

**Identifizierung neuer Entwicklungsgene der Maus
durch Genfallen
in embryonalen Stammzellen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Maria Cristina Cadenas Garcia
aus Bilbao

1. Referent: Prof. Dr. H.-H. Arnold

2. Referent: Prof. Dr. J. Wehland

eingereicht am: 9. März 2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16. Juni 2000

2000

(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge (Poster):

Cadenas, C., Meyer B.I., Gruss, P. & Arnold, H.-H. Isolation and characterization of novel developmental regulated genes using the gene trap insertional mutagenesis approach in mouse ES cells (Abstract 127). EDBC-99 "From life's design to molecular medicine" Congress of the European Developmental Biology Organisation in cooperation with the international Society of Developmental Biologists. Oslo, Norwegen (1999).

Es gab kein "Eins - zwei - drei - los!", sondern jeder begann zu laufen, wann er wollte und hörte auf, wie es ihm einfiel, so daß gar nicht so leicht zu entscheiden war, wann der Wettlauf eigentlich zu Ende war.

Nachdem sie indessen ungefähr eine halbe Stunde lang gelaufen und wieder ganz trocken geworden waren, rief der Brachvogel plötzlich: "Ende des Wettlaufs!" und alle drängten sich, noch ganz außer Atem, um ihn und fragten: "Aber wer ist Sieger?"

Dies konnte der Brachvogel nicht ohne tieferes Nachdenken beantworten, und so saß er längere Zeit hindurch da und legte den Zeigefinger an die Stirn (eine Haltung, in der ihr gewöhnlich Goethe auf den Titelbildern sitzen seht), während ringsum alles schwieg und wartete. Endlich sagte der Brachvogel: "*Alle* sind Sieger und jeder muß einen Preis bekommen!"

LEWIS CARROLL, *Alice in Wonderland*, 1865.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Freunden, Kollegen und Bekannten bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. H.-H. Arnold für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine stete Betreuung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof Dr. J. Wehland sei für die Übernahme des Co-Referats und der Teilnahme an der Prüfungskommission gedankt.

Ferner geht mein Dank an den Sonderforschungsbereich 271 für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion sowie an das EU-Hochschulbüro-Hannover für die Finanzierung einer Kongressteilnahme.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Peter Gruss, Max Plank Institut Göttingen sei herzlich für die Bereitstellung der Zell- und Mauslinien gedankt. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Meyer für ihre Kooperation und ihren Rat herzlich bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. Oliver Pabst für seine stete Hilf- und Diskussionsbereitschaft sowie meinem ehemaligen Kollege Dr. Karsten Ragge für seine enorme Leistung bei der Etablierung der 5` RACE-PCR Methode und seinen freundschaftlichen Rat.. Für die Einweisung in diverse Arbeitstechniken und für ihre organisatorischen Hilfen bedanke ich mich bei Heike Eberhardt, Iris Kautzner, Kerstin Zander, Stefanie Willenzon und Silke Heymann. Nicht unerwähnt darf Detlev Mennerich für seine bewundernswerte Geduld bei der Bewältigung von Computerfragen bleiben. Für konstruktive Diskussionen geht mein Dank an Dr. Thomas Brand, Dr. Barbara Winter, Dr. Robert Zweigerdt, Andre Schneider und Birgit Andree. Ganz herzlichen Dank an Dr. Oliver Pabst, Heike Herbrandt, Sonja Bonneick, Angela Hollnagel und Thomas Brand für die Korrektur des Manuskripts. Ein besonderer Dank gilt Frau Charlotte Klau für ihre enorme Hilfsbereitschaft in allen möglichen Organisations- und Verwaltungsangelegenheiten.

Ein herzliches Dankeschön für die sehr schöne Stunden im Labor geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Braun, und PD Dr. Eva Bober. Insbesondere für die schönen Mittagspausen (einzige Lichtblicke während der vielen, frustrierenden Tagen) geht mein Dankeschön an Leonore Faust, Iris Kautzner, Ines Peiser, Pia Steffens, Dr. Angela Hollnagel, Kerstin Zander, Dr. Oliver Pabst, Heike Herbrandt und Birgit Andree.

Bei meinem Mann, Robin Colzman, möchte ich mich herzlichst für seine einfühlsame Unterstützung und Geduld bedanken; bei meinen besten Freundinnen Meike Tischer und Silke Bertuch und meinen liebsten Kolleginnen Iris Kautzner, Sonja Hoffmann, Sonja Bonneick, Konstanze Schäfer, Silke Heymann und Stefanie Willenzon dafür, daß sie im schmerzhaften Momenten immer da waren, wenn ich sie brauchte.

Ferner geht mein Dank an meine Eltern Jesus und Maria Felisa und an meine Geschwister Isabel, Jesus und Eduardo für ihre Unterstütz aus der Ferne sowie an meine "Schwiegerfamilie", Franka und Peter Colzman, Constance, Matthias und Gloria Herfeld, die mich wie ein eigenes Kind aufgenommen hat, so daß ich mein Zuhause hier gefunden habe.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Genfalle, Gene-trap: Eine Methode zur Identifizierung und Funktionsanalyse unbekannter Gene	2
1.2. Genfallen-Vektoren	5
1.3. Die Bedeutung des "Fusionstranskripts"	7
1.4. <i>In vitro</i> Selektion von Gene-trap ES-Klonen	9
1.5. Problemstellung und Ziel der Arbeit	11
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. Material	12
2.1.1. Chemikalien und Gebrauchswaren	12
2.1.2. Enzyme	13
2.1.3. Allgemeine Puffer und Stammlösungen	13
2.1.4. Verwendete Kits	14
2.1.5. Zelllinien	15
2.1.6. Bakterienstämme	15
2.1.7. Vektoren	15
2.1.8. Antibiotika	16
2.1.9. Art und Herkunft der verwendeten Proben	16
2.1.10. Mausstämme	17
2.1.11. PCR-Primer	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. Sterilisation von Lösungen und Geräten	18
2.2.2. Standardbedingungen und –methoden der Molekularbiologie	18
2.2.3. Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren	19
2.2.3.1. Extraktion genomischer DNA aus tierischen Geweben	19
2.2.3.2. Präparation von RNA aus tierischen Gewebe	20
2.2.3.3. Präparation von RNA aus Zellkulturen	21
2.2.4. Isolierung rekombinanter Klone aus einer cDNA-Phagenbank	21
2.2.5. Southern-Transfer von DNA und radioaktive Hybridisierung	23
2.2.6. Markierung von Nukleinsäuren	24
2.2.6.1. Radiaktive Markierung von DNA-Fragmenten	24
2.2.6.2. Markierung von RNA mit Digoxigenin	24

2.2.7. Exposition von Autoradiogrammen	25
2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Technologien	25
2.2.8.1. Standard-PCR	25
2.2.8.2. Primer-Design	26
2.2.8.3. RT-PCR	27
2.2.8.4. 5`RACE-PCR	28
2.2.9. Methoden zur Sequenzanalyse	31
2.2.10. Zellkultur-Methoden	32
2.2.10.1. Kultivierung von ES-Zellen	32
2.2.10.2. <i>In vitro</i> Differenzierung von ES-Zellen in Embryoid Bodies.	33
2.2.10.3. Präparation und Kultivierung von "Feederzellen"	33
2.2.10.4. Generierung rekombinanter ES-Zellklone	35
2.2.10.5. Die Replica-Plattierungs-Methode zur Analyse rekombinanter ES-Zellklone	36
2.2.11. Präparation von Embryonen und Gewebe	37
2.2.12. Histologische Methoden	37
2.2.12.1. Vibratomschnitte	37
2.2.12.2. Kryotomschnitte	38
2.2.13. Histochemische Färbemethoden	38
2.2.13.1. LacZ-Färbung	38
2.2.13.2. "Whole mount"- <i>in situ</i> -Hybridisierung von Embryonen	40
3. ERGEBNISSE	43
3.1. Etablierung von ES-Zelllinien mit Gene-trap Integrationen.....	43
3.1.1. Herstellung und <i>in vitro</i> Selektion von SA-IRES- β -Geo Klonen zur Identifizierung von Genen, die in differenzierten ES-Zellen exprimiert werden	43
3.1.1.1. Sequenzbestimmung von SA-IRES- β -Geo Klonen.....	46
3.1.1.2. Mögliche Konsequenzen der SA-IRES- β -Geo Gene-trap Integrationen auf die Genprodukte.....	49
3.1.2. Herstellung von pT1-ATG Klonen und "Induktions Gene-trap" zur Identifizierung von RA- und BMP2-induzierbaren Genen	51
3.1.2.1. Sequenzanalyse von pT1ATG Klonen	54
3.1.2.2. Mögliche Konsequenzen der pT1ATG Gene-trap Integrationen auf die Genprodukte.....	57
3.2. Etablierung und Analyse von Mauslinien mit Gene-trap Integrationen	61
3.2.1. Die ES-Zelllinie GTXVI-168	63

3.2.1.1.	Expressionsmuster des getroffenen Gens in ES-Zellen <i>in vitro</i> und in chimären Embryonen anhand der LacZ Reporter-genaktivität	63
3.2.1.2.	Identifizierung des getroffenen Gens durch 5`RACE-PCR.....	66
3.2.1.3.	Isolierung und Charakterisierung der kompletten cDNA des GTXVI-168 Gens.....	67
3.2.1.4.	Mögliche Funktionsdomänen in der GTXVI-168 cDNA	68
3.2.1.5.	Mögliche Auswirkung der Gene-trap Insertion auf das GTXVI-168 Genprodukt	72
3.2.2.	Die ES-Zelllinie GTIII-6 und davon abgeleitete Mäuse	73
3.2.2.1.	Expressionsmuster des getroffenen Gens <i>in vivo</i> anhand der LacZ Reporter-genaktivität	73
3.2.2.2.	Identifizierung des GTIII-6 Transkripts durch 5`RACE-PCR.....	76
3.2.2.3.	Isolierung und Charakterisierung der gesamten GTIII-6 cDNA.....	77
3.2.2.4.	Auswirkung der Gene-trap Insertion auf das GTIII-6 Genprodukt.....	81
3.2.2.5.	GTIII-6 Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp	82
3.2.3.	Die ES Zelllinie GTXVI-44 und davon abgeleitete Mäuse.....	84
3.2.3.1.	Expressionsmuster des getroffenen Gens <i>in vivo</i> anhand der LacZ-Reporter-genaktivität	84
3.2.3.2.	Identifizierung des GTXVI-44 Gens durch 5`RACE-PCR	87
3.2.3.3.	Homozygote GTXVI-44 Mäuse zeigen einen Phänotyp	92
3.2.4.	Die ES-Zelllinie 2A-53 und davon abgeleitete Mäuse.....	96
3.2.4.1.	Die LacZ Reporter-genaktivität in 2A-53 Mäusen.....	96
3.2.4.2.	Identifizierung des getroffenen Gens durch genomische Klonierung aus 2A-53 Mäusen	96
3.2.4.3.	Die homozygoten 2A-53 Mäuse zeigen einen Phänotyp.....	101
3.2.4.4.	Die Auswirkung der Exon-trap Integration auf die Transkription von Pafah1b/Lis1	103
3.2.4.5.	Das β -Geo Fusionstranskript	104
4.	DISKUSSION.....	106
4.1.	Welche Informationen können durch <i>in vitro</i> Selektion der ES-Zellen erhalten werden.....	106
4.1.1.	Ergibt die Aktivität des Reportergens <i>in vitro</i> einen Hinweis auf die Expression des Gens in der Maus?	106
4.1.2.	Die Identifizierung des getroffenen Gens aus Gene-trap ES-Zelllinien	108
4.1.3.	Abschätzung des Mutationspotentials der Integration	108
4.1.4.	Von Zelllinien zu Mausstämmen: Probleme bei der Erzeugung	

der Gene-trap Mäuse.....	109
4.2. Gene-trap Mausstämme.....	109
4.2.1. Die Gene-trap Zelllinie GTXVI-168.....	111
4.2.1.1. GTXVI-168 könnte ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Rho sein	112
4.2.1.2. Das GTXVI-168 Protein enthält möglicherweise eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne.....	113
4.2.1.3. GTXVI-168, CeGAP und " <i>crosstalk</i> "	115
4.2.1.4. Ausblick.....	116
4.2.2. Die Mauslinie GTIII6.....	117
4.2.2.1. Mögliche Funktion des GTIII-6 Proteins.....	117
4.2.2.2. Die Insertion in der GTIII-6 Mauslinie könnte nicht mutagen sein	118
4.2.2.3. Ausblick.....	119
4.2.3. Die Mauslinie GTXVI-44	120
4.2.3.1. Die Proteine der NFκB/Rel und IκB Familien.....	120
4.2.3.2. Eine mögliche Funktion von NFκB1 in der Blutgefäßbildung	122
4.2.3.3. Die Funktion der p105 und IκBγ Inhibitor-Proteine in der Regulation von NFκB	125
4.2.3.4. Ausblick.....	127
4.2.4. Die Mauslinie 2A-53.....	128
4.2.4.1. Integration des Exon-trap Vektors und Aktivierung des Fusionstranskripts	128
4.2.4.2. Das Lis 1 Intron 2.....	129
4.2.4.3. Die Funktion von Lis1 in der Spermatogenese	130
4.2.4.4. Ausblick.....	131
4.3. Gene-trap im Rahmen des Genom Projekts.....	132
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	133
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	150

Abkürzungen

β-Gal	β-Galactosidase
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AS	Aminosäure
BMP2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
Bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
cDNA	Copy Desoxiribonukleinsäure
CDS	Kodierende Sequenz
Dr	<i>Developmental regulated repeat</i>
E	Embryonaltag
EB	Embryoid Bodies
En2	Engrailed
ES	Embryonale Stammzelle
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
ET	Enhancer-trap
et al.	<i>et altera</i> (und andere)
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GCNF	<i>Germ Cell Nuclear Factor</i>
GT	Gene-trap
IκB	<i>Inhibitor of NFκB</i>
ILS	<i>Isolated Lissencephaly Sequence</i>
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
kb	Kilobasenpaare
KH	K-Homologie
LAR	<i>Leukocyte Antigen Related</i>
LIF	<i>Leukemie Inhibitory Factor</i>
MDS	<i>Miller-Dieker Syndrom</i>
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxid Dismutase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Neo	Neomycin
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
Nt	Nukleotid
ORF	Offenes Leseraster
PGK	Phosphoglukokinase
PH	Pleckstrin-Homologie
PT	Promotor-trap
PX	Phox-Homologie
QK	<i>quaking</i>
RA	Retinsäure
RA	Retinsäure

RACE	<u>R</u> apid <u>A</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>E</u> nds
RHD	Rel-Homologie Domäne
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
STAR	<i><u>S</u>ignal <u>T</u>ransduction and <u>A</u>ctivation of <u>R</u>NA</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
UTR	Untranslatierte Region
z.B.	Zum Beispiel
wt	Wildtyp

1. EINLEITUNG

Entwicklungsprozesse wie Musterbildung, frühe Organogenese, kontrollierte Zellteilung, Zellwanderung und Differenzierung werden durch Gene gesteuert. Ein detailliertes molekulares Verständnis der Entwicklung eines Organismus erfordert die Identifizierung der beteiligten Gene und die Funktionsanalyse ihrer Genprodukte. Die Erzeugung experimentell induzierter Mutationen hat sich als eine erfolgreiche Methode erwiesen, um die Entwicklung multizellulärer Organismen, wie *Drosophila melanogaster* (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980) und *Caenorhabditis elegans*, auf molekularer Ebene zu studieren. Zur Untersuchung der Entwicklung höherer Vertebraten ist die Maus das derzeit geeignetste Modelltier. Ähnlich wie bei *Drosophila* und *C. elegans* können mutierte Mauslinien etabliert werden. Die Mutationen können durch chemische Substanzen, wie z.B. Äthylnitrosoharnstoff oder durch radioaktive Bestrahlung, zufällig gesetzt werden, so daß Mäuse mit dominanten oder rezessiven Merkmalen entstehen. Der Nachteil dieses klassisch genetischen Ansatzes liegt darin, daß die Kartierung, Isolierung und Sequenzierung der getroffenen Gene bei der Größe und Komplexität des Säugetiergenoms extrem langwierig ist.

Die Entwicklung der Maus ES-Zelltechnologie hat es ermöglicht, gezielte Mutationen zum Studium des Säugetiergenoms zu erzeugen. Seit der ersten Anwendung (Mansour et al., 1988; Joyner, 1989; Zijlstra et al., 1990; Joyner, 1991; McMahon et al., 1990) bis zum heutigen Tag ist das "Gene Targeting" durch homologe Rekombination in ES-Zellen (Capecchi, 1989; Koller und Smithie, 1992) zur Methode der Wahl gereift, um die Funktion bereits identifizierter Gene zu untersuchen. Mit Hilfe dieser Methode ist es prinzipiell möglich, jedes klonierte Gen in ES-Zellen auszuschalten und dann die entsprechende Maus-Mutante, die sogenannte "Knock-out" Maus zu erzeugen, der ein spezifisches Genprodukt fehlt. Der resultierende Phänotyp kann Aufschluß über die ursprüngliche Genfunktion geben. Voraussetzung für eine gezielte homologe Rekombination ist allerdings, daß das zu mutierende Gen zumindest partiell kloniert vorliegt.

Unter den ersten charakterisierten, entwicklungsrelevanten Genen in der Maus befinden sich solche, die anhand konservierter Domänen zu verwandten Genen in *Drosophila* isoliert wurden. Beispiele sind die Homeobox Gene, wie die *Hox* (Akam, 1989) und die *Engrailed* Homologe En-1 und En-2 (Davidson et al., 1988), und die Pax ("*paired-box*") (Balling et al., 1988) und die "*zinc-finger*" Gene (Chowdury et al., 1989). Aufgrund der Sequenzkonservierung sind zahlreiche Gene, nicht nur Transkriptionsfaktoren, sondern auch

Protooncogene, und Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in der Maus entdeckt worden. Andere Verfahren wie differentielle und substraktive Klonierung stellen ebenfalls wertvolle Methoden zur Isolierung neuer Gene dar.

1.1. Die Genfalle, Gene-trap: Eine Methode zur Identifizierung und Funktionsanalyse unbekannter Gene

Gene-trap ist eine effektive und elegante Methode zur Identifizierung und Funktionsanalyse von Genen mit Hilfe der Transgen-Technik. Dabei handelt es sich um eine Art von nicht-gerichteter Insertionsmutagenese, die auf der zufälligen Integration eines Reportergens in das Genom der Zelle beruht (Überblick: Gossler und Zachgo, 1993; Hill und Wurst, 1993). Dieses Verfahren ist erfolgreich nicht nur in der Maus (Überblick: Griedly et al., 1987; Meisler, 1992; Rossant und Hopkins, 1992), sondern auch in *Drosophila*, in *C.elegans* (Überblick: Spradling et al., 1995) und im Zebrafisch (Schier et al., 1996) etabliert worden.

Gene-trap (der englische Begriff "*trap*" bedeutet Falle) wurde ursprünglich als eine Methode zur Identifizierung transkriptionell aktiver Regionen des Genoms in kultivierten Zelllinien angewendet (Bhat et al., 1988; Okamoto et al., 1990). Im wesentlichen beinhalten Gene-trap Vektoren nur die kodierende Sequenz eines Reportergens (meistens das bakterielle LacZ-Gen), ohne *cis*-regulierende Elemente für ihre Expression, so daß erst nach Integration des Vektors in ein aktives Gen das Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors exprimiert werden kann. Hierzu werden ES-Zellen mit Gene-trap Vektoren durch Elektroporation transfiziert (Skarnes et al., 1992) oder mit Retroviren infiziert (Friedrich und Soriano, 1991). Nach Integration des Konstrukts ins Genom und Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen, werden die manipulierten ES-Zellen mit Morulae aggregiert oder in Blastozysten injiziert (Gossler et al., 1986; Mansour et al., 1988; Thomas und Capecchi, 1987), so daß chimäre Mäuse entstehen. Aufgrund der Totipotenz der ES-Zellen können diese sich an der Ausbildung aller Gewebe und Zelltypen, einschließlich der Keimbahn des Wirtsembryos, beteiligen. Die Blastozysten werden in den Uterus einer Amme transferiert und von dieser ausgetragen. Bei Beteiligung der manipulierten ES Zellen an der Keimbahnentwicklung, wird das mutierte Gen nach Mendelschen Regeln vererbt. Das Reportergenprodukt, das sich durch eine einfache Färbung nachweisen läßt, zeigt, in welchen Zellen und in welchen Stadien der Entwicklung das entsprechende Gen aktiv ist, so daß seine Aktivität normalerweise die Expression des endogenen Gens widerspiegelt (Friedrich und Soriano, 1991; Skarnes et al., 1992). Anhand des Expressionsmusters des Reportergens während der Embryogenese können potentiell entwicklungsrelevante Gene erkannt werden. Darüberhinaus verursacht die

Insertion des Gene-trap Konstrukts oft eine Mutation im Integrationslokus (Skarnes et al., 1992). Das Verfahren bietet weiterhin die Möglichkeit, das getroffene Gen relativ einfach zu identifizieren. Im idealen Fall einer Gene trap Mauslinie ist also die Identifizierung eines Gens, die Bestimmung seines Expressionsmusters und die Untersuchung der Konsequenz seiner Mutation möglich.

Auch wenn Gene-trap Konstrukte durch andere Methoden, wie die Mikroinjektion von DNA in Vorkerne befruchteter Zygoten, in die Mauskeimbahn eingeführt werden können, hat sich die ES-Zelltechnologie aufgrund zahlreicher Vorteile gegenüber anderen Verfahren durchgesetzt. Mit einer einzigen Transfektion in ES-Zellen können hunderte von Integrationsereignisse generiert und *in vitro* analysiert werden. Da Genfallen-Vektoren zufällig und nicht immer in aktive Gene integrieren, ist es notwendig, entweder auf Integration in aktive Gene zu selektionieren oder die Aktivierung des Reportergens nachzuweisen. Das Expressionsmuster des Reportergens kann auch *in vitro* analysiert werden, d.h. während der Differenzierung der ES-Zellen. Die durch die Insertion getroffenen Gene können direkt aus den ES-Zellen kloniert werden. Das prinzipielle Verfahren zur Herstellung von Gene-trap Mauslinien ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

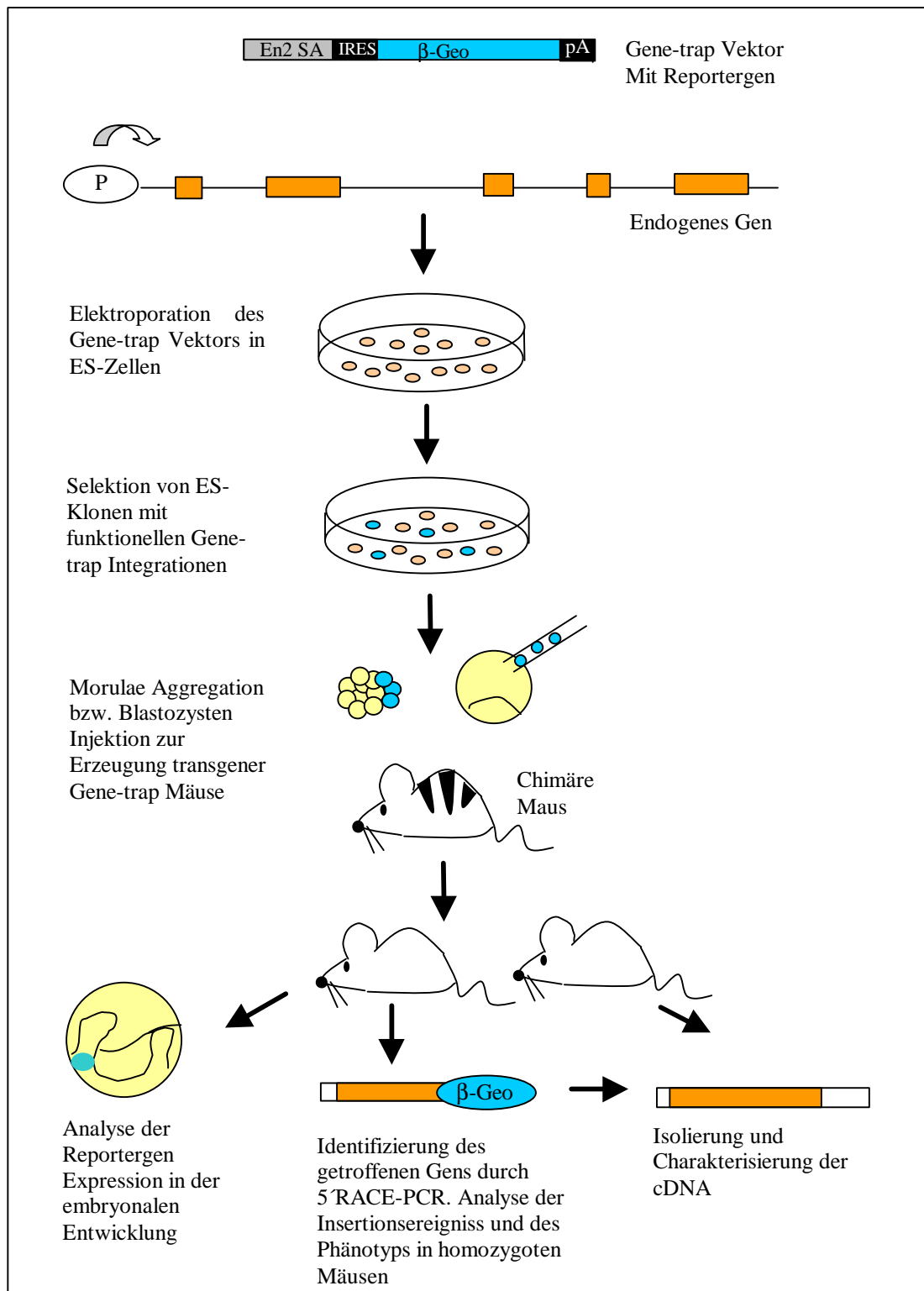


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gene-trap Methode. Gene-trap-Reporter genkonstrukte werden in Maus ES Zellen durch Elektroporation eingebracht. ES-Zellklone mit funktionellen Integrationsereignisse (d.h. Aktivität des Reporter gens) werden selektiert und für die weitere Charakterisierung in die Mauskeimbahn durch Blastozysten Injektion oder Morulae Aggregation eingeführt. Transgene Mausstämme dienen zur Identifizierung der betroffenen zellulären Gene, zur Analyse der Expression des Reporter gens während der embryonalen Entwicklung und zur Untersuchung des Phänotyps einer eventuellen Mutation.

1.2. Genfallen-Vektoren

Es gibt drei Typen von Genfallen-Vektoren, die jeweils spezifische Eigenschaften aufweisen (Überblick: Skarnes, 1990): Sie werden als Enhancer-Trap (ET), Gene-Trap (GT) und Promotor-Trap (PT) Vektoren bezeichnet. Alle drei Vektortypen enthalten das Reporter-gen und eine Selektionskassette für positive Selektion der transfizierten Zellen. In der Regel wird hierfür das Neomycinresistenz Gen unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors, wie PGK, verwendet. Zusätzliche Sequenzelemente in ET-, GT- und PT-Vektoren bestimmen, unter welchen Integrationsbedingungen das Reporter-gen aktiviert wird.

Enhancer-Trap Vektoren benötigen einen zellulären Enhancer zur Expression des Reporters. Sie besitzen ein LacZ Reporter-gen mit Translationscodon (ATG) und Polyadenylierungssignal unter der Kontrolle eines Minimalpromotors. Am 3'-Ende des LacZ Reporter-gens wird im allgemeinen der Selektionsmarker eingesetzt. Der Minimalpromotor enthält Sequenzen, die zum Start der Transkription auf niedrigem Niveau, nicht aber auf hohem Niveau ausreichend sind. Hohe Reporter-genaktivität erfordert Integration in der Nähe eines Enhancers.

Enhancer-trap Konstrukte wurden zunächst entworfen, um zelluläre Enhancer zu identifizieren, die eine gewebespezifische Regulation der Genexpression gewährleisten können (Fried et al., 1983; Weber et al., 1984). Dazu wurden zufällig isolierte zelluläre DNA-Fragmente vor das Reporter-gen kloniert und in Zellen transfiziert, wodurch einige Fragmente entdeckt wurden, die in der Lage waren, das Reporter-gen zu aktivieren. Erst später wurden Reporter-gene direkt ins Genom der Zellen eingebracht, um zelluläre Enhancer zu detektieren (Hamada, 1986). Mit der Entwicklung von Methoden zur Einführung von DNA ins Genom multizellulärer Organismen konnte der Enhancer-trap Ansatz für die Isolierung entwicklungsrelevanter chromosomaler *Loci* (Allen et al., 1988; O'Kane und Gehring, 1987) angewendet werden. Ein P-Element basiertes Enhancer-trap Verfahren wurde dann in *Drosophila* etabliert, wodurch Tausende von Insertionen zur Identifizierung von Entwicklungsgenen generiert und analysiert wurden (O'Kane und Gehring, 1987; Fasano und Kerridge, 1988; Bier et al., 1989; Bellen et al., 1989; Wilson et al., 1989). Hunderte von spezifischen embryonalen (LacZ)-Reporter-gen Expressionsmustern wurden berichtet; 15% der Insertionen führten zu rezessiv embryonal lethalen Mutationen.

Gene-Trap Vektoren enthalten das Reporter-gen ohne eigenen Promotor hinter einem Spleißakzeptor. Erfolgreiche Integrationen der Gene-trap Vektoren produzieren mit Hilfe des

Spleißakzeptors Fusionstranskripte aus Exons eines endogenen Gens mit dem Reporter-gen. Voraussetzung hierfür ist, daß die Integration in einem Intron stattfindet, so daß ein endogener Spleißdonor zum LacZ-Reporter-gen gespleißt werden kann.

Promotor-Trap Vektoren, auch Exon-Trap genannt, ähneln den Gene-Trap Vektoren, tragen aber keinen Spleißakzeptor, weshalb nur dann ein funktionelles Reporter-gen erwartet werden kann, wenn der Vektor in ein Exon des Wirtsgenoms integriert wird.

Der erste Trap Vektor wurde zur Identifizierung von Operons in Bakterien entworfen und bestand aus dem E.coli LacZ Reporter-gen in einem transponierbaren Element (Casabadan und Cohen, 1979). Dieses grundlegende Konstrukt wurde für die Anwendung in Eukaryonten entsprechend modifiziert, wobei eine Spleißakzeptorsequenz am 5'Ende des LacZ Gens eingesetzt wurde (Gossler et al., 1989). Aufbauend auf die Enhancer-trap Erfahrung in *Drosophila* wurde das Gene-trap Verfahren in der Maus etabliert, zunächst mit Hilfe der Vorkern-Mikroinjektion (Allen et al., 1988; Kothary et al., 1988), später in Kombination mit der ES-Zelltechnologie (Gossler et al., 1989; Friedrich und Soriano, 1991; Skarnes et al., 1992; Wurst et al., 1995).

Während funktionelle Integrationen (d.h. Aktivierung des Reporter-gens) mit Gene-Trap und Promotor-Trap Konstrukten von Orientierung und intaktem Leseraster abhängig sind, und daher nur einen geringen Prozentsatz aller Integrationen darstellen, bestehen diese Einschränkungen nicht beim Enhancer-Trap. Deshalb ist hier die Frequenz der Reporter-genaktivierung höher. Eine Analyse der LacZ Expression in undifferenzierten ES-Zellklonen zeigte, daß 20-25% der Neo-resistenten ET-Linien β -Gal Aktivität aufweisen; bei GT-Linien sind es nur 1-5%. Andererseits haben Gene-Trap und Promotor-Trap Konstrukte einen Vorteil in Bezug auf Mutagenität: GT- und PT Integrationen unterbrechen die Expression eines Gens und wirken somit im Wirtsgenom mutagen. Dies ist hingegen beim Enhancer-Trap nicht notwendigerweise der Fall. Darüberhinaus ist bei Gene- und Promotor-Trap Vektoren die molekulare Isolierung der betroffenen Gene relativ einfach, denn GT- und PT- Vektoren produzieren Fusionstranskripte von Reporter-gen und endogenen Exonen. Bei Enhancer-Trap Integrationen findet dagegen keine Fusion statt und oftmals wird die Aktivität von Enhancern detektiert, die vielfach mehrere Kilobasenpaare vom zugehörigen Gen entfernt liegen. Die wichtigsten Eigenschaften der Trap-Vektoren sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Neben dem grundlegenden Design der Trap Vektoren gibt es einige Modifikationen, die dazu dienen, die Frequenz der funktionellen Integrationen zu erhöhen, wie zum Beispiel das Einsetzen eines ATG Codons im LacZ des GT-Konstrukts, oder auch die Verwendung eines Neo-LacZ Fusionsproteins, das eine direkte Selektion von LacZ exprimierenden Zellen ermöglicht. Das Einsetzen eines ATG Startcodons ins Reportergen führt zu funktioneller β -Galaktosidase Aktivität auch im Falle der Integration in untranslatierte Exone oder in Introns, die einem 5'-Ende untranslatiertem Exon folgen.

	ET	GT	PT
Voraussetzung für eine funktionelle Expression des Reportergens	Integration nahe einem cis-aktiven Element, das den Minimalpromotor aktivieren kann	Integration in einem Intron	Integration in einem Exon
Transkript	Definitiver Start zum Minimalpromotor	Fusionstranskript endogenes Gen/Reportergen	Fusionstranskript endogenes Gen/Reportergen
Mutagenität Expression des Targetgens	möglich nicht erforderlich	wahrscheinlich erforderlich	wahrscheinlich erforderlich

Tab. 1: Vergleich von Enhancer-Trap (ET), Gene-Trap (GT) und Promotor-Trap(PT)- Vektoren.

1.3. Die Bedeutung des "Fusionstranskripts"

Die wichtigste Eigenschaft der **Gene-trap** Vektoren ist, daß sie durch die Spleißakzeptorstelle ein "Fusionstranskript" aus 5'endogenen Sequenzen und dem Reportergen bilden. Da die endogenen Sequenzen, die am 3' Ende der GT-Insertion liegen, aufgrund der im GT-Vektor vorhandenen Transkriptionsstop- und Polyadenylierungssignale nicht transkribiert werden können, wird die Expression des endogenen Gens unterbrochen. Dies stellt die Grundlage des mutagenen Potentials der Gene-trap Methode dar (Abb. 2). Allerdings wird die Mutagenität des Insertionsereignisses durch die Integrationsstelle des Vektors mitbestimmt. Je weiter vorne in der kodierenden Region die Insertion stattfindet, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß das Fusionsprodukt keine volle Funktion besitzt. Darüberhinaus ist das Fusionstranskript das wichtigste Werkzeug zur Klonierung der jeweilig getroffenen Gene. Mit der 5'RACE-PCR Methode können die unbekannt Sequenzen am 5'Ende des Reportergens amplifiziert und sequenziert werden. Diese entsprechen einem oder mehreren Exons des getroffenen endogenen Gens.

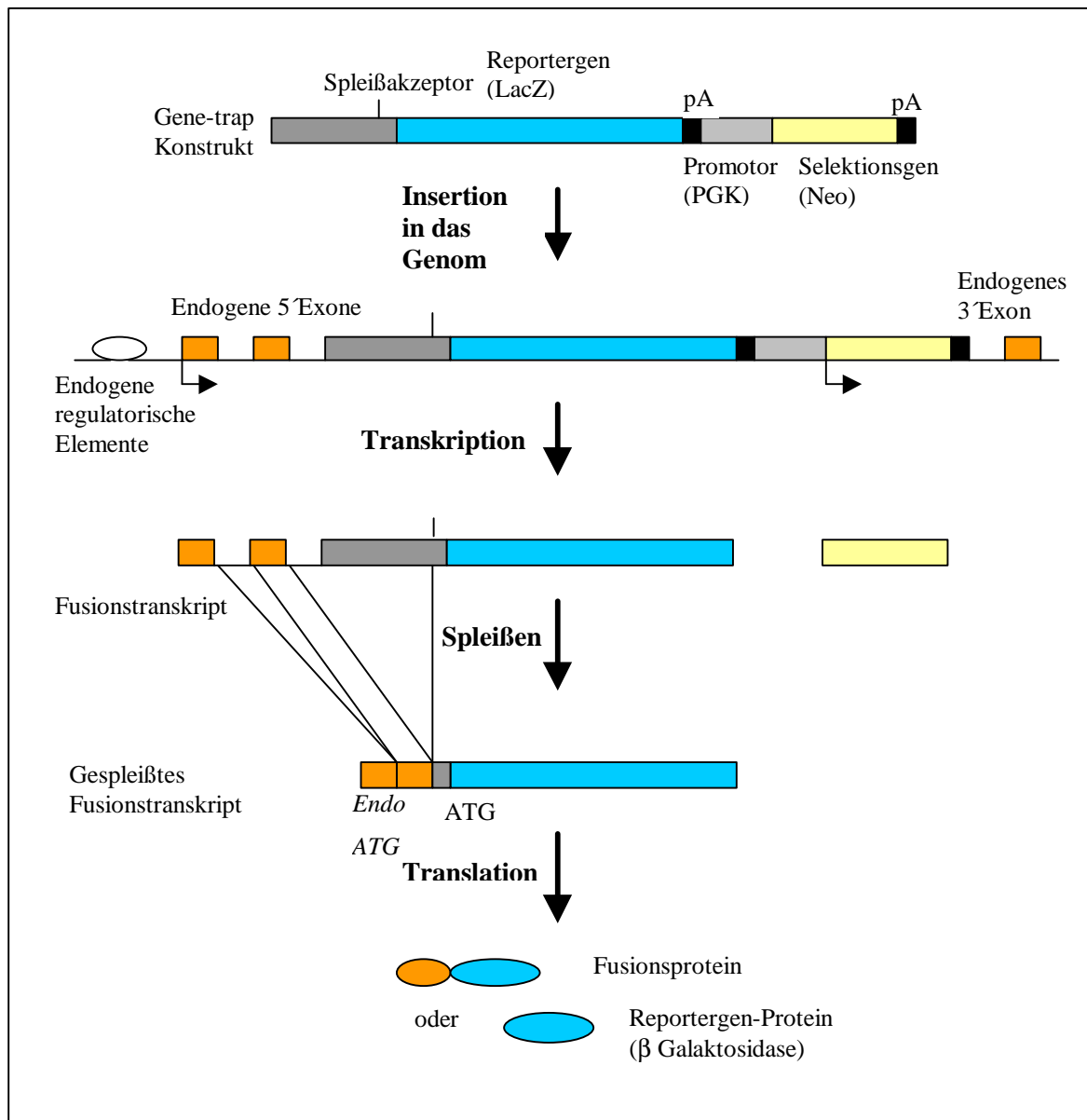


Abb. 2: Prinzip der Mutagenese durch die Gene-trap Insertion. Nach Integration des Gene-trap Vektors innerhalb einer aktiven Transkriptionseinheit wird das Gene-trap Allel unter der Kontrolle des zellulären Promotors transkribiert. Die Transkription terminiert an der Polyadenylierungsstelle (pA) des Gene-trap Vektors und durch Spleißen der Exonsequenzen zum Spleißakzeptor des Reporter-gens, wird ein Fusionstranskript gebildet, das aus 5' Exons des getroffenen Gens und dem Reporter-gen besteht. Bei der Translation entsteht generell ein Fusionsprotein, das im idealen Fall nicht funktionell ist.

Das Auftreten eines Fusionstranskripts und sein Expressionsmuster wird in der Regel die Expression des endogenen Gens widerspiegeln. Sofern keine regulatorischen Sequenzen bei der Integration des Gene-trap Vektors zerstört werden, sollte die Expression des Reporter-gens der Expression des Wildtyp Gens entsprechen.

1.4. *In vitro* Selektion von Gene-trap ES-Klonen

Die Analyse der Reportergenaktivität *in vivo* in chimären oder heterozygoten Embryonen kann als Kriterium zur Erkennung von entwicklungsrelevanten Genen benutzt werden, da generell angenommen wird, daß Gene, die während der embryonalen Entwicklung ein gewebespezifisches und zeitlich und räumlich eingeschränktes Expressionsmuster aufweisen, mit hoher Wahrscheinlichkeit Kontrollgene für spezifische Entwicklungsprozesse darstellen. In der Tat konnten in einer systematischen Analyse des LacZ Expressionsmusters in E 8.5 chimären Embryonen zum Zeitpunkt der Körpermusterbildung, Gene identifiziert, die an der frühen Embryogenese beteiligt sind (Wurst et al., 1995). Zur Identifizierung von Genen, die die Entwicklung des Nervensystems regulieren, wurde das LacZ Expressionsmuster in heterozygoten Mäusen in verschiedenen embryonalen Stadien untersucht (Stoykova et al., 1998).

Alternativ zur aufwendigen Erzeugung einer Vielzahl chimärer Mäuse für die Analyse der Expression des Reportergens *in vivo*, kann die Reportergenaktivierung auch *in vitro* in ES-Zellen als Kriterium für die weitere Charakterisierung von Gene-trap Klonen untersucht werden. *In vitro* Selektionsverfahren werden beispielsweise für die Identifizierung von Genen eingesetzt, die nicht konstitutiv in undifferenzierten Zellen, sondern erst nach induktiven Signalen oder in spezifischen Zelltypen nach Differenzierung der ES-Zellen exprimiert werden. Die *in vitro* Selektion spart Kosten und erhöht die Effizienz der Gene-trap Methode. Unter den häufig angewendeten *in vitro* Selektionsverfahren erlaubt der sogenannte **Induktions Gene-trap** Ansatz die Identifizierung von Genen, die spezifisch durch Chemikalien, pharmakologische Drogen oder Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren induziert bzw. reprimiert werden. Zumindest theoretisch besteht hierdurch die Möglichkeit, die Gene einer gesamten Signalübertragung sowie die Effekte von Teratogenen und chemisch induzierten Mißbildungen während der embryonalen Entwicklung zu analysieren. Dazu wird die Aktivierung des Reportergens vor und nach Behandlung der Gene-trap ES-Zellklone mit entsprechenden Induktoren untersucht. Zur Identifizierung von Genen, die durch Retinsäure reguliert werden, sind derartige *in vitro* Induktions Gene-trap Verfahren erfolgreich durchgeführt worden (Hill and Wurst, 1993; Forrester et al., 1996; Sam et al., 1996; Sam et al., 1998).

Die Expression des Gene-trap Reportergens in bestimmten Zelltypen kann auch während der ***in vitro* Differenzierung** der ES-Zellen untersucht werden. ES-Zellen besitzen die Fähigkeit,

spontan *in vitro* zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren, wenn sie zur Bildung von Aggregaten, den sogenannten Embryoid Bodies (EBs), induziert werden (Pederson, 1994; Keller, 1995). Ein Drittel der gebildeten EBs generiert Blutinseln, die denen im Dottersack ähneln (Doetschman et al., 1985; Wiles und Keller, 1991). Herz- und Skelettmuskelzellen differenzieren ebenfalls in EB-Kulturen (Doetschman et al., 1985; Miller-Hance et al., 1993; Wobus et al., 1994; Baker und Lyons, 1996). Chondrogenese ist dagegen ein selteneres Ereignis als Myogenese (Martin, 1981). Wenn EBs mit RA induziert werden, differenzieren sie zu Neuronen und Glia-Zellen (Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995; Finley et al., 1996). Die zeitliche Reihenfolge der *in vitro* Expression neuronaler Gene (Fraichard et al., 1995), hematopoietischer Gene (Keller, 1995) und myogener Gene (Baker und Lyons, 1996) ähnelt der *in vivo* Expression im Embryo. Diese Daten zeigen, daß die *in vitro* Differenzierung der ES-Zellen für Studien der differentiellen Genexpression geeignet ist, weshalb dieses System häufig im Rahmen der Gene-trap Methode als *in vitro* Selektionsverfahren für die Klonierung differentiell exprimierter Gene in ES-Zellen verwendet wird. Baker et al. (1997) haben die EB-Differenzierung genutzt, um gewebespezifische (Nervensystem, Herzmuskel, Extremitäten und Knorpel) Gene zu identifizieren. Muth et al. (1998) konnten Gene der Hematopoese isolieren. Xiong et al. (1998) haben Gene mit einem zeitlich und räumlich eingeschränkten Expressionsmuster in EBs als Kandidaten für Entwicklungsgene isoliert. RA-behandelten EBs wurde von Gajovic et al. (1998) verwendet, um Gene zu identifizieren, die in neuronalen Zellen exprimiert werden.

1.5. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gene-trap Verfahren etabliert werden und die Anwendung zur Isolierung entwicklungsrelevanter Gene in der Maus getestet werden. Ein Fernziel wäre die sättigende Mutagenese des Mausgenoms mit dieser Methodik.

Spezifisch sollte die Plausibilität der *in vitro* Selektion in ES-Zellen untersucht werden. Weiterhin sollten Daten gewonnen werden, mit welcher Effizienz die Identifizierung von Genen, die Bestimmung von Expressionsmustern und die Mutagenisierung im Tier gelingt.

Schließlich sollten exemplarisch einige Gene-trap Mauslinien detailliert untersucht werden, mit dem Ziel, die Funktion der getroffenen Gene mechanistisch verstehen zu lernen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Gebrauchswaren

Soweit nicht anders erwähnt, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität, Biochemikalien und Enzyme der Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Stratagene (Heidelberg) verwendet. Radioaktive Substanzen stammten von Amersham Buchler (Braunschweig). Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Wilke & Witzel (Hamburg) bezogen.

Anti-Digoxygenin-AP Fab Fragmente 50u	Boehringer (Mannheim)
Blottingpapier GB-003	Schleicher & Schüll (Dassel)
DEAE-Membran NA 45	Schleicher & Schüll (Dassel)
Digoxygenin-11-UTP	Boehringer (Mannheim)
Einmalfilter Minisart NML(0,45- und 0,20 µm)	Sartorius (Göttingen)
Filterpapier 0858	Schleicher & Schüll
Glasperlen (3 mm)	Wilke und Witzel (Hamburg)
Hefe t-RNA	Boehringer (Mannheim)
NBT	Boehringer
Nitrocellulosefilter BA 85	Schleicher & Schüll
Objektträger und Deckgläser	Schütt (Göttingen)
Petrischalen	Nunc, Greiner
Polyamidmembran Nytran Plus	Schleicher & Schüll
Polyesterfilter PeCap HD7-N (1 µm)	Tetko (München)
Rapid Fix	Kodak
Reaktionsgefäße	Schütt (Göttingen)
Ribonukleotid Triphosphate	Boehringer
Röntgenfilme Fuji, Kodak	(Frankfurt am Main)
SDS	Biorad (München)

2.1.2. Enzyme

DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	Promega (Heidelberg)
Polynukleotidkinase	New England Biolabs (Schwalbach)
Proteinase K	Boehringer (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach)
Reverse Transkriptase	Promega (Heidelberg)
Rnase A	Boehringer (Mannheim)
Rnase H	Promega (Heidelberg)
Superscript Reverse Transkriptase	Gibco BRL (Eggenstein)
T4 DNA Ligase	Promega (Heidelberg)
T7, T3, SP6 RNA Polymerase	Promega (Heidelberg)
Taq-Polymerase	Promega (Heidelberg), Takara
Terminale Desoxynukleotidyl Transferase (TdT)	Gibco BRL (Eggenstein)

2.1.3. Allgemeine Puffer und Stammlösungen

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch in der Molekularbiologie wurden nach Maniatis et al. (1982) oder Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert, bzw. sterilfiltriert.

<u>20 x SSPE</u>	3 M NaCl; 0,2 M Na ₂ PO ₄ x H ₂ O; 0,02 M EDTA; pH 7,4
<u>20x SSC</u>	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 7
<u>5 x TBE</u>	445 mM Tris-HCl (pH 8,2); 445 mM Borsäure; 10 mM EDTA
<u>50 x TAE</u>	2 mM TrisHcl pH 8; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA
<u>Chloropan</u>	Für 1 l: 500 ml mit TE pH 8 gesättigtes Phenol mit 500 ml Chloroform mischen. 0,5 g 8-Hydroxychinolin (E.K. 0,5 %) zugeben
<u>Denhardts-Lösung 50x</u>	1% Rinderserumalbumin; 1% Polyvinylpyrrolidin; 1% Ficoll 400

<u>GET-Puffer</u>	25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM Glucose; 10 mM EDTA
<u>Hybridisierungslösung I</u> (Nitrozellulosefilter)	% Formamid; 5 x Denhardts Lösung; 5 x SSPE ; 0,1 % SDS; 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
<u>Hybridisierungslösung II</u> (Church-Puffer)	0,5 M NaH ₂ PO ₄ ; 1 mM EDTA pH 8,0; 7 % SDS
<u>Lachs-/Heringssperm DNA</u>	1 g Lachs-/Heringssperm DNA in 50 ml H ₂ O (E.K.20 mg/ml) lösen. DNA in einem Ultraschall Homogenisator (2 x 10 min) sonifizieren, 10 min kochen und bei -20 °C lagern. DNA vor Gebrauch erneut denaturieren.
<u>LB-Agar</u>	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; 15 g Agar (auf 1 l H ₂ O, pH 7,2)
<u>LB-Medium</u>	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl (auf 1 l H ₂ O, pH 7,2)
<u>Neutralisierungslösung</u>	1.5 M NaCl; 1 M Tris-HCl (pH 7,0)
<u>PBS-Puffer</u>	130 mM NaCl; 7 mM Na ₂ HPO ₄ ; 3 mM NaH ₂ PO ₄
<u>TE-Puffer</u>	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA
<u>TE-Puffer</u>	10 mM TrisHCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

2.1.4. Verwendete Kits

DNA Cycle Sequencing Kit	Abi (Weiterstadt)
DNA Sequencing Kit "Sequenase™ Version 2,0"	Amersham (Braunschweig)
Jetnick Probe Purification Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Jet-Sorb Gel Extraktions Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Lambda DASH® II/BamHI Vektor Kit	Stratagene (Heidelberg)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)

2.1.5. Zelllinien

- ES-Zellen: **J1** (Li et al., 1992, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Braun) aus dem Stamm 129 Sv (A/A, C/C; Haplotyp X/Y; Stevens und Little, 1954).
- Stabil mit dem Gene-trap Vektor SA-IRES- β Geo (Chowdury et al., 1997) transfizierte ES-Zellen **R1** (Nagy et al., 1993), Elektroporation XVI, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Peter Gruss.
- **STO**-Fibroblasten (Ware und Axelrad, 1972), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Brand.
- **Q2bn**: hBMP2 produzierende Fibroblasten Zelllinie aus Wachtel (Duprez et al., 1996), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Brand.

2.1.6. Bakterienstämme

Zur Transformation von Standard Plasmid-DNA wurden *E.coli* Zellen des Stammes **XL1-Blue** verwendet (supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac-; F-[proAB+, lacIq lacZdeltaM15, Tn10 (tetr)]), (Bullock et al., 1987). Die Bakterien wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Für das Screening der λ gt11-Phagenbank wurden *E.coli* Zellen des Stammes **Y1090r** (araD139, hsdR [rk-, mk+] mcrA-, rpsL, supF, trpC22::Tn10, Δ lacU169, Δ lon (pMC9)) (Suggs et al., 1981) verwendet.

Für das Screening der Uni-ZAPTM XR-Bank wurden *E.coli* Zellen des Stammes **XL1-Blue MRF'** (Δ (mcrA)183, Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10 (tetr)]) und den Stamm SOLR/TM (e14- (mcrA), Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, umuC::Tn5(kanr), uvrC, lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1, λ R[F'proAB, lacIqZ Δ M15]Su-(nonsuppressing) (Huynh et al., 1985) (Fa. Stratagene, Heidelberg) verwendet.

2.1.7. Vektoren

- Für routinemässigen Klonierungen wurden die Plasmide **pKS** und **pBS** der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet.

- Für Klonierungen von PCR-Fragmente wurde der **PGEM-T** Vektor (Promega, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Er ist mit EcoRV linearisiert und enthält 3'-Thymidine an beiden Enden. Die 3'-T-Überhänge der Insertionsstelle vermeiden die Religierung des Vektors und sind somit kompatibel mit PCR-Produkten, denen 5'-A-Überhänge durch die Taq-Polymerasen zugefügt worden sind.
- Zur Elektroporation der J1 ES-Zellen für die Gene-trap Insertionsmutagenese wurde der Gene-trap Vektor **pT1-ATG** (Hill und Wurst, 1993) verwendet. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Wolfgang Wurst zur Verfügung gestellt.

2.1.8. Antibiotika

Es wurden Stammlösungen der Antibiotika angesetzt, die sterilfiltriert und bei -20°C gelagert wurden. Die jeweils benötigten Lösungen wurden den Wachstumsmedien erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C zugegeben.

(Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml H_2O)

2.1.9. Art und Herkunft der verwendeten Proben

Southern/Northern blot-Hybridisierungsproben:

- **Neo** Probe: 600 bp PstI-Fragment aus dem Vektor **PKJ-neo-Sall*** (Braun et al., 1992). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Thomas Braun zur Verfügung gestellt.
- **Myf-5** Probe: SpHI-Fragment aus dem genomischen Klon M3 des Myf5/Myf6 Locus. Die Probe wurde freundlicherweise von Thomas Braun zur Verfügung gestellt.
- **NFκB1** 3 Probe: 168 bp RT-PCR Fragment aus der NFκB1/p105 cDNA (Nukleotide +1609 bis +1777) mit den Primern IKNF5S und IKNF3A (2.1.11) amplifiziert.
- **Lis1 Exon2a-3** Probe: 410 bp RT-PCR Fragment aus der Lis1 cDNA, mit den Primern LisC und LisD amplifiziert (Peterfy et al., 1998) (2.1.11).
- **En2** Probe: 600 bp Kpn1 Fragment aus dem Vektor pT1-ATG (Hill und Wurst, 1993). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Wolfgang Wurst zur Verfügung gestellt.
- **LacZ** Probe: Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Franz Vauti.

Screening-Proben:

- **XVI-168**: RT-PCR Fragment von 540 bp, mit Primer 5-940-GT und 168-3-GT (2.1.11) aus der XVI-168 cDNA (Nukleotide) amplifiziert.
- **III-6**: RT-PCR Fragment von 485 bp mit Primern S22 und 44A (2.1.11) aus der III-6 cDNA (Nukleotide) amplifiziert.

Whole mount-*in situ*-Hybridisierungsproben:

- **XVI-168:** Matrize: 540 bp RT-PCR-Fragment im T-Vektor. Antisense-Probe: Linearisierung mit NcoI, Transkription mit der SP6 RNA-Polymerase.
- **III-6:** Matrize: 485 bp RT-PCR-Fragment im T-Vektor. Antisense Probe: Linearisierung mit NcoI, Transkription mit der SP6 RNA Polymerase.

2.1.10. Mausstämme

- Mäuse der Stämme **ICR** wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Paderborn) bezogen.
- Embryonale Fibroblasten wurden aus homozygoten und heterozygoten Embryonen des **b2-Mikroglobulin**-Mausstammes (Zijlstra et al., 1990) präpariert.
- Die Gene-trap Mauslinien **GTIII-6**, **GTXVI-44** und **2A-53** wurden freundlicherweise von Peter Gruss zur Verfügung gestellt.

2.1.11. PCR-Primer

Gen/cDNA	Primer Name	Primer Sequenz (5'-3')
L6 (Hollenberg et al., 1993)	S-RPL7	AAGACGAAAGGAGCTGCAGAAC
	A-RPL7	GAAGCTCATCTATGAGAAGGC
XVI-168	5-940-GT	TGGAATCAACTGGCATTACC
	168-3-GT	ACGTCTCCACGATCTTGTAGC
III6	S22	GTCAGTTCTCCCCAGTAGAACC
	44A	TTGTCAATCACCCCAAGGACTCG
	III6P5	AATTGCCAGGTTGTTTCACGG
	III6P3	TTCTTGAAGTCACTGTATCTC
	1.1P5II	GGAGGATGACCTCTCCTTG
	1.1P5III	GTAATTAGTGATGGCTCTGAG
	1.1P5IV	CTCCAGTGACAGTGACCTTCT
	1.1P3	GCTCGACTCTCCTTGTACACC
	1.1P3II	CTCCACACAATTATCTCCTGG
	2.2P5	GTTGATGCAGACTCTCTTGCC
	2.2P3	CTCCTCGGCAGGGCTCCTCAG

Gen/cDNA	Primer Name	Primer Sequenz (5'-3')
NFκB1	NFKB5S	GAGGAAGAAAATGGCGGAGTTTGG
	IKB5S	TCATGAGAATCAATCGTCTCTCTG
	NFIK3A	ACTTCCGGGATGGAATGTAATCCCA
	IKNF5S	GGCCCTAAAGATTGTGCCAAG
	IKNF3A	GGTATCCTGAAATCCCATGTC
Pafah1b/Lis1 (Peterfy et al., 1998)	LisA	GGCCCTGCGGAGGCGGTGGTGCA
	LisC	GGCGTCGGGTTCTCCGCTTGTCTTA
	LisD	TGGATTTGAATTAATATGCCACTAT GTGGCTTCCACAG
PT1ATG-Vektor (GSPs für 5' RACE)	LacZRT	TGGCGAAAGGGGGATGTG
	GTLacZ2a	GACTCTGGCGCCGCTGCTCTGTCAG
	Nested2AU	ACCTGTTGGTCTGAAACTCAGCCT
SA-IRES-β Geo (GSPs für 5' RACE)	IRES-1	CCAAAAGACGGCAATATGGTGG
	IRES-2	AAACGCACACCGGCCTTATTC
	EN-1	GCTGCTCTGTCAGGTACCTGTTGG
Universale Primer für 5' RACE	UNIP I	ACCTCAGCTGCAGCTCGAG(T) ₂₄
	UNIP II	ACCTCAGCTGCAGCTCGAGGGIIGGGI IGGGIIG
	UAP	ACCTCAGCTGCAGCTCGAG

2.2. Methoden

2.2.1. Sterilisation von Lösungen und Geräten

Glaswaren wurden bei trockener Hitze bei 180 °C sterilisiert oder bei 134 °C bei einem Dampfdruck von 2,2 bar 20 min autoklaviert. Plastikwaren wurden bei 120°C und einem Druck von 1,1 bar für 30 min autoklaviert. Die Zeitangaben sind reine Sterilisationszeiten. Nicht hitzestabile Lösungen wurden durch Filtration durch Zelluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilisiert.

2.2.2. Standardbedingungen und –methoden der Molekularbiologie

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach den molekularbiologischen Standardmethoden durchgeführt, wie sie z.B. in Sambrook et al. (1989) oder Ausubel et al.

(1992) niedergelegt sind. Reagenzien und Proben für die Vorbereitung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Verwendete Medien, Puffer und sonstige Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Ihre Zusammensetzung sowie die Durchführung gentechnologischer Standardverfahren wurden, sofern nicht anders erwähnt, nach oder in Anlehnung an Protokolle aus den Methodenbüchern "Molecular Cloning" (Sambrook et al., 1989) und "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel et al., 1992) durchgeführt. Enzymatische Reaktionen wurden mit den angebotenen Puffern nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Sofern nicht näher erwähnt, wurden folgende Standard-Methoden nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt: Präzipitation von Nukleinsäuren; Chloroformextraktion von Nukleinsäuren; Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen; Ligation von DNA-Fragmenten; Transformation von *E.coli* XL1-Blue-Zellen; Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten *E.coli* XL1-Blue-Zellen im analytischen Maßstab; photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren; Agarose-Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA-Fragmenten.

Das Isolieren von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde nach Angaben des Herstellers mit dem "Jet-Sorb Gel-Extraktionskit" (Genomed, Bad Oeyenhausen) durchgeführt. Sequenzreaktionen wurden nach der Methode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung des "Sequenase-Version-2.0-DNA-Sequencing-Kits" (Amersham, Braunschweig) durchgeführt. Zur Elektrophorese wurde ein in Sambrook et al. (1989) entsprechend beschriebenes Gel-System verwendet. Die Isolierung von DNA in präparativen Maßstab wurde mit dem Midi-Präparation System der Firma Quiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3. Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren

2.2.3.1. Extraktion genomischer DNA aus tierischen Geweben

Zur Isolation genomischer DNA wurde die Methode von Laird et al., (1991) angewandt, die für die Analyse großer Zahlen tierischer Gewebe konzipiert wurde. Die DNA bleibt bei dieser Methode durch den Verdau endogener Nukleasen durch Proteinase K intakt.

Mäuse, gewöhnlich in einem Alter von 4-6 Wochen, wurden kurz mit Hilfe von Diethylether betäubt. Ca.1 cm der Schwanzspitze wurde bei Raumtemperatur in 500 µl Lysis-Puffer überführt und ü.N. bei 55°C schüttelnd inkubiert. Unverdaute Debris wurde bei Raumtemperatur ca. 10 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge präzipitiert. Die DNA aus dem Überstand wurde nach einer Chloroform-Extraktion (optional) mit 500µl Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge und einem Waschschriff in 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet in 100 µl 1 x TE gelöst und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Lösungen:

- Lysis-Mix: 100 mM Tris-HCl (pH 8,5); 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200 mM NaCl; 100 µl Proteinase K/ml

2.2.3.2. Präparation von RNA aus tierischen Gewebe

Die für die Präparation verwandten Chemikalien waren ausschließlich für diesen Zweck reserviert. Als Lösungsmittel wurde steriles pyrogenfreies Wasser verwendet. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Bei allen Enzymreaktionen, bei denen RNA als Substrat dient, wurde RNase-Inhibitor in den Ansatz miteingeschlossen.

Die Entnahme der Gewebestücke zur RNA-Präparation fand möglichst unmittelbar post mortem statt. Die Identifikation der Organe erfolgte makroskopisch, wobei Bindegewebe und Fettgewebsanteile möglichst vollständig mit dem Skalpell entfernt wurden. Die gesäuberten und in physiologischer Kochsalzlösung gewaschenen Organteile wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die RNA-Extraktion aus adulten Maus-Organen wurde, wie in Manniatis et al., (1989) beschrieben, durchgeführt. Das Gewebe wurde in Guanidium-Thiocyanat-Puffer mit Hilfe des Ultrathörax (T25, Janke & Kunkel) homogenisiert, bis keine Gewebestücke sichtbar waren. Das Homogenisat wurde dann auf ein CsCl-Kissen (>1,8 g/ml) überführt und in der Ultrazentrifuge SW40 Rotor ca. 20 Stunden bei 40000 Upm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das RNA-Pellet getrocknet, in sterilem Wasser gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde die RNA mit NaAcetat und Ethanol gefällt.

Lösungen:

- RNA Lysis Puffer: 4 M Guanidium-Thiocyanat; 1 M β -Mercaptoethanol
- Cäsiumchlorid-Kissen: Für 30 ml: 28,79 g CsCl₂; 3 ml 1M EDTA pH 7; 15 μ l β -Mercaptoethanol

Die RNA-Isolierung aus kleinen Gewebemengen wurde nach Chomzyensky und Sacchi (1987) durchgeführt. 100 mg Gewebe wurden mit 1 ml Homogenisierungslösung versetzt und sofort mit dem Ultrathurax homogenisiert. Nach Zugabe von 0,1 ml 2 M Na Acetat, pH 4,0 und Vortexen, 1 ml Tris gesättigtes Phenol (Roth) und Vortexen, 0,2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und Vortexen, wurde die Präparation für 10 sec wiederum gevortext und danach 15 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden so in die Organischen Lösungen extrahiert. Zur Phasentrennung wurde die Lösung 20 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann nach Zugabe von 1 ml Isopropanol 1 Stunde bis ü.N. bei -20°C gefällt. Das RNA-Pellet wurde in 0,3 ml Homogenisierungslösung gelöst und erneut mit einem Volumen Isopropanol gefällt. Nach dem Waschen in 75 % Ethanol wurde das RNA-Pellet in 50 μ l Wasser gelöst und quantifiziert.

Lösungen:

- Homogenisierungslösung: 4 M Guanidium-Isothiocyanat; 25 mM NaCitrat pH 7,2; 0,5 % Sarcosyl; 0,1 M β -Mercaptoethanol

2.2.3.3. Präparation von RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen wurde das RNazol™-System der Firma AGS verwandt, welches eine Kombination der Methoden von Chirgwin et al. (1979) und Chomczynski and Sacchi (1987) darstellt.

2.2.4. Isolierung rekombinanter Klone aus einer cDNA-Phagenbank

Zur Isolierung der XVI-168 cDNA wurde eine Uni-ZAP™XR Bank (Stratagene) von Maus 10.5 dpc Herz verwendet. Zur Isolierung der III-6 cDNA wurde eine λ gt11-Phagenbank (Clontech) von 13.4 dpc Maus verwendet. Die Vorgehensweise zur Isolierung der gesuchten Genen entsprach den Herstellerprotokollen. Dazu wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

1. Ausplattierung der Bank
2. Herstellung und Hybridisierung der Replikafilter

3. Anreicherung der positiven Klone
4. Isolierung von Phagen-DNA

1. Ausplattierung der Bank

Als Wirtsbakterien für die λ gt11-Bank wurde der *E.coli* Y1090r- Stamm, als Wirtsbakterien für die Uni-ZAPTMXR Bank wurde der Stamm *E.coli* XL1Blue verwendet. Für die Ausplattierung der Bank wurden die Bakterien in LB-Medium +0,2 % Maltose + 10 mM MgSO₄ über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und das Bakterienpellet wurde in SM-Puffer aufgenommen. Die OD₆₀₀ sollte dabei zwischen 1,5 und 2 liegen. (1 OD₆₀₀ korrespondiert mit etwa 8 x 10⁸ Zellen/ml).

Pro Platte wurden etwa 10⁵ Phagen ausplattiert. Dementsprechend wurden pro Platte 10⁵ Phagen mit 600 μ l Bakterien für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml Topagar (45 °C) wurden die infizierten Bakterien auf bei 37 °C vorgewärmten λ -Agar (λ gt11)- bzw. NZY-Platten (UniZAPTM XR) gegeben und bei 37 °C für 3-8 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2. Herstellung und Hybridisierung der Replikafilter

Nach vollständiger Lyse der Bakterien wurden zwei Nitrozellulose-Filter pro Platte gezogen, 1 min denaturiert, 5 min neutralisiert, in 2 x SSPE gewaschen, luftgetrocknet und die DNA bei 80 °C für 2 Stunden im Vakuumofen fixiert.

Die Filter wurden bei 42 °C 2 bis 5 Stunden in Prähybridisierungslösung in einer Plastiktüte (5 ml Lösung pro Filter) inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C mit einer α^{32} -P-markierten Probe einer Aktivität von ca. 10⁶cpm/ml. Als Probe dienten durch PCR-amplifizierte Fragmente der XVI-168 bzw. III-6 cDNA. Nach der Hybridisierung wurden die Filter zweimal für 30 min bei 55 °C mit Waschlösung gewaschen.

3. Anreicherung der positiven Klone

Die positiven Phagen-Plaques wurden mit einer Pasteur-Pipette aus der Agar-Platte ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer mit 50 μ l Chloroform aufgenommen. Nach Diffusion der Phagen wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt (10⁻³, 10⁻², 10⁻¹), erneut ausplattiert und mit der Probe hybridisiert.

4. Isolierung von λ gt11-Phagen-DNA

Die positiven Phagen wurden ausplattiert und mit 10-15 ml SM-Puffer bei 4 °C über Nacht von den Platten abgeschwemmt. Das Lysat wurde dann mit Chloroform ausgeschüttelt (500 μ l pro 10 ml Lysat) und kann so bei 4 °C gelagert werden.

0,6 ml des Phagenlysates, dessen Titer nicht kleiner als 5×10^8 pfu sein darf, wurden mit einer gleichen Menge an DEAE-Zellulose in einem Eppendorfreaktionsgefäß gemischt. Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert. 0,6 ml des Überstandes wurden im folgenden mit 0,12 ml Lysis Puffer vermengt, gevortext und 15 min bei 70 °C inkubiert. Die Reaktion wurde ca. 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt, bevor 75 μ l 5 M Kaliumacetat dazugegeben wurde. Die Lösung wurde gevortext und 15 min auf Eis belassen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei RT wurden 0,8 ml des Überstandes mit 0,5 ml Isopropanol 2 min bei RT gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 10-50 μ l Wasser gelöst. Die Länge des cDNA-Inserts wurde durch Restriktionsendonukleaseverdau überprüft. Da die Menge der erhaltenen DNA sehr gering ist, ist die Umklonierung des Inserts in ein Plasmid und dessen Transformation in Bakterien zwecks der Vermehrung zu empfehlen.

Lösungen:

- λ -Agar: Für 1 l: 10 g Bacto-Tryptone; 2,5 g NaCl; 10 g Agar
- λ -Top Agarose: Für 1 l: 10 g Bacto-Tryptone; 2,5 g NaCl; 7 g Agarose
- NZY-Agar: Für 1 l: 5 g NaCl; 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NZ-Amine; pH 7,5; 15 g Agar
- NZY-Top Agar: Für 1 L: 5 g NaCl; 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NZ Amine; pH 7,5; 15 g Agarose
- Lysis-Puffer: 10 mM Tris pH 8; 2,5 % SDS; 250 mM EDTA
- SM-Puffer: 4 M NaCl; 1 M MgSO_4 ; 1 M Tris pH 7,5; 2 % Gelatine

2.2.5. Southern-Transfer von DNA und radioaktive Hybridisierung

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich alkalische Southern-Blotts nach der Methode von Ausubel et al. (1992) durchgeführt. Dazu wurde die DNA zunächst 10 min in 0,45 % HCl depuriniert und unverzüglich in 0,4 M NaOH über Nacht auf eine positiv geladene Polyamidmembran transferiert. Die Membran wurde schließlich kurz in 2 x SSC gewaschen

und im Vakuum-Ofen für 2 Stunden bei 80 °C fixiert. Es schloß sich ein einstündiger Waschschrift in 0,1 x SSC und 0,5 % SDS bei 65 °C an. Die Prähybridisierung erfolgte in Church-Puffer mit 0,2 mg/ml Heringsspermien-DNA 2-3 h bei 65 °C. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls in Church-Puffer bei 65 °C. Die Menge an radioaktiv-markierter Probe variierte zwischen 500.000 cpm/ml (für die Detektion von Plasmid-DNA) und 4 Mio. cpm/ml (für die Detektion von genomischer DNA). Die Hybridisierung wurde mindestens für eine Dauer von 8 Stunden durchgeführt. Im Anschluß wurde die Membran viermal für jeweils 15 min bei 65 °C in 0,04 M NaH₂PO₄ (pH 6,7) und 1 % SDS gewaschen. Zum Exponieren wurden die Filter in Klarsichtfolie eingeschlagen. Bei Bedarf wurde die hybridisierte Probe in 0,4 N NaOH für 30 min bei 42 °C abgewaschen. Die Membran wurde danach in 0,1 x SSC/0,5 % SDS und 0,2 M Tris pH 7,5 neutralisiert.

2.2.6. Markierung von Nukleinsäuren

2.2.6.1. Radiaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Herstellung von Southern blot-Hybridisierungsproben) erfolgte entsprechend der Methode des "random -Priming" (Feinberg und Vogelstein, 1984). Die Methode beruht auf der Hybridisierung von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen (random Primer) an die zu markierende DNA. Die Markierung erfolgte mittels Multiprime-System der Fa. Amersham (Braunschweig). Für eine Reaktion wurde etwa 50 ng DNA hitzedenaturiert (10 min 95 °C), mit Hexanukleotiden, dNTPs, 50 µCi (α -³²P)-dCTP und Klenow-Polymerase gemäß Herstellerangaben versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die markierte DNA mit Ethanol gefällt, das Präzipitat nach Zentrifugation zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.2.6.2. Markierung von RNA mit Digoxigenin

Zur Herstellung der Whole mount *in situ* Hybridisierungsprobe wurde die Plasmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert, und die Probe mit der entsprechenden RNA-Polymerase in der Gegenwart von Digoxigenin-markierten Ribonukleotiden synthetisiert.

Reaktionsansatz:

Bidest. H ₂ O	13 µl
0,2 M DTT	1 µl

10 x Transkriptionspuffer	2 µl
Ribonukleotid-Mix	2 µl
Linearisiertes Plasmid	1 µg
Rnase-Inhibitor	50 U
RNA-Polymerase (T3, T7, SP6)	<u>10 U</u>
Gesamtvolumen	20 µl

Lösungen:

- 10 x Transkriptionspuffer: 400 mM TrisHCl pH 8,25; 60 mM MgCl₂; 20 mM Spermidin
- Ribonukleotid-Mix: 10 mM GTP; 10 mM ATP; 10 mM CTP; 6,5 mM UTP; 3,5 mM Digoxigenin-UTP

Der Ansatz wurde für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert, nach der Synthesereaktion mit 2 µl Ribonuklease-freier Dnase I (10 U) zur Degradation der Plasmid-DNA versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Volumen des Ansatzes wurde mit 1 x TE auf 100 µl erhöht, die RNA unter Zugabe von 10 µl 4 M LiCl und 300 µl EtOH präzipitiert, pelletiert und in 100 µl TE-Puffer oder bidest. H₂O resuspendiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Ansatzes zur Überprüfung der Effizienz der Probesynthese im Agarosegel aufgetrennt. Bis zur Verwendung wurde die Probe bei -20°C gelagert.

2.2.7. Exposition von Autoradiogrammen

Je nach Aktivität der Autoradiogramme wurden Filme verschiedener Empfindlichkeit verwendet. In lichtundurchlässigen Kassetten wurde das getrocknete Gel, bzw. der Filter mit einem plan aufliegenden Film exponiert. Die Dauer und Temperatur der Exposition richteten sich dabei nach der Aktivität des Autoradiogrammes. Bei Sequenzgelen und Souther-Blotts wurden üblicherweise die empfindlicheren Kodak-Filme (Kodak X-AR5) verwendet.

2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Technologien

2.2.8.1. Standard-PCR

Standard-PCR-Anwendungen wurden nach Protokollen aus dem Handbuch von McPherson et al. (1991) durchgeführt. PCR-Technologien wurden zum Nachweis unterschiedlicher mRNAs (RT-PCR) und zur Isolierung von unbekanntem 5' oder 3' cDNA Sequenzen (5'RACE-PCR).

Die PCR-Reaktionen wurden mit einer PCR-Maschine (Hybeid Omnigene, Fa. MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden PCR-Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 μ l in folgender Standardzusammensetzung durchgeführt:

Sense (5')-Primer	1 μ M
Antisense (3')-Primer	1 μ M
dNTP's	Jeweils 0,2 mM
Reaktionspuffer (10 x)	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
Taq-DNA-Polymerase	0,025 U/ μ l

Die eingesetzte Menge an DNA war bei den verschiedenen PCR-Verfahren unterschiedlich. Bei mehr als einer PCR-Reaktion mit identischen Primer-Paaren wurden grundsätzlich sogenannte Master-Mixe, bestehend aus den o.g. Komponenten ohne DNA, hergestellt und dieser dann zur DNA pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 1 Tropfen (50 μ l) Mineralöl überschichtet. In Fällen, in denen die PCR-Maschine mit einer Deckelheizung ausgestattet war, entfiel die Überschichtung mit Mineralöl.

Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorabdenaturierung	1	94-95 °C	2 min
Denaturierung		94-95 °C	1 min
Annealing	15-35	46-76 °C	30 sec-1 min
Extention		70-76 °C	1 min/1000 bp
Extention	1	70-76 °C	5 min
Kühlen	1	25 °C/4 °C	stop

2.2.8.2. Primer-Design

Das Design von Primer-Paaren ist für PCR-Reaktionen von entscheidender Bedeutung und wurde nach folgenden Grundregeln durchgeführt: Die Länge eines PCR-Primers sollte zwischen 17 und 27 Basen liegen. Die Schmelztemperaturen beider Primer eines

Primerpaares lagen möglichst nahe beieinander und unterschieden sich um nicht mehr als 2 °C. Die Kenntnis der Schmelztemperaturen ist für die Festlegung der Annealing-Temperatur, das ist die Temperatur, bei der ein Primer spezifisch und stabil an eine DNA-Matrize hybridisiert, notwendig. Die Berechnung der Schmelztemperatur eines Primers in einer PCR-Reaktion ist von den Konzentrationen von Salz und Tris-HCl im Reaktionspuffer sowie der Länge, der Konzentration und der Sequenz des Primers abhängig. Die Annealing-Temperatur (T_{an}) wird nach der folgenden Faustformel berechnet:

$$T_{an} = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - (0 \text{ bis } 10)$$

wobei T_{an} maximal gleich der optimalen Synthesetemperatur der thermostabilen DNA-Polymerase sein sollte (70-74 °C). Der G/C-Gehalt der Primer betrug zwischen 45 % und 60 %, wobei G und C möglichst gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilt waren. Am 3' Ende endeten die Primer möglichst mit den Nukleotiden A/T, G/C, G/C. Es wurde vermieden solche Primer zu entwerfen, die während des Annealing dimerisieren könnten. In einigen Fällen wurde das Design von Primern durch den Computerprogramm „Gene Jockey“ (Biosoft, Cambridge, UK) durchgeführt. Die hierdurch vorgeschlagenen Primer wurden nach o.g. Regeln überprüft und ggf. modifiziert. Die Kontrolle möglicher Primer-Dimerisierungen wurde mit dem Program „Amplify“ (University of Wisconsin, Genetics, Madison, WI, USA) durchgeführt.

Alle Primer wurden in einem Servicelabor der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig hergestellt bzw. bei der Firma Eurogentec (Belgien) bezogen. Die Konzentration der Primer in OD-Einheiten wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ihre Molaritäten wurden nach der Formel $\text{pmol}/\mu\text{l} = \text{OD}_{260} / (0,01 \times N)$ berechnet, wobei N die Anzahl der Nukleotide ist.

2.2.8.3. RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine empfindliche Methode zum Nachweis spezifischer mRNAs.

2 µg Gesamt-RNA wurden in Gegenwart von 0,5 µg oligo p(dT)₁₅-Primer in einem Volumen von 13 µl für 5 min bei 70 °C erwärmt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Hierbei hybridisiert der Primer an die poly(A)-Schwänze der mRNA. Die cDNA-

Erstrangsynthese wurde durch Zugabe von 5 µl 5 x AMV-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 42 °C; 250 mM KCl; 50 mM MgCl₂; 2,5 mM Spermidin) 2,5 µl DTT, 2,5 µl 10mM dNTP's, 0,7 µl (25 U gesamt) RNase-Inhibitor (RNasin, 40 U/µl), 0,65 µl Wasser und 0,65 µl (15 U gesamt) Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse-Transkriptase (AMV-RT, 23 U/µl) und Inkubation für 60-120 min bei 42 °C durchgeführt. Bei mehr als einer Erstrangsynthese-Reaktion wurde aus diesen Komponenten ein Mix hergestellt und 12 µl hiervon zu den 13 µl der Hybridisierungs-Reaktionsansätze pipettiert. Die Reaktion wurde danach durch Erhitzen bei 100 °C für 2 min gestoppt. Der Ansatz wurde anschließend mit 75 µl Wasser verdünnt. Hiervon wurden 2,5 µl für Standard-PCR-Reaktionen verwendet. 10 µl der PCR-Ansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.8.4. 5`RACE-PCR

Die 5`RACE ("*Rapid amplification of cDNA Ends*") ist eine spezielle Variante der RT-PCR-Methode, bei der durch Anhängen eines Homopolymerschwanzes (poly(A)- oder poly(C)-„Tailing“) an das 5`Ende der revers transkribierten RNA die Amplifizierung und Klonierung von unbekanntem mRNA-Sequenzen, die 5` von einer bekannten Sequenz liegen, ermöglicht wird. Die PCR-Reaktion findet unter Einsatz eines Universalprimers, welcher an den Homopolymerschwanz binden kann sowie 3`-gelegenen, genspezifischen antisense-Primers (GSP) statt. Da im Gegensatz zur RT-PCR nur ein spezifischer Primer eingesetzt werden kann, führen mehrere aufeinanderfolgende Amplifikationsrunden mit innereinander verschachtelten („nested“) Primern zu einer höheren Spezifität der PCR-Produkte. In einer 5`RACE-PCR werden die folgenden Schritte durchgeführt:

1. Synthese des ersten Stranges der cDNA
2. Aufreinigung der cDNA
- 3 TdT-„Tailing“ der cDNA
- 4 Vorverstärkung: Erste PCR-Amplifikation der cDNA
- 5 Nachverstärkungen: Zweite und dritte PCR-Amplifikation der cDNA

1. Synthese des ersten Stranges der cDNA

Die Ersttrang-Synthese oder reverse Transkription wurde wie (2.2.8.3) mit einem genspezifischen antisense-Primer (GSP-1) durchgeführt. Im Anschluß an die reverse Transkription wurde der cDNA Erstrangansatz mit 1 µl RNaseH (1 U/µl) versetzt und 15 min bei 55 °C inkubiert.

2 Aufreinigung der cDNA

Die Syntheseprodukte wurden von verbleibender RNA, dNTPs und dem verwendeten Primer gereinigt, da sich diese Komponenten negativ auf die „Tailingreaktion“ auswirken können. Die Aufreinigung wurde mittels "GlassMax SpinColumns" (Gibco) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

3 TdT-„Tailing“ der cDNA

Im folgenden wurden die cDNA-Erstrangprodukte mittels der Terminalen Desoxynukleotidyl Transferase (TdT) unter Verwendung von dATP bzw. dCTP "getailt":

Tailingreaktion:

Bidest. H ₂ O	6,5 µl
5 x TdT Puffer	5,0 µl
2 mM dATP bzw. dCTP	2,5 µl
cDNA	10 µl

Der Ansatz wurde für 2 min auf 94 °C erhitzt und dann für 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 U TdT erfolgte die Synthesereaktion für 15 min bei 37 °C. Anschließend wurde die TdT durch 10-minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert.

Für die Amplifikation des 5'-Bereichs werden mindestens zwei weitere genspezifische antisense Primer benötigt (GSP-2, GSP-3). Diese sollten ungefähr eine kalkulierte T_M von 65 °C besitzen. Als unspezifischer Gegenprimer wird in der ersten PCR-Reaktion (Vorverstärkung) zunächst der Oligo(dT)-Primer UNIP-1 oder, falls mit dCTP getailt wurde, der Primer UNIP-2 eingesetzt. Während der Nachverstärkungen wird der Primer UAP verwendet. Die Sequenz von UAP ist sowohl in UNIP-1 als auch in UNIP-2 enthalten.

4 Vorverstärkung

In der Vorverstärkung wurde die Templatekonzentration variiert, indem jeweils 1 µl des Tailingansatzes bzw. 1 µl einer 1:10-Verdünnung eingesetzt wurden. Die Reaktionen erfolgten in 25 µl-Ansätzen unter Einsatz von 0,2 mM dNTPs, je 10 pmol Primer (GSP-2/UNIP-1 bzw. UNIP-2), 1,5 mM MgCl₂ und 1 U Taq-Polymerase.

5 Nachverstärkung

Die erste Nachverstärkung wird direkt im Anschluß analog der Vorverstärkung durchgeführt. Als Primer werden GSP-2 und UAP, als Template 1 µl des Vorverstärkungsansatzes eingesetzt. Durch die Verwendung des Primers UAP kann eine höhere Annealing-Temperatur eingestellt werden. Die zweite Nachverstärkung wurde analog den vorhergegangenen PCR-Ansätzen durchgeführt. Als Primer wird GSP-2 durch GSP-3 ersetzt. Durch die Verwendung des Primers GSP-3 und die Wahl einer geringeren Zykluszahl werden genspezifische Amplifikationsprodukte in der Nachverstärkung bevorzugt.

Die Reaktionsansätze wurden im Agarosegel aufgetrennt und spezifische Amplifikationsprodukte durch Southernblot-Analyse oder durch Klonierung und Sequenzierung identifiziert. Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mittels T-Vektor.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 5'RACE-PCR durchgeführt, um endogene cDNA Sequenzen zu klonieren, die am 5' Ende der Insertionstelle des Gene-trap Vektors liegen. Das Gene-Trap-Konstrukt diente als Matrix (bekannte Sequenz) für die genspezifischen antisense "nested" Primer (GSP). Die genspezifischen antisense-Primer wurden entsprechend der für die Insertionsmutagenese verwendete GT-Vektoren ausgewählt (Tab. 3). Die Standard PCR-Bedingungen für die 5'RACE-PCR sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die Annealing-Temperatur wurde für jedes Primerpaar optimiert

Vorverstärkung	UNIP-1: 35 x (95 °C 30 s, 42 °C 30 s, 74 °C 60 s) UNIP-2: 35 x (95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 74 °C 60 s)
1. Nachverstärkung	20-25 x (95 °C 30 s, >55 °C 30 s, 74 °C 60 s)
2. Nachverstärkung	10-15 x (95 °C 30 s, >55 °C 30 s, 74 °C 60 s)

Tab. 2: Standard PCR Bedingungen für die 5'RACE-PCR.

GSP Primer	Gene-trap Vektoren	
	SA-IRES-β Geo	PT1ATG
GSP-1	IRES-1	LacZRT
GSP-2	IRES-2	GTLacZ2a
GSP-3	EN-1	Nested 2AU

Tab. 3: Verwendete GSP-Primer.

2.2.9. Methoden zur Sequenzanalyse

Eine Computeranalyse der Gensequenzen auf Homologien zu anderen bekannten Gensequenzen wurde mit Hilfe der BLAST-Search Programme des NCBI ("National Center for Biotechnology Information") durchgeführt, welche durch die homepage des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zugänglich ist.

Eine Nukleotid- oder Aminosäuresequenz, die im BLAST Server eingegeben wird ("query"), wird durch dieses Programm mit Datenbanken des NCBI ("subject") verglichen und eine Zusammenfassung der Ergebnisse wird zum Benutzer zurückgesendet. Die BLAST-Programme wurden von Altschul et al., (1997) beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit benutzten BLAST-Programme waren:

- Das BLASTP-Programm vergleicht eine eingegebene Aminosäuresequenz mit einer Proteinsequenz-Datenbank.
- Das BLASTN-Programm vergleicht eine eingegebene Nukleotidsequenz mit einer Nukleotidsequenz-Datenbank.
- Das BLASTX-Programm vergleicht die theoretische Translation in den sechs möglichen Leserastern einer eingegebenen Nukleotidsequenz mit einer Proteinsequenz-Datenbank.

Die Suche von kodierenden Sequenzen in einer Nukleotidsequenz wurde mit Hilfe des Leseraster-Sucher "ORF-Finder" (Open reading frame finder) Programms des NCBI durchgeführt, das ebenfalls durch die Homepage des NCBI zugänglich ist. Das ORF Finder-Programm findet alle sechs mögliche Leseraster einer selektierbaren minimalen Länge in einer durch den Benutzer eingegebenen oder in den Datenbanken vorhandenen Nukleotidsequenz.

2.2.10. Zellkultur-Methoden

2.2.10.1. Kultivierung von ES-Zellen

ES-Zellen der Linien J1 und R1 wurden zusammen mit MitomycinC-behandelten Embryonalen Feeder- (Emfi) oder STO-Zellen auf 0,2 % Gelatine-beschichteten Kulturschalen kultiviert. Das Kulturmedium wurde aufgrund der starken Ansäuerung durch die ES-Zellen, täglich gewechselt. Eine Passagierung wurde, in Abhängigkeit der Zelldichte, alle 2-3 Tage durchgeführt. Bei regulären Passagen wurden die ES-Zellen zweimal durch Zugabe von HEPES-Puffer gewaschen und anschließend in Trypsin/EDTA/HEPES Puffer trypsinisiert und 1:3 bis 1:8 geteilt. Vor der erneuten Plattierung wurde die Trypsinlösung durch Zentrifugation bei 1000 U/min entfernt. Bei jeder Passage wurden Stocks der ES-Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Medien für die Kultur von ES-Zellen

- Kulturmedium: Für 500 ml: 425 ml 1 x DMEM; 75 ml fötales Kälberserum (Hitze inaktiviert bei 56 °C für 30 min. E.K: 15 %); 5 ml nicht essentielle Aminosäuren (100 x Stock von Gibco); 5 ml Antibiotika (100 x Penicillin/Streptomycin Stock); 4 µl β-Mercaptoethanol; optional: + 250 µl LIF (106 U/ml)
- Gelatine-Lösung: 0,2 % Gelatine in Wasser
- Trypsin-EDTA: 0,25 % Trypsin (Aus einem 2,5 %igem Stock, Mycoplasmen getestet, GIBCO), 1 mM EDTA in HEPES-Puffer, filtriert und bei –20 °C gelagert.
- Einfriermedium: 80 % DMEM, 10 % FCS, 10 % DMSO.
- G418-haltiges Medium: Aus einem 4 mg/ml Stock in HEPES-Puffer. Die G418-Endkonzentration lag bei der Selektion von Gene-trap elektroporierten ES-Zellen bei 0,4 mg/ml.
- HEPES-Puffer: Für 6l: 42,42 g NaCl, 2,4 g KCl, 0,36 g KH₂PO₄, 0,48 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 6,0 g Glucose, 0,06 g Phenolrot, 28,6 g HEPES. Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt; die Osmolarität sollte 290 betragen.

2.2.10.2. *In vitro* Differenzierung von ES-Zellen in Embryoid Bodies.

ES-Zellen differenzieren bei ausreichender Dichte und dem Entzug von Leukemia Inhibitory Faktor (LIF) und Feederzellen spontan in verschiedene Zelltypen aller drei Keimblätter, wie z.B. Blut-, Endothel-, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen. Diese Eigenschaft kann benutzt werden, um die Expression bestimmter Gene während dieses Differenzierungsprozesses zu studieren. In der vorliegenden Arbeit wurden stabil mit dem Gene-trap-LacZ-Reporterkonstrukt transfizierte ES-Zellen *in vitro* differenziert, um die Expression der Gene zu analysieren, die durch die Vektor-Insertion getroffen wurden.

Die ES-Klone wurden induziert, Embryoid Bodies (EBs) zu bilden. Dazu werden die Zellen trypsinisiert und für eine Stunde auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Durch die schnellere Anheftung der embryonalen Feederzellen können ES-Zellen so von diesen separiert werden. Der Überstand mit den ES-Zellen wurde dann auf bakterielle (unbeschichtete; Greiner) Petrischalen ausgesät. Auf den Boden dieser Schalen sind ES-Zellen nicht in der Lage, sich anzuheften. Durch das E-Cadherin Molekül, welches in der Zellmembran von ES-Zellen verankert ist, haben ES-Zellen eine ausgeprägte Affinität zueinander und bilden spontan Aggregat, die sogenannten Embryoid Bodies. Diese Embryoid-bodies werden bis zur Zysten-Formation nach etwa einer Woche kultiviert. Dabei wird das Medium alle zwei Tage gewechselt. Diese werden erneut auf Zellkulturplatten plattiert, auf denen sie spontan in den Differenzierungsprozeß übergehen.

2.2.10.3. Präparation und Kultivierung von "Feederzellen"

Feederzellen sind unentbehrlich für die Routinekultur der ES-Zellen. Feederzellen bestehen aus mitotisch inaktivierten Fibroblastenzellen. Sie werden in einer gleichmäßig verteilten Zellschicht plattiert, auf die die ES-Zellen ausgesät werden. Geeignete Zellen für „Feeder layers“ sind die STO-Fibroblasten (Ware et al., 1972) oder embryonale Fibroblasten. Die mitotische Inaktivierung der Zellen erfolgt durch Behandlung mit dem „Spindelgift“ Mitomycin C (Martin et al., 1975). Nach dieser Behandlung sind die Zellen nicht mehr teilungsfähig.

2.2.10.3.1. Kultivierung von STO-Fibroblasten

Die STO-Fibroblasten-Zelllinie wird in DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin und 20 mM Glutamine kultiviert. Zur Passagierung der STO-Zellen werden diese zweimal in PBS oder HEPES-Puffer gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung trypsinisiert und 1:10 geteilt. G418-resistente STO-Fibroblasten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thomas Brand.

2.2.10.3.2. Präparation und Kultivierung von embryonalen Fibroblastenzellen

Primäre Fibroblastenzellen sind von vielen Autoren (Doetschmann et al., 1985) für die Kultivierung der ES-Zellen bevorzugt. Da sie als Primärzellen nur eine begrenzte Teilungskapazität in Kultur besitzen, müssen sie immer wieder frisch aus Mausembryonen gewonnen werden.

Zur Präparation von Embryonalen Fibroblasten wurden β 2-Mikroglobulin-mutante 13,5-tägige Embryonen (Zijlstra et al., 1990) verwendet. Zellen dieser transgenen Linie sind aufgrund einer inserierten Neomycin-Kassette in beiden Allelen des β 2-Mikroglobulin-Lokus G418-resistent. Die Mausmutante ist phänotypisch vollkommen normal und eignet sich daher ausgezeichnet für diesen Zweck. Alle folgenden Schritte wurden unter einer sterilen Bank durchgeführt. Vor der Präparation der Fibroblasten wurden Kopf und Innereien der Embryonen entfernt. Das Gewebe wurde mechanisch zerkleinert und 30 min bei 37 °C zur Dissoziation der Zellen in Trypsin-EDTA inkubiert. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 10 % FCS/DMEM abgebrochen. Nach einer erneuten mechanischen Zerkleinerung und der Entfernung von groben Bestandteilen erfolgte, nach kurzer Zentrifugation, die Plattierung der Zellen auf zwei bis vier 25 cm Gewebekulturschalen. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und daraufhin 1:3 bis 1:6 geteilt. Nach erneuter Konfluenz wurden von jeder Schale drei Stocks in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Bei Bedarf wurde ein Stock auf zwanzig 25 cm Schalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit MitomycinC-haltigem Medium behandelt.

2.2.10.3.3. MitomycinC-Behandlung von STO- und embryonalen Fibroblastenzellen zur Herstellung von "Feederzellen"

Für die MitomycinC-Behandlung wurden konfluente STO- bzw. embryonale Fibroblasten für 2-3 Stunden mit Mitomycin-haltigem Medium inkubiert. (2 mg MitomycinC in 200 ml DMEM Medium mit 5 % FCS). Nach 2-3 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde das Medium

abgesaugt und die Zellen wurden zweimal in PBS bzw. Hepes-Puffer gewaschen und anschließend trysinisiert. Aus jeder Schale wurden drei Stocks gebildet und kryokonserviert. Die Stocks wurden dann bei Bedarf auf 0,2 % Gelatine-beschichteten Schalen plattiert.

2.2.10.4. Generierung rekombinanter ES-Zellklone

2.2.10.4.1. Elektroporation und Selektion von G418^R ES-Zellen

Die Elektroporation ist eine rein physikalische Methode zum Gentransfer. Sie basiert auf der Beobachtung, daß biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert werden, ohne daß die Membranstruktur zerstört wird. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen. Die Elektroporation von ES-Zellen wurde nach den Angaben von Thomas und Capecchi (1987) durchgeführt. Dazu wurden 8×10^7 - 1×10^8 exponentiell wachsende Zellen in ein Gesamtvolumen von 800 µl Elektroporationspuffer und 150 µg linearisierte DNA eingesetzt.

Die DNA wurde nach der Linearisierung zunächst in Chloroform extrahiert, in 100 % Ethanol p.A. präzipitiert und in % Ethanol gewaschen. Aus Sterilitätsgründen wurde das DNA-Präzipitat bei Raumtemperatur unter einer Sterilbank luftgetrocknet und in 100 µl Elektroporationspuffer aufgenommen.

ES-Zellen wurden nach der Trypsinisierung in 9 ml Elektroporationspuffer gewaschen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und nach erneuter Zentrifugation in einem Volumen von 700 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Die Suspensionen wurden in einer Küvette (Gene Pulser Cuvette, 0,4 cm; gap 50; Bio Rad) vereinigt und bei 25 µF und 400 V bei Raumtemperatur elektroporiert. (Gene Pulser, Bio Rad). Die elektroporierten Zellen wurden unverzüglich auf Feederzellen in frischem ES-Zellmedium plattiert. Die Selektion in G418 begann nach 12-16 Stunden und wurde bis zur Isolierung der resistenten Klone am Tag 9-10 aufrechterhalten.

Lösungen:

- Elektroporationspuffer: 20 mM Hepes (pH 7,0); 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na₂HPO₄; 6 mM Dextrose; 0,1 mM β-Mercaptoethanol
- 10 x G418: 4 mg/ml in Hepes Puffer (Geneticin, Gibco, BRL)

2.2.10.4.2. Isolierung und Kryokonservierung von ES-Zellklonen

ES-Zellklone wurden lichtmikroskopisch identifiziert. Resistente Klone wurden nach einer G418-Selektion von 9-10 Tage isoliert. Dazu wurden die Kulturen einmal in Hepes-Puffer gewaschen und mit 10 ml Hepes-Puffer überschichtet. Klone wurden mechanisch von den umgebenden Feederzellen getrennt und bei Raumtemperatur in Trypsin/EDTA auf 96-Loch-Platten (Nunc) dissoziiert. Der enzymatische Verdau wurde nach 5-10 min durch die Zugabe von ES-Zellmedium beendet und die dissoziierten Zellen wurden auf eine frische 96-Loch-Platte mit Feederzellen plattiert und bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Klone mit Trypsin/EDTA dissoziiert und 1:3-1:4 geteilt, so daß 3-4 Duplikate jedes Klons zur Verfügung standen. Ein Duplikat wurde bei -80 °C gelagert. Dafür wurden die Zellen in 50 µl Trypsin/EDTA dissoziiert und nach Zugabe von 50 µl 2x Einfriermedium (20 % DMSO, 20 % FCS in DMEM) mit Paraffinöl überschichtet. Die Zellkulturschale wurde mit Parafilm verschlossen und die Zellen unverzüglich bei -80 °C eingefroren. Die anderen Duplikate wurden auf LacZ-Aktivierung in Gegenwart/Abwesenheit von Differenzierungsfaktoren oder während der *in vitro* Differenzierung der ES-Klone analysiert.

Nach der Identifizierung der LacZ-positiven Klone wurden diese aus der bei -80 °C gelagerten Schale aufgetaut, hochgezogen und getrennt in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

2.2.10.5. Die Replica-Plattierungs-Methode zur Analyse rekombinanter ES-Zellklone

2.2.10.5.1. Herstellung von Replikafilter aus Zellkulturen

Zur Herstellung von Replikafilter der G418^R ES-Klone wurde auf diese, nach Entfernung des ES-Zellmediums, sterile Polyesterfilter (Porengroße 1 µm; Fa. Tetko) aufgelegt. Anschließend wurden die Filter mit sterilem Glasperlen (3 mm Durchmesser; Fa Wilke und Witzel) bedeckt und mit frischen ES-Zellmedium für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach zwei Tage wurde das ES-Zellmedium erneut abgesaugt, die Glasperlen wurden vorsichtig entfernt und die Filter, nach Markierung der Orientierung, mit sterilen Pinzetten aus der Platte gezogen. Die Replikafilter wurden dann auf eine mit frischen ES-Zellmedium vorbereitete Zellkulturschale, Zellseite nach oben, überführt und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Die Replikafilter wurden anschließend für die Induktions-Gene-trap Experimente verwendet. Die mit den G418^R ES-Klon-Master-Platte wurde bis zum Schluß des Experimentes routinmässig aufbewahrt.

2.2.10.5.2. Analyse der Replika-Klone auf Induktion mit RA und BMP2

Für die Induktion mit RA wurden die Replikafilter 48 Stunden mit RA enthaltenden bzw. BMP2 konditioniertem Medium inkubiert. Anschließend wurde das Induktions-Medium abgesaugt, die Filter vorsichtig in 1 x PBS gewaschen und mit 3 % Paraformaldehydlösung für eine LacZ-Anfärbung fixiert. LacZ positive Klone wurden aus der Master-Platte "gepickt" und hochgezogen.

Lösungen:

- RA-Medium: 10^{-6} M all-trans Retinsäure (Sigma) in ES-Zellmedium ohne LIF
- BMP2-konditioniertes Medium: Mediumüberstand aus den BMP2-produzierenden Wachtel-Fibroblastenzellen Q2bn-BMP2, die mit einem BMP2-Transgen stabil transfiziert sind
- Q2bn-Zelllinie-Medium: 8 % FCS, 2 % Hühnerembryo-Extrakt, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/ Streptomycin in 1:1 DMEM/Hamsf12 Medium.

2.2.11. Präparation von Embryonen und Gewebe

Die Trächtigskeitsperiode wurde durch die Vaginal-Plug Methode bestimmt. Das Datum, an dem nach der Verpaarung ein mucoider Plug in der Vagina der Maus beobachtet werden konnte, wurde als embryonaler Entwicklungstag 0.5 bezeichnet und hiervon ausgehend der Termin für die Entnahme der Embryonen errechnet. Die trächtige, weibliche Maus wurde durch cervikale Dislokation getötet. Die Bauchdecke des Tieres wurde durch einen medianen Schnitt geöffnet und der Uterus entfernt. Die Embryonen wurden in kaltem 1 x PBS aus dem Uterus herauspräpariert und im Anschluß zur Fixierung in eine 4 %ige Paraformaldehydlösung überführt.

2.2.12. Histologische Methoden

2.2.12.1. Vibratomschnitte

Vibratomschnitte wurden wie bei Bober et al. (1994) beschrieben durchgeführt. Die zu schneidenden Embryonen wurden in Gelatin/Albumin-Blöcken eingebettet und mit einem Vibratom (VT 1000E, Leica) in einer Schichtdicke von 20 bis 60 μ m geschnitten.

Zum Einbetten wurden die Embryonen in eine kleine Menge Gelatin/Albumin-Lösung gelegt und in zwei Gefäßen je 1 ml der Gelatin/Albumin-Lösung vorgelegt. Der erste ml wurde mit

100 µl einer 25%igen Glutaraldehydlösung versetzt, gut gemischt, und sofort wurde der Embryo in die Lösung plaziert. Ebenso wurde mit der zweiten Menge der Lösung verfahren und diese in Form einer zweiten Schicht auf den Embryo gegeben. Der Block wurde zum Auspolymerisieren für 30 min bei RT stehen gelassen. Bis zum Schneiden können die Blöcke in Kunststoffolie bis zwei Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Nach dem Schneiden wurden die angefertigten Schnitte in 80 % Glycerol in PBS auf Objektträger gesammelt und mit einem Deckgläschen verschlossen. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden die Ränder der Deckgläschen mit Nagellack verschlossen.

Lösungen:

- Gelatin/Albumin-Lösung: 0,49 g Gelatine, 30 g Ei-Albumin, 20 g Saccharose in 100 ml PBS. Die Gelatine wurde in 100 ml PBS unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Gelatine-Lösung wurde das Ei-Albumin unter Rühren zugefügt. Nach Zugabe von Sucrose wurde die Mischung aliquotiert und eingefroren.

2.2.12.2. Kryotomschnitte

Die Mausembryonen wurden in O.C.T.-Einfriermittel (Miles, Naperville) für Gefrierschnitte eingebettet und mit einem Kryotom in einer Schichtdicke von 20-40 µm geschnitten. Dabei wurden die Embryonen in auf Trockeneis vorgekühlte Gefrier-Plastikschälchen gelegt, mit dem Flüssigmedium übergossen und langsam eingefroren. Die eingebetteten Embryonen wurden bis zum Schneiden bei -20 °C gelagert. Nach dem Schneiden wurden die Kryotomschnitte in Objektträger angesammelt. Diese können bis zur Anfärbung bzw. Hybridisierung bei -20 °C gelagert werden. Kryotomschnitte, die aus bereits gefärbten Embryonen angefertigt wurden, wurden dehydriert, kurz in Xylol getaucht und in Polymount-Lösung eingedeckelt.

2.2.13. Histochemische Färbemethoden

2.2.13.1. LacZ-Färbung

Bei Studien zur Untersuchung der Genregulation *in vivo* und *in vitro* hat sich die Verwendung des bakteriellen β -Galaktosidase Gens (LacZ) als Reporter bewährt. Das LacZ-Expressionsmuster wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* in undifferenzierten und differenzierten ES-Zellen als auch *in vivo* in transgenen Mäusen untersucht. Bis zum Tag 12,5-13,5 der embryonalen Entwicklung ist eine "Whole-Mount"-LacZ-Anfärbung der

Embryonen ohne weiteres möglich. Zu einem späteren Zeitpunkt empfiehlt es sich aufgrund der schweren Erreichbarkeit der Gewebe durch das Substrat (X-Gal), die zu analysierenden Embryonen zunächst zu schneiden. LacZ-Anfärbungen wurden also auch in Kryotomschnitten durchgeführt.

2.2.13.1.1. LacZ-Färbung von Zellen

Die Zellen werden zweimal in PBS-Puffer gewaschen. Es folgte dann eine 10 minütige Fixierung mit 3 %iger Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in 1 x PBS werden die Zellen 10 min bei Raumtemperatur mit 0,2 % Triton X-100 in 1 x PBS inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig für die Penetration des X-Gal Substrats durch die Zellmembran. Nach viermaligem Waschen in 1 x PBS schloß sich unverzüglich die Färbung mit X-Gal bei 37 °C an. Die Färbung wurde, je nach Intensität, nach 3-12 Stunden durch Waschen in 1 x PBS abgebrochen.

Lösungen:

- 1 x PBS-Puffer
- Fixierlösung: 3 % Paraformaldehyd in 1 x PBS
- 0,2 % Triton X-100 in PBS
- X-Gal-Mix: 5 mM $\text{KFe}(\text{CN})_6\text{II}$; 5 mM $\text{KFe}(\text{CN})_6\text{III}$; 2 mM MgCl_2 ; 2,5 %-5 % X-Gal-Lösung (40 mg/ml in DMSO) in 1 x PBS

2.2.13.1.2. LacZ-Färbung von Embryonen

Nach der Isolierung wurden die Embryonen in 1 x PBS gesammelt und gewaschen. Die Fixierung erfolgt bei Raumtemperatur, 5 min für Embryonen bis zum Tag 9,5 dpc und 15 min für Embryonen zwischen 10,5 und 12,5 dpc. Nach dreimaligem Waschen in Waschlösung (Waschzeiten wie zuvor, je nach Alter der Embryonen) folgt die Färbung mit X-Gal bei 37 °C. Nach der Anfärbung (1-24 Stunden) werden die Embryonen in Waschlösung gewaschen.

Lösungen:

- Fixierlösung: 0,2 % Glutaraldehyd; 5 mM EGTA; 2 mM MgCl_2 in 1 x PBS
- Waschlösung: 0,01 % Natriumdesoxycholat; 0,02 % NP40; 5 mM EGTA; 2 mM MgCl_2
- Färbelösung: 1 mg/ml X-Gal (aus 40 mg/ml in DMSO); 5 mM $\text{KFe}(\text{CN})_6\text{III}$; 5 mM $\text{KFe}(\text{CN})_6\text{II}$; 2 mM MgCl_2 ; 0,01 % Natriumdesoxycholat; 0,02 % NP40

2.2.13.1.3. LacZ-Färbung von Gewebeschnitte

Zur Haftbarmachung der Schnitte wurden die Objekträger beschichtet. Dafür wurden sie 30 min in 100 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 0,1 % Gelatinlösung 20 min bei Raumtemperatur behandelt.

Die Fixierung der Kryotomschnitte zur LacZ-Färbung erfolgte in Fixierlösung (2.2.5.2) für 5 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem, je 5 minütigem Waschen in Waschlösung, fand die Färbung mit X-Gal bei 37 °C über Nacht statt. Nach der Färbung wurden die Schnitte zunächst 5 min in Waschlösung, dann 5 min in destilliertes Wasser gewaschen und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (70 %, 96 %, 100 % Ethanol, je 5 min). Die Schnitte wurden dann 1 min in Xylene/100% Ethanol 1:1 und 1 min in Xylene behandelt und mit Polymount eingedeckelt.

2.2.13.2. "Whole mount"-*in situ*-Hybridisierung von Embryonen

Die hier angewandte Methode wurde im Labor von David Wilkinson für Maus-whole mount-Analysen entwickelt. Die whole-mount-Methode beruht auf der Hybridisierung einer Digoxigenin -markierten antisense-RNA-Probe mit dem zu detektierenden, endogenen RNA-Template. Die RNA-Hybride werden anschließend mit einem Antikörper gegen Digoxigenin detektiert. Für die Hybridisierung wurden 10 µl der zuvor mit Digoxigenin markierten antisense-RNA-Probe eingesetzt.

Die in 4 % Paraformaldehyd fixierten Embryonen (2.2.11) wurden zunächst schrittweise in 100 % Methanol überführt und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei -20 °C gelagert. Vor der Hybridisierung wurden die Embryonen schrittweise rehydriert. Die Inhibition endogener Peroxidasen erfolgte durch einstündige Inkubation in 6 % Wasserstoffperoxid und dreimaligem Waschen in PBT. Um der Probe einen besseren Zugang zu ermöglichen, schloß sich ein 15-minütiger Verdau in 10 µg/ml ProteinaseK an. Nach zweimaligen Waschen in Glycinlösung (2mg/ml) erfolgte eine erneute Fixierung in 0,2 % Glutaraldehyd und 4 % Paraformaldehyd. Nach dieser Vorbehandlung der Embryonen schloß sich die Prähybridisierung bei 70 °C an. Nach einer einstündiger Prähybridisierung erfolgte die eigentliche Hybridisierung bei 70 °C mit 1 µg der markierten Probe/ml Hybridisierungslösung über Nacht. An die Hybridisierung schlossen sich folgende Waschschr

Lösung	Zeit	Temperatur
2 x Lösung 1	30 min	70 °C
1 x Lösung 1/2 (1:1)	10 min	70 °C
3 x Lösung 2	5 min	RT
2 x RnaseA in Lösung 2 (E.K: 100 µg/µl)	30 min	37 °C
1 x Lösung 2	5 min	RT
1 x Lösung 3	5 min	RT
2 x Lösung 3	30 min	65 °C
3 x TBST	5 min	RT

Nach den Waschschrinen, vor der Inkubation mit dem Phosphatase gekoppelten Antikörper, erfolgte eine Absättigung gewebeeigener Antigene in 10 % Schafserum/TBST für 60-90 min. Das Schafserum wurde kurz vor der Verwendung durch 30-minütiger Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Während dieses Absättigungsschrittes wurde der Antikörper vorbereitet. Die Abblockung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation mit Maus-Embryopulver, das aus E12,5-E14,5 Embryonen, in Aceton homogenisiert, getrocknet und zerkleinert, gewonnen wurde. Für 2 ml Antikörper-Lösung wurden 3 mg Embryopulver mit 0,5 ml TBST für 30 min auf 70 °C erhitzt und anschließend eine Stunde bei 4 °C unter kontinuierlichem Schütteln zusammen mit 1 µl Digoxigenin-Antikörper (Fab-Fragmente; Boehringer, Mannheim) inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der den abgeblockten Antikörper enthaltende Überstand abgenommen und mit 1 %igem Schafserum in TBST auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte danach bei 4 °C über Nacht. Die sich anschließenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Lösung	Zeit
TBST	3 x 5 min
TBST	5 x 60 min
NTMT	3 x 10 min

An diese Waschschrine schloß sich die Alkalische-Phosphatase-Färbereaktion mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP (X-Phosphat) in NTMT an. Die Färbung erfolgte bei Raumtemperatur und unter mäßigem Schütteln. In der Regel war die spezifische Färbereaktion nach 1-2 Stunden

beendet. Die Reaktion wurde daraufhin durch mehrmalige Zugabe von PBT beendet. Die Analyse der Färbung erfolgte in 50-100 µm Vibratonschnitte.

Lösungen:

- PBT: PBS, 0,1 % Tween-20
- Prähybridisierungs-, Hybridisierungslösung: 50 % Formamid; 5 x SSC pH 4,5; 50 µg/ml t-RNA; 1 % SDS; 50 µg/ ml Heparin
- Lösung 1: 50 % Formamid; 5 x SSC pH 4,5; 1 % SDS
- Lösung 2: 0,5 M NaCl; 10 mM TrisHCl pH 4,7; 0,1 % Tween-20
- Lösung 3: 50 % Formamid; 2 x SSC pH 4,5
- 10 x TBST (100 ml): 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 25 ml 1 M TrisHCl pH 7,5; 10 ml 10 % Tween-20. Kurz vor der Benutzung wurden, zur Inhibition endogener Phosphatasen, 0,028 g/50 ml Levamisol zugesetzt.
- NTMT: 100 mM NaCl; 100 mM TrisHCl pH 9,5; 50 mM MgCl₂ ; 0,1 % Tween-20. Kurz vor der Benutzung wurden 0,028 g/50 ml Levamisol zugesetzt.

3. ERGEBNISSE

Im folgenden werden zunächst Experimente und ihre Resultate beschrieben, die sich ausschließlich auf die *in vitro* Analyse von Gene-trap embryonalen Stammzellen unter Standardwachstum- und Differenzierungsbedingungen beziehen. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse dargestellt, die an Gene-trap Mäusen gewonnen wurden.

3.1. Etablierung von ES-Zelllinien mit Gene-trap Integrationen

3.1.1. Herstellung und *in vitro* Selektion von SA-IRES- β -Geo Klonen zur Identifizierung von Genen, die in differenzierten ES-Zellen exprimiert werden

Zur Herstellung von Gene-trap Zelllinien wurden R1 ES-Zellen mit dem Gene-trap Vektor SA-IRES- β Geo elektroporiert und anschließend in LIF-haltigem Medium unter Standardbedingungen auf Neomycin Resistenz selektiert. Bei niedriger G418 Konzentration (200 μ g/ml) können bei Verwendung dieses Vektors resistente Klone erhalten werden, die dennoch keine meßbare β -Gal Expression zeigen. Dies scheint auf der unterschiedlichen Sensitivität des Nachweises der Enzymaktivitäten für Neomycin-Resistenz und LacZ Anfärbung zu beruhen (Friedrich und Soriano, 1991). Hierdurch wird es möglich, differentielle LacZ Aktivität in resistenten Klonen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu bestimmen. Im folgenden wurde versucht, ES-Zellklone zu identifizieren, die nur in differenzierten ES-Zellen hohe LacZ Expression zeigten. Zunächst wurden 60 Klone, die von der Arbeitsgruppe Prof. Gruss zur Verfügung gestellt wurden, analysiert. Der verwendete Vektor ist in der Abb. 3 dargestellt.

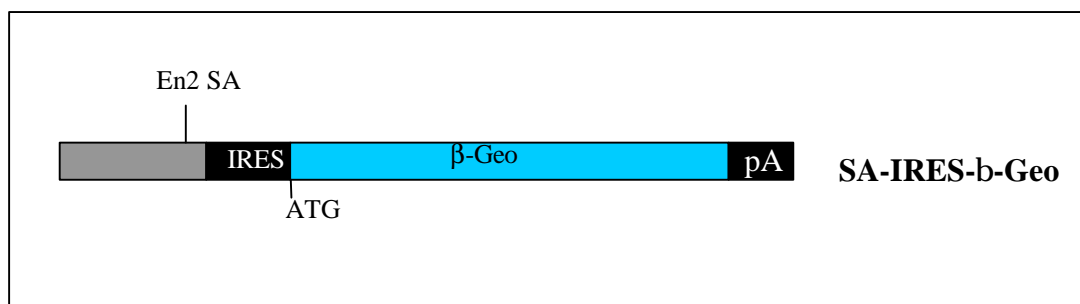


Abb. 3: Der Gene-trap Vektor SA-IRES-b-Geo. En2 SA: Spleißakzeptorstelle des Maus "Engrailed 2" Gens; IRES: "Internal Ribosomal Entry Site" vom emc Virus (Kim et al., 1992); **b** Geo: Fusion aus dem **b**-Galaktosidase und dem Neomycin Resistenz Gen. pA: Polyadenylierungssignal

Die 60 SA-IRES- β -Geo Klone wurden sowohl in undifferenzierten Zustand als auch in ES-Zellaggregaten, den sog. Embryoid Bodies (EBs) kultiviert. In EBs differenzierten die ES-Zellen in verschiedene embryonale Zelltypen (Pederson, 1994; Keller, 1995), wobei Endoderm und kontraktile Kardiomyozyten am häufigsten in diesen Kulturen beobachtet wurden. Weiterhin fand ich Skelettmuskelzellen und Blutinseln (Doetschmann et al., 1985; Wobus et al., 1994; Baker und Lyons, 1996). Differenzierte EBs und die entsprechenden undifferenzierten Klone wurden mit X-Gal gefärbt. Von den 60 untersuchten Gene-trap Klonen zeigten 27 weder in undifferenzierten ES-Zellen noch in Embryoid bodies β -Gal Färbung, 24 zeigten β -Gal Expression in differenzierten EBs, aber nicht im undifferenzierten Zustand, drei Klone zeigten Anfärbung im undifferenzierten Zustand, aber keine oder deutlich schwächere Färbung in EBs; sechs Klone zeigten nur schwache Anfärbung in wenigen Zellen sowohl in undifferenziertem Zustand als auch in EBs (Abb. 4).

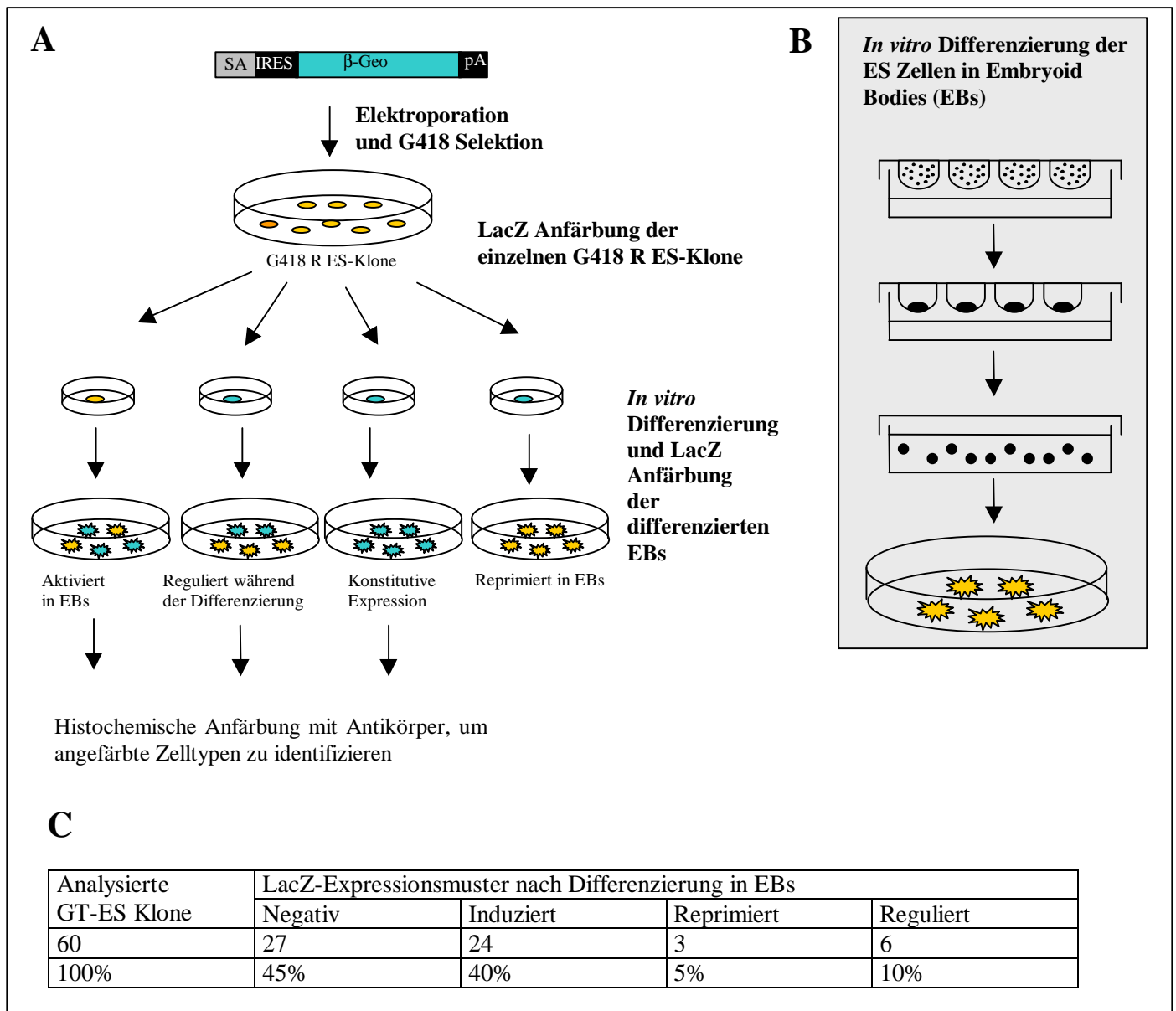


Abb. 4: Gene-trap Ansatz zur Identifizierung von Genen, die während der *in vitro* Differenzierung der ES-Zellen exprimiert werden. A) Die ES-Zellen wurden mit dem Gene-trap Vektor SA-IRES- β -Geo elektroporiert und G418 resistente Klone wurden isoliert. Die Expression des LacZ-Reportergens wurde in undifferenzierten ES-Zellen und in Embryoid Bodies (EBs) untersucht. Die in EBs LacZ-exprimierenden Zelltypen wurden zum Teil mittels Antikörperfärbung identifiziert. B) Induktion der ES-Zellen zur Bildung von Embryoid Bodies mit der "hanging drops" Methode (2.2.10.2). C) Zusammenfassung der verschiedenen LacZ Expressionsmuster der untersuchten Klone.

Die 27 Klone, die keine LacZ Expression zeigten, wurden nicht weiter untersucht. Bei den restlichen Klonen wurde immunohistochemische Anfärbung der LacZ-positiven EBs mit dem Antikörper MF20 gegen muskelspezifisches Myosin (MyHC) durchgeführt, um Klone mit β -Gal-Expression in Myozyten (sowohl Herzmuskel- als auch Skelettmuskelzellen können mit diesem Antikörper nachgewiesen werden) zu entdecken. Sechs Klone mit induzierbarer bzw. regulierter LacZ Aktivität, die MF20/ β -Gal-Doppelfärbung in EBs zeigten (GTXVI-26,

GTXVI-59, GTXVI-95, GTXVI-168, GTXVI-173, GTXVI-175 (Tab. 4), wurden für die molekulare Charakterisierung ihrer Gene ausgewählt.

ES Klone	LacZ-Expression in ES-Zellen	LacZ-Expression in EBs
GTXVI-26	-	++
GTXVI-168	-/+	++
GTXVI-59	+++	++
GTXVI-95	+	++
GTXVI-175	-	++
GTXVI-173	-	+

Tab. 4: LacZ Expressionsmuster der ausgewählten SA-IRES- β -Geo Gene-trap Klone.

3.1.1.1. Sequenzbestimmung von SA-IRES- β -Geo Klonen

Um die Gene zu identifizieren, die in den sechs ausgewählten Klonen durch die Vektor Insertion getroffen wurden, wurde das Gene-trap Fusionstranskript mit Hilfe der 5'RACE-PCR Methode kloniert. Hierzu wurde gesamt RNA aus Gene-trap Klonen isoliert, die unter Bedingungen für höchste Expression des LacZ Reportergens kultiviert wurden, d.h. nach Differenzierung in EBs. Nach reverser Transkription der RNA wurden die Fusionstranskripte mit Hilfe von spezifischen Gene-trap-Vektor Primern amplifiziert und die erhaltenen cDNA Fragmente in den pGEM-T Vektor kloniert und mit flankierenden Primern sequenziert. Alle 5'RACE-PCR Produkte wurden auf ein korrektes Spleißen zwischen der endogenen Spleißdonorstelle (SD) und der Gene-trap Spleißakzeptorstelle (SA) überprüft. Sequenzen am 5'Ende des SA stellen endogene Gen-Sequenzen dar, die von der Gene-trap Insertion getroffen sind; Sequenzen am 3'Ende der SA kommen vom Gene-trap Vektor (Abb.5).

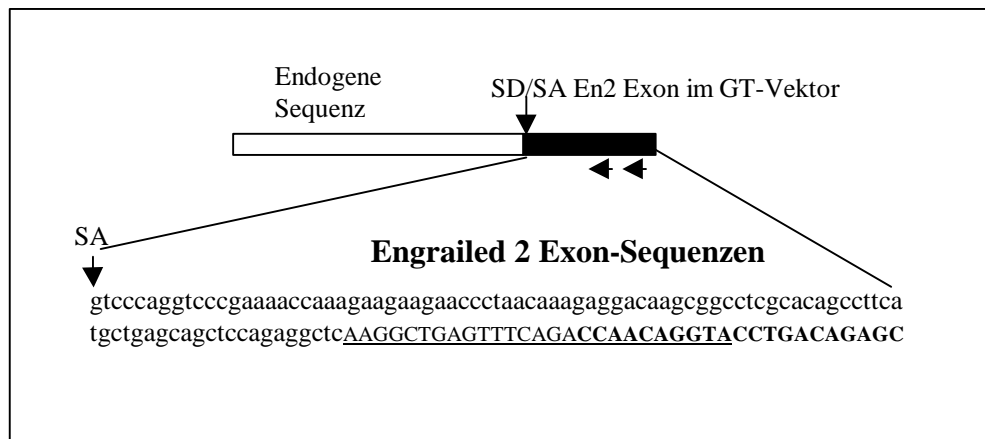


Abb. 5: Struktur der klonierten 5'RACE-PCR-Produkte, die aus den Gene-trap Fusionstranskripten amplifiziert wurden. Sequenzen am 5' Ende des SA stellen endogene Gensequenzen dar. Sequenzen am 3' Ende gehören zum Gene-trap Vektor. Die GT-Primersequenzen, die für die 5'RACE verwendet werden, sind fett bzw. unterstrichen.

Sequenzvergleiche mit Genen sowie ESTs ("Expressed sequence tags") in der NCBI Datenbank wurden mit jeder erhaltenen Sequenz durchgeführt, um neue und unbekannte Sequenzen zu identifizieren. Mit dem "ORF Finder" Programm des NCBI wurde bestimmt, ob unbekannte Sequenzen ein offenes Leseraster enthalten. Die Ergebnisse der 5'RACE-PCR und des Sequenzhomologievergleiches sind in Tab. 5 zusammengefaßt. Bei den sechs ausgewählten Klonen wurde jeweils mindestens ein 5'RACE-PCR Fragment erhalten. In den Fällen, in denen mehrere RACE-Produkte entstanden, wurden nur die größten Fragmente kloniert. PCR Produkte unter 120 bp (Länge der En-2 SA Sequenz) wurden nicht analysiert. Von den sechs klonierten Sequenzen war nur eine, **GTXVI-173**, identisch zu einem bekannten Gen, während die restlichen fünf Sequenzen von neuen Genen stammten.

Das in der ES Zelllinie **GTXVI-173** getroffene Gen, **qk1**, kodiert für das RNA-Bindungsprotein QK1 ("quaking"), das zur kürzlich charakterisierten STAR ("Signal Transduction and Activation of RNA") Proteinfamilie gehört. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine KH (Protein K-Homologie)-Domäne, die für RNA-Bindung und Proteindimerisierung zuständig ist. Die QK1 KH-Domäne ist länger als andere KH Domänen und enthält zwei flankierende Motive, QUA1 und QUA2. Eigenschaften von Signaltransduktions Proteinen, wie Prolin-reiche Regionen, SH3-Domänen oder Tyrosin-reiche Motive sind ebenfalls in QK1 und in fast allen STAR-Familienmitglieder vorhanden (Vernet und Artzt, 1997). QK1 spielt in der Embryogenese eine Rolle und beeinflusst die Myelinisierung (Ebersole et al., 1996). Eine durch ENU verursachte Missense Mutation in der

QUA1 Domäne (qk^c) ist embryonal lethal (Chen und Richard, 1998). Eine qk^v Mutation in der Maus zeigt den "quaking" Phänotyp. In *Xenopus* ist QK1 notwendig für die Bildung des Notochords (Zorn und Krieg, 1997).

GT-Linie	5'RACE	Gen/Homologie	ORF	Insertion
GTXVI-26	174 bp	Homologie zu Human <i>CHES1</i> (<i>checkpoint suppressor 1</i> , U68723) und zu Maus EST (AA016382). ORF ähnlich zu Human HTLF, (<i>Human T-cell leukemia virus enhancer factor containing forkhead</i> , P32314)	Ja	CDS
GTXVI-59	195 bp	Maus EST (W62980), (W07913). EST enthält polyA Signal, vermutlich 3'UTR.	Nein	3'UTR
GTXVI-95	316 bp	Homologie zu Ratte (L11586) und Human (Y00815) LAR (<i>Leukocyte common antigen-related phosphatase</i>), Maus EST (W78500).	Ja	CDS
GTXVI-168	661 bp	Homologie in der Aminosäuresequenz zur GAP (<i>GTPase-activating protein</i>)- Domäne	Ja	CDS
GTXVI-173	187 bp	QK1 (" <i>Quaking</i> " type I gene, U44940)	Ja	Nt +1052 AS 181
GTXVI-175	162 bp	Keine Homologie	Ja	CDS

Tab. 5: Sequenzanalyse der SA-IRES-b-Geo Klone. Die Länge der erhaltenen 5'RACE-PCR Produkte, die Sequenzhomologien zu Genen in GenBank, das Vorhandensein eines offenen Leserasters (ORF), und die Position der Reporterinsertion im entsprechenden Transkript sind zusammengefaßt. UTR: untranslatierte Region, CDS: kodierende Sequenz, Nt: Nukleotid, AS: Aminosäure.

Das Gen, das in der ES-Zelllinie **GTXVI-95** getroffen wurde, ist ein neues Maus Gen der **LAR** (*Leukocyte Antigen Related*) Familie von Transmembran-Tyrosin-Phosphatasen (PTP). Die 5'RACE-Sequenz dieses neuen LAR/GTXVI-95 Gens zeigt 80 bis 90% Homologie zu den LAR Genen der Ratte (L11586) (Zhang et al., 1994) und des Menschen (Y00815) (Streuli et al., 1988) aber keine signifikante Homologie zum Maus LAR Gen (Z37988) (Schaapveld et al., 1995), welches bereits durch homologe Rekombination ausgeknockt worden ist. Homozygote Maus-LAR Weibchen zeigen Defekte in der Entwicklung der Milchdrüse (Schaapveld et al., 1997). Ein weiteres Mitglied der LAR/PTP Familie, PTP δ , spielt in der Lungenentwicklung eine Rolle (Katsura et al., 1995).

Eine weitere Sequenz (**GTXVI-26**) zeigte Homologie zu dem in Menschen bereits identifizierten **CHES1** (*Checkpoint Supressor gene 1*) Gen, das bei Reparatur von DNA-Schäden eine Rolle spielt (Pati et al., 1997). Außerdem wurde eine geringe Homologie in der translatierten Aminosäuresequenz zum humanen "forkhead"-Domänen Transkriptionsfaktor **HTLF** (*Human T-cell Leukemia Virus Enhancer Factor*) (Li et al., 1992) gefunden. Die **GTXVI-59** Sequenz war identisch zu einem EST und **GTXVI-175** zeigte keinerlei Homologien. Letztlich zeigte die abgeleitete Aminosäuresequenz von **GTXVI-168** hohe Homologie zu **GAP** (GTPase-aktivierenden)-Proteinen. Die GTXVI-168 cDNA wurde anschließend isoliert und weitgehend charakterisiert. Die Resultate dieser Analyse werden ausführlich im Kapitel (3.2.1) beschrieben.

Mit Ausnahme von GTXVI-59 zeigten alle Sequenzen ein offenes Leseraster. Während diese mit hoher Wahrscheinlichkeit kodierende Exone darstellen, repräsentiert die GTXVI-59 Sequenz vermutlich ein 3'untranslatiertes Exon, denn ein identischer EST-Klon, W07913, enthält ein Polyadenylierungssignal.

3.1.1.2. Mögliche Konsequenzen der SA-IRES-b-Geo Gene-trap Integrationen auf die Genprodukte

Die Insertionstelle des β -Geo Reporters in den verschiedenen Fusionstranskripten wurde ebenfalls anhand der 5'RACE-PCR Sequenz bestimmt. Im Falle des bekannten Gens qk1 konnte die genaue Position, sowohl im Transkript als auch im Protein, angegeben werden. Im Falle von GTXVI-95 konnte die Integrationstelle aufgrund der hohen Homologie zu den Ratte und Mensch LAR-Genen extrapoliert werden. Für die Sequenzen, die keine Homologien zu bekannten Genen zeigten, konnte lediglich bestimmt werden, ob der Gene-trap Vektor in der kodierenden Region oder in der 3' bzw. 5'untranslatierten Region des getroffenen Gens integriert hat. Diese Daten erlauben eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, mit der diese Gene durch die Gene-trap Insertion inaktiviert werden. Im folgenden werden die Insertionen im qk1 und im GTXVI-95/LAR beschrieben.

QK1/XVI-173 (Abb. 6A)

Die Gene-Trap Insertion in qk1 (Linie GTXVI-173) führt zum Spleißen des Reportertranskripts in Position +1052 der qk1 mRNA und resultiert deshalb in einem verkürzten Protein von 181AS, in dem die QUA1- und mKH-, aber nicht die QUA2-Module der STAR-Domäne vorhanden sind. Da man bereits zeigen konnte, daß eine intakte STAR Domäne für die Proteindimerisierung und RNA-Bindung notwendig ist (Chen und Richard ,

1998), führt die Gene-trap Insertion mit großer Wahrscheinlichkeit zur Inaktivierung des Qk1 Proteins. Darüberhinaus wären durch die Insertion alle drei bekannte Spleißprodukte des QK1 Gens betroffen, welche unterschiedliche 3'-Enden bzw. Carboxyltermini und auch unterschiedliche subzelluläre Lokalisation zeigen (Chen und Richard, 1998).

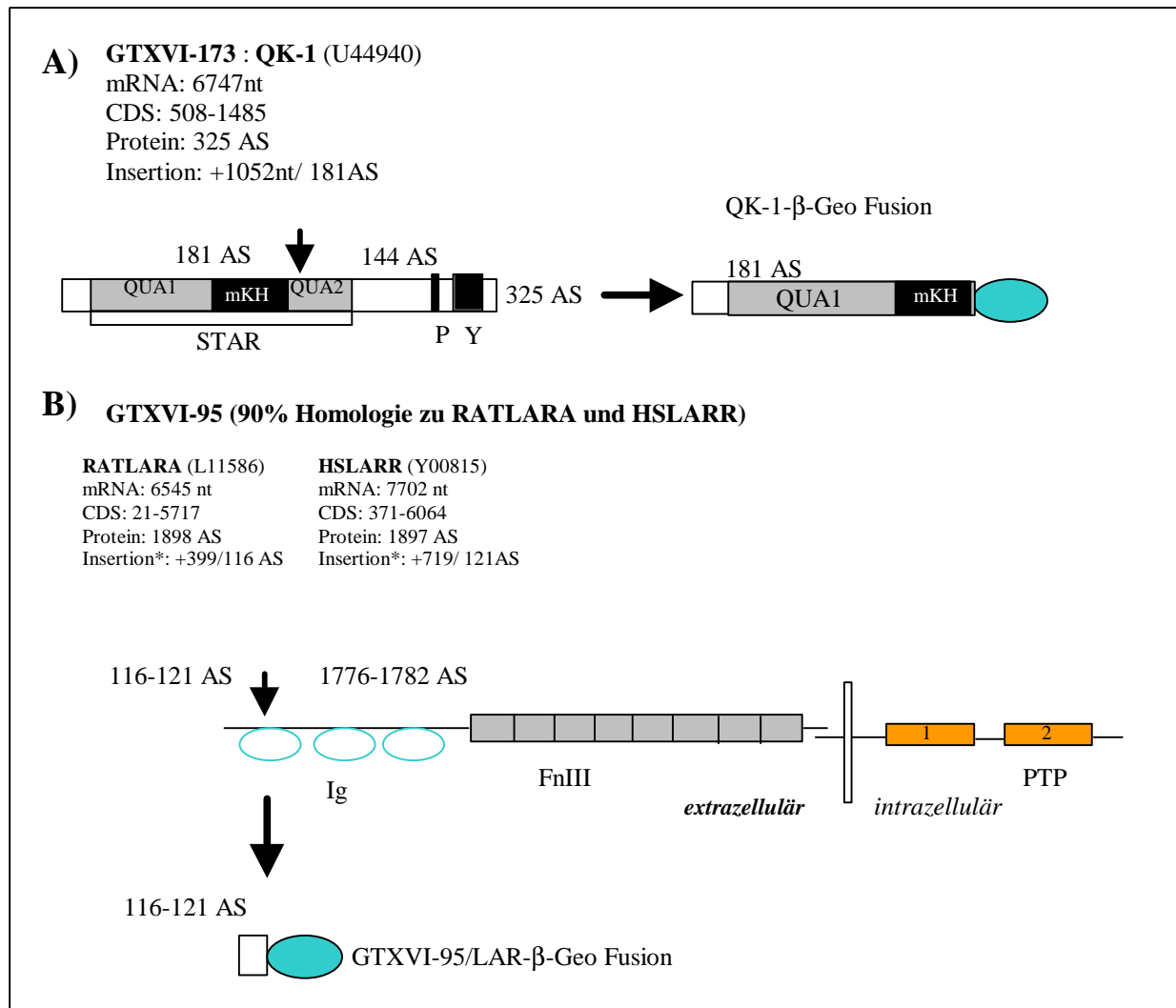


Abb. 6: Die Gene-trap Integration in den GTXVI-173 und GTXVI-95 ES Zelllinien. A) Struktur des Wildtyp QK1 Proteins und des aus der Gene-trap Integration resultierenden Produkts. mKH: maxi KH-Domäne; STAR: Signal transduction and activation of RNA; P: Pro-reich; Y: Tyr-reich B) Das getroffene Gen ist ein neues Maus Gen, das hohe Homologie zu den Ratte (RATLARA) und Mensch (HSLARR) LAR Genen zeigt. *Aufgrund dieser Homologie konnte die Insertionstelle des Vektors in den homologen Genprodukten kartiert werden. Die Struktur des vermuteten Wildtyp Proteins und der β -Geo Fusion sind dargestellt. Ig: Inmunglobulinähnliche Wiederholungen; FnIII: Typ III-Fibronectin Wiederholungen; PTP: Protein Tyrosin Phosphatase Domänen.

GTXVI-95 (Abb. 6B)

Aufgrund der hohen Homologie in der Nukleotidsequenz zwischen dem 5' RACE Produkt der GTXVI-95 Linie, der Ratten und menschlichen cDNAs kann die Insertionstelle des Gene-trap Vektors in diesem neuen Gen vermutet werden. Alle Mitglieder der LAR Familie besitzen eine ähnliche Domänenstruktur. In der extrazellulären Domäne sind drei Immunglobulin-ähnliche Wiederholungen und 8 TypIII-Fibronectin Wiederholungen vorhanden. Die intrazelluläre Domäne besteht aus zwei Protein-Tyrosin- Phosphatase Domänen. Die Insertion des Gene-trap Vektors hat das 5' Ende des Gens getroffen und läßt ein verkürztes Protein von 116 AS bzw. 121AS erwarten, so daß keine der erwähnten Domänen im mutanten Protein vorhanden wäre.

Zusammenfassend erlaubte das oben beschriebene *in vitro* Selektionsverfahren die Identifizierung eines bekannten Gens und fünf neuer Gene, die alle in differenzierten ES-Zellkulturen exprimiert werden. Von diesen SA-IRES- β -Geo Klonen wurde nur der Klon **GTXVI-168** im Rahmen dieser Arbeit weiter charakterisiert. Dabei sollte die entsprechende cDNA isoliert und das Expressionsmuster des Gens in der Maus bestimmt werden. Parallel sollte eine GTXVI-168 Mauslinie hergestellt werden. Die Resultate, die an der GTXVI-168 Zelllinie gewonnen wurden, sind in 3.2.1 beschrieben. Auch der Klon **GTXVI-173**, in dem das Qk1 Gen getroffen ist, sollte für die Generierung einer transgenen Mauslinie eingesetzt werden. Chimäre GTXVI-168 und GTXVI-173 Mäuse wurden durch Morula Aggregation in der Arbeitsgruppe Prof. Gruss erzeugt, wobei ein LacZ Expressionsmuster im Mausembryo ermittelt wurde. Leider erfolgte keine Keimbahn Transmission, so daß keine der transgenen Mauslinien erzeugt werden konnte.

3.1.2. Herstellung von pT1-ATG Klonen und "Induktions Gene-trap" zur Identifizierung von RA- und BMP2-induzierbaren Genen

Retinsäure (RA) spielt eine wichtige Rolle bei der Musterbildung während der embryonalen Entwicklung. Es ist bekannt, daß beides, Überschuß und Mangel an RA während der Embryogenese Mißbildungen an Extremitäten, Herz und im zentralen Nervensystem der Maus und des Menschen verursacht. Die Zugabe von exogener RA hat extreme Wirkungen auf die Musterbildung verschiedener embryonaler Gewebe (Eichele, 1989; Linney, 1992). RA beeinflusst die Expression von Musterbildungskontrollgenen, wie z.B Hox Genen, sowohl *in vitro* in EC-Zellen (Simeone et al., 1990; Simeone et al., 1991; Pruitt et al., 1992) als auch *in vivo* (Conlon and Rossant, 1992; Marshall, 1992). Ihre genregulatorische Funktion übt RA

über die Bindung an die RA-Rezeptoren, die RARs und RXRs, aus, welche hauptsächlich in Form von RAR-RXR Heterodimeren die Transkription von RA-regulierbaren Genen aktivieren oder reprimieren. Knock-out Mäuse für sämtliche RA-Rezeptoren (RAR- α , - β , - γ und RXR- α , - β , - γ) wurden generiert und bestätigen die Bedeutung der RA-Signalwege in der embryonalen Entwicklung. Ein Induktions Gene-trap Ansatz mit RA wurde erfolgreich von Forrester et al., (1996) und McClive et al., (1998) durchgeführt. Dabei wurden Gene identifiziert, die *in vitro* in ES-Zellen von RA aktiviert bzw. reprimiert werden und in der Maus ein gewebespezifisches Expressionsmuster während der Embryogenese zeigen.

BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) regulieren zahlreiche biologische Vorgänge wie Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung, Zelldeterminierung und Morphogenese. Sie sind an der Entwicklung vieler Organe und Gewebe, wie Nervensystem, Somiten, Lunge, Niere, Haut, Knochen und Gonaden, sowie an der Etablierung des embryonalen Körpermusters in Vertebraten beteiligt (Überblick: Hogan, 1996). BMP2 spielt eine entscheidende Rolle in der frühen Maus Embryogenese, sowohl in der extraembryonalen als auch in der embryonalen Entwicklung. Die BMP2 Knock-out Mutation in Mäusen ist embryonal lethal und BMP2-/- Embryonen zeigen Mißbildung des Amnions/Chorions und Defekte in der Herzentwicklung (Zhang and Bradley, 1996). Unter den bekannten BMP2 Zielgenen befinden sich *msx1* und *msx2* und Id Gene (Hollnagel et al., 1999).

In einem Versuch **RA**- und **BMP2** -induzierbare bzw. reprimierbare Gene zu identifizieren, wurde ein "Induktions Gene-trap" Ansatz mit Hilfe des Replica-Plattierungs Verfahrens durchgeführt. Das sog. "Induktions Gene-trap" sollte die Identifizierung von Genen erlauben, die spezifisch von bestimmten Signalmolekülen, Drogen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren- reguliert werden. Für die RA- und BMP2- Induktions Gene-trap Ansätze wurden J1 ES-Zellen mit dem Gene-trap Vektor **pT1-ATG** (Abb.7) elektroporiert. Der pT1ATG Gene-trap Vektor besteht aus dem LacZ-Reportergen ohne eigenen Promotor und dem Neo-Selektionsmarker unter der Kontrolle des konstitutiven PGK-Promotors. Die Strategie mit getrennter Neo-Selektionskassette sollte die Identifizierung von Genen erlauben, die noch nicht in undifferenzierten ES-Zellen exprimiert werden. Allerdings stellen nur 1-5% der Neo-resistenten Klone tatsächlich funktionelle Integrationsereignisse (LacZ positiv) dar.

Die Selektion der Neo-resistenten Klone erfolgte mit 400 µg/ml G418. G418-resistente Klone wurden auf Polyesterfilter übertragen, um "Replicas" der Master-Platte für die Analyse der LacZ-Aktivierung herzustellen (Abb.8).

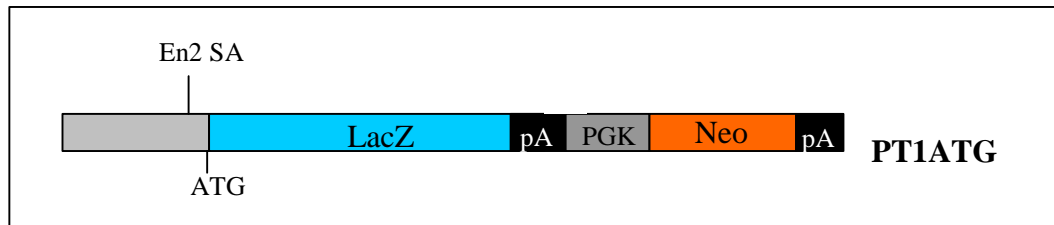


Abb. 7: Der Gene-trap Vektor pTIATG: Der Vektor enthält ein promotorloses LacZ Reportergen und das Neomycin Resistenz Gen (Neo) unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (PGK, Phosphoglucokinase). En2SA: Spleißakzeptor des Maus Engrailed 2 Gens. pA: Polyadenylierungssignal.

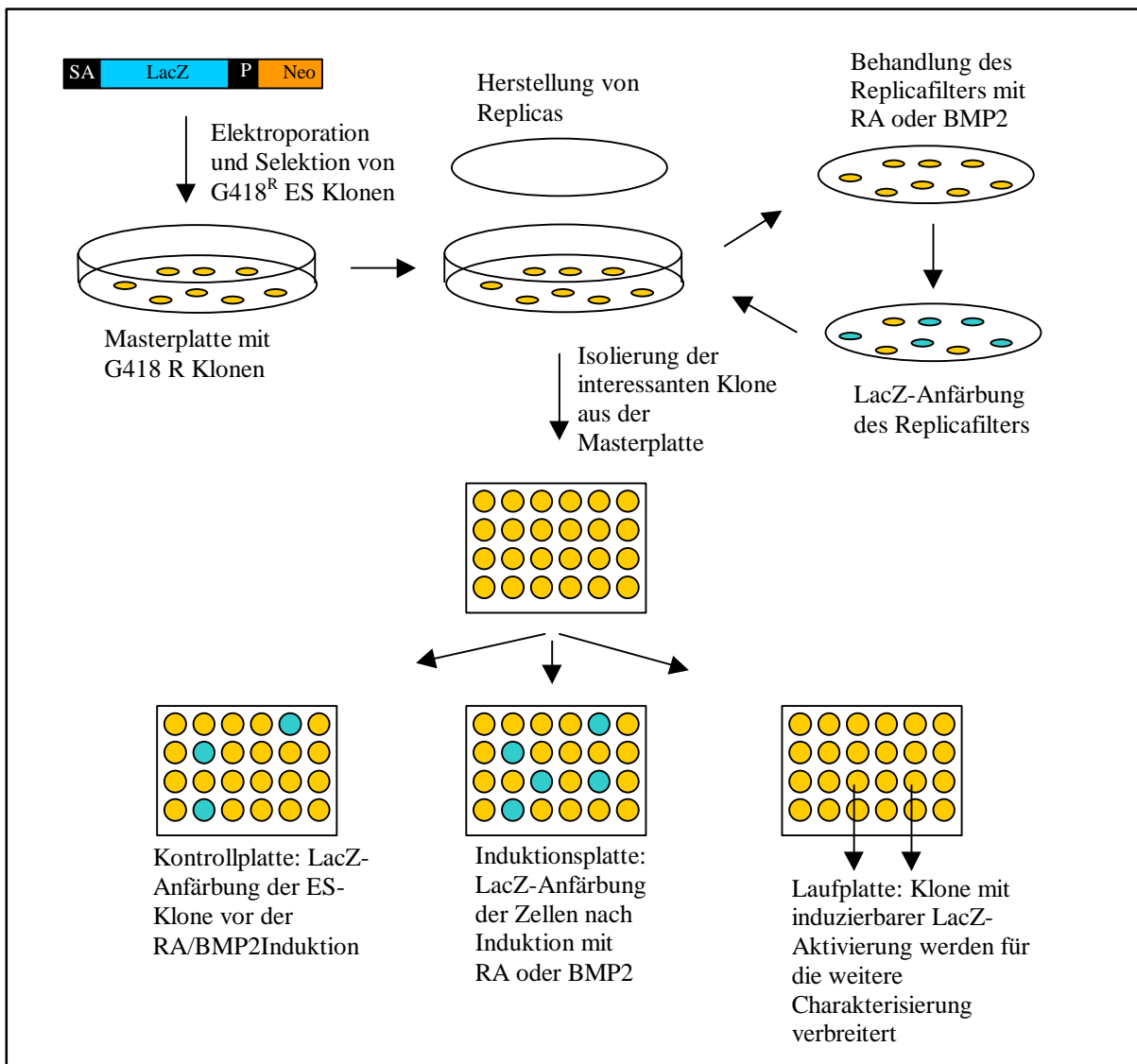


Abb. 8: Induktions Gene-trap und Replica-Plattierung zur Identifizierung RA- und BMP2-induzierbarer Gene in Maus ES Zellen. Die Klone, die eine Aktivierung des LacZ Reportergens nach Inkubation mit RA oder BMP2 zeigten, wurden isoliert und untersucht.

Für die RA-Induktion wurden die auf Replicafilter wachsenden Zellen 48 h mit RA (all-*trans*-retinoic acid, SIGMA) in einer Endkonzentration von 10^{-6} M behandelt und anschließend mit X-Gal gefärbt. 11 LacZ positive Klone wurden von der Master Platte isoliert und kultiviert. Um eine RA-spezifische Induktion zu überprüfen, wurde die Aktivierung des Reportergens in Gewebekulturschalen nochmals getestet. Dafür wurden die ES-Zellklone, vor und nach Zugabe von RA mit X-Gal gefärbt. Nur drei der isolierten 11 Klone, **3G**, **9F**, **2D1**, erwiesen sich in diesem Kontrollexperiment als RA-induzierbar. Klon **6G12** zeigte eine etwas schwächere Färbung in Gegenwart von RA. Der Klon **3H9** zeigte eine sehr starke konstitutive und ubiquitäre LacZ Aktivität. Klon **3B10** zeigte ebenfalls eine ubiquitäre β -Gal Färbung, jedoch deutlich schwächer und in einem punktierten Muster. Alle andere fünf Klone zeigten schwache LacZ Expression, die nicht durch die Zugabe von RA beeinflusst wurde (Tab. 6).

Für die Induktion mit BMP2 wurden Replicafilter mit G418 resistenten Klonen 48 h mit Mediumsüberstand einer BMP2-produzierenden Zelllinie (Q2bn, s. 2.1.5) inkubiert. Nur ein Klon (5H10) zeigte eine Erhöhung der LacZ-Expression nach Inkubation mit BMP2-haltigem Medium (Tab. 7).

GT-Linie	LacZ in ES	LacZ in ES+RA
3H9	+++	+++
3B10	+	+
6G10	+/-	+/-
6F8	+/-	+/-
5E5	+	+
6H10	+/-	+/-
2D1	+	++
5H2	+/-	+/-
6G12	+++	++
9F	+	++
3G	-	++

Tab. 6: LacZ Aktivität der aus dem RA-Induktions Gene-trap Verfahren ausgewählten Klonen.

GT-Linie	LacZ in ES	LacZ in ES+BMP2
5H10	+	++

Tab. 7: LacZ Aktivität der aus dem BMP2 Induktions Gene-trap Verfahren ausgewählten Klonen.

3.1.2.1. Sequenzanalyse von pT1ATG Klonen

Um die Gene zu identifizieren, die durch die Insertion getroffen waren, wurde, wie in (3.1.1), das Gene-trap Fusionstranskript durch 5'RACE-PCR kloniert. Dabei wurden sowohl die RA-

und BMP2-induzierbaren Klone als auch die nicht induzierbaren untersucht. Die Ergebnisse der 5'RACE-PCR und des Sequenzhomologievergleiches mit bekannten Genen und ESTs in der NCBI Datenbank sind in Tab. 8 zusammengefaßt. Diese mit pT1ATG generierten Gene-trap Klone wurden von M. Wiles im MPI Berlin im Rahmen des Humanen Genom Projekts durch eine zweite 5'RACE-PCR überprüft. Die Ergebnisse dieser zweiten unabhängigen 5'RACE-Reaktionen stimmten vollständig mit meinen Ergebnissen überein.

GT-Linie	5'RACE	Gen, Homologie	ORF	Insertion
3H9	288 bp	PGK1 (<i>X-linked Phosphoglycerate kinase</i> , M15668)	Ja	Nt +1235 AS 404
2D1	171 bp	Keine Homologie	Ja	CDS
3B10	230 bp	MnSOD (<i>Mn-dependent superoxide dismutase</i> , X04972)	Ja	Nt +575 AS 174
6G12	354 bp	IAP (<i>Intracisternal A particle</i> , M99279, M97701)	Ja	CDS
6F8	81 bp	Keine Homologie	Nein	UTR
6G10	265 bp	FXR1 (<i>Fragile X mental retardation syndrome related protein 1</i> , X90875)	Ja	Nt +1616 AS 534
3G	104 bp	GCNF (<i>Germ cell nuclear factor</i> , U14666)	Ja	Nt +390 AS 62
9F	421 bp	Keine Homologie	Ja	CDS
	300 bp	Enthält "Dr" Repetitive Sequenz (Sam et al., 1996)	Nein	UTR
5H10	201 bp	Keine Homologie	Nein	UTR

Tab. 8: Sequenzanalyse der im Induktions Gene-trap Verfahren identifizierten Genen. Die Länge der erhaltenen 5'RACE-PCR Produkte, die Sequenzhomologien zu Genen in GenBank, das Vorhanden eines offenen Leserasters (ORF), und die Position der Integration im entsprechenden Transkript (UTR: untranslatierte Region, CDS: kodierende Sequenz, Nt: Nukleotid, AS: Aminosäure) sind zusammengefaßt.

Von 13 klonierten 5'-RACE-PCR Produkten, waren in zehn die endogenen Sequenzen zum SA des GT-Vektors korrekt fusioniert; bei zwei Klonen (6H10, 5E5) wurden nur intronische En-2 Sequenzen des Gene-trap Vektors amplifiziert. Im 5'RACE-PCR Produkt von 5H2 wurde das LacZ Transkript nicht korrekt zu der En-2 Spleißakzeptorstelle gespleißt. Diese drei Klone wurden nicht weiter untersucht. Von den restlichen zehn Sequenzen waren fünf

(3H9, 3B10, 6G12, 6G10 und 3G) identisch zu bekannten Genen und fünf Sequenzen (2D1, 6F8, 5H10 und zwei Sequenzen von Klon 9F) waren unbekannt.

Unter den bekannten Genen befand sich **GCNF** (*Germ Cell Nuclear Factor*), das in der ES-Zelllinie **3G** getroffen war. GCNF ist ein nukleärer Rezeptor und ligandgesteuerter Transkriptionsfaktor, der an definierte DNA-Sequenzen bindet, und damit die Expression von Zielgenen reguliert. Die DNA-Sequenz, an die GCNF binden kann, wurde kürzlich identifiziert und als DRO-Sequenz bezeichnet (Cooney et al., 1998). Potentielle Zielgene, die DRO-Sequenzen in 5'Promotorregionen enthalten, sind ebenfalls isoliert worden. Unter diesen befinden sich die Maus Gene, die für die Spermatid-spezifischen Protamine 1 und 2 (Prm1, 2) (Hummelke et al., 1998) kodieren. Außerdem ist gezeigt worden (Heinzer et al., 1998), daß die Expression und die DNA-Bindungsaktivität von GCNF in P19 embryonalen Carcinoma Zellen von RA reguliert wird. Diese Daten unterstützen den Befund, daß GCNF als RA induzierbares Gen in dem beschriebenen Ansatz gefunden wurde.

FXR1 (*Fragile X Related Protein 1*), das Gen, das in der ES-Zelllinie **6G10** getroffen ist, kodiert wie sein Homolog FMR1 (*Fragile X Mental Retardation Syndrome Protein 1*) für ein RNA-Bindungsprotein mit zahlreichen RNA-Bindungsmotiven. Beide Proteine besitzen ähnliche RNA-Bindungseigenschaften, werden in vielen Geweben koexprimiert (Siomi et al., 1995) und interagieren miteinander (Siomi et al., 1996) und mit Ribosomen (Zhang et al., 1995). Obwohl ihre KH-Domänen fast identisch sind, sind ihre Carboxyltermini sehr divergent. Nukleotidsequenzhomologievergleiche haben gezeigt, daß die 3'-untranslatierte Region des FXR1 Gens in Maus, Mensch und Xenopus stark konserviert ist (Coy et al., 1995).

Die ES Zelllinie **3B10** enthielt eine GT- Integration im **Sod2** Gen. Sod2 kodiert für die Mn-Superoxid Dismutase, ein mitochondriales Enzym, das den Organismus vor freien Superoxid Radikalen schützt, die als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung entstehen. MnSOD ist notwendig für die normale biologische Funktion aller Gewebe und Organe, in dem es die Inaktivierung von mitochondrialen Enzyme verhindert, die gegen Superoxide empfindlich sind. Das Maus Sod2 Gen ist bereits durch homologe Rekombination inaktiviert worden (Li et al., 1995) und homozygote mutante Mäuse sterben innerhalb von 10 Tagen nach der Geburt.

In der ES-Zelllinie **3H9** ist das **PGK** Gen getroffen. Phosphoglycerate Kinase (PGK) ist ein Enzym der Glykolyse, das ubiquitär exprimiert wird. Vererbte PGK-Defizienz verursacht hämolytische Anämie, Dysfunktion des zentralen Nervensystems und Myopathie. Mindestens 20 PGK Varianten (meistens aufgrund einer "missense" Mutation) mit reduzierter PGK-Aktivität sind in Patienten bekannt (Tsujino et al., 1995).

Die ES Zelllinie **6G12** betrifft ein **IAP**. IAPs, ("*Intracisternal A particles*") sind zytoplasmische Ribonukleotidkomplexe, die von endogenen retroviralen Elementen kodiert werden. Diese existieren in der Keimbahn der Maus und besitzen die Fähigkeit, sich zu verlagern und damit neue Mutationen im Genom der Maus zu verursachen. Die Anzahl der IAP Sequenzen in der Maus wird auf über 1000 geschätzt. Die IAP DNA gehört zur Familie der Retrotransposons der Klasse I. Die individuellen Familienmitglieder können in ihrer Sequenz variieren (Singer und Berg, 1991).

Beim Klon **9F** wurden zwei unterschiedliche 5'RACE Produkte erhalten, die keine Homologie zu bekannten Genen zeigten. Das 300 bp-RACE Produkt enthielt jedoch eine repetitive Sequenz, die sog. "Dr" (*developmental regulated repeat*), die von Sam et al., (1996) in zahlreichen RA-induzierten Genen gefunden wurde. Dieser Befund unterstützt die Validität des RA-Induktionsansatzes zur Identifizierung RA-regulierbarer Gene. Ob die isolierten Fusionstranskripte auf zwei unterschiedliche Integrationsereignisse oder auf alternativ gespleißte Isoformen zurückzuführen sind, ist noch unklar.

Die Sequenzen der Klone **2D1**, **6F8** und **5H10** wiesen keine signifikanten Homologien zu bekannten Genen auf, weder in der Nukleotid- noch in der abgeleiteten Aminosäuresequenz.

3.1.2.2. Mögliche Konsequenzen der pT1ATG Gene-trap Integrationen auf die Genprodukte

Wie in 3.1.1.2 wurde die Existenz eines offenen Leserasters und die Position der Reportergenfusion in den jeweiligen Sequenzen bestimmt. Sieben Sequenzen (3H9, 2D1, 3B10, 6G12, 6G10, 3G, 9F/421) zeigten ein offenes Leseraster und von daher eine Integration in der kodierenden Region. Die restlichen drei (6F8, 9F/300, 5H10) zeigten kein offenes Leseraster und entsprachen wahrscheinlich Insertionen in untranslatierten Exonen. Im folgenden werden einige der Insertionen beschrieben:

GCNF/3G (Abb. 9A)

Die Sequenzanalyse des Fusionstranskripts in der 3G Zelllinie zeigte das Spleißen des Reportertranskripts zur GCNF mRNA in Position +390. Translation der erhaltenen Sequenz ergab ein verbleibendes Leseraster von 62 Codons, so daß nur 62 N-terminale Aminosäuren des GCNF Proteins gemacht werden können. Die restlichen 433 AS des Wildtyp Proteins einschließlich der DNA Bindungsdomäne und möglicher anderer Funktionsdomänen fehlen. Diese Insertion führt mit großer Wahrscheinlichkeit zur Inaktivierung des GCNF Proteins.

FXR1/6G10 (Abb. 9B)

Die Fusion des Reportertranskripts in der Linie 6G10 befindet sich in Position +1616 der FXR1 mRNA und trifft somit das Carboxylende des FXR1 Proteins. Vom nativen Protein fehlen nur fünf AS. Da alle bekannten Domänen im Fusionsprotein trotz Insertion intakt bleiben, ist zu erwarten, daß dieses funktionell ist. Andererseits ist die endogene 3'-UTR nicht im Fusionstranskript vorhanden. Aufgrund der Konservierung dieser Sequenz wird vermutet, daß sie eine funktionelle Rolle bei der Regulation der Translation oder des Abbaus der mRNA spielen könnte (Coy et al., 19995). Die Mutation könnte deshalb auf dieser Ebene eine Auswirkung haben.

MnSOD/3B10 (Abb. 9C)

Die Gene-Trap Integration in der ES-Linie 3B10 befindet sich in Position +575 der Sod2 mRNA und trifft das Maus Gen so, daß 48 C-terminale AS des MnSOD-Proteins fehlen. Zwei konservierte AS (183Asp und 187His), die an der Bindung des Mn^{2+} beteiligt sind (Jackson et al., 1998), sind im mutierten Protein nicht vorhanden. Dies führt möglicherweise zu einer verminderten Mn^{2+} Bindungsfähigkeit. Die 3'UTR-Region der Sod-mRNA enthält ein Translationsenhancer-Element, dessen Aktivität von einem Redox-sensitiven RNA-Bindungsprotein reguliert wird (Chung et al.,1998). Wenn die 3'-UTR des Sod-Gens aufgrund der Gene-trap Insertion im Fusionstranskript nicht vorhanden ist, ist mit einer Fehlregulation der Translation zu rechnen.

PGK-1/3H9 (Abb. 9D)

Die Gene-trap Insertion in der Linie 3H10 trifft das Maus PGK-1 Gen in Position +1235. Als Folge der Insertion soll ein PGK-1- β -Gal Fusionsprotein entstehen, in dem die letzten 13 AS des PGK-1 Enzyms fehlen. Die Substrat-Bindungsstelle des Enzyms befindet sich im C-

Terminus (Mori et al., 1986), wird aber durch die Verkürzung des Proteins nicht berührt. Hier sollte trotz Insertion ein funktionelles Enzym synthetisiert werden.

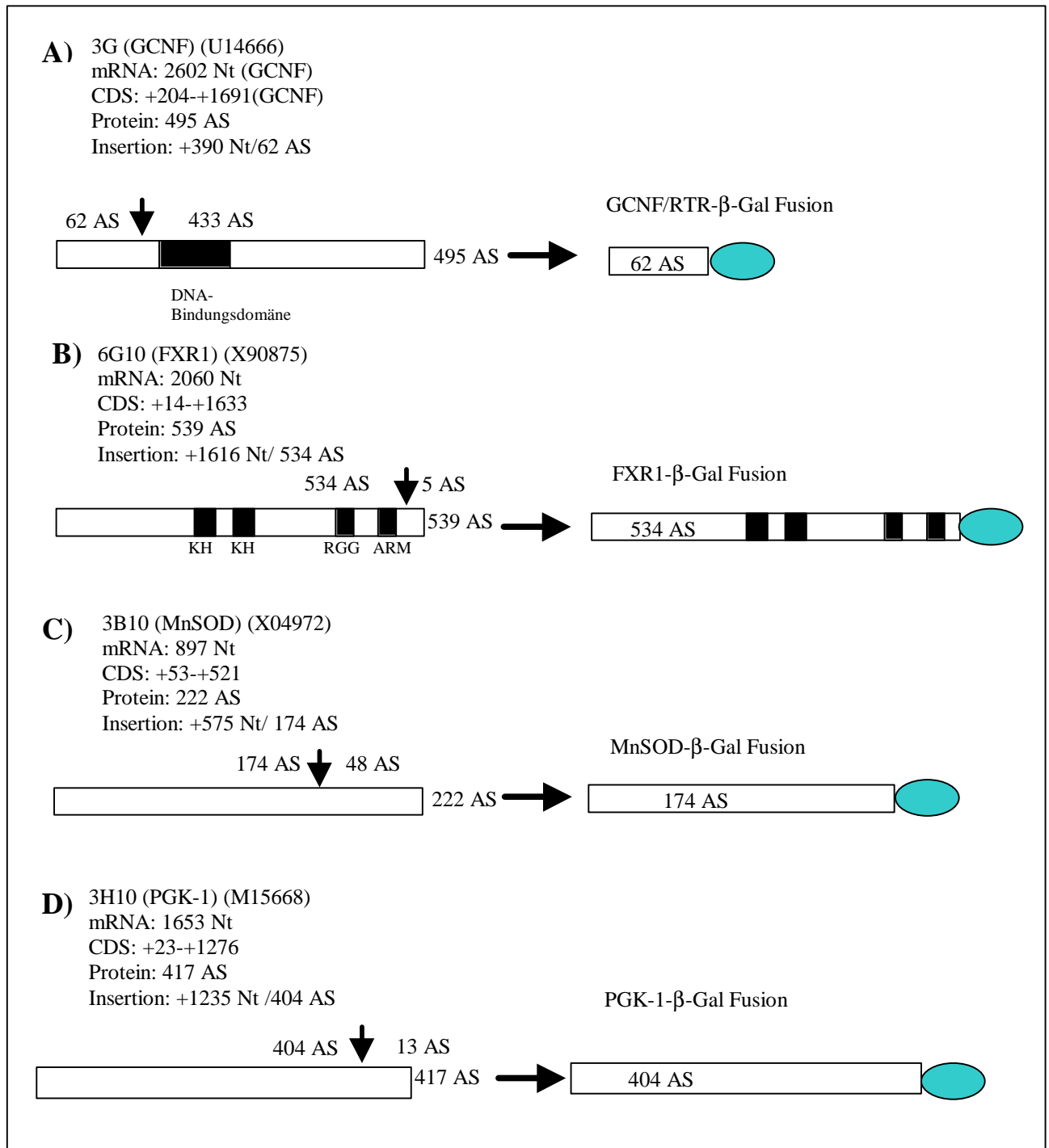


Abb. 9: Mögliche Auswirkung der Gene-trap Insertion in den getroffenen bekannten Genprodukte. Die Domänenstruktur der Wildtyp Proteine und die entsprechenden Gene-trap Fusionsproteine sind dargestellt (KH=K-Homologie Domäne; RGG: Arg-Gly-Gly repetitives Motiv; ARM= Arg-reiches Motiv). Die Pfeile zeigen die Fusionsstelle des β -Gal-Reporters.

IAP/ 6G12 (ohne Abb.)

Die Insertion des Gene-trap Vektors in der Gene-trap ES-Zelllinie 6G12 hat ein IAP getroffen. Die Insertionstelle befindet sich in der für die *gag*, RT (reverse Transkriptase) und *endo* Proteine kodierenden Region. Aufgrund der limitierten Information des 5'RACE-Produktes konnte das IAP tragende Maus Gen nicht identifiziert werden. Trotzdem zeigte die Sequenzhomologie, daß das IAP fast identisch zu dem im Lokus des Maus Interleukins IL-3 (M99279) und dem im Lokus des Folate Bindungsproteins 1 FBP1 (M97701) ist. Das *gag* Protein sollte von der Integration des Gene-trap Vektors direkt betroffen sein. Ob die Integration des Gene-trap Vektors eine Auswirkung auf die Mobilität dieses transponierbaren Elements hat, kann nicht vorhergesagt werden.

Zusammenfassend wurden aus dem Induktions Gene-trap Ansatz vier Gene mit RA bzw. BMP2-induzierbarer Expression identifiziert, von denen eins ein bekanntes Gen ist (GCNF) und drei bislang unbekannte Gene darstellen. Darüberhinaus wurden sieben Gene mit Expression in undifferenzierten ES-Zellen identifiziert. Von den RA-induzierbaren Klonen wird derzeit die **3G/GCNF** Zelllinie zur Erzeugung einer Mauslinie eingesetzt.

3.2. Etablierung und Analyse von Mauslinien mit Gene-trap Integrationen

ES-Zelllinien mit Gene-trap Integrationen wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Gruss zur Herstellung von Mausstämmen in Blastozysten injiziert bzw. mit Morulae aggregiert. Die LacZ Expression der Gene-trap Klone wurde in chimären bzw. heterozygoten Embryonen gewöhnlich am Tag 10.5 der Embryogenese analysiert. Anhand des LacZ Expressionsmusters in diesem Stadium wurden ES-Zelllinien bzw. Mauslinien für die weiteren Charakterisierungen ausgewählt. Die Gene-trap Zelllinie GTXVI-168, die Mauslinien GTIII-6 und GTXVI-44 (Vektor SA-IRES β -Geo) und die Exon-trap Linie 2A-53 (Vektor IRES β -Geo), die eine frühe embryonale Expression hauptsächlich im Herz vermittelten, wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die ES-Linien GTIII-6, GTXVI-44 und 2A-53 gingen in die Keimbahn, so daß Mäusestämme etabliert werden konnten. Ein Schema zur generellen Vorgehensweise ist in Abb. 10 gezeigt. Für jeden der vier ES-Zellklone wurden die folgenden Punkte untersucht: 1) Identifizierung des Gens, das durch die Gene-trap Insertion getroffen wurde und Bestimmung der Fusion- bzw. Insertionstelle des LacZ-Reportergens im entsprechenden Transkript; 2) Analyse der Expression des getroffenen Gens anhand der β -Gal Anfärbung und 3) Untersuchung zum Phänotyp der Gene-trap Insertion in homozygoten Mäusen.

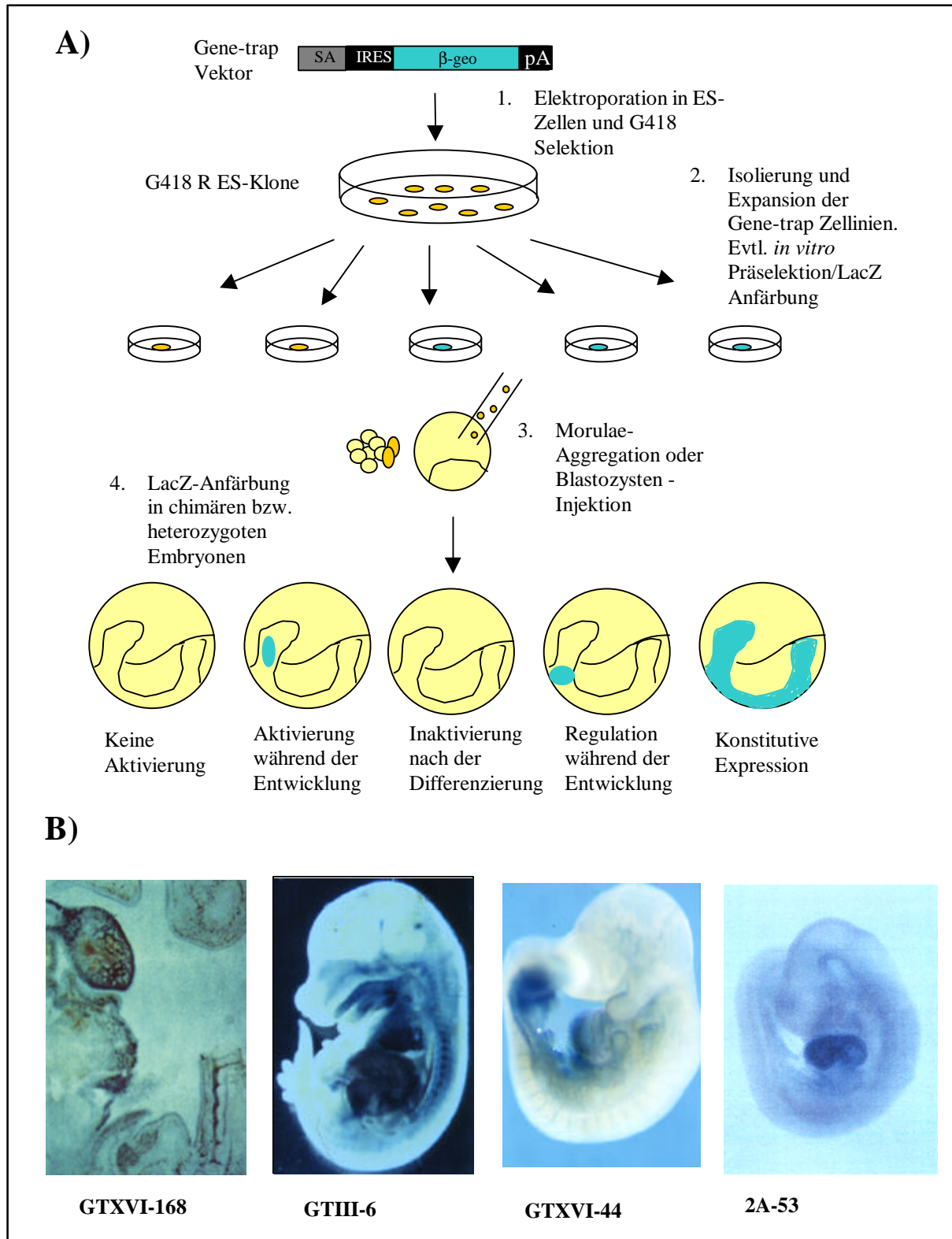


Abb. 10: Erzeugung chimärer Mäuse aus Gene-trap ES-Klonen zur Analyse der Reporterogenaktivierung während der embryonalen Entwicklung. A) Analyse der Expression des LacZ Reportergens *in vivo* in chimären Embryonen. ES-Klone mit Gene-trap Insertionen wurden in Maus Blastozysten injiziert oder mit Morulae aggregiert, um die Expression des Gene-trap Reportergens in chimären Mausembryonen zu analysieren. B) Die zu untersuchenden Gene-trap Mauslinien und ihre LacZ Expressionsmuster in chimären oder in heterozygoten Embryonen

3.2.1. Die ES-Zelllinie GTXVI-168

3.2.1.1. Expressionsmuster des getroffenen Gens in ES-Zellen *in vitro* und in chimären Embryonen anhand der LacZ Reporter-genaktivität

Das LacZ Expressionsmuster der GTXVI-168 ES-Zelllinie wurde *in vitro* in wachsenden ES-Zellen und in differenzierenden Embryoid Bodies (EBs) analysiert (Abb. 11). Die GTXVI-168 ES-Zelllinie zeigte keine oder geringe LacZ Färbung in undifferenzierten ES Zellen, wenn diese auf "Feeder" Zellen und mit LIF inkubiert wurden, d.h. unter Bedingungen, die die Differenzierung der Zellen hemmen (Abb. 11 A und B). Wurde die Zelldichte erhöht, konnte man LacZ positive Zellen in den ES-Zellnestern beobachten, in denen Zellen bereits differenzierten (Abb. 11 C, D). In differenzierten Embryoid Bodies aus der GTXVI-168 Linie war die LacZ Expression sehr stark sowohl im Kern der Embryoid Bodies (Abb. 11 E) als auch in Zellen der Peripherie, die aus den Embryoid bodies ausgewandert waren (Abb. 11 F). Nicht alle Zellen eines EBs zeigten LacZ Expression, was für ein differentiell exprimiertes Gen spricht und nicht etwa für eine generell für Zellen notwendige Aktivität. Dieser Befund wurde nach der Klonierung der GTXVI-168 endogenen Sequenz (3.2.1.2) durch RT-PCR Analysen im wesentlichen bestätigt (Abb. 12). Während in undifferenzierten ES Zellen nur eine schwache Bande zu beobachten war, wurde diese deutlich stärker in differenzierten EBs. "Feeder"Zellen zeigten auch eine schwache Expression des GTXVI-168-Gens; andere Stammzelllinien, wie die pluripotenten embryonalen Carcinoma Zellen P19 (EC-Zellen) schienen das GTXVI-168 Gen ebenfalls sehr schwach in undifferenzierten Zustand zu exprimieren.

Die LacZ-Anfärbung in E11.5 GTXVI-168 chimären Mausembryonen zeigte auf einem niedrigen und ubiquitären Hintergrund hohe Expression im Herzen, in Blutgefäßen (und/oder in Blutzellen), in Wirbelkörpern und in Skelettmuskeln (Abb. 13 A, B).

Zur Analyse des endogenen GTXVI-168 Transkripts wurden sowohl "Whole-mount"-*in situ* Hybridisierungen mit einer RNA-antisense Sonde aus der isolierten cDNA, als auch RT-PCR Analysen durchgeführt. "Whole mounts" vom Wildtyp am Tag E10.5 und E 11.5 zeigten starke Expression im Herzen, aber auch schwache fast ubiquitäre Expression, die schwierig vom Hintergrund zu unterscheiden war (Abb. 13 C, D). RT-PCR Analysen zeigten, daß das GTXVI-168 Gen in zahlreichen Geweben und Organen sowohl in E 12.5 Embryonen als auch in adulten Mäusen exprimiert wird. Embryonales Herz, Leber, Lunge und

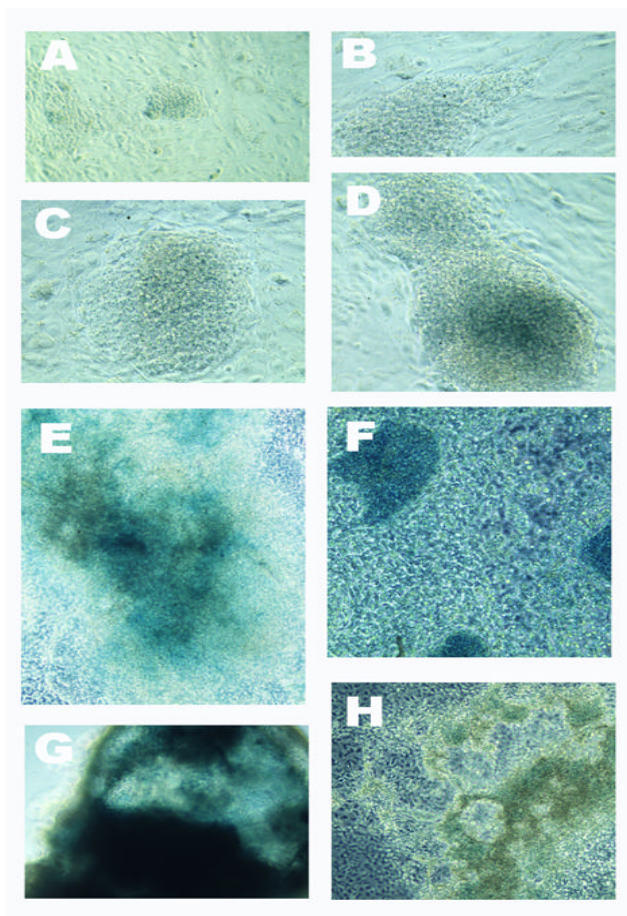


Abb. 11: *LacZ* Anfärbung der GTXVI-168 ES-Zelllinie *in vitro*. **A)** und **B)** in undifferenzierten GTXVI-168 ES Zellen. **C)** und **D)** in GTXVI-168 ES Zellen mit hoher Zelldichte. **E-H)** in GTXVI-168 Embryoid Bodies.

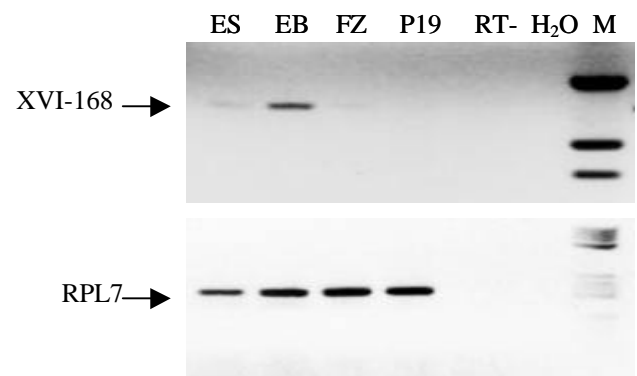


Abb. 12: *RT-PCR* zum Nachweis des endogenen GTXVI-168 Transkripts in undifferenzierten ES Zellen (ES), Embryoid Bodies (EB), "Feeder" Zellen (FZ) und P19 EC Zellen (P19). **Unten:** *RT-PCR* zum Nachweis des ubiquitären ribosomalen Proteins L6 als Kontrolle. RT-: *PCR* Ansatz mit RNA, H₂O: *PCR* Ansatz ohne cDNA.

Darm zeigten hohe Expression, während die Expression im Gehirn etwas schwächer war. Bei adulten Organen war die Expression in Gehirn, Lunge und Herz am höchsten, während Leber, Skelettmuskel und Darm eine schwächere Expression zeigten (Abb. 14). In mehreren Versuchen, eine GTXVI-168 Mauslinie zu etablieren, wurden Chimäre erhalten, von denen viele direkt nach der Geburt starben, da die spontane Atmung ausblieb. In keinem Fall wurden Keimbahnchimäre erhalten, so daß eine detaillierte Analyse der Reporterexpression in heterozygoten und homozygoten Mäusen nicht möglich war. Zusammengefaßt zeigen die Expressionsdaten *in vitro* und in chimären Mäusen, daß das GTXVI-168 Gen in einem dynamischen Expressionsmuster während der Entwicklung auf einem schwachen ubiquitären Hintergrund aktiviert wird.

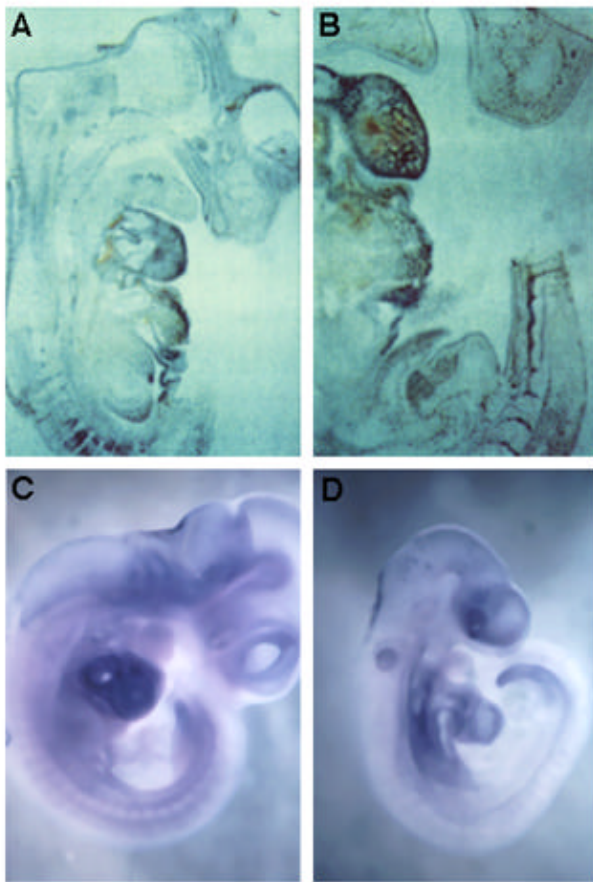


Abb. 13: Expressionsmuster des GTXVI-168 Gens im Mausembryo. A, B: LacZ Anfärbung in E11.5 chimären Embryonen der ES-Zelllinie GTXVI-168. C, D: Whole mount in situ Hybridisierung in E 10.5 (D) und E11.5 (C) Wildtyp Embryonen mit einer antisense GTXVI-168 RNA Probe.

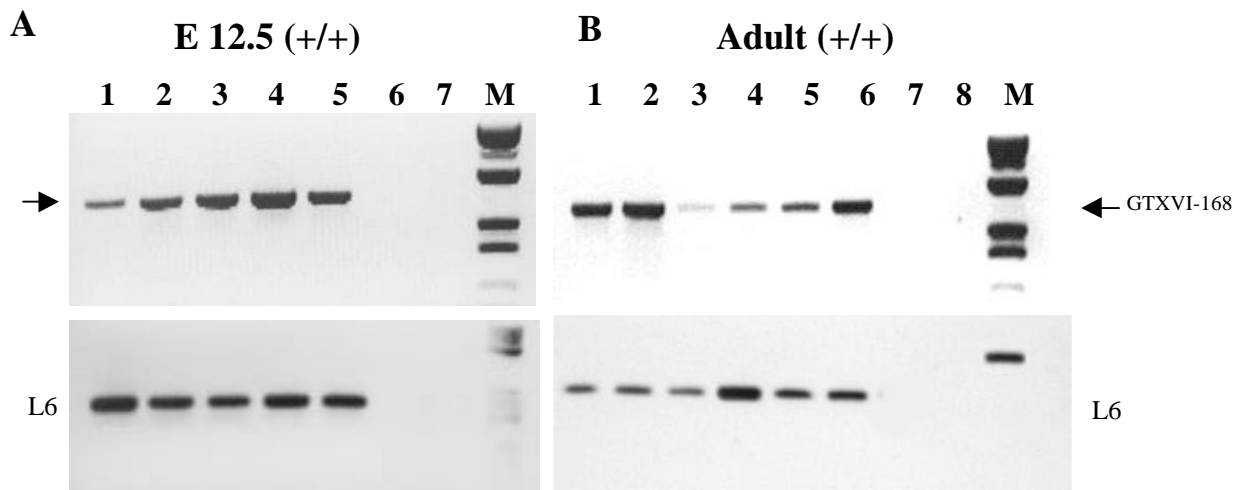


Abb. 14: Expressionsanalyse des endogenen GTXVI-168 Gens in verschiedenen Organen aus Wildtyp Mäusen durch RT-PCR. A) Oben: RT-PCR zum Nachweis der GTXVI-168 mRNA in Gewebe aus E 12.5 Wildtyp Embryonen. Unten: Kontroll RT-PCR zum Nachweis der ubiquitären mRNA L6. 1. Gehirn; 2. Lunge; 3. Magen/Darm; 4. Leber; 5. Herz; 6. PCR mit RNA; 7. PCR ohne cDNA. B) Oben: RT-PCR zum Nachweis der GTXVI-168 mRNA in Organen aus einer adulten Wildtyp Maus. Unten: Kontroll RT-PCR zum Nachweis der ubiquitären mRNA L6. 1. Gehirn; 2. Lunge; 3. Muskel; 4. Darm; 5. Leber; 6. Herz; 7. PCR mit RNA; 8. PCR ohne cDNA

3.2.1.2. Identifizierung des getroffenen Gens durch 5`RACE-PCR

Zur Klonierung des GTXVI-168 Fusionstranskripts wurde zunächst gesamt RNA aus differenzierten Embryoid Bodies (EB) der Linie GTXVI-168 isoliert. In einer 5`RACE-PCR Reaktion mit dieser RNA (2.2.8.4) wurden zwei cDNA-Fragmente von 823 bp und 590 bp erhalten, bei denen der Spleißakzeptor (SA) des GT-Vektors korrekt mit einer endogenen Spleißdonor (SD)-Sequenz verbunden war. Die Nukleotidsequenzen der RACE Produkte enthielten, wie erwartet, 120 bp des *Engrailed* Exons-SA aus dem GT-Vektor und 594 bzw. 461 bp unbekannte DNA Sequenz. Ein Vergleich der DNA-Fragmente zeigte identische Sequenzen am 3`Ende. Beide Sequenzen wurden auf Homologien mit Genen in den Datenbanken analysiert. Keine Homologien zu bekannten Genen, aber hohe Sequenzähnlichkeiten (87% bis 90%) zu der Nukleotidsequenz eines Maus EST-Klons und zahlreichen humanen EST-Klonen wurden festgestellt. In beiden RACE-Produkten ergab sich ein offenes Leseraster, so daß Homologien der abgeleiteten Aminosäuresequenz in Datenbanken gesucht werden konnten. Mit dem BLASTX Programm wurde ein Motiv erkannt, das Ähnlichkeit mit einer GAP (GTPase-activating Protein)-Domäne zeigte.

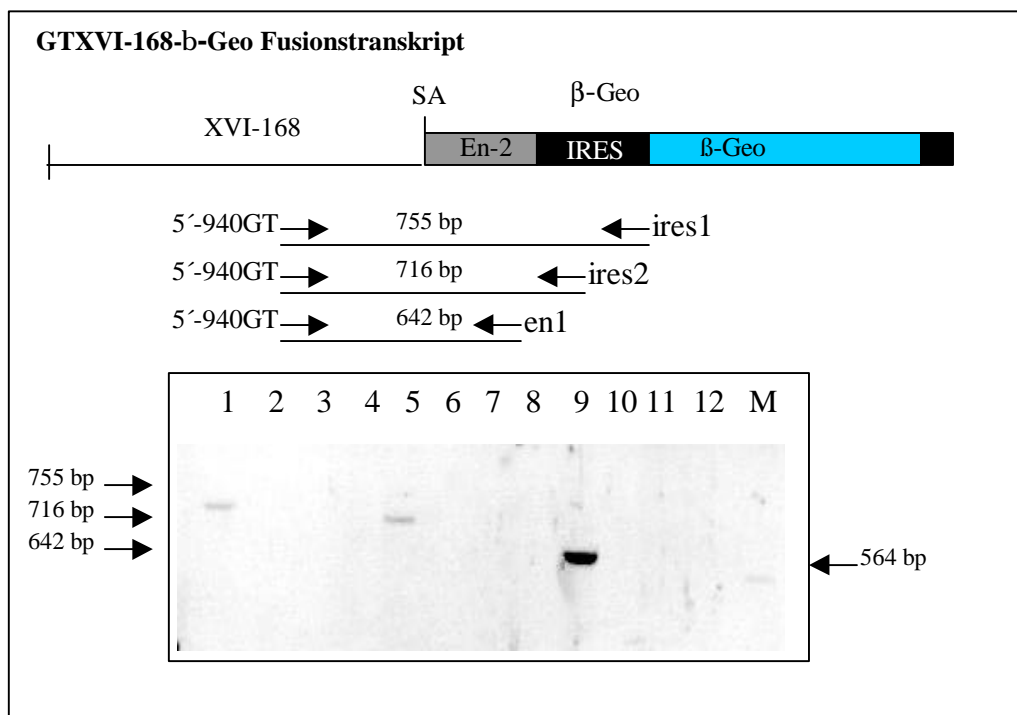


Abb. 15: Nachweis des GTXVI-168 b-Geo Fusionstranskriptes durch RT-PCR. Ein 5`sense GTXVI-168 spezifischer Primer und drei 3`antisense Gene-trap-Vektor Primer wurden in drei unabhängigen PCR-Reaktionen verwendet. 1, 5, 9: cDNA aus differenzierten EBs der Zelllinie GTXVI-168; 2, 6, 10: cDNAs aus Wildtyp ES-Zellen; 3, 7, 11: Kontroll PCR ohne Reverse Transkription; 4, 8, 12: PCR ohne Template; M: IDNA/HindIII Marker.

Um sicherzustellen, daß die isolierten 5'RACE-PCR Fragmente einem tatsächlich exprimierten Fusionstranskript entsprechen, wurde ausgehend von RNA der ES-Zelllinie GTXVI-168 eine RT-PCR Reaktion mit einem 5' genspezifischen Primer und einem 3' GT-Vektor-spezifischen Primer durchgeführt. Drei unabhängige RT-PCR Reaktionen mit verschiedenen 3' Primern aus den Vektorsequenzen ergaben jeweils cDNA-Fragmente der erwarteten Größe. Diese Fragmente wurden nur in RNA aus Embryoid bodies der ES-Zelllinie GTXVI-168 erhalten, nicht aber in RNA aus undifferenzierten ES Zellen oder in Kontrollreaktionen ohne RNA (Abb. 15). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die 5'RACE-PCR Produkte ein exprimiertes Fusionstranskript (Fusion zwischen endogenen exprimierten Sequenzen und dem β -Geo Reportergen) reflektieren.

3.2.1.3. Isolierung und Charakterisierung der kompletten cDNA des GTXVI-168 Gens

Da die Information, die aus dem 5'RACE-PCR Produkt gewonnen werden konnte, keine Identifizierung des Gens erlaubte, wurde versucht, die gesamte cDNA des nativen Transkripts zu isolieren. Das 461 bp lange 5'RACE Fragment wurde als Sonde verwendet, um eine embryonale (11.5 dpc) Maus Herz cDNA Bank durchzumustern. Es wurden zwei Klone unterschiedlicher Länge isoliert und vollständig sequenziert. Die Klone zeigten überlappende Nukleotidsequenz und beide enthielten die Sequenz des 5'RACE-Produktes. Der längere cDNA Klon umfaßte 3890 bp mit einem offenen Leseraster von +1 bis + 2726, das mit dem Leseraster der 5'RACE-PCR Produkte übereinstimmte. Am 3'Ende wurde ein Polyadenylierungssignal und ein polyA-Schwanz gefunden, so daß man davon ausgehen kann, daß die 3'untranslatierte Region in der cDNA vollständig enthalten ist. Das ATG in Position +114 könnte als Initiationskodon dienen, da es das erste im Leseraster ist.

Die vollständige cDNA Sequenz und die daraus abgeleitete Proteinsequenz wurden mit Hilfe der BLASTN und BLASTX Programme der NCBI mit Datenbank Sequenzen verglichen, um eventuell weitere Homologien festzustellen.

Die BLASTN Ergebnisse zeigten, daß die GTXVI-168 cDNA Sequenz keinem bekannten Gen entspricht. Ein BAC Klon, der eine Region des menschlichen Chromosoms 16 enthält (AC002041), zeigte im 3'-Ende etwa 90% Sequenzähnlichkeit zum 5'-Ende der GTXVI-168 cDNA. Hohe Homologien wurden auch zu zahlreichen Maus und Mensch ESTs über die gesamte Länge der EST-Klone festgestellt. Besonders überzeugend war die Homologie zum Maus EST AA050458 (Abb. 16). Diese Sequenz ist mit dem 5'Ende der GTXVI-168 cDNA

identisch und besitzt zusätzlich 140 Nukleotide am 5' Ende vor der GTXVI-168 cDNA. Mit Hilfe des ORF-Finder Programms ergibt sich für den EST-Klon ein Leseraster mit ATG in Position +66 als potentielltem Startkodon. Dieses Leseraster stimmt mit dem des GTXVI-168 cDNA-Klons überein. Somit kann die kodierende Sequenz der GTXVI-168 cDNA am 5' Ende etwas erweitert werden (Abb. 16). Die zu GTXVI-168 homologen ESTs sind in Tab.9 zusammengefaßt.

GenBank Nummer	Spezies, Organ	Länge	Homologie
AI131432	Human, embryonales Herz	709 bp	89%
AA914232	Maus, Brustdrüse	376 bp	98%
W14346	Maus, Embryo 19.5 dpc	393 bp	96%
W61872	Maus, Embryo 13.5-14.5 dpc	369 bp	97%
AA050458	Maus, Embryo 13.5-14.5 dpc	469 bp	100%
AA850065	Ratte, Ovar	434 bp	93%
AA485673	Human, Ovar Tumor	551 bp	89%
AI029281	Ratte, Adult	366 bp	96%
AA832970	Maus, Uterus	497 bp	99%

Tab. 9: Zusammenfassung der EST-Klone mit Homologie zur isolierten GTXVI-168 cDNA Sequenz. Ihre Genbank Zugangsnummer, Spezies und Organe, aus denen sie isoliert wurden und der Prozentsatz identischer Nukleotide sind angegeben.

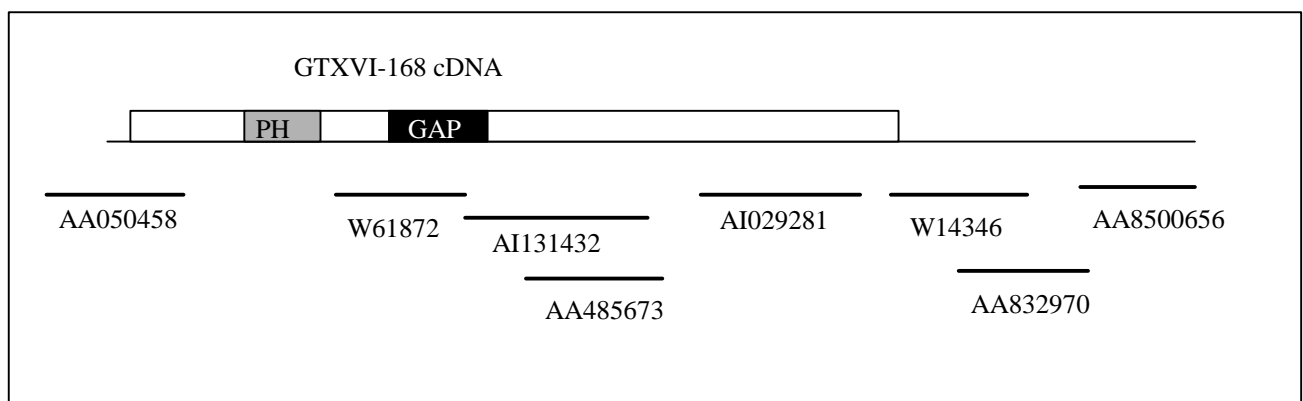


Abb. 16: Lokalisation der EST-Klone mit Homologie zur GTXVI-168 cDNA Sequenz. Die homologen ESTs befinden sich sowohl in der kodierenden Region (Kasten) als auch in der 5' und 3' UTR (Linie).

3.2.1.4. Mögliche Funktionsdomänen in der GTXVI-168 cDNA

Die aus der cDNA Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz enthält eine Region von 150-200 AS signifikanter Homologie zu GAP-Domänen der Rho-GAP Proteine. Diese gefundenen

Homologien sind in Tab. 10 aufgelistet. Ebenfalls sind die homologen Rho-GAP Proteine in ihrer Domänenstruktur schematisch dargestellt (Abb. 17A). Neben der erwähnten GAP-Domäne, wurde im GTXVI-168 Genprodukt eine sogenannte Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne gefunden. Die PH-Domäne ist ein ca. 100 AS umfassendes Strukturmotiv, das sich in vielen Signalmolekülen findet (Gibson et al., 1994) (Abb. 18A). Ursprünglich wurde die PH-Domäne im 47 kDa Pleckstrin-Protein gefunden, das in Blutplättchen das Hauptsubstrat der Proteinase C darstellt (Mayer et al., 1993; Haslam et al., 1993). Die PH-Domäne weist bei nur geringer Sequenzhomologie eine sehr ähnliche Faltungstopologie auf. Das BLASTX Suchprogramm detektierte in der GTXVI-168 Aminosäuresequenz niedrige Sequenzhomologie zu der PH-Domäne des *C.elegans* GAP-Proteins, CeGAP und zu der PH-Domäne von Spectrin (Abb. 18C).

Aus dieser Sequenzinformation kann geschlossen werden, daß die GTXVI-168 cDNA für ein Protein von mindestens 871 AS kodiert, das sowohl eine PH- als auch eine GAP-Domäne enthält.

Nummer	Gen/Protein	Spezies	GRD-Länge	Homologie
U02289	GTPase-activating protein	<i>C.elegans</i>	202 AS	50%
X67250	n-chimerin	<i>R. norvegicus</i>	178 AS	37%
X69489	beta-chimerin	<i>R. norvegicus</i>	182 AS	36%
X51408	n-chimaerin	<i>H. sapiens</i>	178 AS	36%
Z22641	a2-chimaerin	<i>H. sapiens</i>	178 AS	36%
U07223	beta2-chimaerin	<i>H. sapiens</i>	182 AS	36%
S98891	HAT-2 (PKC-homolog)	Canaries	178 AS	35%
X02596	Breakpoint cluster region protein (BCR)	<i>H. sapiens</i>	149 AS	42%
U01147	GTPase activating protein ABR	<i>H. sapiens</i>	149 AS	43%
Z46241	Hypothetical 94,2Kda Protein C38D4.5	<i>C. elegans</i>	143 AS	38%
X78817	Rho-GAP hematopoietic protein c1	<i>H. sapiens</i>	149 AS	43%
AB007871	KIAA0411	<i>H. sapiens</i>	144 AS	33%
AF029913	GTPase activating protein homolog	<i>C. heterostrophus</i>	135 AS	40%

Tab. 10: Ergebnis der BLASTX Suche nach Homologien zu Proteinen in der Datenbank mit der GTXVI-168 cDNA Sequenz. Nur die höchsten Homologien sind gezeigt. Das Prozentsatz bezieht sich auf identische AS in der homologen Domäne. GRD: "GAP related domain".

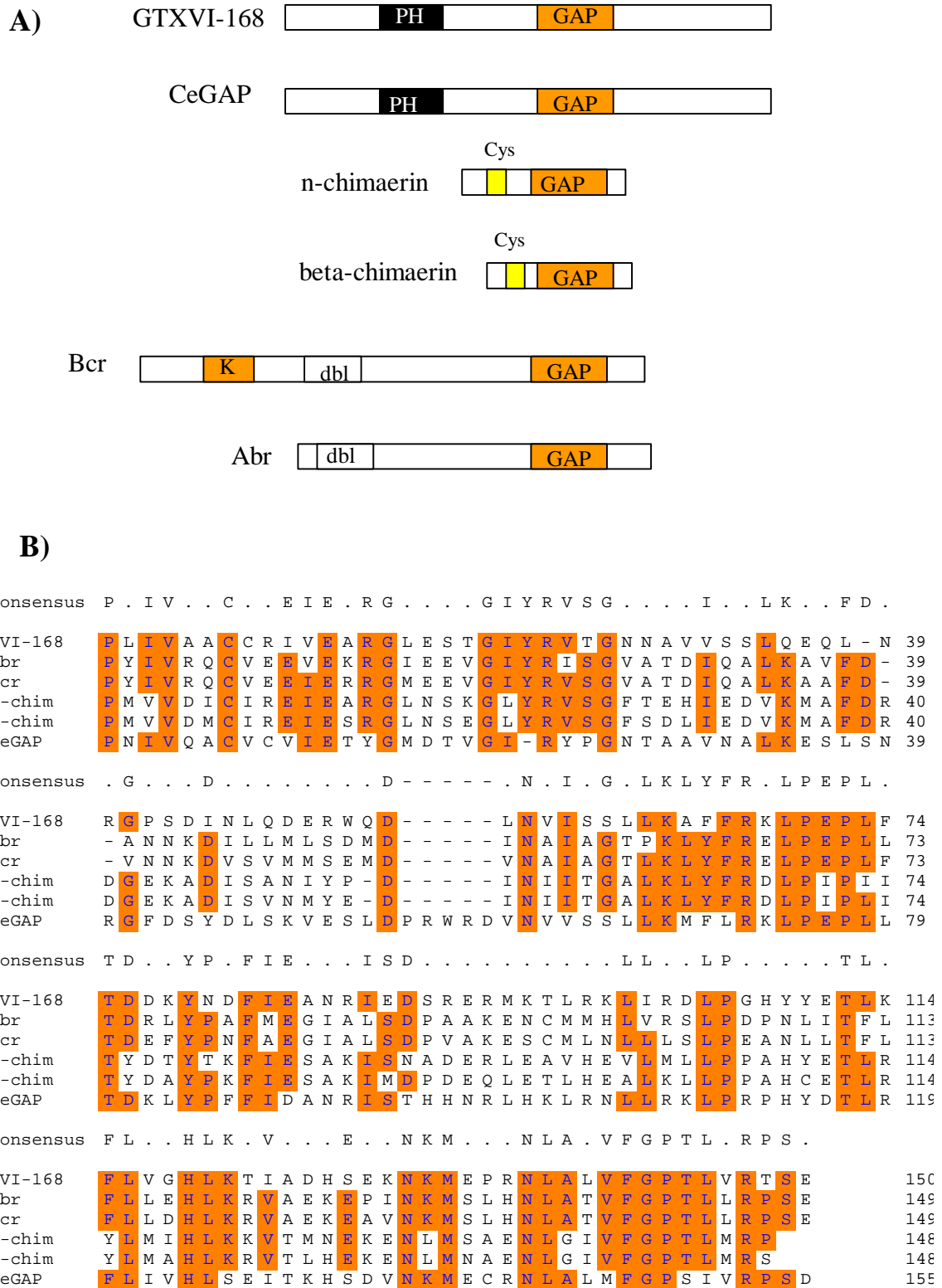
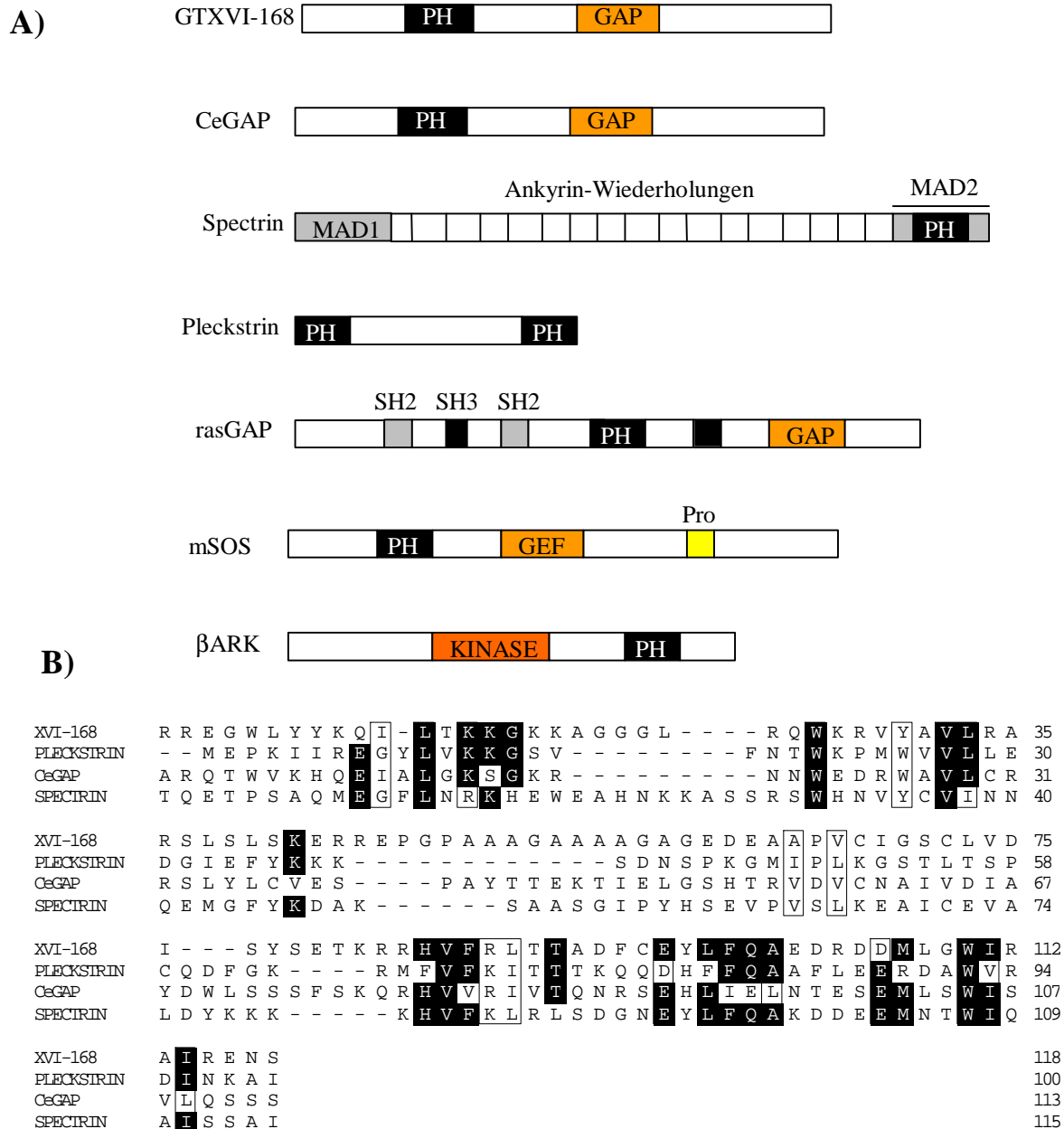


Abb. 17: Die GAP-Domäne. A) Domänenstruktur von Rho-GAP-Proteinen. PH-Pleckstrin-Homologie Domäne; GAP: GTPase-aktivierendes Protein-Domäne; K: Ser/Thr Kinase-Domäne; dbl: Dbl Homologie, Cys: Cys-reich. B) Proteinsequenzhomologievergleich der GTXVI-168 GAP-Domäne (AS 346-495) mit den GAP-Domänen von abr (Human ABR, U01147, AS 661-808), bcr (Human BCR, X02596, AS 1068-1216), b-chim (Ratte b-chimärin, X69486, AS118-265), n-chim (Ratte n-chimärin, X67250, AS 122-269) und CeGAP (C. elegans GAP Protein, U02289, AS 796-951). Identische AS sind in orangenen Kästen dargestellt.



C)

Zugangsnummer	Gen	Spezies	PH-Länge	Homologie
U02289	CeGAP (GTPase-activating protein)	C. elegans	112 Aa	29%
M74773	β-Spectrin (Gehirn)	M. musculus	115 Aa	24%
X07743	Pleckstrin	H. sapiens	91 Aa	16%

Abb. 18: Die PH-Domäne. A) PH-Domänen Proteine. PH-Domänen sind in vielfältigen Proteinen enthalten wie den Proteinen des Cytoskeletts. Spectrin, Tyr-Kinasen, GAP- und GEF-Proteinen. MAD: Membran assoziierte Domäne, SH2: Src-Homologie 2, SH3: Src-Homologie 3, GEF: G-Nukleotid-Austauschfaktor. B) Proteinsequenzhomologievergleich der GTXVI-168 PH- Domäne (AS 117-234) mit den PH-Domänen von Pleckstrin (Human Pleckstrin, X07743, AS 5-96), CeGAP (C. elegans GAP Protein, U02289, AS 446-558) und Spectrin (Maus Gehirn **b** Spectrin, M747743, AS 2190-2305). Identische AS befinden sich in schwarzen Kästen, in der Ladung konservierte AS sind in Blöcken dargestellt. C) Prozentsatz der Homologie der vermuteten GTXVI-168 PH-Domäne zu den PH-Domänen von CeGAP, Spectrin und Pleckstrin. Nur diese wurden aufgrund der niedrigen Sequenzkonservierung dieser Domäne mit dem BLASTX Programm detektiert.

3.2.1.5. Mögliche Auswirkung der Gene-trap Insertion auf das GTXVI-168 Genprodukt

Die Integrationsstelle des β -Geo Reportergens im Transkript befindet sich in Position +1708 der cDNA, d.h. hinter den vermuteten PH und GAP-Domänen innerhalb der kodierenden Region. Das GTXVI-168- β -Geo Transkript ergibt also ein GTXVI-168- β -Geo Fusionsprotein, das aus einem verkürzten GTXVI-168 Protein von 594 AS besteht, in dem 340 AS am C-Terminus fehlen. Da die PH- und GAP-Domänen trotz dieser Insertion intakt bleiben, wäre es möglich, daß das verkürzte GTXVI-168 Protein Restfunktionen besitzt und dominant negativ wirken könnte (Abb. 19).

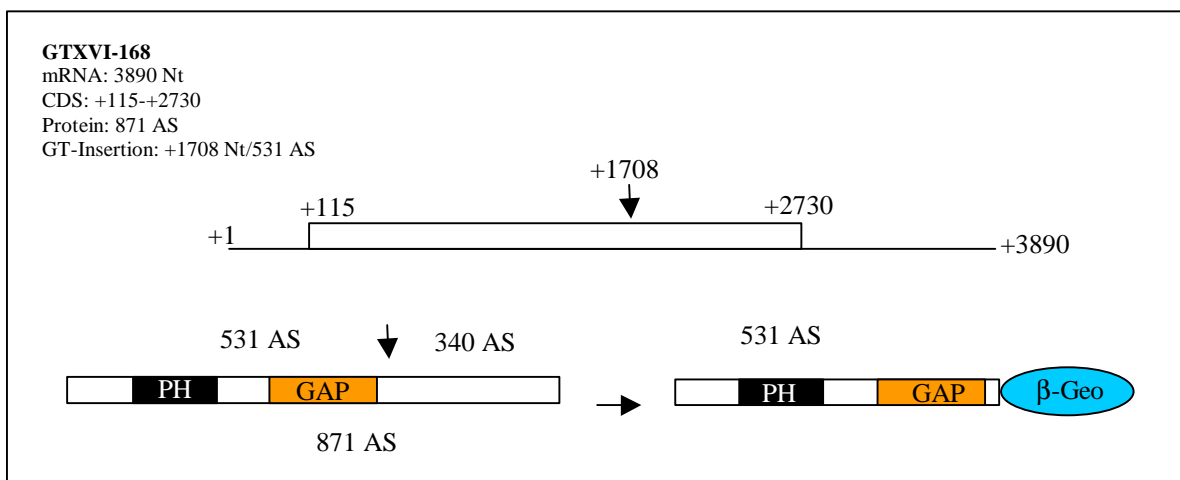
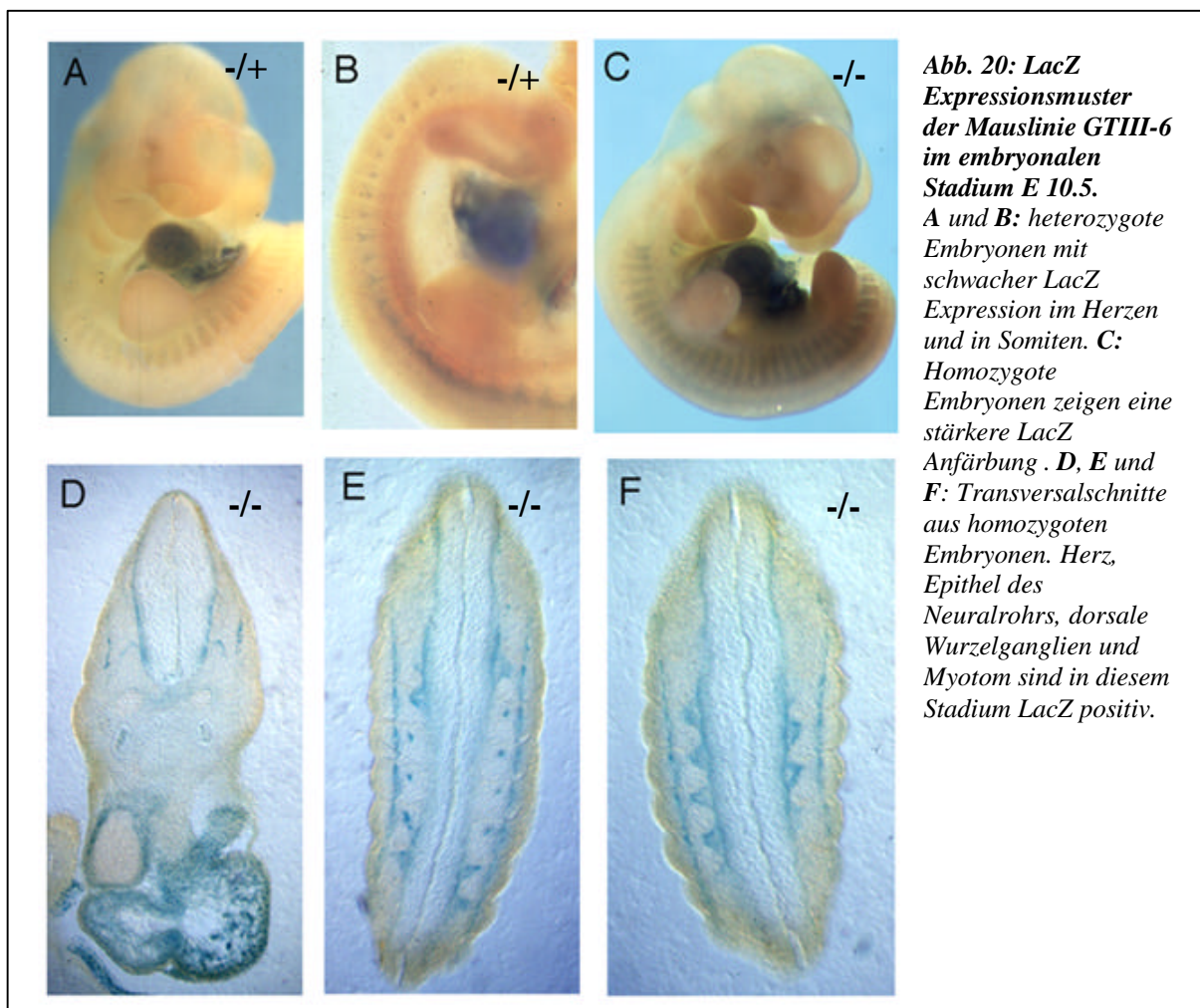


Abb. 19: Insertion des Gene-trap β -Geo Reportergens im GTXVI-168 Transkript und das daraus resultierende Protein. Die Insertion ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.2.2. Die ES-Zelllinie GTIII-6 und davon abgeleitete Mäuse

3.2.2.1. Expressionsmuster des getroffenen Gens *in vivo* anhand der LacZ Reportergenaktivität

In der Arbeitsgruppe Prof. Gruss waren GTIII-6 ES-Zellen in Blastozysten injiziert worden, die erfolgreich in die Keimbahn integrierten. Erste LacZ-Färbungen der Mausembryonen aus dieser Linie zeigten Aktivität auch im Herz, weshalb diese GTIII-6 Linie von mir näher untersucht wurde. Es wurden heterozygote und homozygote GTIII-6 Embryonen zwischen Tag 8.5 und Tag 14.5 der Embryogenese analysiert. Während zwischen Tag 8.5 und 9.5 nur schwache LacZ-Expression im Herz zu sehen war, wurde die Expression einen Tag später deutlich stärker. Zusätzlich wurde Expression in Somiten und im Neuralrohr beobachtet (Abb. 20: A, B und C). E10.5 homozygote Embryonen wurden eingebettet und transversal geschnitten, so daß die Färbung im Neuralrohr in der *Membrana limitans externa* und in Somiten in bestimmten Zellen des Myotoms erkennbar wurde. Ebenfalls positiv waren Zellen in den dorsalen Wurzelganglien und im atrialen sowie ventrikulären Myokard (Abb. 20: D, E, F und D).



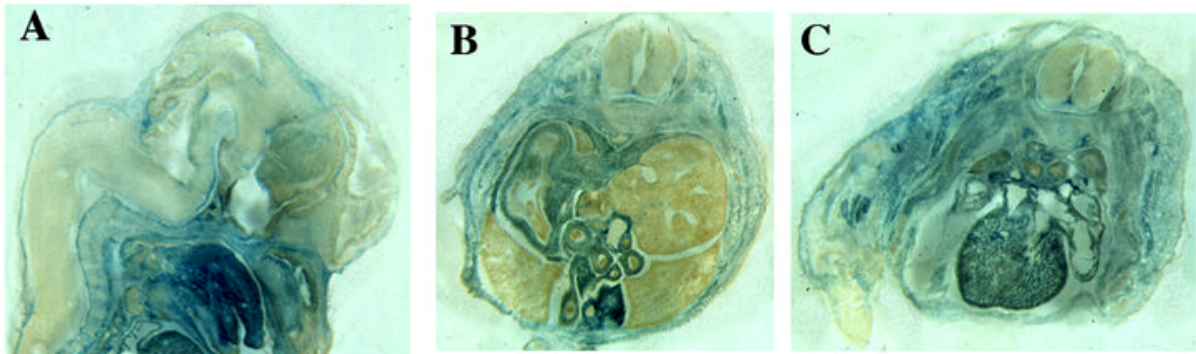
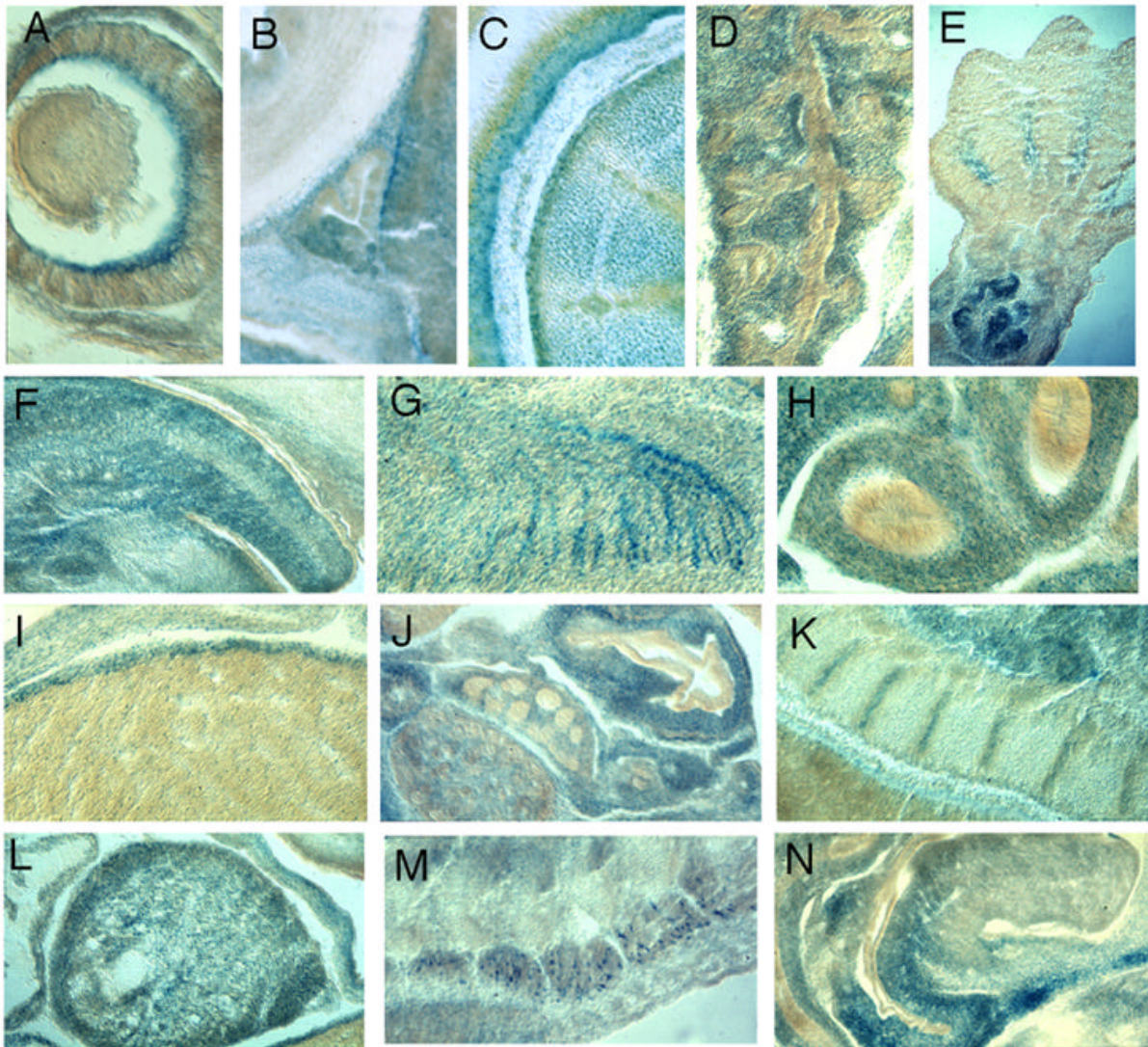


Abb. 21 (Oben): LacZ Expressionsmuster in E 13.5 GTIII-6 homozygoten Embryonen. A: Sagittal-, B, C: Transversalschnitte.

Abb. 22 (Unten): LacZ Expression in verschiedenen Organen aus E 13.5 GTIII-6 homozygoten Embryonen. A) in der Retina B) in der sich entwickelnden Hypophyse C) im Rückenmark und in den Wirbeln D) in der Lunge; E) in den Extremitäten; F) in der Zunge; G) in den Riechnerven; H) im Darm; I) in der Leber; J) im Magen, Pankreas und in der Niere; K) Vertebrae; L) im Herz; M) in den dorsalen Wurzelganglien; N) in den Harn- und Genitalorganen



Ein ähnliches Expressionsmuster wurde in E11.5 Embryonen beobachtet. In E13.5-14.5 Embryonen (Abb. 21-22) zeigte sich LacZ Expression in zahlreichen Organen und Geweben wie Herz, Zunge, Magen, Darm, Lunge, Niere, Blase und Hypophysenanlage. Die Leber und das Rückenmark waren weitgehend LacZ-negativ. In den LacZ positiven Organen war die Expression auf bestimmte Gewebezellen beschränkt. Im Auge war die Anlage der Retina angefärbt (A), in der Hypophyse die Rathkesche Tasche (B), die später zur Adenohypophyse wird. Das Rückenmark war negativ mit Ausnahme der Bodenplatte (C). In der Lunge (D) und im Pankreas (J) war das Mesenchym LacZ-positiv, während in beiden Organen Epithelien negativ waren. In den Extremitäten (E) waren die interdigitalen Nekrosezonen gefärbt. In der Zunge (F) und in Strukturen im Oberkiefer (die Riechnerven) (G) wurde LacZ exprimiert. Ebenfalls war die Muskulatur des Magens (J) und Darms (H) angefärbt. Die Leber (I) war bis auf wenige einzelne Zellen negativ. Das Knorpelprimordium der Wirbelkörper (K) und die Knorpelanlagen in den Extremitäten (E) waren ebenfalls LacZ positiv. Im Herz waren die Atrien und die Ventrikel mit Trabekeln angefärbt (L). In den Rückenwurzelganglien (M) waren einzelne LacZ positive Zellen zu detektieren.

Beurteilt man also die Expression des GTIII-6 Gens anhand der LacZ-Aktivität im Mausembryo, handelt es sich um ein breit exprimiertes Gen, das aber durchaus nicht ubiquitär sondern gewebe- oder zelltypisch aktiviert zu werden scheint.

Nach der Klonierung des getroffenen Gens konnte diese Einschätzung anhand von "whole-mount"-*in situ* Hybridisierungen mit der endogenen Sonde an E 9.5-10.5 Mausembryonen weitgehend bestätigt werden. Allerdings war das Signal im Herz schwach und kaum vom Hintergrund zu unterscheiden (keine Abb.). Mit RT-PCR für das Wildtyp- und das Fusionstranskript in E13.5 heterozygoten Embryonen (Abb. 23) zeigten sich beide Transkripte in allen Geweben in weitgehender Übereinstimmung mit den LacZ Expressionsdaten in Extremitäten, Gehirn, Darm, Niere, Wirbelsäule und schwach in der Leber. Die schwach amplifizierten PCR Fragmente im Herzen kontrastierten jedoch mit der starken LacZ Anfärbung in diesem Organ.

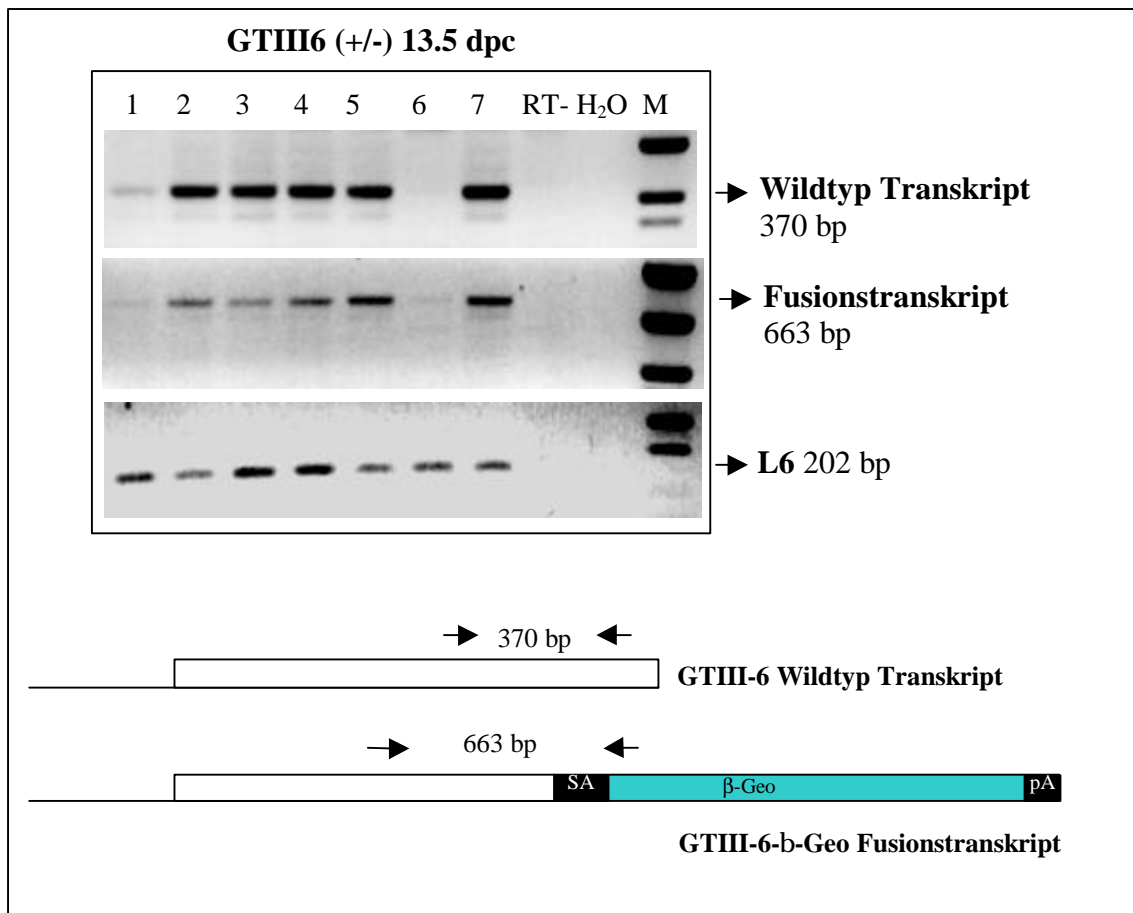


Abb. 23: Koexpression des GTIII-6 Transkripts und des GTIII-6-b Geo Fusionstranskripts in verschiedenen Geweben aus heterozygoten E13.5 GTIII-6 Embryonen. 1) Herz; 2) Extremitäten; 3) Gehirn; 4) Darm; 5) Niere; 6) Leber 7) Wirbelsäule. RT: Ansatz ohne Reverse Transkriptase. H₂O: PCR ohne Template. M: Marke: pUC18 Plasmid mit Sau3AI verdaut. Wt: Wildtyp Transkript; Ft: Fusionstranskript. L6: ribosomales Protein L6 als Kontrolle.

3.2.2.2. Identifizierung des GTIII-6 Transkripts durch 5'RACE-PCR

Klonierung des Fusionstranskripts durch 5'RACE-PCR aus RNA des Herzens von E10.5 heterozygoten Embryonen der GTIII-6 Mauslinie lieferte zwei Produkte von 581 und 938 bp. Sequenzanalyse zeigte korrektes Spleißen zwischen endogenem Spleiß-Donor und dem Spleiß-Akzeptor des Gene-trap Vektors. Beide Produkte waren am 3' Ende identisch. BLASTN und BLASTX Suche nach Sequenzhomologien in der Datenbank detektierten keine Homologien zu bekannten Genen, aber hohe Sequenzähnlichkeit (81%) zu der Nukleotidsequenz eines humanen EST-Klons von 447 bp aus NT2 neuronalen Zellen (AA102718).

Um zu überprüfen, ob die isolierten 5'RACE-PCR-Fragmente tatsächlich aus dem authentischen Fusionstranskript im Embryo stammen, wurde versucht, das GTIII-6-β-Geo

Fusionstranskript durch RT-PCR in Herzen der GTIII-6 heterozygoten Mäuse zu amplifizieren. Mit einem 5'sense Primer aus der identifizierten GTIII-6 Sequenz und zwei 3' antisense Primern aus dem integrierten Gene-trap Vektor wurden PCR Produkte der erwarteten Größe erhalten (Abb. 24).

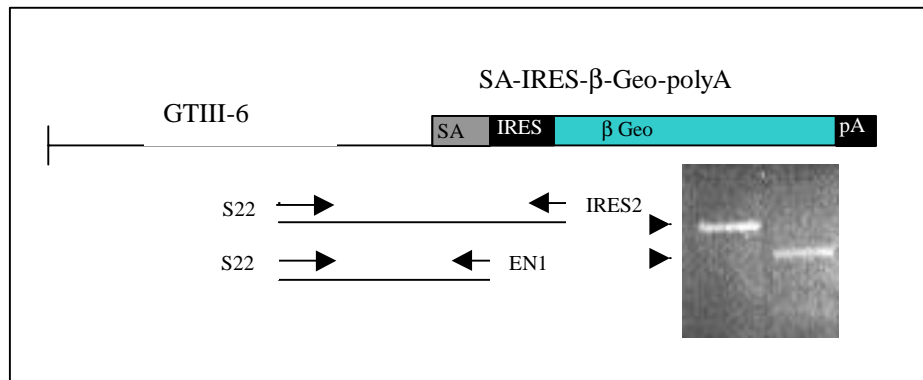


Abb.24: Nachweis des GTIII-6-b-Geo Fusionstranskripts durch RT-PCR..

3.2.2.3. Isolierung und Charakterisierung der gesamten GTIII-6 cDNA

Zur Isolierung der cDNA aus einer λ gt11 cDNA Bank aus E14.5 Mausembryonen wurde das 581 bp 5'RACE-PCR Produkt als Sonde verwendet. Zwei cDNA Klone, III6-1 und III6-2, von 1111 bp bzw. 1547 bp wurden erhalten und vollständig sequenziert. Die Klone waren in einer überlappenden Region identisch (ab Nukleotid +240 im Klon 1 und Nukleotid +392 im Klon 2) und stimmten mit der Nukleotidsequenz der RACE-Produkte überein, aber hatten unterschiedliche 5'Enden (Nukleotide +1 bis +240 im cDNA Klon 1 und Nukleotide +1 bis +392 im cDNA-Klon 2). Klon 1 enthielt ein putatives Startcodon in Position +98. Klon 2 enthielt ein putatives Startcodon in Position +392. Beide Klone schienen am 3'Ende unvollständig zu sein, da sie weder polyA+ noch die dazugehörige Signalsequenz enthielten. Ein weiterer Versuch, eine vollständige cDNA aus einer anderen E14.5 Mausembryonen Bank zu isolieren, war nicht erfolgreich. Es wurde deshalb versucht, das fehlende Ende der GTIII-6 cDNA durch 3'RACE-PCR aus embryonalem Gewebe zu ergänzen. Es wurden zwei PCR-Produkte erhalten, die am 5'Ende eine überlappende Sequenz mit den isolierten cDNA-Klonen aufwiesen, aber unterschiedliche 3'Enden besaßen. Das längere DNA-Fragment von 678 bp enthielt eine 3'UTR von 510 bp. Das kürzere 3'RACE-Fragment von 291 bp zeigte ein fast durchgehendes Leseraster. PolyA-Schwanz und Polyadenylierungssignal waren in beiden cDNA-Fragmente vorhanden.

Eine erneute BLASTN Suche nach Homologien in Datenbanksequenzen wurde mit allen Sequenzen der isolierten cDNA-Fragmente durchgeführt. Es wurde eine 460 bp EST-Sequenz aus E13.5 Maus Embryonen (AA170987) gefunden, die mit dem 678 bp 3'RACE-Fragment identisch war. Ebenfalls wurde eine Homologie zu einem humanen Gen (AF001435) festgestellt, das für ein 152 AS Protein unbekannter Funktion kodiert, das als "iota" bezeichnet wird (Guru et al., 1997). Das BLASTX Suchprogramm bestätigte in der abgeleiteten Aminosäuresequenz eine hohe Homologie zum bereits erwähnten "iota" Protein und zum *C. elegans* F55c5.7 Genprodukt (Z78198). Niedrigere Homologie wurde zu einer Familie von humanen Proteinen, die als "sorting nexins" bezeichnet werden (Haft et al., 1998), gefunden. Diese Homologie beschränkte sich auf eine Domäne von ca. 100 AS, die sog. PX (phox-Homologie)-Domäne, die in den "sorting nexins", in phox-Proteinen und PtdIns 3-Kinasen enthalten ist (Pointing, 1996). "Sorting nexin" Proteine sollen bei der Internalisierung von Membranrezeptoren eine Rolle spielen; phox-Proteine (z.B. p40 und p47) sind Untereinheiten des NADPH Oxidase Komplexes. Die Funktion der PX-Domäne in diesen Proteinen ist bislang nicht bekannt. Eine Analyse der GTIII-6 Aminosäuresequenz mit dem SMART Program (Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg) detektierte ebenfalls die PX-Domäne in der translatierten Sequenz mit einer Signifikanz von 0,00262. Das SMART Program detektierte zusätzlich 88 weitere Sequenzen in der EMBL Datenbank, die eine PX-Domänen enthalten. Unter diesen befanden sich das bereits erwähnte homologe menschliche "iota" Protein, die "Sorting nexins", die phox-Proteine und zahlreiche translatierte Leseraster von unbekanntem Genen und ESTs. Ein Sequenzhomologievergleich zwischen der möglichen PX-Domäne von GTIII-6 und anderen PX-Domänen zeigte, daß die am höchsten konservierten Aminosäuren der "sorting nexins" auch in GTIII-6 enthalten sind (Abb. 26).

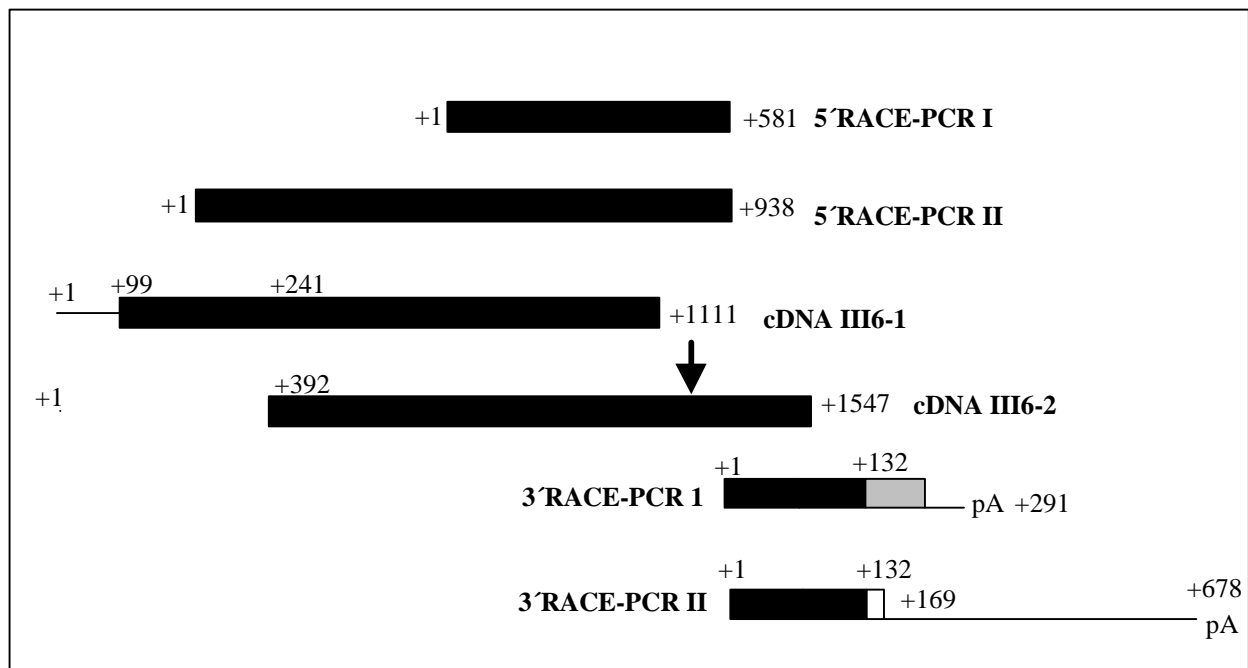


Abb. 25: Vergleich der Struktur der verschiedenen isolierten cDNA Fragmente des GTIII-6 Gens. Der Ursprung der Fragmente - 5' und 3'RACE-PCR oder cDNA Bank - wird angegeben. Kästen repräsentieren die kodierende Region, Linien die 5' bzw. 3' UTR. Der Pfeil zeigt die Insertionsstelle des Gene-trap Reportergens in Nt +1294 des cDNA Klons III6-2).

Die "iota" mRNA gehört zu einer Gruppe von 33 Transkripten, die von einer 600 kb-Region des Chromosoms 11q13 stammen (Guru et al., 1997). Diese Region wurde als Lokus für das MEN-1 (Multiple endocrine neoplasia type1) Syndrom kartiert. MEN-1 ist ein vererbtes Krebsyndrom, bei dem Individuen Parathyroid-, enteropancreatische Tumoren und Tumoren der Hirnanhangdrüse entwickeln (Farnebo et al., 1997).

Ein Sequenzvergleich der erhaltenen cDNAs zeigte eine zentrale Consensus Region mit unterschiedlichen 5' und 3' Enden (Abb. 25). Es ist deshalb denkbar, daß verschiedene GTIII-6 Spleißvarianten existieren.

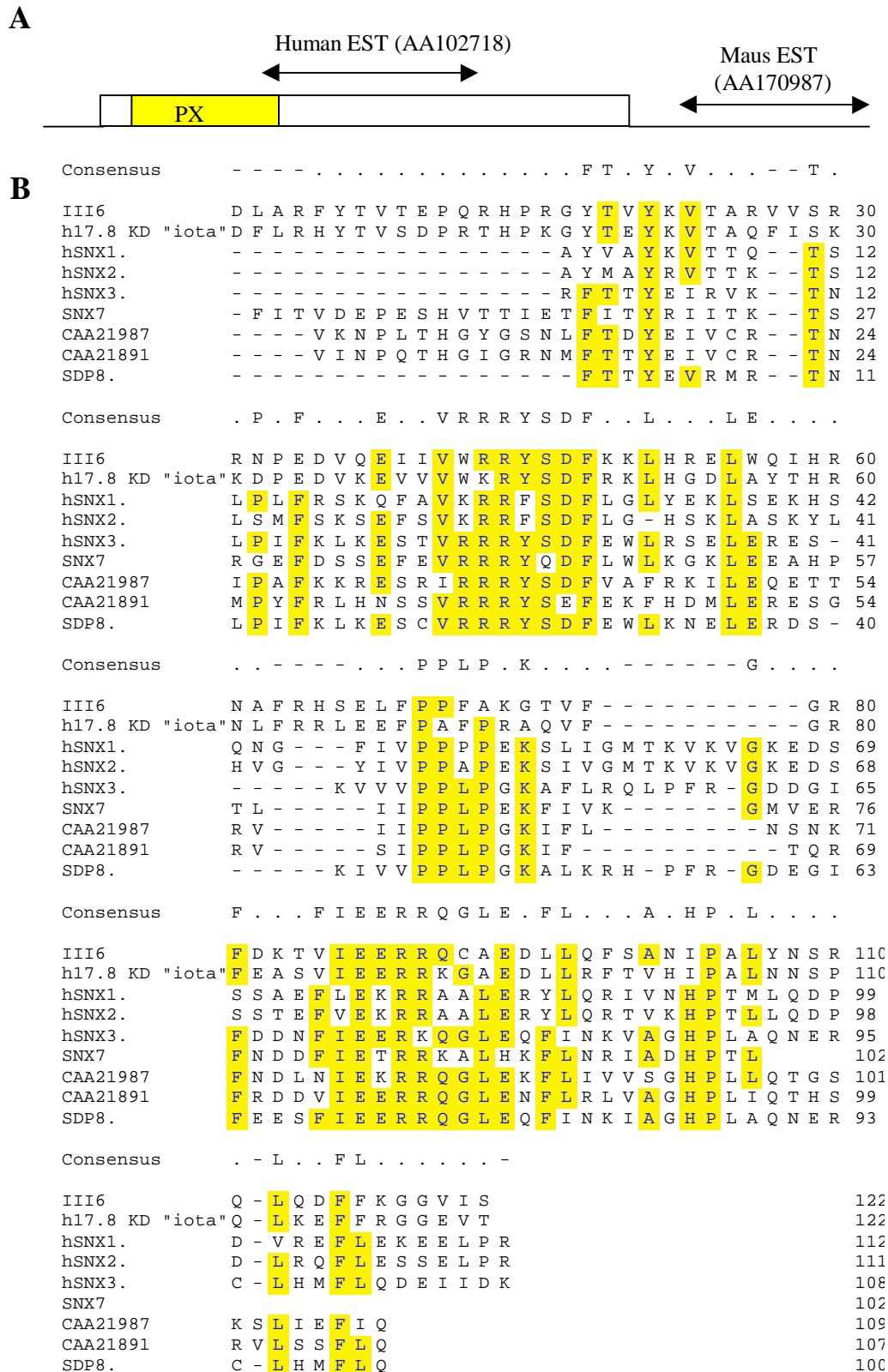


Abb. 26: Sequenzhomologievergleich des GTIII-6 Proteins zu anderen PX-Domäne Proteinen. A) Domänenstruktur des GTIII-6 Proteins und Zusammenfassung der Sequenzhomologien. B) Sequenzhomologievergleich (ClustalV Methode) der III-6 PX-Domäne mit den PX-Domänen vom humanen 17.8 kDa "iota" Protein (AF001435, AS 8-129), den humanen "sorting nexins" hSNX1 (AS 161-272), hSNX2 (AS 158-269), hSNX3 (AS 45-152) und SNX7 (AAD27830, AS 33-134); CAA21891 ("putative golgi membrane sorting protein", AS 29-135), CAA21987("PHOX Domain protein", AS 38-146), SDP8 ("Sorting domain protein 8", 070493, AS 47-146). Identische und konservierte Aminosäuren sind in gelben Kästen dargestellt.

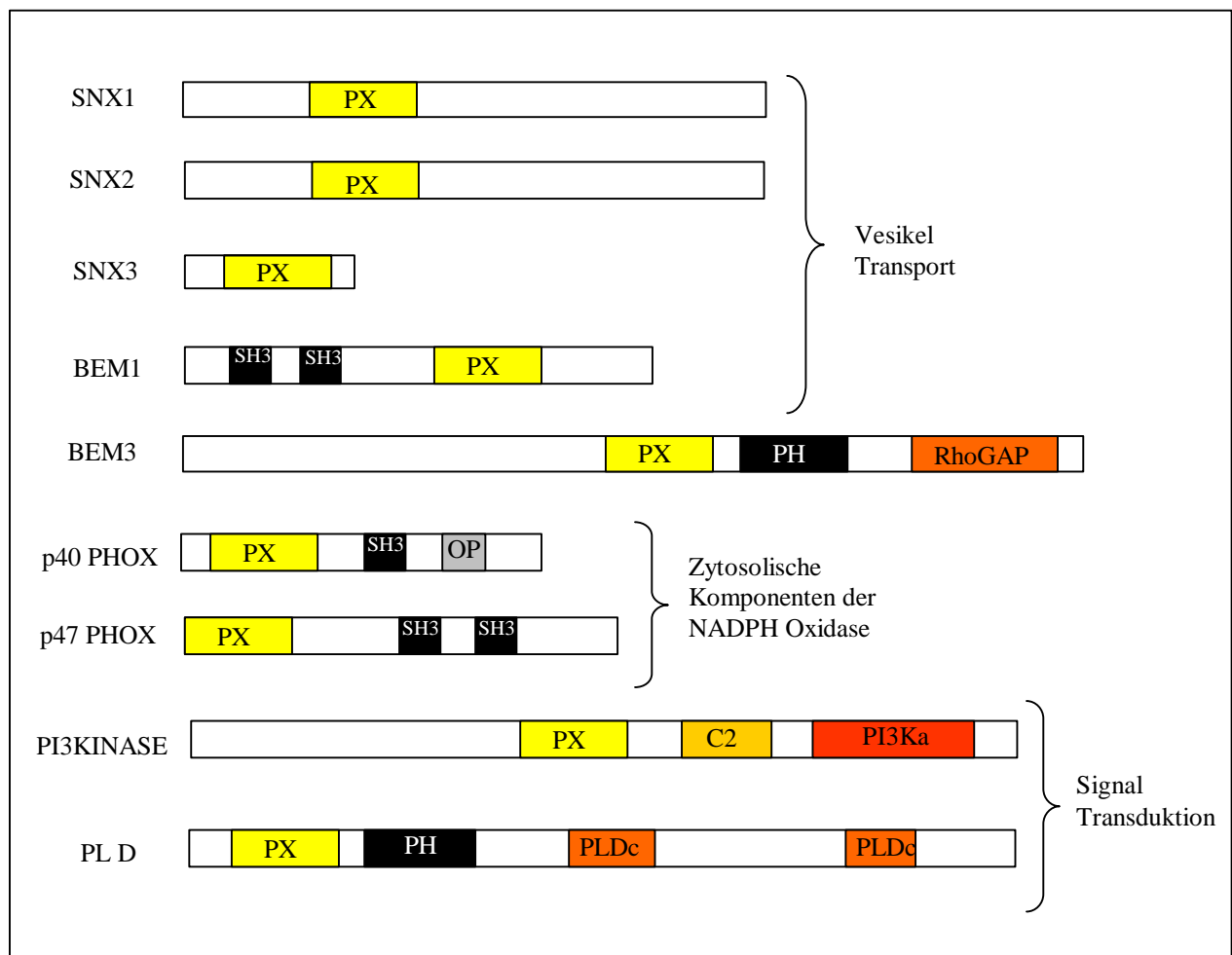


Abb. 27: Domänenstruktur von PX-Domäne Proteinen. PX: Phox-Homologie Domäne; SH3: Src-Homologie Domäne 3; PH: Pleckstrin-Homologie Domäne; PLDc: Phospholipase C.

3.2.2.4. Auswirkung der Gene-trap Insertion auf das GTIII-6 Genprodukt

Aus der Sequenzinformation der verschiedenen GTIII-6 cDNA-Isolate und den RACE-PCR-Fragmenten ergibt sich eine mRNA-Sequenz von 1972 Nukleotiden, die ein offenes Leseraster von 462 AS enthält. Die Insertionsstelle des Gene-trap Reportergens liegt in diesem Transkript gemäß den 5'RACE-PCR Daten nach dem Nukleotid +1139 und erlaubt somit die unveränderte Translation von 347 AS des GTIII-6 Proteins im Fusionstranskript. Somit befindet sich jedenfalls die PX-Domäne vor der Integrationstelle des GT-Vektors. Es ist durchaus denkbar, daß das GTIII-6 Genprodukt zumindest noch teilweise funktionell ist (Abb. 28).

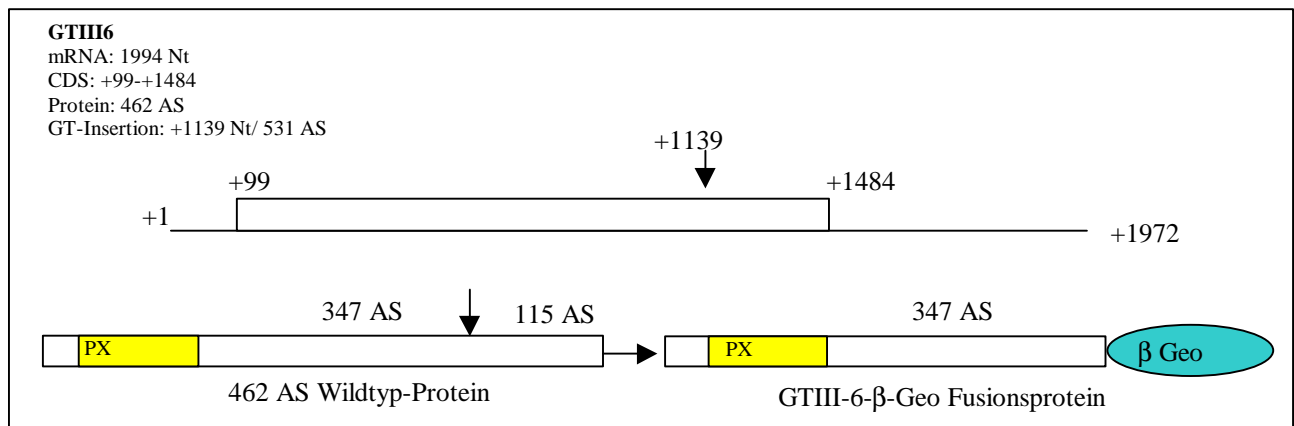


Abb. 28: Auswirkung der Gene-trap Insertion auf das GTIII-6 Genprodukt. Die Fusionstelle des β -Geo Reporters wird durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.2.2.5. GTIII-6 Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp

Zur Untersuchung eines möglichen Phänotyps, der mit der Integration des GT-Vektors in der GTIII-6 Linie einhergehen könnte, wurden hetero- und homozygote Mäuse hergestellt. Der Genotyp wurde über die Signalstärke des integrierten Neo-Alleles im Vergleich zum unabhängigen Gen Myf-5 bestimmt (Abb. 29).

Heterozygote GTIII-6 Mäuse zeigten keinen Phänotyp. Der Anteil homozygoter Nachkommen nach der Verpaarung heterozygoter Eltern war ungefähr das statistisch zu erwartende Viertel (Abb. 29). Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß Mäuse mit der Gene-trap Insertion im GTIII-6-Lokus keine Entwicklungsdefizite aufweisen und auch nach ihrer Geburt normal lebensfähig waren. Homozygote Mäuse unterscheiden sich in einer ersten morphologischen Analyse in keiner Weise von ihren heterozygoten Geschwistern und vom Wildtyp. Es waren weder Unterschiede in der Größe der Tiere, noch Mißbildungen erkennbar. Das Wohlbefinden der Tiere schien auch nicht beeinflußt zu sein. Es wurden keine verkürzte Lebensdauer und keine ungewöhnliche "Verhaltensweise" beobachtet. Die wichtigsten Organe und Gewebe der homozygoten adulten Mäuse wurden präpariert, ohne daß irgendwelche Auffälligkeiten zu sehen waren. Verpaarungen homozygoter GTIII-6 Mutanten führten zu Wurfgrößen zwischen 8 und 10, was ebenfalls nicht ungewöhnlich ist.

Das Fehlen eines offensichtlichen Phänotyps könnte entweder dadurch erklärt werden, daß das getroffene Gen nicht essentiell ist oder, daß die Integration nicht zu einer wirkungsvollen Veränderung des Gentranskripts führt. Um dies zu untersuchen, wurden Transkripte mit diagnostischen Primern aus homozygoten und heterozygoten GTIII-6 Embryonen durch RT-PCR analysiert (Abb. 30). In Wildtyp-Embryonen wurde das normale GTIII-6 Transkript

nachgewiesen, während in heterozygoten Embryonen zusätzlich zum Wildtyp- auch das GTIII-6- β -Geo Fusionstranskript nachgewiesen wurde. In homozygoten GTIII-6 Embryonen wurde vor allem das Gene-trap Fusionstranskript amplifiziert, jedoch konnten in einigen Fällen auch geringe Mengen des Wildtyp Transkripts detektiert werden (nicht gezeigt).

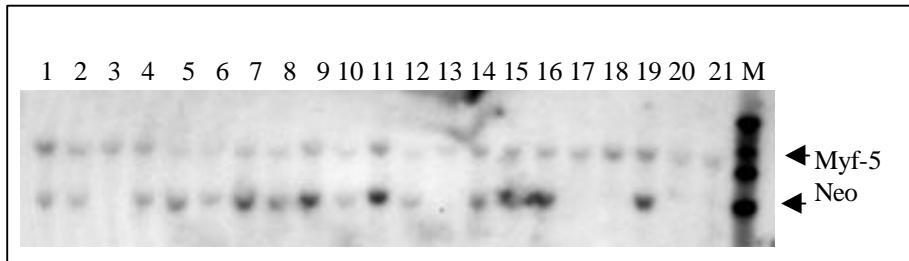


Abb. 29: Genotypisierung der GTIII-6 Mäuse. Genomische DNA aus Mausschwänzen von zwei Würfen von heterozygoten Eltern wurden mit *KpnI* verdaut und mit einer Myf-5 Sonde als Kontrolle und einer Neo Sonde aus dem Gene-trap Vektor hybridisiert. Mögliche homozygote Tiere (Spuren 5, 7, 9, 11, 16, 19) wurden durch Auskreuzung überprüft. Dies zeigte, daß die Anzahl an homozygoten Mäusen das statistisch zu erwartende Viertel war. M: Marker: I DNA verdaut mit *Hind III*.

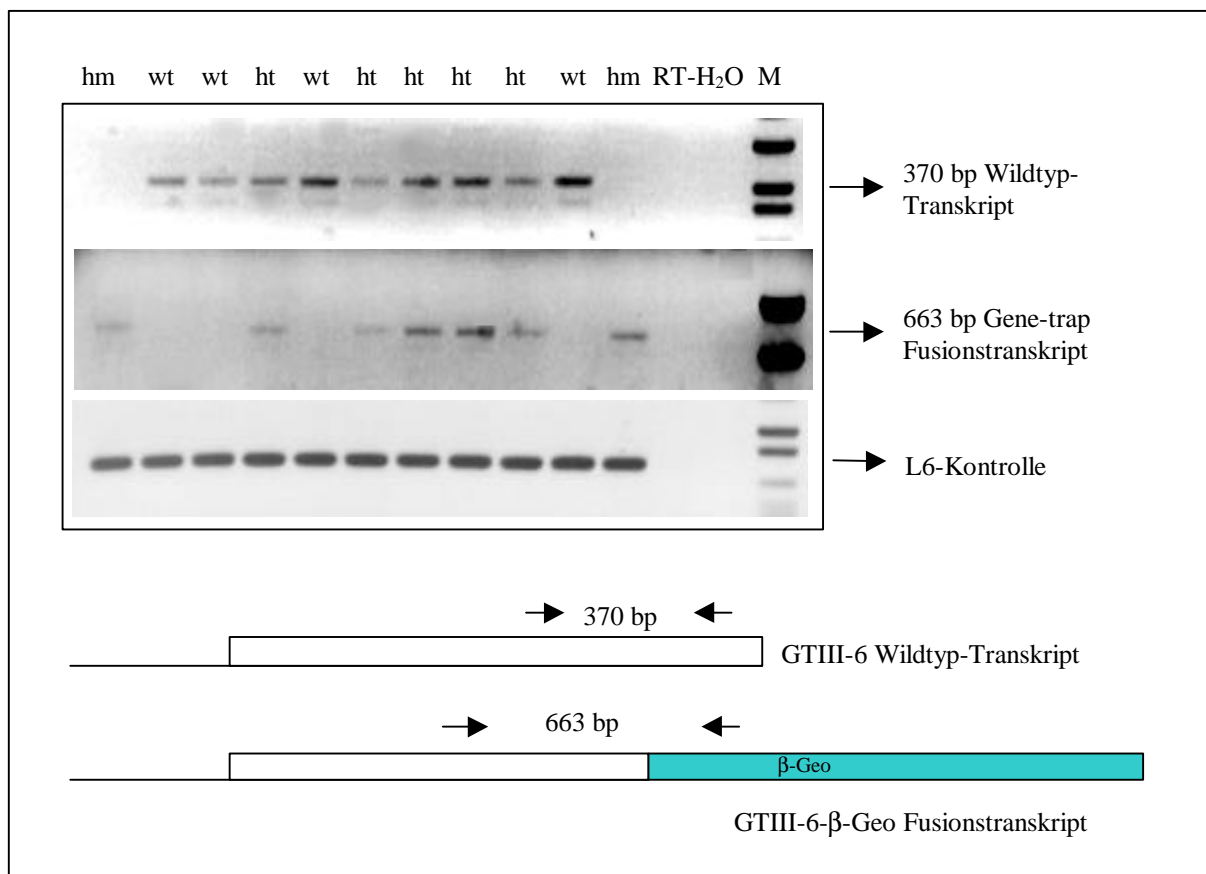


Abb. 30: Nachweis der Wildtyp- und Fusionstranskripte in E 10.5 GTIII-6 heterozygoten, homozygoten und Wildtyp-Embryonen durch RT-PCR. In Wildtyp-Embryonen wurde nur das Wildtyp-Transkript amplifiziert. In heterozygoten Embryonen wurden beide Transkripte nachgewiesen und in homozygoten Embryonen wurde hauptsächlich das GTIII-6 β -Geo Fusionstranskript nachgewiesen. In manchen Fällen wurde das Wildtyp Transkript in kleinen Mengen detektiert. RT-: PCR Ansatz mit RNA; H₂O: PCR Ansatz ohne cDNA; M. Marker: pUC18 verdaut mit *Sau3AI*.

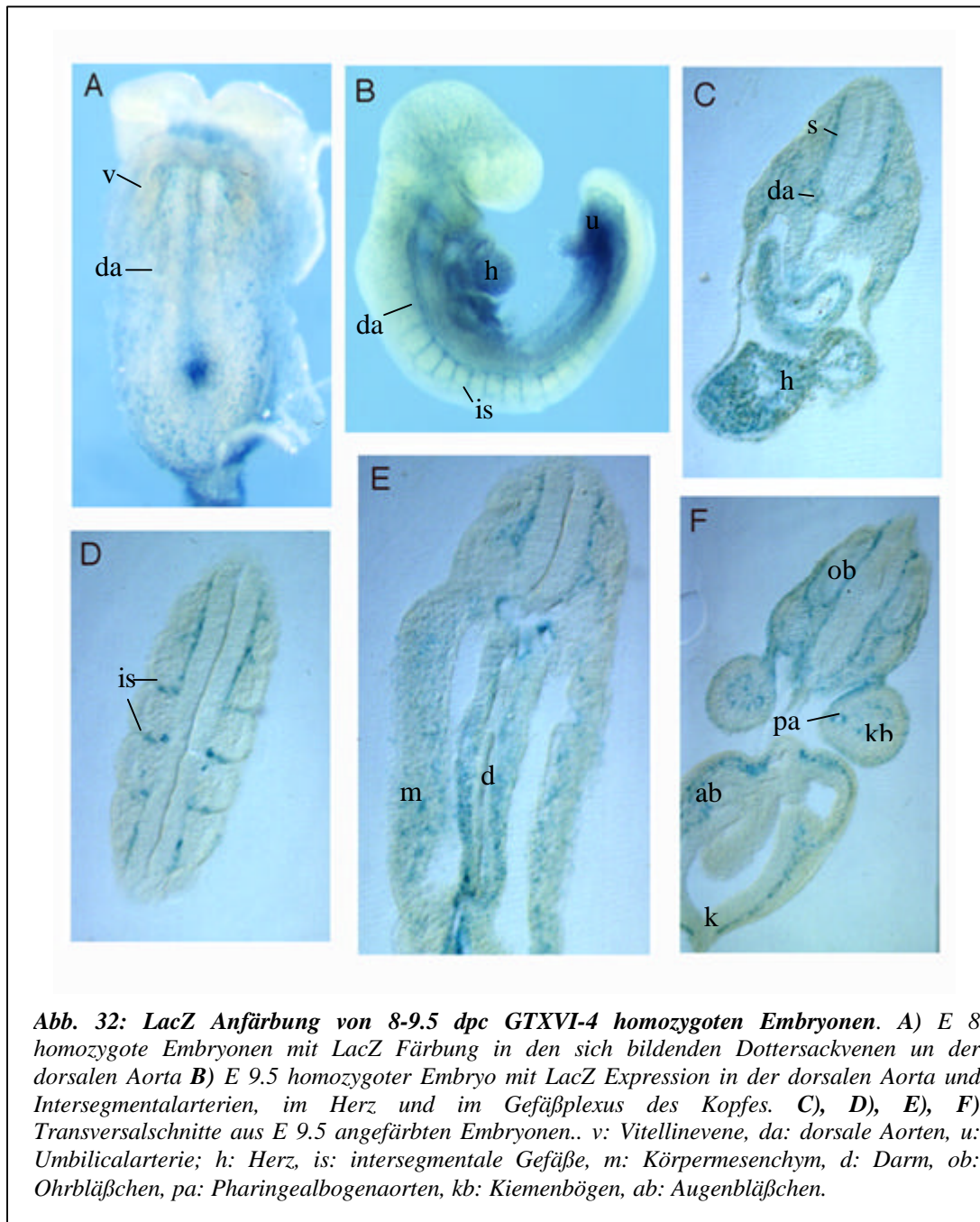
3.2.3. Die ES Zelllinie GTXVI-44 und davon abgeleitete Mäuse

3.2.3.1. Expressionsmuster des getroffenen Gens *in vivo* anhand der LacZ-Reportergenaktivität

In der Arbeitsgruppe von Prof. Gruss wurde eine Mauslinie aus GTXVI-44 ES-Zellen etabliert, die mir zur Verfügung gestellt wurde. Das embryonale Aktivitätsmuster des LacZ Reportergens in der Mauslinie GTXVI-44 wurde zunächst in heterozygoten und homozygoten Embryonen zwischen E 7.5 und E 12.5 bestimmt.

In E 8-8.5 Embryonen wurde LacZ Aktivität im Haftstiel und im extraembryonalen Mesoderm des Dottersacks gefunden, wo die Entwicklung extraembryonaler Blutgefäße und Blutzellen beginnt. Hier aggregieren Zellen (Haemangioblasten) zu Blutinseln, in denen die äußeren Zellen zum Endothel, und die inneren Zellen zu Blutzellen differenzieren. Auch in den ersten embryonalen Gefäßen wurde LacZ Aktivität detektiert (Abb. 31 A, B), z.B. in der dorsalen Aorta, die sich paramedian neben der Chorda dorsalis bildet, in der Anlage der Umbilicalarterie und in der Vitellinvene (Dottersackvene), die sich caudal-lateral zum Herzen bildet und das embryonale Herz mit dem Gefäßplexus im Dottersack verbindet und den Embryo mit Blutzellen versorgt.

In E 9-9.5 Embryonen (Abb. 31 B) wurde die LacZ Anfärbung in der dorsalen Aorta und in den Gefäßen der Nabelschnur stärker. LacZ Expression wurde auch im Herzen (31C), im Kapillarplexus des Kopfs, in den Ohr- und Augenbläschen und in den Kiemenbögen und -taschen in den Pharyngealbogenarterien gefunden (31F). Auch die Intersegmentalarterien, die aus der dorsalen Aorta entstehen, nach dorsal abzweigen und in die intersomitischen Spalten laufen, waren LacZ positiv (31D). LacZ positive Zellen wurden auch im Mesoderm des Mitteldarms und der Körperwand detektiert (31E), wo die dort eingewanderten Angioblasten Gefäße bilden.



In E 11.5 Embryonen (Abb.32 A) war die LacZ Anfärbung in allen Gefäßen, die aus den dorsalen Aortenästen entstehen und das Rückenmark (33 D, E, F), die Wirbelsäule und die Rückenmuskulatur (33H) versorgen stärker und weiter verbreitert. Ebenso LacZ positiv waren die arteriellen Zuflüsse zu den Extremitäten, die sich ebenfalls aus den dorsalen Aortenästen entwickeln sowie der Gefäßplexus in den Extremitäten (33J). Die Gefäße im Kopf- und Gesichtsmesenchym waren ebenfalls angefärbt, z.B. in den Nasenfortsätzen und der Retina des Auges (33A). Die Somiten (33G), aus denen Angioblasten differenzieren, zeigten eine

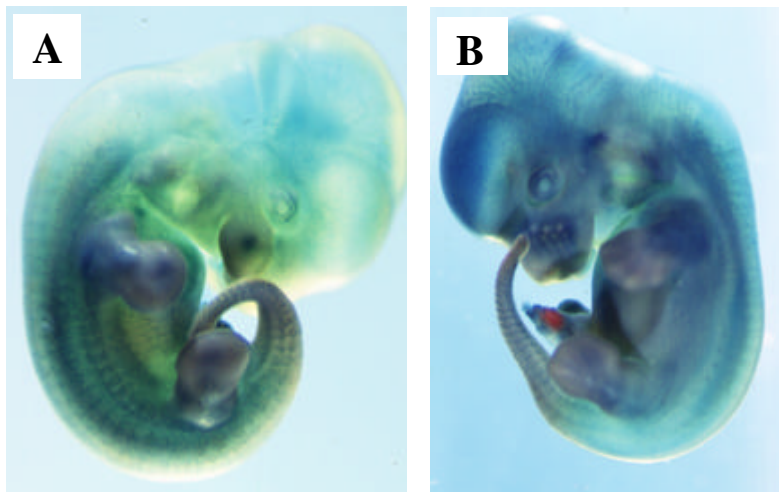


Abb. 32: LacZ Anfärbung in GTXVI-44 homozygoten Embryonen A) E 11.5, B) E 12.5: Die Anfärbung in diesen Stadien ist bereits sehr weit verbreitet. Auf dem ubiquitären Hintergrund sind trotzdem einige stark angefärbte Strukturen erkennbar, wie z.B. die dorsalen intersegmentalen Arterien, die ektodermale Randleiste und die interdigitalen Zonen in den Extremitäten.

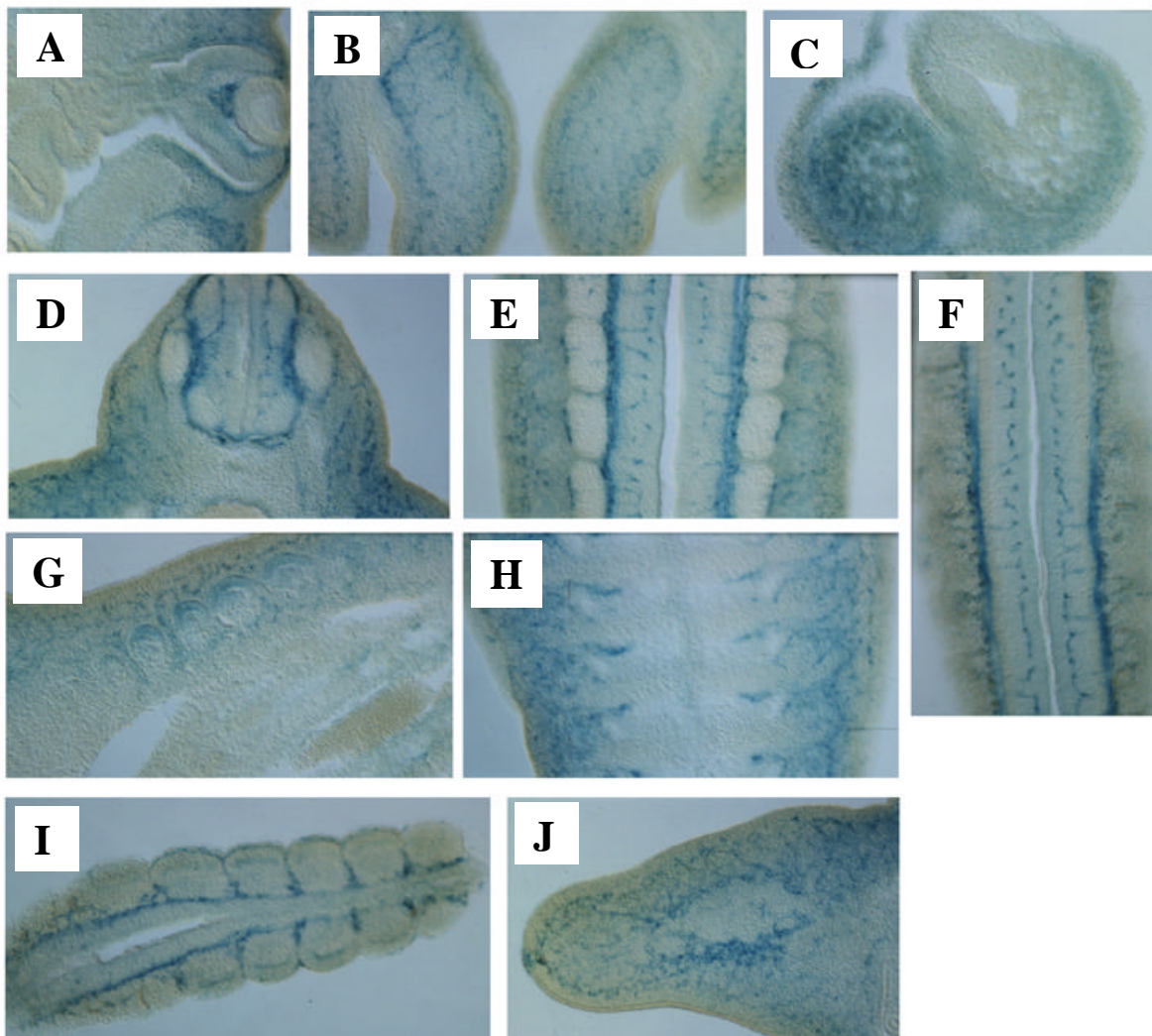


Abb. 33: Transversale Schnitte aus LacZ angefärbten E 11.5 GTXVI-44 homozygoten Embryonen. A) LacZ Anfärbung in den Linsenfasern und in der Retina. B) in den medialen und lateralen Nasenfortsätzen, C) im Herz D) E) F) H) I) in den Arterien, die aus den dorsalen Aortenästen entstanden sind und das Rückenmark, die Wirbelsäule und die Rückenmuskulatur versorgen G) in Somitenzellen und J) in den Extremitäten und in der ektodermalen Randleiste.

schwache LacZ Färbung. In den Extremitäten wurde eine schwache Expression auch in der ektodermalen Randleiste (*apical ectodermal ridge*, AER) beobachtet (33J). In E 12.5 Embryonen (Abb. 32B) erschien die LacZ Expression weitgehend ubiquitär.

Zusammenfassend zeigten die LacZ-Expressionsdaten Aktivität des GTXVI-44 Gens zwischen den embryonalen Tagen 8 und 11.5 vor allem in embryonalen Blutgefäßen, sowohl in denen, die *de novo* aus dem Mesoderm entstehen (Vaskulogenese), als auch in denen, die sich durch Sprossung aus bereits bestehenden Blutgefäßen entwickeln (Angiogenese).

3.2.3.2. Identifizierung des GTXVI-44 Gens durch 5'RACE-PCR

Zur Identifizierung des Gens, das durch die Gene-trap Insertion in der Mauslinie GTXVI-44 getroffen ist, wurde das Gene-trap Fusionstranskript durch 5'RACE-PCR kloniert. Als Ausgangsmaterial diente gesamte RNA aus Herzen von heterozygoten GTXVI-44 Embryonen, da dort das LacZ hoch exprimiert erschien. In der 5'RACE-PCR wurden mehrere DNA Fragmente amplifiziert, von denen das längste (ca.750 bp) kloniert und sequenziert wurde. Die Sequenz des 5'RACE-PCR Produkts zeigte, daß korrektes Spleißen eines endogenen Spleißdonors zum Spleißakzeptor des β -Geo Reportergens stattgefunden hatte. Die Homologiesuche nach Genen in der Datenbank zeigte, daß die isolierte Sequenz zu 100 % identisch mit der 4,0 kb mRNA (Nukleotide +991 bis +1582) des NF κ B1 (*Nuclear factor kappa B*) Gens war. Dieses Transkript kodiert für die NF κ B/p50 Untereinheit und für das p105 Inhibitor-Protein (Liou et al., 1992). Das klonierte 3'Ende des 5'RACE-Produkts war auch mit der 2,6 kb mRNA (Nukleotide +150 bis +385) identisch, die ebenfalls aus dem NF κ B1 Gen hervorgeht und für den p70 I κ B γ Inhibitor kodiert (Inoue et al., 1992) (Abb. 34). Die 2,6 kb mRNA ist, bis auf 150 Nukleotide am 5'Ende, identisch mit der 3'Hälfte der 4,0 kb mRNA; dementsprechend ist das I κ B γ Produkt identisch mit dem Carboxylterminus von p105. Während die 4.0 kb mRNA ubiquitär exprimiert wird, wird die 2,6 kb mRNA nur in geringen Mengen in bestimmten lymphoiden Zelllinien transkribiert. Die Transkription der beiden Produkte wird vermutlich durch zwei unterschiedliche Promotoren reguliert (Inoue et al., 1992). Ein Vergleich der Struktur beider mRNAs ist in der Abb.34 dargestellt.

NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von Genen reguliert, die an der Immunantwort und an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Überblick: Siebenlist et al., 1994). Die aktive Form von NF κ B ist ein Heterodimer, das meist aus einer p50 und p65 Untereinheit besteht. Im Cytosol liegt NF κ B in Form eines inaktiven Komplexes mit dem Inhibitorprotein

I κ B vor. I κ B maskiert das nukleäre Translokationssignal des Heterodimers und verhindert auf diese Weise dessen Transport in den Kern. Vom p105 Protein wird angenommen, daß es p50 Monomere bindet und inhibiert (Liou und Baltimore, 1993; Miyamoto und Verma, 1995).

Aus dem Sequenzhomologievergleich kann geschlossen werden, daß die Gene-trap Insertion GTXVI-44 das NF κ B1 Gen in der Region, die für p105 und p70 (I κ B γ) kodiert, getroffen hat.

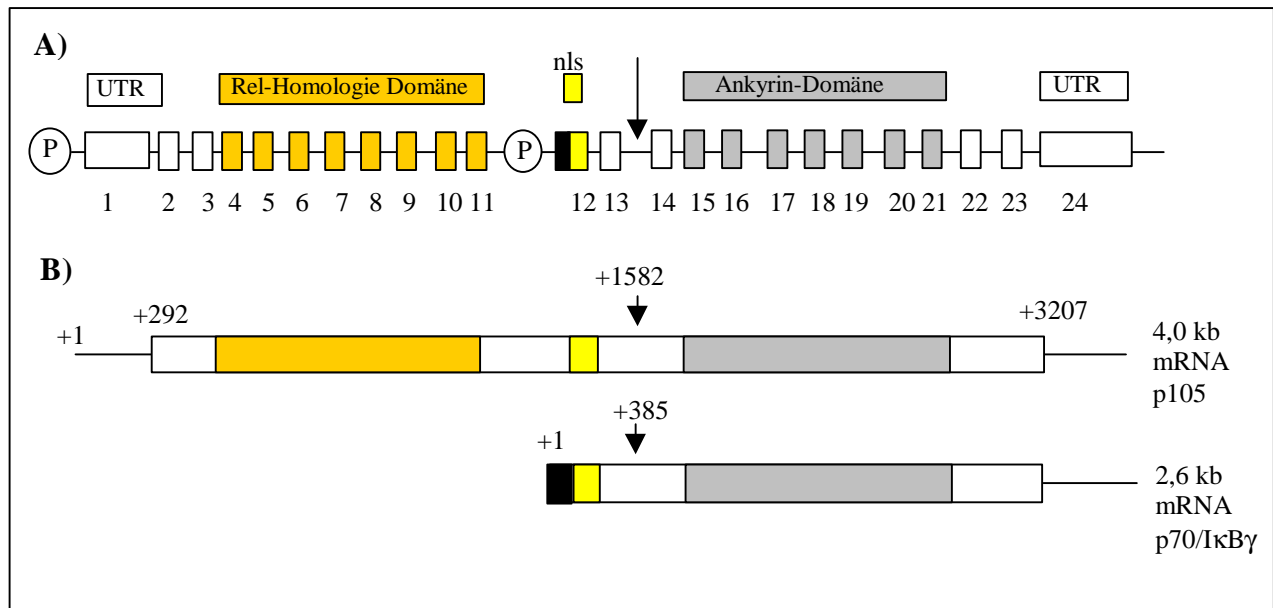


Abb. 34: Das NF κ B1 Gen und die davon abgeleiteten 4,0 kb/p105 und 2,6 kb/I κ B γ Transkripte. A) Das NF κ B1 Gen: Exone sind in Kästen, Introns in Linien dargestellt. Der p50/ p105 Promotor wurde am 5' Ende plaziert. Der I κ B γ Promotor wurde im Intron 11 gezeichnet, da die 3' Sequenzen des Introns 11 (schwarzer Kasten) mit dem 5' Ende des 2,6 kb Transkripts identisch sind. Die Integration des Gene-trap Vektors in der Linie GTXVI-44 ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. B) Die 4,0 kb/p105 und 2,6 kb/I κ B γ Transkripte: Die kodierende Region wird mit einem Kasten, die UTR mit einer Linie dargestellt. Die Nukleotidnummerierung in der 4,0 kb mRNA und in der 2,6 kb mRNA entspricht der von Inoue et al. (1992). Der schwarze Kasten stellt die Sequenz im 2,6 kb mRNA dar, die im p105 Transkript nicht vorhanden ist. Die Spleißdonorstelle (Exon 13), die mit dem **b**-Geo Reportergen im GTXVI-44 Fusionstranskript gespleißt wird, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Diese entspricht Nukleotid +1582 im p105 bzw. +385 im I κ B γ Transkript.

Im folgenden sollte deshalb geklärt werden, ob die GT-Vektor-Insertion Fusionstranskripte für beide mRNA Species aus dem Genlokus generiert. Hierzu wurde RNA aus heterozygoten und homozygoten Mäusen der Linie GTXVI-44 isoliert und über RT-PCR analysiert. Genspezifische Primer und GT-Vektor spezifische Primer wurden verwendet, um die 4.0 kb und 2.6 kb Transkripte des Wildtyps sowie die entsprechenden Gene-trap Fusionstranskripte zu detektieren. Die RNA wurde aus Herz, Thymus und Milz erwachsener Mäuse isoliert.

Mit Primern, die für p105 spezifisch sind und die GT Insertionstelle flankieren (Primer b und f in der Abb. 36 B), konnte das normale Transkript im Wildtyp und in heterozygoten Mäusen,

aber nicht in homozygoten Mäusen amplifiziert werden. Mit einem spezifischen 5' Primer aus der p105 Sequenz (Primer b) und einem antisense Primer aus dem Gene-trap Vektor (Primer En1) konnte das p105- β -Geo Fusionstranskript in heterozygoten und homozygoten Mäusen, nicht aber in Mäusen des Wildtyps amplifiziert werden (Abb.35). Ein ähnliches Experiment mit $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ Primern, die die Insertionstelle flankierten, ergab das normale $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ Transkript im Wildtyp und in heterozygoten Mäusen, aber nicht in homozygoten Mäusen, während das $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ - β -Geo Fusionstranskript nur in heterozygoten und homozygoten Mäusen erhalten wurde (Abb. 36). Diese Resultate zeigen, daß die Gene-trap Insertion in GTXVI-44 Mäusen sowohl die Synthese des 2.6 kb $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ Transkripts, als auch die des 4.0 kb p105/NF κ B Transkripts in homozygoten Mäusen verhindert, da das β -Geo Reportergen im NF κ B1 Locus mit dem Spleißdonor +1582 der p105 mRNA und dem Spleißdonor +385 der $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ mRNA gespleißt wird. Die strukturellen Konsequenzen der Gene-trap Insertion auf die NF κ B1 Genprodukte p50, p105 und $\text{I}\kappa\text{B}\gamma$ sollen in folgenden betrachtet werden.

Das p105 Inhibitor-Protein aus Wildtyp-Mäusen enthält zwei funktionelle Domänen: N-terminal befindet sich die Rel-Homologie Domäne (RHD) mit der DNA-Bindungsdomäne, der Dimerisierungsdomäne und dem nukleären Translokationssignal, die allen Rel/NF κ B Familienmitgliedern gemeinsam ist. Der C-Terminus enthält eine Ankyrin-Domäne, die, in der Familie der $\text{I}\kappa\text{B}$ Inhibitoren vorhanden ist und wahrscheinlich die nls Sequenz des NF κ Bs maskieren kann.

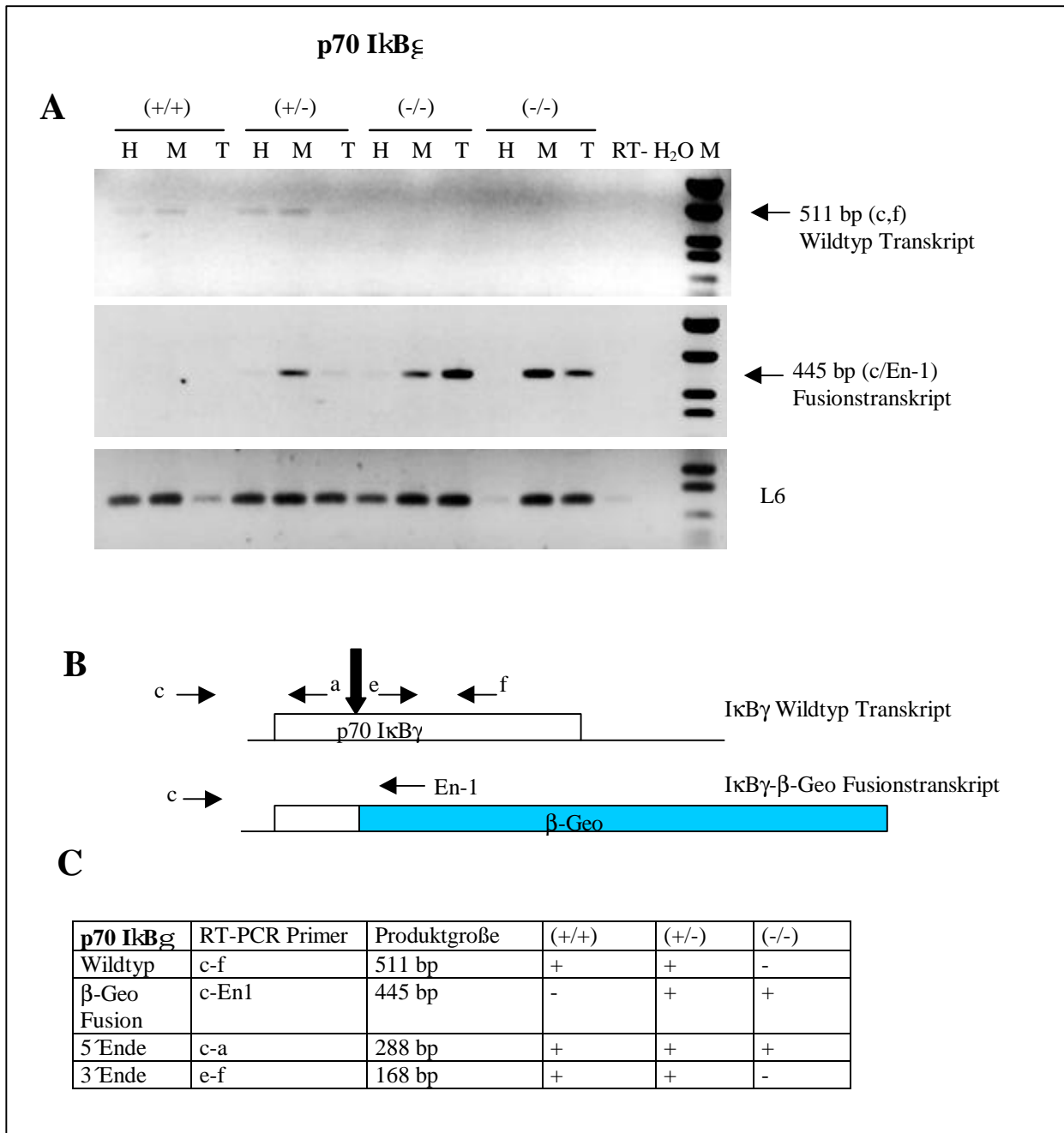


Abb. 36: Analyse der Expression von I κ B ξ in der GTXVI-44 Mauslinie. **A)** RT-PCR zum Nachweis der p70/I κ B ξ Wildtyp und p70/I κ B ξ -Geo Transkripte in Herz (H), Thymus (T) und Milz (M) von adulten Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen der GTXVI-44 Linie. RT: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase; H₂O: Kontrolle ohne cDNA. M: Marker. PUC18 verdaut mit Sau3AI. **B)** Struktur der p70/I κ B ξ Wildtyp und p70/I κ B ξ -Geo Fusionstranskripte und Lokalisation der Insertion bzw. β -Geo Fusion (Pfeil) und der verwendeten PCR Primer. **C)** Zusammenfassung der Ergebnisse mit den verschiedenen Primerpaaren.

Eine Glycin-reiche Region zwischen der Rel-Homologie- und der Ankyrin-Domäne gilt als Spaltstelle des p105 Proteins für proteolytische Prozessierung. Es wurde bisher angenommen, daß p105 in die p50 NF κ B Untereinheit gespalten wird, die ausschließlich die Rel-Homologie-Domäne enthält. Somit wäre p105 das Vorläufer-Protein für p50. Erst kürzlich wurde entdeckt, daß beide Proteine, p50 und p105, aus dem 4,0 kb langen Transkript co-

translationell synthetisiert werden (Lin et al., 1998). Das I κ B γ Protein wird unabhängig von p105 aus dem 2.6 kb Transkript translatiert und enthält ausschließlich die Ankyrin-Domäne.

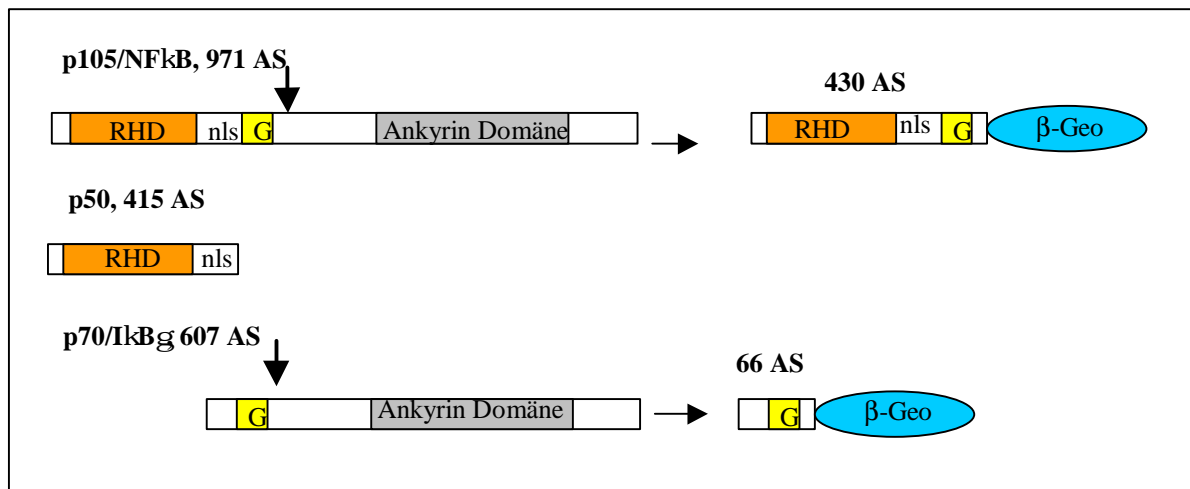


Abb. 37: Domänenstruktur der Wildtyp p105, p50 und I κ B γ Proteine und der durch die GT-Insertion getroffenen Genprodukte. Die letzteren wurden als Fusionsproteine mit dem β -Geo Reporter dargestellt. Die Insertion ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. RHD: Rel-Homologie Domäne: enthält die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne. Nls: nucleäre Lokalisationssignal; G: Glycin-reich : Spaltungstelle des Vorläufer-Proteins.

Die Integration des β -Geo Reportergens ergibt gemäß der RT-PCR Analyse Fusionstranskripte, die die normalen p105 und I κ B γ mRNAs in Position +1582 bzw. +385 unterbrechen. Die daraus resultierenden Proteine bestehen im Falle von p105 aus 430 AS und im Falle von I κ B γ aus 66 AS des N-Terminus. In beiden Produkten ist die Ankyrin-Domäne nicht vorhanden, während die Rel-Homologie-Domäne, die sich vor der Insertionstelle befindet, intakt bleibt (Abb.37).

3.2.3.3. Homozygote GTXVI-44 Mäuse zeigen einen Phänotyp

Zwei heterozygote Männchen der Linie GTXVI-44 stellten den Ausgangspunkt zur Zucht homozygoter GTXVI-44 Mäuse dar. Der Genotyp wurde zunächst über die Signalstärke des integrierten Neo-Allels im Vergleich zum unabhängigen Gen Myf-5 bestimmt. Nach Klonierung des GTXVI-44 Fusionstranskripts und Identifizierung des getroffenen Gens, konnte die Gene-trap Integrationstelle dem NF κ B1 Intron 13 zugeordnet werden. Die in der Literatur vorhandenen Informationen zum Locus NF κ B1 (Héron et al., 1995; Ishikawa et al, 1996) erlaubten dann eine genauere Bestimmung des Genotyps über Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) (Abb. 38A und B).

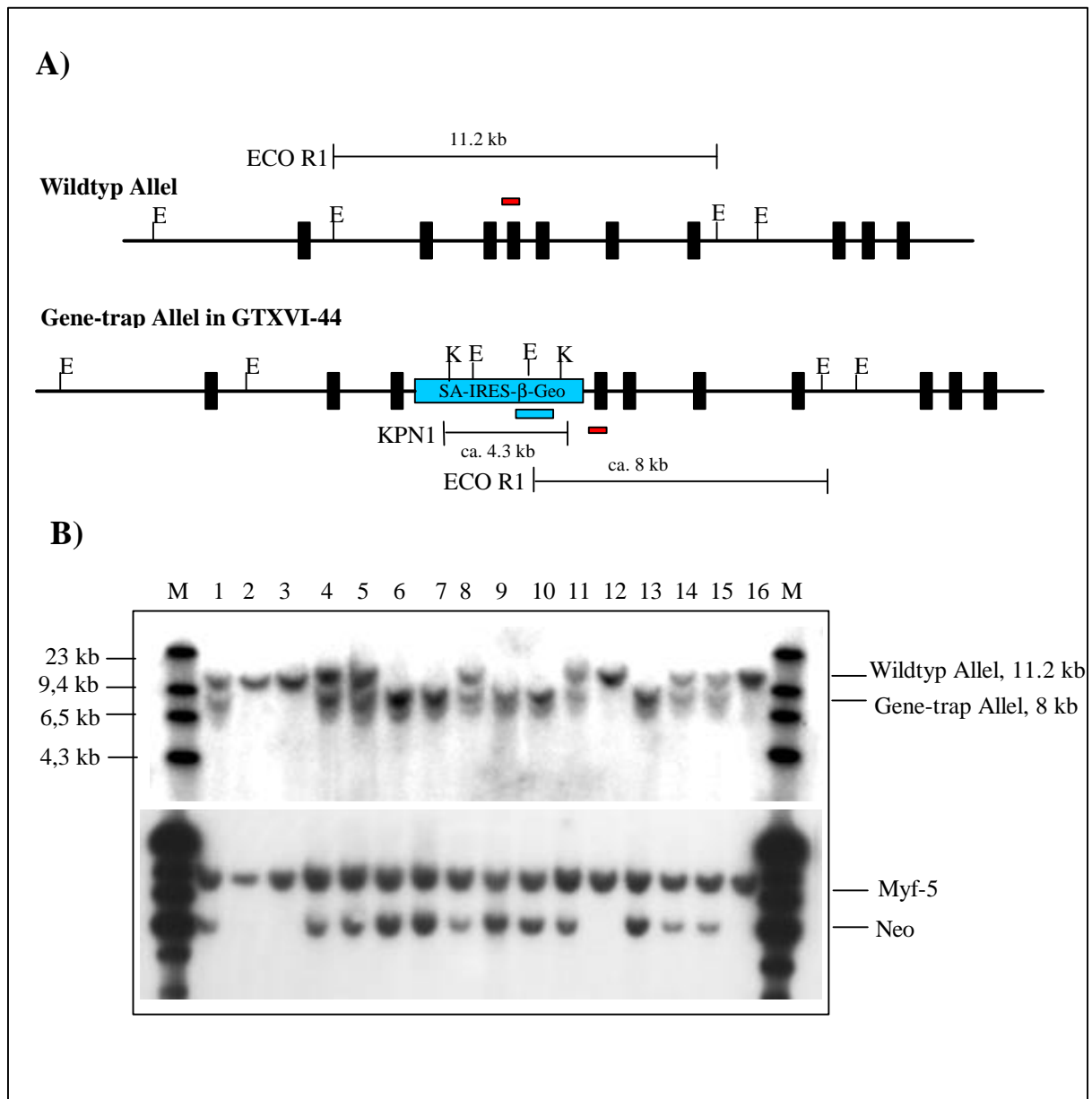


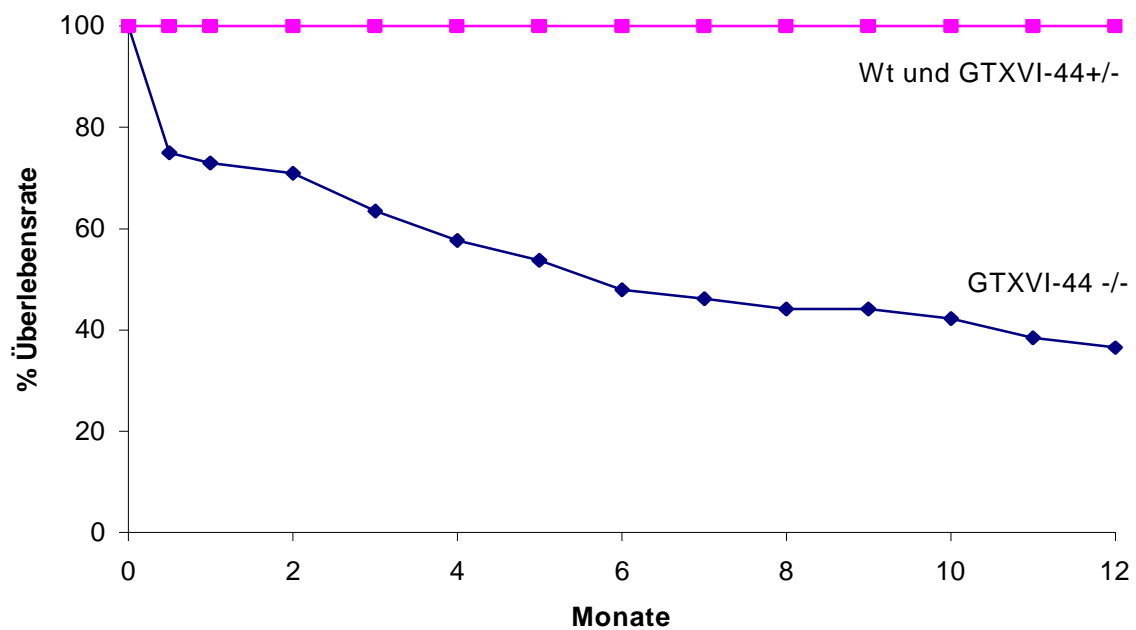
Abb. 38: Genotypisierung der GTXVI-44 Mäuse. **A)** Partielle Restriktionskarte des *NFκB1* Locus gemäß Ishikawa et al.(1998). Die Wildtyp und Gene-trap Allele sind dargestellt. Für das Genotypisieren wurde die genomische DNA mit *EcoRI* verdaut und mit einer externen Probe (RT-PCR Fragment aus Exon unmittelbar nach der Integrationsstelle des GT-Vektors, in rot dargestellt) hybridisiert. Alternativ wurde mit *KpnI* verdaut und mit einer Probe aus dem Gene-trap Vektor (Neo Probe, in blau dargestellt) hybridisiert. **B)** Ergebnisse der Southern blot Hybridisierung. **Oben:** *EcoRI* Verdau und Hybridisierung mit externer Probe. **Unten:** *KpnI* Verdau und Hybridisierung mit Neo Probe und mit *Myf-5* Probe als interner Standard. Wildtyp Mäuse (2, 3, 12, 16) zeigen nur das Wildtyp Allel und hybridisieren nicht mit Neo; heterozygote Mäuse (1, 4, 5, 8, 11, 14, 15) zeigen beide Allele und hybridisieren mit Neo in einem 1:2 Verhältnis zu *Myf-5*; homozygote Mäuse (6, 7, 9, 10, 13) zeigen nur das Gene-trap Allel und hybridisieren mit Neo in einem 2:2 Verhältnis zu *Myf-5*. Das Verhältnis (+/+): (+/-): (-/-) ist das statistisch zu erwartende 1:2:1. M: Marker 1-DNA mit *HindIII* geschnitten.

Heterozygote GTXVI-44 Mäuse erschienen wie der Wildtyp. Bei den ersten Verpaarungen heterozygoter Eltern wurden zwei F1 Wurfgrößen von 9 und 7 erhalten, bei denen der Anteil der homozygoten Mäuse das statistisch zu erwartende Viertel war (Abb. 38). Homozygote Nachkommen unterschieden sich zunächst in keiner Weise von ihren heterozygoten und Wildtyp Geschwistern. Nach der Zucht und Analyse größerer Zahlen an Mäusen wurde beobachtet, daß die Sterblichkeitsrate der Homozygoten im Vergleich zu ihren Wildtyp und heterozygoten Geschwistern erhöht war. Bis zu 20% der neugeborenen homozygoten Mäuse starben innerhalb der ersten Woche. Am Ende des sechsten Lebensmonats lebten nur 48% der Homozygoten (n= 52), im Gegensatz zu ihren Wildtyp und heterozygoten Geschwistern (n=59), die eine Überlebensrate von 100% zeigten (Abb. 40). Einige Homozygote zeigten Krankheitssymptome vor ihrem Tod: Sie waren zitternd und lethargisch und mit einem charakteristischen "strubbeligen" Fell. Aus diesen Mäusen wurden die wichtigsten Organe präpariert. Eine Hypertrophie der Milz (Splenomegalie) (Abb.39), Lebernekrose und vergrößerte Lymphknoten waren makroskopisch sichtbar. Einige homozygote Mäuse wiesen ein verlangsamtes Wachstum auf. Andere entwickelten Augen- und/oder Ohrinfektionen, die vermutlich durch opportunistische Bakterien verursacht wurden. Homozygote Tiere, die nicht erkrankten oder starben, zeigten keine Anfälligkeiten. Verpaarungen von Homozygoten untereinander ergaben Wurfgrößen von 2-8, bei denen wiederum ca. 20% der Neugeborenen starben. Die Ursache des Todes zu diesem Zeitpunkt konnte bislang nicht bestimmt werden. Histologische Untersuchungen der betroffenen Organe werden zur Zeit unternommen.



Abb. 40: Hypertrophie der Milz in GTXVI-44 homozygoten Mäusen.

Die Milz einer Wildtyp Maus (links) wird mit der Milz einer homozygoten GTXVI-44 Maus (rechts) verglichen. Größe und Gewicht sind in der letzteren verdoppelt.



N=52 (100%)	2. Woche	1. Monat	2. Monat	3. Monat	4. Monat	5. Monat	6. Monat	12. Monat	Total
Todesfälle	13 (25%)	1 (1,9%)	1 (1,9%)	4 (7,7%)	3 (5,8%)	2 (3,8%)	3 (5,8%)	6 (11,5%)	33 (63,5%)
Überlebende	39 (75%)	38 (73%)	37 (71%)	33 (63,5%)	30 (57,7%)	28 (53,8%)	25 (48%)	19 (36,5%)	19 (36,5%)

Abb. 40: Sterblichkeitsrate der homozygoten GTXVI-44 Mäuse. Die Kurve zeigt den Prozentsatz der überlebenden Mäuse im Zeitfenster eines Jahres. Die homozygoten GTXVI-44 (n=52) werden mit ihren Wildtyp und heterozygoten Geschwistern (n=59) verglichen. Die Tabelle zeigt die genauen Zahlen an Todesfällen/Überlebenden.

3.2.4. Die ES-Zelllinie 2A-53 und davon abgeleitete Mäuse

Im Gegensatz zu GTXVI-168, GTIII-6 und GTXVI-44 wurde die Zelllinie 2A-53 mit einem Exon-trap Vektor generiert. Diese Art von Vektor unterscheidet sich vom bereits beschriebenen Gene-trap Vektor SA-IRES- β -Geo darin, daß keine Spleißakzeptorstelle (SA) vor dem β -Geo Reportergen vorhanden ist. Deshalb ist hier eine Integration in ein zelluläres Exon Voraussetzung für die Expression des Reportergens. Das Exon-Trap Konstrukt enthält eine 1,3 kb lange Intron-Sequenz des Maus *En2* Gens, die als "Puffer" bei der Integration dient, eine IRES-Sequenz für die cap-unabhängige Translation des Reportergens, das LacZ-Reportergen und den Neo-Selektionsmarker als β -Geo Fusion gefolgt von einem Polyadenylierungssignal (Abb.43 B).

3.2.4.1. Die LacZ Reportergenaktivität in 2A-53 Mäusen

In der Arbeitsgruppe Prof. Gruss wurden 2A-53 ES-Zellen in Blastozysten injiziert, die erfolgreich in die Keimbahn integrierten. Erste LacZ Färbungen von E 9.5 Mausembryonen aus dieser Linie zeigten Aktivität im Herz, weshalb diese Linie 2A-53 von mir näher untersucht wurde. Es wurden heterozygote 2A-53 Embryonen zwischen Tag 8.5 und 12.5 der embryonalen Entwicklung analysiert. E 8.5 Embryonen zeigten LacZ Aktivität im Herz (Abb. 41 A) und im sich schließenden Neuralrohr (Abb. 41 B), hier insbesondere auf der Ebene des *Neuroporus rostralis*, d.h. der anterioren Öffnung des Neuralrohrs. Transversalschnitte aus heterozygoten E10.5 Embryonen zeigten ebenfalls eine starke LacZ-Expression im Herz (Abb. 41 C), im Epithel des Neuralrohrs und in dorsalen Wurzelganglien (Abb. 41 D). Dieses Expressionsmuster wird in E12.5 heterozygoten Embryonen aufrechterhalten (Abb. 41 E, F).

3.2.4.2. Identifizierung des getroffenen Gens durch genomische Klonierung aus 2A-53 Mäusen

Trotz Variation der 5'RACE-PCR Bedingungen unter Verwendung einer Reihe von Primern aus der *En-2* Sequenz war eine Klonierung des 2A-53 Fusionstranskripts nicht möglich. Deshalb wurde eine genomische DNA-Bank aus 2A-53 Mäusen hergestellt, die mit einer Neo-Sonde aus dem ET- Vektor untersucht wurde. Dieses Vorgehen sollte die Isolierung und Identifizierung der genomischen Sequenzen erlauben, die den integrierten Exon-trap Vektor flankierten.

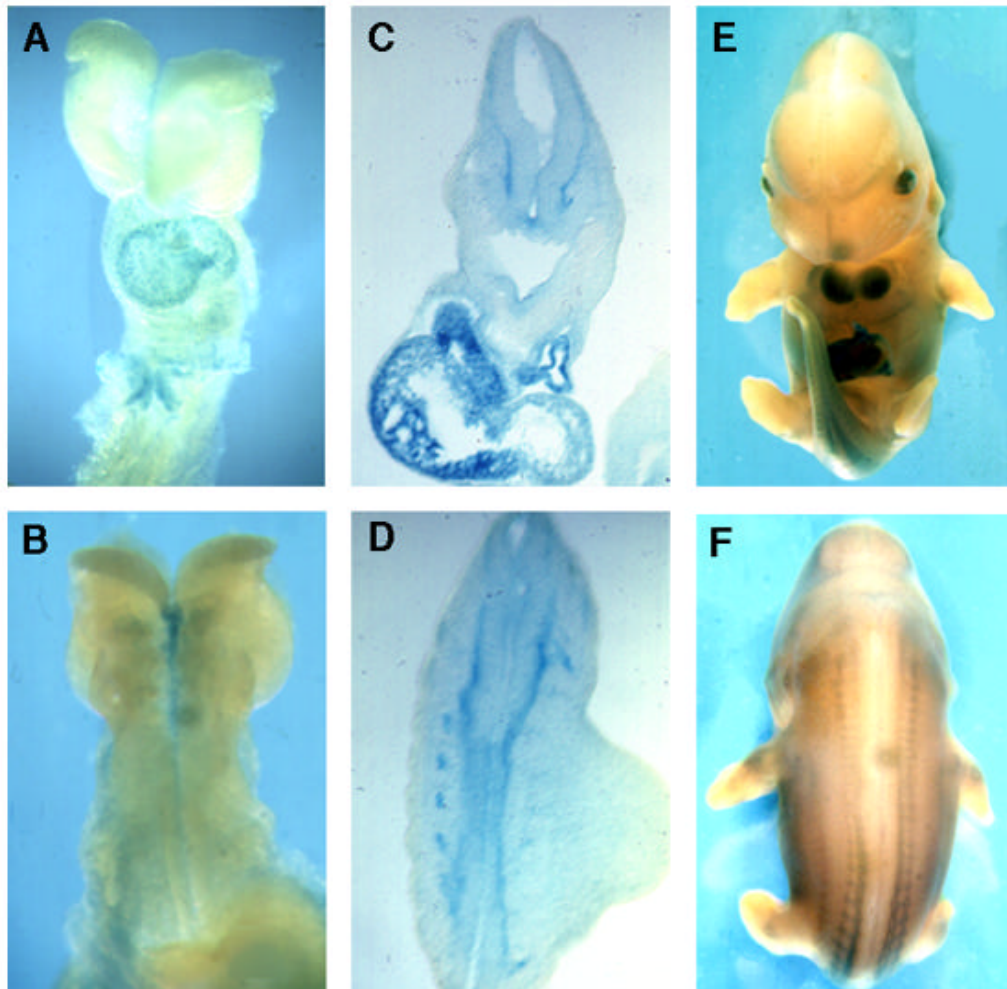


Abb. 41: LacZ Reporteraktivität in 2A-53 Mausembryonen. A) und B) E 8.5 heterozygote Embryonen zeigen LacZ Expression im Herz und im anterioren Neuralrohr. C) und D) Transversalschnitte aus E 10.5 Embryonen. Neben der Expression in Herz und Epithel des Neuralrohrs werden auch LacZ positive Zellen in den dorsalen Wurzelganglien beobachtet. D) und E) Das Expressionsmuster in Herz, Neuralrohr und dorsalen Wurzelganglien wird in E 12.5 noch aufrechterhalten.

Aus 2A-53 Mäusen wurde genomische DNA isoliert und nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* partiell verdaut. DNA-Fragmente einer Größe von 9 bis 23 kb wurden in einen mit *Bam*H1 geschnittenen λ DASH-II Phagen-Vektor (Stratagene) kloniert und verpackt. Insgesamt wurden $2,5 \times 10^6$ pfu erhalten, von denen $1,5 \times 10^6$ pfu ausplattiert und mit einer Neo-Sonde aus dem Exon-trap Vektor hybridisiert wurden. Zwei rekombinante Phagenklone, 16/1 und 18/1, die positive Signale mit der Neo-Sonde gaben, wurden aus der Bank isoliert und analysiert (Abb. 42).

gekommen war, wurde das Restriktionsmuster des Neo Allels in den 2A-53 Mäusen mit dem Restriktionsmuster der Phagenklone verglichen (Abb. 43 C). Dieses war identisch und zeigte damit, daß die Organisation und die Struktur der Phagenklone mit der *in vivo* Situation übereinstimmte.

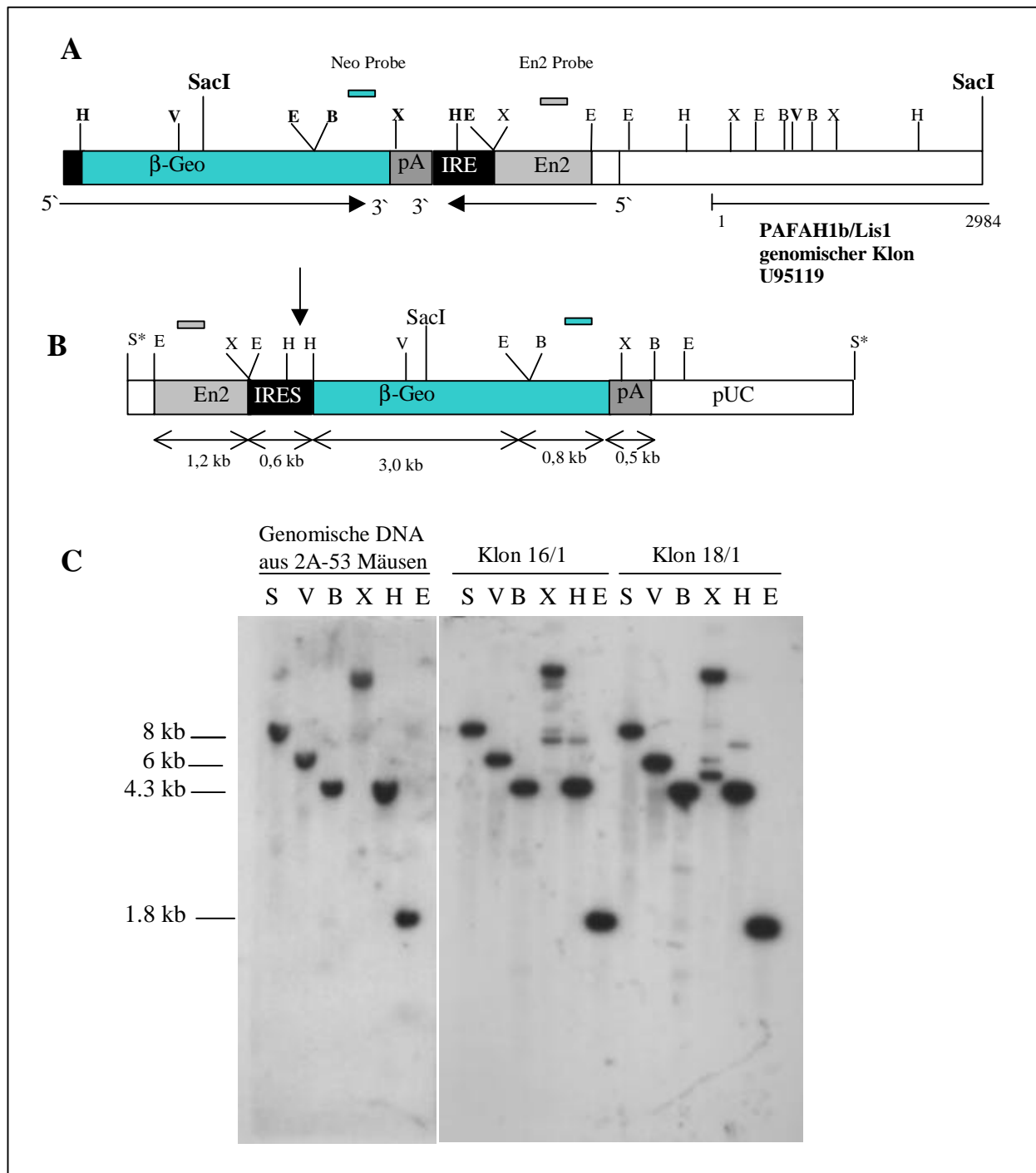


Abb. 43: Struktur des integrierten Exon-trap Vektors. A) Die aus den 16/1 und 18/1 subklonierten *SacI* Fragmente: Restriktionskarte und Anordnung der integrierten Exon-trap Elemente. B) Der ursprüngliche Exon-trap Vektor. Der Pfeil zeigt auf eine mögliche Spaltstelle, die zur Situation in (A) bei der Integration des Vektors führte. C) Genomische DNA aus 2A-53 Mäusen und aus den Phagenklonen 16 und 18 verdaut mit verschiedenen Restriktionsenzymen und hybridisiert mit der Neo Sonde. S: *SacI*; V: *EcoRV*; B: *BamHI*, X: *XbaI*; H: *HindIII*; E: *EcoRI*.

Sequenzierung des SacI-Subfragments zeigte am 3'Ende Sequenzidentität mit dem genomischen Klon Pafah1b/Lis1 U95119 (Nukleotid 1-2984), der ca. 16 kb des Pafah1b/Lis1 Introns 2 umfaßt. Die homologe Sequenz folgte auf etwa 1 kb unbekannter Sequenz, die sich an das 3'Ende des ET-Vektors anschließt. Zusätzlich wurden die vollständigen Phagenklone zunächst mit flankierenden (T3 und T7), dann mit successiven internen Primern sequenziert. Diese Analyse zeigte, daß die DNA-Inserts in 16.1 und 18.1 invertiert vorlagen. Es wurde weiter festgestellt, daß die genomische Sequenz am 3'Ende der Insertion weiter identisch mit der Intron 2-Sequenz des Maus Pafah1b/Lis1 Gens war, während die Sequenz am 5'Ende der Insertion keine Homologie zu bekannten Genen zeigte. Darüberhinaus zeigten die Sequenzen, die den Exon-trap Vektor 5'und 3'direkt flankieren (sie sollten theoretisch Exon-Sequenzen darstellen), weder Homologie zu bekannten Genen, Lis1 Exons oder ESTs noch ein offenes Leseraster. Auch das Absuchen einer embryonalen Maus cDNA Bank mit PCR DNA-Sonden aus den 3'Sequenzen ergab keine spezifisch hybridisierenden cDNA Klone.

Die Beobachtung, daß die zum Lis 1-Intron 2 identischen Sequenzen sich nur auf einer Seite des DNA-Inserts befanden und durch ca. 1 kb unbekannter Sequenz von diesen getrennt wurden, d.h keine der bekannten Lis1 Exon-Sequenzen direkt von der Integration unterbrochen war, benötigte eine Erklärung. Deshalb wurden die genomischen Sequenzen des Lis1 Gens untersucht: Die Exon/Intron Struktur des Lis1 Gens ist weitgehend bekannt und wird in Abb. 44 schematisch dargestellt. Alle Exon- und Intronbereiche sind vollständig sequenziert bis auf Intron 2, in dem eine interne Sequenz von ungefähr 15 kb noch unbekannt ist (Peterfy et al., 1998). Bislang existiert keine Überlappung zwischen den genomischen Klonen U95118 (Exon 2-2a/Intron 2) und U95119 (Intron 2/Exon 3) (Abb.44). Da sich der integrierte Vektor in unseren Phagenklonen ca. 1 kb vor der bekannten Sequenz des genomischen Lis1 Klons U95119 befindet, liegt nahe, daß die Insertion in dem unbekanntem Bereich des Introns 2 stattgefunden hat.

Das Lis1 (Lis: "*lissencephaly*") Protein wurde ursprünglich als die regulatorische Untereinheit des Enzyms PFAH (Platelet activating factor acetylhydrolase) isoliert (Hattori et al., 1994) und wird deshalb auch PFAH1b genannt. Patienten mit Deletionen und anderen Mutationen im Lis1 Gen leiden unter ILS (*isolated lissencephaly sequence*) (Nigro et al., 1997) oder dem Miller-Dieker Syndrom (MDS) (Reiner et al., 1993). Beides sind neuronale Migrationsdefekte, die sich durch eine glatte Gehirnoberfläche auszeichnen. Die meisten Sulci und Gyri des Cortex entstehen nicht (*agyria/pachygyria*) und anstatt der normalen sechs

Rindenschichten (Laminae I-VII), bilden sich bei diesen Patienten nur vier (Barth, 1987; Aicardi 1989).

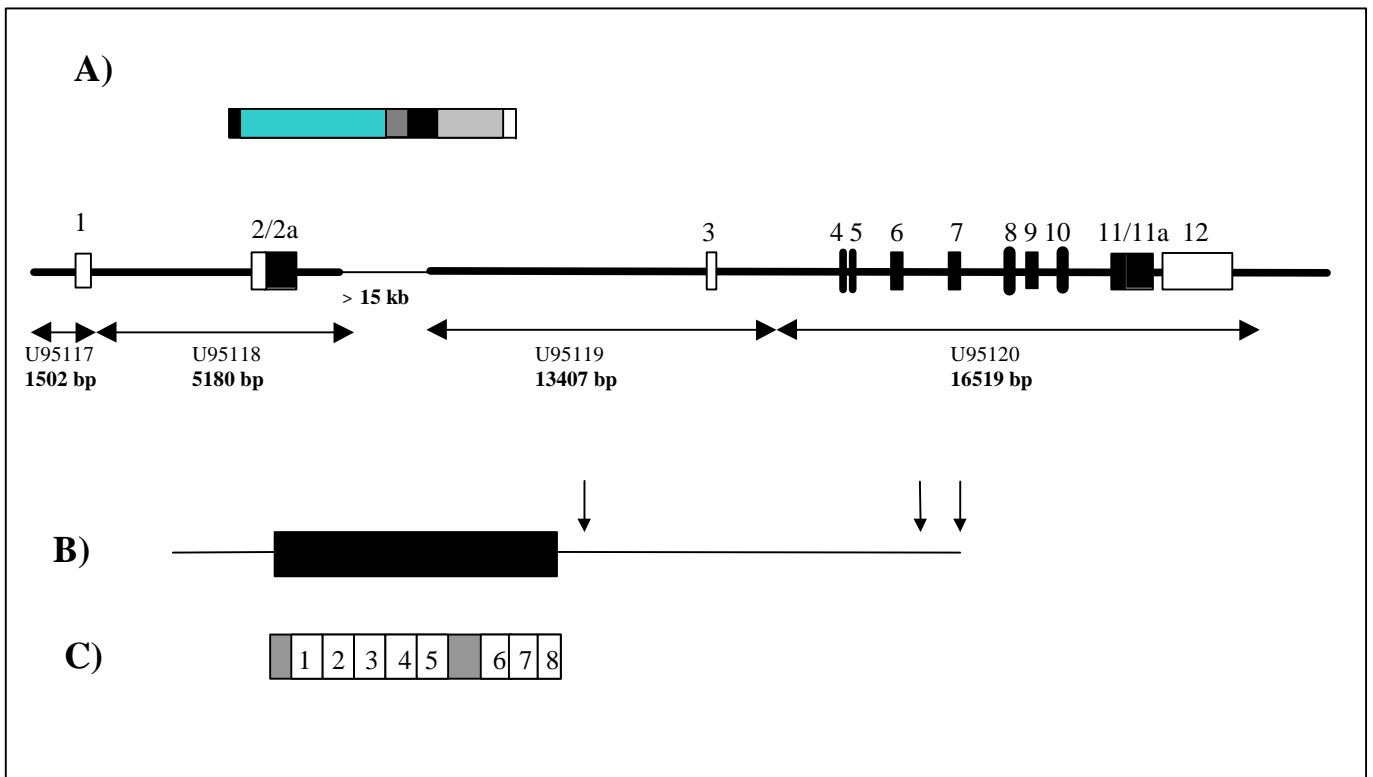


Abb. 44: Das Pafah1b/Lis1 Gen A) Exon-Intron Struktur des Gens und Insertionstelle des Exon-Trap Vektors. Exone sind nummeriert. Kodierende Exone sind in schwarzen Kästen dargestellt, untranslatierte Exone sind durch weiße Kästen gekennzeichnet und alternativ gespleißte Exone sind gemustert. B) Lis1-cDNA Klone zeigen identische kodierende Sequenz aber unterschiedliche polyadenylierte 3' Enden. Diese werden in Pfeilen dargestellt. C) Das 45 kDa Lis1 Protein enthält 8 WD40 Wiederholungen.

Das Lis1 Protein enthält 8 WD40-Wiederholungen (Reiner et al., 1993) und interagiert mit verschiedenen Proteinen, wie PFAFAH (Hattori et al., 1994), Tubulin (Sapir et al., 1997) und NudC (Morris et al., 1998). Das Maus Lis1 Gen ist, wie das humane, weitgehend charakterisiert worden. Die Lis1 $-/-$ Knockout Mutation ist embryonal lethal und Lis1 $+/-$ Mäuse zeigen einen Lissencephaly Phänotyp (Hirotsume et al., 1998).

3.2.4.3. Die homozygoten 2A-53 Mäuse zeigen einen Phänotyp

Der Genotyp der 2A-53 Mäuse wurde zunächst über die Signalstärke des integrierten Neo-Allels bestimmt. Nach der Identifizierung des Insertionslokuses konnte eine externe Lis1 Sonde zum Nachweis der Wildtyp und Exon-trap Allele eingesetzt werden (Abb. 45). Der Anteil homozygoter Nachkommen nach der Verpaarung heterozygoter Eltern war ungefähr das statistisch zu erwartende Viertel. Homozygote Tiere unterschieden sich in einer ersten Analyse nicht von ihren heterozygoten Geschwistern. Jedoch wurde festgestellt, daß

Verpaarungen der homozygoten Männchen zu keinen Nachkommen führten, während homozygote Weibchen normal fruchtbar waren. Eine Untersuchung zum Paarungsverhalten der Männchen zeigte, daß diese in der Lage waren, mit den Weibchen zu kopulieren, denn bei diesen wurden Vaginalpröpfe beobachtet. Jedoch wurden nach einer Ausspülung der Uteri keine Spermien gefunden. Anschließend wurde der Genitaltrakt der Männchen untersucht. Schnitte der Hoden und Nebenhoden zeigten, daß Spermiovorläuferzellen bis zum Stadium Spermatozyte I im Epithel der Hodenkanälchen anwesend waren, aber diese Spermatozyten I differenzierten nicht weiter sondern degenerierten. Als Zeichen der Degeneration wurden Vakuolen beobachtet (Abb. 47). Auch in den Nebenhoden wurden keine Spermazellen gefunden. Größe und Gewicht der Hoden war auf die Hälfte reduziert, was mit dem Fehlen von Spermien korreliert (Abb. 46).

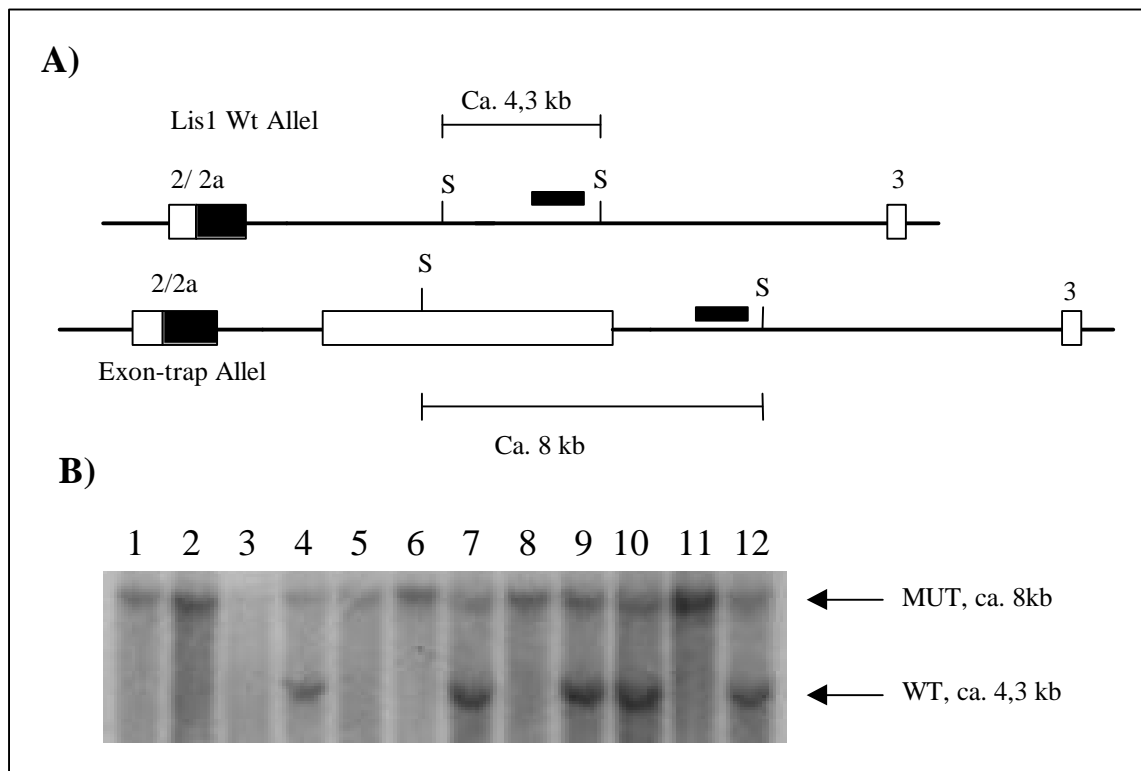


Abb. 45: Genotypisierung der 2A-53 Mäuse. A) Genomische DNA aus 2A-53 Mäusen wurde mit *SacI* verdaut (S) und mit einer Probe aus dem *Lis 1*-Intron 2 (schwarze Kästen) hybridisiert, so daß ein Polymorphismus gefunden wurde. B) Ergebnis der Genotypisierung der Nachkommen aus einer +/- x +/- Verpaarung. In heterozygoten Mäusen (Spuren 4, 7, 9, 10, 12) wurde sowohl das Wildtyp als auch das Exon-trap Allel beobachtet, in homozygoten (1, 2, 3, 5, 6, 8, 11) nur das Exon-trap Allel.

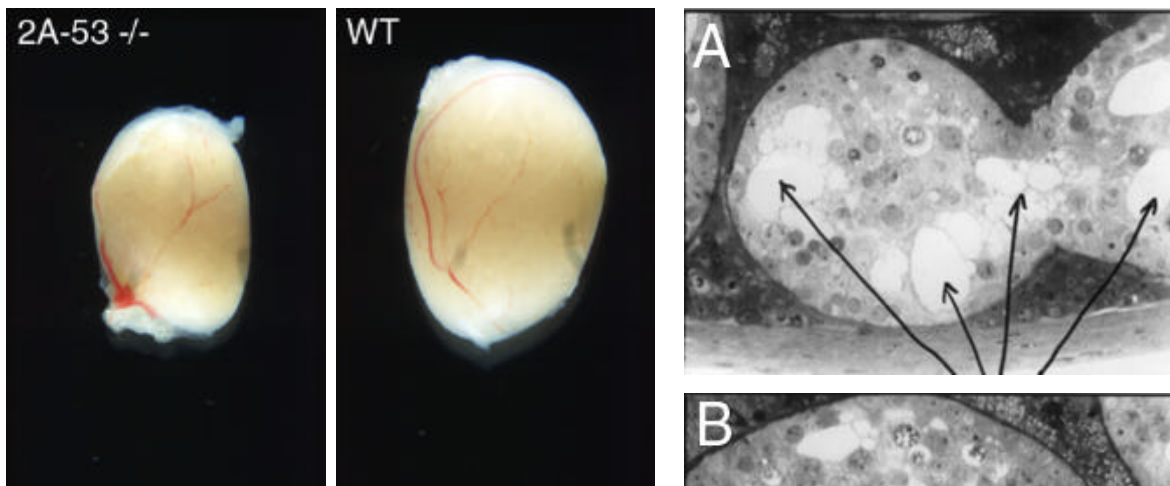


Abb. 46: Der Phänotyp der homozygoten 2A-53 Männchen. Größe und Gewicht der Hoden sind im Vergleich zum Wildtyp auf 50 % reduziert.

Abb. 47: Arretierung der Spermatogenese in homozygoten 2A-53 Männchen. A und B: Schnitte der Hoden aus den homozygoten Männchen. In den Hodenkanälchen finden sich degenerierende Spermatozyten I und zahlreiche Vakuolen (Pfeile). C: In den Nebenhoden werden keine Spermien gelagert, sondern degenerierte Spermatozyten.

3.2.4.4. Die Auswirkung der Exon-trap Integration auf die Transkription von Pafah1b/Lis1

Zahlreiche Pafaha1b/Lis1 cDNAs sind aus einer Maus cDNA Bank isoliert worden (Peterfy et al., 1998). Obwohl diese identisch in der kodierenden Region sind, weisen sie unterschiedliche 3'UTRs auf, die vermutlich durch alternative Polyadenylierung entstehen (Abb. 44 B) und in der Maus gewebespezifisch exprimiert werden. Während die ca. 2,3 kb und 6 kb Transkripte fast ubiquitär vorhanden sind, wurde ein ca. 4,4 kb Transkript ausschließlich im Herz detektiert (Peterfy et al., 1998). Darüberhinaus wurde mit einer DNA-Sonde aus Exon 2a (Abb. 48) ein testisspezifisches Transkript von ca. 2,4 kb detektiert (Peterfy et al., 1998). Da Exon 2a nicht in den bereits erwähnten cDNAs enthalten ist, wurde

vermutet, daß diese Isoform durch alternatives Spleißen oder eventuell durch eine zweite unterschiedliche Transkriptionsstartstelle generiert wird.

Diese Daten dienten als Grundlage, um die Auswirkung der Exon-Trap Integration im Lis1 Lokus auf die Expression der Lis1 Transkripte zu untersuchen. PolyA⁺ mRNAs aus Gehirn, Herz und Testes von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Mäusen der 2A-53 Linie wurden für Northern blot Hybridisierungen isoliert. Da der Phänotyp der homozygoten 2A-53 Männchen auf eine Veränderung des testisspezifischen Transkripts deutete, wurde zunächst eine DNA-Sonde bestehend aus Exon2a und Exon3 eingesetzt (Abb. 48 A). Diese detektierte die ~6.0 kb und die 2,4 kb Transkripte in Gehirn und Herz von Wildtyp Mäusen und, in Testis die 2,4 kb und 2,3 kb Transkripte. Auffällig war in Testes aus homozygoten und heterozygoten 2A-53 Mäusen eine Reduktion in der Relation des 2,4 kb-Transkripts zum 2,3 kb Transkript. Im Herz aus homozygoten Mäusen wurden interessanterweise keine, oder kaum nachweisbare Mengen der bekannten Lis1-Transkripte detektiert. Stattdessen wurde ein schwaches Signal, das einer anderen Transkriptgröße entsprach, beobachtet. Um zu überprüfen, ob dieses das Fusionstranskript darstellt, d.h.eine Fusion von Lis1-Exon2 bzw. Exon2a zum β -Geo, wurde der Northern blot mit einer LacZ-Sonde hybridisiert (Abb. 48 B). Die LacZ-Sonde detektierte, wie erwartet, ein Signal in heterozygoten und homozygoten aber nicht in Mäusen des Wildtyps und dieses entsprach einem Transkript von mehr als 4,5 kb. Da ein nicht fusioniertes β -Geo Transkript etwa 3.8 kb umfaßt, ist es möglich, daß das größere Transkript eine Fusion des β -Geo Reporters zu Lis1 5' Sequenzen repräsentiert. Das detektierte Transkript war sehr schwach im Gehirn, sehr stark in Herz und weniger stark in Testes exprimiert und seine Größe stimmte mit der Größe des schwachen, im Herz von Homozygoten mit der Lis1 Sonde detektierten Signals überein.

3.2.4.5. Das β -Geo Fusionstranskript

Um eine Fusion des β -Geo Reportergens zu Lis1 5' Exonen nachzuweisen, wurde zunächst RT-PCR durchgeführt. Mit 5' Lis1 Primern aus Exon 2 bzw. Exon 2a und 3' LacZ Primern ließ sich kein Fusionstranskript amplifizieren. Auch der erneute Versuch, das β -Geo Fusionstranskript mittels 5' RACE-PCR zu klonieren, diesmal anhand der Information bezüglich des integrierten Vektors, mit Primern aus der LacZ Sequenz, war nicht erfolgreich.

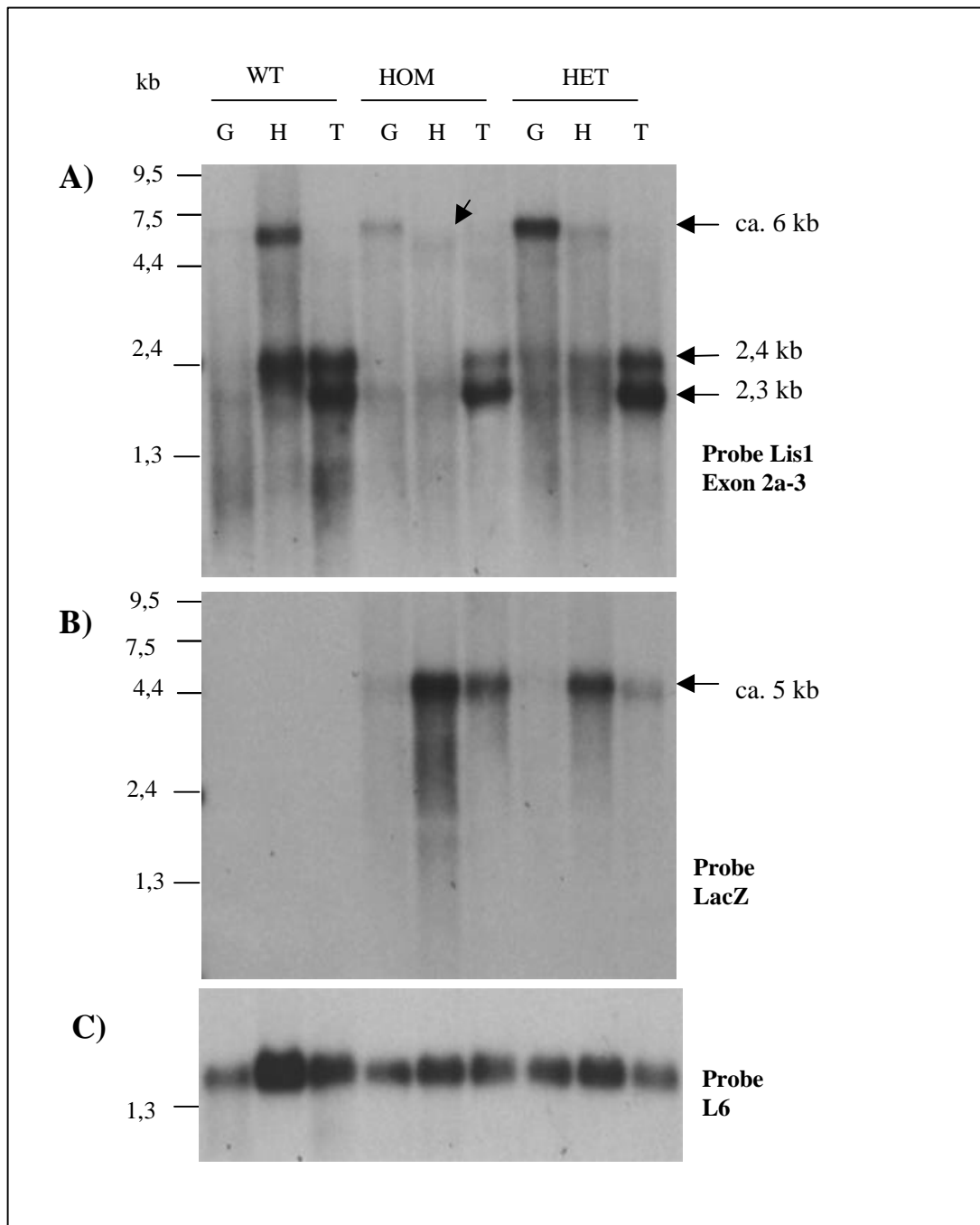


Abb. 48: Northern Blot Analyse der 2A-53 Mäuse mit den Proben A) Exon 2a-3 aus *Lis1*, B) *LacZ* und C) *L6* ribosomales Protein als Kontrolle. G: Gehirn, H: Herz, T: Testis.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die Integration des ET-Vektors eine Auswirkung auf die Transkriptmenge von einigen der *Lis1* mRNA Species hat. Darüberhinaus wurde die Existenz eines β -Geo-Fusionstranskripts nachgewiesen; jedoch konnte dieses nicht kloniert werden und eine Fusion des β -Geo Reportergens zu *Lis1* Sequenzen konnte ebenfalls nicht zweifelsfrei bestätigt werden.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Gene-trap Methode zur Isolierung und Charakterisierung entwicklungsrelevanter Gene getestet. Insbesondere wurden methodische Modifikationen versucht, die unter Umständen den experimentellen Aufwand durch sinnvolle Kriterien begrenzen könnten. So wurde untersucht, inwieweit *in vitro* Selektionsverfahren von ES-Zellen Hinweise auf potentiell interessante Entwicklungsgene liefern und somit eine gezielte Auswahl von ES-Zellen zur Herstellung transgener Mauslinien ermöglichen können. Daneben wurden Gene-trap Mauslinien detailliert analysiert, um ihren sinnvollen Einsatz für biologische Fragestellungen an Einzelbeispielen zu demonstrieren.

Im folgenden wird zunächst der methodische Ansatz evaluiert, sodann die Resultate der einzelnen Gene-trap Modelle diskutiert.

4.1. Welche Informationen können durch *in vitro* Selektion der ES-Zellen erhalten werden

Eine praktische Limitation der Gene-trap Methode ist die große Anzahl der herzustellenden transgenen Mauslinien ohne vorherige Auswahlkriterien für das in der jeweilig untersuchten ES-Zelle getroffenen Gen. Jedes Kriterium, das zum einem die Chancen für eine tatsächlich erfolgte Mutation erhöht, zum anderen eine Abschätzung der möglichen Genfunktion etwa aufgrund der Genexpression erlaubt, hilft daher das Verhältnis von experimentellen Aufwand und biologischen Resultat zu verbessern.

4.1.1. Ergibt die Aktivität des Reportergens *in vitro* einen Hinweis auf die Expression des Gens in der Maus?

Um diese Frage beantworten zu können, wurde die Aktivität des LacZ Reportergens nach Gene-trap Ereignissen *in vitro* mit dem Expressionsmuster des entsprechenden Gens in der Maus verglichen. Hierzu wurden publizierte Expressionsdaten bekannter Gene in der Literatur herangezogen.

Für die Klone **GTXVI-173** und **GTXVI-168** konnte eine gewisse Übereinstimmung der Expression in differenzierten ES-Zellen und den Expressionsmustern der entsprechenden Gene in der Maus festgestellt werden. Beide Klone zeigten keine oder schwache LacZ Aktivität in undifferenzierten ES-Zellen, während in differenzierten Embryoid bodies starke LacZ Expression in verschiedenen Zelltypen beobachtet wurde, unter anderem auch in Herzmuskelzellen. Die entsprechenden Gene sind ebenfalls in der Maus gewebespezifisch

exprimiert. In der frühen embryonalen Entwicklung wird das Maus **Qk1** Gen (Klon GTXVI-173) hauptsächlich im Epithel des Neuralrohrs und im Herzen exprimiert (Ebersole et al., 1996). Das in der Gene-trap ES-Zelllinie GTXVI-168 getroffene Gen zeigte in chimären Embryonen hauptsächlich Expression im Herzen, die durch *whole-mount* Hybridisierung mit einer endogenen GTXVI-168-Sonde bestätigt wurde.

Auch die durch Retinsäure (RA) induzierbare LacZ-Aktivität in den Klonen **3G** und **9F** korrelierte mit der bekannten RA-Induzierbarkeit der getroffenen Gene, **GCNF** (3G) und des neuen **Dr** (*developmental regulated repeat*)-Sequenz enthaltenden Gens (9F). **GCNF** war bereits in der Literatur als RA-induzierbar bekannt (Heinzer et al., 1998) und gehört interessanterweise zur gleichen Familie nukleärer Rezeptoren wie die Retinsäure-Rezeptoren RXR und RAR. Im Mausembryo wird GCNF während der Gametogenese und im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert. Die **Dr**-Sequenz (*developmental regulated repeat*) (Sam et al., 1996) (Klon 9F) wurde unabhängig von mir im Rahmen eines ähnlichen Gene-trap Verfahrens zur Isolierung RA-induzierbarer Gene im Labor von Prof. Wurst identifiziert (Forrester et al., 1996). Die Expression von Dr-Sequenzen wird *in vitro* in ES Zellen durch RA hochreguliert. Dr-Sequenzen werden ebenfalls während der embryonalen Entwicklung und im adulten Gehirn exprimiert. Bis auf das *Aquarius* Gen, ein ebenfalls RA-induzierbares Gen der Dr-Familie (Sam et al., 1998), sind die Funktionen von Dr-Genen und ihre RA-Induzierbarkeit nicht untersucht.

Zwei Klone, die konstitutive LacZ-Aktivität *in vitro* zeigten, repräsentieren Integrationen in Genen mit ubiquitärer Expression und "*housekeeping*" Funktion in der Maus. Zum Beispiel die Linie **3H9**, die *in vitro* eine ubiquitäre zytoplasmatische Expression des LacZ-Reportergens zeigte, trägt die Gene-trap Insertion im "*housekeeping*" Gen **PGK-1**, das für das cytosolische Enzym Phosphoglukokinase-1 kodiert. In der Linie **3B10** war die LacZ Expression ebenfalls ubiquitär mit einem punktierten Muster innerhalb des Zytoplasmas. Das getroffene Gen, *Sod2*, wird in der Maus ebenfalls ubiquitär exprimiert und sein Produkt, die Mangan-abhängige Superoxid Dismutase, **MnSOD**, ist ein mitochondrielles Enzym.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, daß das *in vitro* Expressionsmuster allgemeine Hinweise auf ubiquitäre oder zelltypspezifische Expression *in vivo* geben kann. Das Kriterium einer induzierbaren Expression gegenüber einer konstitutiven LacZ-Aktivität *in vitro* in ES-Zellen deutet auf gewebespezifische Gene hin. Die Bestimmung der *in vitro* Aktivitätsmuster

des Reportergens ist also ein mögliches, wenn auch nicht sehr stringentes Werkzeug, entwicklungsregulierte Gene zu erkennen, bevor eine Maus hergestellt worden ist.

4.1.2. Die Identifizierung des getroffenen Gens aus Gene-trap ES-Zelllinien

Die Identifizierung der getroffenen Gene durch 5'RACE-PCR und anschließende Sequenzanalyse in ES-Zellen gelang mit hoher Effizienz und ermöglichte so die Zuordnung der abgeleiteten Genprodukte zu Proteinklassen wie z.B. nukleären Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren (GCNF), RNA Bindungsproteinen (QK1), Signaltransduktionsproteinen (GTXVI-168/GAP) oder Transmembranproteinen (GTXVI-95/LAR). Jedenfalls kann hierdurch geklärt werden, ob es sich beim getroffenen Gen um ein bekanntes oder unbekanntes Gen handelt, bevor transgene Mäuse etabliert werden. Weiterhin kann das klonierte PCR-Fragment verwendet werden, um durch in situ Hybridisierung etwa die Expression des Gens in der Maus zu bestimmen, weitere Familienmitglieder oder alternativ gespleißte Isoformen auf Northern blots zu erkennen, oder komplette cDNAs zu klonieren.

4.1.3. Abschätzung des Mutationspotentials der Integration

Eines der Ziele der Gene-trap Methode ist die Mutation des getroffenen Gens. Es ist klar, daß Insertionen im 5'Ende eines Gens eher zur kompletten Inaktivierung des Genprodukts führen, als Insertionen im 3'Ende, die eher Hypomorphe generieren oder aber keinen Effekt haben. Bestimmung des Insertionsorts erlaubt daher die Wahrscheinlichkeit einer Mutation abzuschätzen. Im folgenden werden Beispiele aus meiner Arbeit diskutiert.

In drei Fällen kann eine komplette Inaktivierung des Genprodukts vorhergesagt werden: 1) Die Integration im nukleären Rezeptor-Transkriptionsfaktor **GCNF** (GT ES-Zelllinie 3G) unterbricht die kodierende Sequenz nach 62 AS. Im daraus resultierenden verkürzten Protein fehlt die DNA-Bindungsdomäne (Chen et al., 1994), so daß Regulation der Targetgene nicht mehr möglich ist. 2) Die Integration im **Qk1** (GT ES-Zelllinie GTXVI-173) unterbricht die KH-Domäne, die für die Proteindimerisierung und die RNA-Bindung notwendig ist. Da bereits gezeigt wurde, daß das Qk1 Protein eine intakte KH Domäne benötigt, um seine Funktion auszuüben (Chen und Richard, 1998), sollte auch diese Gene-trap Insertion zu einem Phänotyp führen. 3) Die Integration in der neuen Transmembran-Tyrosin-Phosphatase **LAR/GTXVI-95** verkürzt das Protein auf 116-121 AS des N-Terminus, so daß sowohl die extrazelluläre, als auch die intrazelluläre Domäne fehlen.

Ein interessanter Fall ist die Insertion des Gene-trap Vektors im **MnSOD** in der ES-Zelllinie **3B10**. Hier liegt die Insertion ziemlich weit am 3'Ende, deletiert aber zwei Aminosäuren, die an der Bindung des Mangans beteiligt sind (Jackson et al., 1998). Da MnSOD nur mit gebundenen Mn-Ion aktiv ist, kann hier ebenfalls mit einer Mutation gerechnet werden.

4.1.4. Von Zelllinien zu Mausstämmen: Probleme bei der Erzeugung der Gene-trap Mäuse

Ich konnte zeigen, daß die *in vitro* Selektion in ES-Zellen mit den angewendeten Parametern, Expressionsmuster, Identifizierung des getroffenen Gens, Auswirkung der Insertion auf die Funktion des Genprodukts, ein hilfreicher Ansatz zur Auswahl interessanter ES-Klone für die weitere Analyse in der Maus sein kann. Anhand dieser Kriterien wurde der Klon **GTXVI-168** für die weitere Charakterisierung und Etablierung entsprechender Mausstämmen ausgewählt.

Hier zeigte sich allerdings, daß Keimbahntransmission der manipulierten ES-Zellen in der Maus nicht immer gelingt und deshalb die entsprechenden Mausstämmen nicht erzeugt werden können. Diese Erfahrung wurde z.B. mit der Zelllinie GTXVI-168 gemacht. Während im Falle der homologen Rekombination mehrere identische ES-Klone generiert und für die Herstellung von Knockout Mäusen eingesetzt werden können, stellt die Gene-trap Insertion ein einmaliges und zufälliges Ereignis dar. Sollte die erhaltene ES-Linie die Keimbahn der Maus nicht bevölkern, gibt es keine zweite Chance zur Erzeugung mutanter Mäuse.

4.2. Gene-trap Mausstämmen

In Gegensatz zum *in vitro* Selektionsverfahren, werden im sog. *in vivo* Gene-trap Ansatz die erzeugten ES-Klone ohne Vorselektion für Blastozysten Injektion bzw. Morulae Aggregation eingesetzt. Die Expression des Reportergens wird dann direkt in chimären bzw. heterozygoten Mausembryonen analysiert. Es ist von Vorteil, zunächst heterozygote Mäuse herzustellen, um das Problem der Keimbahntransmission zu klären. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Gene-trap Mauslinien untersucht, die aufgrund der interessanten, herzspezifischen LacZ-Reportergenaktivität in der frühen Embryogenese ausgewählt wurden. Für jeden Mausstamm wurde: 1) Die Expression des getroffenen Gens anhand der Reportergenaktivität bestimmt, 2) das getroffene Gen identifiziert und 3) der Phänotyp, wenn vorhanden, untersucht.

Die Mauslinie **GTIII-6** zeigte keinen Phänotyp, möglicherweise, weil die Insertion im 3'Ende des getroffenen Gens liegt und die vermutlich funktionelle PX-Domäne nicht getroffen ist, so daß die Funktion des Genprodukts weitgehend normal bleibt. Diese Situation wäre in den

durchgeführten *in vitro* Ansatz schon vor der Erzeugung der Mauslinie erkannt worden. Ähnlich wie im Falle von **GTXVI-168** bleibt hier die Frage nach der Funktion des Gens in der embryonalen Entwicklung ohne einen erkennbaren Phänotyp unbeantwortet. Im Falle der **2A-53** Mauslinie erwies sich die Identifizierung des getroffenen Gens als ausgesprochen schwierig, da kein Fusionstranskript mit der etablierten 5'RACE-PCR Methode kloniert werden konnte. Der hier verwendete Exon-trap Vektor hat bei der Integration ins Genom offensichtlich Veränderungen erfahren, die für die Schwierigkeiten der Klonierung teilweise verantwortlich sein könnten. In GTXVI-44 Mäusen könnte sowohl das Gen identifiziert werden, als auch ein Phänotyp erhalten werden.

Trotz aller Schwierigkeiten führte die Charakterisierung der Gene-trap-Linien zu interessanten Erkenntnissen: Sowohl GTXVI-168 als auch GTIII-6 betrifft neue Gene, deren Sequenzhomologien interessante Funktionen in der Zelle erwarten lassen. Die Insertion des Exon-Trap Vektors in der 2A-53 Linie führt zu einem drastischen Phänotyp in der Spermatogenese mit Sterilität der Männchen. Die Linie GTXVI-44 ergab ein bisher unbekanntes Expressionsmuster des NFκB1 Gens während der embryonalen Entwicklung und stellt ein geeignetes Modell zur Untersuchung des p105 Gens in der Maus dar. Während meiner Arbeit wurde ein "Knock-out" des p105 publiziert, der den gleichen Phänotyp wie die Gene-trap Linie GTXVI-44 aufweist.

Zusammenfassend zeigen meine Daten, daß die Anwendung der Gene-trap Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Entwicklungsgenen in der Maus, wenn auch aufwendig, eine plausible Methode darstellt. Im folgenden werden die einzelnen Mauslinien diskutiert.

4.2.1. Die Gene-trap Zelllinie GTXVI-168.

Die Gene-trap Linie GTXVI-168 betrifft ein Gen, das für ein Protein von mindestens 871 Aminosäuren mit zwei konservierten Domänen, der GAP (GTPase aktivierendes Protein)-Domäne und der PH (Pleckstrin-Homologie)-Domäne kodiert. Derartige Domänen werden in Proteinen gefunden, die in der RAS-Signalübertragung eine Rolle spielen.

Die Proteine der Ras-Superfamilie sind regulatorische GTPasen, die GTP binden und hydrolysieren und dadurch eine Schalterfunktion bei zellulären Prozessen ausüben. Diese Schalterfunktion beruht auf einem zyklischen, unidirektionalen Übergang zwischen einer aktiven, GTP gebundenen Form und einer inaktiven, GDP gebundenen Form, wobei die Bindung von GTP den Übergang in die aktive Form bewirkt. Die Hydrolyse des gebundenen GTPs durch eine schwache intrinsische GTPase-Aktivität überführt das Protein in die inaktive, GDP gebundene Form. Hierbei wird die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) erhöht. Die Dissoziation von GDP wird durch Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) bewirkt und durch Guanin-Nucleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) inhibiert. Ras-Proteine empfangen, modulieren und übermitteln Signale, die von aktivierten Rezeptoren an der Zellmembran ausgehen. Für die Signalübertragung zwischen dem aktivierten Rezeptor und Ras und Signallöschung sind die GEF, GAP und GDI Effektorproteine erforderlich.

Innerhalb der Ras-Superfamilie werden mindestens fünf Subfamilien unterschieden (Boguski und McCormick, 1993). Es sind dies die Ras/Rap-, die Rho/Rac-, die Rab-, die Ran-, und die Arf-Subfamilien. Ras Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der intrazellulären Übertragung von Signalen, die Wachstums-, Differenzierung- und Zellbewegungsvorgänge beeinflussen. Die Ras-Subfamilie kontrolliert Aspekte der Zellteilung und Differenzierung. Die Mitglieder der Rab-, Ran- und Arf-Subfamilien sind am Transport von Vesikeln und Proteinen zwischen verschiedenen Zellkompartimenten beteiligt. Die Rho-Subfamilie reguliert Signalwege zwischen Membranrezeptoren und dem Aktin-Zytoskelett, die zur Organisation von Aktin-Filamenten in bestimmten Strukturen wie "stress fibers" und "focal contacts" oder zur Bildung von Filopodien oder Lamellipodien (Tapon und Hall, 1997; Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997) führen. Für alle Mitglieder der Ras-Superfamilie gibt es spezifische GAPs, GDIs und GEFs.

4.2.1.1. GTXVI-168 könnte ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Rho sein

Die Ras Proteine besitzen sehr langsame intrinsische GTPase Aktivität. Die Inaktivierung der Ras-proteine wird *in vivo* durch spezifische GAP-Proteine kontrolliert, die eine beträchtliche Erhöhung der GTPase Aktivität herbeiführen. GAP-Proteine sind daher negative Regulatoren der Ras-Signalübertragung. Sie verkürzen die Halbwertszeit des aktivierten Zustands des Ras-Proteins.

Die Ergebnisse der BLASTX Suche haben gezeigt, daß in der GTXVI-168 abgeleiteten Aminosäuresequenz eine konservierte Domäne mit 50 % Homologie zu GAP-Domänen Rho-spezifischer GAPs existiert. Allerdings zeigt eine vergleichende Analyse zwischen bekannten Rho- und Ras-GAPs Ähnlichkeiten in der Sekundär- und Tertiärstrukturen (Calmels et al., 1998). Beispielsweise weisen p120 (Ras-GAP) und p50 (Rho-GAP) ein gemeinsames "scaffold" auf, das als "cradle fold" bezeichnet wird. Aber trotz struktureller Ähnlichkeiten existiert zwischen diesen beiden Proteinen eine niedrige Sequenzidentität (ca. 15%). Rho- und Ras-GAPs besitzen spezifische Consensus Sequenzen, die in der anderen Subfamilie nicht vorhanden sind. Das PROSITE Consensus Motiv FLR(XXX)P(AV)(XXX)P (Gutmann et al., 1993) mit weiteren 25 identischen oder hoch konservierten Aminosäuren kommt in allen Ras-GAPs vor (Ahmadian et al, 1996; Scheffzek et al., 1996; Allen et al., 1998). Dieses Motiv wird nicht in Rho-spezifischen GAPs und auch nicht in der Aminosäuresequenz des GTXVI-168 Proteins gefunden.

Ein Vergleich zwischen sechs Rho-GAP Proteinen (Barrett et al.,1997) zeigt 10 identische Aminosäuren, von denen sieben (Pro und Leu) für die strukturelle Integrität des Proteins von Bedeutung sind, zwei (Asn188 und Lys122) an der Stabilisierung durch Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind und eine (Arg85) im sog. Arg-Finger liegt, der eine Rolle bei der GTP Hydrolyse spielt, indem er den Übergangszustand des Substrats stabilisiert (Bourne, 1997). Alle 10 AS finden sich ebenfalls in der GTXVI-168 Aminosäuresequenz. Fünf weitere hoch konservierte Aminosäuren (Gly 82, Leu132, Leu178, Met190, Asn194 mit Numerierung gemäß Barrett et al., 1997) sind in allen Rho-GAPs enthalten, bei denen eine GTPase-stimulierende Funktion in der Zelle überprüft wurde, während sie in Rho-GAP verwandten Proteinen, die keine katalytische Aktivität zeigen, nicht vorkommen. Es wird deshalb vermutet, daß die Funktion von Rho-GAP Proteinen von der Anwesenheit dieser Aminosäuren abhängt. Da diese auch in der GAP-Domäne des GTXVI-168 Proteins vorhanden sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß GTXVI-168 tatsächlich ein GTPase-

aktivierendes Protein ist. Zusammengefaßt besitzt die GTXVI-168 GAP-Domäne strukturelle und topologische Voraussetzungen sowohl für eine Interaktion mit Rho-GTPase Proteinen als auch für eine GTPase stimulierende Funktion.

4.2.1.2. Das GTXVI-168 Protein enthält möglicherweise eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne

Neben der hoch konservierten GAP-Domäne in der GTXVI-168 abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde eine weniger konservierte Domäne detektiert, die PH-(Pleckstrin-Homologie) Domäne. Die PH-Domäne ist ein ca. 100 AS umfassendes Strukturmotiv, das sich in vielen Signalmolekülen, wie Ser/Thr spezifischen Proteinkinasen, Tyr Kinasen, Isoformen der Phospholipase C (PLC β , γ und δ), in G-Nukleotid-Austauschfaktoren sowie in Proteinen des Cytoskeletts findet. Ursprünglich wurde die PH-Domäne im Pleckstrin-Protein gefunden, das in Blutplättchen das Hauptsubstrat der Proteinkinase C darstellt (Mayer et al., 1993; Haslam et al., 1993). Überraschenderweise weist dieses Strukturmotiv bei nur geringer Sequenzhomologie eine sehr ähnliche Faltungstopologie auf (Cohen et al., 1995; Musacchio et al., 1993). Die Frage der Bindungspartner der in vielen Signalmolekülen vorkommenden PH-Domänen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird diskutiert, daß PH Domänen spezifische Verankerungsfunktionen an Membranen wahrnehmen (Cohen 1995; Pawson, 1995), wobei Phospholipide der Membran als Bindungssubstrate angenommen werden (Lemmon et al., 1996).

Es ist gezeigt worden, daß die PH-Domäne der Phospholipase C $\delta 1$ (PLC $\delta 1$) mit hoher Affinität und Spezifität an Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P $_2$ oder PIP $_2$) bindet (Lemmon et al, 1995). PIP $_2$ ist ein Substrat von PLC, so daß die PH-Domäne den Kontakt zwischen Enzym und seinem Substrat vermitteln könnte (Cifuentes et al., 1993; 1994; Kanematsu et al., 1992). Darüberhinaus konkurriert Inosit-1,4,5,-Trisphosphat (Ins (1,4,5)P $_3$ oder IP $_3$), das zusammen mit Diacylglycerol (DAG) als Produkt der Hydrolyse von PIP $_2$ durch PLC entsteht, mit PIP $_2$ um die Bindung der PLC-PH-Domäne (Cifuentes et al., 1994). Dies blockiert das Enzym (Kanematsu et al., 1992), und stellt einen wichtigen Schritt in der (*Feedback*-) Regulation des PLC dar. Sowohl PIP $_2$ als auch IP $_3$ sind somit physiologisch relevante Liganden für PLC $\delta 1$. Für den Komplex der PH-Domäne von PLC $\delta 1$ mit IP $_3$ wurde die Kristallstruktur ermittelt (Ferguson et al., 1995).

Die Funktion der Ras-Proteine in der zellulären Signalübertragung ist untrennbar mit der Plasmamembran verbunden. Die Ras-Proteine assoziieren mit Hilfe von Lipidankern

(Farnesyl- und Palmitoyl-Reste) mit der inneren Seite der Zellmembran. Um ihre Funktion als negative Regulatoren von Ras-Proteinen ausüben zu können, müssen sich GAP-Proteine in der Nachbarschaft von Ras-Proteinen befinden. Eine Interaktion der PH-Domäne des GTXVI-168 Proteins mit Phospholipiden der Membran würde möglicherweise GTXVI-168 an der Membrannenseite in die Nachbarschaft von Ras bringen. In ähnlicher Weise wie bei der PLC δ 1 könnte die Anwesenheit der PH-Domäne für die GAP Aktivität des GTXVI-168 Proteins von erheblicher Bedeutung sein. Mit anderen Worten, die Kolokalisation von GTXVI-168 und seinem Rho-Targetprotein könnte über die PH-Domäne reguliert sein. PIP₂ ist ein membranassoziierter Botenstoff und seine Interaktion mit der GTXVI-168 PH-Domäne könnte die Verankerung des GTXVI-168 Proteins in der Zellmembran ermöglichen. IP₃ hingegen ist ein diffusibler Botenstoff, so daß die Interaktion von IP₃ mit der GTXVI-168 PH-Domäne die Lokalisation des GTXVI-168 Proteins an der Membran verhindern würde. Wären PIP₂ und IP₃ in der Tat die physiologischen Liganden der GTXVI-168 PH-Domäne, könnte man sich vorstellen, daß diese Interaktion wiederum von PLC reguliert wird, indem PLC die Verfügbarkeit von PIP₂ gegenüber IP₃ durch die Hydrolyse von PIP₂ steuern würde.

Es ist denkbar, daß Signale, die zur Aktivierung von PLC führen und damit zur Umsetzung von PIP₂ in IP₃, eine Interaktion von IP₃ mit PH-domäne Proteinen auslösen würden. Diese Interaktion würde dann PH-Domäne Proteine von der Zellmembran "entfernen", wodurch im Falle von GTXVI-168 eine Wechselwirkung mit Rho-Proteinen verhindert würde. Rho könnte deshalb "länger" im aktivierten Zustand bleiben und seine Signale weiterleiten.

Die Tatsache, daß viele GAP und GEF-Effektorproteine auch eine PH-Domäne enthalten (Lamarche und Hall, 1994), unterstützt diese Hypothese der "Kolokalisation von Signalproteinen". Als Beispiel gilt FGD1, ein kürzlich identifizierter GEF-Faktor für Cdc42 (Mitglied der Rho-Subfamilie), deren adequate Membranlokalisation über seine PH-Domäne vermittelt wird (Aspenström, 1999). Es ist bislang aber nicht bestätigt, daß die Translokation der PH-Domänen-Proteine zur Zellmembran vom metabolischen Zyklus der Inosit-Phosphate abhängt. Das vorgeschlagene Modell der Funktion und Regulation des GTXVI-168 Proteins wird in der Abb. 41 veranschaulicht.

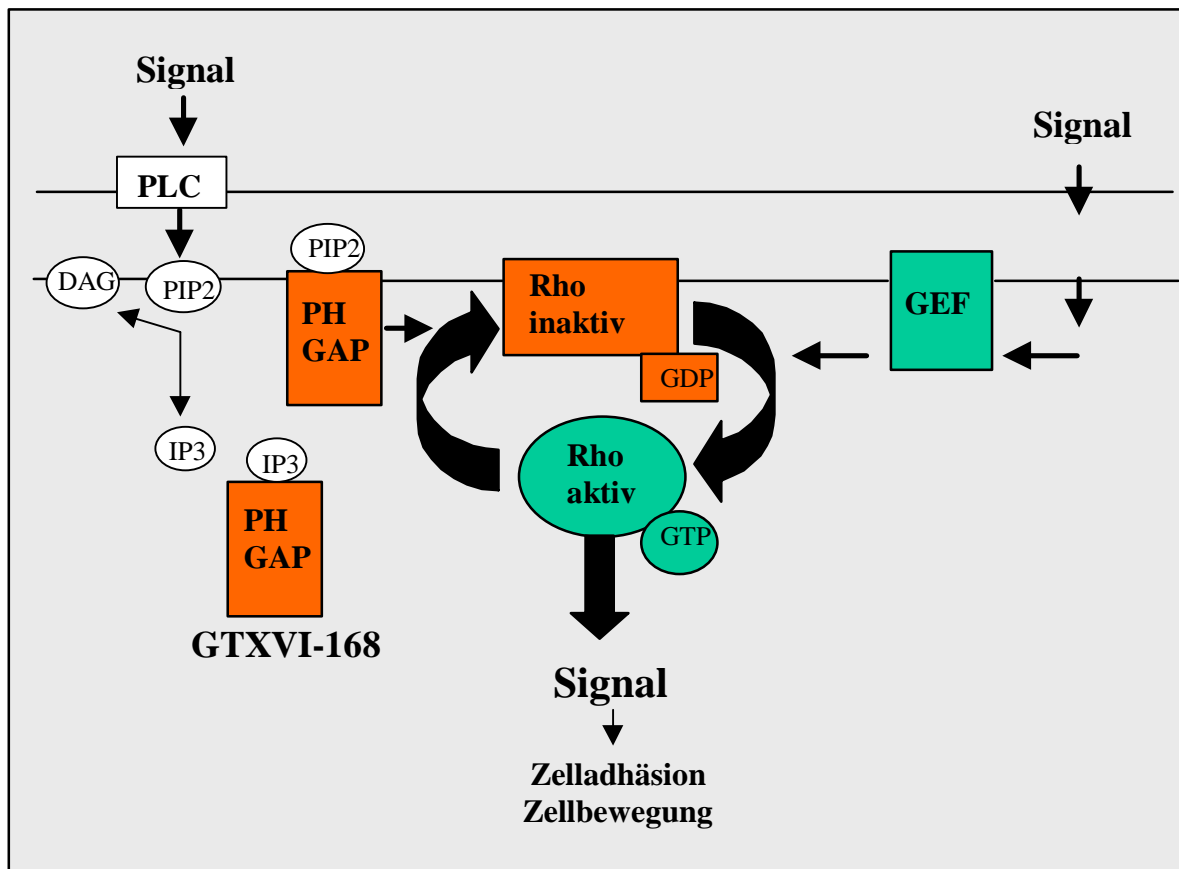


Abb. 49: Modell für die Funktion des GTXVI-168 Proteins in der Zelle. Durch die Interaktion der PH-Domäne mit PIP2 an der Zellmembran wird das GTXVI-168 Protein in die Nachbarschaft von Rho gebracht. Die GTXVI-168 GAP-Domäne kann dann direkt mit Rho interagieren und als negativer Regulator wirken. Die Translokation von GTXVI-168 zur Zellmembran könnte von PLC reguliert werden, welches PIP2 zu IP3 hydrolysiert. IP3 kann ebenfalls die PH Domäne binden, ist aber diffusibel.

4.2.1.3. GTXVI-168, CeGAP und "crosstalk"

Innerhalb der Subfamilie der RhoGAPs weist das GTXVI-168 Protein die höchste Homologie zum C-elegans CeGAP- Protein auf (Chen et al., 1994). Dieses gilt sowohl für die Aminosäuresequenz der GAP-Domäne, als auch für die PH-Domäne und für den allgemeinen Aufbau der beiden Proteine. Beide enthalten die PH-Domäne am N-Terminus und die GAP Domäne in der Mitte des Proteins. Diese Motive sind von einer nicht konservierten Sequenz von 112 AS (GTXVI-168) bzw. 238 AS (CeGAP) getrennt. Das CeGAP Protein kann mit Proteinen der Rho- und Ras-Subfamilien interagieren und die GTPase Aktivität von beiden stimulieren. Wenn das auch für das GTXVI-168 Protein gilt, könnte dieses eine Rolle in der Vernetzung verschiedener Signalwege spielen. Dieser Mechanismus wird als "crosstalk" bezeichnet. Eine Kopplung der Ras- und Rho-Signalwege über das p190 Protein wurde bereits von Settlemann et al.(1992) vorgeschlagen.

4.2.1.4. Ausblick

Die Frage nach der Natur der Signale, die das GTXVI-168 Protein regulieren, sowie des biologischen Effektes, der von diesem Signal ausgelöst wird, bleibt bis zur Charakterisierung der *in vivo* "upstream" und "downstream" Interaktionspartner von GTXVI-168 unbeantwortet. Die Spezifität und Affinität von GTXVI-168 für bereits identifizierte Mitglieder der Rho-Subfamilie sollte *in vitro* - zum Beispiel durch Immunopräzipitationsexperimente - getestet werden. Die Identifizierung der biologischen Interaktionspartner könnte über ein "Two Hybrid" Screen erfolgen und für die Analyse der GTPase-aktivierenden Funktion sollten GTPase Ansätze durchgeführt werden.

Die Frage der Auswirkung der Gene-trap Insertionsmutagenese im GTXVI-168 Protein bleibt ebenfalls unbeantwortet, da keine Keimbahn Transmission mit der GTXVI-168 Zelllinie erhalten wurde. Eine gezielte Inaktivierung des GTXVI-168 Gens durch homologe Rekombination könnte eventuell die Frage der Funktion des GTXVI-168 Genprodukts in der embryonalen Entwicklung aufklären.

4.2.2. Die Mauslinie GTIII6

Die Gene-trap Mauslinie GTIII-6 wurde aufgrund der herzspezifischen LacZ Expression im frühen Embryo für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Analyse in späteren Entwicklungsstadien zeigte jedoch breite Expression in fast allen Geweben. Das getroffene Gen stellte sich als ein unbekanntes Maus Gen mit Homologie zur kürzlich identifizierten PX (Phox-Homologie)-Domäne heraus. Verschiedene cDNA-Fragmente mit unterschiedlichen 5'- und 3'-Enden wurden isoliert und deuten auf die Existenz verschiedener Spleißvarianten hin. GTIII-6 homozygote Mäuse zeigten keine Entwicklungsdefizite und waren nach ihrer Geburt normal lebensfähig. Über mögliche Funktionen des GTIII-6 Genprodukts kann deshalb nur spekuliert werden.

4.2.2.1. Mögliche Funktion des GTIII-6 Proteins

Homologien der Aminosäuresequenz des GTIII-6 Gens zu Proteinen der NCBI-Datenbank wurden ausschließlich innerhalb eines 120 AS konservierten Motivs gefunden, das als PX (Phox-Homologie"-)Domäne bezeichnet wird. Hier wurde die höchste Homologie zu einem humanen Protein gefunden, das als "*iota*" bezeichnet aber auch die Homologie zu der bekannten Familie der "sorting nexins" war signifikant.

Die Funktion des "*iota*" Proteins ist unbekannt. Obwohl das Transkript, das für dieses Protein kodiert, im Rahmen eines Projekts zur Identifizierung von MEN-1(Multiple endocrine neoplasia type 1)-assoziierten Genen, isoliert wurde (Guru et al., 1997), ist jedoch bis zum heutigen Tag keine direkte Verbindung dieses Gens mit dem Syndrom berichtet worden und seine Funktion bleibt ebenfalls ungeklärt. Die humanen "sorting nexins" werden hingegen zur Zeit weitgehend charakterisiert. Sie sollen mit Rezeptoren der Zellmembran interagieren und bei ihrer Internalisierung eine Rolle spielen (Kurten et al., 1996; Renfrew Haft et al., 1998). Weitere "sorting nexins", wie z.B in *S. cerevisiae*, sind am Transport von Proteinen zwischen verschiedenen Organellen beteiligt (Ekena et al., 1995; Horazdovsky et al., 1997; Northweh und Hinds, 1997). Ein Sequenzhomologievergleich zwischen der PX-Domäne von 10 "sorting nexin"-Proteinen und 10 anderen PX-Domänen von nicht-"sorting nexins" erlaubte es, 32 konservierte Aminosäuren in den "sorting nexins" zu detektieren, von denen nur 14 AS in den nicht-"sorting nexin" PX-Domänen vorhanden sind. Das GTIII-6 Protein enthält 18 dieser konservierten Aminosäuren und das am höchsten konservierte Motiv (VxRRYSDFxxL, x für jede AS) ist zu 100% in GTIII-6 anwesend. Ein zweites Motiv in den "sorting nexins", das als Bindungsstelle für SH3 oder W/W Proteine vermutet wird, ist jedoch im GTIII-6 nicht

vorhanden. Eine Rolle des GTIII-6 Proteins in intrazellulären Transportsvorgängen kann jedoch anhand diesen Homologien nicht zweifelsfrei vorhergesagt werden.

Andere PX-Domänen Proteine wie p40phox und p47phox sind Untereinheiten des Enzyms NADPH-Oxidase und wieder andere, die Cpk-Gruppe von Proteinen, sind Phosphatidylinositol 3-Kinasen (Ponting, 1996). Die Homologie der GTIII-6 PX-Domäne zu diesen ist niedriger als für die "sorting nexins". PX-Domänen enthaltende Proteine sind sehr unterschiedlich in ihrer Struktur und Funktion und zur Zeit kann nur vermutet werden, daß die PX-Domäne an Protein-Protein Interaktionen beteiligt ist (Ponting, 1996).

4.2.2.2. Die Insertion in der GTIII-6 Mauslinie könnte nicht mutagen sein

Für die Abwesenheit eines Phänotyps existieren eine Reihe von Erklärungen. Eine davon ist, daß das aus dem Fusionstranskript resultierende GTIII-6 Protein weitgehend normale Funktion hat. Es fehlen nur 115 AS des Carboxylterminus. Die Anwesenheit der PX-Domäne könnte ausreichen, um ein funktionelles GTIII-6 Protein zu generieren.

Eine zweite Erklärung wäre die unvollständige Mutagenisierung des GTIII-6 Gens aufgrund eines Phänomens, das als "*splicing around*" bezeichnet wird. Hierbei werden endogene Gensequenzen am 3' der Gene-trap Vektor Insertionstelle transkribiert und der Vektor wird dann aus der pre-mRNA ausgespleißt, wobei signifikante Mengen an Wildtyp III-6 Transkript entstehen. Eine sehr geringe, kaum nachweisbare Menge an Wildtyp GTIII-6 Transkript wurde bei GTIII-6 homozygoten Embryonen durch PCR Amplifikation detektiert, jedoch nicht in adulten homozygoten Mäusen. Es könnte durchaus möglich sein, daß geringe Mengen an GTIII-6 Wildtyp Transkript für einen "rescue Effekt" ausreichen. Das "*splicing around*" Phänomen ist in vielen Fällen berichtet worden, bei denen ein Gene-trap Vektor in ein Intron integrierte, wie z.B. im Fall des N-myc knock-outs (Moens et al., 1992), der Gene-trap Integration in cordon-bleu (Gasca et al., 1995), der Gene-trap Integration in netrin (Serafini et al., 1996) und in Bodenin (Faisst und Gruss, 1998). Das "*splicing around*" könnte häufiger in Genen vorkommen, die alternativ gespleißt werden, um gewebespezifische Isoformen eines Proteins zu erzeugen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, daß die Auswahl alternativer Spleißstellen strikt kontrolliert ist (Übersicht: Horowitz und Krainer, 1994), entweder durch die Zusammensetzung des Spleißosoms oder durch regulatorisch wirkende Proteine. Es ist gelungen, Proteine zu identifizieren, die die Selektion von Spleißstellen bestimmen können (Caceras et al., 1994). Diese sind Bestandteile des Spleißapparats, und ihre gewebe- oder zellspezifische Verfügbarkeit kann zu einer selektiven Benutzung von Spleißstellen und damit

zu einer zell- und gewebespezifische Genexpression führen. Es ist also durchaus möglich, daß der Gene-trap Vektor ausgespleißt wird, wenn andere Spleißstellen als die En2SA präferentiell ausgewählt werden. Wenn dies noch auf eine gewebespezifische Art geschieht, hat das wichtige Konsequenzen, nicht nur für den Phänotyp der Insertionsmutagenese, sondern auch in Bezug auf das Expressionsmuster des LacZ-Reportergens im Vergleich zum endogenen Gen.

Eine weitere Erklärung für das Fehlen eines Phänotyps wäre die funktionelle Redundanz zwischen Mitgliedern einer Genfamilie oder zwischen Proteinen einer ähnlichen Funktion. Die Existenz zumindest eines Maus ESTs mit Homologie zur GTIII-6 cDNA deutet auf diese Möglichkeit hin.

4.2.2.3. Ausblick

Die LacZ Expressionsdaten zeigten, daß das GTIII-6 Gen während der embryonalen Entwicklung sehr schwach und weit verbreitet exprimiert wird und auch nach der Geburt und in adulten Mäusen in zahlreichen Geweben detektierbar ist. Diese Daten weisen auf eine Funktion in allen Stadien der embryonalen Entwicklung sowie des postnatalen Lebens hin. Da die Mauslinie keinen erkennbaren Phänotyp zeigte, sollte die Funktion des Proteins zunächst *in vitro* untersucht werden. Zum Beispiel könnte eine *in vitro* Translation von einer mit einem *tag* gekoppelten GTIII-6 Fusionsprotein Information zur subzellulären Lokalisation des Proteins liefern. Da die Expression des GTIII-6 Gens sich stets als extrem schwach erwiesen hat, könnten ebenfalls Überexpressionsversuche durchgeführt werden.

4.2.3. Die Mauslinie GTXVI-44

Eine detaillierte Analyse des LacZ Expressionsmusters der Mauslinie GTXVI-44 zwischen den Tagen 8 und 11.5 der Embryogenese zeigte eine interessante zeitliche und räumliche Korrelation mit der Bildung der embryonalen Blutgefäßen. In dieser Maus wurde das NFκB1-Gen getroffen, welches für drei Genprodukte kodiert: Die p50 Untereinheit des heterodimeren NFκB Transkriptionsfaktors und die Inhibitor-Proteine p105 und IκBγ (Inoue et al., 1992). Der NFκB Transkriptionsfaktor besteht im allgemeinen aus p50 und p65 Untereinheiten und reguliert eine Vielzahl von Genen, die an der Immunantwort und an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Überblick: Siebenlist et al., 1994). Seine Aktivität ist wiederum von Mitgliedern der IκB Familie von Inhibitor-Proteinen reguliert, unter denen sich p105 und IκBγ finden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Gene-trap Insertion nur die für p105 und IκBγ kodierende Sequenzen getroffen und inaktiviert hat. Im Einklang damit zeigten homozygote Mäuse der GTXVI-44 Linie eine, im Vergleich zu ihren heterozygoten und Wildtyp Geschwistern, hohe Sterblichkeitsrate, die vermutlich durch erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und Entzündungen an Organen verursacht wird. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für eine p105 Knockout Maus beschrieben (Ishikawa et al., 1998).

Zunächst soll ein Überblick über die Eigenschaften und Funktion der Mitglieder der NFκB und IκB Familien gegeben werden. Da eine frühe embryonale Expression des NFκB1 Gens bislang nicht bekannt war, werden anschließend die Expressionsdaten in Einzelheiten diskutiert. Zuletzt wird ein Modell zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zum Phänotyp führen, dargestellt.

4.2.3.1. Die Proteine der NFκB/Rel und IκB Familien

NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) ist ein Transkriptionsfaktor, der ursprünglich als ein induzierbares Protein in B-Lymphozyten entdeckt wurde, welches in der Lage war, den intronischen Enhancer des κ leichte-Kette des IgG zu binden (Sen und Baltimore, 1986a; 1986b). Die aktive Form von NFκB ist ein aus verschiedenen Kombinationen der Mitglieder der Rel/NFκB Proteinfamilie bestehender Dimerkomplex. Alle NFκB/Rel Mitglieder besitzen die konservierte Rel Homologie Domäne (RHD), die für die Translokation zum Kern, Bindung an κB DNA-Sequenzelemente, Dimerisierung und Interaktion mit den IκB Inhibitoren verantwortlich ist (Bours et al., 1992 a,b; Ryseck et al., 1992; Ip et al., 1993). In

der NFκB Familie können zwei Subgruppen unterschieden werden. Eine Subgruppe besteht aus p50 und p52, die ausschließlich eine Rel-Homologie Domäne enthalten. Die andere Subgruppe besteht aus RelA (p65), Rel (c-Rel), RelB und v-Rel, die neben der RHD eine Transaktivierungsdomäne besitzen. Obwohl der p50/p65 Heterodimerkomplex am häufigsten vorkommt, sind andere Kombinationen heterodimerer und homodimerer Komplexe von signifikanter Bedeutung. Die verschiedenen Komplexe unterscheiden sich z.B. in ihren Expressionsmustern (Ryseck et al., 1992; Carrasco et al., 1993; Feuillard et al., 1994), Präferenz bestimmter DNA-Bindungssequenzen (Hansen et al., 1992; Nakayama et al., 1992; Balkakin et al., 1993; Costello et al., 1993; Ganchi et al., 1993; Kunsch und Rosen, 1993), Transaktivierungspotential (Inoue et al., 1991; Richardson und Gilmore, 1991; Ishikawa et al., 1993; Inuzuka et al., 1994) und Kinetik der nukleären Translokation (Malitor et al., 1990; Doerre et al., 1993).

Im Cytosol liegt NFκB in Form eines inaktiven Komplexes mit einem gebundenen IκB Inhibitor-Protein vor. Auch in der IκB Familie werden zwei Subgruppen unterschieden: Eine besteht aus IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε und Bcl-3 und die andere aus p105 und p100. Alle Mitglieder besitzen eine konservierte Ankyrin-Domäne, die 6 bis 8 Ankyrin-Wiederholungen enthält. Diese Domäne inhibiert die DNA-Bindung der RHD-Domäne (Bours et al., 1990; Gosh et al., 1990; Kieran et al., 1990), indem sie das NLS (nukleäres Lokalisationssignal) maskiert (Berg et al., 1992; Ganchi et al., 1992; Henkel et al., 1992; Matthews et al., 1993; Zabel et al., 1993). P105 und p100 besitzen zusätzlich eine Rel-Homologie Domäne am N-Terminus. Obwohl IκB Proteine generell mit NFκB Dimeren interagieren (Beg et al., 1992), findet auch Bindung einiger Mitglieder zu NFκB Monomeren statt (Henkel et al., 1992; Rice et al., 1992; Mercurio et al., 1993; Naumann et al., 1993). Extrazelluläre Signale bewirken Abbau der IκB Proteine. Hierdurch wird NFκB frei, kann in den Kern transportiert werden und dort seine Funktion ausüben.

IκB Proteine unterscheiden sich in ihrer Spezifität für verschiedenen NFκB Dimer-Kombinationen. Während IκBγ (Identisch zum COOH-Terminus des p105 Proteins) preferentiell p50 Homodimere bindet und inhibiert, assoziiert IκBα sowohl mit p50 Homodimeren als auch mit p50/p65 Heterodimeren, aber inhibiert nur die letzteren. Darüberhinaus unterscheiden sich die verschiedenen IκB Proteine in der Natur der Signale die sie empfangen, die wiederum von unterschiedlichen extrazellulären Stimuli ausgelöst und

durch diverse Signalwege übertragen werden, wie z.B. durch die IKKs (I κ B Kinasen) (Stancovski und Baltimore, 1997)

NF κ B spielt eine zentrale Rolle bei Immunantworten und Entzündungsprozessen. Der Transkriptionsfaktor wird für die Expression von Genen der leichten κ -Kette von Immunoglobuline und vieler Cytokine (z.B. Interleukine 2 und 6, Interferon) benötigt. Diese Cytokine sind wiederum für die Proliferation, Differenzierung und funktionelle Prägung von Zellen des Immunsystems sowie Zellen des blutbildenden Systems wichtig. NF κ B ist der Effektor der Signale, die durch Infektionen, Entzündungen, Verletzungen und Stress ausgelöst werden und die zur Transkription von "*rapid response*" Genen führen.

Darüberhinaus sind NF κ B Faktoren auch an Wachstum, Tumorbildung und Apoptose beteiligt. Eine wachstumshemmende Rolle von NF κ B in epithelialen Zellen ist beschrieben (Seitz et al., 1998). Rekombinationsereignisse und Amplifikationen von NF κ B und I κ B kodierenden Genen sind in humanen Tumoren beobachtet worden (Überblick: Luque und Gelinas, 1997). NF κ B vermittelt Signale, die Zellen vor Apoptose schützen (Sonnenschein, 1997). Eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung wird aufgrund der Tatsache vermutet, daß das Drosophila p65 Homolog "dorsal" die Bildung der dorsoventralen Polarität steuert (Drier und Steward, 1997). In Hühnerembryonen ist NF κ B an der Entwicklung der Extremitäten beteiligt (Kanegae et al., 1998; Bushaid et al., 1998).

4.2.3.2. Eine mögliche Funktion von NF κ B1 in der Blutgefäßbildung

Während die Expression von NF κ B in der adulten Maus fast ubiquitär ist, wird seine Funktion in hohem Maße reguliert, wobei zwei Aktivitätszustände unterschieden werden können: konstitutiv aktiv und latent/induzierbar. In B- und T-Lymphozyten und in Monozyten findet man beispielsweise NF κ B Komplexe dauerhaft in aktiver Form im Kern, während in fast allen anderen Zellen NF κ B im Cytosol in Form eines inaktiven Komplexes mit dem gebundenen Inhibitorprotein I κ B vorliegt.

Die Expression und Aktivität von NF κ B während der embryonalen Entwicklung sind nur teilweise analysiert worden. Die Expression von c-rel und relB während der Ontogenese der lymphoiden Organe ist zum Beispiel weitgehend untersucht (Carrasco et al., 1993 und 1994), wobei die früheste Expression von c-rel im Thymus und in hämatopoetischen Zellen der fötalen Leber am Tag 13.5 (Carrasco et al., 1994) und die früheste Expression von RelB im

Thymus von E 14 Mausembryonen beobachtet wurden (Carrasco et al., 1993). Eine weitere Analyse des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters der Rel-Familienmitglieder während der Ontogenese des Thymus und der Milz (Weih et al., 1994) zeigte, daß zumindest in lymphoiden Organen die Mitglieder der NF κ B/Rel Familie differentiell exprimiert sind und daß manche NF κ B Komplexe (hauptsächlich RelB-bestehende Komplexe) die **konstitutive** κ B-Bindungsaktivität darstellen, während andere (RelA/p65- und c-Rel-bestehende Komplexe) an einer **induzierbaren** Aktivierung von Zielgenen beteiligt sind. Die Expression in lymphoiden Organe stimmt mit der Funktion von NF κ B als zentraler Regulator der Immunantwort überein.

Zur Untersuchung eines früheren Aktivitätsmusters von NF κ B während der embryonalen Entwicklung der Maus, haben Schmidt-Ullrich *et al.* (1996) transgene Mäuse generiert, die ein Konstrukt mit einem κ B-Promotor und einem LacZ-Reportergen trugen. Die Aktivierung des LacZ Reportergens war also abhängig von der Bindung aktiver NF κ B Komplexe zum κ B-Promotor. Auf dieser Art wurde gezeigt, daß die früheste Expression/ LacZ Aktivität erst am Tag 12.5 der Embryogenese im zentralen Nervensystem beginnt (eine konstitutive NF κ B Aktivität in adulten Neuronen war allerdings bereits bekannt: Bakalkin et al., 1993; Kaltschmidt et al., 1993, 1994; Rattner et al., 1993). In späteren Stadien korrelierte die LacZ Expression mit der Ontogenese des Immunsystems und unterstützte somit die vorherigen Daten (Carrasco et al., 1993; 1994).

In meiner Arbeit wurde in Gegensatz zu den Daten von Schmidt-Ullrich et al. (1996) frühe embryonale Expression des NF κ B1 Gens beobachtet, die anhand des im NF κ B1 Lokus integrierten LacZ-Reportergens verfolgt werden konnte. Die LacZ Expression zwischen E 8.5 und 11.5 korrelierte sowohl mit der *de novo* Bildung embryonaler Blutgefäße aus mesodermalen Vorläufer Zellen (Vaskulogenese) als auch mit dem Auf- und Umbau der Gefäße durch Angiogenese. Es stellt sich zunächst die Frage, warum ein solches LacZ Expressionsmuster nicht von Schmidt-Ullrich et al. (1996) beobachtet wurde. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, daß Schmidt-Ullrich et al (1996) nur eine Aktivierung bestimmter NF κ B Targetgene durch Bindung von NF κ B Komplexe an κ B-Promotorsequenzen nachgewiesen haben, während die in der GTXVI-44 Mauslinie beschriebene LacZ Aktivität hingegen einer Transkription des NF κ B1 Gens (bzw. der entsprechenden p50/p105 und/oder I κ B γ mRNAs) entspricht.

Eine mögliche Funktion von NFκB1-Genprodukte während der Ontogenese des Gefäßsystems wäre die Aktivierung endothelialer Marker wie die Adhensions Moleküle E-selektin, ICAM-1 ("*intercellular cell adhesion molecule-1*") und VCAM-1 ("*vascular cell adhesion molecule-1*") (Wehlan et al., 1991; Iademarco et al., 1992; Kaszubska et al., 1993; Shu et al., 1993) und der Wachstumsfaktor VEGF (Chua et al., 1998), deren Promotoren alle NFκB Bindungsstellen besitzen. Neben seiner Rolle als Adhäsionsmolekül für Immunzellen zum Endothel der Blutgefäße ist VCAM-1 auch an der frühen embryonalen Entwicklung beteiligt. VCAM-1 Knockout Mäuse (Gurtner et al., 1995) zeigen Defekte bei der Fusion des Chorions zum Allantoid und bei der Bildung der Plazenta. VEGF spielt eine entscheidende Rolle in der Angiogenese und der Bildung von Blutinseln (Ferrara et al., 1996). Jedoch gegen eine direkte Funktion von NFκB bei der Aktivierung endothelspezifischer Targetgenen wie VEGF sprechen die Daten aus den p50 (Sha et al., 1995) und p50/p52 Doppelknockout Mäusen (Iotsova et al., 1997). Diese Mutationen sind nicht embryonal lethal und es wurde kein Phänotyp bei der Blutgefäßbildung oder Endothelzellendifferenzierung beobachtet. Es ist deshalb denkbar, daß diese potentielle NFκB Aktivität nicht direkt notwendig für die Bildung der Blutgefäße ist, aber auf einer gewissen Art eine schützende Rolle spielt. Es ist zum Beispiel bekannt, daß Endothelzellen resistent zu apoptotischen Signale sind, um die Integrität der Blutgefäße aufrechtzuerhalten. Diese Resistenz wird durch die Funktion von antiapoptotischen Genen wie die bcl Familie Mitglieder vermittelt, die wiederum von einer NFκB Aktivität induziert werden (Badrichani et al., 1999).

4.2.3.3. Die Funktion der p105 und I κ B γ Inhibitor-Proteine in der Regulation von NF κ B

Das p105 Inhibitor-Protein bindet hauptsächlich p50 Monomere (aber auch p65) (Ishikawa et al., 1998), während I κ B γ preferentiell p50 Homodimere inhibiert (Bell et al., 1996). Auf extrazelluläre Signale hin werden beide phosphoryliert, was das Signal für den Eintritt in den Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg darstellt (Verma et al., 1995; Baldwin, 1996; Stancovski und Baltimore, 1997; Verma und Stevenson, 1997). Die Proteolyse der p105 und I κ B γ Inhibitor-Proteine setzt dann die inhibierten p50-Monomere bzw. -Homodimere frei, die in Form von NF κ B Komplexen in den Kern transportiert werden, und dort transkriptionsregulierende Funktion an Zielgenen ausüben. Es liegt nahe, daß die Abwesenheit der Inhibitoren zu drastischen Effekten in der Regulation von p50 und letztlich in der NF κ B-Antwort führen sollte. Folgendes Modell (Abb. 50) veranschaulicht die Konsequenzen, die der Verlust der p105 und I κ B γ Inhibitor-Proteine auslöst: In Abwesenheit des p105 findet die cytosolische Inhibition von p50- und p65-Monomeren nicht statt. Folglich entsteht ein Überschuß an freien Monomeren, die p50-Homodimere oder Heterodimere wie p50/p65 bilden können. In Abwesenheit von I κ B γ können p50 Homodimere frei in den Kern wandern. Da p50 Proteine κ B-DNA Sequenzen binden können, aber keine Transaktivierungsdomäne besitzen, wird vermutet, daß die hohe Besetzung von κ B-Bindungsstellen die Transaktivierung von NF κ B - Zielgenen verhindert.

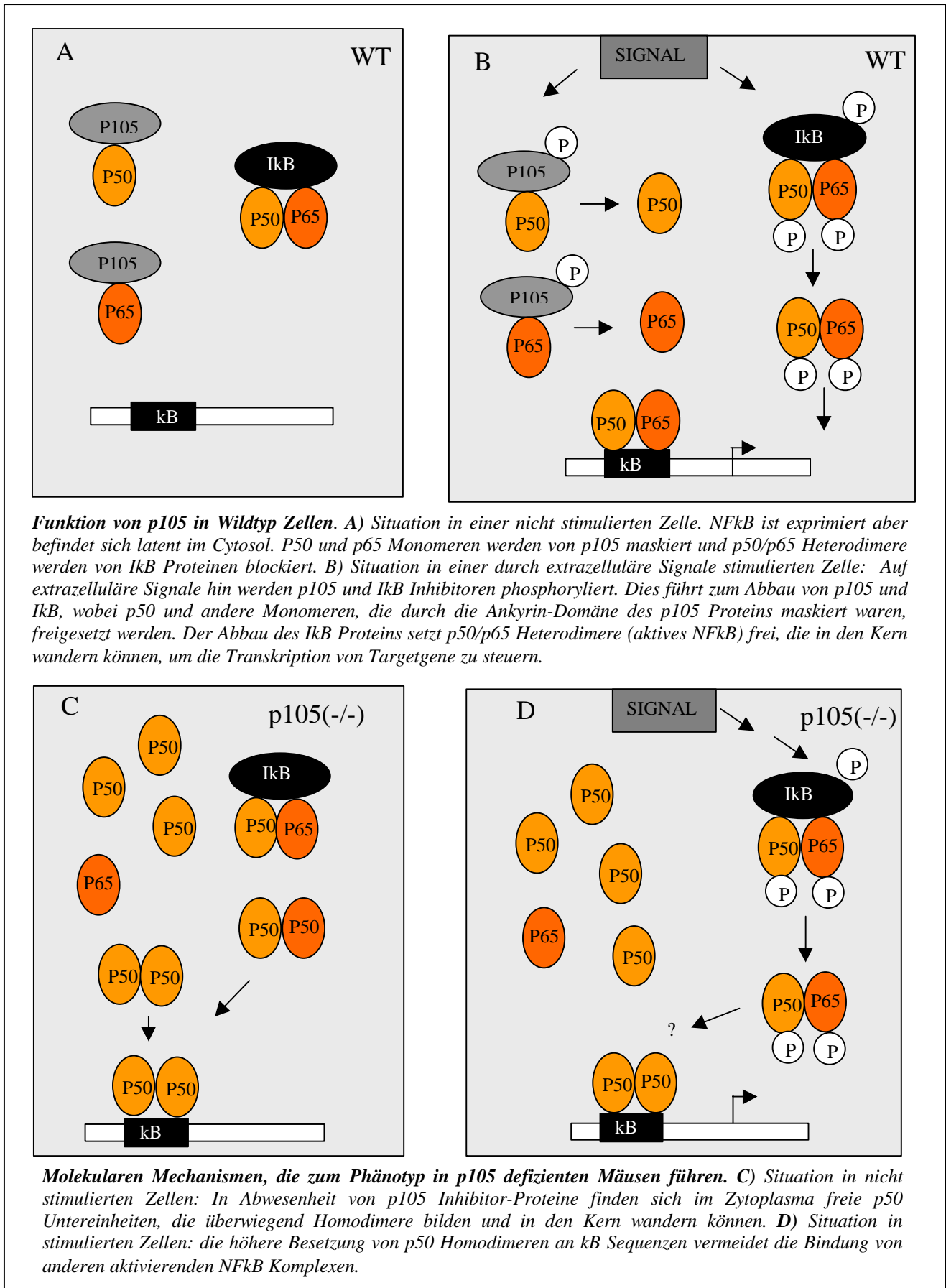


Abb. 50: Modell für die Funktion von p105

Der in den GTXVI-44 homozygoten Mäusen beobachtete Phänotyp (3.2.3.3) stimmt in wesentlichen mit dem Phänotyp der p105-Knockout Mäuse (Ishikawa et al., 1998) überein. Hier wurde ebenfalls eine hohe Sterblichkeitsrate und histologische Veränderungen der Milz, Lymphknoten, Leber und Lunge beobachtet. Wie im Modell vorgeschlagen (Abb. 42D), wurde in p105 $-/-$ Mäusen ein Überschuß an p50 Homodimeren im Zellkern nachgewiesen und EMSA-Experimente zeigten, daß diese p50-Homodimeren die höchste κ B-Bindungsaktivität darstellten. Eine Analyse der Expression von NF κ B-Targetgenen in verschiedenen lymphoiden Organen zeigte beträchtliche Veränderungen in der Transkriptionsrate von G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-2, TNF- β , ICAM-1, TNF- α und IL-6. Einige dieser Cytokine waren hochreguliert in bestimmten lymphatischen Organen und herunterreguliert in anderen. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß p50 Homodimere auf eine gewebespezifische Art die Transkription von NF κ B-Targetgenen aktivieren oder reprimieren können. Die erhöhte und konstitutive Aktivität der p50-Homodimeren in p150 $-/-$ Mäusen sollte zum beobachteten Phänotyp führen. Aufgrund der ähnlichen *targeting*-Ereignisse und Phänotypen zwischen den p105-Knock-out und den GTXVI-44 Mäusen ist zu erwarten, daß dies auch der Fall in GTXVI-44 Homozygoten ist. Jedenfalls wurde in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Wirth nachgewiesen, daß in GTXVI-44 $-/-$ Mäusen tatsächlich kein p105 Inhibitor-Protein, jedoch ein Überschuß an p50 produziert wird. Damit wäre die Gene-trap Linie GTXVI-44 eine vollständige Phänokopie des Knock-outs.

4.2.3.4. Ausblick

Die Frage nach der Expression und Funktion des NF κ B1 Gens in der Bildung der Blutgefäßen soll weiter untersucht werden. Zunächst soll die Anwesenheit von Wildtyp NF κ B1 Transkripten in der Embryogenese überprüft werden. Dabei ist es wichtig, das in GTXVI-44 Embryonen beobachtete LacZ Expressionsmuster mittels "whole mount"-*in situ* Hybridisierung mit antisense RNA-Sonden reproduzieren zu können. Im folgenden sollte durch immunohistochemische Färbung die Anwesenheit von p50 und p105 Proteinen sowie die Existenz von funktionellen NF κ B-Komplexen im Kern nachgewiesen werden. Die Expression von potentiellen NF κ B-Targetgenen in Blutgefäßen kann ebenfalls in homozygoten GTXVI-44 Mäusen untersucht werden.

4.2.4. Die Mauslinie 2A-53

Die Gene-trap Mauslinie 2A-53 wurde in Gegensatz zu GTIII-6 und GTXVI-44 mit einem Exon-trap Vektor etabliert. Die Insertion des Vektors ist im Maus *Lis1* (*Lisencephaly type 1*) Gen erfolgt, das in Patienten mit Miller-Dieker Syndrom (MDS) für den neuronalen Migrationsphänotyp verantwortlich ist. In 2A-53 Mäusen führte die Exon-Trap Integration nicht zu einem kompletten Verlust des Lis 1 Produkts, und auch zu keinem *Lisencephaly* Phänotyp. Homozygote Männchen sind steril aufgrund von Defekten in der Spermatogenese.

4.2.4.1. Integration des Exon-trap Vektors und Aktivierung des Fusionstranskripts

Exon-trap Vektoren unterscheiden sich von Gene-trap Vektoren dadurch, daß sie keine Spleißakzeptorstelle (SA) vor dem Reporter gen enthalten. Deshalb ist hier eine Integration in ein Exon Voraussetzung für die Expression des Reporter gens. Die Mutagenisierungseffizienz mit Exon-trap Vektoren sollte höher sein als mit Spleißakzeptor-Konstrukten, da hier das Problem des Reporter genverlustes durch "*splicing around*" minimiert wird. (s. 4.2.2 und Moens et al., 1992; Gasca et al., 1995; Serafini et al., 1996; Faisst und Gruss, 1998).

RACE-PCR Versuche zur Klonierung des Fusionstranskripts in 2A-53 Mäusen waren bisher nicht erfolgreich, so daß unklar bleibt, in welchem Gen die Fusion des Reporters stattgefunden hat. Es wurde deshalb der genomische Integrationsort aus der Mauslinie 2A-53 kloniert in der Hoffnung, die flankierende Exonsequenz identifizieren zu können. Zwei isolierte genomische Klone zeigen, daß der Exon-trap Vektor im *Lis1* Locus der Maus integriert ist, jedoch nicht in einem der bekannten Exons, sondern vielmehr in einer unbekannt Sequenz, die im Intron 2 des *Lis1* Gens bisher nicht sequenziert wurde. Northern blot Analysen zeigen ein vergrößertes LacZ-Transkript in allen Geweben, die normalerweise *Lis1* exprimieren. Dies spricht dafür, daß zelluläre Sequenzen im Fusionstranskript vorhanden sind und diese unter der Kontrolle des *Lis1* Gens stehen. Welche Möglichkeiten für die Erklärung dieses Transkripts sind denkbar?

- 1) Es ist bekannt, daß das *Lis1* Gen alternativ gespleißt wird und Testis-spezifische Transkripte existieren. Es ist daher möglich, daß in der unbekannt genomschen Sequenz des Introns 2 ein weiteres Exon existiert, in das der Trap-Vektor integriert hat. Diese Frage sollte durch Analyse aller Testis-spezifischen Transkripte zu klären sein.

- 2) Das Fusionstranskript könnte durch aberrantes Spleißen zu einer kryptischen Spleißstelle entstehen, wodurch native Transkripte im Testis verringert werden könnten. In der Tat wird eine drastische Verringerung eines 2,4 kb Transkripts in Testis beobachtet.
- 3) Der Exon-trap Vektor könnte in ein unbekanntes Gen, das innerhalb der 15 kb unbekannter Sequenz im Lis 1 Intron 2 liegt, integriert haben. Diese Möglichkeit erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da die beobachtete LacZ Expression der des Lis1 Gens entspricht.
- 4) Das LacZ Transkript könnte gar kein Fusionstranskript sein, sondern von einem kryptischen Promotor im Locus exprimiert werden. Dabei wäre allerdings zu fordern, daß hierdurch ein Testis-spezifisches Transkript, sei es Lis1 oder ein anderes verändert wird, wodurch der Phänotyp erklärbar wird.

Alle Erklärungsversuche gehen davon aus, daß nur die identifizierte Integration stattgefunden hat und nicht ein zweiter Locus betroffen ist. Die vorher erhobenen Daten sprechen für ein singuläres Integrationsereignis.

4.2.4.2. Das Lis 1 Intron 2

Die Tatsache, daß in homozygoten 2A-53 Mäusen nicht die Größe, sondern die Menge einer der Lis1 mRNA Species reduziert ist, könnte ein Hinweis darauf sein, daß möglicherweise kein Exon, sondern eher regulatorische Sequenzen durch die Exon-trap Integration, zumindest partiell, getroffen worden sind. Welche Bedeutung hat Intron 2 und die hier direkt getroffenen Sequenzen für die Transkription oder eventuell Spleißen des 2,4 kb Transkripts? Um diese Frage beantworten zu können, müssten diese Sequenzen identifiziert und analysiert werden. Da sehr häufig Deletionen im Laufe eines Integrationsereignis vorkommen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese im klonierten Lis1-Exon-trap Allel fehlen. Mindestens eine Deletion von 300 bp ist während der Analyse der λ - genomischen Klone aufgefallen (nicht gezeigt). Die Klonierung des Lis1 Wildtyp Allels einschließlich der 15 kb unbekannter Intron 2 Sequenz ist erforderlich.

Interessanterweise zeigt die Klonierung des vollständigen Introns 2 (entspricht Intron 1 bei Menschen) sowohl im Menschen (Chong et al., 1997), als auch in der Maus (Peterfy et al., 1998) große Schwierigkeiten, weshalb diese Sequenz bis zum heutigen Tag unbekannt

geblieben ist. In der Maus umfaßt Intron 2 etwa 30 kb, im Menschen soll es ca. 50 kb groß sein. Weiterhin zeigte eine Analyse von mehreren MDS und ILS Patienten mit Deletionen und Translokationen im Lis 1 Lokus, daß sich die Spaltstellen in vielen dieser Patienten im Intron 2 befanden (Chong et al., 1997; Kurahashi et al., 1998). In diesen Stellen wurden repetitive Elemente nachgewiesen. Daher wird vermutet, daß diese Sequenzen an Rekombinationsereignissen beteiligt sein könnten, die zu Translokationen führen (Kurahashi, 1998).

4.2.4.3. Die Funktion von Lis1 in der Spermatogenese

Es besteht eine Korrelation zwischen der Reduktion der Expression des 2,4 kb Lis1 Transkripts in Testis und dem Phänotyp in Maus. Diese Resultate deuten auf eine Funktion des Maus Lis 1 Gens in der Spermatogenese hin, was bislang nicht beschrieben worden war. Eine Rolle von Lis1 in der Oogenese ist jedoch für das *Drosophila* Lis1 Homolog vor kurzem entdeckt worden (Liu et al., 1999). Eine Funktion in der Spermatogenese wurde in Lis1 +/- Mäusen nicht beobachtet, da die Lis1 Null-Mutation embryonal lethal ist und die Mäuse bereits vor der Geburt sterben (Hirotsune et al., 1998). Die Lis1 +/- Mäuse zeigen einen *Lissencephaly* Phänotyp mit neuronalem Migrationsdefekt (Hirotsune et al., 1998), so daß sie als Modell für das menschliche Syndrom untersucht werden können.

Lis1 ist ein Protein mit diversen Interaktionen. Die Lis1 Interaktion mit dem Cytoskelett könnte für die neuronale Migration wichtig sein (Sapir et al., 1997). Durch die Interaktion mit NUDC (Morris et al., 1998), ein Kernmigrationsprotein in *Aspergillus nidulans* (Osmani et al., 1990; Xiang et al., 1995), könnte Lis1 in Zellkernwanderungsprozessen, die wiederum auch für die neuronale Migration wichtig sind, eine Rolle spielen. Letztlich könnte Lis 1 durch seine Interaktion mit den katalytischen (β und γ) Untereinheiten des PAFAH (Platelet activating factor acetylhydrolase)-Enzyms das PAFAH in der Nähe seines Substrats (PAF) bringen, das Membran gebunden ist (Vallari et al., 1990). Aber durch welche Interaktionen übt Lis1 seine Funktion in der Spermatogenese aus?

In der *Drosophila* Oogenese ist Lis 1 für die Bildung und Aufrechterhaltung des Fusoms, einen cytoplasmischen Vesikel in Keimbahnzellen, notwendig. Das Fusom hat eine unentbehrliche Funktion in der Regulation der synchronisierten Teilung von Zysten-Zellen und in der Etablierung der Zysten-Polarität. Die schnelle synchronisierte Teilung der Zystoblasten ist die Grundlage für die Bildung der normalen Keimbahnzysten und für die

ultimative Differenzierung der Oozyte und der Nährzellen. Das Fusom wächst aus einer kleinen "Kugel" zu verzweigten Struktur, die durch die zytoplasmatische Brücken (die Ringkanäle) Kontakte zu jeder Zelle des Zysten bildet (Lin et al., 1994; McKearin, 1997; de Cuevas und Spradling, 1998). Während der Zellteilung assoziiert ein Pol der mitotischen Spindel mit dem Fusom (Lin und Spradling, 1995; Deng und Lin, 1997). Die Lis1 mutanten Ovarien zeigen einen drastischen Phänotyp: Der Anzahl an Zellen in den Zysten ist wesentlich reduziert und die Differenzierung der Oozyten ist blockiert. Das Fusom in diesen mutanten Zysten ist mißgebildet und zeigt kaum Verzweigungen (Liu et al., 1999).

Die Oogenese in Vertebraten verläuft anders als in *Drosophila*. Hier bilden sich keine Zysten und keine Fusomen, Nährzellen sind nicht vorhanden. Dies ist anders bei der Spermatogenese, in der während der gesamten Entwicklung (von Spermatogonien bis Spermatischen) die Abkömmlinge einer Urkeimzelle miteinander durch zytoplasmatische Brücken verbunden sind. Erst die fertigen Spermien lösen sich voneinander. Das Fusom ist auch in allen Spermiovorläuferzellen vorhanden und dient zur Koordinierung der mitotischen Zellteilungen. Während der Meiose wird es aufrechterhalten und entwickelt sogar weitere Verzweigungen (Hime et al., 1996).

Diese Parallelen zwischen der Oogenese in *Drosophila* und der Spermatogenese (in der Maus) legen nahe, daß Lis1 auch hier an der Bildung des Fusoms beteiligt sein könnte. Die Tatsache, daß 2A-53 homozygote Weibchen keine Defekte in der Oogenese zeigen, erklärt sich durch die unterschiedliche Ontogenese.

4.2.4.4. Ausblick

Zunächst sollten die homozygoten 2A-53 Männchen durch Western blot Analyse auf eine Reduktion des Lis 1 Proteins in Testes untersucht werden. Der Phänotyp in der Spermatogenese sollte in Detail untersucht werden. Ein Startpunkt für die Untersuchung wäre, anhand des *Drosophila* Modells, der Nachweis von Fusomproteinen mittels immunohistochemischer Färbung. Von hoher Priorität ist die Klonierung und Analyse des β -Geo Fusionstranskripts, um seine Herkunft und Verbindung mit dem Phänotyp erklären zu können.

4.3. Gene-trap im Rahmen des Genom Projekts

In den nächsten Jahren werden die Genome von Maus und Mensch vollständig sequenziert sein. Aber selbst die vollständige Sequenz eines Gens gibt keine Information über seine Funktion. Das langfristige Ziel des Genomprojekts ist die Analyse der biologischen Funktion der Gene. Um eine funktionelle Analyse des Genoms zu ermöglichen, braucht man eine repräsentative Sammlung von Mutanten, wie sie bereits für *Drosophila* und *C. elegans* existiert. ENU Mutagenese und Gene-trap Insertionsmutagenese sind hierfür wertvolle Methoden. Beide Projekte werden im Rahmen des DHGP (Deutsches Human Genom Projekt) durchgeführt (<http://www.dhgp.de/PROJEKTE/FORSCHUNG/MODELLSYSTEME>). Durch den ENU Maus Mutagenese Screen wurden bereits mehr als 50 mutante Mauslinien erzeugt, die z.Z charakterisiert werden. Im Rahmen des Gene-trap Projekts ("Functional analysis of mammalian genes by a large scale gene-trap approach in mouse embryonic stem cells") wurden bislang 1813 mutante Maus ES-Zellklone generiert, von denen 501 (27%) getroffene Gene sequenziert worden sind. 196 (39%) dieser Sequenzen zeigen Homologie zu bekannten relevanten Genen, 109 (21%) sind ESTs und 73 (14%) zeigen keine Homologie zu Genen in der NCBI-GenBank Datenbank.

Für das Verständnis von Krankheiten, ihrer Ursache, ihres Verlaufs, aber auch für die Entwicklung von Behandlungsmethoden sind Tiermodelle für menschliche Krankheiten extrem hilfreich und wichtig. Um Mausmodelle für menschliche Krankheiten zu erzeugen, werden Gene-trap Klone mit Insertionen in Genen, die mit menschlichen Krankheiten verbunden sind, für die Generierung mutanter Mausstämme eingesetzt.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmadian MR, Wiesmüller L, Lautwein A, Bischoff FR, Wittinghoffer A (1996). Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating proteins p120^{GAP} and neurofibromin. *J Biol Chem* **271**, 16409-15.

Akam M (1989). Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* **57**, 347-49.

Albrecht U, Abu-Issa R, Rätz B, Hattori M, Aoki J, Arai H, Inoue K, Eichele G (1996). Platelet activating factor acetylhydrolase expression and activity suggests a link between neuronal migration and platelet-activating factor. *Dev Biology* **180**, 579-93.

Algate PA, McCubrey JA (1993). Autocrine transformation of hematopoietic cells resulting from cytokine message stabilization after intracisternal A particle transposition. *Oncogene* **8**, 1221-32.

Allen M, Chu S, Brill S, Stotler C, Buckler A (1998). Restricted tissue expression pattern of a novel human rasGAP-related gene and its murine ortholog. *Gene* **218**, 17-25.

Allen ND, Cran DG, Barton SC, Hettle S, Reik W, Surani MA (1988). Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. *Nature* **333**, 852-55.

Aspenström P (1999). The Rho-GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* **246**, 20-25.

Ausubel FM, Brentt R, Kingston RE, Moore DT, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Green Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Badrichani AZ, Stroka DM, Bilbao G, Curiel DT, Bach FH, Ferran C (1999). Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest* **103**, 543-53.

Baehrecke EH (1997). Who encodes a KH RNA binding protein that functions in muscle development. *Development* **124**, 1323-32.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995). Embryonic stem cells express neural properties *in vitro*. *Dev. Biol.* **168**, 342-57.

Bakalkin GYA, Yakovleva T, Terenius L (1993). NF-kB-like factors in the murine brain. Developmentally-regulated and tissue specific expression. *Mol Brain Res* **20**, 137-46.

Baker RK, Lyons GE (1996). Embryonic stem cells and *in vitro* muscle development. *Curr. Topics Dev. Biol.* **33**, 263-79.

Baldwin AS Jr (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-83.

Balling R, Deutsch U, Gruss P (1988). *Undulated*, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of the Pax 1. *Cell* **55**, 531-35.

- Barrett T, Xiao B, Dodson EJ, Dodson G, Ludbrook SB, Nurmahomed K, Gamblin SJ, Musacchio A, Smerdon SJ, Eccleston JF** (1997). The structure of GTPase-activating domain from p50rhoGAP. *Nature* **385**, 458-61.
- Beg AA, Ruben SM, Scheinmann RI, Haskill S, Rosen CA** (1992). I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* **6**, 1899-913.
- Belich MP, Salmeron A, Johnston LH, Ley SC** (1999). TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF- κ B-inhibitory protein NF- κ B1 p105. *Nature* **397**, 363-8.
- Bell S, Matthews JR, Jaffray E, Hay RT** (1996). I κ B γ inhibits DNA binding of NF- κ B p50 homodimers by interacting with residues that contact DNA. *Mol Cell Biol* **16**, 6477-85.
- Bellen HJ, O'Kane CJ, Wilson C, Grossniklaus U, Pearson RK, Gehring WJ** (1989). P-element-mediated enhancer detection. A versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes & Dev.* **3**, 1288-1300.
- Bhat K, McBurney MW, Hamada H** (1988). Functional cloning of mouse chromosomal loci specifically active in embryonal carcinoma stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3251-59.
- Bier E, Vaessin H, Shepherd S, Lee K, McCall K, Barbel S, Ackerman L, Caretto R, Uemura T, Grell E, Jan LY, Jan, YN.** (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes & Dev.* **3**, 1273-87.
- Bober E, Brand-Saberi B, Epensperger C, Witting J, Balling R, Paterson BM, Arnold H.-H, Christ B** (1994). Initial steps of myogenesis in somites are independent of influence from axial structures. *Development* **120**, 3073-82.
- Bode VC** (1984). Ethylnitrosourea mutagenesis and the isolation of mutant alleles for specific genes located in the T region of mouse chromosome 17. *Genetics* **108**, 457-70.
- Boguski MS, McCormick F** (1993). Proteins regulating ras and its relatives. *Nature* **366**, 643-54.
- Boullet P, Oulad-Abdelghani M, Vicaire S, Garnier JM, Schuhbauer B, Dolle P, Chambon P** (1995). Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, Stra 1 (mouse LERK-2/Eplg2). *Dev Biol* **170**, 420-33.
- Bourne, HR** (1997). The arginine finger strikes again. *Nature* **389**, 673-74.
- Bours V, Villalobos J, Burd PR, Kelly K, Siebenlist U** (1990). Cloning of a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs. *Nature* **348**, 76-80.
- Bours V, Franzoso G, Brown K, Park S, Azarenko V** (1992 a). Lymphocyte activation and the family of NF- κ B transcription factor complexes. *Curr. Top. Microbiol. Immunolog.* **182**, 411-20.

- Bours V, Burd PR, Brown K, Villalobos J, Park S** (1992b). A novel mitogenic inducible gene product related to p50-p105-NF-kB participates in transactivation through a kB site. *Mol. Cell. Biol* **12**, 685-95.
- Braun T, Rudnicki MA, Arnold H.-H., Jaenisch R** (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death.
- Brigle KE, Westin EH, Houghton MT, Goldman ID** (1992). Insertion of an intracisternal A particle within the 5'-regulatory region of a gene encoding folate-binding protein in L1210 leukemia cells in response to low folate selection. Association with increased protein expression. *J Biol Chem* **267**, 22351-5.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM** (1987). *Biotechniques* **5**, 376-79.
- Bushaid PB, Brantley DN, Yull FE, Blaeuer GL, Hoffma LH, Niswander L, Kerr LD** (1998). Inhibition of NF-kB activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature* **392**, 615-18.
- Calmels T, Callebaut I, Leger I, Durand P, Bril A, Mornon J-P, Souchet M** (1998). Sequence and 3D structural relationship between mammalian Ras- and Rho-specific GTPase-activating proteins (GAPs): the cradle fold. *FEBS Lett* **426**, 205-11.
- Capecchi MR** (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-92.
- Carrasco D, Ryseck R-P, Bravo R** (1993). Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development* **118**, 1221-31.
- Carrasco D, Weih F, Bravo R** (1994). Developmental expression of the mouse c-rel proto-oncogene in hematopoietic organs. *Development* **120**, 2991-3004.
- Casabadian MJ, Cohen SN** (1979). Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *In vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4530-33.
- Chen F, Cooney AJ, Wang Y, Law SW, O'Malley BW** (1994). Cloning of a novel orphan receptor (GCNF) expressed during germ cell development. *Mol Endocrinol* **8**, 1434-44.
- Chen T, Richard S** (1998). Structure-function analysis of Qk1: a lethal point mutation in mouse quaking prevents homodimerization. *Mol Cell Biol* **18**, 4863-71.
- Chen W, Blanc J, Lim L** (1994). Characterization of a promiscuous GTPase activating protein that has a bcr-related domain from *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **269**, 820-23.
- Chirgwin JM, Przybyla RJ, MacDonald RJ, Rutter WJ** (1979). *Biochemistry* **18**, 5294-99.
- Chomzyenski P, Sacchi N** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.

Chong SS, Pack SD, Roschke AV, Tanigami A, Carrozzo R, Smith ACM, Dobyns WB, Ledbetter DH (1997). A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Human Molecular Genetics* **6**, 147-55.

Chowdury K, Dressler G, Breier G, Deutsch U, Gruss P (1988). The primary structure of the murine multifinger gene mKr2 and its specific expression in developing and adult neurons. *EMBO J* **7**, 1345-53.

Chua CC, Hamdy RC, Chua BH (1998). Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **25**, 891-7.

Chung DJ, Wright AE, Clerch LB (1998). The 3'untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry* **37**, 16298-306.

Cifuentes ME, Delaney T, Rebecchi MJ (1994). D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate inhibits binding of phospholipase C- δ 1 to bilayer membranes. *J Biol Chem* **269**, 1945-1948.

Cifuentes ME, Honkanen L, Rebecchi MJ (1993). Proteolytic fragments of phosphoinositide-specific phospholipase C- δ 1: catalytic and membrane binding properties. *J Biol Chem* **268**, 11586-93.

Cohen GB, Ren R, Baltimore D (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **80**, 237-48.

Conlon RA, Rossant J (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* **116**, 357-68.

Cooney AJ, Hummelke GC, Herman T, Chen F, Jackson KJ (1998). Germ cell nuclear factor is a response element-specific repressor of transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **245**, 94-100.

Costello R, Lipcey C, Algarte M, Cerdan C, Bauerle PA (1993). Activation of primary human T-lymphocytes through CD2 plus CD28 adhesion molecules induces long term nuclear expression of NF- κ B. *Cell Growth Differ* **4**, 429-39.

Couldrey C, Carlton MBL, Ferrier J, Colledge WH, Evans MJ (1998). Disruption of murine α -Enolase by a retroviral gene trap results in early embryonic lethality. *Dev Dyn* **212**, 284-92.

Coy JF; Sedlacek, Bachner D, Hameister H, Joos S, Lichter P, Delius H, Poutska A (1995). Highly conserved 3'UTR and expression pattern of FXR1 points to a divergent gene regulation of FXR1 and FMR1. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2209-18.

Davidson D, Graham E, Sime C, Hill R (1988). A gene with sequence similarity to *Drosophila engrailed* is expressed during the development of the neural tube and vertebrate in the mouse. *Development* **104**, 315-316.

De Cuevas M, Spradling AC (1998). Morphogenesis of the *Drosophila* fusome and its implications for oocyte specification. *Development* **125**, 2781-89.

- Deng W, Lin H** (1997). Spectrosomes and fusomes anchor mitotic spindles during asymmetric germ cell divisions and facilitate the formation of a polarized microtubule array for oocyte specification in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **189**, 79-94.
- Doerre S, Sista P, Sun S-C, Ballard DW, Greene WC** (1993). The rel protooncogene product represses NF- κ B p65-mediated transcriptional activation of the long terminal repeat of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1023-27.
- Doetschman T.C, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R** (1985). The *in vitro* development of blastocysts-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **87**, 27-45.
- Drier EA, Steward R** (1997). The dorsoventral signal transduction pathway and the Rel-like transcription factors in *Drosophila*. *Semin Cancer Biol* **8**, 83-92
- Duprez DM, Kostakopoulou K, Francis-West PH, Tickle C, Brickell PM** (1996). Activation of Fgf-4 and HoxD gene expression by BMP-2 expressing cells in the developing chick limb. *Development* **122**, 1821-8.
- Ebersole TA, Chen Q, Justice MJ, Artzt K** (1996). The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins. *Nat Genet* **12**, 260-5.
- Eichele G** (1989). Retinoids and vertebrate limb pattern formation. *Trends Genet.* **5**, 246-51.
- Ekena K, Stevens TH** (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* MVP1 gene interacts with VPS1 and is required for vascular protein sorting. *Mol Cell Biol* **15**, 1671-78.
- Faisst AM, Gruss P** (1998). Bodenin: A novel murine gene expressed in restricted areas of the brain. *Dev Dyn* **212**, 293-303.
- Farnebo F, Jarhult J, Farnebo LO, Nilsson O, Teh BT, Lagercrantz J, Weber G, Sandelin K, Larsson C** (1997). Multiple endocrine neoplasia type 1 and the search for the genetic trigger. *Horm Res* **47**, 179-84.
- Fasano L, Kerridge S** (1988). Monitoring positional information during oogenesis in adult *Drosophila*. *Development* **104**, 245-53.
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1984). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266-7.
- Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB** (1995). Structure of the high affinity complex of inositol triphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037-46.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW** (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-42.

- Feuillard J, Korner M, Fourcade C, Costa A** (1994). Visualization of the endogenous NF- κ B p50 subunit in the nucleus of follicular dendritic cells in germinal centers. *J Immunol* **152**, 12-21.
- Finley MFA, Kulkarni N, Huettner JE** (1996). Synapse formation and establishment of neural polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J. Neurosci.* **16**, 1056-65.
- Forrester L, Nagy A, Sam M, Watt A, Stevenson L, Bernstein A, Joyner AL, Wurst W** (1996). Induction gene trapping in ES cells: identification of developmentally regulated genes that respond to retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1677-82.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehat C, Savatier P, Saramut J** (1995). *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurones. *J. Cell Sci.* **108**, 3181-88.
- Fried M, Griffiths M, Davies B, Bjursell G, La Mantia, G, Lania L** (1983). Isolation of cellular DNA sequences that allow expression of adjacent genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 2117-21.
- Friedrich G, Soriano P** (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & Dev.* **5**, 1513-23.
- Gajovic S, Chowdury K, Gruss P** (1998). Genes expressed after retinoic acid-mediated differentiation of embryonic bodies are likely to be expressed during embryo development. *Exp. Cell Res.* **242**, 138-43.
- Ganchi PA, Sun S-C, Greene WC, Ballard DW** (1992). I κ B/MAD3 masks the nuclear localization signal of NF- κ B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF- κ B p65 DNA binding. *Mol Cell Biol* **3**, 1339-52.
- Ganchi PA, Sun S-C, Greene WC, Ballard DW** (1993). A novel NF- κ B complex containing p565 homodimers: implications for transcriptional control at the level of subunit dimerization. *Mol Cell Biol* **13**, 7826-35.
- Gasca S, Hill DP, Klingensmith J, Rossant J** (1995). Characterization of a gene trap insertion into a novel gene, cordon-bleu, expressed in axial structures of the gastrulating mouse embryo. *Dev Genet* **17**, 141-54.
- Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E** (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* **19**, 349-53.
- Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R** (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **83**, 9065-9.
- Gossler A, Joyner AL, Rassant J, Skarnes WC** (1989). Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* **422**, 463-66.
- Gossler A, Zachgo J** (1993). Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. In "Gene targeting: A practical approach" (A.L. Joyner, Ed) 181-225. IRL Press, Oxford.

- Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI** (1995). Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* **9**, 1-14.
- Guru SC, Agarwal SK, Manickam P, Olufemi SE, Crabtree JS, Weisemann JM, Kester MB, Kim YS, Wang Y, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Spiegel AM, Boguski MS, Roe BA, Collins FS, Marx SJ, Burns L, Chandrasekharappa SC** (1997). A transcript map for the 2.8-Mb region containing the multiple endocrine neoplasia type 1 locus. *Genome Res* **7**, 725-35.
- Gutmann DH, Boguski M, Marchuk D, Wigler M, Collins FS, Ballester R** (1993). Analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) GAP-related domain by site-directed mutagenesis. *Oncogene* **8**, 761-69.
- Gwynn B, Lueders K, Sands MS, Birkenmeier EH** (1998). Intracisternal A-particle element transposition into the murine beta-glucuronidase gene correlates with loss of enzyme activity: a new model for beta-glucuronidase deficiency in the C3H mouse. *Mol Cell Biol* **18**, 6474-81.
- Haft CR, Sierra ML, Barr VA, Haft DH, Taylor SI** (1998). Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol Cell Biol* **18**, 7278-87.
- Hamada H** (1986 a). Activation of an enhancerless gene by chromosomal integration. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4179-84.
- Hamada H** (1986b). Random isolation of gene activator elements from human genome. *Mol. Cell. Biol* **6**, 4185-95.
- Hansen SK, Nerlov C, Zabel U, Verde P, Johnsen M** (1992). A novel complex between the p65 subunit and c-Rel binds to a DNA element involved in the phorbol ester induction of the human urokinase. *EMBO J* **11**, 205-13.
- Haslam R, Kolde HB, Hemmings BA** (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**, 309-10.
- Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K** (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet activating factor. *Nature* **370**, 216-18.
- Heinzer C, Susens U, Schmitz TP, Borgmeyer U** (1998). Retinoids induce differential expression and DNA binding of the mouse germ cell nuclear factor in P19 embryonal carcinoma cells. *Biol. Chem* **379**, 349-59.
- Henkel T, Zabel U, vanZee K, Muller JM, Fanning E** (1992). Intramolecular masking of the nuclear localization signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF.kB subunit. *Cell* **68**, 1121-33.
- Hill DP, Wurst W** (1993). Screening for novel pattern formation genes using gene trap approaches. *Methods in Enzymology* **225**.

Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ, Wynshaw-Boris A (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nature genetics* **19**, 333-39.

Hirotsune S, Pack SD, Chong SS, Robbins CM, Pavan WJ, Ledbetter DH, Wynshaw-Boris A (1997). Genomic organisation of the murine Miller-Dieker/lisencephaly region: conservation of linkage with the human region. *Genome Res* **7**, 625-34.

Hogan BL (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev.* **6**, 432-8.

Hollenberg SM, Cheng PF, Weintraub H (1993). Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD transactivation and muscle determination. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8028-32.

Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A (1999). Id Genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **274**, 19838-45.

Honkaniemi J, Zhang JS, Yang T, Zhang C, Tsi MA, Longo FM (1998). LAR tyrosine phosphatase receptor: proximal membrane alternative splicing is coordinated with regional expression and intraneuronal localization. *Brain Res Mol Brain Res* **60**, 1-12.

Horazdovsky BF, Davies BA, Seaman MN, McLaughlin SA, Yoon SH, Emr SD (1997). A sorting nexin 1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein sorting receptor. *Mol Biol Cell* **8**, 1529-41.

Horowitz DS, Krainer AR (1994). Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet* **10**, 100-6.

Hummelke GC, Meistrich ML, Cooney (1998). Mouse protamine genes are candidate targets for the novel orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor. *Mol Reprod Dev* **50**, 396-405.

Huyhn TV, Young RA, Davis RV (1985). In "DNA Cloning" (D.M. Glover, ed.), Vol 1, s. 56-110. IRL Oxford, England.

Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC (1992). Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* **267**, 16323-29.

Inoue J, Kerr LD, Ransone LJ, Bengal E, Hunter T (1991). C-rel activates but v-rel suppresses transcription from two kB sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 3715-19.

Inoue J, Kerr LD, Kakizuka A, Verma IM (1992). I κ B γ , a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF-kB: A new member of the I κ B family. *Cell* **68**, 1109-20.

Inuzuka M, Ishikawa H, Kumar S, Gelinis C, Ito Y (1994). The viral and cellular Rel oncoproteins induce the differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Oncogene* **9**, 133-40.

- Iotsova V, Caamano J, Loy J, Lewin A, Bravo R** (1997). Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nat med* **3**, 1285-89.
- Ip YT, Reach M, Engstrom Y, Kadalayil L, Cai H** (1993). Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drososophila*. *Cell* **75**, 753-63.
- Ishikawa H, Asano M, Kanda T, Kumar S, Gelinac C** (1993). Two novel functions associated with the Rel ocoproteins: DNA replication and cell-specific transkriptional activation. *Oncogene* **8**, 2889-96.
- Ishikawa H, Claudio E; Dambach D, Raventos-Suarez C, Ryan C, Bravo R** (1998). Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF κ B1) but expressing p50. *J. Exp. Med* **187**, 985-96.
- Jackson SMJ, Cooper JB** (1998). An analysis of structural similarity in zthe iron and manganese superoxide dismutases based on known structures and sequences. *BioMetals* **11**, 159-73.
- Joyner AL** (1991). Gene targeting and gene-trap screens using embryonic stem cells: new approaches to mammalian development. *BioEssays* **13**, 649-56.
- Joyner AL, Skarnes WC, Rossant J** (1989). Production of a mutation in mouse En2 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* **338**, 153-6.
- Justice MJ, Bode VC** (1988). Genetic analysis of mouse t haplotypes using mutations induced by ethylnitrosourea mutagenesis: the order of T and 9K is inverted in t mutants. *Genetics* **120**, 533-43.
- Kaltschmidt B, Bauerle PA, Kaltschmidt C** (1993). Potential involvement of the transcription factor NF- κ B in neurological disorders. *Mol Aspects Med* **14**, 171-90.
- Kanegae Y, Tavares AT, Izipisúa Belmonte JC, Verma IM** (1998). Role of Rel/NF- κ B transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature* **392**, 611-14.
- Kanematsu T, Misumi Y, Watanabe Y, Ozaki S, Koga T, Iwanaga S, Ikehara Y, Hirata M** (1996). A new inositol 1,4,5-trisphosphate binding protein similar to phospholipase C-delta 1. *Biochem J*, **313** (pt1): 319-25.
- Kaszubska W, van Huijsduijnen RH, Ghera P, DeRaemy-Schenk AM** (1993). Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF- κ B and function in the activation of E-selectin promoter in response to cytokines. *Mol Cell Biol* **13**, 7180-90.
- Katsura H, Williams MC, Brodys JS, Yu C** (1995). Two closely realted receptor-type tyrosine phosphatases are differentially expressed during rat lung development. *Dev Dyn* **204**, 89-97.
- Keller GM** (1995). *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 862-69.
- Keran M, Blank V, Logeat V, Logeat F, Vandekerckhove J, Lottspeich F, LeBail O, Urban MB, Kourilsky P, Bauerle PA, Israel A** (1990). *Cell* **62**, 1007-18.

- Kim DG, Kang HM, Jang SK, Shin HS** (1992). Construction of a bifunctional mRNA in the mouse by using the internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus. *Mol Cell Biol* **12**, 3636-43.
- Kothary R, Clapoff S, Brown A, Campbell R, Peterson A, Rossant J** (1988). A transgene containing LacZ inserted into the *dystonia* locus is expressed in the neural tube. *Nature* **335**, 435-37.
- Krumlauf R** (1993). Mouse Hox genetic functions. *Curr Opin Genet Dev.* **3**, 621-25.
- Kunsch C, Rosen CA** (1993). NF- κ B subunit specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol* **13**, 6137-46.
- Kurahashi H, Sakamoto M, Ono J, Honda A, Okada S, Nakamura Y** (1998). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint in the *Lis1* gene of a patient with isolated lissencephaly and balanced t(8;17). *Hum Genet* **103**, 189-92.
- Kurten RC, Cadena DL, Gill GN** (1996). Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science* **272**, 1008-10.
- Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A** (1991). *Nucleic Acids Res* **19**, 4293.
- Lamarche N, Hall A** (1994). GAPs for rho-related GTPases. *TIG* **10**, 436-40.
- Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, Sigler PB, Schlessinger J** (1995). Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10472-76.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J** (1996). PH Domains: Diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* **85**, 621-24.
- Lernbecher T, Müller U, Wirth T** (1993). Distinct NF- κ B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* **365**, 767-70.
- Li C, Lusic AJ, Sparkes R, Tran SM, Gaynor R** (1992). Characterization and chromosomal mapping of the gene encoding the cellular DNA binding protein HTLF. *Genomics* **13**, 658-64.
- Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH** (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **11**, 376-81.
- Lin H, Spradling AC** (1995). Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*. *Dev Genet* **16**, 6-12.
- Lin H, Yue L, Spradling AC** (1994). The *Drosophila* fusome, a germline specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation. *Development* **120**, 947-56.

Lin L, DeMartino GN, Greene WC (1998). Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell* **92**, 819-28.

Linney E (1992). Retinoic acid receptors: transcription factors modulating gene regulation, development, and differentiation. *Curr Top Dev Biol* **27**, 309-50.

Liou HC, Baltimore D (1993). Regulation of the NF-kB/rel transcription factor and Ikb inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 477-87.

Liou HC, Nolan GP, Ghosh S, Fujita T, Baltimore D (1992). The NF-kB p50 precursor, p105, contains an internal Ikb-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J* **11**, 303-9.

Liu Z, Xie T, Steward R (1999). Lis1, the Drosophila homolog of a human lissencephaly disease gene, is required for germline division and oocyte differentiation. *Development* **126**, 4477-88.

Luque I, Gelinas C (1997). Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* **8**, 103-11.

Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988). Disruption of the proto-oncogen int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategie for targeting mutation to non selectabel genes. *Nature* **336**, 348-52.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7634-38.

Martin GR, Evans MJ (1975). Differntiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 1441-45.

Matthews JR, Watson E, Buckley S, Hay RT (1993). Interaction of the C-terminal region of p105 with the nuclear localization signal of p50 is required for inhibition of NF-kappa B DNA binding activity. *Nucleic Acids Res* **21**, 4516-23.

Mayer BJ, Ren R, Clark KL, Baltimore D (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* **73**, 629-30.

McClive P, Pall G, Newton K, Lee M, Mullins J, Forrester L (1998). Gene trap integrations expressed in the developing heart: insertion site affects splicing of the PT1-ATG vector. *Dev Dyn* **212**, 267-76.

McKearin D (1997). The Drosophila fusome, organelle biogenesis and germ line differentiation: if you bild idt. *BioEssays* **19**, 147-52.

McMahon AP, Bradley A (1990). The Wnt-12 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073-85.

McPherson MJ, Hames BD, Tayler GR (1991). *PCR I: A laboratory Approach*. London: IRL Press at Oxford University Press.

McPherson MJ, Hames BD, Tayler GR (1995). *PCR II: A laboratory Approach*. London: IRL Press at Oxford University Press.

Meijer D, Graus A, Kraay R, Langeveld A, Mulder MP, Grosveld G (1990). The octamer binding factor Oct6: cDNA cloning and expression in early embryonic cells. *Nucleic Acids Res* **18**, 7357-65.

Meisler MH (1992). Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet* **8**, 341-44.

Mercurio F, Didonato JA, Rosette C, Karin M (1993). P105 and p98 precursor proteins play an active role in NF- κ B mediated signal transduction. *Genes Dev* **7**, 705-18.

Miller-Hance W.C, Lacorbier M, Fuller S.J, Evans S.M., Lyons G, Schmidt C, Robbins J, Chien K.R (1993). *In vitro* chamber specification during embryonic stem cell development. *J. Biol. Chem.* **268**, 25244-52.

Mori N, Singer-Sam J, Riggs AD (1986). Evolutionary conservation of the substrate-binding cleft of phosphoglycerate kinases. *FEBS Lett* **204**, 313-7.

Morris NR, Efimov VP, Xiang X (1998 a). Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol* **8**, 467-70.

Morris SM, Albrecht U, Reiner O, Eichele G, Yu-Lee L (1998 b). The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr Biol* **8**, 603-6.

Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M (1993). The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signaling proteins. *TIBS* **18**, 343-48.

Muth K, Bruyns R, Thorey I.S, von Melchner H (1998). Disruption of genes regulated during hematopoietic differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev. Dyn.* **212**, 277-83.

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8424-8.

Nakamaya K, Shimizu H, Mimoto K, Watanabe T (1992). A lymphoid cell-specific nuclear factor containing c-Rel-like proteins preferentially interacts with interleukine-6 kB-related motifs whose activities are repressed in lymphoid cells. *Mol Cell Biol* **12**, 1736-46.

Naumann M, Wulczyn FG, Scheiderei C (1993). The NF- κ B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I κ B molecules and control nuclear translocation of NF- κ B. *EMBO J* **12**, 213-22.

Nikulina EM, Skrinkskaya JA, Avgustinovich DF, Popova NK (1995). Dopaminergic brain system in the quaking mutant mouse. *Pharmacol Biochem Behav* **50**, 333-7.

Northweh SF, Hindes AE (1997). A yeast VPS5/GRD2 gene encodes a sorting nexin-1-like protein required for localizing membrane proteins to late Golgi. *J Cell Sci* **110**, 1063-72.

- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- O'Kane C.J, Gehring W.J** (1987). Detection in situ of genomic regulatory sequences in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 9123-27.
- Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H** (1990). A novel octamere binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic stem cells. *Cell* **60**, 461-72.
- Osmani AH, Osmani SA, Morris NR** (1990). The molecular cloning and identification of a gene product specifically required for nuclear movement in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* **111**, 543-51.
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Chazaud C, Dolle P, Chambon P** (1996). AP-2.2: A novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* **225**, 338-47.
- Oulad-Abdelghani M, Chazaud C, Bouillet P, Sapin V, Chambon P, Dolle P** (1997). Meis2, a novel mouse Pbx-related homeobox gene induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* **210**, 173-83.
- Parrot JN, Gay NJ** (1998). Expression and subcellular distribution of rel/NF kappa B transcription factors in the preimplantation mouse embryo: novel kappa B binding activities in the blastocyst stage embryo. *Zygote* **6**, 249-60.
- Pati D, Keller C, Groudine M, Plon SE** (1997). Reconstitution of a MEC1-independent checkpoint in yeast by expression of a novel human forkhead cDNA. *Mol Cell Biol* **17**, 3037-46.
- Pawson T** (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-80.
- Pederson RA.** (1994). Studies of *in vitro* differentiation with embryonic stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 543-52.
- Peterfy M, Gyuris T, Grosshans D, Cuaresma CC, Takacs L** (1998). Cloning and molecular characterization of cDNAs and the gene encoding the mouse platelet-activating factor acetylhydrolase Ib α Subunit/lissencephaly-1 protein. *Genomics* **47**, 200-206.
- Pointing C** (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: Binding partners of SH3 domains?. *Protein Sci.* **5**, 2353-7.
- Pruitt SC, Natoli TA** (1992). Inhibition of differentiation by leukemia inhibitory factor distinguishes two induction pathways in P19 embryonal carcinoma cells. *Differentiation* **50**, 57-65.
- Rattner A, Korner M, Walker MD, Citri Y** (1993). NF-kappa B activates the HIV promoter in neurons. *EMBO J* **12**, 4261-7.

- Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehner M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH** (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats. *Nature* **364**, 717-21.
- Rossant J, Hopkins N** (1992). Of fin and fur: mutational analysis of vertebrate embryonic development. *Genes Dev* **6**, 1-13.
- Salminen M, Meyer BI, Gruss P** (1998). Efficient Poly A trap approach allows the capture of genes specifically active in differentiated embryonic stem cells and in mouse embryos. *Dev Dyn* **212**, 326-33.
- Sam M, Wurst W, Forrester L, Vauti F, Heng H, Bernstein A** (1996). A novel family of repeat sequences in the mouse genome responsive to retinoic acid. *Mamm. Genom* **7**, 741-48.
- Sam M, Wurst W, Klüppel M, Jin O, Heng H, Bernstein A** (1998). Aquarius, a novel gene isolated by gene-trapping with an RNA-dependent RNA Polymerase motif. *Dev. Dyn.* **212**, 304-17.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-7.
- Sapir T, Cahana A, Seger R, Nekei S, Reiner O** (1999). LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur J Biochem* **265**, 181-88.
- Schaapveld RQ, Schepens JT, Robinson GW, Attema J, Oerlemans FT, Franssen JA, Streuli M, Wieringa B, Henninghausen L, Hendriks WJ** (1997). Impaired mammary gland development and function in mice lacking LAR receptor-like tyrosine phosphatase activity. *Dev. Biol.* **188**, 134-46.
- Schaapveld RQ, van den Maagdenberg AM, Schepens JT, Weghuis DO, Geurts van Kessel A, Wieringa B, Hendriks WJ** (1995). The mouse gene *Ptprf* encoding the leukocyte common antigen-related molecule LAE: cloning, characterization, and chromosomal localization. *Genomics* **27**, 124-30.
- Scheffzek K, Lautwein A, Kabsch, Ahmadian MR, Wittinghoffer A** (1996). Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras. *Nature* **384**, 591-96.
- Schier AF, Joyner AL, Lehmann R, Talbot WS** (1996). From screens to genes: prospects for insertional mutagenesis in zebrafish. *Genes Dev* **10**, 3077-80.
- Schmidt-Ullrich R, Mémet S, Lilienbaum A, Feuillard J, Raphael M, Israel A** (1996). NF- κ B activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development* **122**, 2117-28.
- Sen R, Baltimore D** (1986). Inducibility of kappa-immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappaB by posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-8.

Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* **87**, 1001-14.

Sha WC, Liou H-S, Tuomanen EI, Baltimore D (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* **80**, 321-30.

Shu HB, Agranoff AB, Nabel EG, Leung K, Ducketts CS, Neish AS, Nabel GJ (1993). Differential regulation of vascular cell adhesion molecule 1 gene expression by specific NF- κ B subunits in endothelial and epithelial cells. *Mol Cell Biol* **13**, 6283-9.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994). Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 405-55.

Simeone A, Acampora D, Arcioni L, Andrews PW, Boncinelli E, Mavilio F (1990). Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* **346**, 763-6.

Simeone A, Acampora D, Nigro V, Faiella A, D'Esposito M, Stornaiuolo A, Mavilio F, Boncinelli E (1991). Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells. *Mech Dev* **33**, 215-27.

Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1995). FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J* **14**, 2401-8.

Siomi MC, Zhang Y, Siomi H, Dreyfuss G (1996). Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3825-32.

Skarnes WC (1990). Entrapment vectors: A new tool for mammalian genetics. *Biotechnology* **8**, 827-31.

Skarnes WC, Auerbach BA, Joyner AL (1992) A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reporter is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes & Dev* **6**, 903-18.

Sonenshein GE (1997). Rel/NF- κ B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin Cancer Biol* **8**, 113-9.

Spradling AC, Stern DM, Kiss I, Roote J, Lavery T, Rubin GM (1995). Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the Drosophila genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10824-30.

Stancovski I, Baltimore D (1997). NF- κ B activation: the I κ B kinase revealed? *Cell* **91**, 299-302.

Stevens LC, Little CC (1954). Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **40**, 1080-7.

Stoykova A, Chowdury K, Bonaldo P, Torres M, Gruss P (1998) Gene trap expression and mutational analysis for genes expressed in the development of the nervous system. *Dev. Dyn.* **212**, 198-213.

Strübing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedemann B, Hescheler J, Wobus AM.(1995). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech. Dev.* **53**, 275-87.

Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for beta-2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 6631-7.

Tapon N, Hall A (1997). Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 86-92.

Thomas KR, Capecchi MR (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived embryonic stem cells. *Cell* **51**, 503-12.

Tsujino S, Shanske S, DiMauro S (1995). Molecular genetic heterogeneity of phosphoglycerate kinase (PGK) deficiency. *Muscle Nerve* **45-49**.

Vallari D, Record M, Snyder F (1990). Conversion of alkylacetyl glycerol to platelet activating factor in HL60 cells and subcellular localization of the mediator. *Arch Biochem Biophys* **276**, 538-45.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997). Rho GTPases and signalling networks. *Genes Dev* **11**, 2295-322.

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* **9**, 2723-35.

Verma IM, Stevenson, J (1997). Ikb kinase: beginning, not the end. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 11758-60.

Vernet C, und Artzt K (1997). STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA. *TIG* **13**, 479-84.

Ware LM, Axelrad AA (1972). Inherited resistance to N- and B-tropic murine leukemia viruses in vitro: Evidence that congenic mouse strains SIM and SIMR differ at the Fv locus. *Virology* **50**, 339-48.

Weber DM, de Villiers J, Schaffner W (1984). An SV40 "enhancer trap" incorporates exogenous enhancers or generates enhancers from its own sequences. *Cell* **36**, 983-92.

Weih F, Carrasco D, Bravo R (1994). Constitutive and inducible Rel/NF-kappa B activities in mouse thymus and spleen. *Oncogene* **9**, 3289-97.

Whelan J, Ghersa P, Hooft van Huijsduijnen R, Gray J, Chandra G, Talbot F, DeLamarter JF (1991). An NFkB like factor is essential but not sufficient for cytokine

induction of endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM) gene-transcription. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2645-53.

Wiles MV, Keller G (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* **111**, 259-67.

Wobus AM, Rohwedel J, Maltsev V, Hescheler J (1994). *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes or skeletal muscle cells is specifically modulated by retinoic acid. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **204**, 36-45.

Wurst W, Rossant J, Prideaux V, Kownacka M, Joyner A, Hill DP, Gillemot F, Gasca S, Cado D, Auerbach A, Ang SL (1995). A large-scale gene-trap screen for insertional mutagenesis in developmentally regulated genes in mice. *Genetics* **139**, 889-899.

Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR (1995). NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell* **6**, 279-310.

Xiong, J., Battaglino, R., Leahy, A. and Stuhlman, H. (1998). Large scale screening for developmental genes in embryonic stem cells and embryoid bodies using retroviral entrapment vectors. *Dev. Dyn.* **212**, 181-97.

Zabel U, Henkel T, dosSantosSilva M, Bauerle P (1993). Nuclear uptake control of NF- κ B by MAD-3 and I κ B protein present in the nucleus. *EMBO J* **12**, 201-11.

Zaffran S, Astier M, Gratecos D, Semenva M (1997). The held out wings (how) *Drosophila* gene encodes a putative RNA-Binding protein involved in the control of muscular and cardiac activity. *Development* **124**, 2087-98.

Zhang H, Bradley A (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **122**, 2977-86.

Zhang WR, Hashimoto N, Ahmad F, Ding W, Goldstein BJ (1994). Molecular cloning and expression of a unique receptor-like protein-tyrosine-phosphatase in the leucocyte-common-antigen-related phosphate family. *Biochem J* **302**, 39-47.

Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL (1995). The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J* **14**, 5358-66.

Zijlstra M, Bix M, Simister NE, Loring JM, Raulet DH, Jaenisch R (1990). Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature*, **344**, 742-6.

Zorn AM, Krieg PA (1997). The KH domain protein encoded by quaking functions as a dimer and is essential for notochord development in *Xenopus* embryos. *Genes Dev.* **11**, 2176-90.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ein zur Identifizierung neuer entwicklungsrelevanter Gene angewandtes Verfahren stellt die zufällige Mutagenese des Genoms eines Modellorganismus dar. Eine Möglichkeit hierfür stellt die Gene-trap Methode dar, bei der ein Reporter- und ein Selektorgen in embryonale Stammzellen (ES) der Maus eingebracht werden. Dies erlaubt die Selektion erfolgreicher Integrationsereignisse *in vitro* und den einfachen Nachweis der Expression des getroffenen Gens. Aus diesen Zellen können nachfolgend mutante Tiere hergestellt werden, in denen eine *in vivo* Analyse des Phänotyps der Mutation möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gene-trap Zelllinien durch Elektroporation von ES-Zellen und nachfolgender Selektion hergestellt. Um möglicherweise interessante Integrationen anzureichern, wurden Zelllinien ausgewählt, die eine Aktivierung des Reporters während der *in vitro* Differenzierung oder nach Behandlung mit bekannten Signalfaktoren wie Retinsäure oder BMP2 zeigten. Die Identifizierung der getroffenen Gene erfolgte durch Sequenzierung von 5'RACE-PCR Produkten. Es konnten so neun unbekannte und sechs bekannte Transkripte identifiziert werden, von denen GTXVI-168 *in vitro* charakterisiert wurde. Die GTXVI-168 Zelllinie trägt eine Integration in einem bislang unbekanntem, für eine RhoGAP-Domäne kodierenden Gen (GTPase aktivierendes Protein für Rho-GTPase).

Desweiteren wurden drei Mauslinien untersucht, die aufgrund der Expression der getroffenen Gene interessant erschienen. Für alle drei Linien wurde die Integration des Gene-trap Vektors charakterisiert. Das in der Mauslinie GTIII6 getroffene Gen kodiert für ein neues PX (phox-Homologie)-Domäne Protein. Die Mauslinie 2A-53 betrifft das Pafaha1b/Lis1 (*Lissencephaly*) Gen und die Mauslinie GTXVI-44 trägt eine Insertion im NFκB1 Gen. Eine Analyse der Phänotypen zeigte eine hohe Sterblichkeit der GTXVI-44 Mäuse, die vermutlich durch eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen und Entzündungen der Organe verursacht wird. 2A-53 homozygote Männchen sind steril und zeigen eine Arretierung der Differenzierung der Spermatozyten, während homozygote Weibchen fertil sind.