



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 22 816 T2 2007.09.13**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 148 128 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 22 816.2**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 201 037.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **20.03.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **06.09.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12 (2006.01)**

C07K 14/47 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

528928 20.03.2000 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FI, FR, GB, SE

(73) Patentinhaber:

The University of Hong Kong, Hong Kong, HK

(72) Erfinder:

Cheah, Kathryn S.E., Hong Kong, CN

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(54) Bezeichnung: **Genort, beteiligt an der Regulation der Haarpigmentierung, Vestibularfunktion und Fruchtbarkeit**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Es wurde eine Mauslinie geschaffen, die eine rezessive Mutation trägt, welche durch Insertion eines Transgens verursacht wird. Diese Mäuse sind durch eine veränderte Pigmentierung von Haaren gekennzeichnet, was eine gelbe Fellfarbe, Rotationsverhalten und eine Unfähigkeit zu schwimmen ergibt. Es hat sich gezeigt, dass sich das Transgen in zwei Stellen auf dem Mäusechromosom 3 insertiert hat. Eine Recherche in der Mausgemon-Datenbank bestätigte, dass die Mutation neu ist. Der mutante Locus wurde yellow submarine (ysb) genannt. DNA, die die Transgen-Insertion flankiert, wurde isoliert und verwendet, um nach den entsprechenden normalen (unmutierten) Sequenzen zu suchen. Genomische Klone, die 20 kb des unmutierten ysb-Locus (+^{ysb}) überspannen, wurden isoliert, und Kartierungsexperimente weisen darauf hin, dass die Transgen-Integration eine Deletion und chromosomale Inversion verursacht hat, was zu zwei Transgen-Integrationsstellen führt. Rotationsverhalten kann eine Abnormität im Innenohr widerspiegeln oder auf eine Abnormität in der Rautenhirnentwicklung zurückzuführen sein. Studien zeigen eine abnorme Struktur der Innenohren von ysb-Mäusen und einen verkümmerten Hörnerv. Daher sind ysb-Mäuse eine neue Mutante, die sowohl eine abnorme Regulation der Pigmentierung als auch eine Innenohr-Funktionsstörung zeigt. Molekulargenetik, Bioinformatik, Entwicklungsbiologie, transgene und physiologische Ansätze werden verwendet, um: 1) das bzw. die Gene am Wildtyp-ysb(+^{ysb})-Locus zu identifizieren und zu charakterisieren; 2) die Natur der ysb-Mutation zu bestimmen; 3) die molekularen und entwicklungsmaßige Grundlagen, die dem oder den Defekten bei ysb-Mäusen zugrundeliegen, zu studieren; und 4) die neurophysiologischen Veränderungen im Gleichgewichtssinn und Gehör bei ysb-Mäusen zu charakterisieren. Ungefähr 1/1000 Säuglingen sind bei der Geburt von Hörfehlern betroffen, von denen zwei Drittel eine genetische Basis haben. Ysb-Mäuse sind ein wertvolles Modell, um Moleküle zu identifizieren, die an der Kontrolle des Gleichgewichtssinns beteiligt sind. Diese Studien liefern fundamentale Informationen über die Entwicklung des Innenohrs und die Mechanismen, durch die es zu Hör- und Gleichgewichtsdefekten kommen kann. Die Identifizierung und Charakterisierung des bzw. der ysb-Gene und des molekularen Defekts bei ysb-Mäusen liefern auch neue Einsichten in die komplexen Regulationswege, die eine Agouti-Fellfarbe bei Mäusen steuern.

[0002] Diese Erfindung stellt eine isolierte Nucleinsäure bereit, die einen mutanten yellow-submarine-Locus definiert, wobei der mutante yellow-submarine-Locus mit einem Wildtyp-yellow-submarine-Locus identisch ist, abgesehen von einer Integration ei-

nes pAA2-Transgens in wenigstens einen Bereich auf einem Chromosom.

[0003] Diese isolierten Nucleinsäuremoleküle umfassen das Mäusechromosom 3 und pAA2-DNA-Sequenzen, die die 5'-Integrationsstelle, welche eine Nucleinsäure-Verbindungssequenz gemäß SEQ ID Nr. 4 umfasst, flankieren bzw. die 3'-Integrationsstelle, welche eine Nucleinsäure-Verbindungssequenz gemäß SEQ ID Nr. 5 umfasst, flankieren.

[0004] Diese Erfindung stellt einen replizierbaren Vektor bereit, der die obige Nucleinsäure umfasst. Diese Erfindung stellt eine Wirtszelle bereit, die den Vektor umfasst.

[0005] Diese Erfindung gibt die Verwendung einer Nucleinsäure aus wenigstens 14 Nucleotiden an, die mit den Nucleinsäuren der vorliegenden Erfindung spezifisch hybridisieren kann.

[0006] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren einer Innenohr-Funktionsstörung bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kontakt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nucleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des ysb-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen von mutantern ysb und dadurch Diagnostizieren einer Innenohr-Funktionsstörung bei dem Patienten.

[0007] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren einer Pigmentierungs-Funktionsstörung bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kontakt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nucleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des ysb-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen von mutantern ysb und dadurch Diagnostizieren einer Pigmentierungs-Funktionsstörung bei dem Patienten.

[0008] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren einer Zellwachstums-Funktionsstörung, Zellproliferations-Funktionsstörung oder Zelltod-Funktionsstörung bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kontakt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nucleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des ysb-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen von mutantern ysb und dadurch Diagnostizieren einer Zellwachstums-Funktionsstörung oder Proliferations-Funktionsstörung bei dem Patienten.

[0009] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren eines Vestibularisausfalls bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kontakt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nu-

cleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des *ysb*-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen des Gens, das für die gelbe Fellfarbe verantwortlich ist und dadurch Anzeigen des Vorhandenseins eines Vestibularisausfalls bei dem Patienten.

Kurzbeschreibung der Figuren

Fig. 1

[0010] (A) Homozygote *ysb*-Maus, die eine gelbe Fellfarbe zeigt, im Vergleich mit (B) einem heterozygoten Wurfgeschwister mit Agouti-Fell und (C) einem schwarzen C57BL.

Fig. 2

[0011] Totalpräparat-X-gal-Färbung (blau) verschiedener pAA2-Mausembryonen, die das typische LacZ-Expressionsmuster zeigen, in verschiedenen Embryonalstadien.

[0012] (A) Embryo 9,0 Tage nach der Paarung (dpc; dies post coitum); (B) Embryo 12,5 dpc; (C) Embryo 13,5 dpc; (D) Embryo 13,5 dpc. Zu den Expressionsstellen gehören der Kiemenbogen (ba), die Chorda dorsalis (no), die Urwirbel (pv), die Schnauze (sn) und die Zehen (dg).

Fig. 3

[0013] LacZ-Expression gemäß der X-gal-Färbung (blau) von KM12-transgenen Embryonen in verschiedenen Embryonalstadien. LacZ wird an für pAA2 typischen Stellen (Fig. 2) sowie an zusätzlichen Stellen einschließlich der Rhombomere (r) 2, 3 und 5 im Rautenhirn (hb), des Neuralrohrs (nt), des Rückenmarks (sc) und der Haarfollikel (hf), die nicht die normalen Expressionsstellen des *Col2a1*-Transgens sind, exprimiert. (A) Ein im Totalpräparat mit X-gal angefarbter 9,5-dpc-KM12-Embryo zeigt LacZ-Expression im Kiemenbogen (ba), Herz (he), der Chorda dorsalis (no), den Rhombomeren (r) 2, 3 und 5, dem Ohrbläschen (ov) und dem Neuralrohr (nt). (B) zeigt einen Sagittalschnitt eines KM12-transgenen 10,5-dpc-Embryos. (C) Zum Zeitpunkt 10,5 dpc zeigt der KM12-transgene Embryo zusätzliche Expressionsstellen an den Urwirbeln (pv), dem Vorderhirn (fb) und den Spinalganglien (drg) (in dieser Ansicht nicht gezeigt), aber unter Verschwinden der r5-Expression. (D) Expressionsmuster eines 12,5-dpc-Fetus; in diesem Stadium findet man eine Färbung auch im Mittelhirn (mb), Rautenhirn (hb) und dem Rückenmark (sc). In (E) beobachtet man die LacZ-Expression bei 13,5-dpc-Embryonen auch in der Schnauze (sn), den Zehen (dg) und Rippen (rb). (F) Zum Zeitpunkt 16,5 dpc ist im sagittal halbierten Fetus weiterhin eine Expression im Hirn und in den Wirbeln zu be-

obachten. Eine Expression in Haarfollikeln wird in totalpräparierten (G) und geschnittenen (H) 16,5-dpc-Embryonen beobachtet und ist in der Haut 3,5 Tage postnatal, die im Totalpräparat mit X-Gal angefarbt und aufgehellt wurde (1), immer noch vorhanden.

Fig. 4

[0014] Schwimmtest: A) Eine Wildtypmaus schwimmt in Wasser, auch aktiv; B), C), D) und E): Eine homozygote *yellow-submarine*(*ysb*)-Maus rotiert in Wasser und geht unter.

Fig. 5

[0015] Strecktest. Die Maus links, eine *ysb*-homozygote Maus mit Vestibularisausfall, zeigt eine Tendenz, sich zum Bauch hin einzukrümmen, wenn sie am Schwanz gehalten wird. Die Maus rechts zeigt eine normale Streckreaktion mit ausgestrecktem Körper.

Fig. 6

[0016] Southern-Blot-Hybridisierung von genomischer DNA von Mäusen, die heterozygot (he) bzw. homozygot (ho) in Bezug auf das pAA2-Transgen in der Km12-Linie sind, und nichttransgenen (nt) Kontroll-Wurfgeschwistern unter Verwendung von (A) kreisler- (B) agouti- und (C) α -MSHR-cDNA-Sonden. Die Strukturgene kreisler, agouti und α -MSHR wurden durch das COL2A1-lacZ-Transgen in *ysb*-Mäusen nicht zerstört.

Fig. 7

[0017] Der *ysb*-Locus und die chromosomale Lokalisierung des pAA2-Transgens. (A) Lokalisierung von pAA2 (Cheah et al., 1995) bei KM12/*ysb*-transgenen Mäusen auf Chromosom 3 durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung von pAA2 als Sonde. Das Transgen ist bei der Kartierung von *ysb*-Chromosomen in der Metaphase im A2- und B-C-Bereich zu finden. (B) Chromosomenkarte der transgenen Integration. (C) Genomische Klone, die durch PCR-Sonden für die Integrationsstellen 1 und 2 isoliert wurden. (D) Chromosomale Lokalisierung von genomischen Klonen für die Integrationsstellen 1 und 2 durch FISH auf Wildtypchromosomen in der Metaphase. Beide befinden sich bei A3 auf Chromosom 3. Literatur: K.S.E. Cheah, A. Levy, P.A. Trainor, A.W.K. Wai, T. Kuffner, C.L. So, K.K.H. Leung, R.H. Lovell-Badge und P.P.L. Tam. (1995) Human COL2A1-directed SV40 T-antigen expression in transgenic and chimeric mice results in abnormal skeletal development. *J. Cell Biol.* 128, 223-237.

Fig. 8

[0018] Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von ysb-Chromosomen unter Verwendung eines Transgens (pAA2) als Sonde. (A) Das Transgen hat sich in zwei Insertionsstellen im Chromosom integriert. Der Pfeil zeigt die Position von Fluoreszenzsignalen. (B) Das DAPI-Bandenmuster zeigt, dass die pAA2-Insertionsstellen Chromosom 3 entsprechen. (C) Entsprechende Banden, die ein Fluoreszenzsignal zeigen, sind durch Punkte gezeigt.

Fig. 9

[0019] Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung von 9,5-dpc-Embryonen unter Verwendung von Krox-20-Ribosonde, doppelt angefärbt auf β -Galactosidase-Aktivität (rötlich). Homozygote ysb-Embryonen (E, F) und heterozygote ysb-Embryonen (C, D) haben zum Zeitpunkt 9,5 dpc ein normales Krox-20-Expressionsmuster in den Rhombomeren (r) 3 und 5. Sagittale Ansicht (A) und dorsale Ansicht (B) eines nichttransgenen Wurfgeschwisters, das ein normales Muster zeigt.

Fig. 10

[0020] Totalpräparat-Neurofilament-Immunfärbung von nichttransgenen Kontroll- (A, B), heterozygoten ysb- (C, D) und homozygoten ysb-10,5-dpc-Embryonen (E, F) unter Verwendung von monoklonalem Antikörper (2h3), doppelt angefärbt auf β -Galactosidase-Aktivierung. In homozygoten ysb wird bei 10,5 dpc eine Reduktion des achten Nervs (VIII) beobachtet.

Fig. 11

[0021] Dreidimensionale rekonstruierte Bilder von Innenohren von a) nichttransgenen, b) heterozygoten ysb- und c) homozygoten ysb-16,5-dpc-Feten, die strukturelle Fehlbildungen bei der Entwicklung von homozygoten ysb-Innenohren zeigen. Man beachte, dass der obere Bogengang bei homozygotem ysb unterbrochen ist (*).

Fig. 12

[0022] Dreidimensionale rekonstruierte Bilder von Innenohren von a) nichttransgenen Wildtyp-, b) heterozygoten ysb- (+/-) und c) homozygoten ysb-16,5-dpc-Feten (-/-). Man beachte, dass Neuroepithelstrukturen bei der Entwicklung des Innenohrs von homozygoten ysb-Feten fehlen. Bei homozygotem 16,5-dpc-ysb (-/-) ist der obere Bogengang partiell unterbrochen (*) und endet in einem blinden Sack (c); die Macula utriculi sowie Crista superior und lateralis fehlen.

Fig. 13

[0023] Dreidimensionale rekonstruierte Bilder von Innenohren zum Zeitpunkt 13,75 dpc, die strukturelle Fehlbildungen bei der Entwicklung von homozygoten ysb-Innenohren zeigen. Der obere Bogengang ist bei homozygotem ysb unterbrochen (*).

Fig. 14

A) Sequenz des PCR-Produkts an der Integrationsstelle 1
B) Sequenz des PCR-Produkts an der Integrationsstelle 2

Fig. 15

[0024] Southern-Analysen von genomischer ysb-DNA unter Verwendung von flankierenden Sonden an den Integrationsstellen 1 und 2. In den mutanten Allelen werden Banden unterschiedlicher Größe beobachtet, wenn sie mit flankierenden Sonden von beiden Integrationsstellen sondiert werden (gezeigt durch entsprechende Pfeile). Bei den untersuchten ysb-Mäusen (6. Generation) wird keine Segregation der beiden Integrationsstellen beobachtet. Wt, Wildtyp; he, heterozygotes ysb; ho, homozygotes ysb.

Fig. 16

Deletion in ysb an der Integrationsstelle 2.

(A) 20-kb-Deletion in ysb. (B)-(E) Autoradiogramme von Southern-Blots von genomischer DNA, die mit EcoRI (B, D), SacI (C) und XbaI (E) verdaut wurde, von ysb-heterozygoten, -homozygoten und nichttransgenen Mäusen. Die Sonden waren: B) pSD14 (1,4 kb EcoRI); C) pSD11 (1,9 kb SacI); D) pSD9 (3,2 kb BamHI); E) pSD8 (2,0 kb SacI).
(B) Man beachte, dass eine Umlagerungsbande beobachtet wird, wenn pSD14 (1,4 kb EcoRI) verwendet wird, um homozygote genomische ysb-DNA zu sondieren.

* bedeutet homozygotes ysb

[0025] Man beachte die deletierten Sequenzen, die von den Sonden pSD11 (C), pSD9 (D) und pSD8 (E) aufgedeckt wurden.

Fig. 17

Sequenzinformation für die 8,1-kb-Deletion innerhalb des ysb-Locus.

Locus: Chromosom 3

Definition: pPLS

Stichworte: genomische DNA

Herkunft: Hausmaus

Organismus: *Mus musculus*

Vektor: pBluescript
 Insert: 8114 bp
 Insertionsstellen: HindIII

Information:

- A. Sequenz von pPLS, das ein 8114-bp-DNA-Fragment (HindIII-Produkt) von 20 kb deletierten Sequenzen in der Integrationsstelle 2 enthält.
- B. Sequenzausrichtung, die zeigt, dass pPLS (1743 bp-1906 bp) Sequenzen mit 90% Identität mit IMAGE 1196866 enthält.
- C. Sequenzausrichtung, die zeigt, dass pPLS (106 bp-395 bp) Sequenzen mit 100% Identität mit IMAGE 636095 enthält.

Fig. 18

[0026] Zusammenfassungskarte von pPLS, die den Ort von EST-IMAGE-Sequenzen zeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0027] Diese Erfindung stellt eine isolierte Nucleinsäure bereit, die einen mutanten yellow-submarine-Locus definiert, wobei der mutante yellow-submarine-Locus mit einem Wildtyp-yellow-submarine-Locus identisch ist, abgesehen von einer Integration eines pAA2-Transgens in wenigstens einen Bereich auf einem Chromosom.

[0028] Diese isolierten Nucleinsäuremoleküle umfassen das Mäusechromosom 3 und pAA2-DNA-Sequenzen, die die 5'-Integrationsstelle, welche eine Nucleinsäure-Verbindungssequenz gemäß SEQ ID Nr. 4 umfasst, flankieren bzw. die 3'-Integrationsstelle, welche eine Nucleinsäure-Verbindungssequenz gemäß SEQ ID Nr. 5 umfasst, flankieren.

[0029] Die isolierte Nucleinsäure der vorliegenden Erfindung umfasst genomische DNA, RNA und cDNA. Die Nucleinsäure kann mit einem nachweisbaren Marker markiert sein. Der nachweisbare Marker umfasst unter anderem einen radioaktiven, kolorimetrischen, lumineszenten oder fluoreszenten Marker.

[0030] Diese Erfindung stellt einen replizierbaren Vektor bereit, der die obige Nucleinsäure umfasst. Diese Erfindung stellt eine Wirtszelle bereit, die den Vektor umfasst. In einer Ausführungsform ist die Zelle eine eukaryontische Zelle. In einer Ausführungsform ist die Zelle eine Bakterienzelle. Die Vektoren der vorliegenden Erfindung umfassen unter anderem ein Plasmid, Cosmid, einen λ -Phagen, YAC, BAC oder PAC.

[0031] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren einer Innenohr-Funktionsstörung bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kon-

takt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nucleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des ysb-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen von mutantern ysb und dadurch Diagnostizieren einer Innenohr-Funktionsstörung bei dem Patienten.

[0032] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren einer Pigmentierungs-Funktionsstörung bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kontakt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nucleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des ysb-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen von mutantern ysb und dadurch Diagnostizieren einer Pigmentierungs-Funktionsstörung bei dem Patienten.

[0033] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren einer Zellwachstums-Funktionsstörung, Zellproliferations-Funktionsstörung oder Zelltod-Funktionsstörung bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kontakt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nucleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des ysb-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen von mutantern ysb und dadurch Diagnostizieren einer Zellwachstums-Funktionsstörung oder Proliferations-Funktionsstörung bei dem Patienten.

[0034] In einer Ausführungsform des obigen Verfahrens ist der Patient ein Säuger. In einer anderen Ausführungsform ist der Patient ein Nichtsäuger. Der Patient kann ein Mensch, ein Primat, ein Pferd, ein Schaf, ein Vogel, ein Rind, ein Schwein, ein Hund, eine Katze oder eine Maus sein. Der Patient kann ein Wirbeltier sein.

[0035] Diese Erfindung gibt ein Verfahren zum Diagnostizieren eines Vestibularisausfalls bei einem Patienten an, das Folgendes umfasst: a) In-Kontakt-Bringen einer von dem Patienten erhaltenen Nucleinsäureprobe mit der obigen Nucleinsäure, die spezifisch an den mutierten Teil des ysb-Locus bindet; und b) Nachweisen der markierten Nucleinsäure, dadurch Nachweisen des Gens, das für die gelbe Fellfarbe verantwortlich ist und dadurch Anzeigen des Vorhandenseins eines Vestibularisausfalls bei dem Patienten.

Experimentelle Details

[0036] Es wurde eine Mauslinie (KM12) geschaffen, die eine rezessive Mutation trägt, welche durch Insertion eines Transgens verursacht wird. Diese Mäuse sind durch eine Veränderung der Fellfarbe nach Gelb und Rotationsverhalten gekennzeichnet (**Fig. 1**).

[0037] Das gelbe Fell von KM12-Mäusen lässt eine abnorme Regulation der Pigmentsynthese vermuten. Die Haarpigmentierung bei Mäusen wird durch viele Entwicklungs- und Signalgebungsvorgänge vermittelt, bei denen Enzyme, Transkriptionsfaktoren, ein Wachstumsfaktor und sein Rezeptor, ein Membrantransportprotein, ein Hormonrezeptor und ein Antagonist der Hormonbindung beteiligt sind. Bei Mäusen hat wildtypfarbiges Haar Agouti-Färbung und enthält zwei Pigmente, wobei die Ansätze und Spitzen das schwarze Pigment Eumelanin enthalten und eine Zwischenbande Phäomelanin enthält. Zwei Gene in Mäusen, *agouti* (A) auf Chromosom 2 und *extension* (E) auf Chromosom 8, sind an der Regulation der relativen Mengen an Eumelanin und Phäomelanin in der Maus beteiligt. Mutationen in diesen beiden Loci führen bei Mäusen zu einer gelben Fellfarbe. Dominante Mutationen im A-Gen, wie *lethal yellow* und *viable yellow*, führen zu einer adipösen Maus, die vollständig oder fast ganz gelb ist, weil nur Phäomelanin produziert wird. Dagegen sind Mutationen in E, die zu einer gelben Fellfarbe führen (*e*), rezessiv. Sowohl der *agouti*- als auch der *extension*-Locus wurden kloniert. Das A-Gen codiert ein Polypeptid aus 131 Aminosäuren mit einer Struktur, die mit seiner vorgeschlagenen parakrinen Funktion im Einklang steht. E codiert den MSH-Rezeptor (MSH-R). Es wurde festgestellt, dass in KM12-Mäusen weder A noch E mutiert sind. Außerdem wurde das Transgen auf zwei Integrationsstellen auf dem Mäusechromosom 3 lokalisiert (**Fig. 7**), was mit einer Mutation außerhalb des A- und des E-Locus im Einklang steht.

[0038] Das Rotationsverhalten von KM12-Mäusen lässt eine Innenohr-Fehlfunktion vermuten, die das Gleichgewicht beeinflusst. Das reife Innenohr besteht aus der Gehörschnecke, die für die Wahrnehmung von Schall verantwortlich ist (Corti-Organ), und dem Vestibularapparat, der für den Gleichgewichtssinn verantwortlich ist. Es wurden viele Gene gefunden, die die Entwicklung und Funktionen des Innenohrs regulieren, und Mutationen, die Hör- und Gleichgewichtsdefekte verursachen, wurden sowohl beim Menschen als auch bei der Maus gefunden. Diese Gene codieren verschiedene Klassen von Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, sezernierte Wachstumsfaktoren, Signalmoleküle, Rezeptoren, Komponenten des Cytoskeletts, intrazelluläre Transporter und Ionenkanalproteine. Obwohl mit Taubheit assoziierte Pigmentierungsdefekte (wie *microphthalmia*, *dilute*) gefunden wurden, wurden bisher bei Mäusen keine Mutationen identifiziert, die sowohl ein gelbes Fell als auch Innenohrdefekte verursachen.

[0039] Die Datenbanken wurden nach in Frage kommenden Genen und bekannten mutanten Loci auf Chromosom 3, die für das gelbe Fell und den Vestibularisausfall verantwortlich sein können, durchsucht, und es wurden keine gefunden. Die Mutation ist daher neu. Auf der Grundlage der phänotypischen

Merkmale von KM12-homozygoten Mäusen wurde der mutante Locus *yellow submarine* (*ysb*) genannt.

[0040] Eine notwendige Vorbedingung, um den bzw. die molekularen Defekte in *ysb*-Mäusen zu definieren, besteht darin, das bzw. die mutierten Gene zu identifizieren und die phänotypischen Abnormitäten zu charakterisieren. Im derzeitigen RGC-Projekt wurde eine Analyse der vestibulären Abnormitäten in *ysb*-Mäusen begonnen. Abnormitäten im Hörnerv und Innenohr wurden in *ysb*-Embryonen gefunden. Inverses PCR wurde verwendet, um flankierende DNA aus den beiden Transgen-Insertionsstellen zu isolieren. Diese flankierenden DNAs wurden verwendet, um genomische Klone zu isolieren, die insgesamt 49 kb DNA überspannen. Southern-Analysen unter Verwendung dieser Klone zeigen, dass an der Integrationsstelle 2 ungefähr 20 kb DNA deletiert wurde. Klone für beide Integrationsstellen wurden an derselben Stelle auf Chromosom 3 lokalisiert. Die Daten lassen vermuten, dass die Transgen-Integration eine Deletion und chromosomale Inversion verursacht hat. Es wurde auch bestimmt, dass es eine rezessive Mutante auf Chromosom 3 (genannt *lcc*: *light coat and circling*; helles Fell und Rotationsverhalten) mit ähnlichen Merkmalen wie *ysb* gibt, die als Ergebnis einer Röntgenbestrahlung auftrat und zu *ysb* allel sein kann (Dr. C. Tease; MRC Mammalian Genetics Unit, Harwell), und ein Vergleich der beiden Mutanten wird gerade durchgeführt. Kreuzungen zwischen *ysb*- und *lcc*-Mäusen zeigen, dass die *ysb*-Mutanten die *lcc*-Mutation nicht komplementieren können, was stark vermuten lässt, dass die Mutationen allel sind.

[0041] Molekulargenetik, Bioinformatik, Entwicklungsbiologie, transgene und physiologische Ansätze werden verwendet, um: die Gene am *+^{ysb}*-Locus zu identifizieren und die molekularen und entwicklungs-mäßigen Grundlagen, die dem oder den Defekten bei *ysb*-Mäusen zugrundeliegen, zu studieren. Die folgenden Verfahren werden verwendet: 1) Isolierung und Charakterisierung des bzw. der *+^{ysb}*-Gene; 2) Bestimmung der Natur der *ysb*-Mutation; 3) Durchführung von genetischen Komplementierungstests zwischen *ysb*- und *lcc*-Mäusen; 4) Durchführung von Experimenten zur transgenen Rettung; 5) Charakterisierung der Entwicklungsdefekte in den Innenohren von *ysb*-Mäusen unter Verwendung von dreidimensionalen Rekonstruktionsanalysen, Molekularmarkern und Chimärenstudien; 6) Charakterisierung der neurophysiologischen Veränderungen im Gleichgewichtssinn und Gehör bei *ysb*-Mäusen. Obwohl eine gewisse Betonung auf die Innenohrdefekte von *ysb* gelegt wurde, werden durch Klonieren und Charakterisieren des bzw. der *ysb*-Gene Einsichten in den bzw. die biochemischen und möglichen intrazellulären Signalübertragungsdefekte, die der Veränderung der Fellfarbe zugrundeliegen, gewonnen. Ungefähr 1/1000 Säuglingen sind bei der Geburt von Hörfehlern betroffen, von denen zwei Drittel eine genetische Basis

haben. Etwa die Hälfte der Kinder mit Hörschäden haben auch einen Vestibularisausfall. Mäuse sind wegen der Ähnlichkeit in Struktur und Entwicklung zwischen Maus- und Humaninnenohren gute Modelle, um Hörschäden zu untersuchen. Diese Studien liefern fundamentale Informationen über die Mechanismen der Innenohrentwicklung und die molekulare Basis, durch die es bei Gleichgewichtsstörungen von Mäusen und Menschen zu Innenohrdefekten kommen kann.

Die Mauslinie KM12

[0042] Bei der Herstellung von transgenen Mäusen zerstört die Integration der exogenen DNA zuweilen die Funktion von einem oder mehreren Genen. Bei der Untersuchung der Regulation des COL2A1-Gens unter Verwendung eines rekombinanten Plasmids (pAA2), das regulatorische DNA-Sequenzen aus COL2A1 enthielt, die mit dem lacZ-Reporter gen verknüpft waren (Cheah et al., 1995), wurde eine rezessive Mutation geschaffen, die durch die Insertion des Transgens verursacht wurde. Diese Mäuse sind durch eine Änderung der Fellfarbe nach Gelb und durch Rotationsverhalten gekennzeichnet, das man nur bei Nachkommen beobachtet, die homozygot in Bezug auf das Transgen sind ([Fig. 1](#), Anhang). Bei der Entwicklung von KM12-Embryonen wird das Transgen nicht nur in den Stellen exprimiert, die man für COL2A1 erwartet, sondern auch in zusätzlichen Expressionsdomänen, wie spezifischen Rhombomeren des Rautenhirns (r2,3,5), im Rückenmark, den Spinalganglien und in den Haarfollikeln der Haut. Diese neuronalen und Hautexpressionsstellen sind nicht typisch für das endogene Col2a1-Gen, stehen aber mit der Fellfarbe und dem Verhaltensphänotyp von KM12-Mäusen im Einklang ([Fig. 2](#), [Fig. 3](#)).

Agouti- und gelbe Fellfarbe

[0043] Das gelbe Fell von KM12-Mäusen lässt eine anormale Regulation der Pigmentsynthese vermuten. Bei Mäusen hat wildtypfarbiges Haar Agouti-Färbung und enthält zwei Pigmente, wobei die Ansätze und Spitzen das schwarze Pigment Eumelanin enthalten und eine Zwischenbande Phäomelanin enthält. Die Regulation der Haarpigmentierung bei Mäusen wird durch viele Entwicklungs- und Signalgebungsvorgänge vermittelt, bei denen mehrere Enzyme, Transkriptionsfaktoren, ein Wachstumsfaktor und sein Rezeptor, ein Membrantransportprotein, ein an ein G-Protein gekoppelter Hormonrezeptor und ein Antagonist der Hormonbindung beteiligt sind. Diese Pigmente werden in Melanocyten von Tyrosinase synthetisiert (Übersichtsartikel in). Zwei Gene in Mäusen, agouti (A) auf Chromosom 2 und extension (E) auf Chromosom 8, sind an der Regulation der relativen Mengen an Eumelanin und Phäomelanin in der Maus beteiligt. Mutationen in diesen beiden Loci führen bei Mäusen zu einer gelben Fellfarbe. Domi-

nante Mutationen im A-Gen, wie lethal yellow und viable yellow, führen zu einer adipösen Maus, die vollständig oder fast ganz gelb ist, weil nur Phäomelanin produziert wird. Dagegen sind Mutationen in E, die zu einer gelben Fellfarbe führen (e), rezessiv. Sowohl der A- als auch der E-Locus wurden kloniert. Das A-Gen codiert ein Polypeptid aus 131 Aminosäuren mit einer Struktur, die mit seiner vorgeschlagenen parakrinen Funktion im Einklang steht. E codiert den MSH-Rezeptor (MSH-R), ein 35-kD-Polypeptid mit sieben Transmembrandomänen, und wird in Melanocyten exprimiert. Die Aktivierung von MSH-R fördert die Eumelaninsynthese, während das agouti-Protein die Phäomelaninsynthese verstärkt.

Gene und Innenohrdefekte

[0044] Viele taube Mausmutanten sind durch das klassische Shaker/Waltzer-Verhalten von Rotation, Zurückwerfen des Kopfes und Hyperaktivität gekennzeichnet. Das Rotationsverhalten von KM12-Mäusen lässt eine Innenohr-Fehlfunktion vermuten, die den Gleichgewichtssinn und das Gehör beeinflusst. KM12-Mäuse zeigen auch andere Merkmale von Innenohrdefekten, wie Zurückwerfen des Kopfes und eine Unfähigkeit zu schwimmen ([Fig. 4](#)). Außerdem zeigen KM12-Mäuse eine anormale Streckreaktion. Wenn sie am Schwanz hochgenommen werden, strecken KM12-Mäuse ihre Gliedmaßen nicht aus wie normale Mäuse, sondern krümmen sich zum Bauch hin ein ([Fig. 5](#), Anhang). KM12-Mäuse zeigen zwar eine gewisse Reaktion auf scharfe Geräusche (Preyer-Reflex), doch scheint diese nicht so stark zu sein wie bei Wildtypmäusen. Daher ist es möglich, dass KM12-Mäuse partiell hörgeschädigt sind. Physiologische Tests, die das endocochleäre Potential (EP) und das Summenaktionspotential (CAP) messen, zeigen, dass ysb-Mäuse taub sind und dass ysb/lcc-Compound-Heterozygote stocktaub sind. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Stria vascularis nicht richtig funktioniert, und dass die Aktivität des Nervus cochleae als Reaktion auf ein Geräusch ebenfalls anormal ist.

[0045] Das Innenohr ist ein komplexes Sinnesorgan, das sich aus einem aus einer einzelnen Zellschicht bestehenden Epithel (Ohrplakode) entwickelt, das sich durch eine Reihe von Zell- und Gewebewebungen einstülpt und unter Bildung des Ohrvesikels schließt. Weitere morphogenetische Bewegungen und mehrstufige Induktionsereignisse, die die Differenzierung und Proliferation regulieren, führen zur Bildung des Organs für das Gehör und den Gleichgewichtssinn. Das reife Innenohr besteht aus der Gehörschnecke, die für die Wahrnehmung von Schall verantwortlich ist (Corti-Organ), und dem Vestibularapparat, der für den Gleichgewichtssinn verantwortlich ist. Von vielen Genen wurde gezeigt, dass sie im sich entwickelnden Innenohr exprimiert werden. Dazu gehören Gene, die Transkriptionsfaktoren

(z.B. Nkx5.1/hmx3, Nkx5.2/hmx2, otx-1, msx1, pax2, kreisler usw.), sezernierte Faktoren (z.B. Bmp4, fgf3, fgf2, bdnf), Rezeptoren (z.B. EphA4, trkA, trkB, trkC, Ednrb, PTHrP), Cytoskelettproteine, wie unkonventionelle Myosine (z.B. Myo7a, myo15 usw.), codieren.

[0046] Innenohrdefekte wurden auf einen oder mehrere von drei Typen von Abnormitäten zurückgeführt: morphogenetisch, cochleosakkulär und neuroepithelial. Morphogenetische Defekte werden durch Entwicklungsabnormitäten in der Struktur des Innenohrs (Labyrinth) verursacht. Cochleosakkuläre Abnormitäten entstehen aus Defekten im sekretorischen Epithel des Ductus cochlearis. Neuroepitheliale Defekte ergeben sich daraus, dass das Sinnesepithel die normale Reifung nicht vollendet. Außerdem kann eine abnorme Rautenhirnentwicklung zu einem Vestibularisausfall führen. Zum Beispiel sind kreisler-Mäuse durch Taubheit und Rotationsverhalten bei adulten Tieren und durch Abnormitäten in der Positionierung der Ohrbläschen und der Segmentierung des Rautenhirns gekennzeichnet.

[0047] Mäuse sind wegen der Ähnlichkeit in Struktur und Entwicklung zwischen Maus- und Humaninnenohren gute Modelle, um Hörschäden zu untersuchen. Von Mutationen in mehreren Genen, die im Innenohr exprimiert wurden, wurde gezeigt, dass sie bei Menschen und Mäusen Hör- und/oder Gleichgewichtsstörungen verursachen. Dazu gehören Myo7a, Myo15, kreisler, hmx3 (nkx5.1), fgfr3 und andere.

[0048] Die folgenden Verfahren werden durchgeführt: a) Charakterisierung von Abnormitäten im Rautenhirn und der Ohrentwicklung bei KM12-Mäusen und b) Isolieren der DNA-Sequenzen an der bzw. den Integrationsstellen des Transgens bei KM12-Mäusen.

Yellow submarine: ein neuer mutanter Locus

[0049] Die rezessive Natur des mutanten Phänotyps lässt vermuten, dass das Transgen nicht in das A-Gen integriert wurde.

[0050] Die Insertion des Transgens in die codierenden Sequenzen der MSH-R-, ACTH-R-, agouti- und kreisler-Gene wurde getestet, da gezeigt wurde, dass diese für die agouti-Fellfarbe oder die Innenohrentwicklung wichtig sind. Southern-Blot-Analysen der DNA von KM12-Mäusen unter Verwendung von Sonden für die kreisler-, agouti-, E- und ACTHR(Mc2r)-Gene [Spenden von Dr. G. Barsh (UCSF), Dr. R. Woychik (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge) und Dr. R. Cone (Oregon Health Sciences University, Portland)] zeigen, dass die codierenden Sequenzen dieser Gene nicht von dem Transgen unterbrochen wurden (**Fig. 6**). Diese Ergebnisse schließen daher die Chromosomen 2 (agouti, kreisler), 8 (E) und 18 (Mc2r) aus.

[0051] Unter Verwendung des gesamten Transgens und seiner Endfragmente als Sonden in Southern-Blot-Analysen haben wir bestimmt, dass 3 Kopien des Transgens in 2 Stellen im Genom integriert wurden. Es gibt zwei Kopien des Transgens in Kopf-Schwanz-Anordnung an einer Integrationsstelle (Int. 1) und eine Kopie an der anderen (Int. 2) (zusammengefasst in **Fig. 7**, Anhang). Da der Fellfarben- und der Verhaltensphänotyp jedoch über ungefähr 176 Meiosen (6 Generationen) nicht segregiert sind, hat das Transgen vielleicht eine Umordnung und/oder Deletion eines Teils des Chromosom verursacht. Daher könnten der Fellfarben- und der Verhaltensphänotyp von KM12-Mäusen durch die Mutation von einem oder mehreren Genen verursacht sein.

[0052] Die chromosomale Zuordnung des KM12-Transgens ist ein wesentlicher und informativer erster Schritt bei der Definition der Natur der Mutation. Das Transgen wurde durch FISH auf zwei Integrationsstellen auf dem Mäusechromosom 3 lokalisiert, was mit den Southern-Analysen im Einklang steht (**Fig. 7**, **Fig. 8**). Die Daten stehen auch mit den Ergebnissen im Einklang, die die Loci A, E und kreisler ausschließen.

[0053] Bisher wurden bei Mäusen keine Mutationen identifiziert, die sowohl ein gelbes Fell als auch Innenohrdefekte verursachen. Die Datenbanken wurden nach in Frage kommenden Genen und bekannten mutanten Loci auf Chromosom 3, die für das gelbe Fell und den Vestibularisausfall verantwortlich sein können, durchsucht, und es wurden keine gefunden. Die Mutation ist daher neu. Auf der Grundlage der phänotypischen Merkmale von KM12-homozygoten Mäusen wurde der mutante Locus yellow submarine (ysb) genannt (homozygote Mutanten werden im Folgenden als ysb und der Wildtyp als ^{+ysb} bezeichnet; Leung, K.K., S. Dong, A. Tang, H. Heng, L.C. Tsui, P.P.L. Tam & K.S.E. Cheah, Yellow submarine (ysb), a newly discovered locus regulating hair colour and inner ear function; Manuskript in Vorbereitung).

Charakterisierung des ysb-Phänotyps

[0054] Ysb-Mäuse sind ein wertvolles Modell, um Moleküle zu identifizieren, die an der Kontrolle der Pigmentierung und des Gleichgewichtssinns beteiligt sind. Die strukturellen Abnormitäten bei ysb-Mäusen wurden analysiert. Der Phänotyp und das Expressionsmuster des Transgens in ysb-Mäusen weisen darauf hin, dass eine Integration des Transgens eine rezessive Mutation verursacht hat, die die Regulation der Pigmentierung beeinflusst und auch eine abnorme Innenohrentwicklung verursacht. Die Studien konzentrierten sich am Anfang auf die Innenohr-abnormitäten bei ysb-Mäusen.

Struktur von Rautenhirn und Kranialnerv

[0055] Bei der Embryogenese der Wirbeltiere ist der Vorgang der Segmentierung, bei dem sich wiederholende Blöcke von Gewebe entlang der von vorn nach hinten verlaufenden Körperachse entstehen, für die Musterbildung und Differenzierung fundamental. Bei der Entwicklung des Rautenhirns erfolgt eine Segmentierung mit Bildung von Rhombomeren im neuralen Epithel. Eine ausführliche Studie von kreisler-Embryonen unter Verwendung von Markern für die Rautenhirnsegmentierung, wie Knox-20- und Hox-Genen, hat gezeigt, dass die kreisler-Mutation wahrscheinlich auf die Folgen einer abnormen Segmentierung des Rautenhirns zurückzuführen ist, die zu einem Verlust der Rhombomere (r) 5 und 6 führt. Knox-20 ist ein geeigneter Marker für die Rautenhirnsegmentierung, der normalerweise an den Tagen 9,0-9,5 in r3 und r5 exprimiert wird, und in r3 von ysb-Embryonen wurde eine lacZ-Expression beobachtet. Um zu bewerten, ob der Phänotyp von ysb-Mäusen mit einem Problem der Rautenhirnentwicklung assoziiert ist, wurde anfangs das Expressionsmuster von Knox-20 bei heterozygoten und homozygoten, 9,0-9,5 Tagen alten Embryonen durch in-situ-Hybridisierung im Totalpräparat und an Schnitten untersucht und mit dem des Wildtyps verglichen. Die in-situ-Hybridisierung am Totalpräparat zeigte keine Veränderungen in der Rhombomerenentwicklung von Knox-20-mRNA in homozygoten und heterozygoten zum Zeitpunkt 9,5 dpc ([Fig. 9](#)). Dies ist anders als bei der kreisler-Mutante, was vermuten lässt, dass die Mutation insgesamt keine schweren Veränderungen in den Rhombomeren 3 und 5 verursacht hat.

[0056] Immunfärbungsstudien am Totalpräparat von 10,5 Tage alten ysb-Embryonen unter Verwendung eines Antikörpers (2H3) gegen Neurofilament zeigten bei homozygoten Mutanten eine Reduktion des VIII. Nervs (der den Vestibularnerv ergibt), während die anderen Kranialnerven normal schienen ([Fig. 10](#), Anhang). Heterozygote erschienen normal, obwohl der VIII. Nerv im Vergleich zum Wildtyp dünner erschien. Dieses Ergebnis steht mit dem Vestibularis-Ausfall bei den ysb-Mäusen im Einklang. Die Mutation könnte daher a) die Fähigkeit des VIII. Nervs, zur Ohrkapsel hin zu wachsen, beeinflusst haben; b) bewirkt haben, dass am Anfang nicht die volle Zahl der Vorläufer von der Otocyste weggewandert ist; oder c) einen abnormen Zelltod (Apoptose) verursacht haben.

Innenohrmorphologie

[0057] Um zu bestimmen, ob es bei homozygoten ysb-Mäusen irgendwelche Innenohrfehlbildungen gibt, wurden dreidimensionale Rekonstruktionen des Innenohrs der Mäuse unter Verwendung von histologischen seriellen Schnitten erzeugt. Dreidimensiona-

le Rekonstruktionen von Bildern von Schnitten der Ohren von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten ysb-Feten zum Zeitpunkt 16,5 dpc (dies post coitum; Tage nach der Paarung) wurden durchgeführt. Daraufhin wurde das Lumen eingezeichnet, um einen Eindruck von der gesamten Struktur des Labyrinths zu erhalten. Die Daten zeigen Defekte am oberen und seitlichen Bogengang und an der Ampulle bei zwei ysb-Feten, wobei einer schwerer betroffen ist als der andere (Anhang, [Fig. 11](#)).

[0058] Die Rekonstruktionen des Lumens bei zwei homozygoten 16,5-dpc-ysb-Feten zeigen, dass der obere und der seitliche Bogengang verkürzt waren und ihre Ampullen fehlten. Nach 16,5 dpc sind die sensorischen Bereiche von nichtsensorischen Bereichen zu unterscheiden, da die Zellen zu einem mehrreihigen Epithel differenziert sind. Dieses Epithel erscheint wegen der zwei oder mehr Schichten von Zellkernen dicker als das umgebende Epithel. Da dieser Unterschied leicht mit dem Lichtmikroskop beobachtet werden konnte, wurden diese verdickten Bereiche nachgezogen und auf das Lumen von Ohren gezeichnet, die zuvor rekonstruiert worden waren ([Fig. 12](#), Anhang). Die verschiedenen Arten von sensorischen Bereichen einschließlich des Corti-Organs (Schalldetektor), der Maculae (Detektoren der linearen Bewegung) und der Cristae (Detektoren der Drehbewegung) sind in verschiedenen Farben dargestellt, um leichter aufzuzeigen, welche sensorischen Bereiche betroffen sind.

[0059] Die Hinzufügung der sensorischen Information zu diesen Rekonstruktionen zeigte, dass mehrere verschiedene Typen von sensorischen Bereichen bei dem homozygoten Fetus abnorm waren. Die obere und die seitliche Crista, die sich in den Ampullen befinden, fehlten ([Fig. 4](#), Anhang). Diese Beobachtung steht mit der früheren Beobachtung in Einklang, dass die Ampullen fehlten. Die ausführliche Analyse von Sinnesepithelien zeigte auch, dass es keine ektopische Bildung dieser Cristae gab. Beide Maculae schienen ebenfalls von der Mutation beeinflusst zu sein: die utrikuläre Macula zeigte fast keine Verdickung im erwarteten Bereich, und die sakkuläre Macula zeigte zwar eine gewisse Verdickung, erschien jedoch abnorm. Der einzige vestibuläre Fleck, der normal erschien, war die hintere Crista. Das Hörorgan, das Corti-Organ, erschien zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung ebenfalls normal. Beim heterozygoten Fetus wurden unter Verwendung dieses Analyseverfahrens keine Abnormitäten beobachtet, und das Wildtyp-Wurfgeschwister (+/+) wurde als Kontrolle verwendet. Die Rekonstruktion von Schnitten aus 13,75-dpc-Feten zeigte einen ähnlichen Defekt in den Bogengängen ([Fig. 13](#)).

Isolierung und Charakterisierung von Transgen-Integrationsstellen

[0060] **Fig. 7** fasst den Fortschritt bei der Isolierung des Wildtyplocus an der Transgen-Integrationsstelle zusammen. Durch Primerassoziation innerhalb des Transgens wurde inverse PCR verwendet, um DNA-Sequenzen zu isolieren, die die Integrationsstellen flankieren (**Fig. 7**). Zwei PCR-Produkte von 350 bp (Spel-1) und 600 bp (Spel-2) wurden für die Integrationsstellen 1 bzw. 2 erhalten. Eine Sequenzanalyse (**Fig. 14**) zeigte die Anwesenheit eines möglichen PolyA-Befestigungssignal in Spel-1, aber eine BLAST-Recherche in genomischen und EST-Datenbanken zeigte keine signifikanten Übereinstimmungen. Für die Integrationsstelle 1 wurde eine längere 5'-flankierende Sequenz (1,8 kb) und für die Stelle 2 eine 3'-flankierende Sequenz (500 bp) erhalten.

[0061] Eine Southern-Blot-Hybridisierung unter Verwendung der flankierenden Sequenzen für beide Integrationsstellen zeigte, dass eine Deletion an der Integrationsstelle 2, aber nicht an Stelle 1 stattgefunden hatte (**Fig. 15**). Dann wurden diese PCR-Fragmente verwendet, um eine normale genomische 129-Maus- λ -Phagen-Bibliothek zu durchmustern. Für die Integrationsstelle 1 wurden vier überlappende genomische Klone erhalten. Für die Integrationsstelle 2 wurden zwei genomische Klone erhalten. Bei der weiteren Durchmusterung wurden zwei weitere Klone isoliert. Insgesamt wurden genomische Sequenzen, die 19 kb bzw. 30 kb überspannten, an den Integrationsstellen 1 bzw. 2 isoliert. Southern-Analysen unter Verwendung dieser genomischen Klone als Sonden zeigten, dass an der Integrationsstelle 2 ungefähr 20 kb DNA deletiert wurden (**Fig. 16**). Ein Klon für die Integrationsstelle 2 hybridisierte in Northern-Analysen mit mRNA von einem 15,5-dpc-Mausfetuss. Die genomischen Klone für die Integrationsstellen 1 und 2 sind in demselben Bereich von Chromosom 3 colokalisiert, was vermuten lässt, dass möglicherweise auch eine Chromosomeninversion stattgefunden hat (**Fig. 7**). Diese Ergebnisse würden erklären, warum die beiden Transgen-Insertionen über so viele Meiosen hinweg nicht segregiert sind. Die Sequenz von 8114 bp (in ein Plasmid pPLS kloniert) innerhalb des 20-kb-Bereichs, der an der Integrationsstelle 2 in ysb deletiert ist, wurde bestimmt (**Fig. 17**). Dieser Bereich enthält Sequenzen mit 90% bzw. 100% Homologie zu den IMAGE-Klonen 1196866 und 636096 in der EST-Datenbank (**Fig. 17**). Die Positionen dieser IMAGE-Klonsequenzen innerhalb von pPLS sind in **Fig. 18** zusammengefasst.

[0062] Das bzw. die ysb-Gene werden identifiziert und charakterisiert, und die molekularen und entwicklungsmäßigen Grundlagen, die dem oder den Defekten bei ysb-Mäusen zugrundeliegen, werden studiert. Dazu wird auf den derzeitigen Ergebnissen

aufgebaut, und Molekulargenetik, Bioinformatik, Entwicklungsbiologie, transgene und physiologische Ansätze werden verwendet, um: a) das bzw. die $+^{ysb}$ -Gene und die codierten Transkripte zu identifizieren und zu charakterisieren; b) die Natur der ysb-Mutation zu bestimmen; c) genetische Komplementierungstests und transgene Rettungsexperimente durchzuführen; d) die Entwicklungsdefekte bei den Innenohren von ysb-Mäusen unter Verwendung von dreidimensionalen Rekonstruktionsanalysen, Molekularmarkern und Chimärenstudien näher zu charakterisieren; e) neurophysiologische Veränderungen im Gleichgewichtssinn und Gehör zu charakterisieren.

[0063] Diese Studien liefern fundamentale Informationen über die Mechanismen, durch die es zu Innenohrdefekten kommen kann.

Verfahren

Molekulare Klonierung und Charakterisierung der Sequenz des Wildtyp- und des mutanten ysb-Locus

1 Genentdeckung und -charakterisierung am ysb-Locus:

[0064] Mehrere Ansätze werden verwendet, um Gene am ysb-Locus zu identifizieren.

a. Bioinformatik: Die isolierten genomischen Klone werden sequenziert, und die Daten werden unter Verwendung von Bioinformatik-Tools auf die Anwesenheit von potentiellen Exons analysiert. Diese Vorhersagen sind sehr wichtig, um zu verfolgende Bereiche zu identifizieren.

b. Exprimierte Gensequenzen werden unter Verwendung einer Kombination von Ansätzen identifiziert. Zuerst werden DNA-Fragmente, die Exonsequenzen enthalten, mit Northern-Analysen durchmustert. Sobald solche Fragmente identifiziert sind, werden Exon-Trapping-Ansätze verwendet, um Bereiche mit transkribierten Sequenzen zu identifizieren. Potentielle exonhaltige Fragmente werden bei in-situ-Hybridisierungsstudien verwendet, und das Expressionsmuster wird mit dem des Transgens in ysb-Mäusen verglichen.

[0065] Um Einsichten in die Funktion des bzw. der Gene zu gewinnen, verwenden wir außerdem Bioinformatik-Tools, um in anderen Modellgenom-Datenbanken, z.B. Hefe, Fliege, Wurm, Fisch und Mensch, nach homologen Sequenzen zu suchen.

2. Klonierung des mutanten Locus Aufbau einer genomischen Bibliothek:

[0066] Um die Transgen-Integrationsstellen zu isolieren, wird eine genomische Cosmidbibliothek aus DNA aufgebaut, die aus homozygoten ysb-Mäusen isoliert wurde. Das Cosmid, pCos8 (Spende von Dr. A.-M. Frischauf, Imperial Cancer Research Fund,

London), wird als Vektor beim Aufbau der Bibliothek verwendet. Dieser Vektor enthält keine lacZ-Sequenzen, und seine Verwendung hilft, die Isolierung von falsch positiven Klonen während der Durchmusterung der Bibliothek zu minimieren. Primärkulturen von Embryo-Fibroblasten aus KM12-homozygoten Mäusen werden angelegt und als Quelle für genomische DNA hohen Molekulargewichts verwendet. Die Cosmidbibliothek wird mit Standardverfahren aufgebaut. Um eine hohe Effizienz der Cosmidverpackung zu gewährleisten, werden getestete Verpackungsmischungen (z.B. Gigapack Gold von Stratagene) von kommerziellen Quellen erhalten. DNA-Sonden, die das 5'- und das 3'-Ende des Transgens abdecken, und lacZ-Sequenzen werden verwendet, um die Bibliothek durch Koloniehybridisierung zu durchmustern. Cosmidbibliotheken und isolierte Gene wurden in der Vergangenheit erfolgreich aufgebaut.

3. Charakterisierung von genomischen Klonen und des mutanten Locus:

[0067] Die Cosmide werden durch Restriktionsenzym-Kartierung und Southern-Blot-Analysen unter Verwendung der geeigneten Sonden in Bezug auf die Anwesenheit des Transgens charakterisiert. Sobald ein oder mehrere Cosmide, die das Transgen enthalten, identifiziert sind, werden Subklone hergestellt, und die Natur der Sequenzen, die sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende der Insertionsstelle flankieren, werden durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Dann werden die erhaltenen Sequenzen unter Verwendung von Bioinformatik-Tools analysiert, um potentielle offene Leseraster (ORFs) zu finden, und werden auch verwendet, um die Nucleotid- und Aminosäuresequenz-Datenbanken nach homologen Sequenzen abzusuchen. Die ysb-Klone werden verwendet, um genomische DNA von den Harwell-Mutanten zu analysieren. Um zu bestimmen, ob die ysb- und die Harwell-Mutante allel sind, wird ein Komplementierungstest durchgeführt, indem man die beiden Mutanten miteinander kreuzt. Wenn die zwei Mutanten sich nicht komplementieren, ist diese Information für die Identifizierung des verantwortlichen Gens nützlich, da zwei verschiedene Allele verfügbar wären. Weiterhin beinhalten beide Mutanten zwei mögliche Mutationsstellen, und die Nichtkomplementierung reduziert die Zahl der auf molekularem Niveau zu untersuchenden Stellen sofort, da es nur einen einzigen chromosomalen Überlappungsbereich zwischen den beiden Mutationen gibt.

4. Genetische Rettungsexperimente

[0068] Die Expression von BACs in transgenen Mäusen wurde erfolgreich verwendet, um Taubheit bei shaker-2-Mäusen zu korrigieren. Um festzustellen, ob die charakterisierten Sequenzen diejenigen sind, die in ysb mutiert sind, werden Klone mit bakteriellen künstlichen Chromosomen (BAC) durchmus-

tert, wobei man die genomischen Klone für die Integrationsstelle 2 als Sonde verwendet. Wir testeten die Fähigkeit von BAC-Klonen, die den ysb-Locus überspannen, den Phänotyp von ysb-Mäusen durch Transgenese zu retten. Es wäre auch wichtig, den ysb-Locus mit demjenigen der Harwell-Mutante zu vergleichen.

5. Isolierung von humanem ysb

[0069] Das Ziel besteht darin, testen zu können, ob irgendein humaner Vestibularis-Ausfall durch Mutationen im humanen Homologen von ysb verursacht ist. Daher ist es wichtig, humane BAC-Klone zu isolieren, die den äquivalenten ysb-Locus abdecken. Die genomischen Mausklone werden verwendet, um eine humane BAC-Bibliothek zu durchsuchen. Sobald diese isoliert sind, werden sie wie bei den Mausklonen in Bezug auf Sequenz usw. charakterisiert. Ein Vergleich zwischen den humanen und den Mausklonen wird angestellt. Sobald in Frage kommende humane Klone isoliert sind, werden ihre chromosomalen Orte kartiert, und die Mutanten-Datenbanken (z.B. OMIM; Online Mendelian Inheritance in Man) werden nach möglichen assoziierten Störungen beim Menschen durchsucht. Die Verfügbarkeit von humanen Klonen ist eine Ressource für zukünftige Studien an humanen Patienten mit Hör- und Gleichgewichtsproblemen.

6. Morphologische und Entwicklungsanalysen

[0070] Aus den Rekonstruktionen des Lumens von 13,75 und 16,5 Tagen alten Feten ging hervor, dass der obere und der seitliche Bogengang bei der homozygoten Mutante verkürzt waren und ihre Ampullen fehlten. Um den zeitlichen Eintritt der Entwicklungsabnormalität nachzuvollziehen, werden die Köpfe von elf 12,5 Tage alten Feten und Neugeborenen von nichttransgenen Kontroll- und ysb-Mäusen fixiert und für die dreidimensionale Rekonstruktion verarbeitet. Die Struktur der Innenohren wird mit Hilfe von Software in drei Dimensionen rekonstruiert.

[0071] Um zu bestimmen, wann die abnorme Morphogenese der Bogengänge zuerst in Erscheinung tritt, wurde die Morphologie der Ohren von ysb-Embryonen nach 11, 13 (ein kritischer Zeitpunkt bei der Bogengangbildung) und 16,5 dpc sorgfältig herausseziert, gesäubert, und das Lumen wurde mit weißer Farbe gefüllt und dann auf Abnormalität untersucht. Diese Technik sorgt für eine schnelle und genaue Visualisierung der dreidimensionalen Struktur des Ohrs, so dass die Variabilität im homozygoten Phänotyp bewertet und subtile Effekte bei Heterozygoten bewertet werden können. Die Statolithen in der extrazellulären Matrix, die auf den Haarzellen der Maculae liegen, lassen sich nach der Säuberung und vor dem Einspritzen von Farbe leicht beobachten. Es wird untersucht, ob sich diese Matrix in der Mutante normal

bildet, da die Maculae nach 16,5 dpc abnorm erscheinen. Die Innenohren nach 18 dpc werden ebenfalls durch Rasterelektronenmikroskopie untersucht, um zu bestimmen, ob es irgendwelche Abnormitäten in der Verteilung und Struktur der Sinneszellen gibt.

[0072] Außerdem wird eine sorgfältige in-situ-Hybridisierungsanalyse durchgeführt, um bei ysb- und Wildtypembryonen die Expression von Genen zu vergleichen, die bekanntermaßen eine Rolle bei der Innenohrentwicklung spielen, wobei man Molekularmarker, wie Hox-Gene (Hoxa3, Hoxb1 und Hoxb2), Fgf3, nkx5.1, otx1, Bmp4, Trkb, Trkc, NT-3, BDNF, neurogenin1 verwendet, und zwar aus den folgenden Gründen. Bei kreisler-Mäusen wurde gezeigt, dass der Defekt die Folge einer abnormen Segmentierung des Rautenhirns ist. Das hox-Gen und fgf3-Sonden werden verwendet, um die Rautenhirnentwicklung bei ysb-Mäusen zu untersuchen. In-vitro-Fate-Mapping zeigte, dass die seitliche Hälfte der Otocyste zu den Bogengängen und Cristae führt. Nkx5.1 wird im dorsolateralen Teil der Otocyste (und später in den Bogengängen) exprimiert, und eine Inaktivierung des Gens beeinflusst die Bogengänge. Otx-1 wird postero-lateral in der Otocyste exprimiert, und der seitliche Bogengang fehlt, wenn das Gen in Mäusen ausgeschaltet wird. Da im ventro-lateralen Teil des Ohrenepithels bei 9,5 Tage alten ysb-Embryonen eine Xgal-Färbung gefunden wurde, wird die Expression dieser Gene untersucht, um zu bestimmen, ob das bzw. die ysb-Gene stromaufwärts oder stromabwärts dieser beiden Gene wirken. BMP4 wird als Marker verwendet, um die Cristae, Sinnesbereiche des Ohrs, zu untersuchen.

[0073] Mehrere neurotrophe Faktoren (z.B. BDNF und NT-3) und ihre Rezeptoren (Trkb, Trkc) sind für die frühe Entwicklung des Innenohrs wichtig. Sie regulieren das Überleben von vestibulären und cochleären Neuronen und der Neuronen, die das Innenohr innervieren. Da der VIII. Nerv bei ysb-Mäusen verkümmert ist, wird die Expression dieser Gene ebenfalls untersucht. Vor kurzem wurde gezeigt, dass das neurogenin1-Gen für die Bestimmung von neuronalen Vorläufern für die proximalen kranialen sensorischen Ganglien wesentlich ist und ein guter Marker zur Untersuchung der prospektiven Ganglienzellen bei ysb-Mäusen sein wird. Dieselben Marker werden verwendet, um die harwell- und die ysb-Mutante miteinander zu vergleichen, falls die Komplementierungstests beweisen sollten, dass sie allel sind (siehe oben).

7. Ursprung von Entwicklungsabnormitäten

[0074] Die Entwicklungsanalyse von markierten ES-Zellen in Mauschimären ist ein starker Ansatz, um das Zellschicksal und die zellklonspezifische Genfunktion zu untersuchen. Die Tatsache, dass der Locus der ysb-Mutante durch lacZ markiert ist, wird

ausgenutzt, um die zellklonspezifische Genfunktion herauszuarbeiten sowie zu testen, ob der Gendefekt zellautonom oder nichtautonom ist.

[0075] Aus ysb-Blastocysten werden embryonale Stammzellen hergestellt und verwendet, um durch Blastocysteninjektion Chimären zu erzeugen. Analytierte chimärische Embryonen (5-10 pro Stadium) werden in den Entwicklungsstadien zwischen 9,5 dpc und der Geburt eingesammelt, und der relative Beitrag von ES-Zellen zur Entwicklung des Innenohrs gemäß der Beurteilung anhand der lacZ-Expression in den Chimären wird untersucht. Der präferentielle Verlust oder die Unterrepräsentierung des ysb-ES-Zell-Beitrags an bestimmten Stellen in dem sich entwickelnden Innenohr weist auf spezifische Veränderungen der Potenz des Zellklons hin. Die Zellklone werden durch in-situ-Hybridisierungen unter Verwendung der oben beschriebenen geeigneten Molekularmarker charakterisiert.

8. Neurophysiologie des Gleichgewichtssinns und Gehörs bei ysb-Mäusen

[0076] Die Neuronen, die das Innenohr innervieren, sind von der Ohrplakode abgeleitet. Diese Neuronen entstehen schon früh in der Entwicklung des Innenohrs aus der Plakode und bilden das akustische und das vestibuläre Ganglion. Die Neurofilament-Färbereperimente hatten eine Reduktion des achten kranialen Nervs bei 10,5 Tage alten ysb-Embryos gezeigt, was vermuten lässt, dass die fehlende Innervierung des Innenohrs eine Ursache des Gleichgewichts- und/oder Hörproblems bei ysb-Mäusen sein könnte. Es ist wichtig, zu bewerten, ob die ysb-Mäuse (a) Kopfbewegungssignale und (b) Hörsignale effektiv zum Zentralnervensystem befördern können oder nicht. Die Expression von c-fos wird als Indikator für funktionell aktivierte neuronale Aktivität im Hirnstamm verwendet. Die Fos-Expression als Indikator für eine postsynaptische Stimulation ist ein etabliertes Verfahren zum Identifizieren von funktionellen Verbindungen zwischen peripheren sensorischen Rezeptoren und zentralen Neuronen. Daher wird eine Fos-Immunfärbung von Hirnschnitten verwendet, um die zentralen Neuronen zu kartieren, die am funktionellen Neuralweg beteiligt sind.

9. Vestibuläre Experimente

[0077] Natürliche vestibuläre Stimulierungen werden verwendet, d.h. wellenförmige Drehungen um die Gier- und Längsneigungsachse und Drehungen mit konstanter Geschwindigkeit um eine andere als die vertikale Achse. Erstere stimulieren die jeweiligen Paare von Bogengängen, während letztere selektiv die utrikulären Haarzellen nacheinander aktivieren. Mit diesen Stimulationsmodi sollten sekundäre Neuronen im Vestibulariskern, die eine funktionale Verbindung mit Haarzellen auf den jeweiligen Bogen-

gangpaaren oder den utrikulären Maculae aufweisen, erregt werden und Fos exprimieren. Immunhistochemische Techniken, die c-fos beinhalten, werden verwendet, um das Muster der postsynaptischen Vestibularisstimulierung innerhalb der Vestibulariskerne und anderer Teile des Hirnstamms zu kartieren. Um das spinale Projektionsmuster von Fos-exprimierenden zentralen vestibulären Neuronen zu bestimmen, werden Hirnschnitte auf Neuronen untersucht, bei denen die Fos-Immunfärbung und retrograd transportierte Rhodamin-markierte Latexbeads (zuvor in das Rückenmark injiziert) colokalisiert sind.

[0078] Da Anästhetika bekanntermaßen die Niveaus der Fos-Expression beeinflussen, werden unbetäubte Tiere verwendet. Kontrolleexperimente werden durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die beobachteten Ergebnisse spezifisch auf die Aktivierung der Bogengang- und Otolithrezeptoren zurückzuführen sind: (a) intakte Mäuse befestigt, aber ohne Drehung; (b) akut labyrinthektomierte Mäuse befestigt, aber ohne Drehung; und (c) akut labyrinthektomierte Mäuse befestigt und dann in Drehung versetzt. Da die Expression von c-fos auch durch andere Sinnesreize als die in dieser Studie absichtlich erzeugten induziert werden kann, wird darauf geachtet, unkontrollierte Variablen und andere sensorische Einflüsse zu minimieren. Kontrollmäuse mit einer Scheinoperation am Rückenmark werden ebenfalls präpariert.

10. Hörexperimente

[0079] Diese Studien werden in Verbindung mit den Vestibularisexperimenten durchgeführt. Der Hörweg wird durch wiederholte Reizmodelle unter Verwendung von Tone-Burst-Signalen aktiviert. Die Schallreizung wird in einer abgedunkelten schalldichten Kammer durchgeführt. Jede sich frei bewegende Maus wird mit reinen Tone-Burst-Signalen konfrontiert, die von der Decke der Kammer aus abgegeben werden. Die funktionelle Verbindung zwischen zentralen Neuronen und den peripheren Hörrezeptoren wird durch Fos-Expression angezeigt. Diese Experimente liefern Informationen über das Aktivierungsmuster von Neuronen im zentralen Hörweg.

11. Zusätzliche Tests der Vestibularis/Hör-Funktion und Verhaltensstudien

[0080] Die folgenden Studien ergänzen die neurophysiologischen Studien und vergrößern den Umfang der Untersuchung erheblich, was die Definition des bzw. der zugrundeliegenden Defekte bei ysb-Mäusen erleichtert. Unter Verwendung der ysb-Maus wird eine Zuchtkolonie etabliert, um Mutanten für die Studie zu erhalten. Die Folgen der Vestibularisausfälle für das Verhalten werden unter Verwendung einer Standardbatterie von einfachen Gleichgewichtstests beschrieben, einschließlich Lagekorrekturreaktion bei Kontakt, Test mit erhöhter

Plattform und Test im offenen Feld, Streckreaktion, Preyer-Reflex, und das Ausmaß und der Typ der Verhaltensabnormität werden quantifiziert. Die Funktion der Cochlea bei jungen adulten ysb und Wurfgeschwisterkontrollen wird bestimmt, indem man Schwellen für den Nachweis eines von der Cochlea ausgehenden Summenaktionspotentials als Reaktion auf Tone-Bursts bei verschiedenen Frequenzen und mit verschiedenen Intensitäten misst. Dieser Ansatz gibt einen Hinweis auf irgendwelche Hörschäden in der Mutante.

[0081] Die molekulare Klonierung und Charakterisierung der potentiellen ysb-Klone wird durchgeführt. Dreidimensionale Rekonstruktionen an 11 Tage alten ysb-, heterozygoten und Wildtyp-Feten und Neugeborenen werden durchgeführt. In-situ-Hybridisierungsexperimente werden durchgeführt. Die detaillierte Restriktionskarte der genomischen Klone, die für den ysb-Locus isoliert wurden, wird hergestellt, und dann werden die Klone durch Northern-Analysen auf die Anwesenheit von exprimierten Sequenzen getestet. Mit Hilfe von Bioinformatik werden die erhaltenen DNA-Sequenzen analysiert.

Literatur

- Leung, K.K., Ng, L.J., Ho, K.K.Y., Tam, P.P.L. & Cheah, K.S.E., *J. Cell Biol.* 141, 1291-1300 (1998).
 Jackson, I., *J. Curr. Biol.* 3, 518-521 (1993).
 Conklin, B.R. & Bourne, H.R., *Nature* 364, 110-110 (1993).
 Bultman, S.J., Michaud, E.J. & Woychik, R.P., *Cell* 71, 1195-1204 (1992).
 Miller, M.W., Duhl, D.M.J., Vrieling, H., et al., *Genes Dev.* 7, 454-467 (1993).
 Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T. & Cone, R.D., *Science* 257, 1248-1251 (1992).
 Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., et al., *Cell* 72, 827-834 (1993).
 Hughes, D.C., *Audiol. Neurootol.* 2, 3-11 (1997).
 Steel, K.P. & Brown, S.D.M., *Trends Genet.* 10, 428-435 (1994).
 Steel, K.P., *Annu. Rev. Genet.* 29, 675-701 (1995).
 Steel, K.P. & Hardisty, R., *Neuroscience Short Course Syllabus* 1, 26-38 (1996).
 Torres, M. & Giraldez, F., *Mech. Dev.* 71, 5-21 (1998).
 Hertwig, P., *Z. KonstLehnre* 28, 327-354 (1994).
 Deol, M.S. *JEEM* 12, 475-490 (1964).
 Frohman, M.A., Martin, G.R., Cordes, S.P., Halamek, L.P. & Barsh, G.S., *Development* 117, 925-936 (1993).
 Kalatzis, V. & Petit, C., *Hum. Mol. Genet.* 7, 1589-1597 (1998).
 Petit, C., *Nat. Genet.* 14, 385-391 (1996).
 Probst, F.J., Fridell, R.A., Raphael, Y., et al., *Science* 280, 1447 (1998).
 Wang, A., Liang, Y., Fridell, R.A., et al., *Science* 280, 1447-1451 (1998).
 Hadrys, T., Braun, T., Rinkwitz-Brandt, S., Arnold,

H.-H. & Bober, E., *Development* 125, 33-39 (1998).
 Wang, W., Van de Water, T.R. & Lufkin, T., *Development* 125, 621-634 (1998).
 McKay, I.J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A. & Lewis, J. *Development* 120, 2199-2211 (1994).
 Birren, B. Green, E.D. Klapholz, S. Myers, R.M. & Roskams, J. *Genome Analysis: A laboratory manual. Volume 2: Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 1998).
 Krizman, D.B. (Hrsg. Birren, B., Green, E.D., Klapholz, S., Myers, R.M. & Roskams, J.) *Exon trapping*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1998). 191 p. (2): *Genome analysis: a laboratory manual Volume 2 Detecting genes*.
 Martin, P. & Swanson, G.J., *Dev. Biol.* 159, 549-558 (1993).
 Kiernan, A.E., Nunes, F., Wu, D.K. & Fekete, D.M. *Dev. Biol.* 191, 215-229 (1997).
 Rinkwitz-Brandt, S., Arnold, H.-H. & Bober, E., *Hear. Res.* 99, 129-138 (1996).
 Acampora, D., Mazan, S., Avantaggiato, V., et al., *Nat. Genet.* 14, 218-222 (1996).
 Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., et al., *EMBO J.* 12, 2735-2747 (1993).
 Morsli, H., Choo, D., Ryan, A., Johnson, R. & Wu, D.K., *J. Neurosci.* 18, 3327-3335 (1998).
 Fritsch, B., Farinas, I. & Reichardt, L. F., *J. Neurosci.* 17, 6213-6225 (1997).
 Fritsch, B., Silos-Santiago, I., Bianchi, L.M. & Farinas, I., *Trends Neurosci.* 20, 159-164 (1997).
 Fritsch, B., Silos-Santiago, I., Bianchi, L.M. & Farinas, I., *Seminars in Cell Dev. Biol.* 8, 277-284 (1997).
 Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., De la Pompa, J.L. & Anderson, D.J. *Neuron* 20, 469-482 (1998).
 Rossant, J. & Spencer, A. *Trends Genet.* 14, 358-363 (1998).
 Robertson, E.J. in *Teratocarcinomas and embryonic stem cells* (Hrsg. Robertson, E.J.) 71-112 (Oxford IRL press, Oxford, 1987).
 Morgan, J.I. & Curran, T., *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 421-451 (1991).
 Kaufman, G.D., Anderson, J.H. & Beitz, A.J., *J. Neurosci.* 12, 4489-4500 (1992). Steel, K.P. & Smith, R.J., *Nat. Genet.* 2, 75-79 (1992).

Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, das ein Segment der Region A2 des Mausechromosoms 3 umfasst, wobei das Segment eine Nucleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 4 umfasst.
2. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, das ein Segment der Region B-C des Mausechromosoms 3 umfasst, wobei das Segment eine Nucleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 5 umfasst.
3. Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei das Nucleinsäuremolekül markiert ist.

4. Replizierbarer Vektor, der das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2 umfasst.

5. Vektor gemäß Anspruch 4, wobei der Vektor ein Plasmid, ein Cosmid, ein Lambdaphage, ein YAC, ein BAC oder ein PAC ist.

6. Wirtszelle, die den Vektor gemäß Anspruch 4 umfasst.

7. Wirtszelle gemäß Anspruch 6, wobei die Wirtszelle eine Bakterienzelle oder eine eukaryontische Zelle ist.

8. Verfahren zur Bestimmung einer Innenohr-Funktionsstörung bei einem Patienten, umfassend:

a) In-Kontakt-Bringen einer Nucleinsäureprobe von dem Patienten mit dem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3; und

b) Bestimmen, ob das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3 an die Nucleinsäureprobe von dem Patienten gebunden ist, wobei die Tatsache, dass das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3 gebunden ist, eine Innenohr-Funktionsstörung bei dem Patienten anzeigt.

9. Verfahren zur Bestimmung einer Pigmentierungs-Funktionsstörung bei einem Patienten, umfassend:

a) In-Kontakt-Bringen einer Nucleinsäureprobe von dem Patienten mit dem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3; und

b) Bestimmen, ob das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3 an die Nucleinsäureprobe von dem Patienten gebunden ist, wobei die Tatsache, dass das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3 gebunden ist, eine Pigmentierungs-Funktionsstörung bei dem Patienten anzeigt.

10. Verfahren zur Bestimmung eines Vestibularisausfalls bei einem Patienten, umfassend:

a) In-Kontakt-Bringen einer Nucleinsäureprobe von dem Patienten mit dem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3; und

b) Bestimmen, ob das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3 an die Nucleinsäureprobe von dem Patienten gebunden ist, wobei die Tatsache, dass das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3 gebunden ist, einen Vestibularisausfall bei dem Patienten anzeigt.

11. Verfahren zur Bestimmung einer Zellwachstums-Funktionsstörung, Zellproliferations-Funktionsstörung oder Zelltod-Funktionsstörung bei einem Patienten, umfassend:

a) In-Kontakt-Bringen einer Nucleinsäureprobe von dem Patienten mit dem Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3; und

b) Bestimmen, ob das Nucleinsäuremolekül gemäß

Anspruch 3 an die Nucleinsäureprobe von dem Patienten gebunden ist, wobei die Tatsache, dass das Nucleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3 gebunden ist, eine Zellwachstums-Funktionsstörung, Zellproliferations-Funktionsstörung oder Zelltod-Funktionsstörung bei dem Patienten anzeigt.

Es folgen 26 Blatt Zeichnungen

Figur 1



Figur 3

KM12-Linie (ysb)



Figur 2

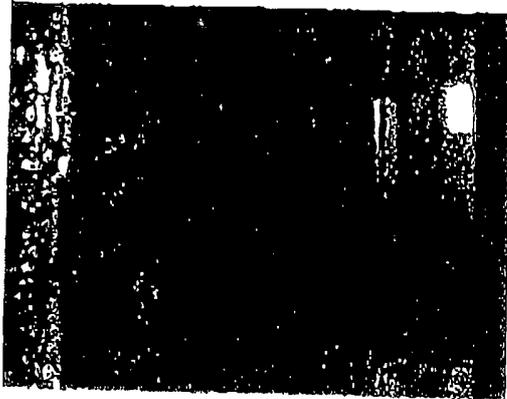
Typische pAA2-Linie



Figur 4



A



B



C



D

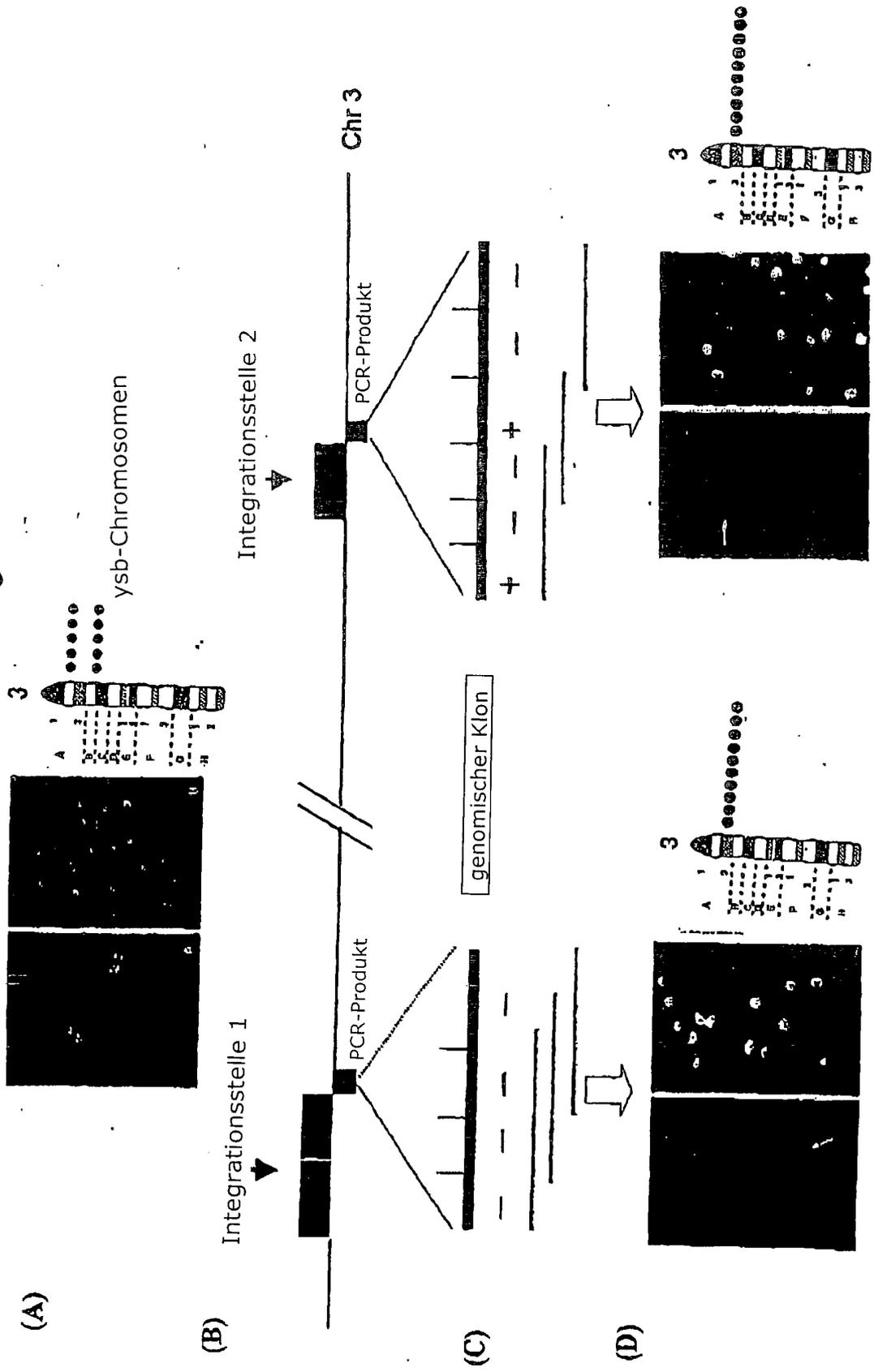


E

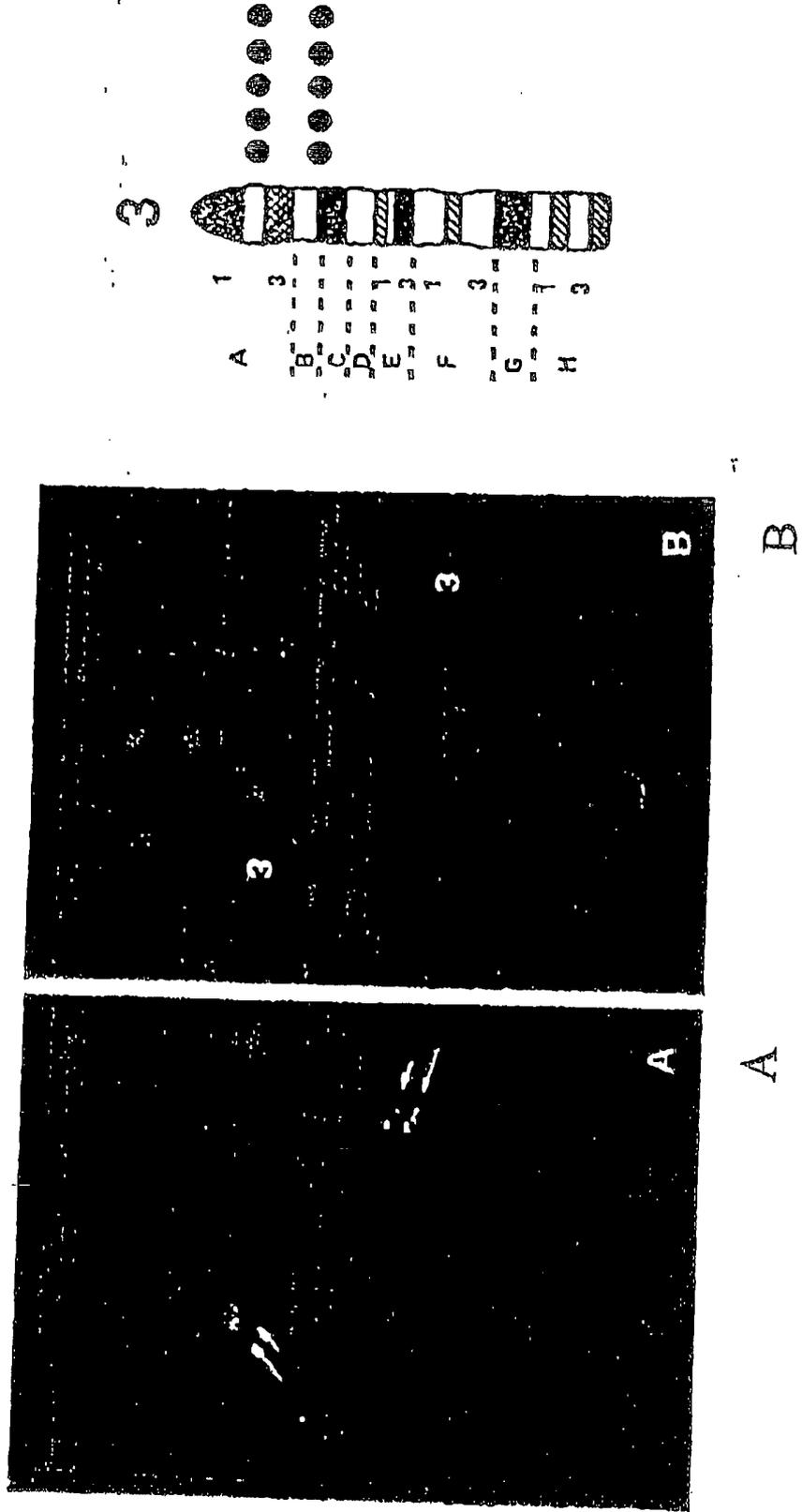
Figur 5



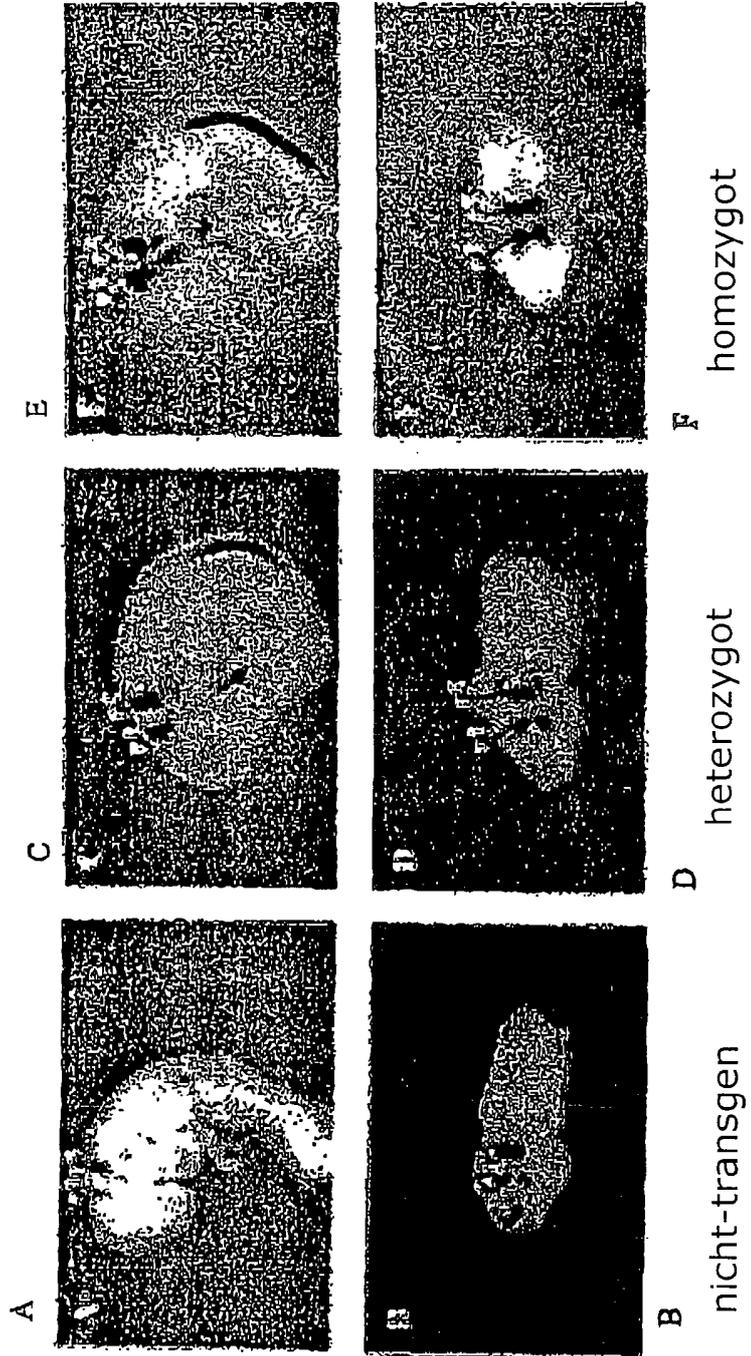
Figur 7



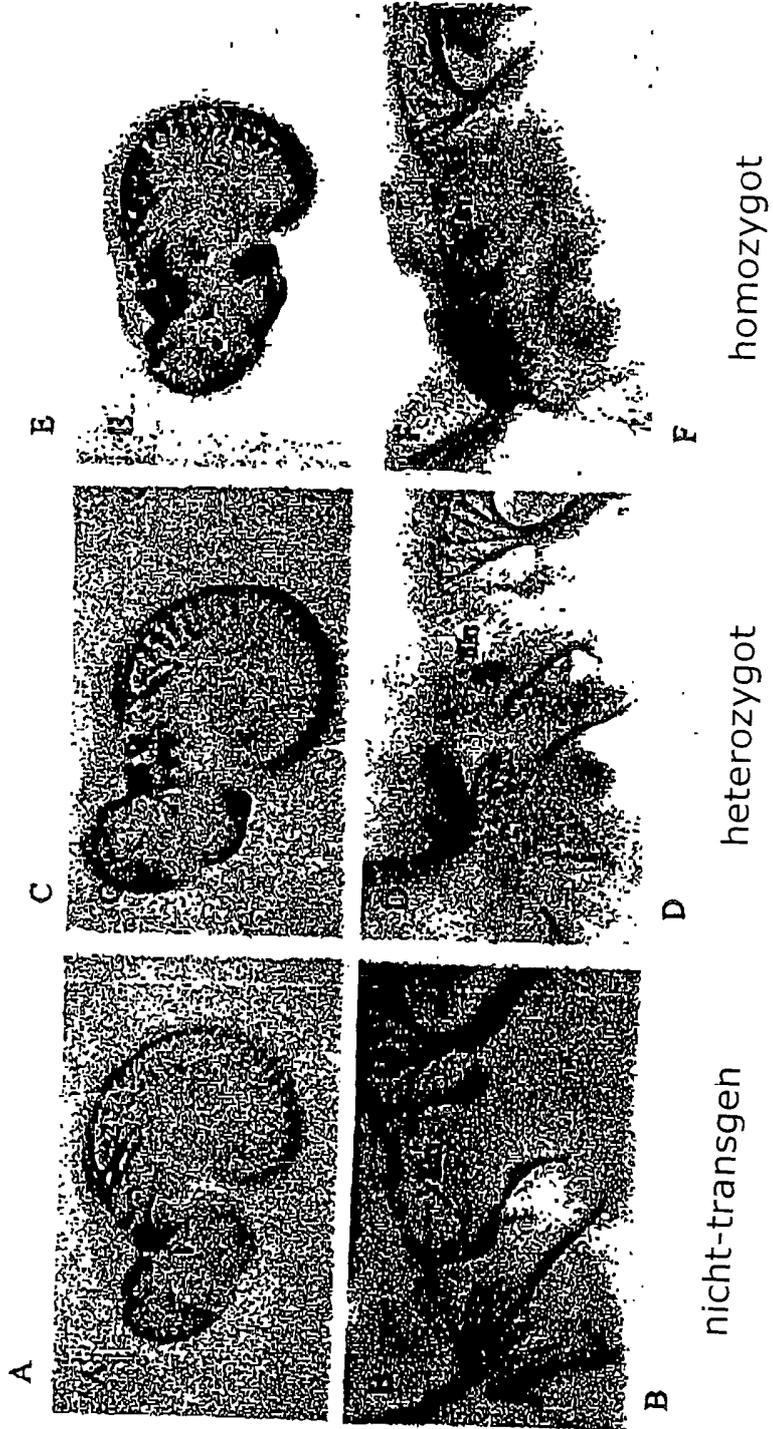
Figur 8



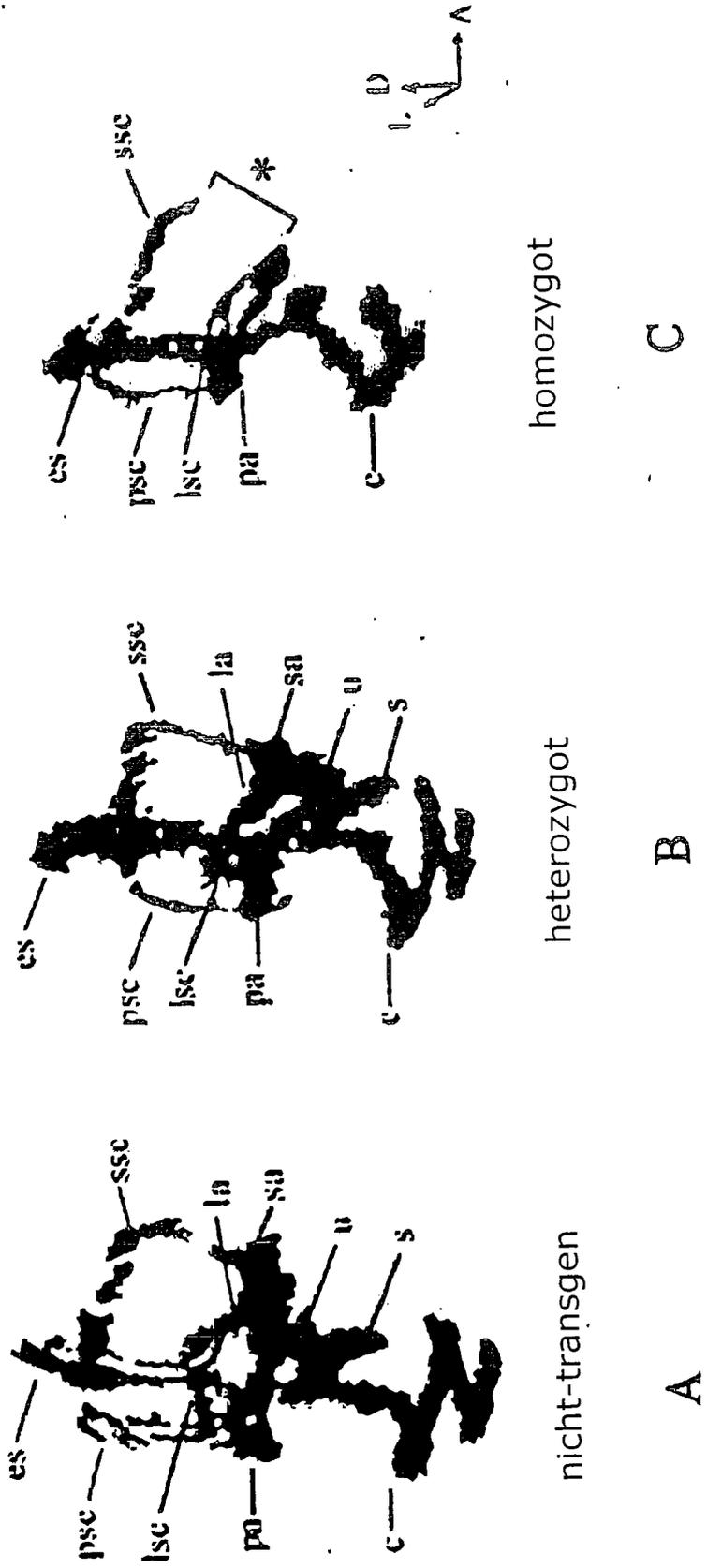
Figur 9



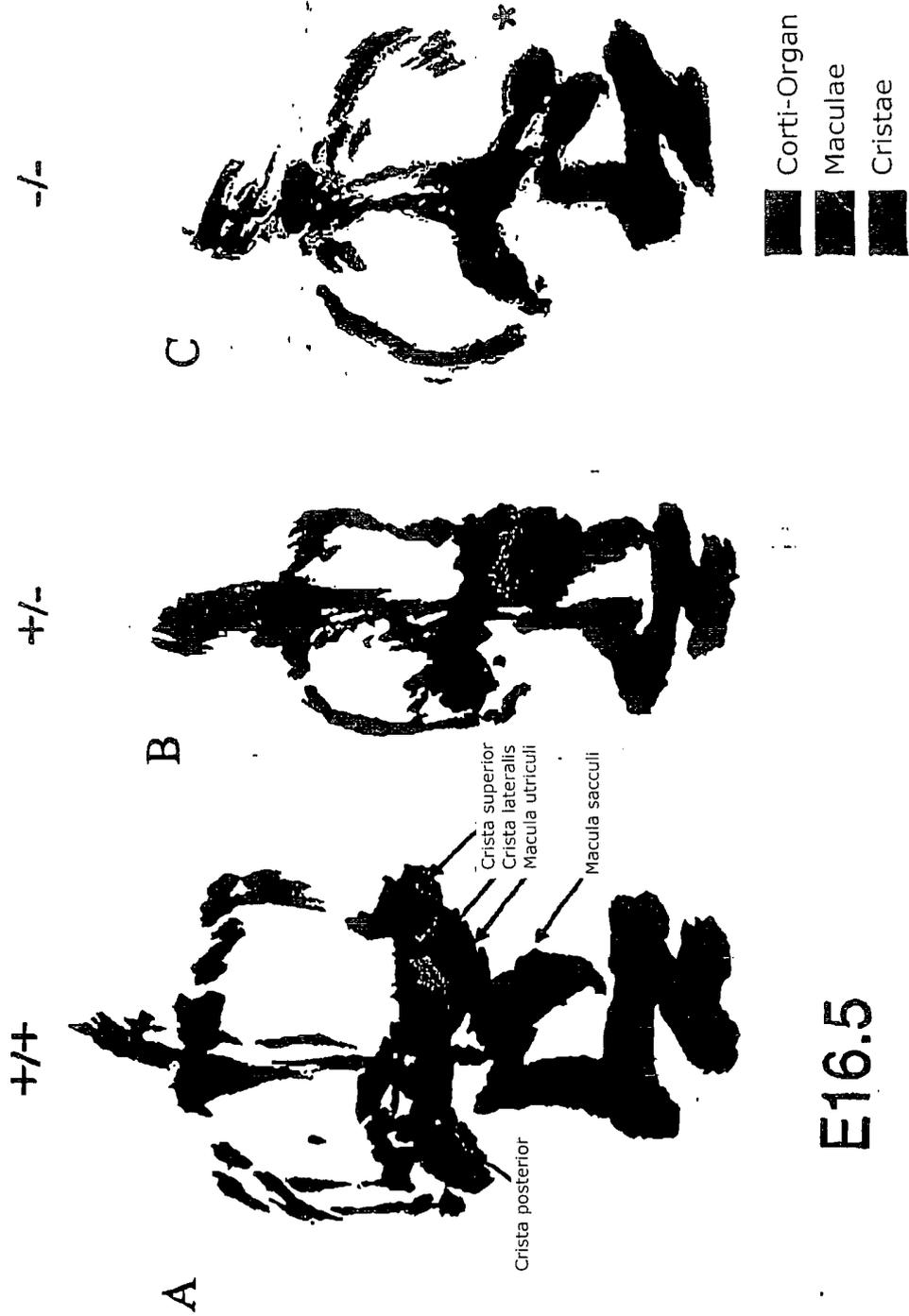
Figur 10



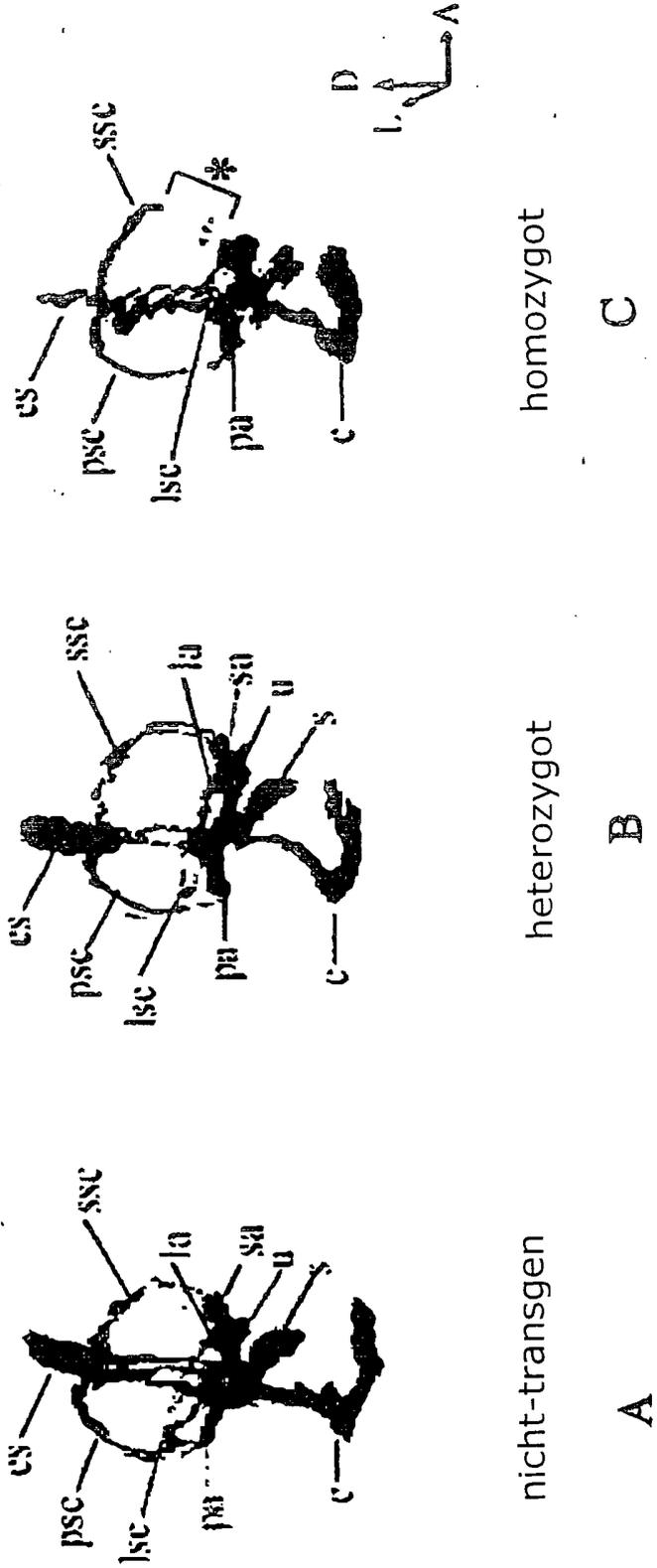
Figur 11



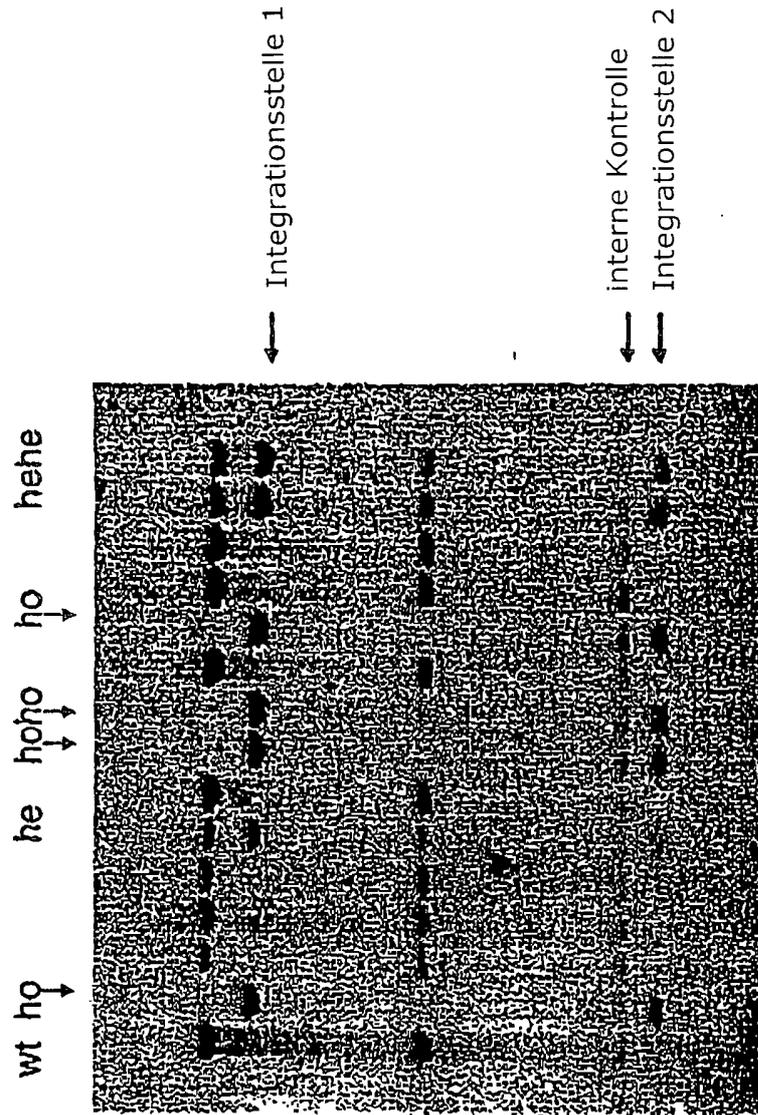
Figur 12



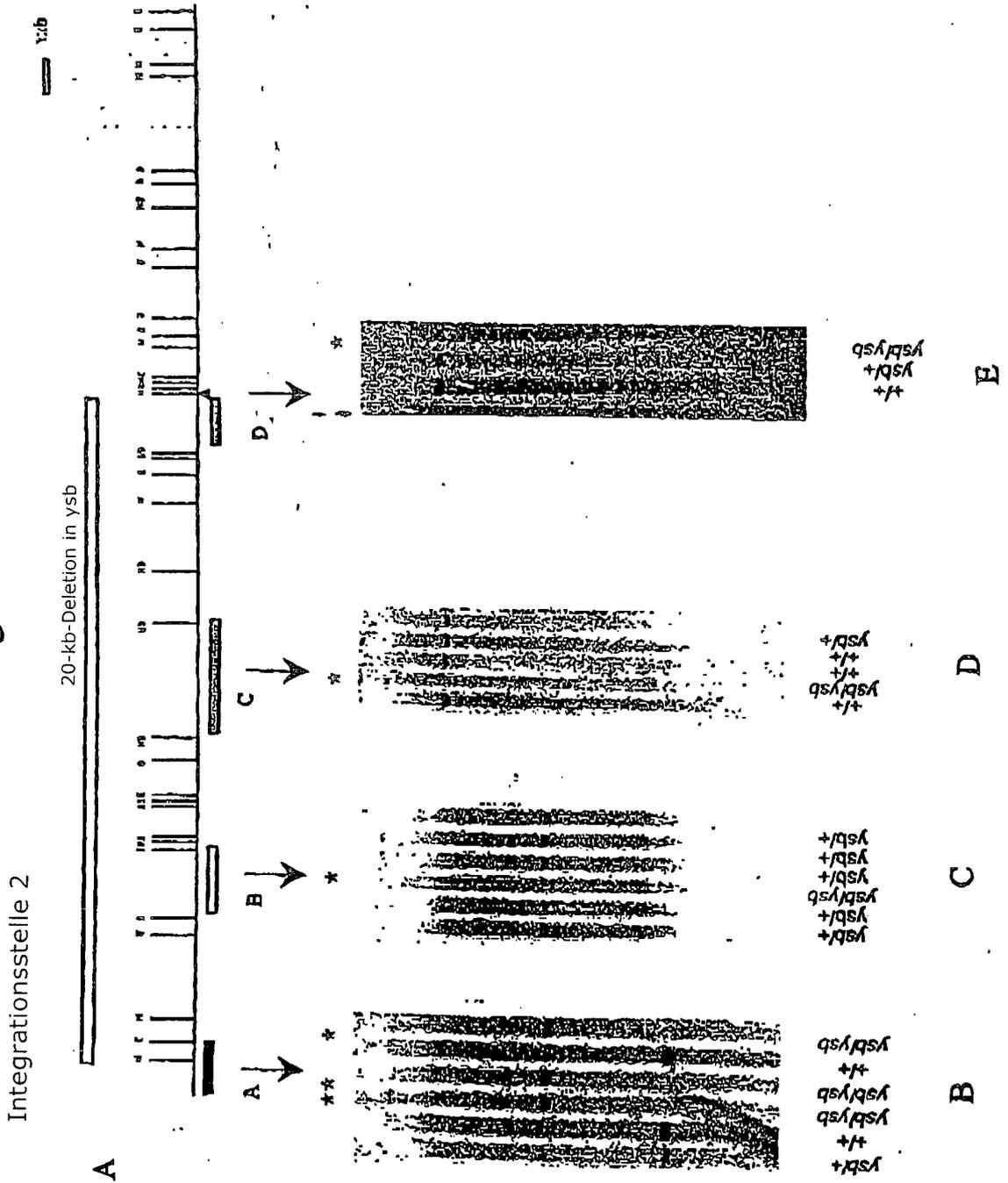
Figur 13



Figur 15



Figur 16



Figur 17-1

Sequenzen von pPL5 (8,1-kb-HindIII-Fragment von 20 kb deletierten Sequenzen in Integrationsstelle 2)

Sequenzbereich: 1 bis 8114

```

>HindIII
|
|      10      20      30      40      50      60
| AAGCTTAAATGAGCCAAGCGCAGAGTGAAGCTGAAGTTGAGAGACACCGGCGCTGTGCC
| TTCGAATTTTACTCGGTTCCGCTCTCACTTCGACTTCAACTCTCTGTGGCCGCGACACGG
|
|      70      80      90      100     110     120
| CAGAACACAGTCCGAACCTTAACATTTGAATGGAGCAACACAAAAGTGGGAACCCAGATG
| GTCTTGTGTCAGGCTTGGAAATGTAACTTACCTCGTTGTGTTTTACCCTTGGGCTCTAC
|                               V G T Q M>
|                               IMAGE 63 >
|
|      130     140     150     160     170     180
| CCCAGACATCTAGCGACACAGTTGGTAAAGCCTTCTTACATAACAATGATAAAAATACTT
| GGGTCTGTAGATCGCTGTGTCAACCATTTCGGAAGAATGTATTGTACTATTTTATGAA
| P R H L A T Q L V K P S Y I T M I K I L>
|                               IMAGE 636095 >
|
|      190     200     210     220     230     240
| AACATTTATTTAACATTTTACACAGGAGTGCATGAGAAGGTTGACAGATGTTATCTGGT
| TTGTAATAAATTGTAAAATGTGTCTCAGTACTCTTCCAAGTGTCTACAATAGACCA
| N I Y L T F L H R S A * E G * Q M L S G>
|                               IMAGE 636095 >
|
|      250     260     270     280     290     300
| GAGATTCCAAAGCCGATGTGAGACCAGTCACCTCTTACAAATTATCTCTCTTCACAAA
| CTCTAAGAGTTTCGGCTACACTCTGGTCAGTGGAGAAATGTTTAAATAGAGAGAGTGT
| E I L K A D V R P V T S L Q I I S L H K>
|                               IMAGE 636095 >
|
|      310     320     330     340     350     360
| CATCTACATGGGCTTTCAGGCTGAGCAGTCTGCCCAAAGGAACCATTAAATAGTTTTC
| GTAGATGTACCCGAAACGTCCGACTCGTCAGACGGGTTTCCCTTGGTAAATTTATCAAAG
| H L H G L C R L S S L P K G T I * I V F>
|                               IMAGE 636095 >
|
|      370     380     390     400     410     420
| TCATGCCAAAGTAAAAGTTAAAAGACAACCTTTTTTTTAAAAAAGTGAAGT
| AGTACGGTTTCATTTTCAATTTTCTGTTGAAAAAATTTTTTTTTTTTTTCACTTCA
| S C Q S K S * K D N F X>
|                               IMAGE 636095 >
|
|      430     440     450     460     470     480
| AAATGACTTAAGGTTTAGTTTACTTCTGTTAGGAGAGATTCAACCGGTTGGGAAAGGGGT
| TTTACTGAATTCCAAATCAAATGAAGACAATCCTCTCTAAGTTGGCCAACCCCTTCCCCA
|
|      490     500     510     520     530     540
| GTGCGCTTGTGTGTGAGACCAGTGAAGCGAAATGCTGGATACGATTGTTCCCTCAGTAAA
| CACCGAACACACACTCTGGTCACTCTCGCTTACGACCTATGCTAACAAGGAGTCATTT
|
|      550     560     570     580     590     600
| AGAGAGGAACTGGAAATGACTAATATTCCATAGAATGATAAGCTCCCAACTTTTAGCATT
| TCTCTCCTTGACCTTACTGATTATAAGGTATCTTACTATTCGAGGGTTGAAAATCGTAA
|
|      610     620     630     640     650     660
| CTTCTCTATTTGTCTATTATGTTTCTCTACAAGACAAAAAATAATTTTCAACTTACAAG

```

17-2

GAAGAGATAAACAGATAATACAAAGAGATGTTCTGTTTTTTTATTAAAAGTTGAATGTTT
 670 680 690 700 710 720
 TCTTATTGTTTACACTTAATTTTCAAGACTTGTACCTAGCTGATGAAACAGATGTTCCCC
 AGAATAACAAATGTGAATTAAGTTCTGAACATGGATCGACTACTTTGTCTACAGGGG
 730 740 750 760 770 780
 AACACCAGATGATCTCAGGTGGACTTACTGGACAGTGTGTGGAGATCTGTGTCCCTTCT
 TTGTTGGTCTACTAGAGTCCACCTGAATGACCTGTCACACACCTCTAGACACAGGGAAG
 790 800 810 820 830 840
 AAGGTATCCGTTGGCACCATTGCCGTGGAGGCTAAGAGATGACACATAGACAGACGCAG
 TTCCAGTAGGCAACCCTGGTAAACGGCACCTCCGATTCTACTGTGTATCTGTCTGCGTC
 850 860 870 880 890 900
 AATCTCATGAGTCAGACTGGTGCCTTGCCCTCCTCAATTTTTGTTTTTATTTTTTGAG
 TTAGTACTCAGTCTGACCACGGGAACGGAGGAGTAAAAACAAAAGTAAAAAACTC
 910 920 930 940 950 960
 AAGAGATCTCATACTCCAGGCTGGCCTTGAACCTACTTTGTAGCTGAGGCTGGCTTTAT
 TTCTCTAGAGTATGAGGGTCCGACCGGAACCTTGAGTGAACATCGACTCCGACCCGAAATA
 970 980 990 1000 1010 1020
 ACTGATGATCCTCCTGCCTCCACCCCTCACATGCTGGGATCCGGCAGTGTGTACCTG
 TGACTACTAGGAGGACGGAGGTGGGGGAGTGTACGACCTAAGGCCGTACACAGTGGAC
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CCCAGGGGATAGTTCCCTCTTAGAAGAAGCACCAGGGAGTTAGTTTCTCCTTTATCCTAT
 GGGTCCCTATCAAGGGAGAATCTTCTTCGTGGTCCCTCAATCAAAGAGGAAATAGGATA
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GTGAGGGTTTGCTGAGGCTGTCTTCTATGAATCATAAAGTAGGCCAGATGCTGAAACTGC
 CACTCCCAAACGACTCCGACAGAAGATACTTAGTATTTTCATCCGGTCTACGACTTTGACC
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CACTGCCCTGTCCACGTTTGGAACTAGAGAAACTATTTTCTGGGGTTGTATGCTACC
 GTGACGGGGACAGGTGCAAACCTTGATCTTCTTTGATAAAGACCCCAAACATACGATGG
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CAGCCTGTGGTGTGTTTGTGTAGCAACTTGGATGGCTAAGACAATGGATTGAGCTGCCT
 GTCGGACACCACAAAACAACATCGTTGAACCTACCGATTTCTGTTACCTAACTCGACCGA
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TCTGTTCTACAACCTGCACTGACCACATGTGACCATTAGCACTTGACACTTGACTATAGT
 AGACAAGATGTTGACGTGACTGGTGTACACTGGTAAATCGTGAACCTGTGAACCTGATATCA
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 GGACTGAGGGAATGATTCTTGCTTTTCTTTCTTTCTTTCTCGGTTTTTTTTTTTTTTTT
 CCTGACTCCCTTACTAAGAACGAAAAGAAAAGAAAAGAAAGCCAAAAA
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TTTGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTGTCCTGGATCTCACTCTGTAGAGTAT
 AAAGCTCTGTCCCAAAGAGACACATCGGGACCGACAGGACCTAGAGTGAGACATCTCATA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GCTGGCCAATTCTAATTAGATTAGTGTCTTATGACTAGTAACCTACTACAGTAGCAAATCT
 CGACCGGTTAAGATTAATCTAATCACAGAATACTGATCATTGATGATGTATCGTTTAGA
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 TGGTTGTCAACTGACTACATCTGGAATCAACTAAAACCAAGATAATAGGTGTACACA
 ACCAACAGTTGAACTGATGTAGACCTTAGTTGATTTGGGTTCTATTATCCACAGTGTGT

17-3

1570 1580 1590 1600 1610 1620
CACAGACACACACACACAGATAGAGACATATGTTTAAACACATAGTTAAAAATAAAC
GTGCTGTGTGTGTGTGTGTCTATCTCTGTATACAAATTGTGTATCAATTTTATTG

1630 1640 1650 1660 1670 1680
TCCTTAAAAGAACATGTATCACGGGGCAAGTTAAATCATAATTCTGAATACTGTACTTCT
AGAAATTTTCTGTACATAGTGCCCCGTCAATTTAGTATTAAGACTTATGACATGAAGA

1690 1700 1710 1720 1730 1740
CTGTAAATTAGAGATGGCACTGTTTCCACTGGGAGAAGATATTAAGAGTTTGTAGTG
GACATTTAATCTCTACCGTGACAAGTAGGTGACCCCTCTCTATAATTCTCAAACGATCAC

1750 1760 1770 1780 1790 1800
GGGCTGGAGAGATGGCTCAGCGGTTAAGAGCACCGACTGCTCTTCTTAGGTCCTGAGTT
CCCACCTCTCTACCGAGTCGCCAATTCTCGTGGCTGACGAGAAGGAATCCAGACTCAA
A G E M A Q R L R A P T A L P * V L S>
IMAGE 1196866 >

1810 1820 1830 1840 1850 1860
CAATCCCAGCAACCACATGTAGCTCACAACCATCCGTAATGAGATCCGACAACCTTCTTC
GTTTAGGGTCGTTGGTGTACATCGAGTGTGGTAGGCATTACTCTAGGCTGTGAAGAAG
S N P S N H M * L T T I R N E I R Q L L>
IMAGE 1196866 >

1870 1880 1890 1900 1910 1920
TGGTGTGTCTGAAGTCAGCTACAGTGTACTTAGATATAATAATAAATAAATCTAAAAAT
ACCACACAGACTTCAGTCGATGTCACATGAATCTATATTATTATTATTATTATTATTTTA
L V C L K S A T V Y L D I I I X>
IMAGE 1196866 >

1930 1940 1950 1960 1970 1980
AAAAACATTTGCTAATGCCAAAACAGACATATCAAGAGTACAAAATAAAAACCTTCCAAAC
TTTTTGTAAACGATTACGGTTTTGTCTGTATAGTTCTCATGTTTTATTTTTGAAGGTTG

1990 2000 2010 2020 2030 2040
TAAAAAGATGCCACCAGAAATAGAGTATCTGGGTTGTCATGTGGCATAGTAGCACACCTG
ATTTTTCTACGGTGGTCTTTATCTCATAGACCCAACAGTACACCGTATCATCGTGTGGAC

2050 2060 2070 2080 2090 2100
CCAAACCTGGCAGGTATGAGGCCCTGCATCCCCACATGAGAACTAAAATTTTCCAATAT
GGTTTGGACCGTCCATACTCCGGGACGTAGGGGGTGTACTCTTGATTTTAAAGGTTATA

2110 2120 2130 2140 2150 2160
GAGATGAAACATATTTAAACAAGATGAAACTCACCAAAACATGAAGGAGTTTCTCCTCAA
CTCTACTTTGTATAATTTTGTCTACTTTGAGTGGTTTGTACTTCTCAAGAGGAGTT

2170 2180 2190 2200 2210 2220
CTTTAAGGATTTGGTAATTGATCTCCACATAAAAATATGTTTGTGGGCTAGCAAGATGG
GAAATTCCTAAACCATTAACTAGAGGGGTGATTTTTATACAAACACCCGATCGTTCTACC

>EcoRI

2230 2240 2250 2260 2270 2280
CTCAGAGCAAAGCACTTGTCTATGCAGGCCCGACGACCTGAATTCAGTGCCAAGAGCATG
GAGTCTCGTTTTCGTGAACAGTACGTCCGGGCTGCTGGACTTAAGTCACGGTTCTCGTAC

2290 2300 2310 2320 2330 2340
CAACGGAAGGCGAAGGCTGCAAATCATTCTCTGACCTCTACATATGCATCATGGCATGGG
GTTGCCTTCCGCTTCCGACGTTTAGTAAGAGACTGGAGATGTATACGTAGTACCGTACCC

17-4

2350 2360 2370 2380 2390 2400
 TACCTACGGTCATAAAAATGTCATAAGCTCATCTACAATAATAAATTATATATGCACATG
 ATGGATGCCAGTATTTTTACAGTATTCGAGTAGATGTTATTATTTAATATATACGTGTAC

2410 2420 2430 2440 2450 2460
 CACACACACATATACACTTGTCAAATCTATAATGTTGGAAACCTTTGCCGTGTCATATAGC
 GTGTGTGTATATGTGAACAGTTTAGATATTACAACCTTTGGAAACGCACAGTATATCG

2470 2480 2490 2500 2510 2520
 TGATCTGTCTAGGTAGAAATATATCAATTAACAATGCTGATTGAAAACCTCAAATATTA
 ACTAGACAGATCCATCTTTATATAGTTAATTGTTACGACTAACTTTTTGGAGTTTATAAT

2530 2540 2550 2560 2570 2580
 TTTTTGAATGCTTATTTGAGTCATTTCCAAGGGATGTGAGCCCGCCATATCTGTGGTT
 AAAAACTTACGAATAAACTCAGTAAAAGGTTCCCTACACTCGGGCGGTATAGACACCAA

2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TGCCCATCCATGAATTTGGTTAATCACATATGCATCAAAATAAGCCCTTCAAGAGAGCTA
 ACGGGTAGGTACTTAAACCAATTAGTGTATACGTAGTTTTATTTCGGGAAGTCTCTCGAT

2650 2660 2670 2680 2690 2700
 TTTTCTTCAGGGCTGTAGCTTCTGGTAAGTCATCCACACCCCTATGCATGCTCCTGTAAG
 AAAAGAAGTCCCGACATCGAAGACCATTCACTAGGTGTGGGGATACGTACGAGGACATTC

2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GACCCCAATTAAACTCAGTAGGCCACTGTCCTAGTTTGCTTTCTTCTACTGTGATAAAAC
 CTGGGGTTAATTTGAGTCATCCGGTGACAGGATCAAACGAAAGAAGATGACACTATTTG

2770 2780 2790 2800 2810 2820
 ACTGAGCTAAGCAGCTTGAGGGACAAGGGGTTACTATAGCTTACTGGTTACAGTCCATCA
 TGACTCGATTCTCGAACTCCCTGTTCGCCAATGATATCGAATGCCAATGTCAGGTAGT

>SacI | >SacI |
 2830 | 2840 | 2850 2860 2870 2880
 CTGAATGAGCTCAGGACAAGAGCTCAAGGCAGGAATCTGAAGCAGAGACCATGGAGGAAC
 GACTTACTCGAGTCTGTTCTCGAGTTCCTGCTTAGACTTCGTCTCTGGTACCTCCTTG

2890 2900 2910 2920 2930 2940
 ACTGCTGACTGGCTCACTCCCACATGAGGCATTAATCATGCAAATGCTTCAAGAGACATGT
 TGACGACTGACCGAGTGAGGGTGTACTCCGTAATTAGTACGTTTACGAAGTCTCTGTACA

2950 2960 2970 2980 2990 3000
 ACACAGGTCAGTCTTATTGAGGCAGTTTCTCAACTGAAGCACCCCTCTTCTCGGTGACTC
 TGTGTCCAGTCAGAATAACTCCGTCAAAGAGTTGACTTCGTGGGAGAAAGGACCACCTGAG

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 TAGAGTCACGCTGACTAAAATAACTAAGTGCTACTGATCTCTCCTCAAGTTCATGCACA
 ATCTCAGTCCGACTGATTTTGATTGATTCAGGATGACTAGAGAGGAGTTCAGTACGTTG

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 AACACATCACTAATGGACCATAGTCAATTTTCTTGTTTATAACAAAGCCCTCACAAATATA
 TTGTGTAGTGATTACCTGGTATCAGTAAAAGAACAATATGGTTTCCGGAGTGTATAT

3130 3140 3150 3160 3170 3180
 AAACATGGTGTAGCCCTTCAATTTCCACAGTCCTTAAAAATTTCAACATATAGAGACAC
 TTTGTACCACATCGGAAAGTTAAAGGTGTCAGGAATTTTTAAAGTTGTATATCTTCTGTG

3190 3200 3210 3220 3230 3240
 AGGTCTTCTTCAAAGTCCAAAGCCCTTAACTGTGGGCTTTTTGCAAATAAAAACAAGT
 TCCAGAAGAAGTTTCAGGTTTCGGGGAATTGACACCCGAAAAACGTTTTATTTTGTTC

17-5

3250 3260 3270 3280 3290 3300
 AACATTATTTCTGATCTTAGAGGGAAGAACCAGGGCACAGTTACAATAAGAACAAGCA
 TTGTAATAAAGGACTAGAACTCCCTTCTGGTCCCCTGTCAATGTTATTCTTGTTCGT

3310 3320 3330 3340 3350 3360
 AAACCAACATCCAGATGTGTAATCAAATCCTATAGCTCAATGTCCAGCATCCGGGGCTT
 TTTGGTTGTAGGTCTACACATTTAGTTTAGGATATCGAGTTACAGGTCGTAGGCCCCGAA

3370 3380 3390 3400 3410 3420
 ATGGTCTCCAGACTCCAAAGGTCTTGGGCAGCTCCACTCTGCCTCTAGCTCCAGTACAT
 TACCAGAGGCTGTGAGGTTCCAGAACCCGTGAGGTGAGACGGAGATCGAGGTCATGTA

3430 3440 3450 3460 3470 3480
 AGGCTCAGGCTGGCTCCAATCCACAGCATCCCCTGTCTGGCTCCTAACATGTTGCA
 TCCGAGTCCGACCGAGGTTAGGTGTCGTAGGGTGACAGGACCGAGGAGATTGTACAACGT

3490 3500 3510 3520 3530 3540
 ATATCTGCTGCAACTGAAGCTGCACCTTCACCAATGAACGACCTCTCCAGACTTCTCACA
 TATAGACGACGTTGACTTCGACGTGGAAGTGGTTACTTGTCTGGAGAGGCTGAAGAGTGT

3550 3560 3570 3580 3590 3600
 GTGACAACTCTACTTCTATGTGACTTCTCAATCCTGGGGTCTCCACTGCAACTGA
 CACTGTTAGGAGATGAAGAGATACACTGAAGGAGTTAGGACCCAGAGGTGACGTTGACT

3610 3620 3630 3640 3650 3660
 GGCTGTACCTTCATCAATAACCTGTCTTAGGCTCTTTCAGAGACTCTGTGGCCTTGAT
 CCGACATGGAAAGTAGTTATTGGACAGAGATCCGAGAGAAAGTCTCTGAGACACCGGAATA

3670 3680 3690 3700 3710 3720
 TTATGGTACCAAGCCTTAACCTGTTCTCAATGGTCCCTTTCAGAGCAGTACCACCAATGA
 AATACATGGTTCCGAAATGACAAGAGTTACCAGGGAAAGTCTGGTCAATGGTGGTTACT

3730 3740 3750 3760 3770 3780
 GACTGTGCTTGGTAGGAGCTAATTATCTGTGGATGGTTTCCCAAGCCCTTTGGAAGAGC
 CTGACACGAACCATCCTCGATTAATAAGACACCTACCAAGGGTTCCGGAAACCTTCTCG

3790 3800 3810 3820 3830 3840
 CCAGAAGACCATGAGTGACTTCCAGAAGTTAGACACTAAGATTCACTGTTGAACCTTTGGT
 GGTCTTCTGGTACTCACTGAAGGTCTCAATCTGTGATTCTAAGTGACAACCTTGAARCCA

3850 3860 3870 3880 3890 3900
 TTCACTCTGATTTAATTGTGACTGTGCCCTTTIGGAGTTCTTCCCTCTTGGAGTAAGAAA
 AAGTGAGACTAAATTAACACTGACACGGGAAACCTCAAGAAGGGAGAACCTCATTCTTT

3910 3920 3930 3940 3950 3960
 ATATTTAACTTATTTTACTTTGCAAGAGCCACAGCTGTGAGAGTTTGGAGTTTGGGAG
 TATAAATTGAATAAAACTGAAACGTTCTCGGGTGTGACACTCTCAAACCTCAAACCTCT

3970 3980 3990 4000 4010 4020
 ATATTTTGGAGTGTTAGAGAGATCAGGGATATTTAGAGAGGCATGAACCTTTGAAAGAGA
 TATAAAACCTCACAACTCTCTAGTCCCTATAAAATCTCTCCGTACTTGAACCTTTCTCT

4030 4040 4050 4060 4070 4080
 CTTTGGATGTTCTAAAGGGATTTAACTTTTAAAGTGCTGGGATTTGTAAGACTTTTTAA
 GAAACCTACAAGATTTCCCTAAATTTGAAAATTTACAGGCCCTAAACATTTCTGAAAATTT

4090 4100 4110 4120 4130 4140
 AGTTGGAATGTTTTATATTGTGATATGAATATTGATATGTAATCTTGGCAGTGAACAAGA
 TCAACCTTACAAAATATAACACTATACTTATAACTATACATTAGAACCGTCACTTGTCTCT

17-6

4150 4160 4170 4180 4190 4200
 AAGGGAAGGTTATATTTTAACTGTAATGTGTTGTGTGTACATTAACAAGCAGTCATAT
 TTCCCTTCCAATATAAAATTGACATTACACAAACACCAATGTAATTGTTCCGTCAGTATA
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 TTTTATGGTTTTATGGAAAGTTTTTCATAAGCTCCTCAAGGCCTTGGAAATCCAAAATCCA
 AAAATAACAAAATACCTTTCAAAGTATTGAGGAGTTCGGAACCTTTAGGTTTTAGGT
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 TTCTTGTGGAAAGAGGGAACCTCAAATGAGAAAATGCCCTTACTAAGATTGGCCAGGAG
 AAGGAACACCTTCTCCCTTGGAGTTACTCTTTTACGGGAATGATTCTAACGGGTCTC
 4330 4340 4350 4360 4370 4380
 AAAGCCTGCAGTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTAAATTGAGGCAGATGTGGGAGGTTT
 TTTCCGACGTCAACAAAACAAAACAAAACAAAATTTAACTCCGTCTACACCTCCAAA
 4390 4400 4410 4420 4430 4440
 CTAGCCCACTGTAGGCAGTGTGACACCTGGGCTGGTGGTCTCTGTCCAACAGAAAGCA
 GATCGGGTGACATCCGTCACTGTGGACCCGACCACCAGGAGACACGGTTGTCTTCCGT
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 GGCTACTAGCTAGGCTAGCCATGAGAAGCAAGCCAGTAAGCATCAGGTTCCCTCTGTCTT
 CCGATGATCGATCCGATCGGTACTCTTCGTTCCGTCATTTCGTAGTCCAAGGAGGACAGAA
 4510 4520 4530 4540 4550 4560
 GCTCCAGCTTCCCTCATTGATGGATTTAATCAGCTGTAAGGTGAAATGAATTGGTTACTT
 CGAGGTGGAAGGGAGTAACTACCTAAATTAGTCGACATTCACCTTTACTTAACCAATGAA
 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 TTATCACAGCAAAGAAATTCTTTTTAAATTTTATTAGGTATTTCCCTCATTTACA
 AATAGTGTGTTTTCTTTAAGAAAAAATTTTAAAAATAATCCATAAAGGAGTAAATGT
 4630 4640 4650 4660 4670 4680
 TTCCAATGCTATCCCAAAGTCCCCATACCTCCCCCCCCACTCCCCTACTCACCCA
 AAAGGTTACGATAGGTTTTTCAGGGGGTATGGGAGGGGGGGGTGAGGGGATGAGTGGGT
 4690 4700 4710 4720 4730 4740
 CTCCCATTCTTGGCCCTGGCGTCCCTGTACTGAGGCACATAAAGTTTCCAAGACCAA
 GAGGGTGAAGAACCGGGACCGCAAGGGGACATGACTCCGTGATTTCAAACGTTCTGGTT
 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 TGGGCCTCTCTTCCACTGATGGCCGACTAGGCCATCTTTGATACATACCGAGCTCATA
 ACCCGGAGAGAAAGGTGACTACCGGTGATCCGGTAGAAAATATGTATCCGTCGAGTAT
 >SacI
 |
 4810 | 4820 4830 4840 4850 4860
 TAGTCAAGAGCTCCGGGTATTGGTTAGTTTATAAATGTGTTCCACCTATAGGGTTGCAG
 ATCAGTTCTCGAGGCCCCATAACCAATCAAGTATTACAACAGGTGGATATCCCAACGTC
 4870 4880 4890 4900 4910 4920
 ATCCCTTTAGCACCTTGGATACTTTCTCTAGCTCCTCCATTGGGGGCCCTGTGATCCATC
 TAGGGAAATCGTGGAACCTATGAAAGAGATCGAGGAGGTAAACCCCGGGACACTAGGTAG
 4930 4940 4950 4960 4970 4980
 CAATAGCTGACAATGAGCATCCACTTCTGTTTTGCTAGGCCCGCCTAGTCTCACAAAG
 GTTATCGACTGTTACTGTTAGGTGAAGACAAAACGATCCGGGCGGATCAGAGTGTTC
 4990 5000 5010 5020 5030 5040
 AGACAGCTACATCTGGGTCCTTTCAGCAAATCTTGCTAGTGTATGCAACGGTGTCTGCG
 TCTGTGATGTAGACCCAGGAAAGTCTTTTGAACGATCACATACGTTGCCACAGACGC

17-7

>BamHI

```

      5050      5060      5070      5080      5090      5100
TTTGGCGGCTGATTATGGCATGGATCCCCGGATATGGTAGTCTCTAGATGGTCCATCCTT
AAACCGCCGACTAATACCGTACCTAGGGCCCTATACCATCAGAGATCTACCAGGTAGGAA

      5110      5120      5130      5140      5150      5160
TCGTCTCAGCTCCAAACTTTGTCTCTGTAACCTCCATGGGTGTTTGTCCCAATTC
AGCAGAGTCGAGGTTTGAACACAGAGACATTGAGGAAGGTACCCACAAAACAAGGGTTAAG

      5170      5180      5190      5200      5210      5220
TAAGAAGGGGCAAAGTGTCCACACTTTGGTCTTCGTTCTTCTTGAGTTTCACTAACTAAG
ATTCTTCCCCTTTTACAGGTGTGAACACAGAGCAAGAAGAACTCAAAGTGATTGATTC

      5230      5240      5250      5260      5270      5280
ACAGAGACTCTTAAATATTATCAAATTCAGCTGCCAGCCTTATGTGGTCTTGACACCCCT
TGTCTCTGAGAATTTATAATAGTTAAGTCGACGGTCGGAATACACCAGAACTGTGGGGA

```

>SacI

```

      5290      5300      5310      5320      5330      5340
GGACTACAACCTTCTGTGTGGGAGCTCTGAGGAGACACTTCGCAGAAGATTTTGCCTGTTA
CCTGATGTTGAAGACACACCCTCGAGACTCCTCTGTGAAGCGTCTTCTAAAACGGACAT

      5350      5360      5370      5380      5390      5400
GGCAGGTCTCGTCTCAATCACACTGAGTTTGCAGCTCCAGTTGAGCACCGTTCAATTGGC
CCGTCAGAGCAGAGTTAGTGTGACTCAAACGTCGAGGTCAACTCGTGGCAAGTTAACCG

      5410      5420      5430      5440      5450      5460
CTAGTAAAGCACAGGTTTCACTTAGGCGATGCTGGAGTCTTAGCAGAAGCCTTACACTGA
GATCATTTCTGTGCCAAAGTGAATCCGCTACGACCTCAGAATCGTCTTCGGAATGTGACT

      5470      5480      5490      5500      5510      5520
ACTTCAGGAGCCAAAGCCTGAGTTGTGGCATTGCTTCCAACACCACCATCCAAGCCCCCT
TGAAGTGCTCGGTTCCGACTCAACAGCCGTAACGAAGGTTGTGGTGGTAGGTTCCGGGGA

```

>SacI

```

      5530      5540      5550      5560      5570      5580
ACACTAGTATATCTTCAAGTTCTAAGCCCTCAGAGCTCAAAGCTCCAAATGCTTCCGCAA
TGTGATCATATAGAAGTTCAAGATTCGGGAGTCTCGAGTTTTCGAGTTTACGAAGGCGTT

      5590      5600      5610      5620      5630      5640
CCACACTTCCAAACCCCAACAAACACACCTGTGTCCATAGTAGCAACAACACACTCTCTG
GGTGTGAAGGTTGGGGTTTGTGTGTGGACACAGGTATCATCGTTGTTGTGTGAGAGAC

      5650      5660      5670      5680      5690      5700
GTACCAATTTCTGTTTCGATAGATGATGGACAGGCAGACAGACAAGAAAGTAGAAAGGGA
CATGGTTAAAGACAAAGCTATCTACTACCTGTCCGTCTGTCTGTTCTTTTCATCTTCCCT

      5710      5720      5730      5740      5750      5760
ACCAGCAGGAAAGAAGAAGAGAGTCCACAAGAGTGGAGGGGACAAGAAAGAGTAATGGGG
TGGTCGTCTTTCTTCTCTCAGGTGTTCTCACCTCCCTGTTCTTTCTCATTACCCC

      5770      5780      5790      5800      5810      5820
GTGAGTATGATCAAATGAACATATATGAAATATCATTATGAAATGTATATAATTAATAT
CACTCATACTAGTTTACTTGTATATACTTTATAGTAATACTTTACATATATTAATTATA

      5830      5840      5850      5860      5870      5880
ATACTAACAGAAACCTTTTTTAAAATTTTCAAAAATCATGCGTGCACCTGAACATGGGCA

```

17-8

TATGATTGTTCTTTGGAAAAATTTTAAAAGTTTTTAGTACGCACGTGACTTGTACCCGT

5890 5900 5910 5920 5930 5940
 GCTTTTCTTGTCCGTACCCCTAAGCAGCACATTACACTATTTACATAACATTTAAATA
 CGAAAAGAACAGCCATGGGGGATTTCGTCTGTAATTGTGATAAATGTATTGTAATTTAT

5950 5960 5970 5980 5990 6000
 TGTTAAGCATTTTAACTAAGTAGAGATGGTTTGAGTGAGTATAGGGAGATGTGTGCACAT
 ACAATTCGTAATAATTGATTGATCTCTACCAACTCACTCATATCCCTCTACACACGTGTA

6010 6020 6030 6040 6050 6060
 CATGAGCAAATGCTGCCGTTTTCCACTGGGGCCCGAGGACTTGTTTTGCCAACCTCCCTG
 TACTCTGTTTACGACGGCAAAGGTGACCCCGGGCTCCTGAACAAAACCGTTGAAGGGAC

6070 6080 6090 6100 6110 6120
 AGCACTGGTGTGGTCTCTCATAGATACCTAGCGATAGCTGATTTCCATTTTCTCCATG
 TCGTGACCACACCAGGAGAGTATCTATGGATCGCTATCGACTAAAGGTAAAAAGAGGTAC

6130 6140 6150 6160 6170 6180
 CCTATCTTTAAGGTAAGTAGGTCTTTTATTGTCTTTACAACCTTTATGAACTACATACAG
 GGATAGAAATTCATTCATCCAGAAAAATAACAGAAATGTTGAAACTTGTATGTATGTC

6190 6200 6210 6220 6230 6240
 CTCCTCTCGTGTAGTTCCTCCGACGAAAAATGGTGTATTCAGAAAAACTCTGCTGTTC
 GAGGAGAGCACATCAAGGAGGGCTCTTTTTACCACATAAGTCTTTTTTGAGACGACAG

>SacI

6250 6260 6270 6280 6290 6300
 TTGCCAAATGCAGCCGCATGGAGCAGAGAGCTGCAGAAACAGAGATGGGAGCTCATTC
 AACGGTTTACGTCGGCGGTACCTCGTCTCTCGACGCTTTGTCTCTACCCCTCGAGTAAGG

>EcoRI

6310 6320 6330 6340 6350 6360
 TGCCTGCGAAGGCTTCGAGGAAGGAGAATTCATCAGGCTGAATGTGTATGAACCTTA
 ACGTGACGCTTCGGAAGCTCCTTCTCTTAAGGTAGTCCGACTTACACAGTACTTGAAT

6370 6380 6390 6400 6410 6420
 AGTAATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
 TCATATATTTATTTAATTTTATTATATTTATTGAGTGAACCGTTACCCATTTCTCTGT

6430 6440 6450 6460 6470 6480
 CCTTGTGGTGACATTGCCTTATATCAGTCAGGGACAGCAGATGACTGTCTTTGTCA
 GGAACAACCACTGTACGGGAATATAGTCAGTCCCTGTCTCGTCTACTGACAGAAAACAGT

6490 6500 6510 6520 6530 6540
 TTCTTAGCTTGATGGCCAAAGCTGTCTTATGTCTAGGATACATGAATATCAAATCAAATC
 AAGGATCGAACTACCGGTTTCGACAGAATACAGATCCTATGTACTTATAGTTTAGTTAG

6550 6560 6570 6580 6590 6600
 AAATCTAGGCAGCACAGCACAAGAAGAGAAAATACAGAGATTTGCATACCACCATGCTACC
 TTAGATCCGTCGTGTCTGTTCTTCTCTTATGTCTCTAAACGTATGGTGGTACGATGG

6610 6620 6630 6640 6650 6660
 CACGGATCTGCCCTCCACACATGGCAGACACCCACTTGCCACCTCATCGTGGAGCAT
 GTGCCTAGACGGGAGGGTGTGTACCGTGTCTGTGGTGAACGGTGGAGTAGCACCTCGTA

6670 6680 6690 6700 6710 6720
 GGATGAAGGGTGTACCACCAGACGTGTGGTCCGGCTTCAGCCAGAGTCAACCACAATGTG
 CCTACTTCCACAATGGTGGTCTGCACACCAGCCGAGTCCGGTCTCAGTGGTGTACAC

17-9

6730 6740 6750 6760 6770 6780
 CAAATATATGGTGGGCAACTGGGAGAGAGAGAAAAAAGTGACAACCTTGAGCATTATGA
 GTTATATATACCACCCGTTGACCTCTCTCTCTTTTTTTTCACTGTTGAACTCGTAATACT

6790 6800 6810 6820 6830 6840
 AGAGAGAGGGAACTGGAGACTGAAGGGTAGAAAGGAGTCGCCTGTTCTGAGTGTCCAGCC
 TCTCTCTCCCTTGACCTCTGACTTCCCATCTTTCTCAGCGGACAAGACTCACAGGTCGG

6850 6860 6870 6880 6890 6900
 TATGGTAAGGCCCCAGCCTGGGCTGCCACTGAGGGCTGTATCTGAGTCCATGAGTCCACA
 ATACCATTCCGGGGTCGGACCCGACGGTGACTCCCGACATAGACTCAGGTACTCAGGTGT

6910 6920 6930 6940 6950 6960
 GCAGCAGGGCTCAGTGTGGATATCCGTGACACATGTTATCACTAGAGAACACGGGGAACT
 CGTCGTCCCGAGTCACACCTATAGGCACTGTGTACAATAGTGATCTCTTGTGCCCTTGA

6970 6980 6990 7000 7010 7020
 CCCTGGTCAGGACAGCTGTAGGGACCCACATGGACGTACAGGGGCTGTGCATAACTAGCC
 GGGACCAGTCTGTGACATCCCTGGGTGTACCTGCATGTCCCGACACGTATTGATCGG

7030 7040 7050 7060 7070 7080
 TTGCCTCTCACAGGATGAGGCCTTTGGGAGAGCTGGTGGCAGCACTTGGGAGAGAGGGCC
 AACGGAGAGTGTCTACTCCGGAACCTCTCGACCACCGTCTGTGAACCTCTCTCCCGG

7090 7100 7110 7120 7130 7140
 CTACACCTACCCAGTCAGCACAGTGGAGCTGGCCCTGGGGGTGGGGCTGGGGTGACTCAC
 GATGTGGATGGTCACTGTGTACCTCGACCAGGGACCCCAACCCGACCCCACTGAGTG

7150 7160 7170 7180 7190 7200
 CCCAAGGGCATGAGTGTGGGAGAGCCACCTCATCACTCATCTGCTGCGGGGTGGCACC
 GGGTCCCGTACTCACACCTCTCGGCTGGAGTAGTGAGTAGACGACGCCCCACCGTGGT

7210 7220 7230 7240 7250 7260
 GTGCAGAGGTGATGCTCAGCCCATCCCCCTGCAACCCCTTGTACCTCTGGAAGTTGGG
 CAGCTCTCCACTACGAGTGGGGTAGGGGGGACGTTGGGGAACAGTGGAGACCTTCAACC

7270 7280 7290 7300 7310 7320
 AAAGCTGCCCATAGGGCCATGAATCCGGGAGAACTAGCCCTGCCCTCACCATTGAGCACT
 TTTGACGGGTATCCCGGTACTTGAGGCCTCTTGATCGGGACGGGAGTGGTAAGTCTGA

>BamHI
 |
 | 7330 7340 7350 7360 7370 7380
 AGGAGGATCCTGCACCTCTCCTGGATAGCACGGCAGAGCTGACCCTGGCAGCAGGGGTAC
 TCCTCCTAGGACGTGGAGAGGACCTATCGTGCCGTCTCGACTGGGACCGTCTGTCCTCCCATG

7390 7400 7410 7420 7430 7440
 GGGTGAACCAGAGGGGAGAGAGAACGAGAGCATGGGAGAGCTGGTCCCACCACCCCTCA
 CCCACTTGGTCTCCCTCTCTCTCTTGTCTCTCGTACCCTCTCGACCAGGGTGGTGGGGAGT

7450 7460 7470 7480 7490 7500
 GCCATGAGAGGTGACCTGGGACAGCTGACCTGGCAGTCATGAGAGTAGGTGAGCTGGCCC
 CGGTACTCTCCACTGGACCTGTGACTGGACCGTCACTACTCTCATCCACTGGACCGGG

7510 7520 7530 7540 7550 7560
 TACCTCTCACTCAGGAGTGGCTGCAGCACTTGGGAGAGTGGTCCCTACATCTTGCCTTGG
 ATGGAGAGTGAAGTCTCACCAGCTCGTGAACCTCTCACCAGGATGTAGAACCGAACC

7570 7580 7590 7600 7610 7620
 CAACACAGCACAGTAGTGTCTGGTCTGGTAGCAAATGCATGGGTGGGCCAGCCCGGAGGG

17-10

GTGTGTGTCGTCATCACGACCAAGACCATCGTTTACGTACCCACCCGGTCGGGGCTCCC

7630 7640 7650 7660 7670 7680
TATAGGAGCAGGAGAGATGGCCTAGCCCCTCACAGGATGCATCACTTGGGACATTGGGTC
ATATCCTCGTCTCTACCGGATCGGGGAGTGTCTACGTAGTGAACCCGTAAACCCAG

7690 7700 7710 7720 7730 7740
CCACGCCATGACTGGGCAGCACAGTGGCGCTGCCTTTGGAGGCTTGGGTGTGGGTGCGCT
GGTGCGETACTGACCCGTGTGTACCGCGACCGAAACCTCCGAACCCACACCCACGCGA

7750 7760 7770 7780 7790 7800
GGCCCCAAGGGCAAGGGAAACAGGAGATCTAAACCTACCTCCTGACTATGGCGGTAGTATT
CCGGGGTCCCGTCCCTTGTCTCTAGATTTGGATGGAGGACTGATACCGCCATCATAA

7810 7820 7830 7840 7850 7860
GACTAGCCTAGCCAAAACAGTGTCTGGAGTGTGGAGAGCCGTGCCACAAGCAATCGCGAGC
CTGATCGGATCGGTTTTGTACGACCTCACACCTCTCGGCACGGTGTTCGTTAGCGCTCG

7870 7880 7890 7900 7910 7920
CGTGAACAATCGCCATTATAAGATGGCGCTAGCTTCCACTGTGCCTAACTAGTAAACAAG
GCACTTGTAGCGGTAATATTCTACCGCGATCGAAGGTGACACGGATTGATCATTGTTC

7930 7940 7950 7960 7970 7980
CCTTATGCACAAGTGCAAGAGTAAATTCACGCCAGTCACTGCCATCTTGGGACGTAGT
GGAATACGTGTTACGTTCTCATTTAAGTGGGGTCACTGACGGGTAGAACCCTGCATCA

7990 8000 8010 8020 8030 8040
AATGGGGTGATGGGCGAGCAACTAATCAGGTGCTGTACGCCACATCAGGTGCTGAAATG
TTACCCCACTACCCGCTCGTTGATTAGTCCACGACAGTGCGGTGTAGTCCACGACTTTAC

8050 8060 8070 8080 8090 8100
TCACACTGTGGCTATATAAGCAGCGGATTTCCGGGTTGGGGTCTTCTGAGAAGTA
AGTGTGACACCCGATAATTCGTGCGCTAAAAGGCCAAGCCCCAGAAGGACTCTTCAT

>HindIII
|
8110
AGCAATAAAAGCTT
TCGTTATTTTCGAA

Figur 18

