTC	TTTGGTGTGC	ATGTCTGCTC	
10601	TATATGGGG	TGTGTGTGT	TCITTAGTTG	TGCTTCACTT	TATGTAGTAA	TGCAAGGTTT	CTTGTGATT	TTGTCTAGTC	AGCTTGGCTC	TGAAATCCCT	
10701	TGCTATGCT	TTTTGATGTC	TGGCTGCTAA	GCCTACCTAG	CTTTTATATG	GGTTTTAAGG	ATCCAAACTC	CATTCGCTAC	ACTTGGTGGG	TGAGTACTTT	
10801	ATCCACTGAA	CACCCCTCTA	CCGCCAACCT	GCAAAATGGG	CTTCTGTACA	TTTGAATTGCT	TCTTAAAAAT	AGAACCCTT	AGCCGGGCGC	GGGTGGCCCA	
10901	CGCTTTAAG	CACCTTGGAG	CGAGAGGAG	GTGGATTCT	GAGTTCAGGG	CAGCCTTGGT	CTACAGAGTA	AGTTCCAGGA	CAGCCAGGCG	CTCACAGAAA	
11001	CCGTGTCTTG	AAAAACCGAA	AAAAAAAATA	ACCAAAACAA	ACCAAAACAA	AAACAGTCGG	GGCTACATA	AAAAACCCCA	ACCATGTGTT	CTAAAAGGAA	
11101	GAGAAAGCCC	GGCTGGGCGT	GGTAGCTCAT	GCCTTAAGC	TGGCCGCTG	AGAAGCTGAG	TCTTTACTAC	TGAGGTGTAG	CATCATTCTT	GGAGAGAGAT	
11201	GAATAAATCT	CTCACCCCA	GAGAGGGGAC	TGGTGACAGA	TCACCCAGAA	AGATACCACC	AAAGTCCAA	TTGGACCTTT	TAGGCTTTTT	TTATTTTTTA	
11301	GTITTTAGGC	AGGGTTTTTC	TGCTGAGCTG	TGCTGAGCTG	TGCTGAGCTG	TTTTGTGTGC	ATGTGTTTGC	TGTGCATGTC	TTTGGTGTGC	ATGTCTGCTC	
11401	ATTACTGGGA	TTAAAGGCAT	GTGCCACCAC	TATCCAGTGA	AGCAGTGAGT	TTTAATTATC	ATCAATATGA	GAGAAAGGTT	ACTTATAAGA	TCATAAATTA	
11501	TCTCAAAGAC	AGCTGTATCA	CACAAAGCTA	CCAGCATGG	ACAATGGCTC	ATGAAAAGCTG	GGAACTTAA	ATTCCTTAAA	CATAGAAGAC	ATTCTGGCAGG	
11601	CTGGAGAGTG	TCTTTAGTGA	GTCTTTACTG	CGTGGGGTGG	GAAATTTTCA	TTTATCTGGT	CAGTTTCCGG	GACTTCTGTA	AGCCTTTGAG	TTGTTGGCTG	
11701	AGCTTTGCGA	ATTTCTCTGT	AGGAATATCC	AAATCTTAA	GCTTCTCAT	CAGAGAGGTT	ATATTTTGG	GAAACTGCCA	CACAAAAGCT	ATATAGGGAG	
11801	AATCTGTCTC	AGAAACACAC	ACACACACAT	GTATGCTATG	ATACACAGAC	ACACACACAC	AGTTAGATCT	TTTCAGAAATG	AGAGGCTCAT	AAATTTTGTG	
11901	TAAATATGAT	AATGACTAAA	TACTATGCC	TCCATTTACA	TTTGTACTTA	TATTCATATG	CTGGGAGTAC	ATGAGAGTGT	CATAGCTTGT	GGGGTGTGCA	
12001	TAGCACACAC	AGCCTGAGAG	ATGATTCAGG	AGTTAAATGT	AAACATGAA	ATAAGGTTAG	GACCCCTCAT	TACTCTCACA	GTATCGCAAA	CCCCACAGT	

3221

2158

3' FRT 2093

Exon 2

3789

2645

3' loxP

3707

Exon 3

3271

Exon 4

2405

Anhang

12101	GCCTCATGAG TTTTAAATTA AAGATGTTC AATTGAGGTT TTGTTTGATT TTGAGACAAT CTTGGGCTAG TCTAGGACTT GCCATGTAGC TCATCTTGGG CGGAGTACTC AAAAATTTAAT TTCTACAAGT ATAACCTCAA AACAACTAAA AACTCTGTGA GGAACCCGATC AGATCCTGAA CGGTACATCG AGTAAGACCC
12201	CCTTGAGCTT ACAGAGATCA GTCTCCTCTG GCTCTTAGGG TTAGGAGTAA AAGCTTGCAC TTCTAATTTA GGAGGGCTTT GTTGTCAAAA ACAGTAGCTT GGAACTCGAA TGCTCTTAAGT CAAGAGAGAC AATCCTCATT TTCGAACGCTG AAGATTTAAAT CCTCCGCAAA CAACAGATTTT TGTCATCGAA
12301	TGAGTGGTTA AAAAAAATTA AAAGGAACAA AGGGAATATT GAAAAAAGTC TTTCACCTTT TGTTTCTTTG TGGTTTTAAA GTCTGTGGTT TCTACCCCCC ACTCACCAAT TTTTTTAAAT TTTCCTTGTG TCCCTTATAA CTTTTTTCAG AAAGGTGGAA ACAAAGAAAC ACCAAATTTT CAGACACCAA AGATGGGGGG
12401	CCCCAAAAA AAAACAAATG TTACCAGTTA AAACAATTTT TAAGTTACAT TGTGCATATG CAGTGTGTAT TTGTGTGGGC ACATGCATGC CATGATGAGA GGGGGTGTTA TTTTCTTATG AATCGTCAAT TTTGTAAAAA ATTCAAATGA ACACGTATAC GTCACACATA AACACACCCG TGTACGTAGC TACTACTCTC
12501	GTATGGAGGT TCTCTTAGTC AAGGTTTCTG TTCCTACACA AACATCATGA CCAAGAAAGCA AGTTGGGGAG GAAAGGGTTT ATTCAGTCTA TACTTCCACA CATACCTCCA ACAGAAAGAC TTCCAAAAGC AAGGATGTGT TTGTAGTACT GGTCTTCTGT TCAACCCCTC CTTTCCCAAA TAAGTGCAAT GTGAAGGTGT
12601	CTGCTGTCTT TCACCAAAGG AAGTCAGGAC TGAACCTCAA GCAGGTGAGC AAGCAGGAGC TGAGCAGAGG CAATGGAGGG ATGTTCTTTA TTGGCTGTCT GACGACAAGA AGTGGTTTCC TTCAGTCTCG ACCTTGAGTT CGTCCAGTCC TTCTGCTCTG ACTCGTCTCC GTTACTCTCC TACAAGAAAT AACCGAACGA
12701	TCCCTGGGCT TGCTCAAGCT GCTCTTCTAT TTGGTTTTTT GTTTTTTTTT TAGATACAGG ATTTTCTCTG TATAGCCCTG GCTGTCCCTG AACTCACTCT AGGGGACCGA ACGAGTCCGA CGAGAGAATA AACCCAAAAA ATCTATGTCC TAAAAGAGAC ATATCGGGAC ATATCGGGAC CGACAGGAGC TTAGTGTAGA
12801	GTAGACCAGG CTGGCCCTGA ACTTAGAAAT TCGCCTGCCT CTGCCTCCCA AAGGTGTTAA AGGCGTACGC CACCACACCT AGCCTGTTCT CTTATAGAAC CATCTGGTCC GACCGGAGCT TGAATCTTTA AGCGGACCGA GACGGAGGTT TTCCACAAAT TCCGCATGCG GTGGTGTGGA TCGGACAAGA GAATATCTTG
12901	CCAAGACTAC CAGCCCAAGG AAAGCCCTT GATCACTAAT TGAGAAAATG CCGTACAGTT GGATCTCATG GAGGCATTTT CTCACCTGAA GCTCCTTTT GGTTCTGATG GTCGGGTCTC TTTCCGGGAA CTAGTGATTA ACTCTTTTAC GGCATGTCAA CCTAGAGTAC CTCCTGTAAG GAGTTGACTT CGAGAAAAA
13001	CTGTGATAAC TCCAGCTGTT TCAAGTTGAT ACAAAACTAG CCAATCATGA GGTGAAAGCA CAGTTTGTGG CAGTCAAGTGT GCATTTCTGA GGTGTACAC GACACTATTG AGCTGCACAA AGTTCAACTA TGTTTTGATC GGTCTATGCT CCACTTCTCT GTCAACACACC GTCAGTACA CGTAAGACCT CCAACGTGTG
13101	TGCTACTGCT GTGCATTCAG CTGTGTAGAC TTTGTGGCAA GAGCCATCTC ACCTGCTCAC CAATTTTTAG ATATAGCATT TCAGATTTAT AATGTATGTG ACGATGACGA CACGTAAGTC AACAACTCTG AACACCCGTT CTCGGTAGAG TGGACGAGTG GTTAAAAATC TATATCGTAA AGTCTAAAT TACATACAC
13201	TGTTTCAATA AGATTTAAGC AGCCAGTATA GTAGAAAAGA AGATTTGAAA TATTTTTTTA ATAGTTATAA TTGGATGGGA GCAAGAGGTT GCAAGTACTT ACGAAGTTAT TCTATAATTG TCGGTCATAT CATCTTCTCT TCTAAACCTT ATAAAAAAT TATCAATATT AACCTACCCT CGTTCTCCAA GACTACCTGA
13301	TTTGACAGT TGGCTGACT CCGTAGGGCT GGACGTAGGT GTGCATCTGT GTAATCCGAG CAATTTGAAA GCTGAATTTG AGGCTAGCAT GAGCCTACAG AAACGTGTC ACCGCTAGC CAGCTCCCGA CTGCTACCA CACTAGGAGC CATTAGGGTC GTTAACTTTC CGACTTAAAC TCCGATCGTA CTCGGATGCT
13401	AATGACGCC CAATTTTTTT GAGCTTCATA GCAAGAGCCT GCCTCATAGA TCTAAGAAAA TAAAACCAAA CTAAAAAAAG ATATACTAGT ATACATATTT TTACTCGTGG TTGATAAAA CTGAAAGTAT CGTTCTCGGA CGGAGTACT ATGATTTGTT ATTTTGGTTT ATTTTCTTTC TATATGATCA TATGTATAA
13501	CAGAAAGCTA GAAAAAGTAG GTACAGAAAG TGGGGTAAAA AGGTAACATT TGTTTATTTA TTTATTTATT TTTATTTTGG GCTCAAAAC TAAAGTATAC GTCTTTCGAT CTTTTTCATC CATGTCTTCT ACCCCATTTT TCCATTGTAA ACAAAATAAT AATAAATAA AATAAATAAC CGGAGTTTGG ATTTTCATATG
13601	TGTAACCCAC TGAATTTAGT GGCCTGGTACC ACTGTGTTAT TTTAAAAGAG AGTAAACATT TCTTATTTGT TCTAATTTT TTTAAGATTT TACTTATTT ACATTTGGTG ACTCAATGAA CCGACCATGG TGACCAATAA AAATTTTCTC TCAATTTGTA AGAATAACAA AAGATTTAAA AAAATTTCAA ATGAATAATA
13701	TATATGTAA TACACTGTAG TTGCTTTTAG ACATATCAGA AGAGAGGTGC AGATCTCATT ATGGATGGAT ATGAGCCACC ATGTGGTTGC TGGGTTTTTG ATATCAATTC ATGTACACTC AACAGAAATC TCTCTCACAG TCTAGAGTAA TACCTACCTA TACTCGGTTG TACACCAAGC ACCCAAAAC
13801	AACCTAGGAC CTTTAGAGCA GTCAGTGTCT TAACTACTG AGCCCTCTCA CTAGCTGTCT TATTTGTTAT GTCATAAAGT TCCTTATTAT ATGTTACCAA TTGAGTCTCG TAAATCTCTG CAGTCCAGG AATTTGATAG TCGGGAGAGT GATCGACGAG AATAACAATA CAGATTTCTA AGGAATAATA TCAATATGTT
13901	ATTAGCCAGG TGAATTTAGT AATCTCCCTT AATCTCAGCA CCAAAAGATG AGAGACAGGA GGAAGGCCAGG AAGGTCCTCG TGAGTTTGGG TGAAGCTGTT TAACTCGTCC ACCACCATCA CGTAAGGAAA TTAGAGTCTG GGGTTCTACG TCTCTGTCTC CTTCCGTCC TCCAGAGAC ACTCAAATC CGGTCGGACC
14001	TTTACAGAAA GAGTTCCAGG ACAGCCAGGG CTACAATAGT GAATTCCTGT CTAAAAAAAA AGTTACCAAA TAATATCTTA TCCTTCTCAC CTCTCCAAATG AAATGCTTTT ATGAGTCTCC ATGCTGGTCC GATGTATATCA GATTTTTTTT TCAATGGTTT ATTATAGAAA AGGAGAAAGT AGGAGAAAGT GAGAGATTAC
14101	TATCCATCCA TCCATCCATT TATTTATTTT GAGTCAAGAT CTTAAAGTAA AGTTCTATAG GACCTAGAAC TCTTGGTTCT TTGCTTCAAT GGCTCCCTTA ATAGGTAGCT AGGTAGTAA ATAAATAAAA CTCAGTCTCA GAATTTCTAT TCAAGTATCA CTGGATCTTG AGAACCAAGA AACGAGTAA CCAGAGGAAT
14201	GAGCCAAAGT TACCTTTAGT TTCATTTATG CTGGCAGGGT AACTGTGTCA TGTGGTATTT TTAGTTGAGT TATAGAGAAA GTTTAAAGAT GTCAGTCTGT CTCGGTTCTT ATGGAACCTA AAGTAAATAG GACCCCTCCA TTGACACTAG AACCCATAAA AATCAACTCA ATATCTCTTT CAAATTTTAC CAGAGTAAAT
14301	GTTTTCCTTT AGTAACCTA TTTGAGTCTA TACTATTCAG TACTATCTGT TGTGTGCTA AGGTAACAAAT GTTTCCTATT TAGTAGGACA GAAATCAGA CCAAAAGAAA TCAATGAGGA AAACCTAAGT ATGATAAGTC CTTTATGACA AAACAACGAT TCCATTTGTA CAAAGGTAAA ATCATCCGTT CTTTGTAGCT
14401	GCACCTAAGA TGCTAATGAT AATGAAGAGC TGAAGAGGAG GGTGGATAGT GGGCCACTTC TGGTTCTCTG AGTAAAAGTG CGAGAGAGAT GTTCTATTAT CGTAGGTTCT ACGTACTTA TTACTTCTGC ACCCTTCTCT CCCCCTACTA CCGGCTGAAG ACCAAGGAGC TCATTTTCCG CGTCTTCTAC CAAGATAATA
14501	TTTAGATGAA GAAAGGTGAG TTAAGGAGAT GGTGCAGGAA GGAGGGAGGA GGTAGGGGTA AAGAACAGAG AGATGCTATT TCTCCATCTG TCAACAGAAC AAATCTACTT CTTTCCACTC AATTCCTCTA CCACGTCCTT CCTCCCTCTC CCATCCCCAT TTCTTGTCTC TCTACGATAA AGAGGTAGAC AGTTGTCTTG
14601	TTTTAATCAA CGCCCACTGG ATAGATGGAC AGCATAGGCA TAAAATGGAC TAAAATTAATG TGCAATTTTA GCATGTTTGG TGTAGATGGCT CAAATTTGAT GCGGGTGAAC TATCTACCTG TCGTACTGAT AAAATTCGTC CATTTACCTG ATTTAATTAC ACGTTAAAAT CGTACAAACC TACTCTACGA
14701	ATCGCTCTCC TCTGTCTGT CAACCCAACT TTGTTTACTC ATCACCTCGC TGCTAAGCCA GGCAGCTGCT TGAGCAGCTG TGTGCTGTTA CCCACTGAGG TAGCGAGAGG AGAACAGACA GTTGGGTTGA AACAAAAGTAG TAGTGGGACG ACGATTCGGT CCGGTCGAGC ACTCGTCCGAC ACACGACATA GGGTGACTCC
14801	ATCGATTTCT AGATTTGAT CAGTTTGAAG TTGGTATTTA AACTTTTCTG ATTTTCTATT AATTTTACCT TGTTTGATTT TCTTTTGTTT TTTATTTTT TAGCTAAAAG TCTAATCTAA GTCAAAATTC AACATAAAT TTGAAAAGCA TAATAAGTAA TAAAATGGA CAAAACATAA AAGAAACAAA AATAAATAA
14901	TGTTTTTTGA GACTCTCACT GTGTAGCCTT GGCTGGCCGT AGACTTGTCT TGTAGACAGG TTGGCCTTGA ACTGCTGACC AGTCTTTTCCA GCTCTAAAGT ACAAAAAATC CTGAGAGTGA CACATCCGAA CCGACCCGAC TCTGAACGAA ACATCTGTCC AACCGGAAC TGACGACTGG TCAGAAAAGGT CGAGATTCCA
15001	GTGTATTTTA TACGGATCA GGAATCAAAAG AGAAATGAAA GGCTTTTGGC GTTTAGTTAG TAACAATGTA TATAAGTATA AATTTGACTA TAATATAAT CACATAAAT ATGCCCTAGT CCATTTGTTT TCTTTACTTT CCGAAAACGG CAAATCAATC ATTTGTTACAT ATATTCATAT TTAACCTGAT ATTTATTTA
15101	GCAATACTGA TAAATTTTCT TATGTGATGG TGATTTTATA TGTCAATAAT AGTTAAAGAG ATATTGGCTC AGGAGCCATT TAGAAATCCA CAAACCAAAA CGTTATGACT ATTCATAAAG ATACACTACC ACTAAAATAT ACGATTATTA TCAATTTCTC TATAACCGAG TCCTCGGTAA ATCTTTAGGT GTTTGGTTTT
15201	CCAGGTGTGA CGACATATGC CTGCACTTCT AGCACTTGGG AAGTGGAGAT AGTAATTTCA AACTGTCTCT AGCTAGACAG CAAAGTCCAG GCGAGCCTGG GGTCCCACT GCTGTATACG GAGCTCAGAA TCGTGAACCC TTCACTCTTA TCAATTAAGT TTGACAAGAG TCGATCTGTC GTTCAAGGCT CGCTCCGACC
15301	ACAACACAAA GCCTGGTCTG AAAGACAGAC AGACAAAAAG GACAATAGAG CAGTTTATTT ACCTTTAGTC CAAAGGTATT TTGAAAATGC TGTAAACCGA TGTGTGTTT CGGACCAGAC TTTCTGTCTG TCTGTTTTTT CTGTATCTC GTCAAATAAA TGGAAATCAG GTTCCATAA AACTTTTACG ACATTTGGCT
15401	AAACAGGTTG GCATTTATTT GTCTACCTTA AAATCACATT TGGAAAAATA TATATTTCAA ATTTATTATC CTTTTTCAA TATATTTTAT ATTTTCTGTA TTTGTCC&AC CGTAAATAAA GACATGGAAT TTTAGTGAAT ACCTTTTTAT ATATAAAGTT TAAATAATAG GAAAAAGTTT ATATAAATA TAAAGACAT
15501	CTAAGTCTG TGTAAATCTT AGAAAGCAGT AATTAATCT CATCTACTGT TTTTACATCT TGGGTTTTTA GTGTGACTGT ATTTGAGAAAT TCTTCTTCA GATTCACGAC ACATTTAGAA TCTTTCTGTA TTAATTTAGA GTAGATGACA AAAAGTATGA ACCAAAAAT CACACTGACA TAACCTTAC AGAAGAAAGT
15601	GTTTAACTGT AGAAGTTTTT AGAA CAAAAG BCCCTTGGT CGTTGAAGAG AATGATCTTA TATTTGAGCG GCGCTCCACT ACTACTTACT CCAGCTTCAG CAAATGACA TCTTCAAAC CTTTTCTT CGGGACGCA GCAACTTCTC TTAAGTATG ATAACTCGC CCGGAGGTGA TGATGAAATG GGTGAAATG
15701	GAAGAACTAC TACTCAAAGC CATGGTCCAA TAAAGGTAAC TAATGTTAC CAAAGGTCTT TTGGAATAAA ATGAACTTTT ATTTAAGCTT CTGACTTCTT CTTCTGTATG ATGAGTTTTC GTACCAGGTT ATTTCCATTG ATTACAAGTA GTTCCAGAA AACCTTATTT TACTTGAATA TAAATTCGAA GACTGAAGAA

Exon 5

2629

3057

Exon 6

11.3 *Bdp1*: Transkript und Aminosäuresequenz

Die Angaben liegen den NCBI ID-Nummern zugrunde (Transkript NM_001081061, Protein: NP_001074530). Start- und Stoppkodon sowie das Polyadenylierungssignal sind hervorgehoben. Exons: grün (ungerade Zahlen) und rot (gerade Zahlen) (modifiziert nach Kelter, Dissertation 2006).

ATG	TTC	CGC	AGG	GCA	CGC	CTT	AGC	GTG	AAG	CCA	AAT	GTC	AGG	CCT	GGT	GTA	GGG	ACC	AGG	60
M	F	R	R	A	R	L	S	V	K	P	N	V	R	P	G	V	G	T	R	20
GGC	TCC	GCC	GCT	CCC	AAT	CCC	CAG	CGT	GGA	CCA	GAG	GCT	CCC	AGG	CCT	CCG	GAG	CCT	GCC	120
G	S	A	A	P	N	P	Q	R	G	P	E	A	P	R	P	P	E	P	A	40
ACC	GAG	TCA	GCT	CCG	AAG	CCA	GCG	GAG	CCC	ACA	GAT	GTG	CCT	GCA	GTG	GAT	TCC	GGG	GGA	180
T	E	S	A	P	K	P	A	E	P	T	D	V	P	A	V	D	S	G	G	60
Exon 1/Exon 2																				
GCA	GAA	CCC	CAG	GAA	CAG	GCT	CCC	GGG	AGC	AGT	GAT	GAA	AAG	ACT	GGT	GAC	AAA	AAT	AAT	240
A	E	P	Q	E	Q	A	P	G	S	S	D	E	K	T	G	D	K	N	N	80
GCT	GCA	GAG	TCC	AGC	ACA	TTG	TCC	TCT	GCT	TCT	TCA	CAG	AGA	AGA	AAG	CGA	GTG	TCA	AGC	300
A	A	E	S	S	T	L	S	S	A	S	S	Q	R	R	K	R	V	S	S	100
ACA	TCC	AGT	CTT	GTT	CAG	CCT	TCT	GGC	AGT	GCC	CCC	TCA	CAG	AGT	CGC	CCC	TTA	TCT	ACA	360
T	S	S	L	V	Q	P	S	G	S	A	P	S	Q	S	R	P	L	S	T	120
GTT	GAT	CAC	GAT	GCA	CCA	CAG	CCA	AAC	CCT	ACT	CCA	GCT	AAA	GAG	AAG	CAG	CCG	TGT	TCA	420
V	D	H	D	A	P	Q	P	N	P	T	P	A	K	E	K	Q	P	C	S	140
GAC	AGA	TAC	CGA	ATC	TAT	AAG	GCC	CGA	AAA	CTG	AGG	GAG	ATG	TTG	AAA	GAG	GAA	CTG	AGA	480
D	R	Y	R	I	Y	K	A	R	K	L	R	E	M	L	K	E	E	L	R	160
Exon 2/Exon 3																				
AAG	GAG	AAG	AAA	CAA	TGG	AAA	AAC	AAA	TTT	TCT	ACA	AAT	GAA	AGC	CAG	AGG	CCA	CCA	GAT	540
K	E	K	K	Q	W	K	N	K	F	S	T	N	E	S	Q	R	P	P	D	180
Exon 3/Exon 4																				
CGT	TCA	AAA	ATG	ACT	ATG	AGA	GAC	TTC	ATA	TAT	TAC	CTT	CCA	GAT	AAC	AAT	CCA	ATG	ACT	600
R	S	K	M	T	M	R	D	F	I	Y	Y	L	P	D	N	N	P	M	T	200
Exon 4/Exon 5																				
TCT	TCA	GTG	GAA	CAA	GAA	AAG	AAA	CCT	GAG	AAA	TCC	TTG	GCT	CCC	ACC	CCA	ACG	AGA	GAT	660
S	S	V	E	Q	E	K	K	P	E	K	S	L	A	P	T	P	T	R	D	220
AGG	CAA	GAA	AAT	CAG	AGC	ACT	CAA	GAT	GCT	AAT	GAT	AAT	GAA	GAC	GTG	GAA	GAG	GAG	GTG	720
R	Q	E	N	Q	S	T	Q	D	A	N	D	N	E	D	V	E	E	E	V	240
GAT	GAT	GGG	CCA	CTT	CTG	GTT	CCT	CGA	GTA	AAA	GTG	GCA	GAA	GAT	GGT	TCT	ATT	ATT	TTA	780
D	D	G	P	L	L	V	P	R	V	K	V	A	E	D	G	S	I	I	L	260
Exon 5/Exon 6																				
GAT	GAA	GAA	AGT	TTA	ACT	GTA	GAA	GTT	TTG	AGA	ACA	AAA	GGC	CCC	TGC	GTC	GTT	GAA	GAG	840
D	E	E	S	L	T	V	E	V	L	R	T	K	G	P	C	V	V	E	E	280
AAT	GAT	CCT	ATA	TTT	GAG	CGC	GGC	TCC	ACT	ACT	ACT	TAC	TCC	AGC	TTC	AGG	AAG	AAC	TAC	900
N	D	P	I	F	E	R	G	S	T	T	T	Y	S	S	F	R	K	N	Y	300
Exon 6/Exon 7																				
TAC	TCA	AAG	CCA	TGG	TCC	AAT	AAA	GAA	ACC	GAT	ATG	TTT	TTT	TTA	GCC	ATC	AGC	ATG	GTA	960
Y	S	K	P	W	S	N	K	E	T	D	M	F	F	L	A	I	S	M	V	320
Exon 7/Exon 8																				
GGA	ACT	GAC	TTT	TCT	ATG	ATT	GGA	CAA	CTT	TTT	CCT	CAC	AGA	GCA	AGG	ATA	GAA	ATT	AAG	1020
G	T	D	F	S	M	I	G	Q	L	F	P	H	R	A	R	I	E	I	K	340
Exon 8/Exon 9																				
AAT	AAA	TTT	AAA	CGT	GAA	GAA	AAA	ACA	AAT	GGA	TGG	AGA	ATA	GAC	AAA	GCA	TTC	CAG	GAA	1080
N	K	F	K	R	E	E	K	T	N	G	W	R	I	D	K	A	F	Q	E	360
AAA	CGC	CCT	TTT	GAC	TTC	GAT	TTT	TTT	GCT	CAT	TTG	CTT	CAG	AAA	GTT	CTT	GCT	GAA	GAA	1140
K	R	P	F	D	F	D	F	F	A	H	L	L	Q	K	V	L	A	E	E	380
GAA	AAA	AGA	AAA	CAA	AAA	TCT	ACT	AAA	TGT	CAG	AGT	TTA	AAG	GAA	AAG	GCC	TCC	AAA	CCA	1200
E	K	R	K	Q	K	S	T	K	C	Q	S	L	K	E	K	A	S	K	P	400
Exon 9/Exon 10																				
CGG	AAA	AAC	TTA	AAA	GCA	AAA	ACA	GTA	ACC	AGT	GAA	GAA	GTT	AAT	GAC	GAT	CCA	GAT	GAG	1260
R	K	N	L	K	A	K	T	V	T	S	E	E	V	N	D	D	P	D	E	420

Anhang

TCT GTA AAT AGT AAC ATT TCA GAT CCA GAA AGA TCT CAA AAT GAT GCT GAG ACA GTC AAT	1320
S V N S N I S D P E R S Q N D A E T V N	440
GAA GAG GAA TCA CCG AGT TCA TCA GGA CAG CAC TTA GAA CAA GCT ATG TTA GAG CAA GAC	1380
E E E S P S S S G Q H L E Q A M L E Q D	460
CAA AAT CAA GAG AAA AAG AGG AGG AGG AAC CAA GGT GAA GCT AAT AAA CAG GAA GCA ACA	1440
Q N Q E K K R R R N Q G E A N K Q E A T	480
Exon 10/Exon 11	
AAT CTT TTA GAG AGG GTT CTT GTT CAT TCG AGC CCT CCT GCA GCA GAA ATA CAC AAG AAT	1500
N L L E R V L V H S S P P A A E I H K N	500
ACA TGT CCT TCT GAG GAA AAT GAA AGT GAA TGC AAT AAA GAA CAG ATA CCA TCC TTG ACA	1560
T C P S E E N E S E C N K E Q I P S L T	520
CAG AAC ATA GAT GAC ATT GCA GGT TTA GCA CCC AGT GAA GAG ACC GAG ATG AGA ATG GAC	1620
Q N I D D I A G L A P S E E T E M R M D	540
Exon 11/Exon 12	
CCC ATC CCT TCC ACA TGT AAT CAA CAA GAC ATC ATG CCA CTA GCA AGG GAG TCC TCA GAG	1680
P I P S T C N Q Q D I M P L A R E S S E	560
TCG TGT GCT GTG GCT TTA CCT GTG TGG GAA CCC GGT AAT ACT GCC TCT GCT GAC ATG GCT	1740
S C A V A L P V W E P G N T A S A D M A	580
Exon 12/Exon 13	
CAT GCT GAG AGC TCC TGC TCA GAA GGA AGA GGT GCT GAC CTG AAG ACT GCG GCA CCA GAG	1800
H A E S S C S E G R G A D L K T A A P E	600
ACT GAA CAG ACA GAA AAT GTC AAA CCA AAA TCA AGA AGT CGA CTA CAG AGA CCT AAG CCT	1860
T E Q T E N V K P K S R S R L Q R P K P	620
AAT CTG GCA AGG GCA GTT GGG AAG AAA TCA GCT GTT TCA CAA GAC AGA CAA GAT GAA AGG	1920
N L A R A V G K K S A V S Q D R Q D E R	640
Exon 13/Exon 14	
AAC AAG AAC TCA CCT TCA GAA ACT GCA GCT GAG AAG AAT CAC ATG GAA AAA GAG ACC ATG	1980
N K N S P S E T A A E K N H M E K E T M	660
AAT GAA TCT GAA ACA TCT GTA GCA AAG AAT ACA GAC GGA GAG AGC CCA GGT GCC AAA ACT	2040
N E S E T S V A K N T D G E S P G A K T	680
Exon 14/Exon 15	
GTG TCT GAT TTG AGT GAG AAA TCC TGT GTA CAG CAG GAT AGT CAG GCA AAG GTT TTA AGA	2100
V S D L S E K S C V Q Q D S Q A K V L R	700
CCT ACC AGA CTA ATG AGG AGT CGA ATG CAA AGA CCA AAG CCA AAT GTA GTG AAA GCT GCA	2160
P T R L M R S R M Q R P K P N V V K A A	720
GAA AGG AAA GAA ATT CTC ACC TCA CAG GAA AAA TTT GGG GCC CAT GTA GAG AAA AGT GAA	2220
E R K E I L T S Q E K F G A H V E K S E	740
Exon 15/Exon 16	
GAT GAA TCC TGT GTT GTG ATT CCT CCA CAA ACG GAA AAT GAG TCA CAT AAA AAC TTG CAA	2280
D E S C V V I P P Q T E N E S H K N L Q	760
TGT GAA GAT ACT GTG TCA GAG CCT GGA AGA AAG GAC CCT TTT GAG AAT ATT CAG CCT GAT	2340
C E D T V S E P G R K D P F E N I Q P D	780
Exon 16/Exon 17	
CAG CCC CAG GTT CTT AGT GAC TGC CCA AGT ATT CAT GAA GGT AAT AAA GAA AAC AAA CGG	2400
Q P Q V L S D C P S I H E G N K E N K R	800
AAA CAA GTC CCA GTT CTA AGG ACT AGA TTC CAG AAA CCA AAA CCA AAT ACA GGA AGA AGA	2460
K Q V P V L R T R F Q K P K P N T G R R	820
AGA AGA AGA ATA TCC TCC AAG GAA GGG ATA CCA GAG GAG ACA CCT ATT TCT GGA GAA ATA	2520
R R R I S S K E G I P E E T P I S G E I	840
CCA GCA ACT TGG GAA GAA ATT CCG AGT CTG GAC ACT TCT CTG AGG GAG GAG GTA CTG AGT	2580
P A T W E E I P S L D T S L R E E V L S	860
GTA CCT CTT GCC CCT CTT ACT GCT ACC GCT TCC ACC AAG GAC TCA GAG TCA GAT GTG AAA	2640
V P L A P L T A T A S T K D S E S D V K	880
GAC AGT GGC AGA AAT GAT ACA GCT TCT AAT GCG GAG ATG TCA GAA ATG ACA GAT GTC ACT	2700
D S G R N D T A S N A E M S E M T D V T	900
ATG GAA ATG GAG ACA GGT TTG GAA ACA ATT GGA AGA GAT ACT TGC CCA GGG GAG ATG GGA	2760
M E M E T G L E T I G R D T C P G E M G	920
GCA GAA ATG ATT GAC ATC CCT ATG GAA ACA GAG GCA GGT TTG AAA GCA TCT TTA AAT GAG	2820
A E M I D I P M E T E A G L K A S L N E	940

ACT TCT TGT ATG GAG AAG GTA CCA GAG CTT ATT GAT ACC ACT GGG GAA ATT TGC ACA AAT	2880
T S C M E K V P E L I D T T G E I C T N	960
TTG GGA GAA ACT GGA AGA AAA GAA GTA TTT TTA CAG GAA AAT GGC CCG AAG GAG GTC GGT	2940
L G E T G R K E V F L Q E N G P K E V G	980
CCA GTT AGT GAA CCA GAG ACA GGT TTG CAA GAA ACT GGA AAA GAT TTG GCC ATG AAA GAG	3000
P V S E P E T G L Q E T G K D L A M K E	1000
AGC ACA CCA GAC ACG ACA GAT AGC ACT GAA GAA AGG GAG GCA TAT TCA GAA GAA ACT GAA	3060
S T P D T T D S T E E R E A Y S E E T E	1020
AGA CAA GAA AAA ATA TCT GCA CTG ATA AAG GAT GCA GAG GAG GCC AAA GCC AGG GGT GAA	3120
R Q E K I S A L I K D A E E A K A R G E	1040
ATG GAA ACC CCC CTG GAA GAG ATT GGA GGA GGA ACT TCC CAG AGA GGA AAG GCA GCA GGC	3180
M E T P L E E I G G G T S Q R G K A A G	1060
GCT CCT GTG GAG CAG TCT GCC AGC GAG GAG GAG CCA CAG GGC AGC GCA TGC AGA GAG GAG	3240
A P V E Q S A S E E E P Q G S A C R E E	1080
GTG GCA GTG GAG TCG AGC ACT GCA GAA GGA AAG GAG CTG AAC CTG AGG GAA ACT GGA GAA	3300
V A V E S S T A E G K E L N L R E T G E	1100
GAT GAC GTC TCC TCG ATG GTT GTG GTC TTA GGA GAA AAG ACT GAC ATT GAG GAA ACG AAT	3360
D D V S S M V V V L G E K T D I E E T N	1120
GGA GAT CCG AAA GAA ACA GAA AGA GAG AGT TCT GTC TCT TGG GAG AGA GGG TCT GGA GAG	3420
G D P K E T E R E S S V S W E R G S G E	1140
ATC CAG GTC GGG GAG GAA ATG GTG GAA GAC TTA GGA AAA CCA GAA AAA ATA GAT GTT GCT	3480
I Q V G E E M V E D L G K P E K I D V A	1160
CCA AGA GAA CGT GAA CCA GAG GAA CAT TCC TCA GGG CAG CCT GAG GCA GAT GTA ATT CTG	3540
P R E R E P E E H S S G Q P E A D V I L	1180
Exon 17/Exon 18	
AGC AGT AGT GAC GGC AGC ACT GGC TCT CCA CAG GAT AAA GTG AAT ATT AGC AGT AAA ATA	3600
S S S D G S T G S P Q D K V N I S S K I	1200
TCA GTG ATG CCT ACA CTT GTG GAA GAA AAA GAA ACT ACT GAC AAG GAC ATA TCC AGC CAC	3660
S V M P T L V E E K E T T D K D I S S H	1220
TTA GGT CAT GTG GAG TCT TGC TCA CAG AAT TTG GGA CGC CAT GAA ACA GAC CAA GGG ATG	3720
L G H V E S C S Q N L G R H E T D Q G M	1240
Exon 18/Exon 19	
CCG CTT CCA GAT GCT CTA GAG CGG TTT TCA GAT ACT AAC TTA AGC AAA CCT CTT CCT CAA	3780
P L P D A L E R F S D T N L S K P L P Q	1260
GAA CAG CAG CCA CTT CAA GTT AAA CCA GCT CCC TTT CTG AGA AGT CGA TTC AAA AAA CCA	3840
E Q Q P L Q V K P A P F L R S R F K K P	1280
AAA CCA AAC CTG TCA AGA GCA GCT TTA AAG AGA GCA ACC ATA GAA GCA GAG CAC TGT GTG	3900
K P N L S R A A L K R A T I E A E H C V	1300
CCT GGG AAG AAA TCC GAA GCC TGC AAA GTG GAG GCC GCC ATG CTA CAG CAG GAC AGT GAC	3960
P G K K S E A C K V E A A M L Q Q D S D	1320
Exon 19/Exon 20	
CAA GCT GCT CTC TCT CCT CAA CAT AAT GTA CCT TCC CTG ATG GCA TCA AGA GAA AAT GAT	4020
Q A A L S P Q H N V P S L M A S R E N D	1340
AAA TCC GGT CAT GAG GAG GAG GAG GAG GCT GCG ATA CTA CCA TGT ACA CAG ACT GAA AAG	4080
K S G H E E E E E A A I L P C T Q T E K	1360
GAT GCT TCA CCG CCA AAT TCA AGT GAA CCT AAA GAG GGT TCT CAG TTA ACC CCA AAC CAG	4140
D A S P P N S S E P K E G S Q L T P N Q	1380
Exon 20/Exon 21	
GAA AAT GGC TTA CTT GTT CCT ATT GGG ACT CCC ATG ATG AAT ACG GTC ACA CAA GAA ACA	4200
E N G L L V P I G T P M M N T V T Q E T	1400
AGG CAA AAT GTT GTC CAG ACA ACT CTC CCA GTG AGG GGT CGA CTT CAG AGA CCA AGA CCA	4260
R Q N V V Q T T L P V R G R L Q R P R P	1420
AAT GTG CAA AAG GCC AGA CAG AGG CAA ATA GTA GAA AAA GGC GAA GCG CGA GAC ATA GCT	4320
N V Q K A R Q R Q I V E K G E A R D I A	1440
Exon 21/Exon 22	
AAG AAT GAA GGA CCA GAA CTG CAA AAA GAC GAG ACT AGA ACA TGC CTG ACT GTG GCA AAC	4380
K N E G P E L Q K D E T R T C L T V A N	1460

TCT TCT CAC ATT GAA AGT GGA GTT GCA GTT GAC ATG TCC TCC AGA GTG TCA GAG TGC CAA	4440
S S H I E S G V A V D M S S R V S E C Q	1480
GTG AGT GAA AGT CAA GGC CAC GCA GAT CCT GTA GAA AAC TTA AGT GTT AAT AAA GCC AGT	4500
V S E S Q G H A D P V E N L S V N K A S	1500
Exon 22/Exon 23	
GTT GTT CAT GAA CAG ATG AGG CAT GAA AAT AAA CCG TAT GTT CCT AGT CCA GCA CTG CTG	4560
V V H E Q M R H E N K P Y V P S P A L L	1520
ATA AGA AGG CGG TTC CAA AAG GCT AAA CCA AAT TTA GGA GGA GCA CGC CGT AAG GAT GAG	4620
I R R R F Q K A K P N L G G A R R K D E	1540
CAA CCA GGT GTG GAG AAA GGC CGG ACA GAC GAG AGC ACA GCA CTA ACA GCA GAA GAT CAC	4680
Q P G V E K G R T D E S T A L T A E D H	1560
Exon 23/Exon 24	
CTG CTG CAG AAG GAA GAC TGT GAC ACC CAG CTT TCT CTG CAA GCA AGG GAA AAG GCA GAT	4740
L L Q K E D C D T Q L S L Q A R E K A D	1580
ATG CCT CTG GAG GTT TCA GTG AGA AAA GAG TGT ATA CAT TCT GAA GAG TCG GGT TCT GAC	4800
M P L E V S V R K E C I H S E E S G S D	1600
AGA AAC GAT GCT CAG CCG AAC GCT GGA CCA TCA GAA GGT TCC AGG GAT GAG ACT GCG AAA	4860
R N D A Q P N A G P S E G S R D E T A K	1620
Exon 24/Exon 25	
GAG CAG CCT ACA TCT TTG GGG CTT GAA GAG CAG AGT CTT AGT AAA CAA ATT AGA TCC AGC	4920
E Q P T S L G L E E Q S L S K Q I R S S	1640
TGT CCA CAA CTA TGG AAA GAA TCA AGC TAT CCC AAG ACT GTT TCG AGT CGA AGA ACC CCT	4980
C P Q L W K E S S Y P K T V S S R R T P	1660
CTC TCT TCT GCC TCT GAG TGT GAA ATA GAG CAC AGT TGG AAA AGA ACA CAG AGG AAG ACG	5040
L S S A S E C E I E H S W K R T Q R K T	1680
AAA CCA AAT CTG ACC AAA GGG CGT GGA TCA AAA CGA ATT CGA GGT AAG ACT GCT AAG AAG	5100
K P N L T K G R G S K R I R G K T A K K	1700
GAA CCT AGA GCT TCC AAG TCC GTG TTG GTG ACT CTT CGG GCT TCT CAG AAA GAG GAT GAA	5160
E P R A S K S V L V T L R A S Q K E D E	1720
GAT GAT GCT GAG GAT TTT GAT TCT GAC TAT GAG GAA GAA ACC TAT CAT CTT GCC CCA GAA	5220
D D A E D F D S D Y E E E T Y H L A P E	1740
GAA TTA AGC AAA GCA CCA GTG TTT GTA CCT GTT GGT CTC AGA TCC CCT GAA CCA GTT TCT	5280
E L S K A P V F V P V G L R S P E P V S	1760
Exon 25/Exon 26	
GCT CAG ATC GAG GAA ACA ATG GAA GAG CTT GAG ATA ACC ATG GAC GTT GCA GAC ATG ACT	5340
A Q I E E T M E E L E I T M D V A D M T	1780
GTT GTT GAA CAT CAG CTT TCA CAT ATG GAC ACA ACA GCT CAG GCT GTG CAA GCA GAG AAA	5400
V V E H Q L S H M D T T A Q A V Q A E K	1800
Exon 26/Exon 27	
GCT GTG TAT CCG CCA TCA TTT GAA ATG GAC GTA GGT GAA CAG ACC CAA GAA GAG CCA GGT	5460
A V Y P P S F E M D V G E Q T Q E E P G	1820
CCC AGT GAT GGA AGC ACG GAA GCC GCC ATA ACT TTA CTT ACA ATG GGA GAT ATA GTA TTG	5520
P S D G S T E A A I T L L T M G D I V L	1840
Exon 28/Exon 29	
CAG TCA GAG ATC ATT CCT GGA CAG GGG GAT GTA GGA GTA TGT GTA TTC CCT GAT GTT CAT	5580
Q S E I I P G Q G D V G V C V F P D V H	1860
TCA GAG GAT AAA AGT CAT GCT CCT TTT AGC CCA GAT AAT GTA AAT CAA AAA GTT GTC CAT	5640
S E D K S H A P F S P D N V N Q K V V H	1880
GAC TAT CCG GAG GTT TGT TCA CCT GTC ATT AGT ACA TCG CAT GCA TCA TTT GAA GAA AAC	5700
D Y P E V C S P V I S T S H A S F E E N	1900
AGG ATT GTA TCA AAG GAA CAA AGC AAT AGA GAC GCT GCT GTG GAG GAA GAA GCA GTG GAG	5760
R I V S K E Q S N R D A A V E E E A V E	1920
Exon 29/Exon 30	
GAG ACC TTG CCA ACC AGG AAT ACA ACT TCT ACG ATG AGC ACA CAT TTA AGA ATG GAG AGT	5820
E T L P T R N T T S T M S T H L R M E S	1940
ATG GTT GTT ACA CCT GAA CTA AAT TCT GAG AAG ACT TTA GAG ATC AGT GAG TCT CAT GGT	5880
M V V T P E L N S E K T L E I S E S H G	1960
Exon 30/Exon 31	
CAT CAG GAA GTT GCC AGT TTC TGC ATA ACT AAA GAG ACA GAA GTG GAA ATT CAA AGA GAA	5940
H Q E V A S F C I T K E T E V E I Q R E	1980

ACT GAA GGA GAT GAT TCC AAA GCA GTA GAA TTA GAA GAT AAA AGC CAT GCA CCA GTC ACA	6000
T E G D D S K A V E L E D K S H A P V T	2000
GCA GCA GAA ACT AAG GAA GAG GAG CAG TCG CAG TGT GTG GGT GAT GTT GAA GGG GCC AGT	6060
A A E T K E E E Q S Q C V G D V E G A S	2020
Exon 31/Exon 32	
GTT TCT CAA GAA GCA ATC CTA CCT GCG AGA ATT GAA GAT CAT GAG GAG ACC TTG CAA GAG	6120
V S Q E A I L P A R I E D H E E T L Q E	2040
GTT CAA GAG TCG GGT ACT GCA GTT GCT TCT TCT GAG ATA GGG CAG CAG ACA CTC GAT TCG	6180
V Q E S G T A V A S S E I G Q Q T L D S	2060
GGT CAG AGT TTT GGT GAG AGT GCT GCT AAA GAA GCC CTC AAA GAA ACC CCT AAA GGC AGC	6240
G Q S F G E S A A K E A L K E T P K G S	2080
Exon 32/Exon 33	
GAC GTG CCC GTG CTT CAT GGG CCA GAG AGT GTA CCA TCT CAT ATT CCA GAA GCC CAA CAA	6300
D V P V L H G P E S V P S H I P E A Q Q	2100
Exon 33/Exon 34	
GAA AAC ACC GGT CCT CAA GCT GTT ACA GTG AAT CCA TTT GCT GAT GGA CAG CAA GAT GGA	6360
E N T G P Q A V T V N P F A D G Q Q D G	2120
GAA GAT GAA CAA GCC TTC ATT TTA ACT CTG GTG GAA ATC CCA ACC CAT GCA ACA GAA GGA	6420
E D E Q A F I L T L V E I P T H A T E G	2140
TTC ACT GAC GCT GCC ATG CAG TTA ATG CCG AGC TCT CTG CTG CCA GCA CCT ATA TTG GTC	6480
F T D A A M Q L M P S S L L P A P I L V	2160
Exon 34/Exon 35	
AGG TCT GGG AAT GCA GCA GAA CGA GGT GAC CTG AGT GGG AGT TTA CAA ACC TCT TTG GTT	6540
R S G N A A E R G D L S G S L Q T S L V	2180
GTT CAA GAT GCT CCA TCC TTA TCT CCT TCT AGA AGT GGC AGT TCT GAA AAG CCT CCT GCT	6600
V Q D A P S L S P S R S G S S E K P P A	2200
AAT TTG GAT CTT ACA TCT AGG AAG AGA TTT TGT TGC AGT CCT GAT GAA AGT ATT CAT GTT	6660
N L D L T S R K R F C C S P D E S I H V	2220
Exon 35/Exon 36	
CCT CCT GCC AAA AAG TCC TCA CTT GTT CCA GGA ATT GAT TAT CAA GAA TGT ACC TCT GAG	6720
P P A K K S S L V P G I D Y Q E C T S E	2240
Exon 36/Exon 37	
GTA TGT TCA GAG GAA TTA AAT GTT TTT GAG AAA ACA GCA GAG TCT TGC ATG GGA CAA GGC	6780
V C S E E L N V F E K T A E S C M G Q G	2260
ATT TTC CCT ACC TCA GAG AGC ACA CAT GCA ACC TCA AAA CCT CAG AAG GAA CAC AGT GAG	6840
I F P T S E S T H A T S K P Q K E H S E	2280
CCA ACT GAT ACA GGA TCA TCT GGA TCT CTT GAT GAA ATC AAA GAT GCG TGT GTA GAA AAC	6900
P T D T G S S G S L D E I K D A C V E N	2300
ATG GCT CAA TTG CCT CAG AGT GAG ATA GTA TCT GAT AAA GAA GAG AAA ACT GAA CCT GCT	6960
M A Q L P Q S E I V S D K E E K T E P A	2320
Exon 37/Exon 38	
TCC AAT TCT GAA CAG AGA GAC ATC GTG ACA TCC TCT TCA AAA CCC CCT CTG ACC AGA CCT	7020
S N S E Q R D I V T S S S K P P L T R P	2340
GGC AGA AGG CCT TTG GGA TTT TTA TCA TTA CTG TGT CCA AAA AAT AGT TTG GAA TCT GAT	7080
G R R P L G F L S L L C P K N S L E S D	2360
GAA GTG ACT CAA ACC CAT AGT AAG AAG CGC CTA AAA CCT CAG ATA CCT GTA TCA CGG CGA	7140
E V T Q T H S K K R L K P Q I P V S R R	2380
AAT TTG AGA AAA CCT AAT CTG CAT AAT ACA AGC CAG AAA AAA AAT CAA GAC TCT TCA GCC	7200
N L R K P N L H N T S Q K K N Q D S S A	2400
CCA CCC CCA TCA CCC AGC GTT ACT GCG CCT CTG TCT GGC ACT GCT GGG AGT CCT GAG AGT	7260
P P P S P S V T A P L S G T A G S P E S	2420
Exon 38/Exon 39	
TCA GCA GCT CAG GTT TCT TCT GAT CAG CCC TTG CTA AAA GAA GAG TGT AAA AAT GGG CCC	7320
S A A Q V S S D Q P L L K E E C K N G P	2440
AAA GGA GCA CCT GAG GAA GAG GTG ACC CCA GTC TCA GAG TTT GTC TTC AGT GAC ATC TTC	7380
K G A P E E E V T P V S E F V F S D I F	2460
ATT GAA GTG GAT GAG ACA CTA TAA AGC TCT CTC CTG GGG CCC CTT CTT TTT ACT TTC TAC	7440
I E V D E T L *	
TTT TGT AAT GAG TTT GAG ATT TCC AGC GAC CCT GAC TTT CAC CAA GCA GAA AAG CAC CAC	7500
TGT CTG TTT TGA TTT AGG TCA ATT TTG AAT ATT TAT TGA GCT TCA TTT GAA GCT TTT ATA	7560
ATC AGT GGG AAA CAT TTC TTT CTG ATT GAC CCT GCA TTT GGA AAT ATC AAG CAA TTA AGA	7620
CTG GTC TCA CTG ACA GGC ATT GTA GCT TGT TTA CAT TTG ATG TCC TCT GTG CTG AGC GCA	7680

CCT	GGA	CTT	GAG	AAC	TGT	GTG	CAC	GCA	CAT	CTG	TAT	AAA	TCG	TAG	TGC	TGG	CAC	ACT	GGG	7740
AGC	TTG	ATT	GTG	CTT	AAC	ATT	TGC	TGC	CCT	TCT	TTT	CTA	AAG	GTG	GCT	GTG	TTT	TGT	TTC	7800
TGT	ATT	TTG	TTT	TGT	TTT	TTA	TTT	TGT	TTT	TTT	CTT	TCT	TTC	ATT	TTT	CTT	TTT	CTT	GAG	7860
GGT	GAT	CAG	TTG	CCT	GTA	ACA	ATA	TGA	AAG	CAA	AGT	GTG	AAA	CTC	CAC	TTT	GGT	ATG	GTA	7920
AAG	TTA	AAA	CTT	TTC	TAT	CAT	CAT	CTA	TTT	GAC	TGA	AAA	AAA	AAA	TGT	ATA	TTT	TTC	TAA	7980
TTC	ATG	GTG	ATG	TAA	CAT	TAG	TCC	TGA	TTG	AAG	ATC	TAG	TAT	TTA	AAC	TTG	CTA	TTT	ATA	8040
AAG	TCG	GCA	CAT	CAA	AGA	GAT	TTA	TTT	TTA	AAT	TTT	TTA	TTT	AAA	ATA	TAT	CCC	AAT	TTA	8100
ATT	ATT	TTC	ACT	CAT	CAA	ATT	TGG	GTA	AAG	AAA	GCA	TTA	ACA	AAT	AAT	TTG	TCT	CCT	TTT	8160
CCT	CTT	TAC	TTT	AAA	AGC	TAT	TTT	AAA	ATG	TCA	TAA	TTA	AAA	ATG	TTT	AGT	GTT	CAT	ATT	8220
TTG	AAT	ACT	TTT	CTC	ACA	CTT	TAA	TAT	ACT	GAA	TTT	GTA	CTG	TGA	ATA	TTT	TTT	GCT	TTT	8280
CTT	ATT	CTA	ATC	TCA	GGA	TTT	TCA	TTG	GAA	GAA	AAA	AAT	TAA	CAT	AAA	GGA	CAA	ATT	GTC	8340
TTG	TAT	AAT	TGA	TCT	TTT	TTA	CAC	ACA	CAC	ACA	CCC	TTA	AAA	AAA	GGT	TTA	GTG	ATA	GCT	8400
ATT	TTC	CCT	ACT	AAA	TTC	TGT	TCA	CAG	GAC	ATG	TGG	GCT	TTC	AGC	CAC	AGA	ACA	TGA	ATC	8460
TGA	TGT	TAA	AGC	AGA	AAA	TAA	GGC	AGC	CAG	TGA	GGT	CCT	CAT	TAT	GAA	CTT	GGG	TGT	TTT	8520
TAA	TTT	TGA	GTC	TTT	ATG	ATT	TAT	GTG	TCT	TGT	TTT	CCC	TAA	CAG	TTT	TTC	CCC	TGG	TTC	8580
AAA	TTA	AAT	GCT	TCC	AAG	AGC	AAA	TGT	ATT	CAA	CTT	TAT	TAT	AAA	ACC	TTA	TAG	ATT	GAT	8640
ACA	TAG	AAG	TTT	TTC	CAT	AAA	AGA	TTC	TTT	TTG	AAC	TGT	GTA	GCC	CAA	GTG	GTC	CTG	GTA	8700
GCA	GCT	GCT	TAG	GCA	GGA	TGT	GCC	TAA	GAT	TCA	AAA	ACT	GTT	CAG	TGT	ATT	AGG	AAA	TGA	8760
GCA	ATA	CTT	CAG	TTG	GAA	AAT	ATT	TTT	ACA	TCT	AGG	TAA	TTT	TTG	TTT	TTC	ATA	TTG	ATA	8820
AAA	TGG	TGA	CCA	CTT	TTC	AAG	TTT	CTA	AGC	AAA	CAA	GGG	TCG	AAC	TCA	ATG	AGT	CTA	GAG	8880
TGC	TGA	TTC	ATT	GAA	CTT	ACT	GTG	AGC	CTG	TTT	CCT	GTT	CTG	TGG	CTT	AGA	GTC	AAA	TGT	8940
ATA	GTT	TAA	TGT	CTG	CTA	TAA	AGG	GAG	ATC	TAT	AAG	TTA	GAT	GGA	AAT	TCT	CAA	AAG	TAT	9000
GCA	TCT	ATT	TCA	TGT	GAC	TAA	TGT	CAC	AAA	ATC	ATG	GAG	GTA	ATT	CAC	ATT	GCT	ATA	TAA	9060
ATG	CCT	TTT	TGT	TAG	TTT	TTA	AAA	TGT	CAT	GTT	CTG	TAA	AGT	TTG	TTT	GTT	TGT	TTT	TGT	9120
AAA	TGT	TAC	TTG	GGT	TAG	ATC	ACC	GAG	ACT	AAA	CTA	TTA	TTT	ATC	CCT	GTA	TAA	TAT	TTA	9180
TTT	TTT	TAA	CCT	CTG	TCT	CAT	TTA	TCT	GTA	ATA	AAC	TGA	TTT	TAT	GGA	AGA	TGT	AAT	TTA	9240
TTG	TAT	AAA	GAC	TAC	AGG	GGC	ATT	TGT	TGT	ATA	GAG	AAT	CAT	GTC	GGT	CAA	CAA	ATT	GTC	9300
CTG	CTG	CCA	CTG	GAC	AAA	CCG	GTG	CTA	GGA	AGA	GAA	ATA	CAA	TCA	GTG	TGC	TTA	GCT	TTA	9360
AGG	TGG	GAA	GAT	TTG	TGA	TGG	TGG	AAA	GAT	GTT	GCA	AGG	AAT	TTG	TTA	TAG	AAA	TCT	TCA	9420
AGG	AGA	TGT	ATG	AAA	GGG	CTT	TAC	CTT	CTC	TTG	ACT	GTT	TTC	CTC	TGA	TCA	ATT	ACA	TCT	9480
TAG	CAG	GTG	GCC	CAG	GCA	AGA	CAT	AGA	TGC	AAA	TAT	TAA	TAC	CCA	GTG	TTT	ACC	ACC	ATT	9540
ATT	CAA	ATG	CAA	GTG	ACC	ATG	TTT	AAT	ATC	TTG	CTT	GAA	GTT	TTT	GAC	AAA	GAA	GCA	ATA	9600
TCT	TGT	CAT	TTG	TAA	ATT	TTC	TTG	TTC	TAA	AGA	AAG	CAG	TAA	TGT	TCT	GTA	GAT	AAA	AAT	9660
TAT	GTA	<u>AAT</u>	<u>AAA</u>	AGT	TAT	TTT	AT													9683

Polyadenylierungssignal

11.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth angefertigt. Ich möchte mich herzlich bei ihr für die Bereitsstellung des Themas bedanken. Ihre Ratschläge, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching für die Übernahme des Koreferats und bei Herrn Prof. Dr. Ansgar Büschges für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die schöne Zusammenarbeit. Dabei gilt mein besonderer Dank der SMA-Gruppe: ihr habt stets ein offenes Ohr für die vielen kleinen „Laborproblemchen“ gehabt, seit keiner Diskussion entwichen und auch die Lachmuskulatur wurde bestens gestärkt. Kristina möchte ich recht herzlich für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe der letzten Monate danken. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner ehemaligen „Maus-Mitstreiterin“ Ylva für ihre fantastische Zusammenarbeit und Unterstützung in so manchen beruflichen und privaten Situationen - ich vermisse unsere gemeinsame Zeit im Labor.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Jens Brüning für die Bereitstellung der Zellkulturbiologischen Labore sowie Materialien. Herrn Prof. Dr. Manolis Pasparakis danke ich für die Bereitstellung der histologischen Geräte.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Anja Sterner-Kock für ihre rege Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken. Ebenso danke ich Herrn Dr. Christoph Köhler für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Frau Morr bedanken: „wachsen“ ist für mich nun mehr, als nur ein Wort.

Mein größter Dank gilt allerdings meinen Eltern, meiner Schwester Katja und Joachim: ihr seid einfach wunderbar.

12. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. Dr. B. Wirth und Frau Prof. Dr. S. Korsching betreut und in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. B. Wirth angefertigt worden.

Teilpublikationen liegen in Form von gedruckten Posterbeiträgen (siehe Kapitel 9.2) vor.

Köln, den 02.05.2011

Miriam Jakubik

13. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jakubik
Vorname	Miriam
Geburtsdatum	03. Juni 1979
Geburtsort	Wipperfürth
Adresse	Weinsbergstrasse 180 50823 Köln
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

08/1985 - 06/1989	Grundschule St. Antonius Wipperfürth
08/1989 - 06/1995	Städt. Realschule Wipperfürth
08/1995 - 06/1998	St.-Angela-Gymnasium Wipperfürth, Abitur

Ausbildung

09/1998 - 07/2001	Biologielaborantin, Universität zu Bonn, Institut für Tierhygiene
07/2001	Abschluß IHK Bonn/Rhein-Sieg

Hochschulstudium

ab 10/2001	Studium der Biologie auf Diplom an der Universität zu Köln
12/2003	Abschluß des Grundstudiums mit dem Vordiplom
03/2006	Diplomprüfung
	Hauptfach: Genetik
	Nebenfächer: Entwicklungsbiologie Biochemie

- 04/2006 - 03/2007 Diplomarbeit, Institut für Humangenetik, Universität zu Köln
Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth
„Funktionelle Analysen des Bdp1 Proteins mit Hilfe von
konditionalen knockout Mäusen“
- 04/2007 - 06/2011 Dissertation, Institut für Humangenetik, Universität zu Köln
Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth
„Generierung und Charakterisierung von konditionalen *Bdp1*-
knockout-Mausmodellen - Analysen des Transkriptionsfaktor
III_B-Komplexes“

Köln, den 02.05.2011

Miriam Jakubik