

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe  
Jochen Claus Hartner  
aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung:

**Die RNA-abhängige Adenosin-Deaminase ADAR1:  
Defizienz führt zu hämatopoietischen Defekten  
und embryonalem Tod**

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung Heidelberg zwischen April 1998 und April 2002 unter der Anleitung von Dr. Miyoko Higuchi und Prof. Dr. Peter H. Seeburg durchgeführt

Gutachter: Prof. Dr. Peter H. Seeburg  
Max-Planck-Institut für medizinische Forschung Heidelberg

Prof. Dr. Günther Schütz  
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Desweiteren erkläre ich hiermit, an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderen Form anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt zu haben.

Heidelberg, im April 2002

*Gewidmet meinen Eltern*

# Dank

Mein herzlicher Dank gilt

Prof. Dr. Peter H. Seeburg für die Vergabe eines sehr interessanten Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Dr. Miyoko Higuchi, für die exzellente Betreuung, die großartige Unterstützung, sowie für ihre wertvollen Anregungen und hilfreiche Kritik,

Dr. Rolf Sprengel für seine Hilfe bei Problemen mit Computern und optischen Systemen,

Dr. Frank N. Single für die kompetente Einarbeitung in die ES-Zell-Kultivierung und sein Mitwirken an Teilen dieser Arbeit,

Christiane Brandel, Axel Erhardt, Giovanni Miucci, Tina Herforth, Marc Westermann, Rita Pfeffer (MPI) und Sandra Fiala (ZMBH) für die Aufzucht und Pflege zahlreicher Mäuse,

Frank Zimmermann und Sascha Dlugosz für die Blastocysten-Injektionen

Prof. Dr. Andreas Kispert und Dr. Jochen Klock für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und ausgezeichnete praktische Einführung in die Embryologie,

Prof. Dr. Albrecht Müller und Carolin Schmittwolf für die engagierte wissenschaftliche Zusammenarbeit,

Prof. Dr. Hannah Monyer und Ulla Amtmann für ihre kompetente Hilfe bei der In-Situ-Hybridisierung,

Dominik Krilleke und Christian Faul für ihren wertvollen Beitrag zu Teilen dieser Arbeit,

Sebastian Gornik und Stephan König für ihre engagierte experimentelle Hilfe,

Annette Herold, Juliana Kern, Carmen Baust, Horst Großkurth und Hans Gaugler für ihre zuverlässige technische Hilfe,

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des MPI für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft,

meiner Freundin Silvia Kreutzer für ihre unendliche Geduld, ihr großes Verständnis, sowie für das Korrekturlesen und

Prof. Dr. Günther Schütz für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung

## Zusammenfassung

RNA-Editierung durch selektive Deaminierung von Adenosin zu Inosin in nukleären Transkripten wird durch dsRNA-bindende Adenosin-Deaminasen (ADARs) vermittelt. In Säugern sind drei ADARs bekannt: die ubiquitär exprimierten ADAR1 und ADAR2, sowie die gehirnspezifische ADAR3. ADAR2-defiziente Mäuse wurden zunehmend anfällig für epileptische Attacken und starben drei Wochen nach der Geburt. Die molekulare Analyse zeigte reduzierte Editierung der meisten von 25 bekannten Editierungsstellen in diversen Transkripten des ZNS. Der Phänotyp ADAR2-defizienter Mäuse resultierte jedoch allein aus der mangelhaften Editierung einer einzigen Position, der Q/R-Stelle in Prä-mRNA der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR-B, welche das physiologisch wichtigste Substrat für ADAR2 ist. Ein geringer Teil der GluR-B-Transkripte wurde in ADAR2-defizienten Mäusen an der Q/R-Stelle noch editiert. Die Editierung von insgesamt drei Positionen, in Transkripten der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR-B, der Kainat-Rezeptor-Untereinheit GluR5 und des Serotonin2C-Rezeptors, wurde durch ADAR2-Defizienz nicht beeinträchtigt. ADAR3 zeigt an diesen Positionen keine Aktivität, und daher kommt für die Editierung dieser Stellen und die verbliebene Editierung der GluR-B-Q/R-Stelle in Abwesenheit von ADAR2 derzeit nur ADAR1 in Betracht.

In dieser Arbeit wurde die physiologische Bedeutung von ADAR1 durch Inaktivierung des ADAR1-Gens im Säugermodell Maus untersucht. Es konnte anhand von zwei ADAR1-defizienten Mutanten mit kongruentem Phänotyp gezeigt werden, dass ADAR1-Verlust zu embryonaler Letalität führt. Tiere mit einem ADAR1-Nullallel und einem ADAR1-Wildtyp-Allel zeigten eine normale prä- und postnatale Entwicklung. ADAR1-defiziente Embryonen starben zwischen E11.5 und E12.5. Zum Todeszeitpunkt waren sie 0.25-0.75 Tage in ihrer Entwicklung hinter gleichaltrigen Wildtyp-Embryonen zurückgeblieben. Bis E11.5 waren ADAR1-defiziente Embryonen von Wildtypen nicht unterscheidbar. Ab E11.5 war die fötale Leber von ADAR1-Nullmutanten aufgrund einer deutlich reduzierten Zellzahl bezogen auf Wildtyp klein und oft blass. Der Dottersack ADAR1-defizienter Embryonen wurde nach Manifestation des Leberphänotyps zunehmend blass. Die Bildung von primitiven Erythrozyten und Blutgefäßen im Dottersack wurde durch ADAR1-Defizienz nicht beeinträchtigt. Hämatopoietische Zellen in der fötalen Leber ADAR1-defizienter Embryonen zeigten ab E11.5 eine deutlich verminderte Proliferation und vermehrten Zelltod. Das Potential myeloider Vorläuferzellen aus der fötalen Leber von ADAR1-Nullmutanten, in vitro Kolonien zu bilden, war bei E11.5 drastisch reduziert. Defekte außerhalb der fötalen Leber wurden in ADAR1-defizienten Embryonen nicht beobachtet. Der Tod ADAR1-defizienter Embryonen zwischen E11.5 und E12.5 konnte mit einer defekten Leber-Hämatopoiese nicht hinreichend erklärt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für aufbauende Experimente, welche sich mit der Rolle von ADAR1 innerhalb des komplexen hämatopoietischen Systems und der physiologischen Bedeutung von ADAR1 im Embryo nach E12.5 und in postnatalen Stadien befassen werden.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                        |               |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>1. Einleitung.....</b>                                                              | <b>1</b>      |
| 1.1 Adenosin-zu-Inosin RNA-Editierung.....                                             | 2             |
| 1.2 RNA-abhängige Adenosin-Deaminasen .....                                            | 2             |
| 1.3 Expression editierter Transkripte im Zentralnervensystem.....                      | 4             |
| 1.4 Mechanismus der ADAR-vermittelten RNA-Editierung .....                             | 5             |
| 1.5 Ziel der Arbeit.....                                                               | 10            |
| <br><b>2. Ergebnisse.....</b>                                                          | <br><b>11</b> |
| 2.1 Charakterisierung des murinen ADAR1-Gens .....                                     | 11            |
| 2.2 Das Cre/loxP-System .....                                                          | 14            |
| 2.3 Konditionale Inaktivierung des ADAR1-Gens der Maus .....                           | 15            |
| 2.4 Etablierung der Mauslinie ADAR1 <sup>f7-9</sup> .....                              | 17            |
| 2.5 Etablierung der Mauslinie ADAR1 <sup>Δ7-9</sup> .....                              | 18            |
| 2.6 Analyse von ADAR1 <sup>Δ7-9</sup> -Embryonen .....                                 | 19            |
| 2.6.1 Ermittlung des Todeszeitpunkts von ADAR1 <sup>Δ7-9/Δ7-9</sup> -Embryonen .....   | 19            |
| 2.6.2 Phänotyp von ADAR1 <sup>Δ7-9/Δ7-9</sup> -Embryonen.....                          | 20            |
| 2.7 Deletion der Exons 2-13 des ADAR1-Gens der Maus.....                               | 21            |
| 2.8 Etablierung der Mauslinie ADAR1 <sup>Δ2-13</sup> .....                             | 23            |
| 2.8.1 Ermittlung des Todeszeitpunkts von ADAR1 <sup>Δ2-13/Δ2-13</sup> -Embryonen ..... | 24            |
| 2.8.2 Phänotyp von ADAR1 <sup>Δ2-13/Δ2-13</sup> -Embryonen.....                        | 25            |
| 2.9 Analyse ADAR1-defizienter Embryonen.....                                           | 26            |

|           |                                                                                                                         |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.9.1     | Größe der fötalen Leber von ADAR1 <sup>-/-</sup> -Embryonen.....                                                        | 26        |
| 2.9.2     | Histologische Untersuchung von ADAR1 <sup>-/-</sup> -Embryonen.....                                                     | 27        |
| 2.9.3     | Expression von ADAR1 .....                                                                                              | 29        |
| 2.9.4     | Zelltod in der fötalen Leber von ADAR1 <sup>-/-</sup> -Embryonen .....                                                  | 30        |
| 2.9.5     | Zellproliferation in der fötalen Leber von ADAR1 <sup>-/-</sup> -Embryonen .....                                        | 32        |
| 2.9.6     | Proliferation von Hepatoblasten und erythroiden Zellen in der fötalen Leber<br>von ADAR1 <sup>-/-</sup> -Embryonen..... | 33        |
| 2.9.7     | Zellzahl in hämatopoietischen Geweben von ADAR1 <sup>-/-</sup> -Embryonen .....                                         | 36        |
| 2.9.8     | Methylzellulose-Kultur hämatopoietischer Vorläufer von ADAR1 <sup>-/-</sup> -<br>Embryonen.....                         | 37        |
| <b>3.</b> | <b>Diskussion .....</b>                                                                                                 | <b>39</b> |
| 3.1       | ADAR1-Defizienz und Hämatopoiese .....                                                                                  | 39        |
| 3.2       | Beziehung von ADAR1-Nullmutanten zu anderen embryonal letalen<br>Mausmutanten mit hämatopoietischen Defekten .....      | 40        |
| 3.3       | Eingrenzung des hämatopoietischen Defekts .....                                                                         | 45        |
| 3.4       | Die Funktion von ADAR1 im Embryo nach E12.5 und<br>in postnatalen Stadien.....                                          | 47        |
| <b>4.</b> | <b>Material und Methoden .....</b>                                                                                      | <b>48</b> |
| 4.1       | Material.....                                                                                                           | 48        |
| 4.1.1     | Eukaryontische Zellen .....                                                                                             | 48        |
| 4.1.2     | Mauslinien.....                                                                                                         | 48        |
| 4.1.3     | Lösungen.....                                                                                                           | 49        |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2 Methoden .....                                                                | 50        |
| 4.2.1 Kultur, Transformation und Selektion von murinen ES-Zellen.....             | 50        |
| 4.2.2 Herstellung und Haltung transgener Mäuse.....                               | 50        |
| 4.2.3 Bestimmung des Entwicklungsstadiums von Maus-Embryonen.....                 | 50        |
| 4.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....                                        | 51        |
| 4.2.5 DNA-Sequenzierung .....                                                     | 52        |
| 4.2.6 Isolierung genomischer DNA für PCR-Analyse.....                             | 52        |
| 4.2.7 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA .....                            | 52        |
| 4.2.8 Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung.....                                    | 52        |
| 4.2.9 In-Situ-Hybridisierung (nach Wisden und Morris, 1994) .....                 | 52        |
| 4.2.10 TUNEL von Paraffinschnitten .....                                          | 53        |
| 4.2.11 Inkorporation von Bromodeoxyuridin.....                                    | 53        |
| 4.2.12 Immunhistologie.....                                                       | 53        |
| 4.2.13 Zellzahlbestimmung von fötaler Leber, Dottersack und peripherem Blut ..... | 55        |
| 4.2.14 Methylzellulose-Kultur.....                                                | 55        |
| <b>5. Anhang.....</b>                                                             | <b>56</b> |
| 5.1 Oligonukleotid-Sequenzen .....                                                | 56        |
| 5.2 Abkürzungen.....                                                              | 56        |
| 5.3 Ein-Buchstaben-Code erwähnter Aminosäuren.....                                | 58        |
| <b>6. Literatur .....</b>                                                         | <b>59</b> |
| <b>7. Publikation .....</b>                                                       | <b>69</b> |

# 1. Einleitung

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie fordert den Fluss genetischer Information von DNA über mRNA zu Protein: Die im Genom eines Organismus gespeicherte exonische Sequenzinformation sollte die Aminosäureabfolge der codierten Proteine exakt vorhersagen (Crick, 1970). Seine uneingeschränkte Gültigkeit verlor dieses Dogma u.a. auch durch die Entdeckung der RNA-Editierung, deren Konsequenz die Veränderung der genetischen Information auf der Stufe der RNA miteinschließt.

Der Begriff der RNA-Editierung bezog sich zunächst auf Insertion und Deletion von Uridin-Nukleotiden in mitochondrialen mRNAs der Protozoen-Gruppe Kinetoplastida (Benne et al., 1986). Die Editierung dieser mRNAs ist notwendig, um funktionelle Proteine zu generieren. Inzwischen sind zwei Typen von RNA-Editierung bekannt: Der eine umfasst die Insertion bzw. Deletion von Nukleotiden, der andere die Modifikation von Nukleotiden. Letzterer ist der am weitesten verbreitete Typ der RNA-Editierung und kommt in Pflanzenorganellen sowie Zellkernen höherer Eukaryonten vor (Keegan et al., 2001).

Das erste Beispiel für Editierung eines nukleären Transkripts war Apolipoprotein B-RNA, in der über Cytidin-zu-Uracil-Deaminierung selektiv ein CAA-Kodon, das für Glutamin codiert, in ein Translations-Stopp-Kodon (UAA) überführt wird (Powell et al., 1987; Chen et al., 1987). Infolge dieser Modifikation entsteht nach Translation der editierten mRNA ein trunkiertes Apolipoprotein B (Apo-B48) mit 2152 Aminosäuren, wohingegen das uneditierte Transkript zu einem größeren, vom Gen spezifizierten, Apolipoprotein-B (Apo-B100) mit 4536 Aminosäuren führt. Damit können durch eine mittels RNA-Editierung eingefügte „Nonsense“-Mutation zwei Protein-Varianten von ein und demselben Gen erzeugt werden. Beide Protein-Varianten haben distinkte Funktionen beim Lipid-Metabolismus: Apo-B100 wird in der Leber exprimiert und bildet hier die Haupt-Proteinkomponente von VLDLs („very low density lipoproteins“) und IDLs („intermediate density lipoproteins“). Das infolge von gewebespezifischer RNA-Editierung im Dünndarm der meisten Säuger gebildete Apo-B48 wird in Chylomikronen inkorporiert. Etwa 90 Prozent der Apo-B-mRNA liegen im Dünndarm editiert vor. Die selektive Deaminierung von Cytosin-6666 in ApoB-Transkripten wird von der  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen Cytidin-Deaminase APOBEC-1 (Apo-B-mRNA-editierende Cytidin-Deaminase, Teng et al., 1993; Navaratnam, et al., 1993) im Zusammenspiel mit dem Hilfsfaktor ACF („APOBEC-1 complementation factor“, Lellek et al., 2000; Mehta et al., 2000) katalysiert.

RNA-Editierung durch selektive Deaminierung von Adenosin zu Inosin in Transkripten des Zentralnervensystems wurde von Sommer et al., 1991 entdeckt. Der Sinnstrang von cDNA für die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR-B und für die Kainat-Rezeptor-Untereinheiten GluR5 und GluR6 wies an einer einzigen Position, der sogenannten Q/R-Stelle, an der im korrespondierenden Genabschnitt ein Adenosin spezifiziert ist, ein Guanodin auf. Die

beobachtete Diskrepanz zwischen Gen und Transkript an dieser Position wurde auf Adenosin-zu-Inosin RNA-Editierung zurückgeführt, wobei das resultierende Inosin wie Guanosin mit Cytosin eine Basenpaarung eingehen kann. Inzwischen wurden in Säugern insgesamt 25 Editierungsstellen in verschiedenen Transkripten identifiziert (Tab. 1).

## **1.1 Adenosin-zu-Inosin RNA-Editierung**

Das Vorkommen von Inosin in tRNAs wurde bereits vor mehr als dreißig Jahren beschrieben, aber erst vor kurzem wurden tRNA-spezifische Adenosin-Deaminasen entdeckt, die für die Erzeugung von Inosin in tRNAs verantwortlich gemacht wurden (Gerber et al., 1998; Maas et al., 1999 und 2000). Während die Deaminierung von Adenosin an der Wobble-Position von tRNAs eine wichtige molekulare Determinante für die Degenerierung des genetischen Codes darstellt, führt sie in exonischen Bereichen von Transkripten zu einer Umcodierung genetischer Information und kann daher zu Proteinen mit veränderter Funktion führen.

Die Konversion von Adenosin zu Inosin wurde von zwei Gruppen voneinander unabhängig zunächst als Doppelstrang-RNA (dsRNA)-aufwindende Aktivität beschrieben (Bass und Weintraub, 1987; Rebagliati und Melton, 1987). Diese aufwindende Aktivität resultiert aus der Umwandlung eines Großteils der Adenosin-Uridin-Basenpaare in Inosin-Uridin-Fehlpaarungen, welche die dsRNA-Struktur destabilisieren.

Enzyme, die in RNA Adenosin zu Inosin konvertieren, bilden die Familie RNA-abhängiger Adenosin-Deaminasen (ADARs).

## **1.2 RNA-abhängige Adenosin-Deaminasen**

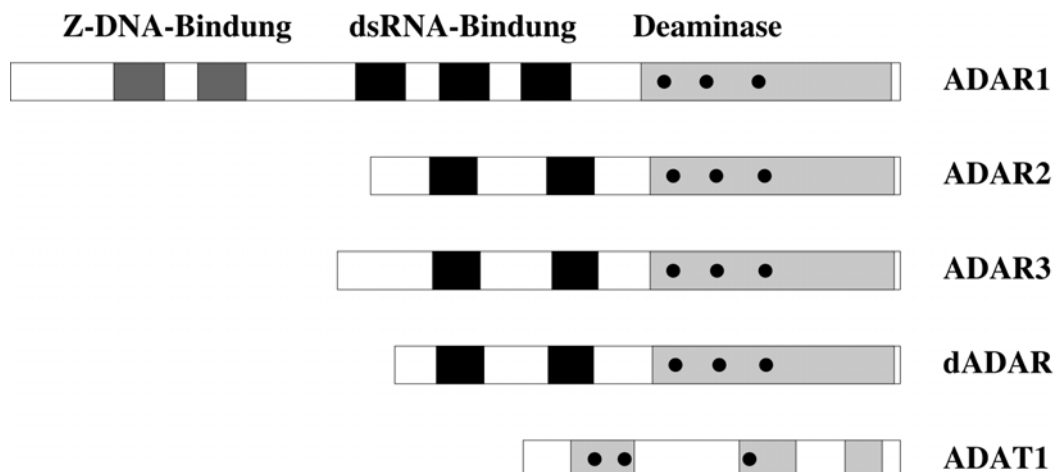
Mitglieder der ADAR-Familie (Abb. 1) besitzen eine Deaminase-Domäne mit hochkonservierten Aminosäure-Motiven, welche auch in Cytidin-Deaminasen (z.B. APOBEC-1) vorkommt. Die Deaminase-Domäne katalysiert die hydrolytische Deaminierung von Adenosin zu Inosin. ADARs werden entsprechend ihrer Substrate in dsRNA-abhängige ADARs und tRNA-abhängige ADATs gegliedert. ADARs besitzen zwei oder drei Doppelstrang-RNA-Bindemotive (dsRBMs), ADATs fehlen solche Motive.

In Säugern wurden drei dsRNA-abhängige ADARs identifiziert: ADAR1 (Kim et al., 1994; O'Connell et al., 1995), ADAR2 (Melcher et al., 1996a) und ADAR3 (Melcher et al., 1996b).

ADAR1 wird in embryonalen Stammzellen, Gehirn, Leber, Skelettmuskel, Herz, Pankreas, Lunge, Thymus und vermutlich allen übrigen Geweben exprimiert (Kim et al., 1994; O'Connell et al., 1995). ADAR1 nimmt innerhalb der ADAR-Familie eine Sonderstellung ein

(Abb.1): Sie besitzt drei dsRBMs, und jedes der drei dsRBMs wird von zwei Exons codiert. Der N-terminale Bereich von ADAR1 enthält zwei Z-DNA-Bindemotive, welche die Bindung an aktive Transkriptionsstellen vermitteln könnten (Herbert et al., 1997). Das ADAR1-Gen kann zwei Proteinvarianten hervorbringen, ein durch Interferon induzierbares Enzym voller Länge und eine konstitutiv exprimierte, N-terminal trunkierte ADAR1, mit nur einem Z-DNA-Bindemotiv (George und Samuel, 1999). Beide ADAR1-Varianten editieren dsRNA in vitro mit vergleichbarer Effizienz.

ADAR2 wird in embryonalen Stammzellen, Herz, Milz, Lunge, Leber, Niere, Testis und vermutlich in allen übrigen Geweben exprimiert (Melcher et al., 1996). Sie besitzt zwei dsRNA-Bindemotive, die von einem Exon codiert werden. ADAR2 zeigt pleiotrope Aktivität (Tab. 1), und das physiologisch wichtigste Substrat von ADAR2 wird im Gehirn exprimiert (Higuchi et al., 2000). Es wird angenommen, dass ADAR2 durch Editierung der eigenen Prä-mRNA die Menge an aktivem ADAR2-Protein regulieren kann (Rueter et al., 1999).



**Abb. 1.** Schematische Darstellung von RNA-abhängigen Adenosin-Deaminasen

Gezeigt sind ADAR1 (1178 AS), ADAR2 (701 AS), ADAR3 (745 AS), die tRNA-spezifische ADAT1 (499 AS) der Maus und die einzige dsRNA-abhängige Deaminase von *Drosophila* (dADAR, 669 AS). ADAT1 besitzt keine dsRNA-Bindemotive. Z-DNA-Bindemotive (dunkelgraue Balken), dsRNA-Bindemotive (schwarze Balken) und die Deaminase-Domäne (hellgrauer Balken) mit konservierten AS-Motiven (schwarze Kreise) sind dargestellt.

Die gehirnspezifische ADAR3 enthält zwei dsRBMs und eine katalytische Domäne mit den für die Deaminasefunktion essentiellen Aminosäure-Motiven. Dennoch, während ADAR1 und ADAR2 in vitro sowohl in perfekt gepaarten dsRNA-Duplexen als auch in spezifischen Prä-mRNAs Adenosin zu Inosin konvertieren können, zeigt ADAR3 hier keine Aktivität (Melcher et al., 1996).

Im Gegensatz zu Säugern wurde in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) nur eine dsRNA-abhängige Adenosin-Deaminase, dADAR, identifiziert (Palladino et al., 2000). Sie besitzt zwei dsRBMs und eine katalytische Domäne (Abb. 1); dADAR wird im Zentralnervensystem von *Drosophila* exprimiert und editiert dort Transkripte verschiedener Ionenkanäle. Wie bei ADAR2 beobachtet, kann dADAR ihre eigene Prä-mRNA editieren (Palladino et al., 2000).

Die Gruppe der tRNA-abhängigen Adenosin-Deaminasen (ADATs) umfasst die in Hefen vorkommende Tad1p/ADAT1 (Gerber et al., 1998) und ihre in Säugern auftretenden Homologe hADAT (Maas et al., 1999) und mADAT1 (Maas et al., 2000). Die bisher gefundenen ADATs deaminieren selektiv Adenosin-37 in der Antikodon-Schleife von Alanin transportierender tRNA zu Inosin. Die katalytische Domäne von ADATs enthält die für die Deaminasefunktion wichtigen Aminosäure-Motive, im Gegensatz zu dsRNA-abhängigen ADARs besitzen ADATs jedoch keine dsRBMs. Die tRNA-Bindung wird vermutlich durch die katalytische Domäne der ADATs vermittelt. Es wird diskutiert, ob ADARs im Laufe der Evolution durch Erwerb von dsRBMs aus ADATs entstanden sind (Gerber et al., 1998).

Vermutlich wurden alle in Säugern und Fruchtfliegen vorkommenden ADARs identifiziert, aber nur wenige physiologische Substrate dieser Enzyme sind bekannt.

### **1.3 Expression editierter Transkripte im Zentralnervensystem**

In Säugern und *Drosophila* werden die meisten der bisher bekannten von ADARs editierten Transkripte im Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert. Möglicherweise entwickelte sich die selektive RNA-Editierung, um durch die daraus resultierende Erhöhung der Protein-Diversität eine Feinabstimmung bestimmter neurophysiologischer Prozesse zu ermöglichen (Seeburg, 2000). Die Feinabstimmung solcher Prozesse könnte für die im Zuge der Evolution zunehmende Komplexität des Gehirns erforderlich geworden sein.

Die Häufigkeit von Inosin wurde auf eines von 17000 Nukleotiden in Rattengehirn PolyA<sup>+</sup>-RNA, aber nur auf eines von 33000 Nukleotiden in anderen Geweben geschätzt (Paul und Bass, 1998). Die Suche nach Inosin-enthaltenden mRNAs führte auf untranslatierte Regionen (UTRs) einiger *C. elegans*-mRNAs (Morse und Bass, 1999). Durch die Modifikation von UTRs könnte der RNA-Editierung eine Rolle bei der Modulation der Stabilität, des Exports oder der Translationseffizienz von mRNA zukommen.

Unter den editierten mRNAs des ZNS sind solche, die für glutamatgesteuerte Ionenkanal-Rezeptoren (GluRs) und den Serotonin-Rezeptor (5-HT<sub>2C</sub>R) in Säugern, spannungsgesteuerte Calcium- und Natriumkanäle sowie einen glutamatgesteuerten Chloridkanal in *Drosophila* und einen spannungsgesteuerten Kaliumkanal im Cephalopoden *Loligo* codieren. Desweiteren werden ADAR2-Prä-mRNAs in Säugern (Rueter et al., 1999) sowie dADAR-Prä-mRNAs in

*Drosophila* (Palladino et al., 2000) mittels Editierung durch das eigene Protein modifiziert (Selbsteditierung).

Die Editierung verändert das Codierungspotential der genannten Transkripte derart, dass verschiedene Protein-Isoformen generiert werden können. In Transkripten des spannungsgesteuerten Calcium-Kanals *Cacophony* ermöglicht die Editierung an 10 verschiedenen Positionen mehr als 1000 unterschiedliche Isoformen. Das enorme Potential der RNA-Editierung sollte im Kontext der unerwartet niedrigen Zahl von Genen in Mensch (Lander et al., 2001) und *Drosophila* (Adams et al., 2000) gesehen werden.

Der Grad der Editierung einer bestimmten Position kann innerhalb verschiedener Gehirn-Regionen variieren, wie in Transkripten des 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptors beobachtet wurde, bei dem 12 prinzipielle Isoformen regionsspezifische Expression zeigen (Burns et al., 1997; Niswender et al., 1999).

## **1.4 Mechanismus der ADAR-vermittelten RNA-Editierung**

ADAR-Proteine benötigen für die hydrolytische Deaminierung von Adenosin zu Inosin *in vitro* keine Co-Faktoren. Die hochkonservierten Aminosäure-Motive der Deaminase-Domäne enthalten metallbindende Aminosäure-Reste. Gezielte Mutagenese von potentiell Zink-bindenden Resten (Lai et al., 1995) führt zum Verlust der Deaminase-Aktivität.

Die Bindung von dsRNA wird durch die dsRBMs der ADARs vermittelt. Aufgrund ihrer Bindung an das Zucker-Phosphat-Gerüst, und damit ohne Kontakt zur Base, wurde angenommen, dass dsRBMs keine Sequenzspezifität vermitteln könnten. Inzwischen wurde gezeigt, dass die dsRBMs von ADAR2 zur Identifizierung von Editierungsstellen beitragen (Yi-Brunozzi et al., 2001). Basierend auf ihrer Homologie zu DNA-Methyltransferasen wurde postuliert, dass ADARs ein in einer RNA-Doppelstrang-Struktur befindliches, zur Editierung bestimmtes Adenosin vor der Deaminierung nach außen schnippen, ähnlich dem Basen-Schnipp-Mechanismus von DNA-Methyltransferasen. Inzwischen unterstützen experimentelle Daten dieses „Flip-out“-Modell (Stephens et al., 2000).

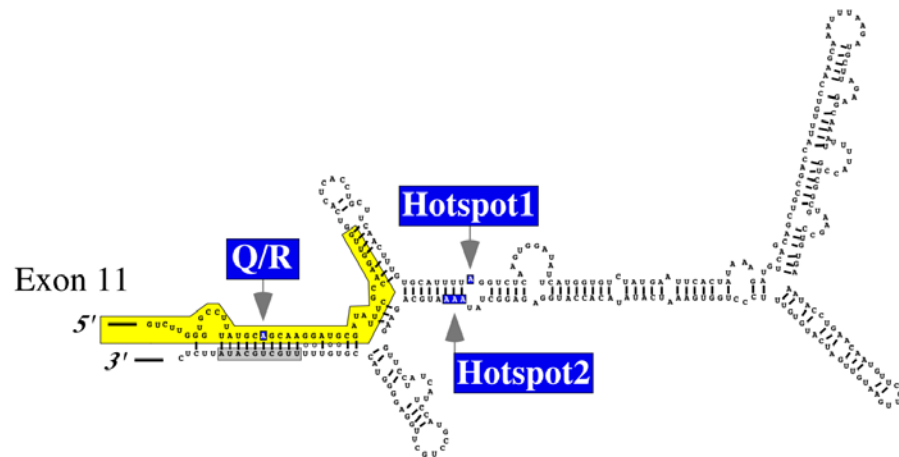
ADARs erkennen das zu editierende Adenosin als Teil einer dsRNA-Struktur, die zwischen der Editierungsstelle und einer zur Editierungsstelle komplementären Sequenz (ECS) gebildet wird (Higuchi et al., 1993). Das hinsichtlich der Strukturvoraussetzungen für selektive RNA-Editierung am besten untersuchte ADAR-Substrat ist die Prä-mRNA der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR-B. Der Sinn-Strang von GluR-B-cDNA enthält an einer als Q/R-Stelle bezeichneten Position ein CGG-Kodon, das für Arginin (R) codiert, wohingegen sich an entsprechender Stelle im GluR-B-Gen ein CAG-Kodon befindet, das für Glutamin (Q) codiert. Die Transfektion von GluR-B-Minigenen in neuroendokrine PC12-Zellen demonstrierte, dass nur Prä-mRNA, nicht aber mRNA editiert werden kann. Die Editierung

von GluR-B-Transkripten findet im Zellkern statt und geht dem Spleißen voraus. Die Editierung der exonischen Q/R-Stelle in GluR-B-Prä-mRNA erfordert den proximalen Teil des stromabwärts folgenden Introns. Er enthält ein imperfektes, invertiertes „Repeat“, dem die aus 10 Nukleotiden bestehende ECS folgt. Die ECS ist exakt komplementär zu der exonischen Sequenz, die das uneditierte CAG-Kodon enthält (Abb. 2). Die Substitution einzelner Nukleotide in der ECS oder ihrem exonischen Komplement reduzierte oder eliminierte die Editierung der Q/R-Position. Durch Wiedereinführung der Komplementarität im jeweiligen Partnerstrang konnte die Editierung wieder erreicht werden. Die selektive Editierung von Adenosin wird somit von der dsRNA-Struktur und nicht von der Nukleotidabfolge bestimmt. Die ECS ist als cis-agierendes Element an der Bildung einer dsRNA-Struktur zwischen intronischen und exonischen Sequenzen beteiligt.

Im Fall der Editierung der Arginin/Glycin (R/G)-Stelle in Transkripten der AMPA-Rezeptoren GluR-B, -C und -D liegt die intronische ECS in unmittelbarer Nähe zum Exon, grenzend an eine 24-Bp-selbstkomplementäre intronische Sequenz, die den Spleiß-Donor enthält. Die vorhergesagte dsRNA-Struktur umfasst etwa 30 Bp. Im Gegensatz zur Editierung der GluR-B-Q/R-Stelle ist das zur Editierung bestimmte Adenosin in der Exon-Intron-dsRNA fehlgepaart und nach erfolgter Editierung basengepaart. Neben exonischen Adenosinen werden auch intronische Adenosine in GluR-B-Prä-mRNA editiert, die als Hotspots bezeichnet werden (Abb. 2). Die funktionelle Bedeutung der Hotspot-Editierung ist nicht bekannt.

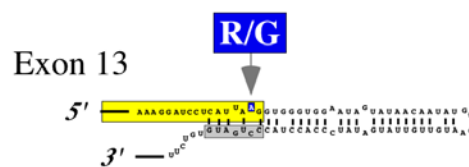
Nukleäre Extrakte aus HeLa- und Neuroblastom-Zellen konnten in-vitro-transkribierte RNA eines GluR-B-Minigens sowohl an der Q/R- als auch an der R/G-Stelle effizient editieren (Melcher et al., 1995; Yang et al., 1995). Durch Einfügen von Mutationen in das GluR-B-Substrat konnte gezeigt werden, dass die Editierung der GluR-B-Prä-mRNA in vitro die gleichen Strukturvoraussetzungen benötigt wie die Editierung in vivo (Higuchi et al., 1993). Mit Hilfe des In-vitro-Systems wurde der Nachweis erbracht, dass die RNA-Editierung aus der Konversion von Adenosin zu Inosin mittels enzymatischer Deaminierung resultiert. Die in den nukleären Extrakten enthaltene Editierungsaktivität benötigte kein ATP oder  $Mg^{2+}$  (Melcher et al., 1995; Yang et al., 1995).

## A) GluR-B



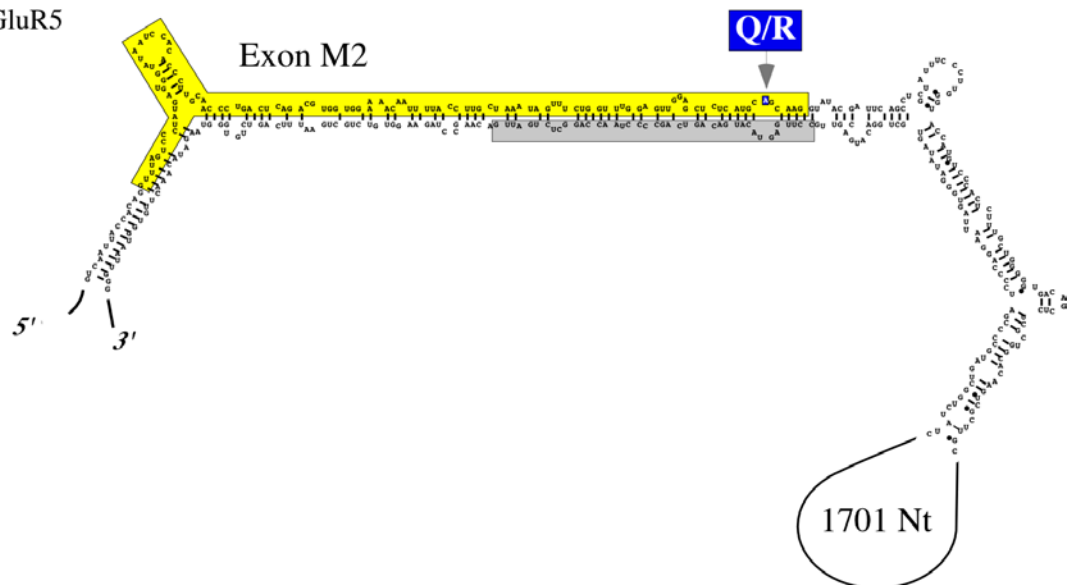
## B) GluR-B

GluR-C  
GluR-D



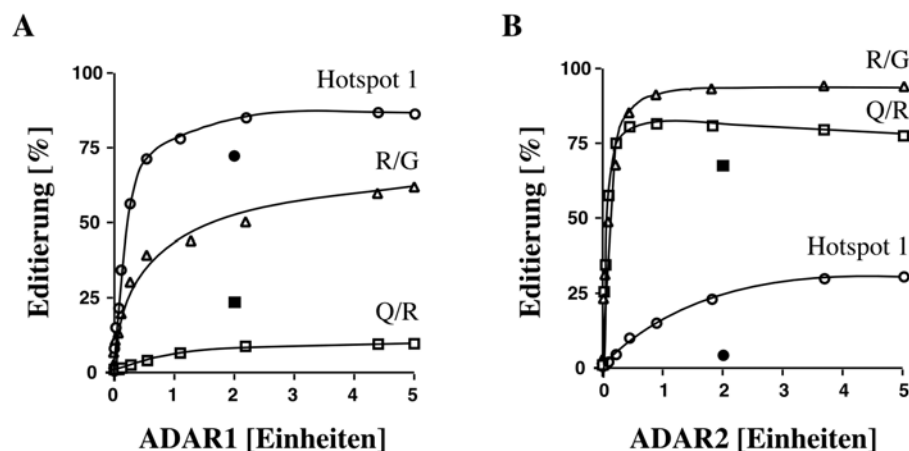
## C) GluR6

GluR5



**Abb. 2.** Strukturen einiger Prä-mRNAs im Bereich editierter Stellen. Exonische Nukleotide sind gelb untermalt. Die Bezeichnungen der Editierungsstellen sind mit blauen Rechtecken hervorgehoben, zur Editierung bestimmte Adenosine sind weiß auf blauem Hintergrund. ECS-Elemente sind grau hervorgehoben. Die gezeigten Strukturen sind die von GluR-B-Prä-mRNA (A) im Bereich der Q/R-Stelle und (B) im Bereich der R/G-Stelle. Sehr ähnliche Strukturen sind in Transkripten von GluR-C und -D zu finden. (C) Die GluR6-Prä-mRNA im Bereich der Q/R-Stelle ist dargestellt. Die intronische ECS liegt hier etwa 2000 Nukleotide stromabwärts der Editierungsstelle. Eine ähnliche Struktur wird für GluR5-Prä-mRNA vorhergesagt. Modifiziert nach Seeburg et al., 1998.

Nach Klonierung der cDNAs von ADAR1 (Kim et al., 1994; O'Connell et al., 1995) und ADAR2 (Melcher et al., 1996) konnte mittels Coexpression von editierungskompetenten GluR-B-Minigenen und rekombinanter ADAR1 oder ADAR2 in HEK-293-Zellen die Aktivität beider Deaminasen an GluR-B-Transkripten untersucht werden (Abb. 3). ADAR1 editierte in GluR-B-Prä-mRNA die R/G-Stelle sowie den intronischen Hotspot1 effizient, die Q/R-Stelle dagegen nicht. ADAR2 editierte sowohl die Q/R- als auch die R/G-Stelle sehr effizient, den intronischen Hotspot1 dagegen nicht. Damit wurde gezeigt, dass ADARs identische Editierungsstellen mit unterschiedlicher Effizienz deaminieren können. Der Editierungsgrad eines spezifischen Adenosins in Prä-mRNA beträgt meist nicht 100 Prozent, mit Ausnahme der Q/R-Stelle in GluR-B-Transkripten (Sommer et al., 1991; Higuchi et al., 1993).



**Abb. 3.** Aktivitätsprofile von rekombinantem ADAR1 und ADAR2 für drei Editierungspositionen in GluR-B-Prä-mRNA. Die Q/R-Stelle (offene Quadrate), R/G-Stelle (offene Dreiecke) und der intronische Hotspot1 (offene Kreise) sind dargestellt. Der Grad der Editierung für zwei Einheiten von gereinigtem rekombinantem Enzym wird durch schwarz ausgefüllte Symbole angezeigt. Modifiziert nach Melcher et al., 1996.

Die Editierung der Q/R-Position in GluR-B-Transkripten ist von essentieller physiologischer Bedeutung. Sie kontrolliert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität und die Kanal-Leitfähigkeit heteromerer AMPA-Rezeptoren, welche schnelle exzitatorische synaptische Transmission im ZNS vermitteln (Seeburg et al., 1998; Dingledine et al., 1999).

Die physiologische Bedeutung der Q/R-Stellen-Editierung konnte an genetisch manipulierten Mäusen demonstriert werden: Über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen wurde die ECS der Q/R-Stelle in einem der beiden GluR-B-Allele durch eine kurze Fremdsequenz ersetzt (Brusa et al., 1995). Die molekulare Analyse der  $\Delta\text{ECS}$ -Mutante zeigte, dass alle von diesem GluR-B <sup>$\Delta\text{ECS}$</sup> -Allel stammenden Transkripte an der Q/R-Stelle nicht editiert waren. Damit war die essentielle Bedeutung der intronischen ECS für die Editierung dieser Position in vivo gezeigt. Die fehlende Editierung der Q/R-Stelle in Transkripten des

modifizierten GluR-B-Allels manifestierte sich im Phänotyp der  $\Delta$ ECS-Mutante: Mäuse mit einem GluR-B <sup>$\Delta$ ECS</sup>-Allel entwickelten epileptische Anfälle und starben drei Wochen nach ihrer Geburt. Physiologische Messungen an Gehirnen von  $\Delta$ ECS-Mäusen zeigten eine drastisch erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität und Einzelkanal-Leitfähigkeit heteromerer AMPA-Rezeptoren. Dieser Effekt wurde zurückgeführt auf den erhöhten Anteil von GluR-B-Untereinheiten, die durch fehlende Editierung an der Q/R-Position ein Glutamin hatten, gegenüber solchen, die aufgrund erfolgter Editierung an dieser Position ein Arginin aufwiesen.

| Editierungsstellen       |          | ADAR2 <sup>+/+</sup> | ADAR2 <sup>+/-</sup> | ADAR2 <sup>-/-</sup> |
|--------------------------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>GluR-B Prä-mRNA</b>   |          |                      |                      |                      |
|                          | Q/R      | 98 $\pm$ 3           | 90 $\pm$ 3           | 10 $\pm$ 3           |
|                          | Hotspot1 | 50                   | 45                   | 60                   |
|                          | Hotspot2 |                      |                      |                      |
|                          | +262     | 30                   | 20                   | <10                  |
|                          | +263     | 65                   | 55                   | <10                  |
|                          | +264     | 15                   | 10                   | <5                   |
| <b>mRNA</b>              |          |                      |                      |                      |
|                          | Q/R      | 100 $\pm$ 1          | 100 $\pm$ 1          | 40 $\pm$ 4           |
| <b>AMPA-R R/G</b>        |          |                      |                      |                      |
|                          | GluR-B   | 75                   | 55                   | 15                   |
|                          | GluR-C   | 90                   | 85                   | 75                   |
|                          | GluR-D   | 45                   | 40                   | 10                   |
| <b>GluR5</b>             |          |                      |                      |                      |
|                          | Q/R      | 64 $\pm$ 5           | 55 $\pm$ 2           | 40 $\pm$ 1           |
| <b>GluR6</b>             |          |                      |                      |                      |
|                          | Q/R      | 86 $\pm$ 4           | 78 $\pm$ 4           | 28 $\pm$ 8           |
|                          | I/V      | 87 $\pm$ 2           | 79 $\pm$ 7           | 22 $\pm$ 5           |
|                          | Y/C      | 90 $\pm$ 4           | 82 $\pm$ 5           | 2 $\pm$ 1            |
| <b>5HT<sub>2C</sub>R</b> |          |                      |                      |                      |
|                          | A        | 75                   | 70                   | 70                   |
|                          | B        | 80                   | 75                   | 30                   |
|                          | C        | 15                   | 10                   | <5                   |
|                          | D        | 70                   | 55                   | <5                   |
| <b>ADAR2</b>             |          |                      |                      |                      |
|                          | -1       | 15                   | 10                   | <10                  |
|                          | +23      | 25                   | 15                   | <10                  |
|                          | +24      | 45                   | 35                   | 10                   |

**Tab. 1.** ADAR2-Defizienz und selektive Adenosin-Deaminierung

Dargestellt ist der Editierungsgrad bekannter Stellen in Transkripten zwei Wochen alter Mäuse. Die Werte sind in Prozent als Mittel  $\pm$  Standardabweichung (n = 3) für Wildtypen (ADAR2<sup>+/+</sup>), Heterozygote (ADAR2<sup>+/-</sup>) und Homozygote (ADAR2<sup>-/-</sup>) angegeben. Zu beachten ist, dass die Editierung der GluR-C R/G-Stelle, der GluR5 Q/R-Stelle und der 5HT<sub>2C</sub>R A-Stelle durch ADAR2-Defizienz nicht oder nur wenig beeinträchtigt wurde. Modifiziert nach Higuchi et al., 2000.

Die Q/R-Stelle in GluR-B-Prä-mRNA wird in vitro effizient von ADAR2 editiert. Dieser Befund machte ADAR2 zu einem Kandidaten für die Editierung dieser Position in vivo. Die Bedeutung von ADAR2 für die Editierung der GluR-B Q/R-Stelle in vivo wurde anhand ADAR2-defizienter Mäuse untersucht (Higuchi et al., 2000). Homozygote ADAR2-Mutanten zeigten eine Untereditierung der Q/R-Stelle von GluR-B-Transkripten. In ADAR2-Nullmutanten ist die Q/R-Stelle in 10 Prozent der ungespleißten und 40 Prozent der gespleißten GluR-B-Transkripte editiert.

Wie in heterozygoten GluR-B<sup>ΔECS</sup>-Mäusen beobachtet, wurden ADAR2-Nullmutanten im Alter von 13 Tagen zunehmend anfällig für epileptische Attacken und starben drei Wochen nach der Geburt. Sie zeigten eine drastisch erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität und Einzelkanal-Leitfähigkeit heteromerer AMPA-Rezeptoren. Durch Einkreuzen von zwei GluR-B<sup>R</sup>-Allelen (Kask et al., 1998), die für die editierte Version der Q/R-Stelle codierten, konnte der Phänotyp von ADAR2-defizienten Mäusen komplett aufgehoben werden. Damit war gezeigt, dass der letale Phänotyp der ADAR2-Mutante allein aus der mangelhaften Editierung einer einzigen Position resultierte. Die Q/R-Stelle in GluR-B-Prä-mRNA war damit als das physiologisch wichtigste Substrat für ADAR2 identifiziert.

Neben der drastischen Untereditierung der GluR-B-Q/R-Stelle zeigten ADAR2-Nullmutanten eine reduzierte Editierung an den meisten von 24 weiteren bekannten Editierungsstellen diverser Transkripte im ZNS (Tab. 1). Allerdings wird die Editierung des intronischen Hotspot1 in GluR-B-, der Q/R-Stelle in GluR5- und der Position A in 5-HT<sub>2C</sub>-Prä-mRNAs von ADAR2-Defizienz nicht oder nur wenig beeinflusst (Tab. 1). Es ist nicht bekannt, ob diese Stellen natürliche Substrate für ADAR1 sind, oder ob ADAR1 nur in Abwesenheit von ADAR2 Zugang zu den genannten Positionen findet.

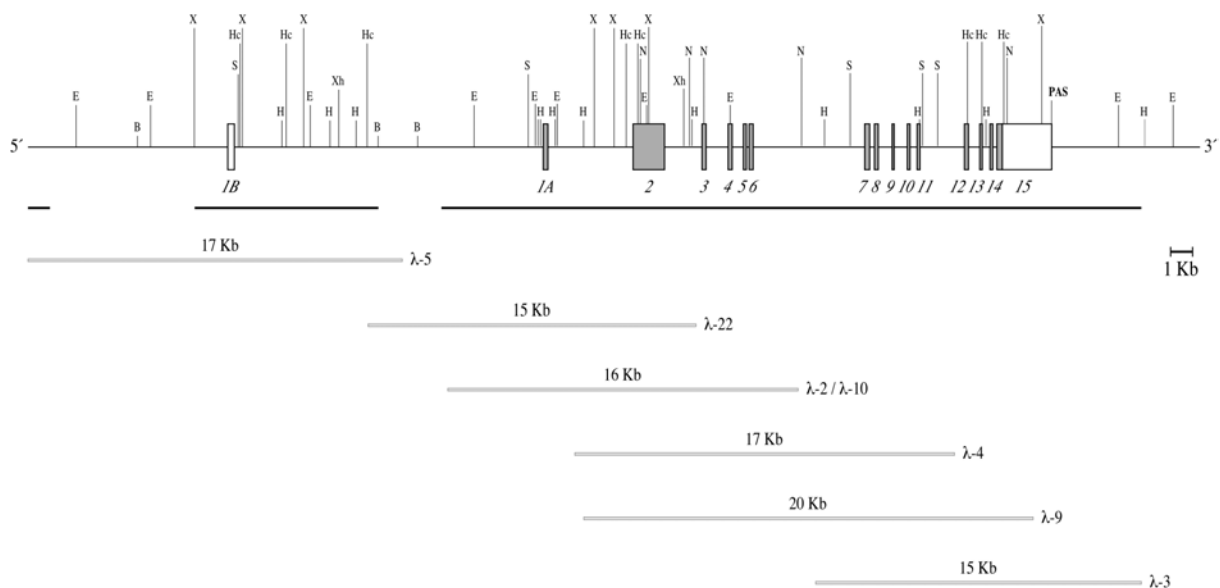
## 1.5 Ziel der Arbeit

ADAR1 und ADAR2 zeigen überlappende Spezifitäten in vitro: beide können identische Positionen, z.B. die R/G-Stelle in GluR-B-Prä-mRNA, editieren. Während das physiologisch wichtigste Substrat für ADAR2 die Q/R-Stelle in GluR-B-Prä-mRNA darstellt, ist die physiologische Bedeutung von ADAR1 unbekannt. Die Inaktivierung des ADAR1-Gens in der Maus sollte Hinweise auf die Funktion dieser Adenosin-Deaminase in vivo geben. Aufgrund der ubiquitären ADAR1-Expression wurde das ADAR1-Gen unter Verwendung des Cre-loxP-Systems konditional inaktiviert. Diese Strategie erlaubt auch die Herstellung einer ADAR1/ADAR2-defizienten Doppelmutante, welche ein mögliches Zusammenspiel beider Deaminasen aufdecken könnte.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Charakterisierung des murinen ADAR1-Gens

Für die Charakterisierung des ADAR1-Gens der Maus wurde eine genomische  $\lambda$ -FIX II-DNA-Bibliothek, hergestellt aus Leber-DNA weiblicher 119/SV-Mäuse (Stratagene), mit Ratten-ADAR1-cDNA-Sonden durchmustert. Es wurden zunächst drei  $\lambda$ -Klone ( $\lambda$ -4,  $\lambda$ -9,  $\lambda$ -3), die ADAR1-Genfragmente enthielten, identifiziert. Die Verwendung des 5'-Endes von  $\lambda$ -Klon 4 als Sonde führte zur Identifizierung von vier weiteren Klonen ( $\lambda$ -2,  $\lambda$ -5,  $\lambda$ -10 und  $\lambda$ -22), die stromaufwärts von Intron 1A gelegene ADAR1-Genbereiche enthielten. Klon  $\lambda$ -2 und  $\lambda$ -10 enthielten identische ADAR1-Fragmente („Siblings“). Es wurden insgesamt sechs unabhängige, überlappende  $\lambda$ -Klone isoliert (Abb. 4). Die Größe der enthaltenen genomischen ADAR1-Fragmente betrug 15-20 Kb. Die genomischen ADAR1-Fragmente wurden aus  $\lambda$  in pBluescript umklontiert und über Restriktions- und Southern-Analyse sowie DNA-Sequenzierung charakterisiert.



**Abb. 4.** Schematische Darstellung des murinen ADAR1-Gens

Exonische Sequenzen sind als graue Boxen, untranslatierte Regionen als weiße Boxen und Introns als Linien dargestellt. Die Länge der in den  $\lambda$ -Klonen enthaltenen ADAR1-Genfragmente ist angegeben. Restriktions-Schnittstellen folgender Endonukleasen sind dargestellt: BamHI (B); EcoRI (E); HincII (Hc); HindIII (H); NcoI (N); SmaI (S); XbaI (X); XhoI (Xh). Sequenzierte Bereiche sind unterstrichen.

Das murine ADAR1-Gen enthält 16 Exons, die sich über etwa 40 Kb erstrecken (Abb. 4.). Es befindet sich auf Chromosom 3F2 (Weier et al., 2000). Die Größe der Exons liegt zwischen 94 Bp (Exon 9) und 2502 Bp (Exon 15). Wie beim humanen ADAR1-Gen beobachtet (Wang

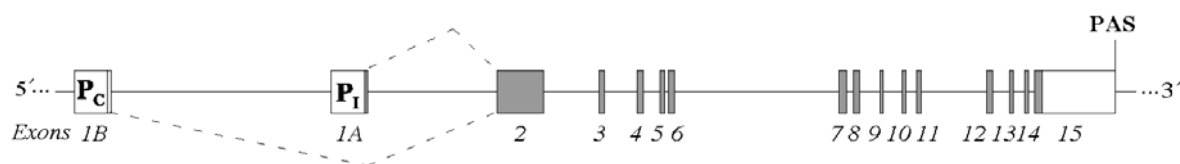
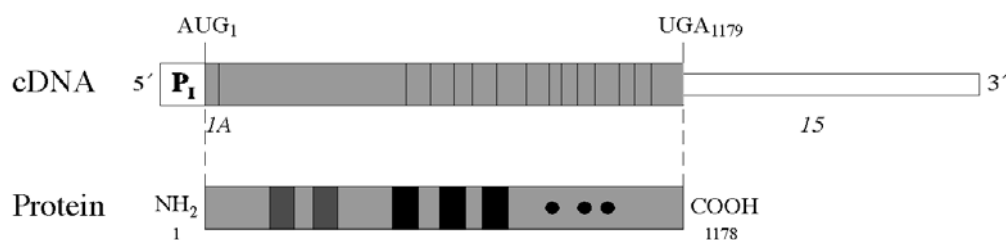
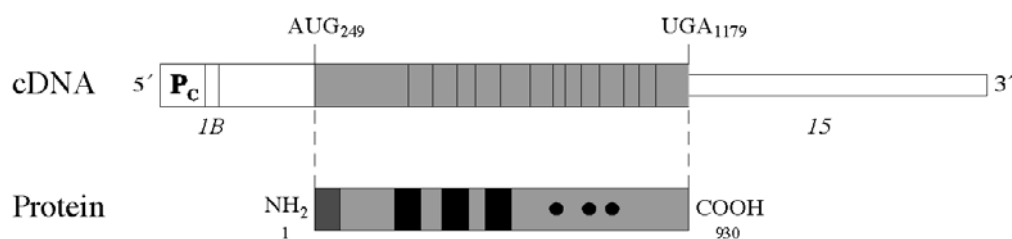
et al., 1995), bilden die Exons 3-6, die Exons 7-11 und die Exons 12-15 drei Gruppen relativ nahe beieinander liegender Exons (Abb. 4). Alle Spleiß-Stellen-Verbindungen folgen der GT-AG-Regel.

Die drei dsRBMs von ADAR1 werden von insgesamt sechs Exons codiert, während die beiden dsRBMs in ADAR2 und ADAR3 von einem Exon codiert werden (Melcher et al., 1996a und b). Zwei putative Z-DNA-Bindemotive ( $Z\alpha$  und  $Z\beta$ ) und die N-terminale Hälfte des dsRBM<sub>I</sub> werden von Exon 2 codiert, Exon 3 codiert die C-terminale Hälfte von dsRBM<sub>I</sub>. Exon 4 und 5 codieren für dsRBM<sub>II</sub>, und Exon 6 und 7 für dsRBM<sub>III</sub>. Das CHAE-Motiv wird von Exon 9, das PCG-Motiv von Exon 11 und das MSCS-Motiv von Exon 12 codiert. Diese hochkonservierten Motive sind für die Deaminasefunktion von ADAR1 essentiell (Lai et al., 1995).

Dem Translationsstopp-Kodon UGA in Exon 15 folgt eine 3'-untranslatierte Region (UTR) mit etwa 2260 Bp, deren 3'-Ende das Polyadenylierungssignal (PAS, 5'-AATAAA-3'; Proudfoot und Brownlee, 1976) bildet. Das PAS wurde über 3'-RACE-Analyse von cDNA aus Gehirn-PolyA<sup>+</sup>-RNA zwei Wochen alter Mäuse identifiziert (Daten nicht gezeigt).

Das 3'-Ende des murinen ADAR1-Gens grenzt an das 3'-Ende des Gens für die Acetylcholin-Rezeptor-Untereinheit  $\beta$  2 (Bessis et al., 1990; Lueders et al., 1999), das in Gegensinnorientierung zu ADAR1 liegt (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis der Sequenzanalyse des murinen ADAR1-Gens deutet auf zwei ADAR1-Proteinformen hin, ein Interferon-induzierbares Protein mit 1178 AS und einem berechneten Molekulargewicht von 130 kD und ein konstitutiv exprimiertes N-terminal trunkiertes 100 kD-Protein mit 930 AS (Abb. 5). Es wurden zwei alternative Exon-1-Strukturen des murinen ADAR1-Gens identifiziert: Exon 1A enthält das Start-Methionin des 130 kD-Proteins, Exon 1B-enthaltende Transkripte werden vermutlich beginnend mit dem ersten Methionin (M249)-Kodon (Kozak-Sequenz: 5'-ACATGC-3') in Exon 2 in das 100 kD-Protein translatiert (Abb. 5). Exon 1B liegt etwa 8 Kb stromaufwärts von Exon 1A (Abb.5). In der Promotor-Region ( $P_i$ ) stromaufwärts von Exon 1A befinden sich, wie im humanen ADAR1-Gen, ein KCS- und ein ISRE-Element, was auf IFN-Induzierbarkeit des 130 kD-Proteins hindeutet. Die Sequenz der Promotor-Region stromaufwärts von Exon 1B ( $P_c$ ) deutet auf konstitutive Expression Exon1B-enthaltender Transkripte hin. Durch 5'-RACE von cDNA aus Gehirn-PolyA<sup>+</sup>-RNA zwei Wochen alter Mäuse wurden die 5'-Enden von ADAR1-Transkripten amplifiziert. Die erhaltenen Amplikons wurden zur Identifizierung der 5'-Enden subkloniert und sequenziert. Alle der 20 analysierten Sequenzen entsprachen Exon 1B (Daten nicht gezeigt).

**A****B****C**

**Abb. 5.** Schematische Darstellung des murinen ADAR1-Gens und der abgeleiteten Genprodukte

Exons sind durch graue Boxen und Introns durch Linien repräsentiert. Nicht-translatierte Bereiche sind als weiße Boxen dargestellt. Der konstitutive Promotor ( $P_C$ ), der Interferon-induzierbare Promotor ( $P_I$ ) und das Polyadenylierungssignal (PAS) sind angegeben.

(A) Das murine ADAR1-Gen besitzt zwei Exon1-Strukturen (1B und 1A), die alternativ an Exon 2 gespleißt werden (gestrichelte Linien).

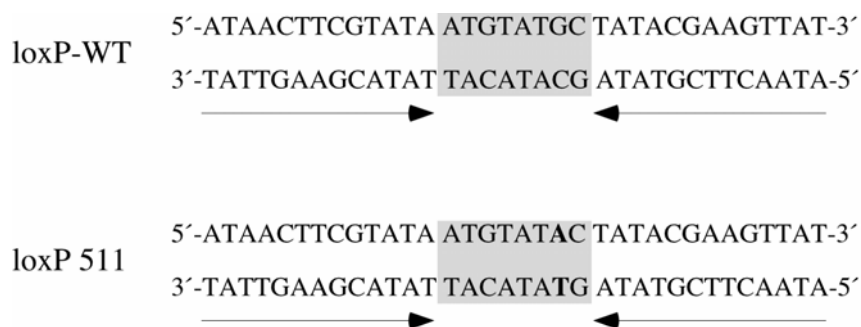
(A) Schema der Interferon-induzierten ADAR1-Form: cDNA und codiertes Protein. Exon-Grenzen sind durch schwarze Striche repräsentiert. Die Position des ersten translatierten Methionin-Kodons ( $AUG_1$ ) und des Translations-Stopp-Kodons ( $UGA_{1179}$ ) sind angegeben. Die putativen Z-DNA-Bindemotive  $Z\alpha$  und  $Z\beta$  sind durch dunkelgraue Boxen, dsRBMs durch schwarze Boxen und konservierte AS-Motive der katalytischen Domäne durch schwarze Kreise hervorgehoben.

(C) Schema der konstitutiven ADAR1-Form: cDNA und codiertes Protein. Beachte, dass die konstitutive ADAR1-Form nur ein Z-DNA-Bindemotiv,  $Z\beta$ , besitzt, da das erste translatierte Methionin-Kodon ( $AUG_{249}$ ) stromabwärts von  $Z\alpha$  liegt.

Die Expression von murinem ADAR1 wurde über Northern-Analyse von Gehirn-RNA zwei Wochen alter Mäuse unter Verwendung einer Ratten-ADAR1-cDNA-Sonde untersucht. Es konnte ein Transkript von etwa 7 Kb Länge identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

## 2.2 Das Cre/loxP-System

Die konditionale und/oder induzierbare Inaktivierung eines Gens kann mithilfe des Bakteriophagen P1 Cre/loxP-Rekombinationssystems erreicht werden (Rajewsky et al., 1996; Kühn et al., 1995). Cre-Rekombinase (Cre) katalysiert die spezifische DNA-Rekombination zwischen 34 Bp-Erkennungssequenzen (loxP-Elemente, Abb. 6). Werden zwei loxP-Elemente in gleicher Orientierung in einen Genlokus inseriert, vermittelt Cre die Deletion des loxP-flankierten (gefloxten) Genabschnitts, wobei ein loxP-Element im Gen zurückbleibt.



**Abb. 6.** Schematische Darstellung von loxP-Elementen

Das Wildtyp-loxP-Element (loxP-WT, oben) und die loxP-Mutante 511 (loxP 511, unten) sind gezeigt. Die invertierten „Repeats“, bestehend aus jeweils 13 Bp, sind durch Pfeile markiert, die „Spacer“-Region (8 Bp) ist grau unterlegt. Die Punktmutation in der „Spacer“-Region der Mutante ist durch Fettdruck hervorgehoben.

Für die konditionale Inaktivierung eines Gens wird ein funktionell wichtiger Teil des Gens gefloxt, ohne dabei die Funktion des Gens zu beeinträchtigen. Erst durch Expression von Cre wird der flankierte Bereich deletiert und damit die Genfunktion inaktiviert. Die zeitliche und räumliche Expression von Cre definiert die zeitliche und räumliche Deletion des gefloxten Genabschnitts.

LoxP-Elemente bestehen aus einer asymmetrischen 8-Nukleotide umfassenden „Spacer“-Region, die von zwei invertierten 13-Nukleotid-„Repeats“ flankiert wird (Abb. 6). Nukleotid-Substitutionen in der „Spacer“-Region werden von Cre erkannt. Nur loxP-Elemente mit identischer „Spacer“-Region werden effizient rekombiniert.

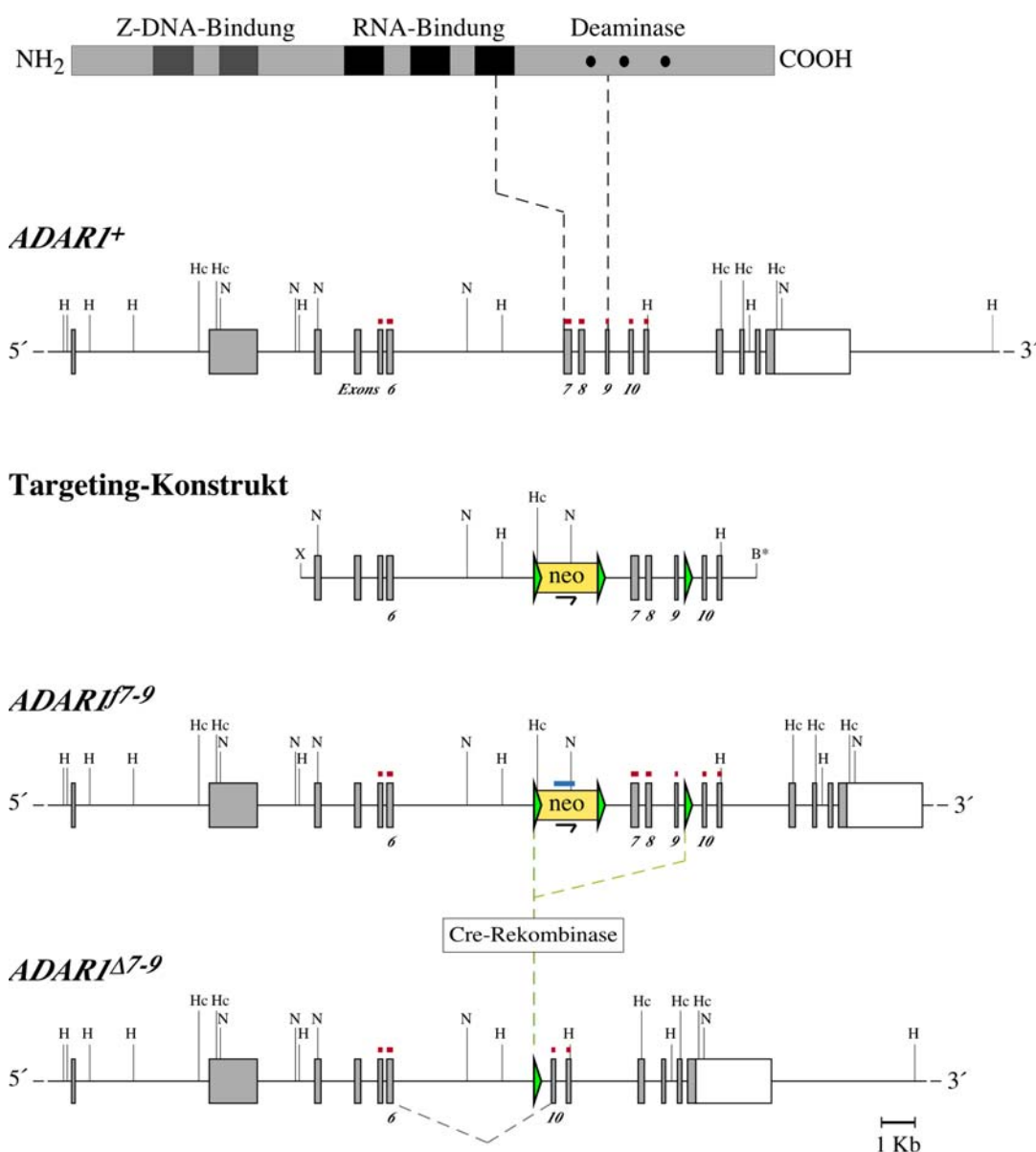
Die Effizienz der Cre-vermittelten Rekombination verschiedener loxP-Mutanten und ihre Kreuzrekombination mit Wildtyp-loxP-Elementen wurden *in vitro* untersucht (Hoess et al., 1986; Lee und Saito, 1998). Die loxP-Mutante 511 (Abb. 6) zeigte *in vitro* effiziente Rekombination, aber nur geringe Kreuzrekombination mit dem Wildtyp-loxP-Element. Daher erschien das loxP-511-Element geeignet im Hinblick auf ADAR1/ADAR2-

Doppelinaktivierung, wobei ein ADAR2-Genabschnitt von Wildtyp-loxP-Elementen (Higuchi et al., nicht publiziert) und ein ADAR1-Genbereich von loxP-511-Elementen flankiert wurde.

## 2.3 Konditionale Inaktivierung des ADAR1-Gens der Maus

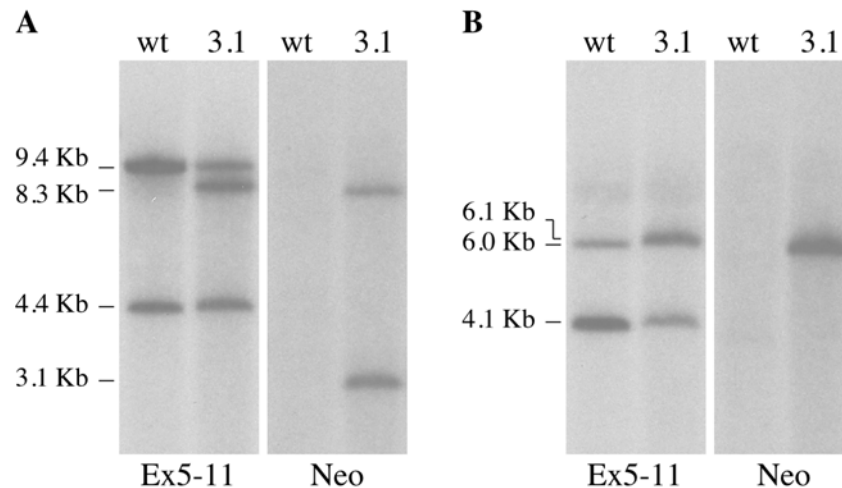
Ein für die Funktion des ADAR1-Proteins wichtiger Bereich des ADAR1-Gens (Exons 7-9) wurde mit loxP-511-Elementen flankiert, um ihn mittels Cre-Rekombinase-Aktivität zu deletieren und damit die Genfunktion zu inaktivieren (Abb. 7). Exon 7 codiert die C-terminale Hälfte des dritten dsRNA-Bindemotivs, welches in vitro das funktionell wichtigste der drei dsRBMs von ADAR1 darstellt (Liu und Samuel, 1996). Exon 9 codiert das CHAE-Aminosäure-Motiv der katalytischen Domäne, dessen Histidin für die Deaminasefunktion von ADAR1 essentiell ist (Lai et al., 1995).

Für die Konstruktion eines „Targeting“-Vektors (Abb. 7) wurde als 5'-Rekombinationsarm ein 6.9 Kb langes XhoI/SmaI-Fragment, das die Exons 3-6 des ADAR1-Gens beinhaltete, aus  $\lambda$ -Klon 9 isoliert und in pBluescript kloniert. Über die SmaI-Schnittstelle wurde eine von zwei loxP-511-Elementen flankierte Neomycin-Transferase-Kassette mit einem Phosphoglycerat-Kinase-Promotor in Sinn-Orientierung als Selektionsmarker eingefügt. Als 3'-Rekombinationsarm wurde ein 3.3 Kb langes SmaI-Fragment, das die Exons 7-11 enthielt, aus  $\lambda$ -Klon 4 isoliert und an das 3'-Ende der Neo-Kassette ligiert. Ein drittes loxP-511-Element wurde über eine MscI-Schnittstelle in Intron 9, das Teil des 3'-Rekombinationsarms war, inseriert. Der eigentliche 3'-Rekombinationsarm ist somit der stromabwärts des dritten loxP-Elements liegende Teil (0.9 Kb) des verwendeten SmaI-Fragments. Der „Targeting-Vektor“ wurde mit einem NotI-Schnitt linearisiert und in R1-ES-Zellen elektroporiert. Es wurden 540 Geneticin-resistente ES-Zellklone isoliert und über geschachtelte PCR-Analyse unter Verwendung der Oligonukleotidpaare mDra19/mDra17 und lox511S/mDra18 auf das gewünschte Rekombinationsereignis im ADAR1-Gen durchmustert. PCR-positive Klone wurden mittels Southern-Analyse auf korrekte homologe Rekombination des ADAR1-Lokus überprüft. ES-Zell-Klon 3.1 hatte korrekt rekombiniert und zeigte keine Zufallsintegrationen (Abb. 8). Über DNA-Sequenzierung wurde die Präsenz des dritten loxP-511-Elements in Intron 9 bestätigt (Daten nicht gezeigt). Klon 3.1 wurde zur Herstellung der Mauslinie ADAR1<sup>f7-9</sup> in C57BL/6-Blastocysten injiziert.

**ADAR1**

**Abb. 7.** Konditionale Inaktivierung der ADAR1-Genfunktion mittels Cre-loxP-System.

Schema des ADAR1-Proteins (hellgrauer Balken) mit den zwei putativen Z-DNA-bindenden Motiven (dunkelgraue Boxen), den drei dsRNA-Bindemotiven (schwarze Boxen) und drei für die katalytische Aktivität von ADAR1 wichtigen Motiven (schwarze Kreise) der Deaminase-Domäne sind dargestellt. Schwarzgestrichelte Linien markieren den loxP-flankierten Bereich des ADAR1-Gens und die korrespondierende Region im ADAR1-Protein. Translatierte exonische Sequenzen sind durch graue Boxen, untranslatierte exonische Sequenzen durch weiße Boxen und Introns durch Linien repräsentiert. Die Orientierung der Neo-Kassette (gelbe Box) ist durch einen Pfeil angegeben, loxP-511-Elemente sind als grüne Dreiecke dargestellt. Die Positionen von Restriktionsschnittstellen folgender Enzyme sind angezeigt: BamHI (B), HincII (Hc), HindIII (H), NcoI (N), XhoI (X). Für die Klonierung des Targeting-Konstrukts eingeführte Schnittstellen sind markiert (\*). Grün gestrichelte Linien zeigen den durch Cre-Rekombinase deletierten Bereich des ADAR1-Gens. Die Southern-Sonden Ex5-11 (rote Striche) und Neo (blauer Strich) sind dargestellt. In Transkripten des ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Allels wird Exon 6 an Exon 10 gespleißt (grau-gestrichelte Linien).



**Abb. 8.** Southern-Analyse von genomischer ES-Zell-DNA

Der Blot wurde zunächst mit der Neo-Sonde und dann mit der ADAR1-Sonde (Ex5-11) hybridisiert.

(A) NcoI-geschnittene genomische DNA eines Wildtyp (wt)-ES-Zellklons und des rekombinierten Klons 3.1. Die ADAR1-spezifische cDNA-Sonde Ex5-11 (linkes Bild) hybridisierte mit zwei NcoI-Fragmenten (9.4 Kb und 4.4 Kb) des ADAR1-Wildtyp-Allels und mit einem 8.3 Kb- und einem 4.4 Kb-Fragment des rekombinierten ADAR1-Allels, die Neo-Sonde (rechtes Bild) erkannte aufgrund einer NcoI-Schnittstelle im Neo-Gen zwei Fragmente (8.3 Kb und 3.1 Kb) des rekombinierten Allels.

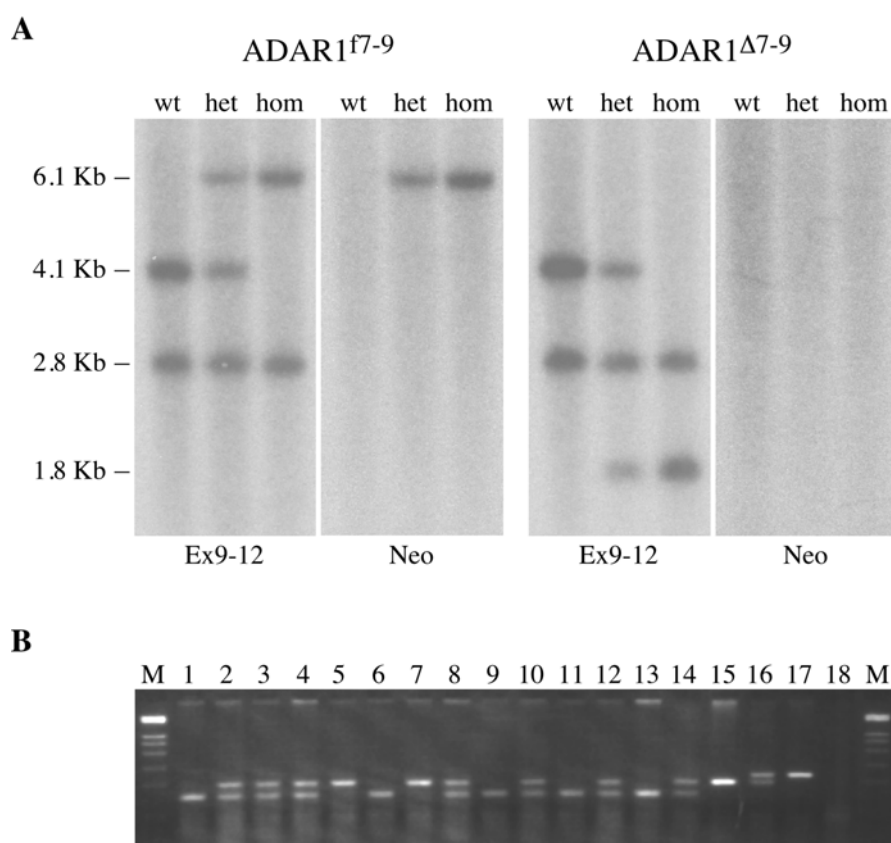
(B) HindIII-geschnittene genomische DNA eines Wildtyp (wt)-ES-Zellklons und des rekombinierten Klons 3.1. Sonde Ex5-11 (linkes Bild) hybridisierte mit zwei HindIII-Fragmenten (6.0 Kb und 4.1 Kb) des ADAR1-Wildtyp-Allels und zwei Fragmenten (6.1 Kb und 6.0 Kb) des rekombinierten ADAR1-Allels. Die Neo-Sonde hybridisierte mit der im 6.1 Kb-Fragment enthaltenen Neo-Kassette.

## 2.4 Etablierung der Mauslinie ADAR1<sup>f7-9</sup>

Die mit Klon 3.1 injizierten Blastocysten wurden scheinchwangeren C57BL/6-Weibchen intrauterin implantiert. Unter den insgesamt 24 geborenen, phänotypisch unauffälligen Nachkommen befanden sich 12 hochchimäre Tiere, von denen drei verpaart wurden. Alle drei Tiere zeigten vertikale Transmission des veränderten ADAR1-Allels und wurden zur Zucht heterozygoter (ADAR1<sup>f7-9/+</sup>)-Tiere rekrutiert. Die phänotypisch unauffälligen ADAR1<sup>f7-9/+</sup>-Mutanten der ersten Generation wurden zur ubiquitären Inaktivierung des ADAR1<sup>f7-9</sup>-Allels mit Cre-Deleter-Mäusen (Schwenk et al., 1995) verpaart. Die Cre-Rekombinase-vermittelte Excision des loxP-flankierten ADAR1-Genbereichs wurde über Southern-Analyse hochmolekularer genomischer DNA verifiziert (Abb. 9A). Die Genotypisierung der ADAR1-Mutanten erfolgte über Multiplex-PCR mit den Oligonukleotiden mDra13, mDra42 und mDra52 oder Southern-Analyse (Abb. 9B).

## 2.5 Etablierung der Mauslinie ADAR1<sup>Δ7-9</sup>

ADAR1-Mutanten mit Cre-Transgen zeigten effiziente Deletion der von den mutierten loxP-Elementen flankierten ADAR1-Sequenz. Die mutierten loxP-Elemente wurden mit ähnlicher Effizienz rekombiniert wie Wildtyp-loxP-Elemente, die einen ADAR2-Genbereich flankierten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 9.** Southern- und PCR-Analyse von ADAR1<sup>f7-9</sup>- und ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Mutanten

(A) Southern Analyse HindIII-geschnittener genomischer DNA von Wildtyp-Mäusen (wt), sowie heterozygoten (het) und homozygoten (hom) ADAR1<sup>f7-9</sup>- (linke Spalte) und ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Mutanten (rechte Spalte). Die ADAR1-spezifische cDNA-Sonde Ex9-12 hybridisierte mit je zwei HindIII-Fragmenten des ADAR1-Wildtyp-Allels (4.1 Kb und 2.8 Kb), des ADAR1<sup>f7-9</sup>-Allels (6.1 Kb und 2.8 Kb) und des ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Allels (2.8 Kb und 1.8 Kb). Die Neo-Sonde erkannte das 6.1 Kb-Fragment des ADAR1<sup>f7-9</sup>-Allels (linke Spalte, rechtes Bild). Das fehlende Neo-Signal des ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Allels zeigte die erwartete Deletion der Neo-Kassette an (rechte Spalte, rechtes Bild).

(B) PCR-Analyse genomischer DNA von 12 Embryonen aus einer ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Heterozygoten-Verpaarung. Homozygote (Spur 1, 6, 9, 11), heterozygote (Spur 2-4, 8, 10, 12) ADAR1<sup>Δ7-9</sup>- und Wildtyp-Embryonen (Spur 5, 7) mit Genotyp-Kontrollen für homozygote (Spur 13), heterozygote (Spur 14) ADAR1<sup>f7-9</sup>- und ADAR1-Wildtyp-Embryonen (Spur 15), sowie für heterozygote (Spur 16) und homozygote (Spur 17) ADAR1<sup>f7-9</sup>-Embryonen sind gezeigt. Zwei Spuren (M) wurden mit einem DNA-Größenmarker beladen.

Mittels PCR-Analyse wurde unter Verwendung verschiedener Oligonukleotid-Kombinationen nach Kreuzrekombination zwischen Mutanten- und Wildtyp-loxP-Elementen in Cre-transgenen ADAR1/ADAR2-Doppelmutanten gesucht. Heterozygote ADAR1/ADAR2-Doppelmutanten zeigten vollständige Deletion der geflochten Genbereiche ohne Kreuzrekombination zwischen Wildtyp-loxP-Elementen des ADAR2-Allels und loxP-511-Elementen des ADAR1-Allels (Daten nicht gezeigt). Nach Auskreuzung des Cre-Transgens wurden die phänotypisch normalen heterozygoten  $ADAR1^{\Delta7-9/+}$ -Tiere untereinander zur Homozygotie verpaart. In 17 unmittelbar nach der Geburt genotypisierten Würfen fanden sich keine homozygoten  $ADAR1^{\Delta7-9/\Delta7-9}$ -Nachkommen, wohingegen Heterozygote und Wildtypen im Verhältnis 2:1 auftraten (Tab. 2). Diese Befunde indizierten embryonale Letalität von  $ADAR1^{\Delta7-9/\Delta7-9}$ -Tieren. Mit der weiteren Analyse wurde zunächst der Todeszeitpunkt von homozygoten  $ADAR1^{\Delta7-9}$ -Tieren während der Embryonalentwicklung ermittelt.

## 2.6 Analyse von $ADAR1^{\Delta7-9}$ -Embryonen

### 2.6.1 Ermittlung des Todeszeitpunkts von $ADAR1^{\Delta7-9/\Delta7-9}$ -Embryonen

Zur Ermittlung des Todeszeitpunkts der  $ADAR1^{\Delta7-9/\Delta7-9}$ -Embryonen wurden Verpaarungen angesetzt, bei denen die Weibchen täglich auf Vorhandensein eines Vaginalpfropfs untersucht wurden. Ein aus getrocknetem Sperma bestehender Vaginalpfropf deutet auf Schwangerschaft hin. Die Kopulation mit dem Männchen erfolgt seitens des Weibchens bevorzugt zum Zeitpunkt der Ovulation während der Östrusphase des weiblichen Zyklus in der Mitte einer 12-stündigen Dunkelphase. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag Null der Embryonalentwicklung (E0) definiert. Der Zeitpunkt, an dem ein Vaginalpfropf nachgewiesen werden konnte (etwa 12 Stunden nach Mitte der Dunkelphase), wurde entsprechend als E0.5 bezeichnet. Embryonen unterschiedlichen Alters (E16.5 bis E10.5) wurden präpariert, auf Herzschlag untersucht und mittels PCR von genomischer DNA aus Dottersack-Gewebe oder Schwanzspitze genotypisiert. Homozygote ADAR1-Mutanten traten zwischen E16.5 und E13.5 nur in Form von Resorptionen auf (Tab. 2). Die ersten lebenden  $ADAR1^{\Delta7-9/\Delta7-9}$ -Embryonen wurden bei E12.5 gefunden, bis E11.5 zeigten Homozygote bezogen auf Heterozygote und Wildtypen keine erhöhte Mortalität. Die Anzahl von Resorptionen oder bei Präparation toter Embryonen betrug für Wildtypen und Heterozygote aller analysierten Stadien und für Homozygote bis E11.5 weniger als zwei Prozent.

| Alter | W  | Gesamt | +/+ | $\Delta 7-9/+$ | $\Delta 7-9/\Delta 7-9$ | (Lebend) |
|-------|----|--------|-----|----------------|-------------------------|----------|
| P0    | 17 | 119    | 36  | 83             | 0                       |          |
| E16.5 | 2  | 15     | 2   | 11             | 2                       | (0)      |
| E14.5 | 3  | 33     | 10  | 16             | 7                       | (0)      |
| E13.5 | 1  | 14     | 5   | 5              | 4                       | (0)      |
| E12.5 | 9  | 95     | 23  | 45             | 27                      | (2)*     |
| E12.0 | 9  | 99     | 22  | 44             | 33                      | (17)     |
| E11.5 | 25 | 240    | 68  | 116            | 56                      | (56)     |
| E11.0 | 2  | 27     | 6   | 15             | 6                       | (6)      |
| E10.5 | 9  | 108    | 37  | 50             | 21                      | (21)     |

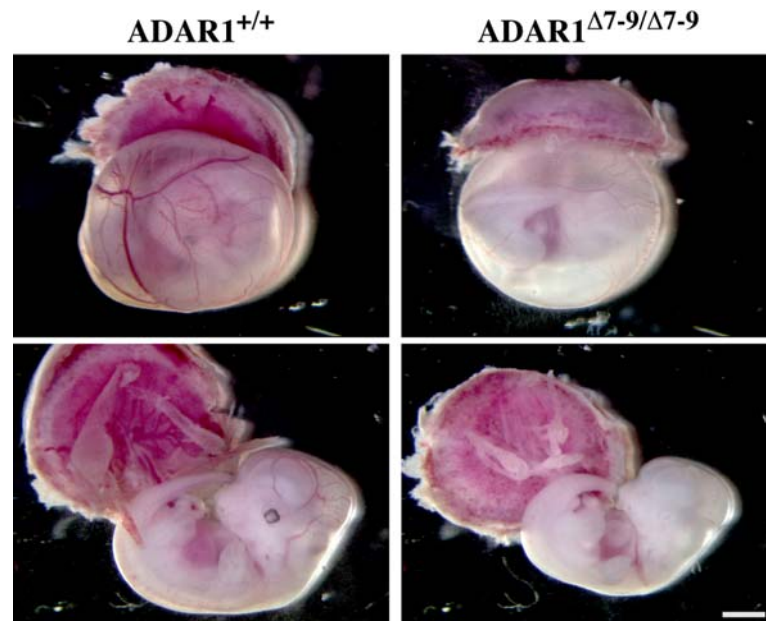
**Tab. 2.** Genotypisierung verschiedener Entwicklungsstadien von ADAR1 <sup>$\Delta 7-9$</sup> -Mutanten

Nachkommen aus ADAR1 <sup>$\Delta 7-9/+$</sup> -Verpaarungen wurden unmittelbar nach ihrer Geburt (postnataler Tag Null, P0) oder während verschiedener Stadien der Embryonalentwicklung genotypisiert. Embryonen im Alter von E16.5-E10.5 wurden als lebend bezeichnet, wenn zum Zeitpunkt der Präparation ihr Herz schlug. Die Anzahl der analysierten schwangeren Weibchen (W) und Embryonen ist angegeben. Die Genotypen sind angegeben: +/+, Wildtyp;  $\Delta 7-9/+$ , heterozygot;  $\Delta 7-9/\Delta 7-9$ , homozygot. (\*) Lebenden Homozygoten fehlten die für E12.5 typischen Merkmale, ihr Entwicklungsstatus entsprach dem von E12.0-12.25-Embryonen.

### 2.6.2 Phänotyp der ADAR1 <sup>$\Delta 7-9/\Delta 7-9$</sup> -Embryonen

Bis E11.5 waren ADAR1 <sup>$\Delta 7-9/\Delta 7-9$</sup> -Embryonen phänotypisch unauffällig und von Heterozygoten und Wildtypen gleichen Alters nicht zu unterscheiden. Ab E11.5 zeigten Homozygote bezogen auf Wildtypen und Heterozygote einen zunehmend blassen Dottersack und eine verkleinerte fötale Leber (Abb. 11). Zum Todeszeitpunkt um E12.5 waren homozygote ADAR1-Mutanten relativ zu gleichaltrigen heterozygoten und Wildtyp-Embryonen 0.25-0.75 Tage in ihrer Entwicklung retardiert. Dieser Befund wurde durch eine genaue Bestimmung des Entwicklungsstadiums, unabhängig vom Alter der Embryonen, erhalten. Für jedes der analysierten Stadien wurden einige typische Merkmale, wie Anzahl der Somitenpaare und Entwicklung der Vorder- bzw. Hintergliedmaßen, nach Kaufman (1999) definiert. Die für E12.5 typischen Entwicklungsmerkmale wurden von homozygoten ADAR1 <sup>$\Delta 7-9$</sup> -Mutanten nie erreicht. Der Entwicklungszustand der ältesten lebenden Homozygoten entsprach dem von E12.25-Embryonen.

Durch Teildeletion der katalytischen Domäne und des dritten dsRBM, welches das funktionell wichtigste der drei dsRBMs ist, sollte das ADAR1 <sup>$\Delta 7-9$</sup> -Allel keine funktionelle Deaminase exprimieren. In Anbetracht des dramatischen Phänotyps von ADAR1 <sup>$\Delta 7-9/\Delta 7-9$</sup> -Embryonen war aber sicherzustellen, dass die embryonale Letalität aufgrund von ADAR1-Defizienz und nicht durch ein von zwei ADAR1 <sup>$\Delta 7-9$</sup> -Allelen exprimiertes trunkiertes Protein verursacht wurde (Abb. 7).



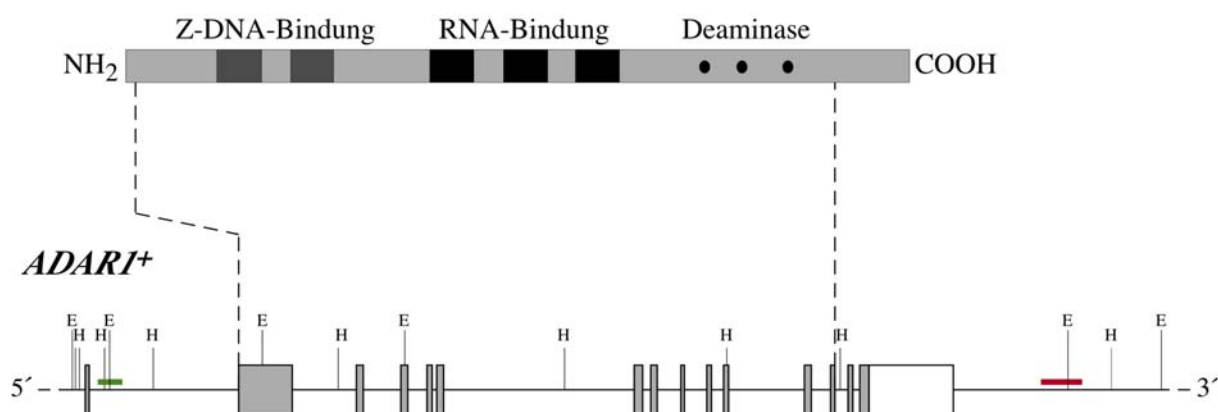
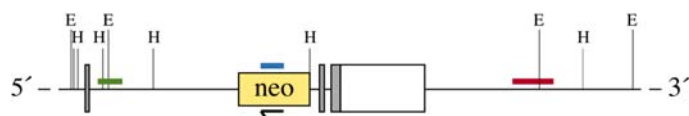
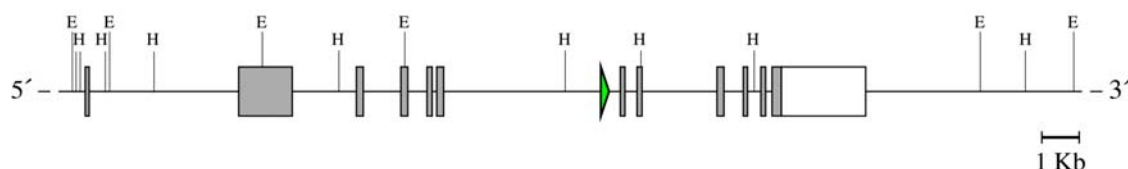
**Abb. 11.** Beobachtung von  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ -Embryonen.

Gezeigt sind E12.5-Embryonen vor (obere Reihe) und nach (untere Reihe) Entfernung der Dottersäcke. Der blasse Dottersack und der leicht blassere, etwa 0.5 Tage retardierte  $ADAR1^{\Delta 7-9/\Delta 7-9}$ -Embryo mit auffallend kleiner fötaler Leber sind erkennbar. Herz, Plazenta und ZNS waren unauffällig. Der weiße Strich entspricht 2 mm.

Über Northern-Analyse von Gehirn-mRNA zwei Wochen alter  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ -Tiere wurde ein trunkiertes Transkript identifiziert, dessen Expression der des  $ADAR1$ -Wildtyp-Transkripts entsprach (Daten nicht gezeigt). Die Sequenzanalyse von  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ -cDNA ergab, dass nach Deletion der Exons 7-9 Exon 6 an Exon 10 gespleißt wird (Daten nicht gezeigt). Das  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ -Transkript kann im gleichen Raster translatiert werden wie das  $ADAR1$ -Wildtyp-Transkript. Ein trunkiertes  $ADAR1$ -Protein konnte mangels eines geeigneten  $ADAR1$ -Antikörpers nicht ausgeschlossen werden. Die Erzeugung einer  $ADAR1$ -Mutante, der die codierenden Bereiche für beide Z-DNA-Bindemotive, die drei dsRNA-Bindemotive und die nahezu komplette katalytische Domäne fehlten, sollte bestätigen, dass der embryonale Tod von  $ADAR1^{\Delta 7-9/\Delta 7-9}$ -Embryonen durch  $ADAR1$ -Defizienz verursacht wurde (Abb. 12).

## 2.7 Deletion der Exons 2-13 des $ADAR1$ -Gens der Maus

Für die Konstruktion eines „Targeting“-Vektors zur Deletion der  $ADAR1$ -Exons 2-13 (Abb. 12) wurde als 5'-Rekombinationsarm ein über PCR mit den  $ADAR1$ -spezifischen Oligonukleotiden mDra91 und mDra92 generiertes 1.1 Kb langes Intron-1A-Fragment aus  $\lambda$ -Klon10 mit einer Gegensinn-orientierten Neo-Kassette fusioniert. Den 3'-Rekombinationsarm bildete ein 6 Kb-EcoRI/HindIII-Fragment aus  $\lambda$ -Klon 3, das die Exons 14 und 15 des  $ADAR1$ -Gens enthielt. Dieses Fragment wurde an das 5'-Ende der Neo-Kassette ligiert. Der mit XhoI linearisierte „Targeting“-Vektor wurde in R1-ES-Zellen elektroporiert.

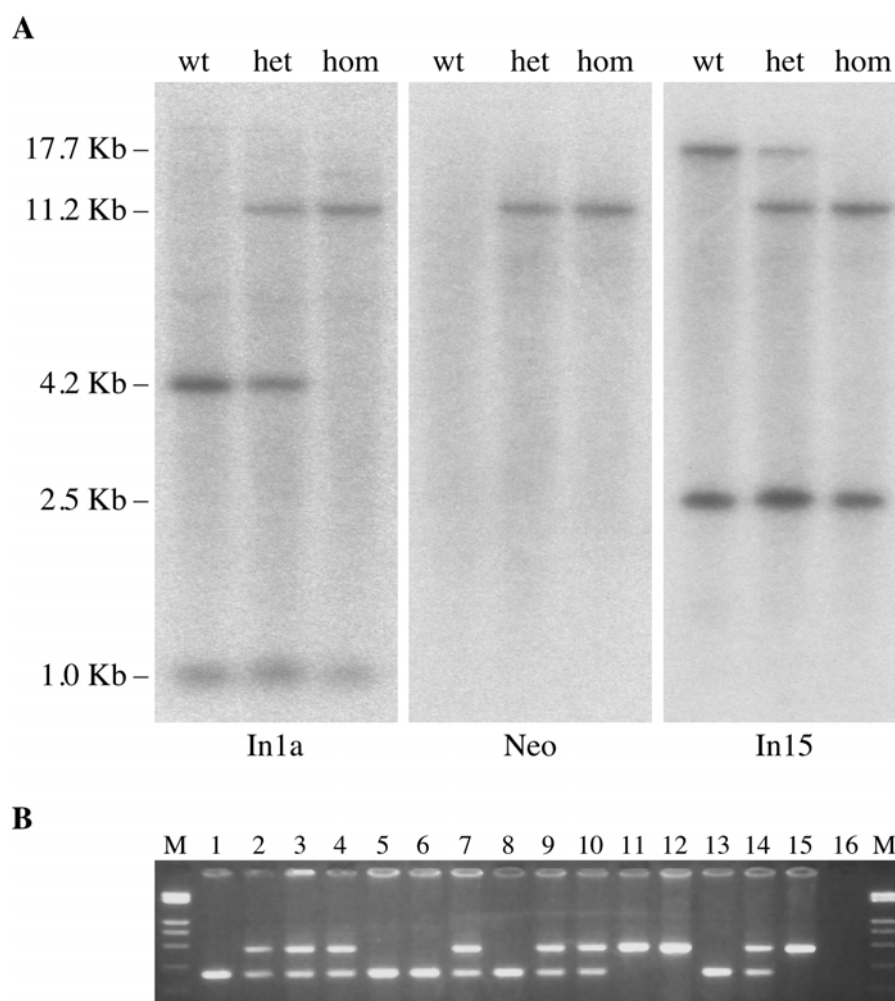
**ADAR1****Targeting-Konstrukt*****ADAR1*<sup>Δ2-13</sup>*****ADAR1*<sup>Δ7-9</sup>****Abb. 12.** Inaktivierung des ADAR1-Gens durch Deletion der Exons 2-13.

Schema des ADAR1-Proteins (hellgrauer Balken) mit den zwei putativen Z-DNA-bindenden Motiven (dunkelgraue Boxen), den drei dsRNA-Bindemotiven (schwarze Boxen) und drei für die katalytische Aktivität von ADAR1 wichtigen Motiven (schwarze Kreise) der Deaminase-Domäne sind dargestellt. Gestrichelte Linien markieren den deletierten Bereich des ADAR1 Gens und die korrespondierende Region im ADAR1-Protein. Translatierte exonische Sequenzen sind durch graue Boxen, untranslatierte exonische Sequenzen durch weiße Boxen und Introns durch Linien repräsentiert. Die Orientierung der Neo-Kassette (gelbe Box) ist durch einen Pfeil angegeben. Die Restriktionsschnittstellen folgender Enzyme sind angegeben: EcoRI (E), HincII (Hc), HindIII (H), NotI (N), XhoI (X). Für die Klonierung des Targeting-Konstrukts eingeführte (\*) Schnittstellen, sowie deletierte (Δ) Schnittstellen des ADAR1-Gens sind angezeigt. Die Southern-Sonden In1A (grüner Strich), In15 (roter Strich) und Neo (blauer Strich) sind dargestellt. Zum Vergleich beider generierter ADAR1-Nullallele wurde das Schema des ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Allels hinzugefügt.

Die genomische DNA von 1603 Geneticin-resistenten ES-Zellklonen wurde über geschachtelte PCR mit den Oligonukleotiden mDra94/PGKterm4 und mDra95/PGKterm3 auf homologe Rekombination des ADAR1-Lokus durchmustert. Die 23 PCR-positiven Klone wurden einer Southern-Analyse unterzogen (Daten nicht gezeigt). Sie wurde entsprechend der Southern-Analyse von ADAR1<sup>Δ2-13</sup>-Embryonen durchgeführt (Abb. 13). Drei ES-Zellklone mit korrekt rekombiniertem ADAR1-Allel und ohne Zufalls-Integrationen konnten identifiziert werden. Die Klone 192 und 438 wurden zur Generierung von ADAR1<sup>Δ2-13</sup>-Mäusen in C57BL/6-Mausblastocysten injiziert.

## **2.8 Etablierung der Mauslinie ADAR1<sup>Δ2-13</sup>**

Die aus der Blastocysten-Injektion des Klons 192 und des Klons 438 hervorgehenden 22 und 17 chimären Tiere, von denen 14 bzw. 11 hochchimär waren, zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten. In die Keimbahn transmittierende hochchimäre Männchen wurden zur Zucht heterozygoter F1-Tiere eingesetzt. Die phänotypisch normalen heterozygoten ADAR1<sup>Δ2-13</sup>-Tiere wurden untereinander zur Homozygotie verpaart. Wie bei der ADAR1<sup>Δ7-9</sup>-Mutante beobachtet, kamen keine homozygoten ADAR1<sup>Δ2-13/Δ2-13</sup>-Tiere zur Welt, während Heterozygote und Wildtypen im Verhältnis 2:1 auftraten (43 Heterozygote und 24 Wildtypen in 9 Würfen).



**Abb. 13.** Southern- und PCR-Analyse von  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Embryonen

(A) Southern-Analyse von EcoRI-geschnittener genomischer DNA aus Wildtyp- (wt), sowie heterozygoten (het) und homozygoten (hom)  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Embryonen. Die Maus-ADAR1-Intron 1-spezifische Sonde In1A (linkes Bild) erkennt je zwei EcoRI-Fragmente (4.2 Kb und 1.0 Kb) des  $ADAR1$ -Wildtyp-Allels und des  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Allels (11.2 Kb und 1.0 Kb). Die Maus-ADAR1-Intron 15-spezifische Sonde In15 detektiert je zwei EcoRI-Fragmente (17.7 Kb und 2.5 Kb) des  $ADAR1$ -Wildtyp-Allels und des  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Allels (11.2 Kb und 2.5 Kb). Die Neo-Sonde hybridisierte mit dem die Neo-Kassette enthaltenden 11.2 Kb-Fragment des  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Allels.

(B) PCR-Analyse genomischer DNA von 12 Embryonen aus einer  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Heterozygoten-Verpaarung. Wildtyp- (Spur 1, 5, 6, 8), heterozygote (Spur 2-4, 7, 9-10) und homozygote (Spur 11, 12)  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Embryonen mit Genotyp-Kontrollen für Wildtyp- (Spur 13), heterozygote (Spur 14) und homozygote (Spur 15)  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Embryonen sowie Wasserkontrolle (Spur 16) sind gezeigt. Zwei Spuren (M) wurden mit einem DNA-Größenmarker beladen.

### 2.8.1 Ermittlung des Todeszeitpunkts von $ADAR1^{\Delta 2-13/\Delta 2-13}$ -Embryonen

Die Ermittlung des Todeszeitpunkts von  $ADAR1^{\Delta 2-13/\Delta 2-13}$ -Embryonen erfolgte wie für Linie  $ADAR1^{\Delta 7-9}$  beschrieben. Es wurden Embryonen verschiedener Stadien (E16.5-E10.5) präpariert, auf Herzschlag untersucht und genotypisiert. Der Todeszeitpunkt der  $ADAR1^{\Delta 2-13/\Delta 2-13}$ -Embryonen stimmte mit dem Todeszeitpunkt von  $ADAR1^{\Delta 7-9/\Delta 7-9}$ -Embryonen überein.

und lag zwischen E11.5 und E12.5 (Tab. 3), wobei die für E12.5 typischen Merkmale nie beobachtet werden konnten.

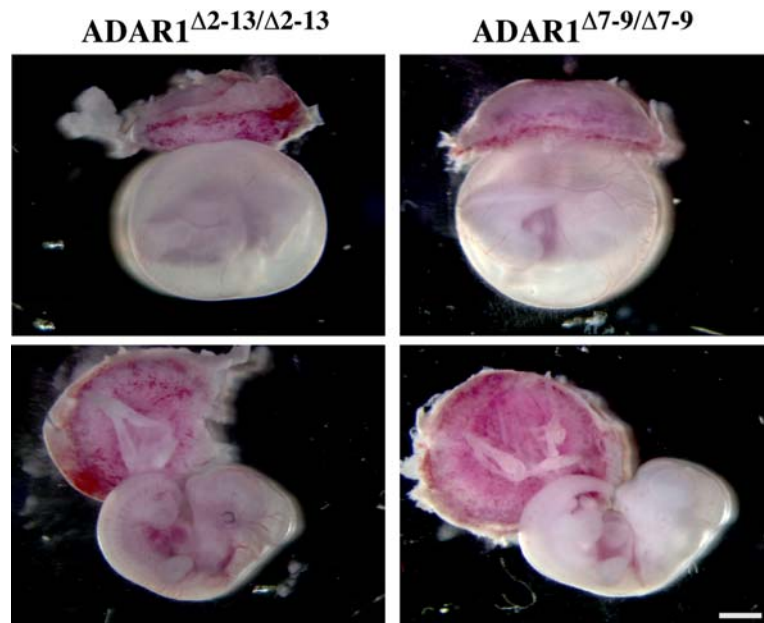
| Alter | W  | Gesamt | +/+ | $\Delta 2-13/+$ | $\Delta 2-13/\Delta 2-13$ | (Lebend) |
|-------|----|--------|-----|-----------------|---------------------------|----------|
| E12.5 | 4  | 37     | 15  | 16              | 6                         | (0)      |
| E12.0 | 9  | 96     | 22  | 46              | 28                        | (11)     |
| E11.5 | 17 | 183    | 45  | 89              | 49                        | (47)     |

**Tab. 3.** Genotypisierung ausgewählter Entwicklungsstadien von ADAR1 <sup>$\Delta 2-13$</sup> -Mutanten

Nachkommen aus ADAR1 <sup>$\Delta 2-13/+$</sup> -Verpaarungen wurden zu definierten Zeitpunkten genotypisiert. Embryonen wurden als lebend bezeichnet, wenn ihr Herz zum Zeitpunkt der Präparation schlug. Die Anzahl der analysierten schwangeren Weibchen (W), Wildtyp (+/+)-, heterozygoten ( $\Delta 2-13/+$ ) und homozygoten ( $\Delta 2-13/\Delta 2-13$ ) Embryonen ist angegeben.

### 2.8.2 Phänotyp der ADAR1 <sup>$\Delta 2-13/\Delta 2-13$</sup> -Embryonen

Homozygote ADAR1 <sup>$\Delta 2-13$</sup> -Embryonen waren von ADAR1 <sup>$\Delta 7-9/\Delta 7-9$</sup> -Embryonen phänotypisch nicht unterscheidbar (Abb. 14): Bis E11.5 bezogen auf Somitenpaarzahl und Extremitäten nicht unterentwickelt, waren ab E11.5 der Dottersack, die Leber und oft der Embryo an sich blass. Die Größe der fötalen Leber von ADAR1 <sup>$\Delta 2-13/\Delta 2-13$</sup> -Embryonen war ab E11.5 relativ zu Wildtyp- und heterozygoten reduziert. Plazenta und Herz erschienen normal. Zum Todeszeitpunkt um E12.5 waren ADAR1 <sup>$\Delta 2-13/\Delta 2-13$</sup> -Mutanten bezogen auf Wildtypen und Heterozygote gleichen Alters 0.25-0.75 Tage in ihrer Entwicklung zurückgeblieben, d.h. sie wiesen nie die für E12.5 typischen Entwicklungsmerkmale auf. Der Entwicklungszustand der ältesten erhaltenen Homozygoten entsprach, wie bei ADAR1 <sup>$\Delta 7-9$</sup> -Mutanten beobachtet, dem von E12.25-Embryonen.



**Abb. 14.** Gegenüberstellung von  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ - und  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Mutanten.

Die obere Reihe zeigt homozygote Embryonen (E12.5) beider  $ADAR1$ -Linien, umgeben von einem deutlich blassen Dottersack. Die untere Reihe zeigt die noch mit der Plazenta verbundenen Embryonen nach Entfernung des Dottersacks. Der weiße Strich entspricht 2 mm.

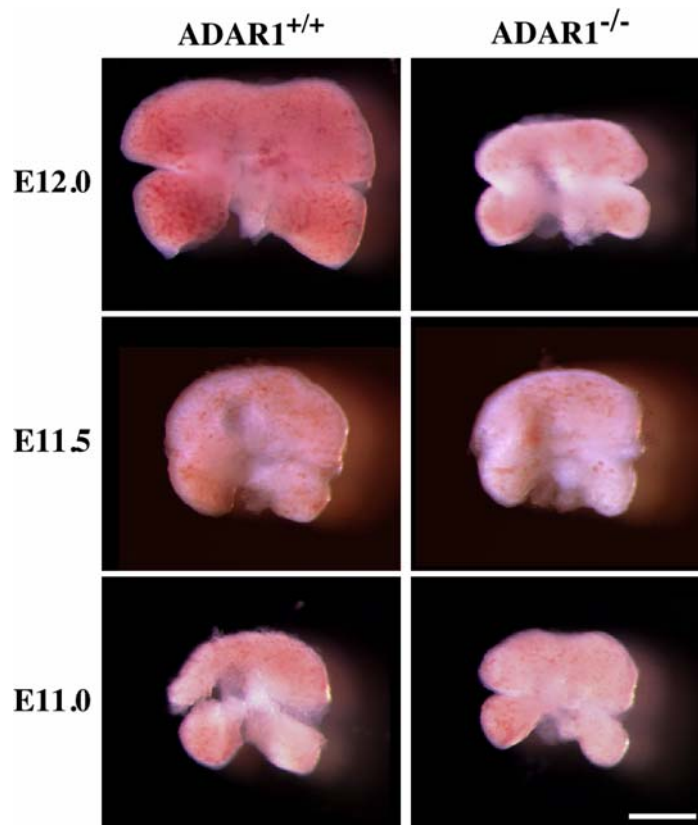
Die mit der Mauslinie  $ADAR1^{\Delta 2-13}$  erhaltenen Befunde deckten sich mit denen der Linie  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ . Damit war bestätigt, dass die bei der  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ -Mutante beobachtete embryonale Letalität durch  $ADAR1$ -Defizienz und nicht durch einen „gain-of-function“-Effekt eines von zwei  $ADAR1^{\Delta 7-9}$ -Allelen codierten Proteins hervorgerufen wurde. Aufgrund des nicht unterscheidbaren Phänotyps von  $ADAR1^{\Delta 7-9}$  und  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Mutanten werden beide Linien bei der Darstellung der folgenden Analysen zusammenfassend als  $ADAR1^{-/-}$ -Tiere bezeichnet. Aus logistischen Gründen wurde der Großteil der Analysen mit Linie  $ADAR1^{\Delta 2-13}$  durchgeführt.

## 2.9 Analyse $ADAR1$ -defizienter Embryonen

### 2.9.1 Größe der fötalen Leber von $ADAR1^{-/-}$ -Embryonen

Fötale Mutanten- und Wildtyp-Lebern verschiedener Stadien (E11.0, E11.5, E12.0) wurden präpariert und photographiert (Abb.15). Der Durchmesser des großen Leberlappens wurde durch Vermessung der Bilder bestimmt. Er nahm in homozygoten  $ADAR1$ -Mutanten zwischen E11.5 (1.3 mm, n = 4) und dem Todeszeitpunkt um E12.5 (1.3 mm, n = 3) nicht mehr zu, wohingegen sich in Heterozygoten und Wildtypen der Leber-Durchmesser in diesem Zeitraum von 1.3 mm (n = 6) auf 1.9 mm (n = 8) vergrößerte. Die fötale Leber war mit Ausnahme des blassen Dottersacks zwischen E11.5 und E12.0 das einzige auffallende Organ

in ADAR1-Nullmutanten. Andere Gewebe, wie das Herz und die Plazenta, waren makroskopisch unauffällig und dem ermittelten Entwicklungsstadium der Embryonen entsprechend ausgebildet (Daten nicht gezeigt). Hämorrhagien, die sich oft als Blutansammlungen in Körperhöhlen, wie die Gehirn-Ventrikel oder die Bauchhöhle, manifestieren, waren nicht erkennbar (Daten nicht gezeigt).

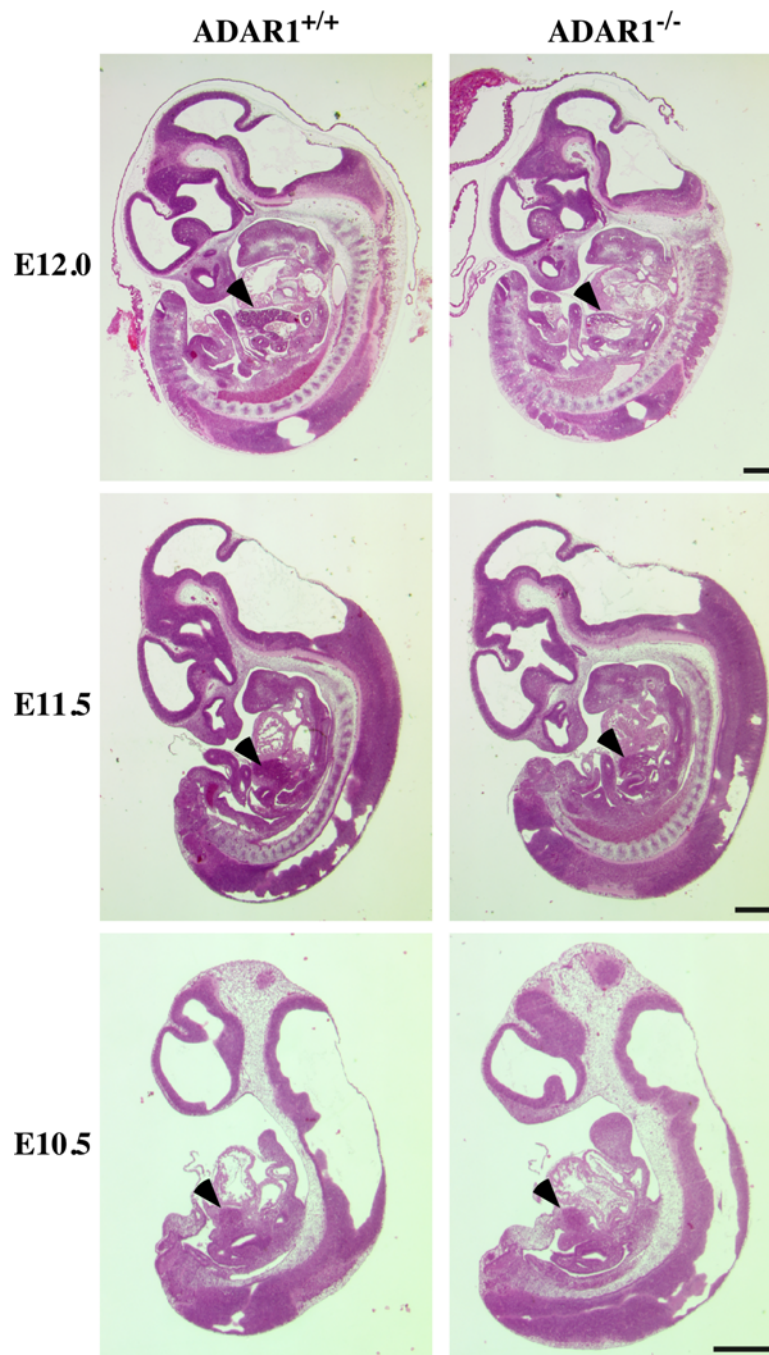


**Abb. 15.** Lebergröße ADAR1-defizienter Embryonen.

Abgebildet sind Lebern von E11.0- (untere Reihe), E11.5- (mittlere Reihe) und E12.0-Embryonen (obere Reihe). Die fötalen Lebern von Wildtypen (ADAR1<sup>+/+</sup>, linke Spalte) und Mutanten (ADAR1<sup>-/-</sup>, rechte Spalte) sind einander gegenübergestellt. Die Mutanten-Leber erscheint im Vergleich mit der Wildtyp-Leber ab E11.5 blass und nimmt nicht weiter an Größe zu. Der weiße Strich entspricht 0.5 mm.

### 2.9.2 Histologische Untersuchung von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen

Zur Untersuchung der Auswirkungen von ADAR1-Defizienz auf zellulärer Ebene wurde eine histologische Analyse von ADAR1-Mutanten durchgeführt.



**Abb. 16.** Histologische Färbung von ADAR1-Mutanten.

H&E-gefärbte Paraffinschnitte (5  $\mu$ m) Bouin's-fixierter Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien: E10.5 (untere Reihe), E11.5 (mittlere Reihe) und E12.0 (obere Reihe). Wildtypen (ADAR1<sup>+/+</sup>, linke Spalte)- und Mutanten (ADAR1<sup>-/-</sup>, rechte Spalte) sind einander gegenübergestellt. Fötale Lebern sind durch Pfeilspitzen markiert. Der schwarze Strich entspricht 0.5 mm.

Für die histologische Betrachtung der fötalen Leber und der übrigen Gewebe in ADAR1-defizienten Embryonen wurden sagittale und transversale Paraffin-Schnitte von E10.5-, E11.5- und E12.0-Embryonen angefertigt, mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt und mikroskopisch untersucht (Abb. 16). Die fötale Leber und die übrigen Gewebe der ADAR1-

Mutanten wurden durch Vergleich mit Wildtypen auf Auffälligkeiten untersucht. Insgesamt wurden 17 zwischen E10.5 und E12.5 alte Embryonen (ADAR1<sup>+/+</sup>, n = 6; ADAR1<sup>+/-</sup>, n = 3; ADAR1<sup>-/-</sup>, n = 8) aus 7 schwangeren Weibchen analysiert.

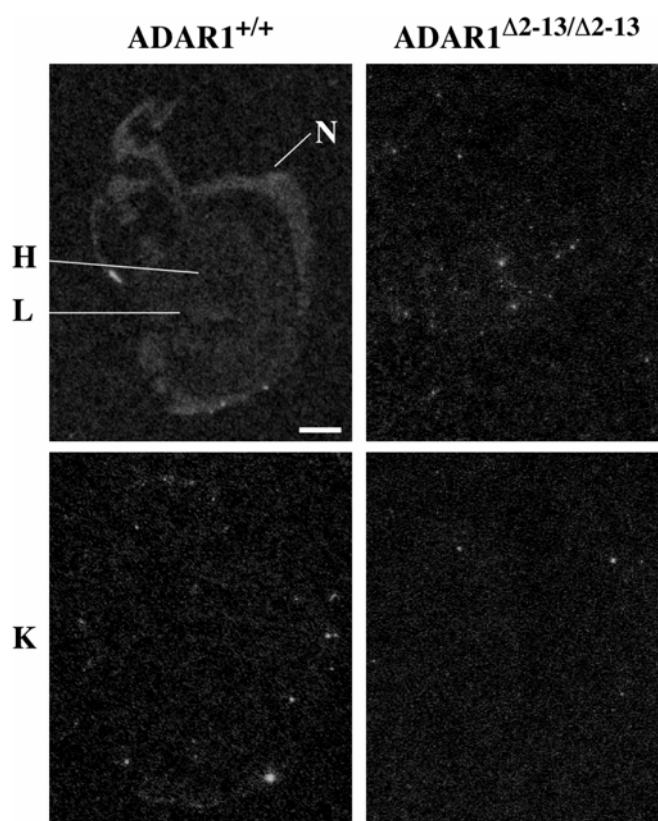
Bei E10.5 waren homozygote von heterozygoten ADAR1-Mutanten und Wildtypen histologisch nicht unterscheidbar (Abb. 16). Bei E11.5 war innerhalb der fötalen Leber ADAR1-defizienter Embryonen eine leicht verringerte Zelldichte und eine erhöhte Zahl pyknotischer (zerfallender) Zellkerne, ein Hinweis auf Zelltod, zu beobachten. Bei E12.0 war die Zelldichte in der Mutanten-Leber drastisch reduziert. Intraembryonische Defekte außerhalb der fötalen Leber, insbesondere des Herzens und des ZNS, von ADAR1-Mutanten konnten in keinem der analysierten Stadien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Histologisch unauffällig waren auch extraembryonische Gewebe (Plazenta und Dottersack, Daten nicht gezeigt). Blutansammlungen in Körperhöhlen (Hämorrhagien) konnten auch mikroskopisch nicht beobachtet werden (Abb. 16).

### 2.9.3 Expression von ADAR1

ADAR1 wird in ES-Zellen und vermutlich allen Geweben exprimiert. Eine In-situ-Hybridisierung sollte zeigen, ob der Zeitpunkt, an dem der beobachtete Phänotyp der fötalen Leber auftrat, mit einer Änderung der ADAR1-Expression in der Leber oder anderen Geweben einherging.

Im Hinblick auf den sich um E11.5 manifestierenden Phänotyp ADAR1-defizienter Embryonen wurde die Expression von ADAR1-Transkripten in Wildtyp-Embryonen diesen Alters mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) untersucht (Abb. 17). Sagittale Gefrierschnitte (15 µm) von E11.5-Embryonen wurden angefertigt und mit dem radioaktiv-markierten, ADAR1-spezifischen Oligonukleotid mDra154 inkubiert. Dieses Oligonukleotid hybridisiert mit Exon 2 von ADAR1-Transkripten, das ADAR1<sup>Δ2-13</sup>-Embryonen fehlt. ADAR1<sup>Δ2-13/Δ2-13</sup>-Mutanten wurden als Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Hybridisierung verwendet. Als weitere Kontrolle wurde ein 100-facher Überschuss an nicht-markiertem gegenüber markiertem Oligonukleotid verwendet.

Im Wildtyp war eine schwache Expression von ADAR1-Transkripten in allen Geweben detektierbar (Abb. 17), ein etwas stärkeres Signal zeigte sich im Neuroepithel des entstehenden ZNS. Die fötale Leber zeigte bei E11.5 keine signifikant höhere Expression von ADAR1-Transkripten als die übrigen Gewebe. Die Kontrollen lieferten kein ADAR1-Signal.



**Abb. 17.** Expression von ADAR1-Transkripten

Gezeigt ist die In-situ-Hybridisierung von Sagittalschnitten durch einen E11.5-Wildtyp- und -homozygoten  $ADAR1^{\Delta 2-13}$ -Embryo mit dem ADAR1-spezifischen Oligonukleotid mDra154. Schnitte, die mit markiertem Oligonukleotid hybridisiert wurden (obere Reihe) und Schnitte, die mit einem Überschuss an nicht-markiertem Oligonukleotid (Kontrolle, K) hybridisiert wurden (untere Reihe) sind dargestellt. Neuroepithel (N), Herz (H) und Leber (L) sind angezeigt. Schnitte des ADAR1-defizienten Embryos zeigten kein ADAR1-Signal. Zu beachten ist die prominente ADAR1-Expression im Neuroepithel. Der weiße Strich entspricht 1 mm.

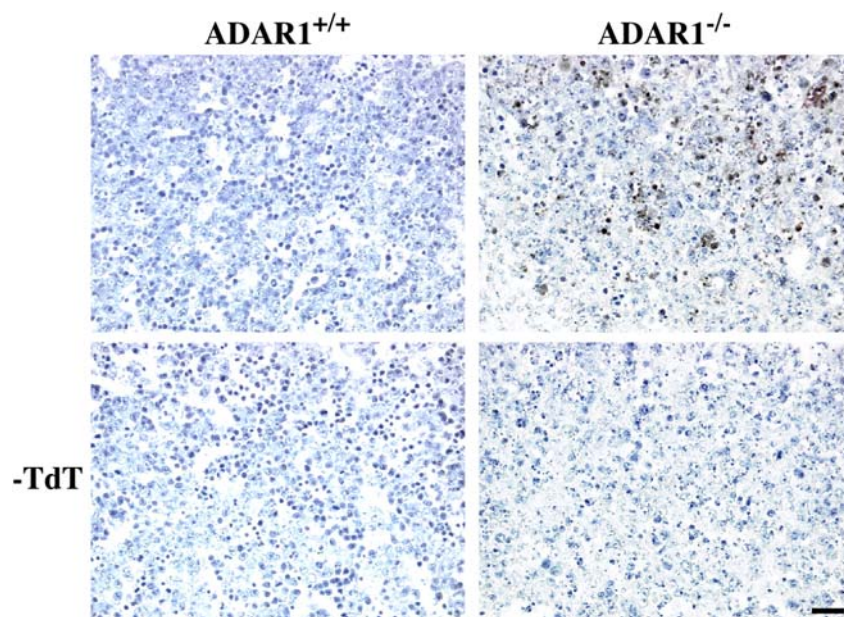
#### 2.9.4 Zelltod in der fötalen Leber von $ADAR1^{-/-}$ -Embryonen

Die um E12 drastisch reduzierte Zelldichte in  $ADAR1^{-/-}$ -Lebern relativ zu heterozygoten (Daten nicht gezeigt) und Wildtyp-Lebern könnte durch verminderte Proliferation und/oder vermehrten Zelltod (Nekrose oder Apoptose) von Zellen in der fötalen Leber bedingt sein. Der Nachweis apoptotischer Zellen in ADAR1-defizienten Embryonen erfolgte durch TUNEL („TdT-mediated dUTP nick end-labeling“).

Nekrose ist ein pathologischer Prozess, der stattfindet, wenn Zellen starkem physikalischen oder chemischen Stress ausgesetzt sind. Nekrotische Zellen schwellen aufgrund gestörter Osmoregulation und lysieren.

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein physiologischer Vorgang, bei dem nicht mehr benötigte Zellen, z.B. während der Embryogenese, eliminiert werden. Apoptotische Zellen zeigen Chromatinaggregation und Kondensation von Zellkern und Cytoplasma. Sie zerfallen

in apoptotische Körper mit intakter Zellmembran, die innerhalb weniger Stunden von Makrophagen oder benachbarten Epithelzellen phagocytiert werden. Ein biochemisches Kennzeichen apoptotischer Zellen ist eine Endonuklease-vermittelte Fragmentierung genomischer DNA, bei der freie 3'-Hydroxylgruppen („nicks“) entstehen. An diese Gruppen vermag das Enzym Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) freie Deoxynukleosid-Monophosphate anzuhängen (TUNEL-Reaktion). Der Deoxynukleosid-Phosphat-Mix enthält an Fluorescein gekoppeltes dUTP. Die Reaktion kann unter Licht einer definierten Wellenlänge oder mittels spezifischer Antikörper gegen Fluorescein sichtbar gemacht werden.



**Abb. 18.** Zelltod in der fötalen Leber von ADAR1-Mutanten.

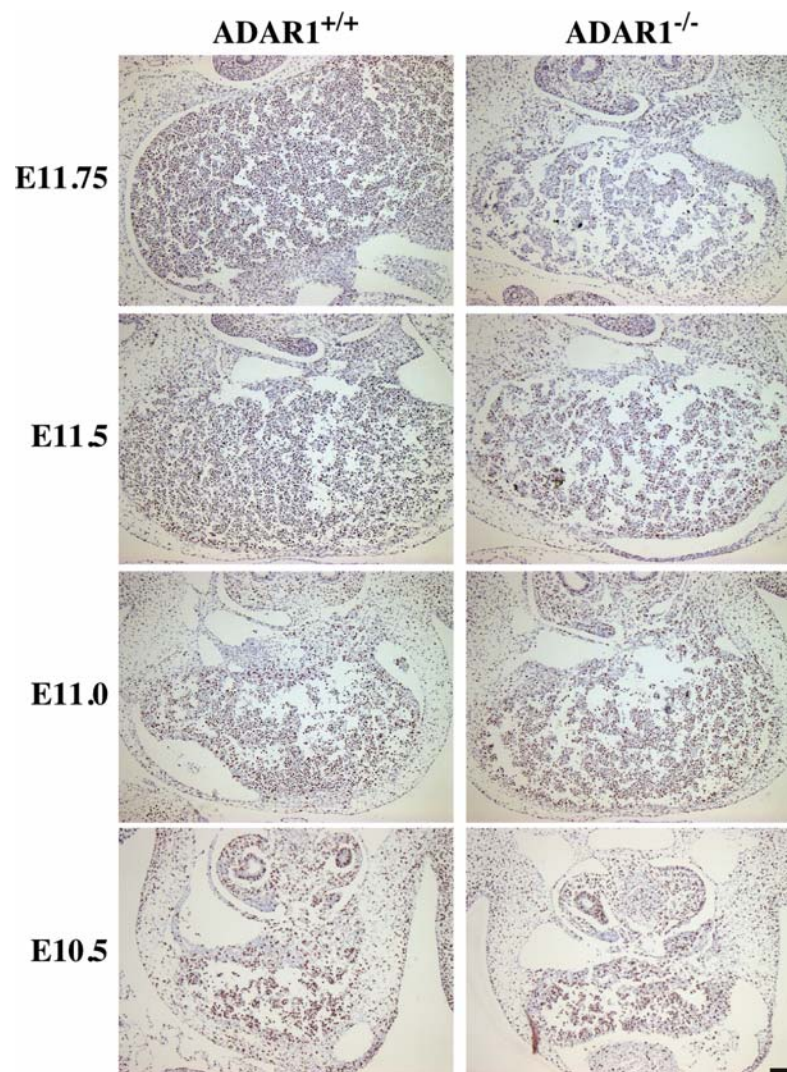
Transversalschnitte (5 µm Dicke) PFA-fixierter E11.5-Wildtyp- (linke Spalte) und E11.5-ADAR1-defizienter Embryonen (rechte Spalte). Die obere Reihe zeigt mit TdT behandelte Schnitte, TUNEL-positive Zellkerne sind braun gefärbt. Die untere Reihe zeigt ohne TdT-behandelte Schnitte als Negativkontrolle (-TdT). Mit Hämatoxylin gegengefärbte Zellkerne erscheinen blau. Zellkerne hämatopoietischer Zellen sind optisch dichter als Kerne von Hepatoblasten und treten daher dunkelblau hervor. Der schwarze Strich entspricht 30 µm.

Apoptose und Nekrose sind schwierig voneinander zu unterscheiden. Morphologische Kennzeichen apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen sind oft nur mittels Elektronenmikroskopie deutlich zu erkennen. DNA-Fragmentierung, die mittels TUNEL nachgewiesen wurde, kann auch in nekrotischen Zellen auftreten.

Transversalschnitte im Bereich der Leber ADAR1-defizienter Embryonen zeigten um E12.0 zahlreiche TUNEL-positive Zellen, die in heterozygoten und Wildtyp-Embryonen nur selten zu beobachten waren (Abb. 18). Außerhalb der fötalen Leber fanden sich in ADAR1-Nullmutanten keine Hinweise auf vermehrten Zelltod (Daten nicht gezeigt).

### 2.9.5 Zellproliferation in der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen

Bromodeoxyuridin (BrdU), ein Thymidin-Analog, wird während der S-Phase des Zellzyklus in replizierende DNA inkorporiert und kann über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. BrdU wurde schwangeren Weibchen intraperitoneal verabreicht, eineinhalb Stunden später wurden die Weibchen getötet und die Embryonen präpariert und fixiert. Von den Embryonen wurden Transversalschnitte angefertigt, die mit einem BrdU-spezifischen Antikörper zum Nachweis proliferierender Zellen immungefärbt wurden (Abb. 19). Es wurden je zwei ADAR1<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Embryonen bei E10.5, E11.0, E11.5 und E11.75 analysiert.



**Abb. 19.** Zell-Proliferation in der fötalen Leber von ADAR1-Mutanten.

Die Zellkerne proliferierender Zellen (braun) in Transversalschnitten (5 µm dick) PFA-fixierter Wildtyp- (linke Spalte) und ADAR1-defizienter Embryonen (rechte Spalte) verschiedener Entwicklungsstadien wurden mit α-BrdU detektiert. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die deutlich verringerte Zelldichte der fötalen Leber in der E11.5- und E11.75-Mutante ist klar erkennbar. Der schwarze Strich entspricht 100 µm.

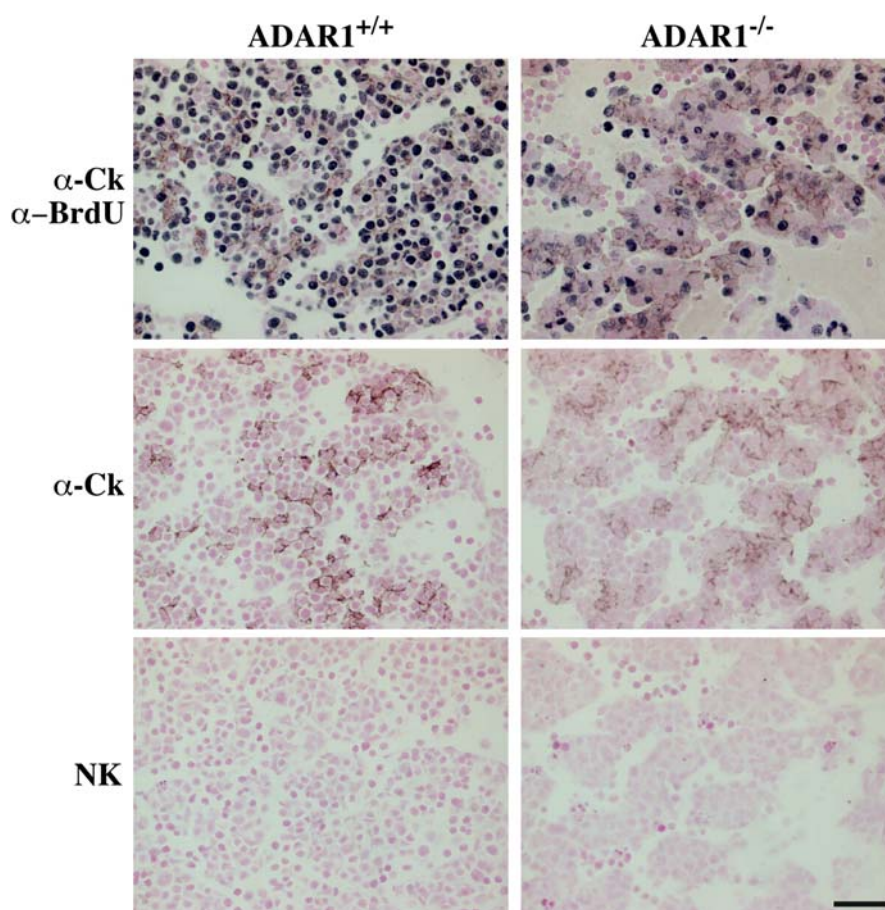
Die Quantifizierung proliferierender Zellen erfolgte über Bestimmung der Zellzahl in mindestens zwei verschiedenen Bereichen der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Embryonen. Pro Bereich wurden mehr als 500 Zellen ausgezählt. Der Anteil BrdU-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl eines ausgezählten Bereichs wurde ermittelt. Bei E10.5 und E11.0 stimmte die Anzahl proliferierender Zellen in fötalen Lebern von ADAR1-Nullmutanten und Wildtypen überein. Bei E11.5 war die Zahl BrdU-positiver Zellen in der fötalen Leber von ADAR1-defizienten Embryonen relativ zu Wildtypen auf 70 Prozent und bei E11.75 auf 30 Prozent reduziert. Außerhalb der fötalen Leber zeigten sich zwischen ADAR1-Mutanten- und Wildtypen keine Unterschiede in der Anzahl proliferierender Zellen (Daten nicht gezeigt).

### **2.9.6 Proliferation von Hepatoblasten und erythroiden Zellen in der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen**

Die Ergebnisse der TUNEL- und BrdU-Experimente zeigten, dass die in ADAR1-defizienten Embryonen ab E11.5 beobachtete Reduktion der Zelldichte in der fötalen Leber auf drastisch verminderte Zell-Proliferation und vermehrten Zelltod zurückzuführen ist. Die zum Zeitpunkt, an dem sich der Phänotyp von ADAR1-Mutanten manifestierte (E11.5), vorherrschenden Zelltypen in der fötalen Leber sind hämatopoietische Zellen und Hepatoblasten, aus denen in der weiteren Entwicklung Hepatocyten hervorgehen. Hämatopoietische Zellen besiedeln ab etwa E9 das sich aus Hepatoblasten bildende Leberparenchym und expandieren hier, bevor ab E11 die Leber zum wichtigsten blutbildenden Gewebe der weiteren Embryonalentwicklung wird. Es galt nun herauszufinden, welcher der genannten Zelltypen aufgrund verminderter Proliferation und vermehrtem Zelltod an der Ausbildung des letalen Phänotyps ADAR1-defizienter Embryonen beteiligt war. Hierzu wurden Immundoppelfärbungen unter Verwendung von Antikörpern, die hämatopoietische Zellen bzw. Hepatoblasten erkennen, in Kombination mit einem BrdU-Antikörper, der proliferierende Zellen detektiert, durchgeführt.

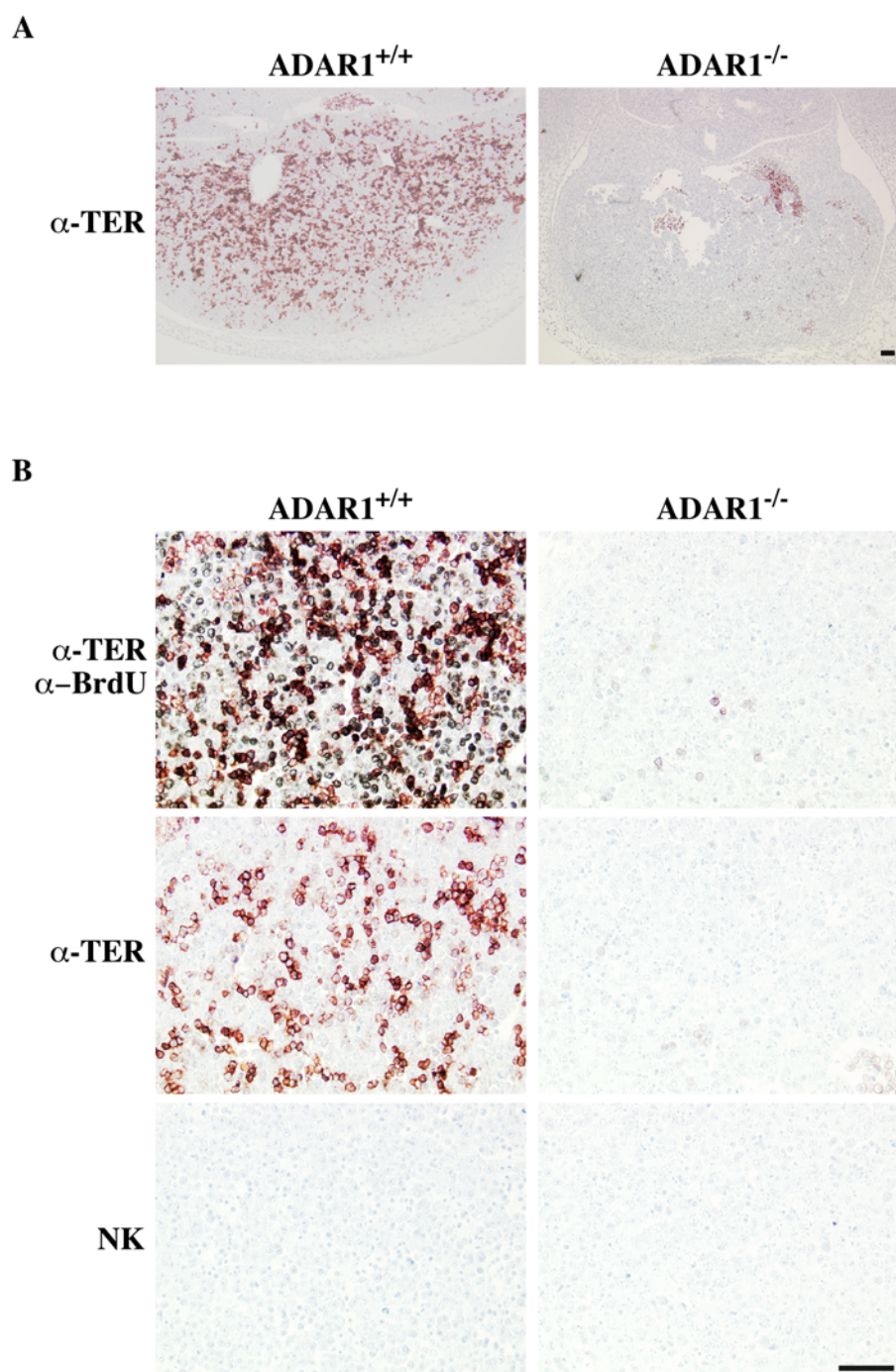
Intermediärfilamente von Hepatoblasten wurden mit  $\alpha$ -Cytokeratin (Pan), einem Antikörper-Cocktail, der gegen verschiedene Cytokeratin-Typen gerichtete Antikörper enthält, identifiziert. Hämatopoietische Zellen werden von  $\alpha$ -Cytokeratin nicht erkannt.

Die Anzahl Cytokeratin-positiver Zellen in der fötalen Leber von ADAR1-Nullmutanten bei E11.5 entsprach der von Wildtypen (Abb. 20), d.h. Hepatoblasten waren in ADAR1<sup>-/-</sup>-Lebern nicht unterrepräsentiert. Das Cytokeratinsignal von ADAR1-defizienten Hepatoblasten war etwas schwächer als bei Wildtyp-Hepatoblasten. Die Zahl BrdU-positiver Zellen in der fötalen Leber von ADAR1-Mutanten war bezogen auf Wildtyp drastisch reduziert, wogegen die Anzahl BrdU/Cytokeratin-doppelpositiver Zellen unverändert war. Dieser Befund zeigte, dass die Proliferation von Hepatoblasten durch ADAR1-Defizienz nicht beeinträchtigt wurde.



**Abb. 20.** Proliferation Cytokeratin-positiver Zellen in der fötalen Leber von ADAR1-Nullmutanten. Mit Cytokeratin- und Bromodeoxyuridin-spezifischen Antikörpern ( $\alpha$ -Ck und  $\alpha$ -BrdU) immunodoppelfärbte (obere Reihe), mit  $\alpha$ -Ck gefärbte (mittlere Reihe) und ohne Primärantikörper (Negativkontrolle (NK), untere Reihe) behandelte Paraffin-Schnitte (5  $\mu$ m Dicke) von PFA-fixierten E11.5-Wildtypen- und E11.5-Mutanten im Bereich der fötalen Leber sind dargestellt. Zellkerne BrdU-positiver Zellen sind blaugrün, das Cytoplasma Ck-positiver Zellen ist braun gefärbt. Gegengefärbte Zellkerne erscheinen pink. Der schwarze Strich entspricht 50  $\mu$ m.

Hämatopoietische Zellen der erythroiden Linie, die um E11.5 in der fötalen Leber dominiert, exprimieren das Oberflächen-Antigen TER-119, das mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden kann. Die Anzahl TER-119-positiver Zellen in der fötalen Leber von ADAR1-Nullmutanten war bei E11.5 relativ zu Wildtyp-Embryonen gleichen Alters drastisch reduziert (Abb. 21). Die wenigen TER-119-positiven Zellen in den Lebersinusoiden ADAR1-defizienter Embryonen wurden morphologisch als Dottersack-Erythrozyten identifiziert (Abb. 21A). Eine Immundoppelfärbung von BrdU- und TER-119-positiven Zellen zeigte, dass erythroide Vorläuferzellen von ADAR1-Nullmutanten ab E11.5 einen massiven Proliferationsdefekt aufwiesen, der in Kombination mit vermehrtem Zelltod die beobachtete Hypozellularität der fötalen Leber hinreichend erklärt (Abb. 21B).



**Abb. 21.** Proliferation TER-119-positiver Zellen in der fötalen Leber von ADAR1-Nullmutanten

(A) Mit TER-119 ( $\alpha$ -TER)-spezifischem Antikörper immungefärbte Paraffin-Schnitte (5  $\mu$ m, untere Reihe) von Bouins-fixierten E11.5-Wildtypen- und E11.5-Mutanten im Bereich der fötalen Leber sind gezeigt. TER-119-positive Zellen erscheinen rotbraun, gegengefärbte Zellkerne blau. Der schwarze Strich entspricht 50  $\mu$ m.

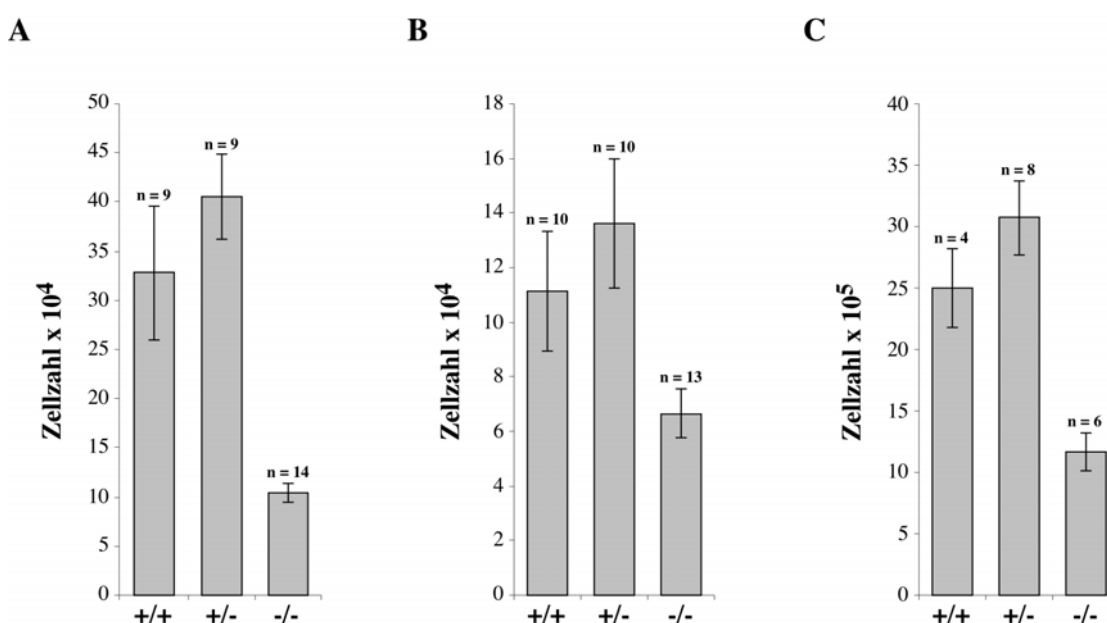
(B) Mit TER-119 ( $\alpha$ -TER)- und Bromodeoxyuridin ( $\alpha$ -BrdU)-spezifischen Antikörpern immundoubletgefärbte (obere Reihe), mit  $\alpha$ -TER gefärbte (mittlere Reihe) und ohne Primärantikörper (NK, Negativkontrolle) behandelte Paraffin-Schnitte (5  $\mu$ m, untere Reihe) von mit Bouin's-Lösung fixierten E11.5-Wildtypen- und E11.5-Mutanten im Bereich der fötalen Leber sind gezeigt. Zellkerne BrdU-positiver Zellen sind graugrün, die Oberfläche TER-119-positiver Zellen ist rotbraun gefärbt. Gegengefärbte Zellkerne erscheinen blau. Der schwarze Strich entspricht 50  $\mu$ m.

### 2.9.7 Zellzahl in hämatopoietischen Geweben von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen

Die Ergebnisse der TER-119/BrdU-Immundoppelfärbung werden unterstützt durch Experimente, die in Zusammenarbeit mit Prof. Albrecht Müller und Carolin Schmittwolf an der Universität Würzburg durchgeführt wurden. Diese Experimente beinhalteten die Bestimmung der Zellzahl in hämatopoietischen Geweben und Methylzellulose-Kulturen hämatopoietischer Vorläufer.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden Einzelzellsuspensionen hämatopoietischer Gewebe hergestellt. Die Anzahl lebender Zellen in der fötalen Leber, im Dottersack und im peripheren Blut von E11.5-Embryonen wurde unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Tote Zellen, die sich mit Trypan-Blau anfärben lassen, wurden nicht gezählt.

Die Zellzahl in Leber, Dottersack und peripherem Blut von ADAR1<sup>+/-</sup>-Embryonen entsprach der von Wildtypen. ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen zeigten bei E11.5 eine signifikante Reduktion der Zellzahl in den genannten Geweben relativ zu Wildtyp- und ADAR1<sup>+/-</sup>-Embryonen (Abb 22). Die Zellzahl in Homozygoten bezogen auf Wildtypen und Heterozygote betrug bei E11.5 in der fötalen Leber 28 %, im Dottersack 54 % und im peripheren Blut 40 %.



**Abb. 22.** Zellzahlen hämatopoietischer Gewebe von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen

Dargestellt ist die Anzahl lebender Zellen bei E11.5 in hämatopoietischen Geweben von Wildtypen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) ADAR1-Mutanten als arithmetisches Mittel  $\pm$  S.E.M. Gezeigt sind die Anzahl lebender Zellen in fötaler Leber (A), Dottersack (B) und peripherem Blut (C). Die Anzahl (n) der analysierten Gewebe ist angegeben. Sie stammten von Embryonen aus 4 Weibchen.

Bei E9.5 und E10.5 zeigten die fötale Leber und der Dottersack von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen relativ zu Wildtyp- und heterozygoten Embryonen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahl (Daten nicht gezeigt).

### 2.9.8 Methylzellulose-Kultur hämatopoietischer Vorläufer aus ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen

Hämatopoietische Vorläufer-Zellen aus fötaler Leber, Dottersack und peripherem Blut von E11.5-Embryonen wurden in Methylzellulose, einem semisoliden Medium, kultiviert. Durch Applikation spezifischer Faktoren wurde das Wachstum verschiedener hämatopoietischer Zell-Linien stimuliert. Nach einer definierten Zeit in Kultur wurden die entstandenen Kolonien visuell identifiziert und quantitativ ausgewertet.

Nach Bestimmung der Zahl lebender Zellen in den präparierten Geweben wurden  $1 \times 10^4$  Zellen ausplattiert. Das Wachstum von erythroiden Kolonien wurde mit Erythropoietin und Interleukin-6 stimuliert. CFU-E (koloniebildende erythroide Einheiten) wurden 3 Tage und die relativ zu CFU-E weniger festgelegten BFU-E („burst“-bildende erythroide Einheiten) 5 Tage nach Aussähen der Vorläuferzellen gezählt. Das Wachstum nicht-erythroider myeloider Vorläufer (CFU-G/M), darunter granuloide und Makrophagen-Vorläufer, wurde mit PWM-SCCM (konditioniertes Medium aus der Milz) stimuliert. CFU-G/M-Kolonien wurden 9 Tage nach dem Aussähen gezählt.

ADAR1-defiziente Vorläufer aus fötaler Leber und Dottersack zeigten bei E11.5 ein drastisch reduziertes Potential, im Methylzellulose-Versuch erythroide sowie nicht-erythroide myeloide Kolonien zu bilden (Tab. 4). Die Anzahl der von ADAR1-defizienten Vorläufern aus fötaler Leber gebildeten Kolonien bezogen auf Wildtypen und Heterozygote betrug 3 % für BFU-E, 0.03 % für CFU-E und 1.4 % für CFU-G/M.

| Genotyp | BFU-E                 | CFU-E                 | CFU-G/M              |
|---------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| +/+     | 79297 ± 16664 (n = 2) | 36954 ± 11410 (n = 6) | 1915 ± 1232 (n = 10) |
| +/-     |                       |                       |                      |
| -/-     | 2624 ± 539 (n = 4)    | 13 ± 17 (n = 4)       | 27 ± 30 (n = 8)      |

**Tab. 4.** CFU-C-Aktivität hämatopoietischer Vorläufer aus fötaler Leber von ADAR1-Mutanten

Einzelzell-Suspensionen fötaler Lebern von E11.5-Embryonen wurden in Methylzellulose plattiert ( $10^4$  Zellen pro Gewebe). Dargestellt sind die Koloniezahlen pro Gewebe in Wildtypen (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) ADAR1-Mutanten als arithmetisches Mittel ± Standardabweichung. Die Anzahl (n) der analysierten Gewebe ist angegeben.

ADAR<sup>-/-</sup>-Vorläufer aus Dottersack bildeten keine CFU-E und 2.5 % CFU-G/M relativ zu Wildtypen und Heterozygoten.

Bei E9.5 und E10.5 zeigten fötale Leber und Dottersack im Methylzellulose-Versuch keine signifikanten Unterschiede zwischen homozygoten und Wildtyp-/heterozygoten Embryonen bezüglich der Anzahl erythroider Kolonien (Daten nicht gezeigt).

## 3. Diskussion

### 3.1 ADAR1-Defizienz und Hämatopoiese

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ADAR1-Defizienz in der Maus zu einem hämatopoietischen Defekt während der Embryonalentwicklung führt. Die Blutbildung der Maus beginnt im extraembryonalen Dottersack mit der Ausbildung von Blutinseln bei E7-7.5 (Palis und Yoder, 2001). Die in den Dottersack-Blutinseln gebildeten primitiven Erythrozyten vermitteln den Gasaustausch zwischen Embryo und maternalem Blut. Während die blutbildende Aktivität des Dottersacks zwischen E11 und E12 drastisch abnimmt, zeigt die fötale Leber einen massiven Anstieg hämatopoietischer Aktivität und wird zum wichtigsten blutbildenden Gewebe der weiteren Embryonalentwicklung. Die fötale Leber besitzt keine autonome hämatopoietische Aktivität (Johnson und Moore, 1975). Sie wird von hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Dottersack und der intraembryonischen Sp/AGM (Splanchnopleura/Aorta-Gonaden-Mesonephros)-Region besiedelt. Die Sp/AGM-Region wurde erst vor wenigen Jahren als blutbildendes Gewebe identifiziert und wird als wichtige Quelle hämatopoietischer Vorläuferzellen diskutiert (Medvinsky et al., 1993; Godin et al., 1993; Müller et al., 1994). Bis dahin galt der Dottersack als das einzige vor der fötalen Leber hämatopoietisch aktive Gewebe. Vorläufer, die sich im Parenchym der fötalen Leber angesiedelt haben, benötigen dieses Milieu („microenvironment“) für ihre Expansion, Linien-Festlegung und Differenzierung in diverse Blutzelltypen (Kinoshita et al., 1999). Bis zu 90 Prozent der um E13 in der fötalen Leber angesiedelten hämatopoietischen Vorläufer differenzieren in reife Erythrozyten (Johnson und Moore, 1975). Reife Erythrozyten aus der fötalen Leber gewährleisten die Sauerstoffversorgung des sich rasch entwickelnden Embryos. Gegen Ende der Embryonalentwicklung, wenn die Leber wichtige metabolische Funktionen übernimmt (Zaret, 1998), wird die Produktion reifer Erythrozyten und aller anderen Blutzelltypen in die Milz und das Knochenmark verlagert (Russell, 1979). Die Entwicklung und Funktion des hämatopoietischen Systems wird durch ein komplexes Netzwerk aus Zell-Zell-, DNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen gesteuert (Orkin, 1996; Shivdasani und Orkin, 1996; Cantor und Orkin, 2001). Eine Störung dieses komplexen Systems führt zu einem breiten Spektrum von Defekten der embryonalen bzw. adulten Blutbildung.

Im Laufe dieser Arbeit berichtete Kazuko Nishikuras Labor (Wang et al., 2000) embryonale Letalität einer ADAR1-Mutante um E14.5, die hochchimär bezüglich Zellen mit einem inaktivierten ADAR1-Allel war. Aufgrund der embryonalen Letalität der Hochchimären war es Wang et al. nicht möglich, Keimbahntransmission des veränderten ADAR1-Allels zu zeigen. Hochchimäre Embryonen zeigten ab E12.5 bezogen auf Wildtyp eine verringerte Zahl reifer Erythrozyten im peripheren Blut, eine reduzierte Zelldichte in der fötalen Leber und starben um E14.5.

Der embryonale Tod hochchimärer ADAR1-Mutanten (Wang et al., 2000) steht in starkem Gegensatz zu den hier präsentierten Befunden, die zeigten, dass Embryonen mit einem ADAR1-Nullallel und einem ADAR1-Wildtyp-Allel phänotypisch unauffällig waren, wohingegen Embryonen mit zwei ADAR1-Nullallelen zwischen E11.5 und E12.5 starben. Die Diskrepanz der Befunde beider Gruppen könnte sich aus Unterschieden in den jeweils verwendeten „Targeting“-Konstrukten oder im verwendeten genetischen Hintergrund ergeben haben. Dennoch zeigte der kongruente Phänotyp beider in dieser Arbeit vorgestellten ADAR1-Mutanten, von denen einer die nahezu komplette proteinkodierende Region des ADAR1-Gens fehlt, deutlich, dass ein intaktes ADAR1-Allel für eine normale embryonale und postnatale Entwicklung ausreichend ist.

### **3.2. Beziehung von ADAR1-Nullmutanten zu anderen embryonal letalen Mausmutanten mit hämatopoietischen Defekten**

Der Vergleich ADAR1-defizienter Embryonen mit Mausmutanten, die hämatopoietische Defekte und embryonale Letalität zeigten, sollte Hinweise liefern auf die Rolle von ADAR1 innerhalb des hämatopoietischen Systems.

ADAR1-defiziente Embryonen hatten beginnend mit E11.75 einen relativ zu Wildtyp zunehmend blassen Dottersack. Der Dottersack beginnt bei E7.5 mit der Bildung primitiver Erythrozyten und der Ausbildung von Blutgefäßen. Der Vergleich mit Mutanten, die eine defekte Blutzell- bzw. Blutgefäßbildung im Dottersack hatten, lieferte keine Hinweise auf eine gestörte Bildung von primitiven Erythrozyten und Blutgefäßen im Dottersack ADAR1-defizienter Embryonen:

Transkriptionsfaktor tal-1/SCL- und Rbtn-2/Lmo2-defiziente Embryonen zeigten einen vollständigen Block der Dottersack-Erythropoese, der sich durch Fehlen primitiver Erythrozyten manifestierte (Robb et al., 1995; Shivdasani, 1995a; Warren et al., 1994). Diese Mutanten waren blass und starben zwischen E8.5 und E10.5.

Embryonen, denen die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Flk-1 (Fötale Leber-Kinase-1) fehlte, hatten einen frühen Defekt bei der Entwicklung hämatopoietischer und endothelialer Zellen (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997). Flk-1-Nullmutanten bildeten keine Dottersack-Blutinseln, keine primitiven Erythrozyten und keine organisierten Blutgefäße. Sie starben zwischen E8.5 und E9.5.

In ADAR1-defizienten Embryonen war der Dottersack vor E11.75 nicht auffällig. Blutinseln und Blutgefäße im Dottersack sowie zahlreiche zirkulierende primitive Erythrozyten waren in ADAR1-defizienten Embryonen ausgebildet und morphologisch nicht auffällig (Daten nicht gezeigt). Histologisch war die Dottersack-Vaskulatur ADAR1-defizienter Embryonen von

Wildtyp nicht unterscheidbar. Durch eine immunhistochemische Färbung mit  $\alpha$ -PECAM-1 („platelet-endothelial cell adhesion molecule“-1), einem gegen Endothelzellen gerichteten Antikörper, konnten kleinste Blutgefäße des Dottersacks sichtbar gemacht werden. Sie waren bezüglich Durchmesser und Verzweigung von Wildtyp nicht unterscheidbar (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl proliferierender Zellen im Dottersack von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen entsprach Wildtyp, gezeigt durch eine BrdU-Analyse (Daten nicht gezeigt).

Der Dottersack ADAR1-defizienter Embryonen wurde erst nach Manifestation des Leber-Phänotyps blass und war morphologisch nicht auffällig. Dies lässt vermuten, dass der blasser Dottersack ADAR1-defizienter Embryonen eine Konsequenz des hämatopoietischen Defekts in der fötalen Leber ist.

Einige embryonal letale Mausmutanten zeigten neben einer gestörten Leber-Hämatopoiese auch Defekte anderer Gewebe, wie Plazenta, Herz oder ZNS. ADAR1-defiziente Embryonen zeigten bis zu ihrem Tod zwischen E11.5 und E12.5 keine Anzeichen für eine Fehlentwicklung dieser Gewebe:

Mitogen-aktivierte-Protein-Protein-Kinase c-Raf-1<sup>-/-</sup>-Embryonen hatten neben einer unterentwickelten fötalen Leber infolge massiven Zelltodes von Hepatoblasten und hämatopoietischen Zellen eine defekte Plazenta (Mikula et al., 2001; Hüser et al., 2001). Die Labyrinth- und Spongiotrophoblast-Schicht der Plazenta von c-Raf-1<sup>-/-</sup>-Embryonen war deutlich kleiner als in Wildtyp. Die Plazenta von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen war auch nach Manifestation des Leberphänotyps makroskopisch und histologisch von Wildtyp-Plazenta nicht unterscheidbar (Daten nicht gezeigt).

Transkriptionsfaktor c-Jun-defiziente Embryonen zeigten extensiven Zelltod von Hepatoblasten und hämatopoietischen Zellen in der fötalen Leber und starben um E13 (Eferl et al., 1999). Das Herz von c-Jun-Nullmutanten zeigte Missbildungen im Bereich des Ausström-Trakts. Das Herz von ADAR1-defizienten Embryonen war makroskopisch wie histologisch nicht auffällig und kontrahierte rhythmisch bis zum Eintritt des Todes um E12 (Daten nicht gezeigt).

Transkriptionsfaktor GATA-3-defiziente Embryonen hatten eine schwer gestörte Leber-Hämatopoiese assoziiert mit schweren Missbildungen des ZNS und starben zwischen E11 und E12 (Pandolfi et al., 1995). Retinoblastom-Empfänglichkeits-Gen *Rb*-defiziente Embryonen zeigten eine gestörte Leber-Erythropoiese, Anämie und neuronalen Zelltod und starben gegen E14 (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). Das ZNS von ADAR1-Mutanten war bis zum Eintritt des Todes nicht auffällig, beurteilt nach vollständiger Schließung des Neuralrohrs, Morphologie, Histologie und Anzahl proliferierender und sterbender Zellen relativ zu Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Die fötale Leber von ADAR1-defizienten Embryonen zeigte ab E11.5 eine relativ zu Wildtyp deutlich verminderte Zahl hämatopoietischer Zellen. Die Anzahl erythroider Zellen, welche das Oberflächenantigen TER-119 exprimieren, war in der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen verglichen mit Wildtyp drastisch reduziert. Myeloide Vorläufer, einschließlich erythroider, granuloider und Makrophagen-Vorläufer, aus der fötalen Leber von ADAR1-Nullmutanten hatten bei E11.5 ein drastisch reduziertes Potential, in vitro Kolonien zu bilden. Die wichtigsten in der fötalen Leber gebildeten Blutzellen sind reife Erythrozyten. Sie müssen die transiente Population primitiver Erythrozyten aus dem Dottersack nach und nach ersetzen, um die Sauerstoffversorgung des schnell sich entwickelnden Embryos zu gewährleisten.

Eine wichtige Funktion bei der Bildung reifer Erythrozyten hat das Glykoprotein-Hormon Erythropoietin (Epo), welches das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung erythroider Vorläuferzellen fördert (Krantz, 1991). Die spezifische Wirkung von Epo auf erythroide Zellen wird durch die gewebespezifische Expression seines dimeren Rezeptors, ein Mitglied der Cytokin-Rezeptor-Familie, vermittelt (D'Andrea et al., 1989). Epo wird während der mittleren Embryonalentwicklung in der fötalen Leber produziert, der Epo-Rezeptor (EpoR) wird vor allem von späten erythroiden Vorläufern exprimiert (Koury et al., 1991).

Epo- und EpoR-defiziente Embryonen konnten keine reifen Erythrozyten in der fötalen Leber bilden und starben zwischen E13 und E15 (Wu et al., 1995; Lin et al., 1996). Epo- und EpoR-defiziente Embryonen und Dottersäcke wurden ab E10.5 infolge einer relativ zu Wildtyp abnehmenden Zahl primitiver Erythrozyten blass. Die fötale Leber zeigte bei E12.5 bezogen auf Wildtyp eine 4-5fach reduzierte Größe, eine deutlich verminderte Zellzahl und enthielt zahlreiche pyknotische Zellkerne, ein Hinweis auf apoptotische Zellen. Die Anzahl später erythroider Vorläufer in der fötalen Leber von Epo-defizienten Embryonen entsprach Wildtyp (Wu et al., 1995). Diese Vorläufer konnten nicht in reife Erythrozyten differenzieren und starben. Dies führte zu einem vollständigen Block der Leber-Erythropoiese. Das Potential nicht-erythroider myeloider Vorläufer aus der fötalen Leber von Epo- und EpoR-Nullmutanten, in vitro Kolonien zu bilden, entsprach Wildtyp.

In der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen war die Anzahl sowohl erythroider als auch nicht-erythroider myeloider Vorläufer mit in vitro koloniebildendem Potential bei E11.5 relativ zu Wildtyp drastisch vermindert. Von nicht-erythroiden Vorläufern gebildete Blutzellen übernehmen erst gegen Ende der Embryonalentwicklung essentielle Funktionen:

Transkriptionsfaktor PU.1-defiziente Embryonen, die keine Makrophagen, Granulozyten und lymphoiden Zellen bildeten, starben nicht vor E18.5 (Scott et al., 1994; McKercher et al., 1996). Transkriptionsfaktor NF-E2-Nullmutanten, denen infolge eines Megakaryozyten-Defekts zirkulierende Blutplättchen fehlten, starben kurz nach Geburt (Shivdasani et al., 1995b; Shivdasani und Orkin, 1995c).

Das relativ zu Wildtyp bei E11.5 drastisch reduzierte Potential sowohl erythroider als auch nicht-erythroider myeloider Vorläufer aus der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen, in vitro Kolonien zu bilden, deutete auf einen Defekt bei der Bildung, Erhaltung, Proliferation bzw. dem Überleben früher myeloider Vorläufer hin.

Eine wichtige Rolle beim Überleben und der Proliferation früher hämatopoietischer Vorläufer spielt der Transkriptionsfaktor GATA-2 (Yamamoto et al., 1990). GATA-2 ist Mitglied einer Familie von Zink-Finger-Proteinen, die ein GATA-Konsensus-Motiv erkennen (Evans und Felsenfeld, 1989; Tsai et al., 1989). Das GATA-Motiv ist in regulatorischen Elementen zahlreicher Gene, die in hämatopoietischen Zellen exprimiert werden, zu finden (Evans et al., 1988). GATA-2 wird innerhalb des hämatopoietischen Systems besonders in frühen Vorläufern, aber auch in differenzierten Blutzellen exprimiert. In-vitro-Expressionsstudien haben gezeigt, dass eine hohe GATA-2-Expression in hämatopoietischen Vorläufern die Proliferation auf Kosten der Differenzierung dieser Vorläufer förderte (Briegel et al., 1993). GATA-2 zeigt Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, darunter auch das Gründungsmitglied der GATA-Familie, GATA-1 (Evans et al., 1988): Eine zunehmende GATA-1 Expression in differenzierenden Vorläufern geht mit einer abnehmenden GATA-2-Expression einher, und aus GATA-1-defizienten ES-Zellen in vitro differenzierte primitive Erythrozyten zeigten bezogen auf Wildtyp-Zellen eine 50fach erhöhte GATA-2-Expression (Weiss et al., 1994). Auf welche Weise GATA-2 und GATA-1 ihre Expression gegenseitig beeinflussen, ist nicht bekannt.

Die Ausschaltung des GATA-2-Gens in der Maus führte zu embryonaler Letalität zwischen E10.5 und E11.5 (Tsai et al., 1994). GATA-2-defiziente Embryonen und Dottersäcke waren ab E9.5 blass, und die Anzahl primitiver Erythrozyten war verglichen mit Wildtyp leicht reduziert. Das Potential myeloider Vorläufer aus Dottersäcken GATA-2-defizienter Embryonen, in vitro Kolonien zu bilden, war bei E9.5 relativ zu Wildtyp drastisch reduziert. Aufgrund des embryonalen Todes vor dem fötalen Leber-Stadium der Hämatopoiese wurde eine Chimärenanalyse mit GATA-2<sup>-/-</sup>-ES-Zellen durchgeführt (Tsai et al., 1994). Während GATA-2<sup>-/-</sup>-Zellen einen geringen Beitrag zu primitiven Erythrozyten zeigten, waren sie in Blutzellen aus der fötalen Leber und adulten hämatopoietischen Geweben nicht nachweisbar, mit Ausnahme eines geringen Beitrags zu Thymus und Milz in adulten Chimären. Die In-vitro-Differenzierung von GATA-2<sup>-/-</sup>-ES-Zellen zeigte, dass die Proliferation und das Überleben früher hämatopoietischer Vorläufer verglichen mit Wildtyp drastisch reduziert war, während die Differenzierung dieser Vorläufer, mit Ausnahme der Mastzell-Differenzierung, durch GATA-2-Defizienz nicht beeinträchtigt war (Tsai und Orkin, 1997).

Das bei E11.5 vorhandene, wenn auch drastisch reduzierte Potential in vitro koloniebildender myeloider Vorläufer aus der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen könnte auf einen Defekt bei der Proliferation bzw. dem Überleben früher Vorläufer, wie bei GATA-2-defizienten Embryonen beobachtet, hindeuten. Allerdings könnten die wenigen Vorläufer, die bei E11.5 in der fötalen Leber ADAR1-defizienter Embryonen nachweisbar waren, auch aus dem

Dottersack stammen. Dadurch kann ein Defekt bei der Bildung myeloider Vorläufer in der AGM-Region nicht ausgeschlossen werden.

Eine wichtige Funktion bei der Bildung hämatopoietischer Vorläufer hat der Transkriptionsfaktor AML1, der durch seine Beteiligung an der Entstehung akuter myeloider Leukämie (AML) infolge einer Chromosomentranslokation identifiziert wurde (Miyoshi et al., 1991). AML1 wird während der Embryonalentwicklung u.a. in Dottersack-Blutinseln, definitiven hämatopoietischen Vorläufern und Endothelzellen exprimiert (North et al., 1999). AML1 könnte für das Abschnüren hämatopoietischer Zellen von definitivem hämatogenem Endothel in Vitellin-, Umbilical-, Dottersack-Gefäßen und ventraler Dorsalaorta benötigt werden (North et al., 1999).

Die Inaktivierung der AML1-Genfunktion in der Maus verursachte embryonale Letalität zwischen E11.5 und E12.5 (Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996a,b). AML1-defiziente Embryonen zeigten einen schweren Defekt bei der Bildung definitiver Blutzellen, der sich durch das Fehlen hämatopoietischer Zellen in der fötalen Leber manifestierte. Myeloide Vorläufer mit in vitro koloniebildendem Potential waren in der fötalen Leber und im Dottersack AML1-defizienter Embryonen bei E11.5 nicht vorhanden. Die Bildung primitiver Erythrozyten im Dottersack war durch AML1-Defizienz nicht beeinträchtigt. Eine Chimärenanalyse mit AML1<sup>-/-</sup>-ES-Zellen zeigte, dass hämatopoietische Gewebe adulter Chimären (Knochenmark, peripheres Blut, Milz und Thymus) keine AML1<sup>-/-</sup>-Zellen enthielten (Okuda et al., 1996). AML1<sup>-/-</sup>-ES-Zellen ließen sich in vitro nicht in definitive Blutzellen differenzieren, während die Differenzierung in primitive Erythrozyten durch AML1-Defizienz nicht beeinträchtigt war (Okuda et al., 1996). Neben dem hämatopoietischen Defekt entwickelten AML1<sup>-/-</sup>-Embryonen beginnend mit E11.5 massive innere Blutungen, die sich durch Ansammlung primitiver Erythrozyten im Pericard, Peritoneum und in den Gehirnventrikeln manifestierten.

Defekte bei der Bildung bzw. Expansion hämatopoietischer Vorläufer könnten zu der drastisch reduzierten hämatopoietischen Aktivität in der fötalen Leber von ADAR1-defizienten Embryonen bei E11.5 geführt haben. Eine reduzierte hämatopoietische Aktivität in der fötalen Leber könnte aber auch durch einen Defekt bei der Ansiedelung blutbildender Vorläufer im Leberstroma erklärt werden: Die fötale Leber besitzt keine autonome blutbildende Aktivität (Johnson und Moore, 1975), d.h. sie muss von hämatopoietischen Vorläufern aus anderen Geweben besiedelt werden. Eine wichtige Rolle bei der Ansiedelung dieser Vorläufer im Stroma hämatopoietischer Gewebe spielen von Integrinen vermittelte Zell-Zell-Kontakte (Fässler und Meyer, 1995; Hirsch et al., 1996).  $\beta$ 1-Integrin-defiziente multipotente hämatopoietische Vorläufer konnten die fötale Leber, das Knochenmark und den Thymus chimärer Tiere nicht besiedeln, während die Proliferation und Differenzierung dieser Vorläufer in vitro durch  $\beta$ 1-Integrin-Defizienz nicht beeinträchtigt war. Die Interaktion von hämatopoietischen Zellen und fötalem Leber-Parenchym ist nicht nur für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wichtig: Hepatoblasten erzeugen ein „microenvironment“, in dem

hämatopoietische Vorläufer expandieren und differenzieren können. Das Leberstroma produziert z.B. das Cytokin SCF („stem cell factor“), welches die Proliferation bzw. das Überleben hämatopoietischer Vorläufer in der fötalen Leber fördert (Ogawa et al., 1993; Sicurella et al., 2001). Hämatopoietische Zellen produzieren z. B. das Cytokin Oncostatin M, welches gegen Ende der Embryonalentwicklung die Differenzierung von Hepatoblasten in Hepatozyten induziert (Miyajima et al., 2000).

Der Vergleich von ADAR1-defizienten Embryonen mit anderen embryonal letalen Mutanten, die hämatopoietische Defekte aufwiesen, konnte den Tod von ADAR1-defizienten Embryonen zwischen E11.5 und E12.5 als Folge eines hämatopoietischen Defekts in der fötalen Leber nicht hinreichend erklären.

### **3.3 Eingrenzung des hämatopoietischen Defekts**

Die Ursache des hämatopoietischen Defekts und damit die Funktion von ADAR1 innerhalb des blutbildenden Systems ist nicht leicht zu untersuchen. Die Komplexität dieses Systems erfordert, den durch ADAR1-Defizienz verursachten Defekt bei der Blutbildung einzugrenzen, um die Funktion von ADAR1 innerhalb dieses Systems untersuchen zu können.

Folgende Fragen ergeben sich hinsichtlich der Eingrenzung des hämatopoietischen Defekts von ADAR1-defizienten Embryonen: (1) Ist die drastisch reduzierte Zahl hämatopoietischer Zellen in der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen ab E11.5 die Folge eines Mangels an hämatopoietischen Vorläufern in der AGM-Region? (2) Ist die Einwanderung bzw. Ansiedelung solcher Vorläufer in der fötalen Leber von ADAR1<sup>-/-</sup>-Embryonen gestört? (3) Können eingewanderte hämatopoietische Vorläufer in der fötalen Leber ADAR1-defizienter Embryonen nicht ausreichend expandieren bzw. differenzieren, und (4) welche Rolle spielt das ADAR1-defiziente Leberstroma in seiner Funktion als „microenvironment“ bei der Ansiedelung, Erhaltung, Proliferation und Differenzierung dieser Vorläufer?

Eine CFU-S-Analyse, die frühe myeloide Vorläufer nachweist, könnte klären, ob diese Vorläufer infolge ADAR1-Defizienz bereits in der AGM-Region, noch bevor sie in die fötale Leber einwandern, fehlen oder unterrepräsentiert sind. Der Vergleich von CFU-S-Aktivität in der AGM-Region und der fötalen Leber könnte Hinweise auf eine gestörte Besiedelung der fötalen Leber durch Vorläufer aus der AGM-Region liefern.

Die CFU-S-Analyse basiert auf der Eigenschaft früher myeloider Vorläufer aus hämatopoietischen Geweben, in der Milz letal bestrahlter Empfängermäuse makroskopisch sichtbare Kolonien zu bilden. Entsprechend werden solche Vorläufer als CFU-S („colony-forming unit-spleen“) bezeichnet. Die CFU-S-Aktivität in der AGM-Region nimmt zwischen E10 und E11 drastisch zu, und nach E11 schnell wieder ab. Der Anstieg der CFU-S-Aktivität

in der AGM-Region geht dem Anstieg dieser Aktivität in der fötalen Leber etwa einen halben Tag voraus (Medvinsky et al., 1993). Eine CFU-S-Analyse der AGM-Region und fötalen Leber von E11-Embryonen würde die Quantifizierung von CFU-S-Aktivität in beiden Geweben erlauben.

Eine Chimärenanalyse mit ADAR1-defizienten ES-Zellen, welche bereits zur Verfügung stehen, könnte zur Eingrenzung des hämatopoietischen Defekts beitragen und Hinweise auf die Bedeutung von ADAR1 innerhalb des „microenvironment“ hämatopoietischer Zellen liefern. Mit der Herstellung chimärer Tiere über die Injektion von ADAR1<sup>-/-</sup>-ES-Zellen in ADAR1-Wildtyp-Blastocysten könnte der embryonale Tod ADAR1-defizienter Mäuse zwischen E11.5 und E12.5 umgangen werden und der Anteil ADAR1-defizienter Zellen an verschiedenen Geweben während der Embryonalentwicklung nach E12.5 und im adulten Tier bestimmt werden.

Die Bestimmung der Position in der hämatopoietischen Hierarchie, an der ADAR1 für eine funktionierende Blutbildung benötigt wird, kann wichtige Hinweise auf die Funktion von ADAR1 innerhalb des hämatopoietischen Systems liefern.

Die In-vitro-Differenzierung von ES-Zellen in hämatopoietische Zellen ist ein etabliertes System für die Rekapitulation der hämatopoietischen Entwicklung im lebenden Organismus (Weiss, 1997). Unter definierten Wachstumsbedingungen können aus ES-Zellen schrittweise hämatopoietische Vorläufer und differenzierte Zellen gebildet werden. Tsai und Orkin (1997) fanden eine Kombination von Wachstumsfaktoren, welche die Expansion multipotenter Vorläufer und ihre anschließende Differenzierung förderte. Damit zeigten Tsai und Orkin, dass die Proliferation und das Überleben, nicht aber die Differenzierung GATA-2-defizienter multipotenter Vorläufer relativ zu Wildtyp drastisch reduziert war. Diese Ergebnisse konnten mit Vorläufern aus dem Dottersack GATA-2-defizienter Embryonen bestätigt werden.

Hämatopoietische Vorläufer erythroider und nicht-erythroider myeloider Zellen aus der fötalen Leber ADAR1-defizienter Embryonen hatten ein drastisch reduziertes, aber noch vorhandenes Potential, in vitro Kolonien zu bilden. Dies könnte auf einen quantitativen Defekt myeloider Vorläufer hindeuten. Mit der In-vitro-Differenzierung ADAR1-defizienter ES-Zellen kann untersucht werden, inwieweit sich ADAR1-Defizienz auf die Proliferation, Erhaltung, das Überleben bzw. die Differenzierung hämatopoietischer Vorläufer auswirkt.

Der Phänotyp einer Zelle wird durch zellspezifische Genexpression bestimmt. Eine Analyse der Genexpression in ADAR1-defizienten hämatopoietischen Zellen bzw. Geweben könnte dazu beitragen, Gene zu identifizieren, deren Expression durch ADAR1-Defizienz verändert ist und damit auch den hämatopoietischen Defekt eingrenzen. Für die Analyse der Genexpression stehen verschiedene Methoden zur Verfügung: Eine RT-PCR-Analyse erlaubt die qualitative und semi-quantitative Untersuchung ausgewählter Gene. Die cDNA-Array-

Technik erlaubt die Expression einer Vielzahl von Genen in Zellen oder Geweben zu quantifizieren (Lockhart und Winzeler, 2000).

### **3.4 Die Funktion von ADAR1 im Embryo nach E12.5 und in postnatalen Stadien**

Die physiologische Bedeutung von ADAR1 während der Embryonalentwicklung nach E12.5 und in postnatalen Stadien konnte durch den embryonalen Tod ADAR1-defizienter Embryonen nicht untersucht werden. Dies würde erfordern, den durch ADAR1-Defizienz verursachten embryonalen Tod zwischen E11.5 und E12.5 zu umgehen:

Die ubiquitäre Expression von ADAR1 und die Möglichkeit eines embryonal letalen Phänotyps von ADAR1-Nullmutanten wurde durch Verwendung des Cre/loxP-Systems (Rajewsky, et al., 1996) bei der Herstellung der Mauslinie ADAR1<sup>f7-9</sup> berücksichtigt: Das Cre/loxP-System erlaubt eine regionsspezifische ADAR1-Inaktivierung in ADAR1<sup>f7-9</sup>-Tieren durch regionsspezifische Expression von Cre-Rekombinase. Der kritische Faktor bei diesem Ansatz ist die Verfügbarkeit geeigneter transgener Linien, die Cre regionsspezifisch exprimieren.

In Kombination mit dem Tetrazyklin-abhängigen Expressionssystem (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1993, 1994) ermöglicht das Cre/loxP-System die durch Tetrazyklin-kontrollierte Cre-Expression vermittelte regionsspezifische bzw. ubiquitäre Inaktivierung von ADAR1 zu einem beliebigen Zeitpunkt. Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass ADAR1 nach Cre-Expression irreversibel inaktiviert wäre.

Durch eine zeitlich regulierbare An- und Abschaltung der ADAR1-Expression könnten die physiologischen Konsequenzen eines temporären Verlustes von untersucht werden. Eine Tetrazyklin- oder RU-486-abhängige Expression von ADAR1 wäre denkbar (Clackson, 1997): Das Tetrazyklin-System wurde erfolgreich für die Vorderhirn-spezifische zeitlich regulierbare Expression der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR-A angewendet (Mack et al., 2001). Das RU-486-System wurde erfolgreich eingesetzt für eine Leber-spezifische induzierbare Expression von humanem Wachstumshormon (Wang et al., 1997)

Die Verfügbarkeit ADAR1<sup>f7-9</sup>-Mäusen mit den mutierten loxP-511-Elementen (Hoess et al., 1986; Lee und Saito, 1998) und Mutanten mit einem von Wildtyp-loxP-Elementen flankierten ADAR2-Genbereich (Higuchi et al., nicht publiziert) erlaubt die regionsspezifische bzw. simultane Ausschaltung beider Deaminasen durch Verpaarung gefloxter Doppelmутanten mit geeigneten Cre-exprimierenden Mauslinien. Die Effekte einer Doppelinaktivierung könnten Hinweise über ein mögliches Zusammenspiel von ADAR1 und ADAR2, insbesondere bei der RNA-Editierung von Transkripten im ZNS, geben.

## 4. Material und Methoden

Materialien und Methoden, die zur Anwendung kamen, hier aber nicht explizit aufgeführt sind, wurden folgenden Nachschlagewerken entnommen:

Current Protocols in Molecular Biology

F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl  
John Wiley & Sons, Inc., 1989

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition

J. Sambrock, D. W. Russell

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

Gene Targeting: A Practical Approach

A. L. Joyner

Oxford University Press, 1993

Manipulating the Mouse Embryo

B. Hogan, R. Beddington, F. Costantini, E. Lacy

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

The Atlas of Mouse Development

M. H. Kaufman

Academic Press, 1999

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Eukaryontische Zellen

R1 ES-Zellen: Pluripotente embryonale Stammzellen (Passage 12) aus der inneren Zellmasse von 129/SVx129/SVJ-Mausblastozysten (Nagy et al., 1993)

Feeder-Zellen: Primäre Maus-Fibroblasten aus E13.5 NMRI-Embryonen (Passage 2)

#### 4.1.2 Mauslinien

C57Bl/6NCrI BR: Fa. Charles River (Deutschland)

NMRI: Fa. Charles River (Deutschland)

Cre-Deleter: Klaus Rajewsky (Köln)

**4.1.3 Lösungen**

|                     |                                                                                                              |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 x PBS (pH 7,3)   | 1400 mM NaCl<br>80 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>27 mM KCl |
| Proteinase K-Lösung | 10 mg/ml Proteinase K (Roche)<br>15 mM NaCl<br>10 mM Tris-HCl, pH 7,6                                        |
| 20 x SSC            | 3 M NaCl<br>0.3 M Na-Citrat                                                                                  |
| TEN-Puffer          | 100 mM Tris-HCl, pH 8,0<br>5 mM EDTA, pH 8,0<br>200 mM NaCl                                                  |
| TENS-Puffer         | 60 mM Tris-HCl, pH 8,0<br>120 mM EDTA, pH 8,0<br>120 mM NaCl<br>1,2% [w/v] SDS                               |

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Kultur, Transformation und Selektion von murinen ES-Zellen

Pluripotente murine R1 embryonale Stammzellen wurden in ES-Zellmedium („Dulbecco’s modified Eagle medium“ (DMEM) mit 4500 mg/l Glukose, 2 mM Glutamin, 0.1 mM nicht essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 0.1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20% fötalem Kälberserum, 50  $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin und 1000 U/ml Leukämie-Inhibierungsfaktor) auf infolge Mitomycin C-Behandlung mitotisch inaktiven primären Maus-Fibroblasten (Feederzellen) oder auf mit Gelatine (0,1 %)-beschichteten Kulturplatten kultiviert. Der "gene targeting"-Vektor wurde mittels Restriktionsverdau linearisiert, nach Ethanolpräzipitation in PBS gelöst und über eine mit PBS umgepufferte Gelfiltrationssäule (Chroma Spin TE-1000, Clontech) aufgereinigt. Linearisierter, gereinigter Vektor (30  $\mu$ g) wurde unter Verwendung eines BioRad Genepulsers mit 500  $\mu$ FD und 240 V in R1-ES-Zellen elektroporiert. Die transformierten Zellen wurden für 11 Tage mit G418 (250  $\mu$ g/ml) auf Gelatine-Platten selektioniert. G418-resistente Klone wurden isoliert expandiert. Ein Teil der Zellen wurde für die Isolierung genomischer DNA zur PCR-Analyse verwendet, ein Teil wurde auf Feeder-Zellen expandiert, eingefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. PCR-positive Klone wurden aufgetaut, expandiert und mittels Southern-Analyse ihrer genomischen DNA auf das korrekte Rekombinationsereignis im ADAR1-Lokus sowie zufällige Integrationen überprüft. Richtig rekombinierte Klone wurden nach Expansion bis zur Injektion in murine Blastocysten in flüssigem Stickstoff gelagert oder zunächst unter hohen G418-Dosen (2-3 mg/ml) auf Gelatine-Platten selektioniert nach ADAR1<sup>-/-</sup>-Zellen, die zwei rekombinierte ADAR1-Allele aufwiesen. Der Verlust des Wildtyp-ADAR1-Allels wurde mittels PCR und Southern-Analyse nachgewiesen.

### 4.2.2 Herstellung und Haltung transgener Mäuse

Mausblastozysten-Injektionen und Embryo-Transfers wurden in der transgenen Einheit des ZMBH von Frank Zimmermann und Sascha Dlugosz durchgeführt. Die Versuchstiere wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen in der Versuchstierhaltung des ZMBH und im zentralen Tierlabor des MPI gehalten. Die behördliche Zulassung der transgenen Manipulationen erfolgte durch das Regierungspräsidium Karlsruhe.

### 4.2.3 Bestimmung des Entwicklungsstadiums von Maus-Embryonen

Für jedes der analysierten Entwicklungsstadien wurden nach Kaufman (The Atlas of Mouse Development, 1999) typische Merkmale definiert. Anhand dieser Merkmale konnte der Entwicklungszustand von Embryonen zwischen E11.0 und E12.5 bis auf 0.25 Tage genau bestimmt werden (Tab. 5).

| Stadien       | Kriterien |                                                                  |
|---------------|-----------|------------------------------------------------------------------|
| <b>E10.5</b>  | 1         | 35-39 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge = 4.6 mm (fixiert)                              |
|               | 3         | Vorderextremität rostral aufsteigend                             |
|               | 4         | Hinterextremität rostral nicht aufsteigend                       |
|               | 5         | Caudaler Neuroporus fast vollständig geschlossen                 |
| <b>E11.0</b>  | 1         | 39-42 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge etwa 5 mm (fixiert)                             |
|               | 3         | Vorderextremität mit proximalem und distalem Teil                |
|               | 4         | Hinterextremität ohne proximalen und distalen Teil               |
| <b>E11.25</b> | 1         | 40-45 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge = 5-5.5 mm (fixiert)                            |
|               | 3         | Vorderextremität bildet proximalen und distalen Teil             |
|               | 4         | Hinterextremität bildet ansatzweise proximalen und distalen Teil |
| <b>E11.5</b>  | 1         | 43-46 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge = 5.8 mm (fixiert)                              |
|               | 3         | Vorderextremität bildet proximalen und distalen Teil             |
|               | 4         | Hinterextremität bildet proximalen und distalen Teil             |
|               | 5         | Maxillare Komponente des 1. Kiemenbogens prominent               |
| <b>E11.75</b> | 1         | 45-48 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge = 6-6.5 mm (fixiert)                            |
|               | 3         | Handplatte paddelförmig                                          |
|               | 4         | Hinterextremität bildet proximalen und distalen Teil             |
| <b>E12.0</b>  | 1         | 48-52 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge = 7.0 mm (fixiert)                              |
|               | 3         | Handplatte zeigt angulare Konturen                               |
|               | 4         | Fußplatte paddelförmig                                           |
| <b>E12.25</b> | 1         | 48-52 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge = 7-7.5 mm (fixiert)                            |
|               | 3         | Handplatte zeigt digitale Zwischenzonen (Strahlen)               |
|               | 4         | Fußplatte zeigt ansatzweise angulare Konturen                    |
|               | 5         | Physiologische Hernie sichtbar                                   |
| <b>E12.5</b>  | 1         | 50-55 Somitenpaare                                               |
|               | 2         | Kopf-Rumpf-Länge = 7.5-9.5 mm (fixiert)                          |
|               | 3         | Handplatte zeigt digitale Zwischenzonen (Strahlen)               |
|               | 4         | Fußplatte zeigt angulare Konturen                                |
|               | 5         | Physiologische Hernie deutlich sichtbar                          |

**Tab. 5.** Merkmale embryonaler Entwicklungsstadien

Für jedes der gezeigten Stadien wurden 4-5 typische makroskopisch sichtbare Merkmale nach Kaufman, 1999 definiert.

#### 4.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Ein 10 µl PCR-Ansatz enthielt PCR-Puffer (GibcoBRL), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP-Mix (0,2 mM pro Nukleotid), spezifische Sinn- und Gegensinn-Oligonukleotide (jeweils 0,4 µM), 0.2 Un

Taq-Polymerase und ddH<sub>2</sub>O. Dem Ansatz wurde 1 µl Matrizen-DNA-Lösung (10-100ng/µl) beigelegt. Einer initialen Denaturierung (10 min, 94 °C) folgten 20-35 Zyklen mit je 20 s, 94 °C (Denaturierung), 55 °C, 30 s (Oligonukleotid-Anlagerung), 72 °C, 1 min/Kb (Extension). Nach dem letzten Zyklus wurde eine finale Extension (5 min bei 72 °C) durchgeführt.

#### **4.2.5 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA erfolgte, basierend auf der Kettenterminations-Methode (Sanger et al., 1977), nach Protokollen der Firma ABI (Applied Biosystems) mittels "Dye Terminator Cycle Sequencing" auf der automatischen Sequenziermaschine 377. Pro Reaktion wurden 100-200 ng/Kb Plasmid bzw. 10-20 ng/Kb PCR-Produkt in 5,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl Oligonukleotid (10 µM) und 4 µl „Big-Dye-Terminator“-Mix (ABI) eingesetzt.

#### **4.2.6 Isolierung genomischer DNA für PCR-Analyse**

Ein Stück Dottersack oder Schwanzspitze wurde mit 1 mg Proteinase K in TENS-Puffer übernacht bei 55 °C mit 300 Upm verdaut, die genomische DNA mit 2-Propanol präzipitiert, in 70 % Ethanol gewaschen und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Genotypisierung erfolgte über Multiplex-PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide.

Für die schnelle Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung von Embryonen wurde folgende Methode angewendet: Ein Stück Schwanz (etwa 2 mm) von E10-E12-Embryonen wurde in 30 µl ddH<sub>2</sub>O für 20 min bei 94°C erhitzt, auf RT gekühlt und durch Pipettieren zerkleinert. Nach 3 min Zentrifugation mit 13000 Upm wurde 1 µl des DNA-haltigen Überstands für die Genotypisierung mittels Multiplex-PCR eingesetzt.

#### **4.2.7 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA**

Für die Gewinnung hochmolekularer genomischer DNA aus Embryonen oder Lebern adulter Mäuse wurden etwa 80 mg Gewebe mechanisch zerkleinert und in 5 ml TEN-Puffer mit 40 mg Proteinase K und 0.6 % SDS für 1-2 Tage bei 55 °C unter leichtem Schütteln (40 Upm) inkubiert. Nach 2-3maliger Phenol-Chloroform-Extraktion und 2-3maliger Chloroform-Extraktion wurde die in der wässrigen Phase gelöste DNA mit 10 % 3M Natrium-Acetat und zwei Volumen Ethanol bei Raumtemperatur präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, abgetropft und in 0.5-1.5 ml ddH<sub>2</sub>O bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler (40 Upm) gelöst.

#### **4.2.8 Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung**

Paraffinschnitte von Bouin's- oder Paraformaldehyd-fixiertem embryonalem Gewebe wurden mit Xylol entwachst, über abnehmende Ethanol-Konzentrationen schrittweise rehydriert, in Gill's Hematoxylin No. 3 (PolySciences, Inc.) gefolgt von Eosin Y (PolySciences, Inc.) gefärbt, in Ethanol entfärbt, in Xylol geklärt und mit Permount (Fisher Scientific) eingebettet.

#### **4.2.9 In-Situ-Hybridisierung (nach Wisden und Morris, 1994)**

Sagittale Gefrierschnitte (15 µm Dicke) von E11.5-Embryonen wurden mit 4 % PFA in PBS bei 4 °C für 5 min leicht fixiert, mit kaltem PBS gewaschen und mit ansteigenden Ethanol-

Konzentrationen schrittweise dehydriert und luftgetrocknet. Die Konzentration von Oligonukleotid mDra154 (42 Nt) wurde auf 0.3  $\mu$ M, was 4.3 ng/ $\mu$ l entspricht, eingestellt. Die radioaktive Markierung von 0.3 pmol mDra154 erfolgte über TdT-vermitteltes Anhängen eines Schwefel-35-dATP-Schwanzes (5 min, 37 °C) an das 3'-OH-Ende des Oligonukleotids unter Verwendung eines TdT-Kits (Roche). Für die Markierung von 0.3 pmol Oligonukleotid wurden 10 pmol <sup>35</sup>S-dATP eingesetzt. Nicht-inkorporiertes <sup>35</sup>S-dATP wurde über eine Bio-Spin6-Gelfiltrationssäule (Bio-Rad) entfernt. Für die In-Situ-Hybridisierung wurden 0.3 pmol markiertes Oligonukleotid pro 5 ml Hybridisierungslösung (50 % Formamid, 4 x SSC, 10 % Dextransulfat) verwendet. Die Hybridisierung erfolgte übernacht bei 42 °C. Nach Waschen mit 1 x SSC bei RT, 1 x SSC für 20 min bei 60 °C und 0.1 x SSC für 3 min bei RT wurden die Schnitte über ansteigende Ethanol-Konzentrationen dehydriert, luftgetrocknet und für 1-3 Wochen bei RT einem Röntgenfilm exponiert.

Als Kontrolle für unspezifische Bindung wurden Schnitte mit einem 100-fachen Überschuss an nicht-markiertem gegenüber markiertem Oligonukleotid wie beschrieben hybridisiert.

#### 4.2.10 TUNEL von Paraffinschnitten

Der Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL („TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated dUTP nick end labeling“) erfolgte mit dem "In Situ Cell Death Detection, POD"-Kit (Roche). Das Protokoll des Herstellers wurde nach Negoescu (Boehringer Mannheim, Biochemica Nr. 2, 1998) modifiziert. Paraffin-Schnitte (5 $\mu$ m Dicke) von mit Bouin's-Lösung (Sigma) fixiertem embryonalem Gewebe wurden mit Xylol entwacht und durch abnehmende Ethanol-Konzentrationen schrittweise rehydriert. Die DNA wurde durch Mikrowellen-Erhitzung der Gewebeschnitte in Citratpuffer (pH 6) zugänglich gemacht. Zwei Sättigungen zur Abdeckung unspezifischer Bindestellen wurden eingefügt: vor der TUNEL-Reaktion wurde eine Sättigung der Gewebeschnitte mit Blockierungs-Lösung I (3 % BSA und 20 % FCS in PBS (30 min, RT) durchgeführt; vor Applikation des POD-Konverters erfolgte eine Sättigung mit Blockierungs-Lösung II (3 % BSA, 1 % Blockierungs-Reagenz (Roche) und 20 % Ziege-Normalserum (Dianova)). Der POD-Konverter wurde 1:3 mit Blocking-Lösung II verdünnt und 3 h bei RT oder übernacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels DAB (Roche) oder NovaRed (Vectorlabs) bei RT. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (1:3-verdünnt mit 25 % Ethylenglycol) 30 s bei RT gegengefärbt.

#### 4.2.11 Inkorporation von Bromodeoxyuridin

Schwangere Mäuse (E9,5-E11,5) wurden mit 0,3 ml 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU, Roche) in PBS (100  $\mu$ g BrdU pro Gramm Körpergewicht) intraperitoneal injiziert, 1-1.5 h nach BrdU-Injektion getötet, und die Embryonen für den immunhistologischen Nachweis von inkorporiertem BrdU präpariert und mit 4 % PFA oder Bouin's-Lösung (Sigma) fixiert.

#### 4.2.12 Immunhistologie

Für immunhistologische Untersuchungen wurden Embryonen in 4 % PFA bei 4 °C unter leichtem Schütteln fixiert, mit PBS gewaschen und über ansteigende Methanol-

Konzentrationen schrittweise dehydriert. Die Dauer der Fixierung war vom Alter der Embryonen abhängig (2 h für E9-10- bis übernacht für >E12-Embryonen). Ab E12 wurden die Embryonen mit einer 23G-Nadel punktiert, um eine vollständige Penetration des Fixativs zu gewährleisten. Für Immunfärbungen wurden 5 µm dünne Paraffin-Schnitte angefertigt, mit Xylol entwacht und über abnehmende Ethanol-Konzentrationen rehydriert. Der Blockierung endogener Peroxidase-Aktivität durch Inkubation in 3 % Wasserstoffperoxid in ddH<sub>2</sub>O (20 min, RT) folgte eine Mikrowellen-Erhitzung (360 W, 5 min) der Schnitte in 200 ml Citratpuffer (pH 6); dadurch konnten im Zuge der Fixierung und Paraffineinbettung des Gewebes maskierte Epitope wieder zugänglich für Antikörper gemacht werden.

#### **BrdU-Antikörper-Färbung**

Unspezifische Bindestellen für den monoklonalen BrdU-Antikörper (Roche) wurden mittels M.O.M.-Kit (Vectorlabs) abgedeckt. Die Inkubation mit 3 µg/ml α-BrdU (entspricht einer 1:33-Verdünnung) in M.O.M.-„Diluent“-Lösung erfolgte für 30 min bei RT. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit biotinyliertem Sekundärantikörper (α-Maus-IgG) 1:250 verdünnt in M.O.M.-„Diluent“-Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain-Elite-ABC-Kit, Vectorlabs) für 15 min bei RT inkubiert. Dem Waschen der Schnitte mit PBS folgte die Färbung mit DAB (Vectorlabs) für 5-10 min bei RT. Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (1:3-verdünnt mit 25 % Ethylenglycol) für 30 s bei RT gegengefärbt.

#### **Pan-Cytokeratin-Antikörper-Färbung**

α-Pan-Cytokeratin (Sigma) ist ein Gemisch monoklonaler Antikörper (Maus-IgG1 und -IgG2a), welche verschiedene Cytokeratin-Typen erkennen. Die Färbung mit 1:10-verdünnter Antikörperlösung erfolgte wie für α-BrdU beschrieben. Zellkerne wurden mit Nuclear Fast Red (Vectorlabs) gegengefärbt.

#### **TER-119-Antikörper-Färbung**

Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit 5 % Kaninchen-Normalserum (1h, RT) abgedeckt. Die Schnitte wurden mit 3.1 µg/ml α-TER-119 (entspricht einer 1:10-Verdünnung) in 5 % Kaninchen-Normalserum) für 2 h bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 2µg/ml (entspricht einer 1:250-Verdünnung) biotinyliertem Sekundärantikörper (α-Ratte-IgG) in 5 % Kaninchen-Normalserum für 1 h bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain-Elite-ABC-Kit) für 15 min bei RT inkubiert. Dem Waschen der Schnitte mit PBS folgte die Färbung mit DAB für 5-10 min bei RT. Normalserum, Antikörper, ABC-Kit und Peroxidasesubstrate wurden von Vectorlabs bezogen. Zellkerne wurden mit Nuclear Fast Red (Vectorlabs) gegengefärbt.

#### **Immundoppelfärbung**

Immundoppelfärbungen wurden für TER-119/BrdU und Cytokeratin/BrdU durchgeführt. Paraffinschnitte wurden mit α-TER-119 bzw. α-Cytokeratin (PAN) und anschließend mit α-

BrdU durch Verwendung unterschiedlicher Peroxidasesubstrate gefärbt. Die Detektion von  $\alpha$ -TER-119- bzw  $\alpha$ -Cytokeratin (PAN) erfolgte mit DAB (Vectorlabs), die Detektion von BrdU erfolgte mit VECTOR<sup>®</sup>-SG (Vectorlabs).

Nach der Gegenfärbung wurden die Schnitte über ansteigende Ethanol-Konzentrationen dehydriert, in Xylol geklärt und mit Permount eingebettet.

### **4.2.13 Zellzahlbestimmung von fötaler Leber, Dottersack und peripherem Blut**

Fötale Leberzellen wurden in PBS durch Auf- und Abpipettieren gefolgt von Filtrieren durch ein Hybridisierungsnetz (Biometra) vereinzelt. Dottersackzellen wurden mit 0.25 % Kollagenase und 20 % FBS in PBS (StemCell Technologies) für 30 min bei RT inkubiert und anschließend durch Pipettieren vereinzelt. Peripheres Blut wurde durch Ausbluten von Embryonen gewonnen. Für die Ermittlung der Anzahl lebender Zellen pro Gewebe mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde ein Teil der Einzelzellsuspension 1:2 verdünnt mit Trypan-Blau (Sigma), das tote Zellen färbt.

### **4.2.14 Methylzellulose-Kultur**

Einzelzell-Suspensionen (5000 und 10000 Zellen pro Ansatz) individueller embryonaler Gewebe wurden mit definierten Wachstumsfaktoren versetzt und in 0,9% Methylzellulose (Methocult) plattiert, um das Wachstum erythroider Kolonien, CFU-E und BFU-E, oder nicht-erythroider myeloider, CFU-G/M, zu stimulieren. Das Wachstum von BFU-E und CFU-E wurde durch 4U/ml Epo und 10 ng/ml IL-3 gefördert. Das Wachstum von CFU-G/M wurde durch PWM SCCM („Pokeweed mitogen murine spleen cell conditioned medium“, Cellsystems) stimuliert. Die Anzahl der gewachsenen CFU-E wurde am 3. Tag, BFU-E am 5. Tag, CFU-G/M am 9. Tag nach Plattieren der Einzelzellen bestimmt.

## 5. Anhang

### 5.1 Oligonukleotid-Sequenzen

|          |                                                  |
|----------|--------------------------------------------------|
| lox511S  | 5'-CGATAACTTCGTATAATGTATACTATACGAAGTTATGC-3'     |
| mDra13   | 5'-CTGTTGGGCCAGTGGTTCAGTAGTCC-3'                 |
| mDra17   | 5'-CTCAGTGCTGTCCAGTCCAGTGAC-3'                   |
| mDra18   | 5'-GACCAAGACACAGTGTGGCTCTCG-3'                   |
| mDra19   | 5'-GCCCCTGCCTGGCGATAACTTCG-3'                    |
| mDra42   | 5'-GCCACTTCTCCCTGACTCCTG-3'                      |
| mDra52   | 5'-GCGTACGTCGACGGTATCGA-3'                       |
| mDra91   | 5'-GCGAAGCTTCTCGAGTGGGCGCAGAAAGAAGACCAG-3'       |
| mDra92   | 5'-GCGGAATTCGCTCCCAACAGAATACCTTTCC-3'            |
| mDra127  | 5'-CCTGCACATGCCGTGATCAGC -3'                     |
| mDra128  | 5'-GGGTGGACAAGTACCACCTG-3'                       |
| mDra154  | 5'-GTCAGAGGCAGGGTCTCCGTCCTCACTGTCCAAACCAGGCTC-3' |
| PGKterm3 | 5'-CGAGATCAGCAGCCTCTGTTCCAC-3'                   |
| PGKterm5 | 5'-TAGATCTATAGATCTCTCGTGGGATC-3'                 |

### 5.2 Abkürzungen

|            |                                                           |
|------------|-----------------------------------------------------------|
| $\alpha$   | Alpha                                                     |
| $\alpha$ - | Anti-                                                     |
| $\beta$    | Beta-                                                     |
| $\Delta$   | Delta                                                     |
| $\mu$      | Mikro                                                     |
| A          | Adenin                                                    |
| ADAR       | An Doppelstrang-RNA agierende Adenosin-Deaminase          |
| AMPA       | $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure |
| AS         | Amino(carbon)säure                                        |
| BFU-E      | „Burst“-bildende erythroide Einheit                       |
| Bp         | Basenpaar                                                 |
| BrdU       | Bromodeoxyuridin (5-Bromo-2'-deoxyuridin-5'-monophosphat) |
| BSA        | Bovines Serumalbumin                                      |
| C          | Cytosin                                                   |
| cDNA       | Zur mRNA komplementärer DNA-Strang                        |
| CFU-C      | In Kultur Kolonie-bildende Einheit                        |
| CFU-E      | In Kultur erythroide Kolonien-bildende Einheit            |
| CFU-GM     | In Kultur myeloid-granuloide Kolonien-bildende Einheit    |
| CFU-S      | In Milz Kolonien-bildende Einheit                         |

---

|                    |                                          |
|--------------------|------------------------------------------|
| Ck                 | Cytokeratin                              |
| Cre                | Cre-Rekombinase                          |
| DAB                | Diaminobenzidin                          |
| ddH <sub>2</sub> O | Doppelt destilliertes Wasser             |
| DNA                | Deoxyribonukleinsäure                    |
| dNTP               | Deoxynukleosidtriphosphat                |
| ds                 | Doppelsträngig                           |
| DTT                | Dithiothreitol                           |
| dUTP               | Deoxyuridintriphosphat                   |
| E                  | Embryonaler Tag                          |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat                 |
| Epo                | Erythropoietin                           |
| EpoR               | Erythropoietin-Rezeptor                  |
| ES                 | Embryonale Stammzelle                    |
| FBS                | Fötales Bovinserum                       |
| FD                 | Faraday                                  |
| g                  | Gramm                                    |
| G                  | Guanin                                   |
| G418               | Geneticin                                |
| GluR               | Glutamat-Rezeptor-Untereinheit           |
| h                  | Stunde                                   |
| HSC                | Hämatopoietische Stammzelle              |
| IFN                | Interferon                               |
| IL-3               | Interleukin 3                            |
| ISH                | In-Situ-Hybridisierung                   |
| ISRE               | „Interferon-stimulated response element“ |
| Kb                 | Kilobase                                 |
| KCS                | Kinase-konservierte Sequenz              |
| kD                 | Kilodalton                               |
| lacZ               | β-Galactosidase Gen                      |
| m                  | Milli                                    |
| M                  | Mol                                      |
| MAPKK              | Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase |
| min                | Minute                                   |
| RNA                | Ribonukleinsäure                         |
| mRNA               | Boten-Ribonukleinsäure                   |
| Na                 | Natrium                                  |
| Neo                | Neomycin-Phosphotransferase              |
| ng                 | Nanogramm                                |
| Nt                 | Nukleotid                                |
| p                  | Pico                                     |
| P                  | Postnataler Tag                          |

|                         |                                                          |
|-------------------------|----------------------------------------------------------|
| P <sub>I</sub>          | Interferon-induzierbarer Promotor des ADAR1-Gens         |
| P <sub>C</sub>          | Konstitutiver Promotor des ADAR1-Gens                    |
| PAS                     | Polyadenylierungssignal                                  |
| PBS                     | Phosphatgepufferte Salzlösung                            |
| PCR                     | Polymerasekettenreaktion                                 |
| PFA                     | Paraformaldehyd                                          |
| PGK                     | Phosphoglyceratkinase                                    |
| PolyA <sup>+</sup> -RNA | Vielfach adenylierte Ribonukleinsäure                    |
| PWM SCCM                | „Pokeweed mitogen murine spleen cell conditioned medium“ |
| RACE                    | Schnelle Amplifikation von cDNA-Enden                    |
| RBM                     | RNA-Bindemotiv                                           |
| RT                      | Raumtemperatur                                           |
| RTr                     | Reverse Transkriptase                                    |
| s                       | Sekunde                                                  |
| S                       | Schwefel                                                 |
| SDS                     | Natriumdodecylsulfat                                     |
| S.E.M.                  | Standardfehler des Mittelwerts                           |
| SSC                     | Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung                      |
| T                       | Thymin                                                   |
| TdT                     | Terminale Deoxynukleotidyl Transferase                   |
| TE                      | Tris/EDTA-Puffer                                         |
| TEN                     | Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer                          |
| TENS                    | Tris-EDTA-Natriumchlorid-SDS-Puffer                      |
| Tris                    | Trishydroxymethylaminomethan                             |
| tRNA                    | Transfer-RNA                                             |
| TUNEL                   | „TdT-mediated dUTP nick end-labeling“                    |
| U                       | Uracil                                                   |
| Un                      | Einheit („unit“)                                         |
| Upm                     | Umdrehungen pro Minute                                   |
| UTR                     | Untranslatierte Region                                   |
| UV                      | Ultraviolett                                             |
| V                       | Volt                                                     |
| VP                      | Vaginal-Pfropf                                           |
| W                       | Watt                                                     |

### 5.3 Ein-Buchstaben-Code erwähnter Aminosäuren

|   |          |   |           |   |          |
|---|----------|---|-----------|---|----------|
| A | Alanin   | G | Glycin    | Q | Glutamin |
| C | Cytosin  | H | Histidin  | R | Arginin  |
| E | Glutamat | M | Methionin | S | Serin    |

## 6. Literatur

Adams, M. D. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.

Bass, B. L., and Weintraub, H. (1987). A developmentally regulated activity that unwinds RNA duplexes. *Cell* 48, 607-13.

Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-26.

Bessis, A., Simon-Chazottes, D., Devillers-Thiery, A., Guenet, J. L., and Changeux, J. P. (1990). Chromosomal localization of the mouse genes coding for alpha 2, alpha 3, alpha 4 and beta 2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* 264, 48-52.

Briegel, K., Lim, K. C., Plank, C., Beug, H., Engel, J. D., and Zenke, M. (1993). Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev* 7, 1097-109.

Brusa, R., Zimmermann, F., Koh, D. S., Feldmeyer, D., Gass, P., Seeburg, P. H., and Sprengel, R. (1995). Early-onset epilepsy and postnatal lethality associated with an editing-deficient GluR-B allele in mice. *Science* 270, 1677-80.

Burns, C. M., Chu, H., Rueter, S. M., Hutchinson, L. K., Canton, H., Sanders-Bush, E., and Emeson, R. B. (1997). Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 387, 303-8.

Cantor, A. B., and Orkin, S. H. (2001). Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 11, 513-9.

Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M., and et al. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238, 363-6.

Clackson, T. (1997). Controlling mammalian gene expression with small molecules. *Curr Opin Chem Biol* 1, 210-8.

Clarke, A. R., Maandag, E. R., van Roon, M., van der Lugt, N. M., van der Valk, M., Hooper, M. L., Berns, A., and te Riele, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-30.

Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561-3.

D'Andrea, A. D., Lodish, H. F., and Wong, G. G. (1989). Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57, 277-85.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61.

Eferl, R., Sibilio, M., Hilberg, F., Fuchsbichler, A., Kufferath, I., Guertl, B., Zenz, R., Wagner, E. F., and Zatloukal, K. (1999). Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol* 145, 1049-61.

Evans, T., and Felsenfeld, G. (1989). The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell* 58, 877-85.

Evans, T., Reitman, M., and Felsenfeld, G. (1988). An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5976-80.

Fässler, R., and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 9, 1896-908.

George, C. X., and Samuel, C. E. (1999). Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4621-6.

Gerber, A., Grosjean, H., Melcher, T., and Keller, W. (1998). Tad1p, a yeast tRNA-specific adenosine deaminase, is related to the mammalian pre-mRNA editing enzymes ADAR1 and ADAR2. *Embo J* 17, 4780-9.

Godin, I. E., Garcia-Porrero, J. A., Coutinho, A., Dieterlen-Lievre, F., and Marcos, M. A. (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364, 67-70.

Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-51.

Gossen, M., and Bujard, H. (1993). Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* 21, 4411-2.

- Gossen, M., Bonin, A. L., Freundlieb, S., and Bujard, H. (1994). Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol* 5, 516-20.
- Herb, A., Higuchi, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1996). Q/R site editing in kainate receptor GluR5 and GluR6 pre-mRNAs requires distant intronic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1875-80.
- Herbert, A., Alfken, J., Kim, Y. G., Mian, I. S., Nishikura, K., and Rich, A. (1997). A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8421-6.
- Higuchi, M., Maas, S., Single, F. N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (2000). Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406, 78-81.
- Higuchi, M., Single, F. N., Kohler, M., Sommer, B., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. In *Cell*, pp. 1361-70.
- Hirsch, E., Iglesias, A., Potocnik, A. J., Hartmann, U., and Fassler, R. (1996). Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* 380, 171-5.
- Hoess, R. H., Wierzbicki, A., and Abremski, K. (1986). The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 14, 2287-300.
- Hüser, M., Luckett, J., Chiloeches, A., Mercer, K., Iwobi, M., Giblett, S., Sun, X. M., Brown, J., Marais, R., and Pritchard, C. (2001). MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* 20, 1940-51.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A., and Weinberg, R. A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300.
- Johnson, G. R., and Moore, M. A. (1975). Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* 258, 726-8.
- Kask, K., Zamanillo, D., Rozov, A., Burnashev, N., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1998). The AMPA receptor subunit GluR-B in its Q/R site-unedited form is not essential for brain development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13777-82.

- Kawakubo, K., and Samuel, C. E. (2000). Human RNA-specific adenosine deaminase (ADAR1) gene specifies transcripts that initiate from a constitutively active alternative promoter. *Gene* 258, 165-72.
- Keegan, L. P., Gallo, A., and O'Connell, M. A. (2001). The many roles of an RNA editor. *Nat Rev Genet* 2, 869-78.
- Kim, U., Wang, Y., Sanford, T., Zeng, Y., and Nishikura, K. (1994). Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11457-61.
- Kinoshita, T., Sekiguchi, T., Xu, M. J., Ito, Y., Kamiya, A., Tsuji, K., Nakahata, T., and Miyajima, A. (1999). Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7265-70.
- Kohler, M., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1993). Determinants of Ca<sup>2+</sup> permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10, 491-500.
- Koury, S. T., Bondurant, M. C., Koury, M. J., and Semenza, G. L. (1991). Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 77, 2497-503.
- Krantz, S. B. (1991). Erythropoietin. *Blood* 77, 419-34.
- Lai, F., Drakas, R., and Nishikura, K. (1995). Mutagenic analysis of double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for RNA editing of glutamate-gated ion channel transcripts. *J Biol Chem* 270, 17098-105.
- Lander, E. S. et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lee, E. Y., Chang, C. Y., Hu, N., Wang, Y. C., Lai, C. C., Herrup, K., Lee, W. H., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288-94.
- Lee, G., and Saito, I. (1998). Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* 216, 55-65.
- Lin, C. S., Lim, S. K., D'Agati, V., and Costantini, F. (1996). Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 10, 154-64.

- Liu, Y., and Samuel, C. E. (1996). Mechanism of interferon action: functionally distinct RNA-binding and catalytic domains in the interferon-inducible, double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J Virol* 70, 1961-8.
- Lockhart, D. J., and Winzeler, E. A. (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-36.
- Lomeli, H., Mosbacher, J., Melcher, T., Hoyer, T., Geiger, J. R., Kuner, T., Monyer, H., Higuchi, M., Bach, A., and Seeburg, P. H. (1994). Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* 266, 1709-13.
- Lueders, K. K., Elliott, R. W., Marenholz, I., Mischke, D., DuPree, M., and Hamer, D. (1999). Genomic organization and mapping of the human and mouse neuronal beta2-nicotinic acetylcholine receptor genes. *Mamm Genome* 10, 900-5.
- Maas, S., Gerber, A. P., and Rich, A. (1999). Identification and characterization of a human tRNA-specific adenosine deaminase related to the ADAR family of pre-mRNA editing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8895-900.
- Maas, S., Kim, Y. G., and Rich, A. (2000). Sequence, genomic organization and functional expression of the murine tRNA-specific adenosine deaminase ADAT1. *Gene* 243, 59-66.
- Mack, V., Burnashev, N., Kaiser, K. M., Rozov, A., Jensen, V., Hvalby, O., Seeburg, P. H., Sakmann, B., and Sprengel, R. (2001). Conditional restoration of hippocampal synaptic potentiation in Glur-A- deficient mice. *Science* 292, 2501-4.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15, 5647-58.
- Medvinsky, A. L., Samoylina, N. L., Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-7.
- Mehta, A., Kinter, M. T., Sherman, N. E., and Driscoll, D. M. (2000). Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA- binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 1846-54.
- Melcher, T., Maas, S., Higuchi, M., Keller, W., and Seeburg, P. H. (1995). Editing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion. *J Biol Chem* 270, 8566-70.

- Melcher, T., Maas, S., Herb, A., Sprengel, R., Seeburg, P. H., and Higuchi, M. (1996a). A mammalian RNA editing enzyme. *Nature* 379, 460-4.
- Melcher, T., Maas, S., Herb, A., Sprengel, R., Higuchi, M., and Seeburg, P. H. (1996b). RED2, a brain-specific member of the RNA-specific adenosine deaminase family. *J Biol Chem* 271, 31795-8.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F., and Baccarini, M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf- 1 gene. *Embo J* 20, 1952-62.
- Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukoyama, Y., and Hara, T. (2000). Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 177-83.
- Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10431-4.
- Morse, D. P., and Bass, B. L. (1997). Detection of inosine in messenger RNA by inosine-specific cleavage. *Biochemistry* 36, 8429-34.
- Morse, D. P., and Bass, B. L. (1999). Long RNA hairpins that contain inosine are present in *Caenorhabditis elegans* poly(A)<sup>+</sup> RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6048-53.
- Müller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291-301.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8424-8.
- Navaratnam, N., Shah, R., Patel, D., Fay, V., and Scott, J. (1993). Apolipoprotein B mRNA editing is associated with UV crosslinking of proteins to the editing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 222-6.
- Niswender, C. M., Copeland, S. C., Herrick-Davis, K., Emeson, R. B., and Sanders-Bush, E. (1999). RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J Biol Chem* 274, 9472-8.

North, T., Gu, T. L., Stacy, T., Wang, Q., Howard, L., Binder, M., Marin-Padilla, M., and Speck, N. A. (1999). Cbfa2 is required for the formation of intra-aortic hematopoietic clusters. *Development* 126, 2563-75.

O'Connell, M. A., Krause, S., Higuchi, M., Hsuan, J. J., Totty, N. F., Jenny, A., and Keller, W. (1995). Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol Cell Biol* 15, 1389-97.

Ogawa, M., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Hayashi, S., Kunisada, T., Nakao, J., Kina, T., Sudo, T., and Kodama, H. (1993). Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development* 117, 1089-98.

Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., and Downing, J. R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321-30.

Orkin, S. H. (1996). Development of the hematopoietic system. *Curr Opin Genet Dev* 6, 597-602.

Palis, J., and Yoder, M. C. (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 29, 927-36.

Palladino, M. J., Keegan, L. P., O'Connell, M. A., and Reenan, R. A. (2000). dADAR, a *Drosophila* double-stranded RNA-specific adenosine deaminase is highly developmentally regulated and is itself a target for RNA editing. *Rna* 6, 1004-18.

Palladino, M. J., Keegan, L. P., O'Connell, M. A., and Reenan, R. A. (2000). A-to-I pre-mRNA editing in *Drosophila* is primarily involved in adult nervous system function and integrity. *Cell* 102, 437-49.

Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D., and Lindenbaum, M. H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 11, 40-4.

Paul, M. S., and Bass, B. L. (1998). Inosine exists in mRNA at tissue-specific levels and is most abundant in brain mRNA. *Embo J* 17, 1120-7.

Powell, L. M., Wallis, S. C., Pease, R. J., Edwards, Y. H., Knott, T. J., and Scott, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein- B48 in intestine. *Cell* 50, 831-40.

- Rebagliati, M. R., and Melton, D. A. (1987). Antisense RNA injections in fertilized frog eggs reveal an RNA duplex unwinding activity. *Cell* 48, 599-605.
- Robb, L., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Kontgen, F., Harvey, R. P., Metcalf, D., and Begley, C. G. (1995). Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7075-9.
- Rueter, S. M., Dawson, T. R., and Emeson, R. B. (1999). Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature* 399, 75-80.
- Russell, E. S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet* 20, 357-459.
- Schwenk, F., Baron, U., and 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, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-7.
- Seeburg, P. H., Higuchi, M., and Sprengel, R. (1998). RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Res Brain Res Rev* 26, 217-29.
- Seeburg, P. H. (2000). RNA helicase participates in the editing game. *Neuron* 25, 261-3.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-6.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-90.
- Shivdasani, R. A., Mayer, E. L., and Orkin, S. H. (1995a). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-4.
- Shivdasani, R. A., Rosenblatt, M. F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C. W., Hunt, P., Saris, C. J., and Orkin, S. H. (1995b). Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 81, 695-704.

Shivdasani, R. A., and Orkin, S. H. (1995c). Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8690-4.

Shivdasani, R. A., and Orkin, S. H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87, 4025-39.

Sicurella, C., Freeman, R., Micallef, S., Mucenski, M. L., Bertoncello, I., and Ramsay, R. G. (2001). Defective stem cell factor expression in c-myb null fetal liver stroma. *Blood Cells Mol Dis* 27, 470-8.

Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11-9.

Stephens, O. M., Yi-Brunozzi, H. Y., and Beal, P. A. (2000). Analysis of the RNA-editing reaction of ADAR2 with structural and fluorescent analogues of the GluR-B R/G editing site. *Biochemistry* 39, 12243-51.

Teng, B., Burant, C. F., and Davidson, N. O. (1993). Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 260, 1816-9.

Tsai, S. F., Martin, D. I., Zon, L. I., D'Andrea, A. D., Wong, G. G., and Orkin, S. H. (1989). Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339, 446-51.

Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W., and Orkin, S. H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-6.

Tsai, F. Y., and Orkin, S. H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-43.

Wang, Q., Khillan, J., Gadue, P., and Nishikura, K. (2000). Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science* 290, 1765-8.

Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., and Speck, N. A. (1996a). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3444-9.

Wang, Q. et al. (1996b). The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell* 87, 697-708.

- Wang, Y., Zeng, Y., Murray, J. M., and Nishikura, K. (1995). Genomic organization and chromosomal location of the human dsRNA adenosine deaminase gene: the enzyme for glutamate-activated ion channel RNA editing. *J Mol Biol* 254, 184-95.
- Wang, Y., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., and O'Malley, B. W. (1997). Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 15, 239-43.
- Warren, A. J., Colledge, W. H., Carlton, M. B., Evans, M. J., Smith, A. J., and Rabbitts, T. H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein *rbtn2* is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.
- Weier, H. U., George, C. X., Lersch, R. A., Breitwieser, S., Cheng, J. F., and Samuel, C. E. (2000). Assignment of the RNA-specific adenosine deaminase gene (*Adar*) to mouse chromosome 3F2 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 89, 214-5.
- Weiss, M. J., Keller, G., and Orkin, S. H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev* 8, 1184-97.
- Weiss, M. J. (1997). Embryonic stem cells and hematopoietic stem cell biology. *Hematol Oncol Clin North Am* 11, 1185-98.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.
- Yamamoto, M., Ko, L. J., Leonard, M. W., Beug, H., Orkin, S. H., and Engel, J. D. (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF- E1 multigene family. *Genes Dev* 4, 1650-62.
- Yang, J. H., Sklar, P., Axel, R., and Maniatis, T. (1995). Editing of glutamate receptor subunit B pre-mRNA in vitro by site- specific deamination of adenosine. *Nature* 374, 77-81.
- Yi-Brunozzi, H. Y., Stephens, O. M., and Beal, P. A. (2001). Conformational changes that occur during an RNA-editing adenosine deamination reaction. *J Biol Chem* 276, 37827-33.
- Zaret, K. (1998). Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev* 8, 526-31.

## 7. Publikation

Higuchi, M., Maas, S., Single, F. N., Hartner, J., Rozov, A., Burnashev, N., Feldmeyer, D., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (2000). Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* 406, 78-81.