

Untersuchungen zur Regulation des *Insl3* Gens

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität Göttingen**



vorgelegt von

Tarvo Thamm

aus Osnabrück

Göttingen 2002

Referent: Prof. Dr. W. Engel

Korreferentin: PD Dr. S. Hoyer-Fender

Tag der mündlichen Prüfungen: 29.01.2003

For the less even as for the greater there is some deed that he may accomplish but once only; and in that deed his heart shall rest.

Feanor, from the Quenta Silmarillion.

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungen.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Geschlechtsdifferenzierung beim Säuger	1
1.2 Der Insulin-ähnliche Faktor <i>Insl3</i>	2
1.3 Die Bedeutung des <i>Insl3</i> Gens für die Gonadenposition	5
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Chemikalien	11
2.2 Gebrauchswaren.....	14
2.3 Puffer und Stammlösungen.....	15
2.4 Medien und Zusätze.....	22
2.4.1 Medien für Bakterien	22
2.4.2 Medien für die Zellkultur.....	22
2.5 Sterilisation	23
2.6 Molekulargewichtstandards	24
2.7 Verwendete Vektoren, Bakterienstämme, Antibiotika und Agarplatten ..	24
2.7.1 Vektoren.....	24
2.7.2 Bakterienstämme.....	24
2.7.3 Antibiotika und Agarplatten	25
2.8 Gensonden, Oligonukleotide und Antikörper	25
2.8.1 Gensonden und Klone	25
2.8.2 Synthetische Oligonukleotide	26
2.8.3 Antikörper	28
2.9 Organ-und Gewebeproben	28
2.10 Eukaryotische Zelllinien	29
2.11 Mäusestämme	29
2.12 Methoden zur Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.12.1 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus Organen	29
2.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Midi- oder Maxipräparation	30
2.12.3 Isolierung von Plasmid -DNA durch Minipräparation	31
2.12.4 Herstellung von Glyzerinkryokulturen	31

2.12.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe.....	31
2.12.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.13	Gelelektrophoretische Methoden.....	33
2.13.1	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.13.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.13.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	35
2.13.3.1	PAGE zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten im Gel.....	35
2.13.3.2	Denaturierende PAGE zur Analyse des Laufverhaltens von Fusionsproteinen.....	35
2.14	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten.....	37
2.14.1	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels Anionenaustauschersilikat.....	37
2.15	Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	37
2.15.1	PCR an Plasmid-DNA.....	38
2.15.2	„Reverse Transkriptions-PCR“ (RT-PCR).....	39
2.16	Subklonierung von DNA-Fragmenten.....	41
2.16.1	Ligation.....	41
2.16.2	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	42
2.16.3	Plasmidtransformation in kompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	43
2.17	Transfertechniken.....	43
2.17.1	"Southern-Blotting" von DNA.....	43
2.17.2	„Dot-Blotting“ von DNA.....	44
2.17.2.1	Dot-Blot zum Nachweis eines Transgens.....	44
2.17.2.2	Dot-Blot zur Abschätzung der Anzahl inserierter Kopien.....	45
2.17.3	"Northern-Blotting" von RNA.....	45
2.17.4	"Western-Blotting" von Proteinen.....	46
2.17.5	Coomassiefärbung von Proteingelen.....	47
2.18	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren.....	47
2.18.1	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	48
2.18.2	Spaltung von genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	48
2.18.3	Dephosphorylierungsreaktion mit alkalischer Phosphatase (CIAP).....	48
2.18.4	Auffüll- und Glättungsreaktion zur Generierung von „Blunt end“- Fragmenten.....	50

2.18.5	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („random prime labelling“)	50
2.18.6	Radioaktive Endmarkierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden.....	51
2.19	DNA Sequenzanalyse	52
2.20	Hybridisierungsmethoden	53
2.20.1	Hybridisierung radioaktiver DNA-Sonden an membrangebundene Nucleinsäuren	54
2.21	Isolierung von Proteinen	55
2.21.1	Gesamtproteinisolierung aus Zellkulturen und Geweben.....	55
2.21.1.1	Extraktion von Kernproteinen aus Geweben	56
2.21.1.2	Isolierung von Kernproteinen aus kultivierten Zellen	56
2.22	Proteinanalysen	57
2.22.1	SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen.....	57
2.22.2	Acetonfällung von Proteinen	57
2.22.3	Dialyse von Proteinlösungen	58
2.22.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	58
2.23	Herstellung von Parafinschnitten.....	59
2.24	Immunlokalisation von Proteinen in Parafinschnitten.....	59
2.25	Zelllinien und Gewebekultur	60
2.25.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	60
2.25.2	Transfektion eukaryotischer Zellen	60
2.25.3	Einfrieren eukaryotischer Zellen.....	62
2.26	Expression von rekombinantem Protein mit dem <i>Strep</i> -tag®-System.....	63
2.26.1	Insertion der <i>Apg-1</i> -cDNA in den Vektor pSKA-IBA2	63
2.26.2	Genexpression und Translation in <i>E. coli</i> -Zellen	64
2.26.3	Präparation des cytoplasmatischen Proteinextraktes	64
2.26.4	Säulenchromatographische Aufreinigung des Proteins	65
2.27	Quantitativer Nachweis von Reporterenzymen	65
2.27.1	„Luciferase-Assay“	66
2.27.2	β-Galactosidase- „Assay“	66
2.28	Gel Retardation „Assay“	67
2.28.1	Protein/DNA-Bindungsreaktion	68
2.28.2	Antikörper „Inhibition“ Assay	69
2.28.3	„Supershift“ Assay	69

2.28.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten für den Gel Retardation Assay.....	69
2.28.5	Gelelektrophoretische Auftrennung der Protein/DNA-Komplexe	69
2.29	Immunfärbung von PVDF-Filtern	70
2.30	Erzeugung transgener Mäuse.....	71
2.30.1	Vorbereiten der DNA zur Mikroinjektion	71
2.30.2	Superovulation	72
2.30.3	Gewinnung befruchteter Oocyten.....	72
2.30.4	Mikroinjektion	73
2.30.5	Retransfer mikroinjizierter Oocyten.....	74
3	Ergebnisse.....	76
3.1	Überexpression von <i>Insl3</i> in weiblichen Mäusen.....	76
3.1.1	Generierung des <i>Insl2/Insl3</i> Konstruktes.....	76
3.1.2	Herstellung transgener <i>Insl2-Insl3</i> Mäuse	77
3.1.3	Untersuchung des Expressionsmusters des transgenen Allels mittels Northern-Blot-Analyse	78
3.1.4	Immunhistochemische Analyse des transgenen Proteins	79
3.1.5	Transabdominaler Abstieg der Ovarien und die Entwicklung des <i>Processus vaginalis</i> in transgenen Weibchen	80
3.1.6	Fertilität transgener Weibchen.....	84
3.1.7	„Rescue“-Experiment zur Untersuchung der Wirkung des <i>Insl2/Insl3</i> Transgens bei <i>Insl3</i> -defizienten Männchen	85
3.2	Untersuchungen zur Charakterisierung des <i>Insl3</i> -Promotors <i>in vitro</i>	87
3.2.1	Untersuchung der DNA/Protein-Interaktionen innerhalb des M2-Sequenzelements des <i>Insl3</i> Promotors auf Gewebespezifität.....	87
3.2.2	Untersuchung der Bindungsspezifität der M2 bindenden Proteine mit mutierten Oligonukleotiden des <i>Insl3</i> -Promotors.....	88
3.2.3	Datenbankanalyse des Sequenzelements M2.....	92
3.2.4	Untersuchung des Sequenzelements M2 auf Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren	93
3.2.5	Untersuchungen zur Bedeutung des M2 Sequenzelements für die Transaktivierung des <i>Insl3</i> Promotors	94
3.2.5.1	Klonierung von „Luciferase“-Konstrukten unter der Kontrolle des <i>Insl3</i> Promotors.....	94

3.2.5.2	Zur Bedeutung des M2 Sequenzelements für die Transaktivierung von <i>Ins13</i> durch Bestimmung der „Luciferase“-Aktivität.....	96
3.2.6	Untersuchungen zur SF-1-abhängigen Transaktivierung von <i>Ins13</i>	98
3.2.6.1	Untersuchung der SF-1-abhängigen Transaktivierung durch Bestimmung der „Luciferase“-Aktivität in steroidogenen Zelllinien	98
3.3	Untersuchungen zur Charakterisierung des <i>Ins13</i> -Promotors <i>in vivo</i>	100
3.3.1	Generierung und Verifizierung der <i>Ins13/CAT</i> - Konstrukte	100
3.3.2	Erzeugung transgener Mäuse.....	101
3.3.3	Untersuchung der Expressionsmuster der transgenen Allele mittels Northern-Blot-Analyse	102
3.3.4	Statistische Analyse der Wurfgrößen und Genotypen	103
3.4	Isolierung und Charakterisierung eines cDNA-Fragmentes, das für das M2 transagierende Protein codiert.....	106
3.4.1	Untersuchung der Bindungsspezifität eines Apg-1-Fusionsproteins aus dem One-Hybrid System mittels Gel Retardation Assay	107
3.4.2	Klonierung eines Apg-1-cDNA-Fragmentes in den Expressionsvektor pSKA-IBA2 zur Herstellung eines hochkonzentrierten, rekombinanten Proteins	108
3.4.3	Untersuchung der Bindungsspezifität des Apg-1-Fusionsproteins aus dem pASK-IBA2-System mittels Gel Retardation Assay	109
3.4.4	Untersuchung der Expression des <i>Apg-1</i> -Gens in der postnatalen Testisentwicklung	112
3.4.5	Untersuchungen zur temperaturabhängigen Expression des <i>Apg-1</i> -Gens	113
3.5	Subzelluläre Lokalisation eines Apg-1-GFP-Fusionsproteins.....	115
3.5.1	Klonierung eines Apg-1-GFP-Fusionsproteins mit dem pEGF-C1-Vektorsystem	115
3.5.2	Detektion der Fluoreszenz des Apg-1-GFP-Fusionsproteins zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation.....	117
4	Diskussion	119
4.1	Zur Überexpression von <i>Ins13</i> in transgenen weiblichen Mäusen	119
4.1.1	Descensus der Ovarien in transgenen <i>Ins12/Ins13</i> Weibchen.....	120
4.1.2	Anatomische Aspekte des <i>Processus vaginalis</i>	122
4.1.3	Wirkung der Überexpression von <i>Ins13</i> auf die weibliche Fertilität.....	124
4.2	Analyse des <i>Ins13</i> Promotors	125

4.2.1	Analyse der DNA/Protein Interaktionen.....	128
4.2.2	Expressionanalyse des <i>Apg-1</i> Gen der Maus im Testis	131
4.2.3	Zur temperaturabhängigen Expression des <i>Apg-1</i> Gens.....	131
4.2.4	Analyse der transgenen Mäuse	132
5	Zusammenfassung.....	134
6	Literatur.....	137
7	Anhang.....	150

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony forming units
cpm	„counts per minute“ (Zählrate)
CTP	Cytidin-5`-triphosphat
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtri-phosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytymidintri-phosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteres
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethylsulfonsäure

HSE	Heatshockelement
Hrsg	Herausgeber
IPTG	Isopropyl-b-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molarität
m-	mili- (1×10^{-3})
m-	mikro- (1×10^{-6})
Min.	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n-	nano- (1×10^{-9})
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
PCR	„Polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenyl-Methylsulfonyl-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SSC	„standard saline citrat“ (-Puffer)
SSPE	„standard saline phosphate EDTA“ (-Puffer)
Std.	Stunde
TBE	Tris-Borat-EDTA (-Puffer)
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
t-RNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-b-Galactosid

Code der Nukleinsäuren

A	Adenin
T	Thymin
G	Guanin
C	Cytosin
U	Uracil

Code der Aminosäuren

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

1 Einleitung

1.1 Geschlechtsdifferenzierung beim Säuger

Ausgangspunkt für die Geschlechtsdifferenzierung bei Säugetieren ist die bipotente Gonadenanlage. In Säugetieren induziert das Y-Chromosom die Entwicklung der Testes und damit die männliche Sexualentwicklung. In Abwesenheit des Y-Chromosoms differenziert sich die bipotente Gonadenanlage zu Ovarien. Molekulargenetische Studien zeigen, dass für die Entwicklung der Gonaden sowohl das Y-chromosomale Gen *Sry* als auch autosomale und X-chromosomale Gene verantwortlich sind (Schafer und Goodfellow, 1996). Ein beeindruckender Beweis für diese These stammt aus Versuchen mit Kaninchen. Jost (1953) kastrierte embryonale Kaninchen *in utero* in einem Entwicklungsstadium, in dem die Differenzierung der inneren und äußeren Geschlechtsorgane noch nicht eingesetzt hat. Die Entnahme der Gonaden zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung führte sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Kaninchen zur Ausbildung weiblicher Geschlechtsorgane. Diese Experimente zeigten, dass die Anwesenheit der Testes die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsorgane unterdrückt, während sie die Entwicklung des männlichen Phänotyps fördern.

Die Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane wird durch die Wolffschen und Müllerschen Gänge bestimmt (Abb. 1). Aus den Wolffschen Gängen differenzieren sich die Nebenhoden, die Samenleiter und die Samenblasen. Aus den Müllerschen Gängen entwickeln sich der Uterus, die Eileiter und die oberen zwei Drittel der Vagina (Schafer und Goodfellow, 1996). Im männlichen Embryo wird die Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane durch das Wachstumshormon „Müllerian Inhibiting Substance“ (MIS) reprimiert (Cate et al., 1986), das in den Sertolizellen des embryonalen Hodens produziert wird. Zeitgleich produzieren die Leydigzellen des Testis (Leydig, 1850) Testosteron, welches die Differenzierung der Wolffschen Gänge fördert. In Abwesenheit von MIS entwickeln sich im weiblichen Embryo die Müllerschen Gänge zu Uterus, Eileiter und den oberen 2/3 der Vagina (Byskov und Hoyer, 1988).

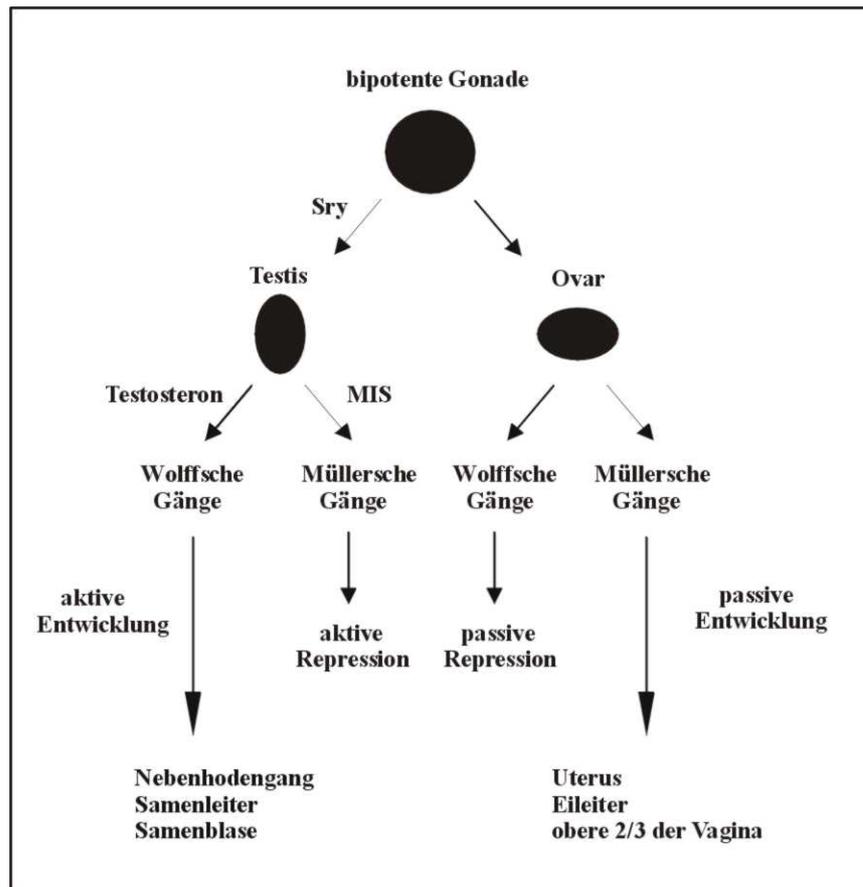


Abb. 1: Schematische Darstellung der Genitalentwicklung bei Säugern

1.2 Der Insulin-ähnliche Faktor *Insl3*

Die *Insl3* cDNAs von Schwein und Mensch kodieren für einen offenen Leserahmen mit 131 Aminosäuren (Burkhardt et al., 1994). Ein Vergleich der *Insl3* Primärstruktur mit Proteinen der Familie der Insulin-ähnlichen Hormone – Insulin, Relaxin, Insulin-like Growth Faktor I (IGF I) und Insulin-like Growth Faktor II (IGF II) – zeigt, dass das abgeleitete *Insl3* Peptid in diese Familie eingeordnet werden kann (Adham et al., 1993)(Abb. 2).

Die Proteine dieser Familie werden als Prärohormone synthetisiert (Blundell und Humbel, 1980). Das Signalpeptid vermittelt den Transport des Prohormons durch das endoplasmatische Retikulum und wird anschließend abgespalten. Unter Vermittlung des Verbindungspeptids (C-Peptid) werden B- und A-Kette zueinander gefaltet. Nachfolgend werden die für diese Proteinfamilie charakteristischen Disulfidbrücken

ausgebildet. Zwei Brücken verbinden B- und A-Kette, eine Verbindung wird innerhalb der A-Kette gebildet. Das nicht mehr benötigte C-Peptid wird proteolytisch abgespalten (Pour und Hauser, 1987).

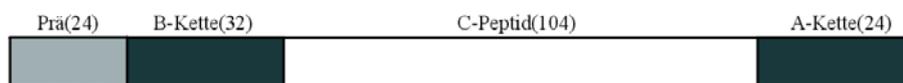
A PräproInsI3 (131 As)



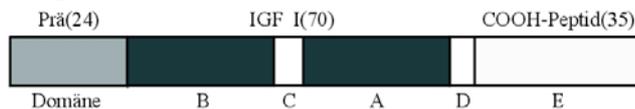
B PräproInsI2 (110 As)



C Präprorelaxin (185 As)



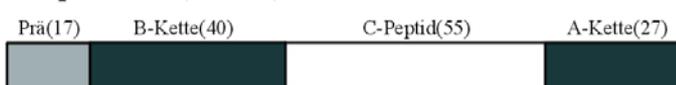
D PräproIGFI (130 As)



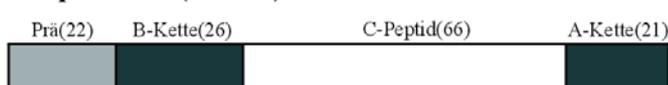
E PräproIGFII (180 As)



F PräproInsI4 (139 As)



G PräproInsI5 (135 As)



H PräproInsI6 (213 As)

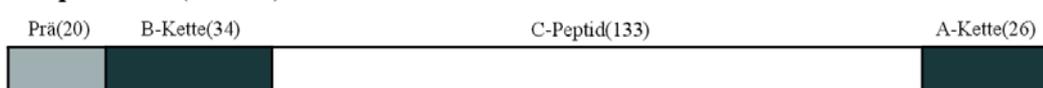


Abb. 2: Schematische Darstellung einiger Mitglieder der InsI3-Superfamilie

Die Prärohormonformen von Insulin (B) (Bell et al., 1979), Relaxin (C) (Hudson et al., 1983) IGF I (D) (Jansen et al., 1983) IGF II (E) (Bell et al., 1984), (F) InsI4 (Chassin et al., 1995), (G) InsI5 (Conklin et al., 1999) und (H) InsI6 (Lok et al., 2000) des Menschen im Vergleich zu PräproInsI3 (A) (Burkhardt et al., 1994). Die verschiedenen Abschnitte der Polypeptidketten sind gekennzeichnet. Das Signalpeptid ist als hellgrauer Balken, A- und B-Kette sind als dunkelgrauer Balken sowie das C-Peptid und die zusätzlichen Dömanen C/D/E von IGF I und IGF II sind als offene Balken dargestellt. Die Zahl der Aminosäuren dieser Bereiche werden in Klammern angegeben.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten, insbesondere zu Insulin und Relaxin, wird angenommen, dass das *Insl3* Peptid sich aus einer B-Kette mit 32 (Schwein) bzw. 31 Aminosäuren (Mensch), einer A-Kette von 26 Aminosäuren (Schwein und Mensch) und einem C-Peptid von 49 bzw. 50 Aminosäuren zusammensetzt. Durch die innerhalb dieser Familie hochkonservierten 6 Cysteine, die auch bei *Insl3* vorhanden sind, könnten die B- und A-Kette durch Disulfidbrücken verbunden werden. Weiterhin befindet sich in der abgeleiteten *Insl3* Primärstruktur N-terminal ein hydrophobes Signalpeptid, das in seinen Charakteristika den Signalpeptiden der Insulin-ähnlichen Polypeptide entspricht (Dull et al., 1984). Weitere Mitglieder dieser Familie sind *Insl4* (Chassin et al., 1995), *Insl5* (Conklin et al., 1999) und *Insl6* (Lok et al., 2000).

Durch Northern Blot Experimente und *in situ*-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass das *Insl3* Gen spezifisch in den prä- und postnatalen Leydigzellen des Testis und in den Thecazellen des postnatalen Ovars exprimiert wird (Adham et al., 1993). Als weiterer Ort der *Insl3* Expression, wenn auch in erheblich geringerem Ausmaß, wurden von Tashima et al. (1995) das Corpus luteum und der Trophoblast des Menschen identifiziert. Weiterhin wurde eine starke Expression des *Insl3*-Gens in kultivierten MA10 Leydig-Tumorzellen und im Testis der *W/W^v* mutanten Maus, die keine Keimzellen enthält, nachgewiesen. Dies zeigt, dass die Expression des *Insl3* Gens im Testis nicht von Signalen aus Sertoli- und Keimzellen abhängig ist (Zimmermann et al., 1997).

Mit Hilfe von RT-PCR und Northern Blots konnte die erste Expression des *Insl3* Gens im Testis bei 13.5 Tage alten Embryonen nachgewiesen werden. Im Ovar beginnt die Expression bei 6 Tage alten Tieren. Postnatal bleibt die Expression im Testis in den ersten drei Wochen konstant, steigt jedoch am 25. Tag an (Zimmermann et al., 1997). Dieses dimorphe Expressionsmuster während der Gonadenentwicklung lässt eine Bedeutung des *Insl3*-Faktors bei der Geschlechtsdifferenzierung vermuten.

Untersuchungen zur Expression des *Insl3*-Gens im Ovar während des Zyklus und der Schwangerschaft der Maus geben einen Hinweis auf den Einfluß des *Insl3*-Hormons auf die Follikelentwicklung. Während der folliculären Phase (Proöstrus und Östrus) wurde eine höhere Transkriptmenge in der ovariellen RNA nachgewiesen als während der lutealen Phase (Metaöstrus und Diöstrus). Eine Expressionsanalyse zeigte, dass das *Insl3*-Transkript lediglich in der ersten Schwangerschaftswoche nachweisbar ist. Mit

dem Einsetzen der Follikelentwicklung am 18. Embryonaltag setzt auch die Expression von *Insl3* wieder ein (Zimmermann et al., 1997).

Mit Hilfe von *Insl3*-CAT-Deletionskonstrukten wurde untersucht welcher 5' flankierende Bereich des *Insl3* Gens der Maus für eine volle Promotoraktivität ausreicht und eine Leydigzell-spezifische Expression des Gens vermittelt (Zimmermann et al., 1997). Dabei zeigte sich, dass 160 Bp des 5' flankierenden Bereichs des *Insl3*-Gens für eine spezifische Expression ausreichen. Innerhalb dieses Promotorbereichs konnten mittels „DNase Footprint-Analysen“ und „Gel Retardation Assays“ konservierte Abschnitte identifiziert werden. Davon enthalten drei die Sequenzen für SF-1-Bindungsstellen. Durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers wurde die Affinität des Transkriptionsfaktors SF-1 mit dem *Insl3* Promotor bestätigt (Zimmermann et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor SF-1 reguliert die Expression von vielen Genen, die in der Geschlechtsdifferenzierung eine Rolle spielen (Ikeda, 1996). Es zeigte sich in Zellkulturexperimenten, dass der SF-1 Faktor den *Insl3*-Promotor transaktivieren kann.

1.3 Die Bedeutung des *Insl3* Gens für die Gonadenposition

In undifferenzierten Embryonen sind die Gonaden ventrolateral zu den Nieren lokalisiert und mit der Inguinalregion durch das craniale suspensorische Ligament (CSL) und das Gubernaculum verbunden. Die unterschiedliche Position der Testes und der Ovarien im adulten Tier sind das Ergebnis der sexualdimorphen Entwicklung dieser Ligamente.

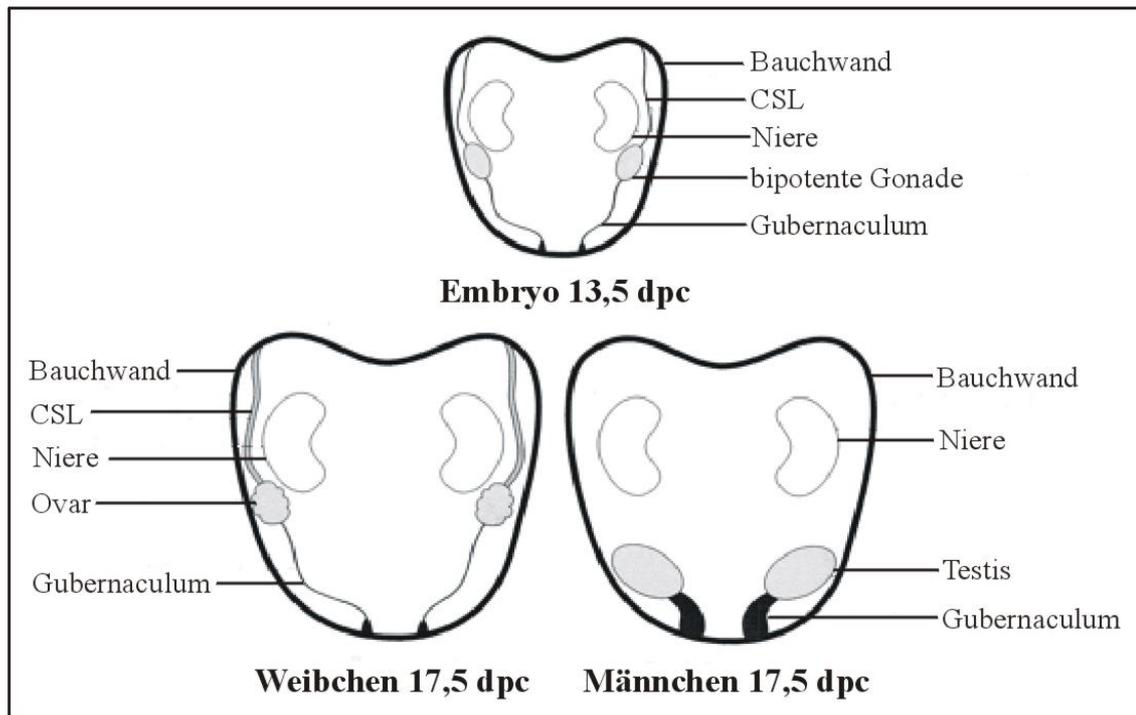


Abb. 3: Schematische Darstellung der Entwicklung des Cranial Suspensory Ligaments (CSL) und des Gubernaculums der Maus

Am Tag 13,5 dpc ist die Position der Gonadenanlagen in männlichen und weibchen Embryonen identisch. Sie sind durch das Gubernaculum und das Cranial Suspensory Ligament (CSL) mit der Bauchdecke verbunden. Zwischen Tag 15.5-17,5 dpc führt die Entwicklung des Gubernaculums und die Regression des CSL im männlichen Embryo zum transabdominalen Abstieg der Testes in die Inguinalregion. Im weiblichen Embryo führt die Weiterentwicklung des CSL und die ausbleibende Entwicklung des Gubernaculums zum Verbleiben der Ovarien caudal der Niere.

Die Regression des CSL und das Wachstum des Gubernaculums verursachen den *Descensus testis*. Am Tag 15 dpc sind bei Ratten die Testes und der sich entwickelnde Nebenhoden in der Nähe der Nieren lokalisiert und mit der Inguinalregion durch das Gubernaculum verbunden. Das Gubernaculum kann während dieser Entwicklungsphase in zwei Strukturen eingeteilt werden. Der craniale Teil (Gubernaculum cord) ist ein auffälliger Strang aus mesenchymalen Zellen im freien Seitenrand der Tunica serosa, das die Bauchorgane überziehende Mesothel des Peritoneums (Abb. 4A/8). Der caudale Teil besteht hauptsächlich aus mesenchymalen Zellen und ist ein intra-abdominales (Abb. 4A/9a) und in ein extra-abdominales Segment unterteilt (Abb. 4A/9b), das sich durch die inguinale Bauchdecke zieht. Das intra-abdominale Segment wird von Myoblastzellen umschlossen, aus denen der Musculus obliquus internus und der

Musculus obliquus externus gebildet werden. Das extra-abdominale Segment reicht von der caudalen Inguinalregion bis zum zukünftigen Scrotum. Das Mesenchym und die Myoblasten des intra-abdominalen Segmentes werden auch als Gubernaculum bulb bezeichnet (Abb. 4A/7 + 9a). Der gesamte Komplex ist auch in weiblichen Feten vorhanden und unterscheidet sich nicht von dem bei gleichalten männlichen Feten.

Während der nächsten 3-4 Tage entwickelt sich das Gubernaculum schnell. Am Tag 17 dpc verlängert sich der Gubernaculum bulb (Abb. 4B/7 + 9a) in männlichen Tieren, während in weiblichen Tieren die Entwicklung zum Stillstand kommt. Die Vergrößerung des intra- und extrabdominalen Segments wird durch Zellteilungen der mesenchymalen Zellen erreicht. Zeitgleich verkürzt sich der craniale Teil des Gubernaculums und führt so zur caudalen Wanderung der Testes und der Nebenhoden (Abb. 4B/1 + 2).

Die nächste Phase des Descensus testis ist durch die Regression der mesenchymalen Anteile des Gubernaculums gekennzeichnet. Sie beginnt am Tag 20 am caudalen Ende des extra-abdominalen Segments. 2,5 bis 3 Tage nach der Geburt sind alle mesenchymalen Zellen innerhalb des Gubernaculum bulbs und des extra-abdominalen Segments verschwunden. Die Muskelwand des Gubernaculum bulb wandert ins Scrotum (Abb. 4B/10). Diese Invagination wird als *Processus vaginalis peritonei* bezeichnet.

4 Tage nach der Geburt ist dieser Prozess abgeschlossen, das den Gubernaculum bulb umgebende Muskelgewebe hat sich vollständig umgestülpt und bildet das Scrotum (Abb. 4B/7 + 11). Die Vergrößerung des Scrotums und leichter abdominaler Druck führen in den folgenden Tagen zur scrotalen Lokalisation der Testes sowie der Nebenhoden (Wensing, 1986).

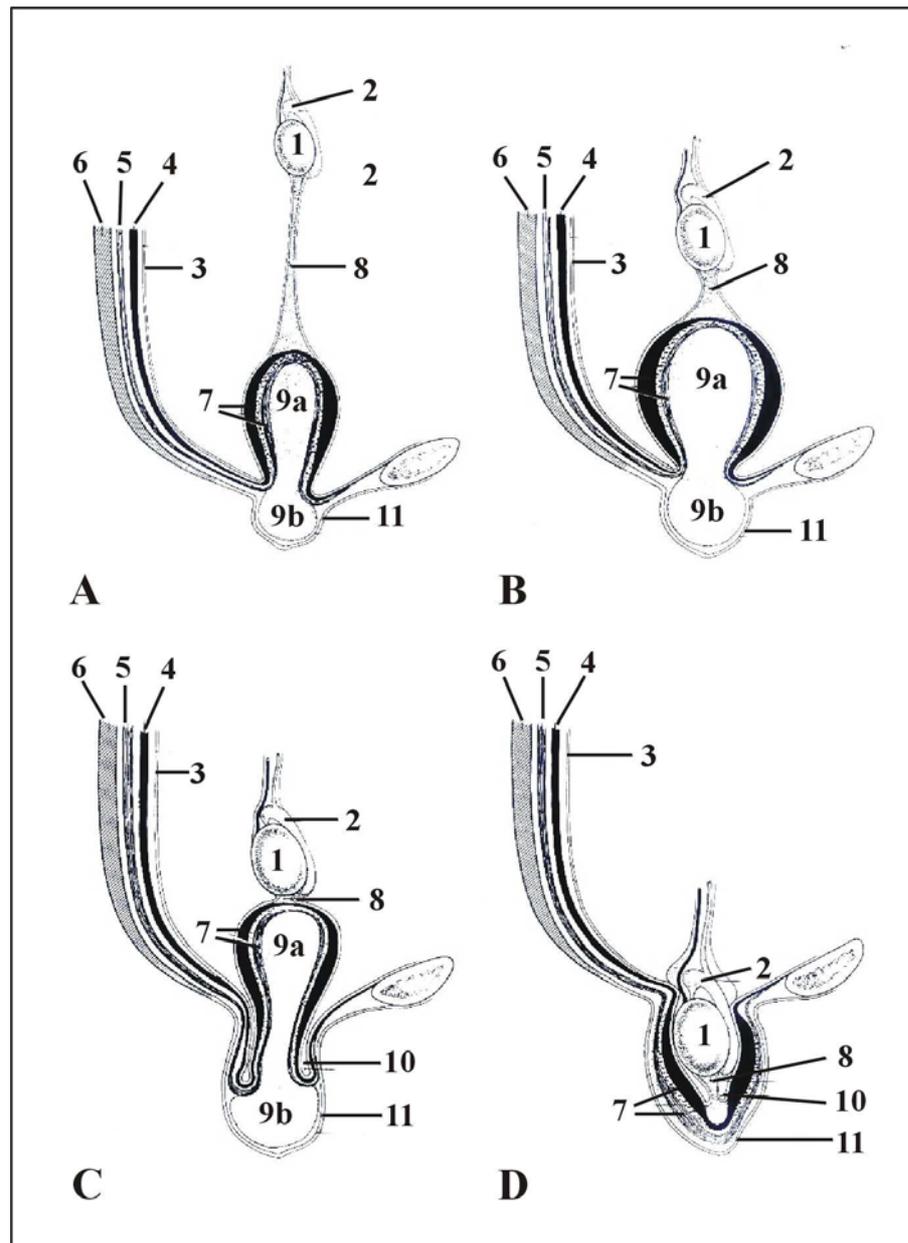


Abb. 4: Schematische Darstellung des Descensus Testis in der männlichen Ratte (nach Wensing, 1986)

A) Gubernaculumentwicklung am Tag 16 dpc; B) Wachstum des Gubernaculums am Tag 20 dpc; C) Gubernaculumentwicklung und Invagination am Tag der Geburt; D) Topographie des Testis und des Musculus cremaster 10 bis 15 Tage nach der Geburt; 1) Testis; 2) Nebenhoden; 3) parietales Bauchfell; 4) transversale Bauchmuskeln; 5) Musculus obliquus internus; 6) Musculus obliquus externus; 7) 2 Lagen des Musculus cremaster; 8) Gubernaculum cord; 9) caudaler Teil des Gubernaculum testis; a) Mesenchym des intra-abdominalen Segments; b) extra-abdominales Segment; 10) Invagination; 11) Fascia spermatica externa (7+9a bilden zusammen den Gubernaculum cone)

Beim Weibchen führt die Weiterentwicklung des CSL und die zurückbleibende Entwicklung des Gubernaculums zur Lokalisation der Ovarien lateral der Nieren (Hutson et al., 1997). Die Entwicklung beider Ligamente ist hormonell kontrolliert. Pränatale Exposition mit Testosteron führte zur Regression des CSL bei weiblichen Ratten (van der Schoot und Elger, 1992). Behandelt man männliche embryonale Ratten mit einem Antiandrogen unterbleibt die Regression des CSL. Das Abwesenheit des CSL in männlichen Mäusen und die Entwicklung des CSL in testikulär feminisierten Mäusen (Hutson, 1986), die keinen funktionsfähigen Androgenrezeptor besitzen, zeigt die Sensitivität des CSL gegenüber Androgenen (Emmen et al., 1998). Die Entwicklung des Gubernaculums unterliegt der Wirkung des *Insl3* Genprodukts. Die Deletion dieses Gens durch homologe Rekombination führt zu einem bilateralen abdominalen Cryptorchismus (Zimmermann et al., 1999; Nef und Parada, 1999). Cryptorchismus ist mit 3-5% die häufigste Störung der Sexualentwicklung bei Jungen. Dies führt zu Infertilität und erhöht das Hodenkrebsrisiko (Toppari und Kaleva, 1999). In Mäusen, die *Insl3*- und androgendefizient sind, sind die Ovarien wie in Wildtypweibchen lokalisiert (Zimmermann et al., 1999). Dieses Experiment zeigte, dass *Insl3* und Androgen für die Gonadenposition verantwortlich sind (Adham et al., 2000).

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die *Insl3*-gesteuerte Gubernaculumentwicklung von Androgenen abhängig ist und ob die Überexpression von *Insl3* in weiblichen Embryonen zu Entwicklung des Gubernaculums führt und damit den Descensus der Ovarien induziert. Zu diesem Zweck wurden transgene Mäuse hergestellt, die *Insl3* im Pankreas überexprimieren. Der Phänotyp sollte mit molekulargenetischen und immunhistochemischen Analysetechniken untersucht werden. Interessanterweise zeigten sich bei weiblichen transgenen Mäusen bilaterale Inguinalhernien. Daher wurde die Fertilität transgener Weibchen und die Wirkung des *Insl2/Insl3* Transgens bei *Insl3*-defizienten Männchen untersucht.

In dieser Arbeit sollten auch Fragen zur Regulation des *Insl3* Gens geklärt werden. Innerhalb der Promotorregion des *Insl3* Gens sollte durch Gel Retardation Assays ein *cis*-ständiges Element charakterisiert und der daran bindende transagierende Faktor identifiziert werden. Durch Luciferaseassays sollte die Beteiligung des transagierenden

Faktors an der Regulation des *Ins13* Gens untersucht werden. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation des transagierenden Faktors wurden GFP-Fusionsproteine hergestellt, in kultivierte Zellen transient transfiziert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Außerdem wurde in diesem Zusammenhang das Expressionsmuster des transagierenden Faktors in der postnatalen Testisentwicklung untersucht und Untersuchungen zur temperaturabhängigen Expression durchgeführt.

Um die Transfektionsexperimente zur Ermittlung des 5'-flankierenden Bereich des *Ins13* Gens der Maus in vivo zu bestätigen, wurden transgene Mäuse erzeugt und in Northern-Blot-Analysen auf Expression des transgenen Allels untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Acrylamid-Stammlösung (40%)	Amresco [®] , Ohio, USA
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
AP-konjugiertes Streptavidin-System	Gibco BRL, Eggenstein
Aqua Polymount	Polyscience, Warrington
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, USA
Biotin-16-dUTP	Boehringer, Mannheim
Blockierungsreagenz	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Biomol, Hamburg
α - ³² P dCTP	Amersham, Braunschweig
DAPI	Serva, Heidelberg
Dextransulfat	Pharmacia, Freiburg

Digoxigenin-11-dUTP	Boehringer, Mannheim
Dimethyldicarbonat (Velcorin)	Bayer AG, Leverkusen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DNase I (RNase frei)	Sigma, Deisenhofen
dNTP-Set (PCR Grade)	Boehringer, Mannheim
Ethanol	ROTH, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1µg/ml)	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
FKS	Gibco BRL, Eggenstein
Formamid (99,5%, deionisiert)	ROTH, Karlsruhe
Formaldehyd (≥ 37 %)	Sigma, Deisenhofen
Freezing-Medium CRYO-BLOCK	Medizinische Diagnostik Methoden, Gießen
Glyzerin	Gibco BRL, Eggenstein
Gummiarabicum	Merck, Darmstadt
IPTG	Biomol, Hamburg
JETSORB-Insert-Isolierungskit	Genomed, Bad Oyenhausen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
1 Kb DNA – Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
Kompetente DH5α - Zellen	Gibco BRL, Eggenstein
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Lipopolysaccharide	Boehringer, Mannheim
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Membran Hybridisierungs-Puffer	KPL

MicroSpin™ S-200 HR Säulen	Amersham Pharmacia Biotech
MOPS	Biomol, Hamburg
NBT/BCIP-Stocklösung	Boehringer, Mannheim
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin	Gibco BRL, Eggenstein
Pepsin	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Biomol, Hamburg
PLATINUM® Taq DNA Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon	Pharmacia, Freiburg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
QIAGEN® Plasmid-Midipräpkit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Large construct Kit	Qiagen, Hilden
Rapid-Hybridization Puffer	Amersham Pharmacia Biotech
Rediprime™ II Markierungs-System	Amersham Pharmacia Biotech
Restriktionsenzyme	Biolabs, Boehringer, BRL
RNase A	Gibco BRL, Eggenstein
RNase STD.	Gibco BRL, Eggenstein
RNase-Inhibitor	Boehringer, Mannheim
RNA-Längenstandards	Gibco BRL, Eggenstein
Roti®-Quant Protein Assays	ROTH, Karlsruhe
RPMI-Medium 1640	Gibco BRL, Eggenstein
SDS	Serva, Heidelberg
Soybean Trypsin Inhibitor	Sigma, Deisenhofen

Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
SUPERSCRIPT TM II	Gibco BRL, Eggenstein
Szintillationsflüssigkeit	Packard, Groningen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Total RNA Isolation Reagent	Biomol, Hamburg
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Vectashield Antifading	Firma Vector, Firma Camon, Heidelberg
X-Gal	Biomol, Hamburg
Xylencyanol FF	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt

2.2 Gebrauchswaren

Blotting Papier GB 003	Schleicher & Schüll, Dassel
Blotting Papier GB 002	Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalfilter Minisart NML (0.45 und 0.2 µm)	Sartorius, Göttingen
Millipore Filter HV, 45 µm	Nihon Millipore, Yonezawa, Japan
Fixogum Rubber-Cement (Marabu)	Schütt, Göttingen
Hybond TM -C extra	Amersham Buchler, Braunschweig
Kühlzentrifugenbecher	Nalge, Rochester, USA
LX-24-Entwickler	Kodak, Stuttgart

Objektträger/Deckgläschen	Schütt, Göttingen
Superfrost* Plus Objektträger	Schütt, Göttingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikwaren	Greiner, Nürtingen
Polymax-Fixierer	Kodak, Stuttgart
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Hyperfilm-MP	Amersham Buchler, Braunschweig
Röntgenfilme ³ STD.-Hyperfilm	Amersham-Buchler, Braunschweig
Schlauchfolie	Schütt, Göttingen
Ultrazentrifugengefäße	Beckmann, München
Zellkulturflaschen	Greiner, Nunc

2.3 Puffer und Stammlösungen

Die Lösungen für den routinemäßigen Laborbetrieb wurden nach (Sambrook et al., 1989) angesetzt. Die Chemikalien wurden den Erfordernissen entsprechend in deionisiertem (dH₂O), in vollentsalztem Wasser (Millipore), in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) oder Ampuwa gelöst. Je nach Bedarf wurden die Lösungen dampfdrucksterilisiert^{1a}, sterilfiltriert^{1b}, frisch angesetzt², aliquotiert und bei -20°C³ oder bei 4°C⁴ aufbewahrt. Für Versuche mit RNA wurden die Chemikalien in mit 0.1 % Dimethyldicarbonat (DEPC-Ersatz) behandeltem und dampfdrucksterilisiertem Wasser gelöst.

AP 1-Puffer ^{1a}	150 mM NaCl
	100 mM Tris/ HCl pH 7.5
AP 3-Puffer ^{1a}	100 mM NaCl
	50 mM MgCl ₂

	100 mM Tris/ HCl pH 9.5
Coomassie-Lösung	30% (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R250
10 x Bindungspuffer (Gel Retardation Assay)	100 mM HEPES (pH 8,0) 1 mM EDTA 17 % Glycerol (40-50 mM) MgCl ₂ (0,1 M) KCl 20 mM DTT (vor Gebrauch zugegeben)
50 x Denhardts Lösung ^{1b,3}	1 % (w/v) Rinderserumalbumin 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) Ficoll 400
Entfetter-Lösung ²	348 ml Chloroform 48 ml Ether 48 ml Methanol
Elutionspuffer (Fusionsproteinisolierung)	10 mM reduziertes Glutathion 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Coomassie-Entfärber	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
E-Puffer (10 x)	300 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0) 50 mM EDTA
Extraktionspuffer (Gesamtprotein)	100 mM Kaliumphosphat (pH 7,8) 1 mM DTT (direkt vor Gebrauch zugeben)

	0,2 % (v/v) Triton X-100 (Lysis von Zellkulturen)
	1 % (v/v) Triton X-100 (Lysis von Geweben)
Formamid-Stopmix	95 % (v/v) Formamid 50 mM EDTA 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylenyanol
IPTG ^{1b,3}	100 mM in H ₂ O
1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) ^{1a}	342 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ 158 ml 1 M NaH ₂ PO ₄
NBT/BCIP-Färbelösung ²	200 ml NBT/BCIP-Stocklösung in 10 ml AP 3-Puffer
Paraformaldehyd-Lösung (4 %) ²	4 % PFA (w/v) 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,2) auf 60 °C erhitzen und etwas NaOH hinzugeben
Gewebe-Lysis-Puffer	100 mM NaCl
(Isolierung genomischer DNA)	100 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 0,5 % (w/v) SDS 0,5 mg/ml Proteinase K
Glycylglycinpuffer (pH 7,8)	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO ₄ 4 mM EGTA
Hybridisierungslösung	10 % (w/v) Dextransulfat 5 x Denhardts Lösung 5 x SSC

	0,5 % SDS
	Lachs-Spermien-DAN 100 µg/ml
Luciferase-Reaktionspuffer	165 µl Glycyglycinpuffer (25 mM, pH 7,8)
	35 µl Kaliumphosphat (100 mM, pH 7,8)
	2,5 µl DTT (100 mM)
	2,5 µl ATP (200 mM)
Luciferin (Stocklösung)	10 mg D-Luciferin (freie Säure)
	55 mg DTT
	37,5 ml Glycyglycin-Puffer (25 mM, pH 7,8)
	(Aliquots bei -70°C, lichtgeschützt lagern)
Luciferin-Injektionslösung	1 ml Luciferin Stocklösung
	4 ml Glycyglycinpuffer (25 mM, pH 7,8)
	80 µl DTT (0,5 M)
Kernproteinpuffer A (Gewebe)	0,6% (v/v) Nonidet P40
	10 mM HEPES (pH 7,9)
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
Kernproteinpuffer B (Gewebe)	25 % (v/v) Glycerol
	20 mM HEPES (pH 7,9)
	1,2 mM MgCl ₂
	0,2 mM EDTA
Kernproteinpuffer NE (Zellen)	10 mM HEPES (pH 7,9)
	10 mM KCl

	0,2 mM EDTA
	0,2 mM EGTA
Kernproteinpuffer NESG (Zellen)	25 % (v/v) Glycerol
	20 mM HEPES (pH 7,9)
	0,2 mM EDTA
	0,2 mM EGTA
Zu den Kernproteinpuffern	1 mM DTT
wurde vor Gebrauch zugefügt:	1 mM PMSF
	2 mM Benzamidin
	5 µg/ml Aprotinin
	5 µg/ml Leupeptin
	5 µg/ml Pepstatin
NBT-Stammlösung	75 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid
Puffer W	100 mM Tris/HCl pH (8.0)
	1 mM EDTA
SDS-PAGE Probenpuffer	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8)
	7 % SDS
	30 % Glycerol
	0,3 % Bromphenolblau
	15 % β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen)
SDS-PAGE Sammelgelpuffer (2 x)	0,25 M Tris/HCl (pH 6,8)
	0,2 % SDS
SDS-PAGE Trenngelpuffer (4 x)	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)

	0,4 % SDS
SDS-PAGE Laufpuffer (10 x)	250 mM Tris/HCl 2,5 M Glycin 1 % SDS
Semi-dry Transferpuffer	25 mM Tris/HCl (pH 8,3) 150 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
20 x SSC (pH 7,0)	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat
20 x SSPE (pH 7,0)	0,02 M EDTA 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 3,6 M NaCl
TBS	100 mM Tris/HCl 0,9 % (w/v) NaCl
PBS (pH 7,2)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
Spermidin ^{1b,3}	200 mM
20 x SSC ^{1a}	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natrimcitrat (pH 7.0)
Stop-Mix I ⁴	15 % Ficoll 400 1 mM EDTA

	0.01 % Orange G
Stop-Mix II ⁴	0.25 % Bromphenolblau
	0.25 % Xylencyanol
	30 % Glyzerin in Wasser
50 x TAE-Puffer ^{1a}	2 M Tris (pH 8,0)
	2 M Essigsäure
	50 mM EDTA (pH 8,0)
5 x TBE-Puffer ^{1a}	450 mM Tris (pH 8.0)
	450 mM Borsäure
	10 mM EDTA
10 x TBS ^{1a}	100 mM Tris (pH8,0)
	1,5 M NaCl
1 x TE-Puffer ^{1a}	10 mM Tris (pH 7,5)
	1 mM EDTA
Thionin-Färbelösung (0,15 %) ²	0,15 % Thionin (w/v)
	0,1 M Essigsäure
	3,6 mM Natronlauge
Trisacetat-Puffer ^{1a}	1 M Tris
	pH 7,6 mit Essigsäure einstellen
X-Gal ^{1b,3}	2 % in Diemethylformamid

2.4 Medien und Zusätze

2.4.1 Medien für Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium (pH 7,5) 1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl

Zusätze zur Selektion: Ampicillin (0,1 mg/ml)
Kanamycin (0,05 mg/ml)

Agarplatten enthielten 1,5 % (w/v) Agar

2.4.2 Medien für die Zellkultur

Medien und Zusätze zur Anzucht eukaryotischer Zellen wurden als sterile Lösungen bezogen (PAN, Aidenbach; Sigma, Deisenhofen). Zur Kultivierung primärer Fibroblasten sowie verschiedener Tumorzelllinien wurden folgende Medien benutzt:

- Alpha MEM Eagle mit L-Glutamin ohne Ribonukleoside und Deoxyribonukleoside ohne NaHCO₃
- DMEM (Dulbeccos „modified Eagle medium“): 4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃
- Hams F-10 Medium mit L-Glutamin mit 1,2 g/l NaHCO₃
- RPMI 1640: mit 3,7 g/l NaHCO₃
- Waymouths MB 752/1 Medium mit L-Glutamin mit 2,24 g/l NaHCO₃

Medienzusätze zur Kultivierung: 10 % (v/v) FKS, 15 % (v/v) HS, L-Glutamin (2-4 mM), Penicillin (200 U/ml), Streptomycin (0,2 mg/ml), Gentamycin (50 mg/ml)

Medienzusätze zur Lagerung in N₂: 20 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO

Während der Präparation von befruchteten Oocyten und zur Kultivierung unter 5 % CO₂ wurden folgende von der Fa. Sigma bezogene Medien verwendet:

M2-Medium:	5 ml 10 x Hanks
	1,25 ml 40 x HEPES
	165 µl 300 x Na-Pyruvat
	0,25 ml 1 M NaOH
	0,5 ml Penicillin (6 mg/ml)
	Streptomycin (5 mg/ml)
	43 ml Ampuwa
	0,2 g BSA
M16-Medium:	1 ml 10 x EARLE
	270 µl 37,5 x NaHCO ₃
	33 µl 300 x Na-Pyruvat
	100 µl Penicillin (6 mg/ml)
	Streptomycin (5 mg/ml)
	8,6 ml Ampuwa
	40 mg BSA

2.5 Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 20 Min. bei 121°C und 10⁵ Pascal im Dampfdruckautoklaven (Webeco, Bad Schwartau) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengröße: 0,2 µm). Gebrauchswaren wurden autoklaviert oder für 8-12 Std. bei 180°C hitzesterilisiert.

2.6 Molekulargewichtstandards

DNA-Längenstandard (1 µg/µl)	DNA 1 Kb-Leiter (0.12-12.2 Kb) (Gibco BRL, Eggenstein)
RNA-Längenstandard (1µg/µl)	RNA-Leiter (0.24 - 9.5 Kb) (Gibco BRL, Eggenstein)
SDS-Proteinmarker	Prestained SDS-PAGE Standard SeeBlue™ Plus 2 (4 - 500 kDa) (Firma NOVEX)

2.7 Verwendete Vektoren, Bakterienstämme, Antibiotika und Agarplatten

2.7.1 Vektoren

Plasmid-Vektoren: pASK-IBA2	3,3 Kb	(IBA, Göttingen)
pBlueScript II SK +/-	3,0 Kb	(Stratagene, Heidelberg)
pCAT basic	4,6 Kb	(Promega, Wisconsin,USA)
pCMV-βGal (pUC 18, 19)	14,3 Kb	(Norander et al., 1983)
pEGFP-C1	4,7 Kb	(Clontech, Heidelberg)
pGEM-T	3,0 Kb	(Promega, Wisconsin,USA)
pGL3 basic	4,8 Kb	(Promega, Wisconsin,USA)

2.7.2 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i>	DH5a	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i>	HB 101	(Bolivar und Backman, 1979)
<i>Escherichia coli</i>	JM109	(Messing, 1983)
<i>Escherichia coli</i>	LE 392	(Murray et al., 1977)

2.7.3 Antibiotika und Agarplatten

SOC-Medium:	(Gibco BRL, Eggenstein)
LB-Ampicillin-Medium:	50 µg Ampicillin pro ml LB-Medium
LB-Kanamycin-Medium:	30 µg Kanamycin pro ml LB-Medium
LB-Amp-IPTG-X-Gal-Medium:	LB-Ampicillin-Medium 100 µM IPTG 0,4 % X-Gal (w/v)

Den jeweiligen Selektivnährböden wurde vor dem Autoklavieren zusätzlich 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

2.8 Gensonden, Oligonukleotide und Antikörper

2.8.1 Gensonden und Klone

HEF-2 (Rapp et al., 1989; Hanes et al., 1992)

Zur Überprüfung der Integrität und der Quantität von RNA wurde ein cDNA-Fragment für den humanen Elongations-Faktor-2 (HEF-2) benutzt. Das als Gensonde verwendete 1,6 Kb Fragment wurde mit *Bam* HI und *Bgl* II aus der HEF-2-cDNA abgespalten, die dem Institut für Humangenetik freundlicherweise von Prof. Dr. K.STD. Scheit, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, zur Verfügung gestellt wurde.

2.8.2 Synthetische Oligonukleotide

Alle für die Experimente verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) synthetisiert und im lyophilisierten Zustand erworben, mit Ampuwa auf eine Konzentration von 100 μ M (100 pmol/ μ l) eingestellt und als Stock bei -20° C gelagert.

APG-GFP (f1)	5'-GGG GGA ATT CTT GAG ACT GTA TCA GGA GTG -3'
APG-GFP (r1)	5'-GGG GGT CGA CCA TGT CTT CTG GAG TGA TGA AC -3'
APG-GFP (f2)	5'-GGG GGA ATT CCT ACC TAT CCA GAG TAG CCT C -3'
APG-GFP (r2)	5'-GGG GGT CGA CTT AGT CCA CTT CCA TCT CTC CG -3'
B5/1 (f)	5'-AGC TTC TCG AGC CTC GAC CTT TGG -3'
B5/1 (r)	5'-TCG AGC CAA AGG TCG AGG CTC GAG -3'
B5/1m (f)	5'-AGC TTT CGA Gc a T aa ACC TTT GGG T -3'
B5/1m (r)	5'-TCG AGA CCC AAA GGT ttA tGC TGC A -3'
B5/2 (f)	5'-AGC TTA CCT TTG GGT GCT TGG C -3'
B5/2 (r)	5'-TCG AGG CCA AGC AGC ACC CAA CGG T -3'
B5/2m (f)	5'-AGC TTA CCT TTG aaa GCT GCT TGG C -3'
B5/2m (r)	5'-TGG AGG CCA AGC AGC ttt CAA AGG T -3'
B4/2 (f)	5'-AGC TTC CCA TGG GCG GCG CGA GGC ACT T -3'
B4/2 (r)	5'-TCG AGA ACT GCC TCG CGC CGC CCA TGG G -3'
EGFP-N (f)	5'-CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G -3'
EGFP-C (r)	5'-CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G -3'
Insl3 (f)	5'-TTT GGA CTA TAA AGC TAG TGG -3'
Insl3 (r)	5'-AGT TTG AAT CCA GCC TGG TCC -3'
pCAT (f)	5'-CGG CCT TTA TTC ACA TTC TTG -3'

pCAT (r)	5'- GGA TTG GCT GAG ACG AAA AAC -3'
lym1a (f)	5'- AGC TTT CCC GCC AAG GCC CAT GG -3'
lym1a (r)	5'- TCG AGC CAT GGG CCT TGG CGG GA -3'
lym2a (f)	5'- AGC TTC TCG AGC CTC GAC CTT TGG G -3'
lym2a (r)	5'- TCG AGC CCA AAG GTC GAG GCT CGA G -3'
mlym2 (f)	5'- AGC TTC TCG AGC CTC GtC agT TGG G -3'
mlym2 (r)	5'- TCG AGC CCA Act Gac GAG GCT CGA G -3'
M2/1 (f)	5'- AAT TCC CTC GAC CTT TGG GTC CTC GAC CTT TGG GTC CTC GAC CTT TGG GTT -3'
M2/1 (r)	5'- CTA GAA CCC AAA GGT CGA GGA CCC AAA GGT CGA GGA CAA AGG TCG AGG G -3'
M2/2 (f)	5'- AAT TCC CTC GAC CTT TGG GTC CTC GAC CTT TGG GTC CTC GAC CTT TGG GTG -3'
M2/2 (r)	5'- TCG ACA CCC AAA GGT CGA GGA CCC AAA GGT CGA GGA CCC AAA GGT CGA GGG -3'

Die thermodynamische Schmelztemperatur T_m wurde für kurze (≤ 18 nt) Oligonukleotide nach der 2+4 -Formel (Patel et al., 1984) („Wallace Temperatur“) (2.1) berechnet und für längere Primer (≥ 19 nt) nach der GC-Formel (2.2) (Sambrook et al., 1989) abgeschätzt.

$$T_m = N_{A+T} \cdot 2 \text{ } ^\circ\text{C} + N_{G+C} \cdot 4 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (N = \text{Anzahl Nukleotide}) \quad (2.1)$$

$$T_m = 61,2 \text{ } ^\circ\text{C} + 0,41(\%G + C) - \frac{600}{l} \quad (l = \text{Länge des Oligonukleotids}) \quad (2.2)$$

Die für die jeweilige PCR-Reaktion optimale „Annealing“ -Temperatur kann zwischen 3°C–12°C über der T_m liegen und mußte daher für jede PCR optimiert werden.

2.8.3 Antikörper

Tabelle 2.1: In „Gel Retardation Assays“ (2.28) verwendete Antikörper

Antikörper	Anwendungsgebiet	bezogen von
anti a-myb	Identifikation von transagierenden Faktoren, die an den <i>Insl3</i> -Promotor binden	Fa. Santa Cruz, Santa Cruz, Delaware, USA
anti c-myb	Identifikation von transagierenden Faktoren, die an den <i>Insl3</i> -Promotor binden	Fa. Santa Cruz, Santa Cruz, Delaware, USA
anti CoupTF	Identifikation von transagierenden Faktoren, die an den <i>Insl3</i> -Promotor binden	Fa. Santa Cruz, Santa Cruz, Delaware, USA
anti HNF4	Identifikation von transagierenden Faktoren, die an den <i>Insl3</i> -Promotor binden	Fa. Santa Cruz, Santa Cruz, Delaware, USA
anti Insl3	Immunhistochemische Analyse von Insl3 im Pankreas der Maus	Medical University of South Carolina, USA

2.9 Organ-und Gewebeproben

Die Organe zur Anfertigung von Gewebeschnitten und zur Isolierung von DNA und RNA stammen, falls nicht anders angegeben, von FVB-Mäusen aus dem institutseigenen Tierstall. RNA aus den Testes der Mausmutanten *W/W^v*, *olt/olt*, *Insl3^{-/-}* und *qk/qk* sowie RNA aus den Testes verschiedener postnataler Stadien stammen ebenfalls von Tieren aus dem institutseigenen Stall.

2.10 Eukaryotische Zelllinien

3T3 Zelllinie	(Dr. Strutz, Klinikum Göttingen)
F9 Zelllinie	(Strickland und Mahdavi, 1978)
HeLa Zelllinie	(Jones et al., 1995)
L-M(TK-)	(Dr. Mansouri, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen)
MA10 Zelllinie	(Ascoli, 1981)
Y1 Zelllinie	(ATCC, USA)

2.11 Mäusestämme

Mäuse des Stammes FVB wurden in den institutseigenen Tierställen gezüchtet. Die Haltungsbedingungen bestanden aus einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (Hellperiode: 6⁰⁰-18⁰⁰ Uhr) bei einer Temperatur von 22 °C. Den Tieren standen eine pelletierte Zuchtdiät (Herilan, Eggersmann, Rinteln) und Wasser ad libitum zur Verfügung.

2.12 Methoden zur Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.12.1 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus Organen

Lyse Puffer:	50 mM Tris / HCl, pH 8.0 100 mM EDTA 0.5 % SDS
Proteinase K:	10 mg/ml in H ₂ O

Hochmolekulare genomische DNA wurde modifiziert nach (Laird et al., 1991) isoliert. Dazu wurde 1 cm des Mausechwanzes in 10 x Vol. Lyse-Puffer (w/v) zusammen mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 500 µg/ml in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 55°C ü. N. in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Phenol- (1 x Vol. ss-Phenol) und Phenol/Chloroform-Extraktion (1 x Vol. ss-Phenol/Chloroform 1:1) wurde die DNA mit 0,1 x Vol. 3 M NaAc und 2 x Vol. 100 % EtOH bei RT ausgefällt, mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 200 µl Ampuwa über mehrere Tage bei RT gelöst und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Nach vollständigem Lösen der DNA erfolgte die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung im Spektralphotometer (Ultraspec 3000 pro, Amersham Pharmacia) (2.12.6). Die DNA wurde im genomischen Southern-Blot (2.17.1) oder im Rahmen der Genotypisierung transgener Mäuse (2.30) eingesetzt.

2.12.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Midi- oder Maxipräparation

Mit Hilfe von Plasmid-Vektoren kann rekombinante DNA (2.16) in Bakterien vermehrt werden. Die Auswahl der Plasmid-Isolierungsmethoden erfolgte nach dem jeweiligen Bedarf und der Kopienzahl der verwendeten Plasmide.

Größere Mengen Plasmid-DNA für Hybridisierungs- und Klonierungsexperimente wurden aus 200-500 ml LB-Übernachtskulturen mit entsprechendem plasmidkodiertem Antibiotikum durch eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Birnboim, 1983) mit den Lösungen des QIAGEN® -Plasmid-Systems (QIAGEN®, Hilden) präpariert und mit Hilfe der mitgelieferten Anionenaustauschersäulen den Herstellerangaben folgend gereinigt. Die Kulturen wurden aus Minipräparations- oder Glycerinkryokulturen angeimpft und ü. N. bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

2.12.3 Isolierung von Plasmid -DNA durch Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid -DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation) wurde mit den Lösungen des QIAGEN®-Plasmid-Kits (QIAGEN®, Hilden) mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Birnboim, 1983) aus 5 ml LB-Übernachtskulturen mit entsprechendem plasmidkodiertem Antibiotikum durchgeführt, wobei auf die Reinigung über Anionenaustauschersäulen verzichtet wurde. Die Qualität dieser DNA ist hinreichend gut, um sie in Sequenzierungsreaktionen (2.18.6), in Restriktionen (2.18.1), im Southern-Blot (2.17.1) und für die Insert-Isolierung (2.14) einzusetzen.

2.12.4 Herstellung von Glycerinkryokulturen

Glycerinkryokulturen wurden aus den LB-Übernachtskulturen der Plasmid-Minipräparationen (2.12.3) durch Zugabe von 500 µl sterilem Glycerin zu 800 µl der Bakteriensuspension, anschließender Durchmischung und Lagerung bei -70 °C hergestellt.

2.12.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Gesamt-RNA für Northern-Analysen wurde aus unterschiedlichen Geweben der Maus isoliert. Da RNA besonders anfällig gegen Abbau durch RNasen endogener und exogener Herkunft ist, wurden alle Lösungen und das Millipore-STD₂O ü. N. mit 0.1 % DMDC inkubiert und autoklaviert, die Benutzung von Glaswaren weitestgehend vermieden oder ü. N. bei 180 °C erhitzt. Um eine RNase-Kontamination aus exogener Quelle zu vermeiden, wurden alle Glasgeräte und Einmal-Plastikartikel nur mit Handschuhen berührt. Die Arbeitsschritte wurden weiterhin nach Möglichkeit auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt.

Die Organe für die RNA-Präparation wurden mit sterilem Präparierbesteck entnommen, kurz in 1 x PBS-Puffer gespült und sofort in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolierung der RNA wurde mit dem „Total RNA

Isolations Reagent“ der Firma Biomol (Hamburg) durchgeführt und basiert im wesentlichen auf der Methode von (Chomczynski und Sacchi, 1987). Bis zu 100 mg Gewebe wurden mit 1 ml „Total RNA Isolation Reagent“ versetzt, mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax T 25, Schütt, Göttingen) homogenisiert und zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe 5 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Suspension vorsichtig geschwenkt und erneut 5 Min. auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation für 10 Min. bei 4000 x g und 4 °C wurden die Phasen getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1 x Vol. 2-Propanol für 10 Min. auf Eis präzipitiert, durch Zentrifugation für 10 Min. bei 4000 x g und 4 °C sedimentiert, einmal in 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl DEPC-Wasser (2.3) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch (2.12.6), und die Intaktheit der RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel (2.13.2) getestet. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

2.12.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Bestimmung der Lichtabsorption bei 260 nm in einem Spektralphotometer (Ultrospec[®] 3000 pro, Amersham Pharmacia Biotech). Man erhält die Nukleinsäure-Konzentration nach folgender Formel:

$$c = (OD_{260} - OD_{320}) \cdot \varepsilon \cdot f$$
$$f = \text{Verdünnungsfaktor}$$
$$\varepsilon = 50 \mu\text{g} / \mu\text{l} \quad (\text{DNA})$$
$$\varepsilon = 40 \mu\text{g} / \mu\text{l} \quad (\text{RNA})$$
(2.3)

2.13 Gelelektrophoretische Methoden

2.13.1 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) wurde standardmäßig mit einer Agarosekonzentration von 1.0 % (w/v) im 0.5 x TBE-Puffersystem durchgeführt und diente der Integritätsprüfung isolierter bzw. synthetisierter Nukleinsäuren (2.12), der Überprüfung durchgeführter enzymatischer Modifikationen (2.18) und der „Insert“-Isolierung über Anionenaustauschersilikat (siehe 2.14.1). Die TBE -Gelelektrophorese wurde auch dann benutzt, wenn das Gel nach der Elektrophorese geblottet werden sollte (2.17.1 und 2.17.3). Die Elektrophorese restringierter genomischer DNA für genomische „Southern-Blots“ (2.17.1) wurde in großen horizontalen Gelkammern (10 x 15 cm) im 1 x TAE Puffersystem durchgeführt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 100-200 ml des entsprechenden Elektrophoresepuffers gelöst, mit 5 µl Ethidiumbromid (Stammlösung 1 µg/µl) versetzt und in die Gelkammer gegossen. Nach Erkalten und Verfestigung der Agarose wurden die Reaktionsansätze nach Zugabe von 0.2 x Vol. Stop-Mix I aufgetragen und in dem entsprechenden Elektrophorese-Puffer bei einer konstanten Spannung von 1.0 - 5.0 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator (230-360 nm) mit einem Video-Dokumentationssystem (Herolab, Heidelberg) fotografiert und bei Bedarf auf Nitrozellosemembranen transferiert (2.17.1).

2.13.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

(Hodge, 1994)

10 x MOPS-Puffer:	0,2 M MOPS
	50 mM NaOAc
	10 mM EDTA pH 7,0 mit NaOH

RNA-Probenpuffer:	60 % Formamid
	9,25 % Formaldehyd
	1,5 x MOPS-Puffer
RNA-Ladepuffer:	15 % Ficoll 400
	1 mM EDTA
	0.01 % Orange G
	0,05 % Ethidiumbromid (w/v)

Um eine Rückbildung der Sekundärstruktur der RNA während der Elektrophorese zu vermeiden, wurden RNA-Proben unter denaturierenden Bedingungen in Agarosegelen mit Formaldehyd aufgetrennt. Zur Herstellung dieser Gele wurden 200 ml eines Agarosegels (1,0 %) durch Aufkochen von 2 g Agarose und 20 ml 10 x MOPS-Puffer zusammen mit 148 ml DMDC-Wasser hergestellt, nach dem Abkühlen bis auf 60 °C mit 33,2 ml Formaldehyd bis auf eine Endkonzentration von 6,2 % (v/v) gemischt und das Gel wie unter 2.13.2 beschrieben in eine horizontale Gelkammer gegossen. Das denaturierende Agarosegel wurde analog zum „Southern-Blot“ zum Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA im „Northern-Blot“ (Sambrook et al., 1989) auf eine Nitrozellulosemembran (2.17.3) benutzt.

Die RNA-Proben (15-30 µg Gesamt-RNA bzw. 1-2 µg poly-A⁺-mRNA) und 4 µl RNA-Längenstandard (4 µg) wurden in der Vakuum-Zentrifuge oder durch Zugabe von DMDC-Wasser auf ein Vol. von 6 µl gebracht, mit 12 µl frisch zubereitetem Proben-Puffer vermischt, für 10 Min. bei 65 °C denaturiert und anschließend für 5 Min. auf Eis gestellt, um eine Renaturierung zu vermeiden. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0.25 x Vol. RNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS-Puffer für 8-10 Std. bei konstanter Spannung von 4.0 V/cm bei RT.

2.13.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.13.3.1 PAGE zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten im Gel

Die PAGE wurde zur Identifikation von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten, die kleiner als 500 bp sind, zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten sowie bei der Analyse von Protein/DNA-Komplexen (Gel Retardation Assay) verwendet. Dazu wurden je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente 6-12%ige Polyacrylamidgele hergestellt. 7.5-15 ml 40%ige Acrylamidlösung und 5 ml 5x TBE wurden mit H₂O auf 50 ml gebracht und sofort nach Zugabe von 400 µl 10%igem Ammoniumperoxidisulfat (APS) und 20 µl TEMED zwischen die gereinigten Glasplatten der Elektrophoresekammer (LKB, Vertikal-Elektrophoresekammer 2001, Bromma, Schweden) luftblasenfrei gegossen und der Kamm eingesetzt. Zur vollständigen Polymerisation wurde das Gel 1 Std. bei RT stehengelassen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 100-200 V für mehrere Std., wobei als Elektrophorese-Puffer 1x TBE verwendet wurde.

2.13.3.2 Denaturierende PAGE zur Analyse des Laufverhaltens von Fusionsproteinen

Acrylamid-Stammlösung:	40 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid (29:1) (Amresco [®] , Ohio)
Laufpuffer (5x):	25 mM Tris/HCl (pH 8.3) 192 mM Glycin 0.1 % SDS
Ladepuffer (2x):	0.5 M Tris/HCl (pH 6.8) 20 % Glyzerin 0.25 % Bromphenolblau 4 % SDS (frisch zugesetzt) 10 % 2-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)
Sammelgelpuffer (4x):	0.5 M Tris/HCl (pH 6.8)
Trenngelpuffer (4x):	1.5 M Tris/HCl (pH 8.8)

APS-Lösung

10 % APS (w/v) in H₂O

Durch die denaturierende SDS-PAGE (Laemmli, 1970) werden Proteine entsprechend ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Durch Aufkochen mit SDS werden die Polypeptidketten entfaltet und dann einheitlich mit einer negativen Ladung abgesättigt, so dass die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar wird und deren Wanderungsgeschwindigkeit vorrangig durch das Molekulargewicht bestimmt ist. Durch Verwendung von 2-Mercaptoethanol werden zusätzlich vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Mit Hilfe der SDS-PAGE wurden die Fusions-Proteine aus dem *Strep-tag*[®]-KIT (IBA, Göttingen) aufgetrennt und nach der Elektrophorese durch „Western-Blotting“ auf eine Membran (Porablot PVDF, Macherey Nagel, Düren) transferiert (2.17.4).

Die SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen wurde standardmäßig diskontinuierlich mit einem Konzentrations- und pH-Sprung im Gel durchgeführt. Dadurch wurde die Lauffront gebündelt und die Auflösung der Elektrophorese erhöht. Ein 3.5-20 %iges Trenngel (pH 8,8) wurde dabei in 1,5 mm Schichtdicke zwischen zwei Glasplatten (14 x 16 cm) gegossen und mit einem 4 %igen Sammelgel (pH 6,8) überschichtet. Die Polyacrylamidstufen wurden aus der 40 %igen Acrylamid-Stammlösung (Amresco[®], Ohio) in 1 x Trenn- bzw. Sammelgelpuffer auf die entsprechende Konzentration verdünnt und mit 0,1 % SDS versetzt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe des Radikalbildners APS (0,05 %) und des Radikal-Stabilisators TEMED (0,1 %) gestartet. Die Trenngelstufe wurde bis zur Polymerisation mit 1 x Trenngelpuffer überschichtet. Nach einem Vorlauf von 30 Min. bei 25 mA in 1 x Laufpuffer wurden die Proben mit 1 x Vol. 2 x Ladepuffer vermischt, für 3 Min. bei 95 °C denaturiert, 1 Minute bei 12000 x g zentrifugiert, in die Geltaschen pipettiert und bei 50 mA aufgetrennt. Als Standard wurden 7,5 µl eines vorgefärbten Protein-Elektrophorese-Standards („prestained“ SeaBlue[™] Plus2, 4-250 kDa, Firma NOVEX) eingesetzt.

2.14 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten

2.14.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels Anionenaustauschersilikat

Diese Methode wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente für Hybridisierungs- (2.18.5) und für Klonierungsexperimente (2.16) zu isolieren. Dazu kamen die Fertigsysteme der Firmen Genomed (Bad Oeynhausen, „Jetsorb“) und Macherey-Nagel (Düren, NucleoSpin® Extract) zum Einsatz. In beiden Systemen wird die Agarose nach Zugabe einer hochmolaren Lösung des chaotropen Salzes Natriumperchlorat (NaClO_4) bei 50 °C irreversibel aufgelöst und die DNA nach dem von Vogelstein und Gillespie (1979) beschriebenen Prinzip in Suspension („Glasmilch“, Jetsorb) oder in „spin-Säulen“ an Anionenaustauschersilikat gebunden, mehreren Waschschritten mit Hochsalzpuffer und Niedrigsalzpuffer unterzogen und mit Wasser (Ampuwa) oder TE-Puffer eluiert. Die im Macherey Nagel-System durch Zentrifugation optimierten Waschschrritte ermöglichen eine salz- und silikatfreie DNA-Präparation und wurden daher zur Aufbereitung von PCR-Produkten vor deren Klonierung (2.16.1) benutzt.

Die entsprechende DNA-Bande wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung (2.13.1) auf einem Transilluminator unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und die DNA den Herstellerangaben folgend isoliert.

2.15 Techniken der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Technik ist eine enzymatische Methode für die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Saiki et al., 1988). Die Spezifität dieser Amplifikation basiert auf zwei Oligonukleotidprimern, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren und nach einer Hitzedenaturierung an den komplementären Strängen binden. Die hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase) des Archeabakteriums *Thermus*

aquaticus (Chien et al., 1976) synthetisiert bei ihrer optimalen Temperatur (72 °C) die DNA entlang der Region zwischen den Primern. Durch sich wiederholende Zyklen von Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Primer ("Annealing") und DNA-Synthese (Elongation) wird eine exponentielle Vermehrung des jeweiligen DNA-Fragmentes erreicht. Durch den Einsatz der hitzestabilen *Taq*-Polymerase wird die Automatisierung der PCR in Thermocyclern ermöglicht.

2.15.1 PCR an Plasmid-DNA

Die PCR an Plasmid-DNA wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente zu amplifizieren, die nicht durch restriktionsenzymatische Spaltung isoliert werden konnten. Für die PCR wurden folgende Reagenzien aus dem PLATINUM® *Taq* DNA Polymerase-System (Gibco BRL) in einem dünnwandigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zu einem Gesamtansatz von 50 µl zusammenpipettiert:

x µl	Plasmid-DNA (100 ng)
1 µl	Primer 1 (10 pmol/ µl)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/ µl)
1 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
5 µl	10 x PCR-Puffer
1,5 µl	50 mM MgCl ₂
<u>0,5 µl</u>	PLATINUM® <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl	Ampuwa

Die Ansätze wurden in einem Thermocycler (Primus 96, MWG Biotech) mit folgendem PCR-Profil für 35 Zyklen inkubiert:

5 Min.	95 °C	Vordenaturierung	} x 35 (2.4)
30 Sek.	95 °C	Denaturierung	
30 Sek.	55–65 °C	Annealing	
1 Min./kb	72 °C	Elongation	
7 Min.	72 °C	Auffüllreaktion	

Die „Annealing“-Temperatur (Anlagerung der Primer) war spezifisch für die einzelnen Primerpaare und wurde für jede Primerkombination optimiert. Die Spezifität des Produktes (Fragmentlänge) wurde nach der Amplifikation in einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.13.1) überprüft. Dazu wurden 5 µl des Reaktionsansatzes mit 0,2 x Vol. Stop-Mix I vermischt und auf das Gel aufgetragen. In präparativen Ansätzen zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden 20 bis 30 µl des PCR-Ansatzes ebenfalls mit 0,2 x Vol. Stop-Mix I auf ein horizontales Agarosegel (1 %) aufgetragen und wie unter 2.14 beschrieben gereinigt.

2.15.2 „Reverse Transkriptions-PCR“ (RT-PCR)

(Loh et al., 1989)

Unter der „Reversen Transkriptions-PCR“ versteht man die Amplifikation von cDNA-Sequenzen (komplementäre DNA), die zuvor durch reverse *in vitro*-Transkription der mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase synthetisiert wurden. Mittels der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen in Geweben detektiert werden. Die RNA wird dabei in cDNA umgeschrieben (Erststrangsynthese der komplementären DNA). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die RT-PCR mit sequenzspezifischer Erststrangsynthese benutzt, um die Expression eines großen Transkriptes zu untersuchen und dessen 5'-cDNA Bereiche zu klonieren. Die Intaktheit und die Integrität der verwendeten RNA wurde über eine Kontroll-RT-PCR mit einem Primerpaar, das ein spezifisches 480 bp Fragment eines ubiquitär exprimierten Gens (GAPDH=Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) amplifiziert, dokumentiert (Seipp und Buselmaier, 1994). Es wurden 1 bis 5 µg Gesamt-RNA mit 2 pmol genspezifischem Primer (GSP) und 2 pmol des reversen GAPDH-Primers (GAPDH_{rev})

in einem Ansatzvolumen von 11 μ l für 10 Min. bei 70 °C denaturiert und 5 Min. auf Eis gekühlt. Zu diesem Ansatz wurden folgende Komponenten aus dem SUPERSCRIPT™ II-System (Gibco BRL) gegeben, und anschließend 2 Min. bei 42 °C in einem Thermocycler (Primus 96, MWG Biotech) vorinkubiert:

11 μ l	Ansatz (RNA und Primer)
4 μ l	5 x Reverse Transkriptase-Puffer
2 μ l	DTT (0,1 M)
1 μ l	dNTP-Mix (je 10 mM)
1 μ l	RNase Inhibitor

Nach der Vorinkubation wurde 1 μ l RNase STD. (SUPERSCRIPT™ II, 200 U) dazupipettiert, gemischt und 50 Min. bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die zur cDNA komplementäre RNA durch Zugabe von 2 U *E. coli* RNase STD. (Gibco BRL) und 20 Min. Inkubation bei 37 °C entfernt, da diese RNA die Amplifikation speziell von größeren PCR-Produkten (> 1 Kb) inhibieren kann. Die cDNA konnte direkt als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt werden oder wurde bei -20 °C eingefroren.

Für die PCR wurden folgende Reagenzien aus dem PLATINUM® *Taq* DNA Polymerase-System (Gibco BRL) in einem dünnwandigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zu einem Gesamtansatz von 50 μ l zusammenpipettiert:

2 μ l	cDNA
1 μ l	Primer 1 (10 pmol/ μ l)
1 μ l	Primer 2 (10 pmol/ μ l)
1 μ l	dNTP-Mix (je 10 mM)
5 μ l	10 x PCR-Puffer
1,5 μ l	50 mM MgCl ₂
<u>0,5 μl</u>	PLATINUM® <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ l)
ad 50 μ l	Ampuwa

Die Ansätze wurden in einem Thermocycler (Primus 96, MWG Biotech) mit folgendem PCR-Profil für 35 Zyklen inkubiert:

5 Min.	95 °C	<i>Vordenaturierung</i>		
30 Sek.	95 °C	<i>Denaturierung</i>	} x 35	(2.5)
30 Sek.	55–65 °C	<i>Annealing</i>		
1 Min./ kb	72 °C	<i>Elongation</i>		
7 Min.	72 °C	<i>Auffüllreaktion</i>		
∞	4 °C	<i>Kühlung</i>		

Zeitgleich wurde die GAPDH-Kontroll-PCR an den synthetisierten cDNA – Proben mit Hilfe des GAPDH-Primerpaares durchgeführt. Ein Aliquot der PCR-Proben wurde anschließend, wie unter 2.13.1 beschrieben, auf einem Agarosegel getestet und die PCR-Produkte bei Bedarf über ein präparatives Agarosegel isoliert und subkloniert (2.16). In einigen Fällen war es nötig, eine sogenannte „nested-PCR“ mit einem zweiten Primerpaar an der DNA der ersten Amplifikation durchzuführen, bevor man spezifische PCR-Produkte erhalten konnte. Dazu wurde die 1. PCR 1:50 mit Ampuwa verdünnt und davon 1 µl in einem weiteren PCR-Ansatz mit einem zweiten Primer-Paar eingesetzt und in einem Thermocycler mit dem oben beschriebenen PCR-Programm amplifiziert.

2.16 Subklonierung von DNA-Fragmenten

2.16.1 Ligation

DNA-Fragmente können durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden unter Hydrolyse von ATP verbunden werden, wobei diese Reaktion durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert wird. Für die Ligasereaktion wurden 50 ng restriktionsenzymatisch linearisierte (2.18.1) und dephosphorylierte (2.18.3) Vektor-DNA und die zu klonierende, restriktionsenzymatisch vorbereitete und eventuell „blunt end“ aufgefüllte (2.18.4) Insert-DNA

(2.14) in einem molaren Verhältnis von 1:3 zusammen mit dem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer und 0,1 x Vol. T4-Ligase in einem 10 µl Reaktionsansatz gemischt und ü. N. im Wasserbad bei 16 °C ligiert.

Für die Ligationen kamen in dieser Arbeit unterschiedliche Systeme zum Einsatz:

1. Für Standard-Ligationen wurde das T4-DNA-Ligase-System der Firma Gibco BRL verwendet, deren T4-DNA-Ligase eine Enzymaktivität von 1 U/µl besitzt.
2. Für „blunt-end“ Ligationen wurde das DNA-Ligations-System der Firma Stratagene verwendet, das eine T4-DNA-Ligase mit 4 U/µl und externes ATP verwendet.
3. Für große genomische Fragmente (> 10 Kb) wurde das Ligations-ExpressTM System der Firma Clontech verwendet. Die T4-DNA-Ligase in diesem System besitzt eine Enzymaktivität von 100 U/µl und verwendet externes ATP.
4. Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das pGEM[®]-T Vektorsystem der Firma Promega (Wisconsin, USA) benutzt. Dieses System enthält linearisierten pGEM[®]-5Zf(+) Vektor mit einfachen 3'-T-Überhängen, die kompatibel zu den 3'-A-Überhängen von PCR-Produkten sind, die von den meisten thermostabilen DNA-Polymerasen (*Taq*- und *Tth*-Polymerasen) aufgrund terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TdT) –Aktivität bei der Elongation angehängt werden (Clark, 1988).

Für die Reaktion benötigtes ATP in dem jeweiligen Ligase-Puffer wurde nach dem ersten Gebrauch in Aliquots eingefroren und jedes Aliquot nur einmal verwendet.

2.16.2 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

(Dagert und Ehrlich, 1979)

Einzelkolonien der verschiedenen *E. coli* Stämme wurden in 50 ml LB-Medium ü. N. zu einer Vorkultur angezogen. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml frisches, auf

Neutralisierungslösung: 1 M Tris (pH 7.5)
 1.5 M NaCl

Für den Southern-Blot wurden je 15 µg genomische bzw. 1-2 µg Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (2.18.2) und elektrophoretisch aufgetrennt (2.13.1). Die DNA im Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt, fotografiert und anschließend bei RT unter Schütteln mit folgenden Lösungen inkubiert:

30 Min. in 500 ml Denaturierungslösung

45 Min. in 500 ml Neutralisierungslösung

Die so behandelte einzelsträngige DNA wurde durch ein modifiziertes Kapillarblotting-Verfahren mit einem Turbo BlotterTM der Firma Schleicher & Schüll auf eine Hybond C-Nitrozellulosemembran mit nukleinsäurebindenden Eigenschaften übertragen und durch zweistündige Inkubation bei 80 °C oder durch „Crosslinken“ mit UV-Licht (UV StratalinkerTM 1800, Stratagene, Heidelberg, 254 nm, 120 mJ) auf dem Filter fixiert. Der Southern-Blot wurde den Herstellerangaben folgend mit 20 x SSC als Transferpuffer durchgeführt und erfolgte standardmäßig für 16-18 Std. bei RT ü. N.. Nach dem Transfer wurde der Filter kurz in 2 x SSC-Puffer gespült, getrocknet und durch „Crosslinken“ oder Inkubation für 2 Std. bei 80 °C kovalent auf dem Filter fixiert.

2.17.2 „Dot-Blotting“ von DNA

2.17.2.1 Dot-Blot zum Nachweis eines Transgens

Zur Analyse des Genotyps transgener Tiere wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze isoliert und punktförmig auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurde eine mit 2 x SSC angefeuchtete Nitrozellulosemembran in eine Vakuumkammer (Minifold, Schleicher & Schüll, Dassel) eingesetzt und zur Äquilibrierung 100 µl 20 x SSC über das angelegte Vakuum durch die einzelnen Öffnungen gesogen. 2-10 µg der zu analysierenden DNA wurden mit H₂O auf ein Vol. von 30 µl gebracht, 10 Min. bei 95°C denaturiert und durch Zugabe von 150 µl

eiskaltem 20 x SSC schockgekühlt. Die DNA-Lösungen wurde in die Öffnungen der Vakuumkammer pipettiert und durch die Membran gesogen, auf der die DNA haften blieb. Nach dem Nachspülen der Kammer mit weiteren 100 µl 20 x SSC wurde der Blot entnommen, in 2 x SSC gespült und die DNA durch „Crosslinking“ der feuchten Membran (Stratalinker™ 1800 mit 120 mJ, Fa. Stratagene) oder Backen der luftgetrockneten Membran (2 Std., 80°C) fixiert. Beide Methoden sollen eine irreversible Bindung der Nukleinsäuren an die Nitrocellulose-Membran gewährleisten.

2.17.2.2 Dot-Blot zur Abschätzung der Anzahl inserierter Kopien

Die Abschätzung der Anzahl der in das Mausgenom inserierten Fragmente erfolgte über den Vergleich von Signalstärken von DNA transgener Tiere zu den Signalen aufgetragener Plasmid-DNA der Injektionsfragmente. Dazu wurde die Plasmid-DNA unter Zugabe von 10 µg Wildtyp-Träger-DNA in unterschiedlichen Mengen, etwa einer aufsteigenden Reihe von 10-400 pg über den Dot-Blot auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht und das nach der Hybridisierung resultierende Signal mit geblotteter DNA von transgenen Mäusen verglichen. Für ein beispielhaft angenommenes, in das Mausgenom (3000 Mb) inseriertes 3 Kb-Fragment entspricht ein Signal aus 10 µg DNA eines transgenen Tieres bei einer integrierten Kopie also dem Signal von 10 pg Plasmid.

2.17.3 "Northern-Blotting" von RNA

Als "Northern-Blotting" wird die Übertragung von RNA auf nukleinsäurebindende Membranen bezeichnet. Die Technik ist der des „Southern-Blottings“ äquivalent und wurde wie unter 2.17.1 beschrieben bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde die Elektrophorese in einem denaturierenden Gel durchgeführt. Nach dem Lauf konnte das Gel daher direkt zum Transfer verwendet werden. Nach dem Transfer der RNA aus dem Gel auf den Nitrozellulosefilter wurde das Filter kurz in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und die RNA wie unter 2.17.1 beschrieben fixiert.

reaktiviert. Die ausgeblotteten Gele wurden durch Coomassie-Färbung (2.17.5) auf ihre Transfereffizienz kontrolliert.

2.17.5 Coomassiefärbung von Proteingelen

(modifiziert nach Weber und Osborn, 1969)

Färbelösung:	0,025 % Coomassie Brillant Blue R 250
	10 % Essigsäure
	30 % Methanol
	in H ₂ O
Entfärbelösung:	10 % Essigsäure
	30 % Methanol
	in H ₂ O

Der blaue Coomassie-Farbstoff bildet mit Proteinen unlösliche Komplexe. Für die Färbung wurden die Polyacrylamidgele für 1 Std. in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden die Gele ü. N. in deionisiertem Wasser grob entfärbt und dann für weitere 10 - 20 Min. in Entfärbelösung auf einem Taumler so lange equilibriert, bis die Hintergrundfärbung ausgewaschen war. Die Färbe- und Entfärbelösung wurde wiederverwendet.

2.18 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

Alle enzymatischen Modifikationen wurden den etablierten molekularbiologischen Standardmethoden folgend durchgeführt, wie sie z.B. in (Sambrook et al., 1989) bzw. (Ausubel et al., 1992) niedergelegt sind. Reagenzien und Proben für die Durchführung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt und wurden, sofern

nicht anders angegeben, mit den mitgelieferten Puffersystemen und den Angaben des Herstellers folgend angesetzt.

2.18.1 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Standardmäßig wurden 10 U Enzym pro 1 µg DNA über 1-2 Std. beim Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms eingesetzt. Zur „Insert“- Isolierung wurden entsprechend 10 µg Plasmid-DNA mit 100 U Enzym (10 U/µl) in Reaktionsansätzen von 100-200 µl eingesetzt. Doppelrestriktionen wurden in kompatiblen Puffern des Herstellers oder nacheinander nach Hitzeinaktivierung (15 Min., 65 °C) oder Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung durchgeführt. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese (2.13.1) überprüft. Die Restriktionsenzyme wurden vor Durchführung weiterer enzymatischer Modifikationen (2.18.3 und 2.18.4) hitzeinaktiviert (15 Min., 65 °C) oder bei hitzeresistenten Restriktionsenzymen über Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung entfernt.

2.18.2 Spaltung von genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für genomische Southern-Hybridisierungen wurden 15 µg genomische DNA in einem 80 µl Reaktionsvolumen mit 8 µl Restriktionsendonuklease (80 U) durch Zugabe von 10 mM Spermidin für 16 Std. ü. N. verdaut und tagsüber in einem Reaktionsvolumen von 160 µl mit weiteren 8 µl Restriktionsendonuklease und Spermidin nachverdaut. Die vollständig restringierte genomische DNA wurde nach Zugabe von 0,2 x Vol. Stop-Mix I ü. N. in einem 1 x TAE –Puffersystem über ein 10 x 15 cm Agarosegel (2.13.1) aufgetrennt, denaturiert, neutralisiert und auf Nitrozellulose-Folie transferiert (2.17.1).

2.18.3 Dephosphorylierungsreaktion mit alkalischer Phosphatase (CIAP)

Bei diesem Verfahren werden Phosphat-Reste am 5'-Ende von DNA-Molekülen, die bei der restriktionsenzymatischen Spaltung (2.18.1) entstehen, durch eine alkalische Phosphatase entfernt. Dadurch wird die Zirkularisierung von Vektor-DNA bei der Ligation verhindert und die Klonierungseffizienz erhöht. Zur Phosphatase-Behandlung wurde die „calf intestinal alkaline Phosphatase“ (1 U/ μ l) der Firma Gibco BRL (CIAP) verwendet.

Für 5'-überhängende Enden aus restriktionsenzymatischen Spaltungen von bis zu 20 μ g Vektor-DNA (3,0 Kb) wurde standardmäßig 1 μ l CIAP (1 U) in folgendem Ansatz eingesetzt, und 30 Min. bei 37 °C dephosphoryliert:

1 μ l	CIAP (Gibco BRL, 1 U/ μ l)
9 μ l	Verdünnungs-Puffer (Gibco BRL, + Zn ²⁺)
10 μ l	10 x CIAP-Puffer (Gibco BRL)
<u>x μl</u>	DNA (\leq 20 μ g)
H ₂ O ad 100 μ l	

Für 3'-überhängende Enden oder „blunt-ends“ aus restriktionsenzymatischen Spaltungen von bis zu 5 μ g Vektor-DNA wurden 5 μ l CIAP (5 U) in folgendem Ansatz eingesetzt und für 1 Std. bei 50 °C dephosphoryliert:

5 μ l	CIAP (Gibco BRL, 1 U/ μ l)
5 μ l	Verdünnungs-Puffer (Gibco BRL, + Zn ²⁺)
10 μ l	10 x CIAP-Puffer (Gibco BRL)
<u>x μl</u>	DNA (\leq 5 μ g)
H ₂ O ad 100 μ l	

Die alkalische Phosphatase wurde nach der Dephosphorylierung bei 75 °C hitzeinaktiviert und die Vektor-DNA bei -20 °C gelagert.

2.18.4 Auffüll- und Glättungsreaktion zur Generierung von „Blunt end“-Fragmenten

(Costa et al., 1994)

Dieses Verfahren wurde benutzt, um in Klonierungsexperimenten nicht kompatible DNA-Fragmente in „blunt end“-Fragmente zu überführen und diese dann mit der in 2.16.1 (Nr. 2) beschriebenen Methode in einen entsprechend „blunt end“ vorbereiteten Vektor zu klonieren. Die *PfuTurbo*TM-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) vereint die enzymatischen Aktivitäten zum Auffüllen von 5'-Überhängen und zum Glätten („polishing“) von 3'-Überhängen.

Für beide Reaktionen wurde 1 µg linearisierte und durch EtOH-Fällung gereinigte Insert-DNA folgendem Schema folgend zusammenpipettiert:

x µl	DNA (1 µg)
2,5 µl	dNTP (je 10 mM)
2,5 µl	10 x <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Puffer
<u>0,5 µl</u>	<i>PfuTurbo</i> TM -DNA-Polymerase
H ₂ O ad 25,0 µl	

Die Reaktion wurde für 2 Std. bei 70 °C in einem Thermocycler inkubiert, die DNA mit 1 x Vol. Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert, mit 0,1 x Vol. NaOAc (pH 5,2) und 3 x Vol. eiskaltem (-20 °C) EtOH (100 %, z.A.) bei -80 °C ausgefällt, mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 12 µl Ampuwa-H₂O gelöst.

2.18.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten („random prime labelling“)

Für Hybridisierungsexperimente wurden DNA-Fragmente durch die „random prime labelling“-Methode radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Für die Markierungsreaktion wurde das „RediprimeTM II - random prime labelling“-System

der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Dem mitgelieferten Protokoll zur Durchführung der Markierungsreaktion wurde weitgehend gefolgt. Die Dauer der Markierungsreaktion wurde von 10 Min. auf 1,5 Std. verlängert und die eingesetzte Aktivität pro Reaktion von 50 μCi auf 40 μCi verringert. Pro Reaktion (50 μl) wurden 2,5-25 ng DNA eingesetzt.

Die Reaktion wurde nach der Inkubation durch Zugabe von 2 μl 0,5 M EDTA (pH 8.0) gestoppt und das Reaktionsvolumen mit H_2O auf 100 μl erhöht. Die synthetisierte DNA wurde über ein siebchromatographisches Säulensystem (MicroSinTM S-200 HR, Amersham Pharmacia Biotech) von nicht eingebauten Nukleotiden (dNTPs und $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP) befreit und direkt in das Hybridisierungsexperiment (2.20.1) eingesetzt.

2.18.6 Radioaktive Endmarkierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Für die Gel Retardation „Assays“ (2.28) wurden Oligonukleotide in „Sense“- und „Antisense“-Orientierung mit eingestellten Konzentrationen (100 pmol/ μl) hergestellt (NAPS, Göttingen). Nach Anlagerung der einzelsträngigen Oligonukleotide erhält man doppelsträngige Fragmente mit überhängenden Enden, die radioaktiv markiert werden können.

Für das „Annealing“ wurden gleiche Mengen (z.B. je 20 μl) der jeweiligen („Sense“ und „Antisense“) Oligonukleotide zusammenpipettiert und 5 Min. im kochendem Wasserbad denaturiert. Den Reaktionsansatz ließ man bis auf RT abkühlen. Zur Abschätzung der Mengen wurden 2 μl der angelagerten Oligonukleotide auf ein Agarosegel aufgetragen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Oligonukleotide, die als Gel Retardation Assay-Fragmente eingesetzt wurden, wurden über NAP5-Säulen (Pharmacia) aufgereinigt. Dazu wurden die Säulen zweimal mit Ampuwa gespült, dem 50 μl -Reaktionsansatz 450 μl H_2O zugegeben und der gesamte Ansatz auf die Säule gegeben. Das radioaktiv markierte DNA-Fragment wurde dann mit 1 ml Ampuwa in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß eluiert.

Die zusammengelagerten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden für den Gel Retardation „Assay“ an den beiden überhängenden Enden mit radioaktivem dCTP markiert.

Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

20-50 ng dsDNA
10 µl 5x Reaktionspuffer (Amersham)
1,5 µl Klenow-Enzym (2U/µl)
5 µl ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP
ad 50 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde 10 Min. bei RT inkubiert und anschließend über eine NAP5-Säule (Pharmacia) aufgereinigt.

2.19 DNA Sequenzanalyse

(Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierung wurde modifiziert nach dem Kettenabbruchverfahren von (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP) statistisch unterbrochenen DNA-Neusynthese. Es wurde mit dem DYEnamic ET-Terminator-Mix der Firma Amersham Pharmacia gearbeitet. Dieser Mix enthält dNTPs, mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs, Taq-DNA-Polymerase sowie Reaktionspuffer.

Die eingesetzte Menge zu sequenzierender Template-DNA wurde nach der Formel (2.6) berechnet. Für ein 2,0 Kb Fragment in einem 3,0 Kb Vektor wurden demnach 1000 ng (1 µg) in die Sequenzreaktion eingesetzt.

$$m(\text{ng}) = \frac{x(\text{bp})}{5} \quad (2.6)$$

Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Ansatz in einem dünnwandigen 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

x μ l DNA m (ng)
 1 μ l Primer (10 pmol / μ l)
 4 μ l DYEnamic ET-Mix
 ad 10 μ l mit H₂O

Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem automatischen Thermocycler mit Deckelbeheizung (Primus 96, MWG Biotech) standardmäßig mit dem folgendem PCR-Programm durchgeführt:

5 Min.	96 °C	<i>Vordenaturierung</i>		
30 Sek.	98 °C	<i>Denaturierung</i>	} x 35	(2.7)
15 Sek.	50 °C	<i>Annealing</i>		
4 Min.	60 °C	<i>Elongation</i>		
∞	4 °C	<i>Kühlung</i>		

Nach der PCR wurden die Proben mit Wasser auf 20 μ l aufgefüllt und nach Zugabe von 2 μ l NaOAc/EDTA-Puffer mit 80 μ l eiskaltem (-20 °C) 95 % EtOH (z.A.) nach Durchmischung für 15 Min. auf Eis ausgefällt. Die präzipitierte DNA wurde in einer Mikrozentrifuge für 15 Min. bei 12000 x g sedimentiert, mit eiskaltem (-20 °C) 75 % ETOH (z.A.) gewaschen, erneut 5 Min. zentrifugiert, vollständig vom Überstand befreit und bei RT als Pellet getrocknet. Die DNA wurde schließlich bei -20 °C gelagert und vom institutseigenen Sequenzier-Service in geeignetem Probenpuffer aufgenommen, auf ein Sequenziergel aufgetragen und auf einem automatischen Sequenzierer Modell 373A (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgewertet.

2.20 Hybridisierungsmethoden

2.20.1 Hybridisierung radioaktiver DNA-Sonden an membrangebundene Nukleinsäuren

(modifiziert nach Denhardt, 1966)

Hybridisierungslösung I:	5 x Denhardts Lsg. 0.5 % SDS 6 x SSC 10 % Dextransulfat
Hybridisierungslösung II:	Rapid-Hybridisierungs-Puffer
Hybridisierungslösung III:	Membran-Hybridisierungs-Puffer
Lachs-Spermien-DNA:	10 mg/ml
Waschlösung I:	2 x SSC 0.1 % SDS
Waschlösung II:	0.2 x SSC 0.1 % SDS

Für unterschiedliche Hybridisierungsexperimente haben sich verschiedene Hybridisierungslösungen als optimal erwiesen. Die Hybridisierung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten auf Nitrozellulosemembranen wurde standardmäßig mit Hybridisierungslösung I (Denhardt, 1966) durchgeführt. „Northern-Blot“-Hybridisierungen (2.17.3) wurden mit Hybridisierungslösung II und genomische „Southern-Blot“-Hybridisierungen mit Hybridisierungslösung III durchgeführt.

Die Nitrozellulosemembran mit der immobilisierten DNA bzw. RNA wurde für 20 Min. in 2 x SSC eingeweicht und für 2-4 Std. mit 6-10 ml Hybridisierungslösung und 200 µg/ml hitzedenaturierte Lachs-DNA bei 65 °C im Hybridisierungssofen (Bachofer, Reutlingen) vorhybridisiert. Der Hybridisierungslösung wurde dann die radioaktiv markierte hitzedenaturierte Sonde (2.18.5) zusammen mit 200 µg/ml Lachs-DNA zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 65 °C ü. N. im Hybridisierungssofen. Am nächsten Tag wurde der Filter wie folgt gewaschen:

- 2 x 10 Min. in 2 x SSC bei RT
- 15 - 20 Min. in Waschlösung I bei 60 - 65 °C
- 10 - 15 Min. in Waschlösung II bei 60 - 65 °C

Nach dem Waschen wurden die Filter luftgetrocknet, in Schlauchfolie eingeschweißt und ein Röntgenfilm (Amersham, Braunschweig) vor einer Verstärkerfolie für 1-10 Tage bei -70 °C exponiert.

2.21 Isolierung von Proteinen

2.21.1 Gesamtproteinisolierung aus Zellkulturen und Geweben

Gesamtprotein aus Zellkulturen und Geweben wurde zum immunologischen Nachweis nach SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Transfer der Proteine auf Nitrocellulose und zur Verwendung in Reportergen-Assays isoliert. Der Nachweis der Aktivität des Reporterenzym Luciferase bestimmte die Methode der Isolierung und wurde für alle vergleichbaren Gesamtproteinisolierungen beibehalten. Die verschiedenen zu Transfektionsexperimenten verwendeten adhärennten Zelllinien wurden 24-48 Std. nach der Transfektion einmal mit Ca/Mg-freiem PBS gewaschen, das PBS wurde sorgfältig entfernt und die Zellen je nach Größe der Kulturschale und der zu erwartenden Reportergenaktivität mit Extraktionspuffer überschichtet. Für die so durchgeführte Lyse der Zellen in den Kulturschalen wurden z.B. 75-150 µl je Schale einer 12-Well Platte (Costar®, Fa. Corning, New York) oder bis zu 1 ml für eine 100 mm Ø Kulturschale verwendet. Nach 5 Min. Inkubation bei RT wurden die Zellextrakte in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, Zelltrümmer durch Zentrifugation pelletiert (5 Min., 12000 x g, 4°C) und ein Aliquot des Überstandes im entsprechenden Test auf Luciferase- oder β-Galactosidaseaktivität gemessen.

2.21.1.1 Extraktion von Kernproteinen aus Geweben (modifiziert nach Deryckere und Gannon, 1994)

Frisch präparierte Organe (0,1–0,2 g) wurde auf Eis in PBS gewaschen, in 2 ml Kernproteinpuffer A aufgenommen und mit einem Glas/Glas-Potter homogenisiert. Nach der Überführung in 10 ml Zentrifugationsröhrchen wurden größere Zellbestandteile durch vorsichtige Zentrifugation (50 Sekunden, 800 x g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde 10 Min. (4000 x g, 4°C) zentrifugiert und die pelletierten Zellkerne in 100 - 300 µl Kernproteinpuffer B resuspendiert. Die osmotische Lyse der Kerne erfolgte während einer 20 minütigen Inkubation auf Eis (mehrmaliges Aufschütteln). Die Ansätze wurden in 1,2 ml Reaktionsgefäße überführt und hochmolekulare Bestandteile (inkl. DNA) durch kurzzeitige Zentrifugation (5 Min., 7000 x g) sedimentiert. Der die Kernproteine enthaltende Überstand wurde bei -70°C gelagert oder bis zur Verwendung innerhalb einiger Tage auf Eis aufbewahrt.

2.21.1.2 Isolierung von Kernproteinen aus kultivierten Zellen

Die zur Isolierung von Kernproteinen verwendeten, adhärend wachsenden Zellen wurden vor der Proteinextraktion trypsinisiert und in NE-Puffer aufgenommen oder nach zweimaligem Waschen mit PBS noch in der Kulturschale mit NE-Puffer (1 ml NE-Puffer /100 mm Kulturschale) überschichtet, mit einem Schaber abgekratzt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden 15 Min. auf Eis inkubiert und anschließend zum Aufbrechen der Zellwände 10 x durch eine Kanüle aufgezogen. Die Kerne wurden anschließend in einem kurzen Zentrifugationsschritt (30 Sekunden., 10000 x g, 4°C) von den Zellresten getrennt, die pelletierten Kerne in 100 µl NESG-Puffer resuspendiert. Der Aufschluß der Kerne erfolgte dann während einer 30 minütigen Inkubation auf Eis, wobei die Proben häufig aufgeschüttelt wurden. Die Kernproteine blieben nach der folgenden Zentrifugation (20 Min., 20000 x g, 4°C) im Überstand und wurden bei -70°C gelagert oder bis zur Verwendung innerhalb einiger Tage auf Eis aufbewahrt.

2.22 Proteinanalysen

2.22.1 SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen

Proteine werden in Anwesenheit von reduzierenden Agenzien (DTT und β -Mercaptoethanol) und SDS aufgekocht, wobei die natürlichen Ladungen der Probe durch die negativen Ladungen des SDS maskiert werden und so eine Auftrennung der nun gleich geladenen Proteine nach ihrer Größe gewährleistet wird. Die große Trennleistung der Diskelektrophorese wird über Diskontinuitäten im pH-Wert und in der Porengröße erreicht, die aus der Kombination eines großporigen Sammelgels (3 % Polyacrylamid) zur Konzentrierung der Probe auf eine schmale Startzone und eines feinporigen Trenngels (10-12 % Polyacrylamid) resultieren. Es wurden diskontinuierliche Gele in PHASE-Minigelkammern mit Trennlängen von ca. 70 mm gegossen oder vorgefertigte Gele des NuPAGE™ Elektrophorese Systems (Fa. NOVEX, San Diego) benutzt. In der Regel wurden Trenngele mit 10 % Polyacrylamid (29:1) gegossen (1x Trenngelpuffer, 0,1 % APS und 0,1 % TEMED zur Polymerisierung). Um bei selbst gegossenen Gelen eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erhalten, wurde diese direkt nach dem Gießen mit Butanol überschichtet. Das Butanol wurde nach dem vollständigen Polymerisieren des Trenngels mit Wasser ab gespült, danach das 4 %ige Sammelgel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit 0,5-1 Vol Probenpuffer versetzt, 10 Min. bei 75°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 – 100 V und zwar solange bis der mitlaufende gefärbte Proteinstandard (SeeBlue™Plus2, NOVEX) eine genügende Auftrennung der Proben wahrscheinlich machte.

2.22.2 Acetonfällung von Proteinen

Proteinproben konnten, wenn nötig, über Acetonfällung aufkonzentriert werden. Hierzu wurden 4 Vol Aceton (vorgekühlt auf -20°C) zugegeben. Nach 1 Std. bei -20°C wurden

die ausgefallenen Proteine 30 Min. bei 10000 x g zentrifugiert, die erhaltenen Pellets einmal mit 80 %igem Aceton (enthält 20 % H₂O) gewaschen.

2.22.3 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyseschläuche (Serva) wurden vor dem Gebrauch in folgenden Lösungen ausgekocht:

Na₂CO₃ (2 %, w/v)

H₂O dest.

EDTA (2 mM)

H₂O dest.

Anschließend wurden die Schläuche autoklaviert und bei 4°C in H₂O aufbewahrt. Die Dialyse erfolgte unter Rühren bei 4°C gegen ein 1000faches Puffervolumen für ca. 12 Std..

2.22.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

(Bradford, 1976)

Coomassie Brilliant Blau G250 wird durch Bindung an Protein vom kationischen in den anionischen Zustand überführt und absorbiert. In diesem Zustand wird Licht mit einer Wellenlänge von 595 nm absorbiert (der kationische Zustand absorbiert bei 470 nm). Coomassie Brilliant Blau G250 bindet hauptsächlich an basische Aminosäuren (Chial und Splittgerber, 1993), die Absorptionsmessungen wurden immer auf eine Eichgerade mit BSA (BSA gelöst in H₂O: 0; 10; 20; 40; 100 µg/ml) bezogen. Das vorgefertigte Bradford-Reagenz (Roti[®]-Quant, Fa. Roth) enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 unter Zusatz von Ethanol und H₃PO₄ gelöst in H₂O. Für die Verwendung in Mikrotiterplatten wurden wie vom Hersteller angegeben 2 Vol des Reagenz mit 5,5 Vol H₂O verdünnt. Pro Messung wurden dann 200 µl verdünntes Reagenz zu 50 µl der vorgelegten Standards und verdünnten Proben gegeben. Nach 5 Min. Inkubation bei RT

wurde die OD₅₉₅ in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Microplate Reader 450, Biorad Laboratories, München) gemessen. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Auswertung wurde die OD₅₉₅ für jede Probe gegen die eingesetzte Proteinmenge aufgetragen. Bei der Messung von Proben, die mit Hilfe von Glycerin, Triton X 100 oder SDS enthaltenden Lysispuffern erhalten wurden, mußte beachtet werden, das diese Reagenzien ab einer bestimmten Konzentration das Anfärbeverhalten von Coomassie Blau beeinflussen (siehe Produktprotokoll).

2.23 Herstellung von Parafinschnitten

Die Parafinblöcke mit dem fixierten Material wurden zu Quadern optimaler Größe zurechtgeschnitten und in das Mikrotom (Hn 40 Ing. Nussloch) eingespannt. Die Schnittdicke betrug 5-8 µm. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte auf die vorbehandelten Objektträger übertragen. Um eine bessere Haftung der Schnitte zu erreichen, wurden die Objektträger mit einem Tropfen 70%igem Ethanol benetzt und auf einer 40°C warmen Heizplatte erwärmt. Die Schnitte wurden direkt auf den Ethanoltröpfchen aufgelegt und solange auf der Wärmeplatte belassen, bis der Ethanol vollständig verdampft war. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.24 Immunlokalisation von Proteinen in Parafinschnitten

Das Gewebe wurde über Nacht in 10% Formalin fixiert und vor der Paraffineinbettung in 70%iges Ethanol überführt. 7 µm dicke Schnitte wurden durch Xylen von Wachs befreit und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Danach wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde in 5%igem Ziegenserum (gelöst in 0,05% Triton X-100/PBS) präinkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit anti-Insl3 Antiserum inkubiert. Anschließend wurden die histologischen Präparate mit an alkalischer Phosphatase konjugiertem Ziegen Anti-Kaninchen Antikörper (1:500) (Sigma) für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5

Min. wurde die Immunreaktivität durch Inkubation in einer Lösung aus fast red TR/naphthol AS-Mx Phosphat Plätzchen (Sigma) nachgewiesen. Die Schnitte wurden 7 Min. mit Hematoxylin gegengefärbt.

2.25 Zelllinien und Gewebekultur

2.25.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten, ausschließlich adhärend in beschichteten Gewebekulturschalen wachsenden Zellen wurden im entsprechenden Medium bei 37°C und zur Einstellung eines günstigen pH-Wertes (alle Medien enthielten NaHCO₃) mit einer Begasung von 5 % CO₂ kultiviert. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen geteilt, bevor eine 100 %ige Konfluenz erreicht wurde. Zum Aufteilen wurden die Zellen nach Abnahme des Kulturmediums zweimal mit Ca/Mg-freier PBS-Lösung gewaschen und in Trypsin/EDTA-Lösung solange inkubiert, bis sich alle Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst hatten. Zum Abstoppen der Trypsin-Wirkung wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen. 10 % dieser Zellsuspension wurden zur Weiterkultur in der benutzten oder einer neuen Kulturschale gleicher Größe verwendet.

2.25.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte zum qualitativen Nachweis oder zur quantitativen Bestimmung von Reportergenaktivität. Für die Transfektion der verschiedenen Zelltypen wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet.

Zum Teil wurde das Reagenz auch gewechselt, wenn aufgrund der geringeren Sensitivität des folgenden Versuchs größere Mengen an DNA transfektiert werden mußten, um mehr RNA oder Protein zu erhalten. Transfektionsreagenzien komplexieren DNA, sie schirmen die negativen Ladungen ab und ermöglichen dem positiv geladenen DNA/Reagenz-Komplex auf unterschiedliche, z. T. nicht genau aufgeklärte Weise den Eintritt in die Zelle und weiter in den Kern. Monokationische Lipide wie z.B. DOTAP (Roche Diagnostics, Mannheim) oder polykationische Lipide wie Roti-Fect (Carl Roth, Karlsruhe) ermöglichen eine Fusion des Komplexes mit der Zellmembran während DNA-Komplexe mit Substanzen wie Superfect (Qiagen, Hilden) aktiv von den Zellen aufgenommen werden. Bei der Transfektion besitzt jede Kombination von Zelllinie und Plasmid einen Satz von optimalen Parametern in Hinblick auf die Transfektionseffizienz. Es muß für jede Zelllinie das beste Verhältnis von Transfektionsreagenz und DNA ermittelt werden. Zu beachten ist aber, das Transfektionsreagenzien unterschiedlich toxisch auf verschiedene Zellen wirken, was auch bei ansonsten sehr guter Transfektionseffizienz die Menge der DNA im Transfektionsansatz limitiert. Grundsätzlich wurden zu Transfektionsexperimenten nur Zellen benutzt, die sich in einer permanenten Wachstumsphase befanden. Zellen, die zu lange konfluent waren, lassen sich schwerer transfektieren als schnell wachsende (häufig und rechtzeitig passagierte) Zellen. Die Anzahl der Passagen lag zwischen 5 und 25. Die Anzahl der Passagen wurde ab Ankunft der Zellen gezählt. Früheste erhältliche Passagen von MA10 Zellen sind laut ATCC-Katalog (American Type Culture Collection) erst ab einer Passagenzahl von ca. 120 (ab Primärkultur) erhältlich. Zu oft passagierte Zellen können ihre Morphologie und damit ihre Transfektionsbereitschaft verändern. Zur Transfektion wurden die Zellen einen Tag vor der DNA-Aufnahme in die entsprechende Kulturschalen passagiert, so dass am folgenden Tag eine Konfluenz von 50-70 % erreicht wurde. Die Transfektion erfolgte weitgehend nach den Herstellerangaben, veränderliche Parameter der am häufigsten eingesetzten Transfektionsreagenzien sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Zelltyp	Kulturgröße (µg DNA/Schale)	Nachweis/ Verwendung	Reagenz (µl/µg DNA)
NIH/3T3	6 Well (3 µg)	Luciferase-Assay	Superfect (3 µl/µg)

NIH/3T3	6 cm (4-8 µg DNA) 10 cm (10 µg DNA)	Northern- Western- Blot, Gel-Retardation	Superfect (5 µl/µg)
MA10	6 Well (3 µg)	Luciferase-Assay	Superfect (3 µl/µg)
MA10	6 cm (4-8 µg DNA) 10 cm (10 µg DNA)	Northern- Western- Blot, Gel-Retardation	Superfect (3 µl/µg)
Y1	6 Well (0,25-0,5 µg)	Luciferase-Assay	Superfect (3-6 µg)
Y1	6 cm (4-8 µg DNA) 10 cm (10 µg DNA)	Northern- Western- Blot, Gel-Retardation	Superfect (3-6 µl/µg)

Die Dauer der Inkubation mit den DNA-Komplexen betrug 2-4 Std. Die Ernte der Proteine bzw. der RNA erfolgte 20-40 Std. nach dem Abstoppen der Transfektion durch Ersetzen des Ansatzes mit frischem Kulturmedium.

2.25.3 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Nicht-transformierte und stabil exprimierende Zelllinien wurden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden während der stärksten Wachstumsphase zweimal mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die losgelösten Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins in Medium mit FKS aufgenommen und abzentrifugiert (3 Min., 900 x g, 4°C), der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Aus einer 10 ml Kulturflasche mit einer Konfluenz von etwa 80 % lassen sich vier Kryoröhrchen mit einem Vol. von 1,8 ml befüllen. Für die Lebensfähigkeit der Zellen ist langsames Einfrieren erforderlich. Die Zellen wurden deshalb zunächst bei -20°C für 2 Std. gefroren, dann ü. N. bei -70°C gehalten (Lagerung bei -70°C ist abhängig vom Zelltyp für mehrere Monate möglich) und später in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Röhrchen schnell aus dem Stickstoff in ein 37°C Wasserbad überführt. Nach dem Schmelzen wurde der Inhalt des Röhrchens in eine kleine Kulturflasche mit 6 ml vorgewärmtem Kulturmedium gegeben. Nach dem Anwachsen der Zellen (ü. N.) wurde das noch DMSO enthaltende Medium gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Eine Transfektion frisch aufgetauter Zellen war nach drei bis vier Passagen möglich.

2.26 Expression von rekombinantem Protein mit dem *Strep-tag*[®]-System

Im Gel Retardation Assay eingesetzte Proteinextrakte von Apg-1 wurden mit dem *Strep-tag*[®]-Proteinexpressionssystem (IBA, Göttingen) hergestellt. Dieses Expressionssystem wird durch den *tet*-Promotor kontrolliert und nutzt die Interaktion zwischen *Strep-tag* II (NH₂-WSHPQFEK-COOH; Schmidt et al., 1996) und StrepTactin (Voss und Skerra, 1997), um rekombinantes Protein über Säulenaffinitätschromatographie aufzureinigen.

Zur Isolierung konzentrierter Proteinextrakte von Apg-1 wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Insertion der *Apg-1*-cDNA in den Vektor pSKA-IBA2 (2.26.1)
2. Kontrollsequenzierung des rekombinanten Vektors (2.19)
3. Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen (2.16.3)
4. Genexpression und Translation in *E.coli*-Zellen (2.26.2)
5. Präparation des cytoplasmatischen Proteinextraktes (2.26.3)
6. Säulenchromatographische Aufreinigung des Proteins (2.26.4)
7. Bestimmung der Proteinkonzentration (2.22.4)
8. Detektion des rekombinanten Proteins mittels „Western Blot“-Analyse (2.17.4)

2.26.1 Insertion der *Apg-1*-cDNA in den Vektor pSKA-IBA2

Um die *Apg-1*-cDNA in den Vektor zu inserieren, wurde 0.1µg des Vektors pSKA-IBA2 in einem 20µl Ansatz mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und BsaI gespalten. 5µl gespaltenes Plasmid, 1µl (0.1 µg) XbaI/BsaI-gespaltene *Apg-1*-cDNA

und 4µl Wasser wurden gemischt, mit 1.2µl 10 x T4 Ligationspuffer und 0.8µl DNA-Ligase versetzt und ü. N. bei 14°C im Wasserbad ligiert.

Die kompetenten Bakterien (DH5α) wurden mit der ligierten DNA transformiert (2.16.3). Zur Kontrolle wurde das rekombinante Plasmid isoliert (2.12.3) und sequenziert (2.19).

2.26.2 Genexpression und Translation in *E.coli*-Zellen

3 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer Kolonie des Bakterienstammes mit dem rekombinanten Expressionsplasmid inokuliert und ü. N. bei 30°C unter ständigem Schütteln (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit 2 ml der Vorkultur inokuliert und solange bei 37°C inkubiert, bis die optische Dichte der Kultur bei 550 nm 0.5 betrug. Um die Expression des rekombinanten Proteins zu induzieren, wurde der tetA-Promotor des rekombinanten Plasmids 3 Std. lang durch Zugabe von 10µl Anhydrotetracyclinlösung (2mg/ml) zum Medium stimuliert.

2.26.3 Präparation des cytoplasmatischen Proteinextraktes

Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (4°C, 4500 g, 12 Min.), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml vorgekühltem Puffer W (2.3) bei 4°C resuspendiert. Zur Kontrolle des Gesamtproteins durch SDS-PAGE (2.22.1) wurden 10µl des Extraktes entnommen und im Western Blot (2.17.4) eingesetzt. Die übrige Zellsuspension wurde unter Eiskühlung bis zur vollständigen Lyse sonifiziert und zur Entfernung unlöslicher Zellkompartimente zentrifugiert (4°C, 12000 g, 15 Min.). Der Überstand wurde nun in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der Säulenaffinitätschromatographie aufgereinigt. Zur Analyse in der SDS-PAGE (2.22.1) wurden vorher 20µl des Extraktes entnommen.

2.26.4 Säulenchromatographische Aufreinigung des Proteins

Die Streptavidinsäule wurde zunächst durch Zugabe von 5ml Puffer W (2.3) äquilibriert. Um das *Strep*-tag Fusionsprotein zu adsorbieren, wurde die Streptavidinsäule mit 1 ml des präparierten Proteinextraktes (2.26.3) beladen und anschließend 5 x mit 1 ml Puffer W gewaschen. Zur Elution des rekombinanten Proteins wurde die Säule mit 6 x 0,5 ml Puffer E (Puffer W mit 2.5 mM Desthiobiotin) beladen. Durch die Wirkung des reversibel bindenden, spezifischen Kompetitors Desthiobiotin werden dabei die an das Streptavidin der Säule gebundenen Fusionsproteine freigesetzt. Jeweils 2 µl der verschiedenen Proteinfractionen wurden gesammelt, die Konzentration der Proteine (2.22.4) wurde bestimmt, und sie wurden einer SDS-PAGE Analyse unterzogen (2.22.1).

Anschließend wurde die Säule durch Waschen mit 3 x 5 ml Puffer R (Puffer W mit 1mM HABA) regeneriert. Der Farbumschlag von gelb nach rot zeigt den Regenerierungsprozess an, bei dem das Desthiobiotin von der Säule gewaschen und durch HABA ersetzt wird. Die Intensität des Farbumschlages ist dabei ein Indikator für die Aktivität der Säule. Zuletzt wird Puffer R durch Zugabe von 2 x 4 ml Puffer W ersetzt. Die Säule wird nun mit 2 ml Puffer W überschichtet und bei 4°C gelagert.

2.27 Quantitativer Nachweis von Reporterenzymen

Der quantitative Nachweis der Aktivität der Reporterenzyme Luciferase und β -Galactosidase erfolgte über die Messung von Lichtemissionsreaktionen in RLUs („relative light units“) in einem Luminometer (Typ LB 953, Fa. Berthold, Bad Wildbad). Das rekombinante Gen des Enzyms Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1987) wurde als Reporter gen verwendet (Halbwertszeit in transfektierten Zellen ca. 3 Std., (Thompson et al., 1993), da die auf die Oxidation des Käfer-Luciferins zurückzuführende Biolumineszenzreaktion gut nachgewiesen werden kann. Nach der automatischen Injektion des Substrats durch das Luminometer startet die lichtemittierende Reaktion in <1 Sekunde und ist bei einer Zugabe des Substrats im Überschuß über einen bestimmten Zeitraum proportional zur

Luciferaseaktivität der Probe, was eine indirekte Bestimmung der Transkription des Reportergens erlaubt. In der ATP- und Mg^{2+} -abhängigen Reaktion wird zunächst eine Acyl-AMP Zwischenstufe gebildet, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Oxyluciferin oxidiert wird. Angeregtes Oxyluciferin fällt nachfolgend in den Grundzustand zurück, wobei ein Photon emittiert wird. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidase exprimierender Vektor im Verhältnis 1:10 bis 1:20 zu dem zu testenden Konstrukt kotransfiziert. Durch die Verwendung von Chemilumineszenzsubstraten ist die Aktivitätsmessung im Luminometer möglich, was den linearen Bereich der Detektion erhöht und die Sensitivität gegenüber dem calorimetrischem Ansatz um den Faktor 5×10^5 steigert (Bronstein et al., 1994).

2.27.1 „Luciferase-Assay“

(Ausubel et al., 1995)

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 200 μ l des Luciferase-Reaktionspuffers in Meßröhrchen (Fa. Sarstedt, Nürmbrecht) vorgelegt und 25-50 μ l Zell- bzw. Gewebeextrakt zugegeben. Zum Starten der Lichtreaktion wurden 100 μ l der Luciferin-Injektionslösung durch einen Injektor des Luminometers eingespritzt und die nachfolgende Lichtemission nach Verstreichen einer Vorlaufzeit von 20 Sekunden über weitere 20 Sekunden integriert.

2.27.2 β -Galactosidase- „Assay“

(Jain und Magrath, 1991)

Die Chemilumineszenzmessung der β -Galactosidaseaktivität erfolgte unter Verwendung desselben Zellextrakts wie zur Luciferasebestimmung (Fulton und Van Ness, 1993) mit dem „Galacto-Light™-Kit“ (Fa. Tropix, Bedford, USA). Das als Stocklösung vorliegende chemilumineszente Substrat Galacton wurde 1:100 mit dem gelieferten Reaktionspuffer verdünnt und 70 μ l in die Messröhrchen des Luminometers vorgelegt. In einem Abstand von 30 Sekunden wurden 5 – 10 μ l der Proben zum Substrat gegeben.

Der Abstand von 30 Sekunden entsprach der Dauer einer Messung im Luminometer, zusammengesetzt aus 20 Sekunden Vorlaufzeit nach Injektion von 100 µl des „Light Emission Accelerators“ und 10 Sekunden Messintervall. Die Inkubationszeit mit Reaktionspuffer sollte für jede Probe identisch sein, da die Signalintensität mit der Inkubationszeit variiert. Nach dem Pipettieren der ersten Probe begann die Inkubationszeit von 30 - 60 Min. bei RT, nach der die Messungen gestartet wurden. Der durch das Luminometer injizierte „Light Emission Accelerator“ enthält modifizierten „Emerald Lumineszenz-Verstärker“, der gleichzeitig nichtenzymatischen Hintergrund reduzieren soll.

2.28 Gel Retardation „Assay“

(Johnson, 1991)

Der Gel Retardation „Assay“ dient zum Nachweis einer Protein/DNA-Interaktion. Das als Sonde dienende DNA-Fragment wird über das „Annealing“ zweier komplementärer Oligonukleotide erhalten. Nach der „Annealingreaktion“ bleiben 5' und 3' überhängende, einzelsträngige Guanin-Reste, an denen das Fragment mit Hilfe der Klenow-Polymerase Reaktion mit radioaktiven dCTPs markiert werden kann. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden verschiedene Kernproteinisolierungen (2.21.1.1 und 2.21.1.2) (20-50 µg Protein) und Poly(dI*dC) in Bindungspuffer (2.3) 15 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des markierten DNA-Fragments (2.18.6) erfolgte eine Inkubation von 30 Min. auf Eis. Nach dieser Bindungsreaktion (2.28.1) wurde der Ansatz ohne die Zugabe von Stopmix auf ein 5 %iges Polyacrylamidgel (enthält 5 % (v/v) Glycerol) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C mit 7 V/cm in 1 x TBE-Puffer. Nach der Auftrennung über ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel (PAGE zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten im Gel) können Protein/DNA-Komplexe wegen ihrer verzögerten Laufgeschwindigkeit auf einem Röntgenfilm von freier DNA unterschieden werden.

2.28.1 Protein/DNA-Bindungsreaktion

Für den Gel Retardation „Assay“ wurden 10-20 µg Kernproteine pipettiert, 10.000 cpm (0,1-1ng) DNA und 2-8 µg Poly (dI*dC) eingesetzt. Für den „Assay“ wurden in der Regel folgende Ansätze pipettiert:

1. 1 Kontrolle mit DNA, ohne Zusatz von Kernproteinen und Poly (dI*dC)
2. 1 Kontrolle mit DNA, mit Kernprotein, aber ohne Poly (dI*dC)
3. Kernproteine aus verschiedenen Zelllinien bzw. Geweben wurden in ein bis zwei Konzentrationen eingesetzt, wobei jede Konzentration mit 1-2 verschiedenen Poly (dI*dC) Mengen inkubiert wurde.

Um die Spezifität des Protein/DNA-Komplexes nachzuweisen, wurde das nicht markierte Fragment (spezifische Kompetition) in 100- und 500-fachem Überschuß der Reaktion zugesetzt.

Die Kernproteine wurden mit 2 µl Bindungs-Puffer, Poly dI*dC und H₂O auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht und 10 Min. auf Eis inkubiert. Für eine Kompetition wurde den Ansätzen der 100- und 500-fache Überschuß an nichtradioaktiver DNA hinzugefügt und die Inkubation auf Eis für 15 Min. fortgesetzt. Bei Kompetition mit Antikörpern wurden dagegen 1 bis 5 µl des Antiserums zu den Kernproteinansätzen gegeben und 15 Min. unter ständiger Bewegung auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10.000 cpm (10 µl) markierten DNA-Fragments wurden die Ansätze weitere 20 Min. auf Eis inkubiert und dann ohne Zugabe von Stopp-Mix auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Referenz für die Laufstrecke wurde eine Tasche auf dem Gel mit Stopp-Mix III beladen.

Stopp-Mix III: 15% Ficoll 400
0,05% Bromphenolblau
0,05% Xylencyanol

2.28.2 Antikörper „Inhibition“ Assay

Der Antikörper „Inhibition“ Assay dient zur Identifikation von transagierenden Faktoren, die an spezifische Promotormotive binden. In Abwandlung zu Kapitel 2.28.1 soll durch Präinkubation der Kernproteinextrakte (2.21.1.1 und 2.21.1.2) mit Antikörpern (2.8.3) eine Bindung an markierte DNA-Promotorfragmente verhindert werden.

2.28.3 „Supershift“ Assay

Der „Supershift“ Assay kann parallel zum Antikörper „Inhibition“ Assay (2.28.2) durchgeführt werden. In Abwandlung zu Kapitel 2.28.1 und 2.28.2 werden die Kernproteinextrakte zunächst mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment (2.8.2 und 2.18.6) und anschließend mit den Antikörpern (2.8.3) inkubiert. Dies sollte eine verzögerte gelelektrophoretische Wanderung des Komplexes zur Folge haben.

2.28.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten für den Gel Retardation Assay

Für den Gel Retardation „Assay“ wurden DNA-Fragmente an beiden Enden radioaktiv markiert (2.18.6). Dazu wurde das DNA-Fragment restriktionsenzymatisch so aus dem Plasmid-Vektor gespalten, dass 5`überhängende Enden mit dG erzeugt wurden. Nach der Messung des radioaktiven Einbaus im ^3H -Kanal des Flüssigszintillationszählers wurde das markierte DNA-Fragment auf eine Konzentration von 2.000 cpm/ μl mit H_2O eingestellt.

2.28.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der Protein/DNA-Komplexe

Die Proben wurden in 6%igen Polyacrylamidgelen (PAGE zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten im Gel) aufgetrennt. Die Vorelektrophorese wurde 30 Min. mit

150 V bei 4°C durchgeführt, die eigentliche Elektrophorese mit 200 V bei 4°C. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 45 Min. bei 70°C unter Vakuum getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt für 1-3 Tage bei -70°C über einem Röntgenfilm exponiert.

2.29 Immunfärbung von PVDF-Filtern

Blockierungspuffer:	1 x TBS 0,05 % Tween-20 5 % Blockierungsreagenz (Milchpulver)
Waschpuffer:	1 x TBS 0,05 % Tween-20

Die Protein-beladenen PVDF-Filter aus Kapitel 2.17.4 wurden direkt verwendet oder nach Lagerung bei 4 °C zunächst 3 Min. in Methanol reaktiviert und gründlich in Waschpuffer gespült. Nach einstündiger Inkubation unter Schütteln in Blockierungspuffer wurden die Filter für 1 Std. bei RT in 5 ml einer verdünnten Lösung des primären Antikörpers (1:200 in Blockierungspuffer), und zwar eingeschweißt in einer Schlauchfolie, inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 Min. unter Schütteln in Waschpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 5 ml Blockierungspuffer mit dem sekundären Antikörper, einem mit alkalischer Phosphatase-konjugierten anti-Kaninchen IgG (AP-anti-rabbit-IgG, Firma Sigma), in einer 1:10000 Verdünnung für 45 Min. bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Filter erneut dreimal für 5 Min. in Waschpuffer gewaschen. Zur Detektion wurde das bereits in Kapitel 2.17.5 beschriebene NBT/BCIP-Färbesystem als Substrat für die alkalische Phosphatase benutzt. Dazu wurde der Filter zunächst dreimal für 5 Min. in AP 1-Puffer gewaschen, zweimal für 3 Min. in AP 3-Puffer auf pH 9,5 umgepuffert, eingeschweißt in Schlauchfolie im Dunkeln ohne Schütteln 1-2 Std. in 10 ml NBT/BCIP-Färbelösung gefärbt, in H₂O gewaschen, luftgetrocknet und fotodokumentiert.

2.30 Erzeugung transgener Mäuse

Die Erzeugung transgener Mäuse, also keimbahn-inserierte Fremd-DNA tragende Mäuse, erfolgte z.T. im Institut für Humangenetik und z.T. (ab 1999) über den „Transgenen Service“ des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin in Göttingen. Die Methoden zur Erzeugung transgener Mäuse wurden prinzipiell nach Hogan et al. (1986) durchgeführt.

2.30.1 Vorbereiten der DNA zur Mikroinjektion

Alle zur Mikroinjektion vorgesehenen Konstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert (2.18.6). Laut Literatur (Brinster et al., 1985) integriert DNA bevorzugt in linearisierter Form, die Beschaffenheit der Enden spielt dagegen für die Integrationseffizienz keine Rolle. Das das Konstrukt enthaltende DNA-Fragment wurde über einen Verdau des Vektorrückgrats mit entsprechenden Restriktionsenzymen aus dem Plasmid freigesetzt und über ein Agarosegel (ohne EtBr) vom Vektorrückgrat getrennt. Da DNA-Mengen von 25 µg verdaut wurden, wurden mehrere Taschen eines Gels beladen. Die äußeren Taschen erhielten dabei nur etwa 1/10 der DNA/Dye-Lösung. Nach dem Gellauf wurden diese Taschen und der DNA-Längenstandard ausgeschnitten und die Gelstücke im EtBr-Bad angefärbt. Nach dem Anfärben wurde das Gel zusammengesetzt und auf dem UV-Tisch die gesuchte Bande zwischen den angefärbten Bereichen ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte mit Glasmilch (siehe 2.10.3). Um nach der Gelelution jegliche verbliebenen Partikel zu entfernen, wurde das Eluat über kleine Mikrofilter (Fa. Millipore, Typ HY, 0,45 µm) filtriert. Die Konzentration der DNA wurde über eine Anfärbung mit Etbr nach der Agarosegelelektrophore bestimmt. Dazu wurden verdünnte Aliquots der DNA-Lösung aufgetragen und die Anfärbung mit der auf gleicher Höhe laufenden Bande eines Markers verglichen, die definierte DNA-Mengen enthielt. Zur Mikroinjektion wurde die Konzentration auf etwa 5 ng/µl mit 1 x Mikroinjektionspuffer verdünnt.

2.30.2 Superovulation

Bei dem im Tierstall vorgegebenem Hell-Dunkel-Rythmus (7-18, 18-7 Uhr) ovulieren die Weibchen alle 4-5 Tage 3-5 Std. nach Einsetzen der Dunkelperiode. Um die Ausbeute an befruchteten Eizellen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erhöhen, wurden die Tiere hormonell behandelt. Der Tag der Oocytenisolierung wird als Tag 0 bezeichnet. Den Tieren wurde um 15 Uhr je 10 IU PMS (follikelstimulierendes Hormon aus dem Serum schwangerer Stuten) intraperitoneal injiziert. Nach 48 Std. wurden 10 U HCG auf die gleiche Weise injiziert. HCG entspricht dem Luteinisierungshormon und wird für die Ovulation benötigt. Direkt nach der HCG- Injektion wurde je ein Weibchen mit einem im Einzelkäfig gehaltenen Männchen zusammengesetzt. Die Befruchtung erfolgte 1-2 Std. nach der Ovulation, meist etwa in der Mitte der Dunkelperiode. Die erfolgte Kopulation wurde am nächsten Morgen (Tag 0,5) am Vorhandensein des Vaginalpfropfs (VP) festgestellt, VP-positive Tiere wurden zur Oocytenentnahme verwendet. Je nach Stamm erhielt man 20-40 befruchtete Oocyten pro Tier.

2.30.3 Gewinnung befruchteter Oocyten

Die Bearbeitung und Kultivierung der Oocyten am Tag 0,5 erfolgte in 35 mm Kulturschalen, von denen zur Vorbereitung einige mit M2- bzw. M16-Medium befüllt und im Wärmeschrank bei 37°C (M2) bzw. im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ (M16) inkubiert wurden. In eine weitere Kulturschale wurden drei einzelne Tropfen M16-Medium gegeben und mit Mineralöl überschichtet (Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂). Den zur Oocytenentnahme getöteten Tieren wurde die Bauchdecke geöffnet, die Eileiter von den Uterushörnern abgetrennt und in M2-Medium (auf 37°C vorgewärmt) gegeben. Die weitere Arbeit erfolgte unter einem Stereomikroskop (Stemi SV 11, Fa. Zeiss) unter Durchlicht auf einer mit 37°C beheizten Arbeitsplatte. Mit Hilfe von spitz ausgeschmiedeten Pinzetten wurde die geschwollene Ampulle angerissen, worauf die von Cumulusmasse umgebenen Oocyten wegen des vorliegenden Überdrucks herausgepresst wurden. Restliche Zellen wurden mit den Pinzetten aus den Ampullen herausgestrichen, die leeren Reste der Ampullen entfernt. Zum Ablösen der

Cumuluszellen wurde 20 µl Hyaluronidase (10 mg/ml) zugegeben. Nach 5minütiger Inkubation wurde die Oocyten mit einem Mundschlauch in eine über dem Bunsenbrenner ausgezogenen Pasteurpipette eingesaugt und mit möglichst wenig Cumuluszellen oder Geweberesten in frisches M2-Medium gegeben. Auf dieselbe Weise wurden die Oocyten solange weitergewaschen bis alle Cumuluszellen, Gewebereste oder zerstörten Oocyten abgetrennt waren. Danach wurden die Oocyten zum Mediumwechsel einmal kurz in M16-Medium gewaschen, bevor sie in die zur Kultivierung vorbereiteten M16-Tropfen unter Mineralöl gegeben und bis zur Mikroinjektion bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert wurden.

2.30.4 Mikroinjektion

Die im Institut für Humangenetik verwendete Mikroinjektionsanlage (Fa. Eppendorf, Hamburg) besteht aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 10, Fa. Zeiss), zwei Mikromanipulatoren (Typ 5171, Fa. Eppendorf), einem Mikroinjektor (Typ 5242, Fa. Eppendorf) und einer Mikrometerspritze zur Kontrolle der Haltepipette (CellTram Air, Fa. Eppendorf). Vor der Mikroinjektion wurde eine Haltepipette (Vacu Tips, Fa. Eppendorf) mit M2-Medium befüllt, mit der Mikrometerspritze verbunden und in einen Mikromanipulator (hier linker Hand) eingesetzt. Die Injektionskanüle (Femtotips II, Innendurchmesser 0,5 µm, Außendurchmesser 0,7 µm, Fa. Eppendorf) wurde rückseitig über eine lang ausgezogene „Mikroladder“ Pipettenspitze (Fa. Eppendorf) befüllt, mit dem Mikroinjektor über eine Verschraubung verbunden und in den zweiten, rechter Hand liegenden Mikromanipulator eingespannt.

Jeweils ca. 10-20 Oocyten wurden aus den M16-Tropfen entnommen, einmal in M2-Medium äquilibriert und auf einen Hohlschliffobjektträger in einen 20 µl Tropfen M2-Medium unter Mineralöl gegeben. Der Objektträger wurde auf dem Mikroskoptisch fixiert, die Ebene der Oocyten fokussiert und die Haltepipette an eine Oocyte herangeführt. Die Oocyte wurde dann über einen angelegten Unterdruck an der Haltepipette fixiert. Ansaugen und Abstoßen der Oocyten erfolgte solange, bis sie so fixiert waren, das die Vorkerne leicht zu erkennen und der männliche (größere) Vorkern der Seite der Injektionskapillare zugewandt war. Je nach Durchlässigkeit der

Injektionskapillare wurde der Injektionsdruck (Mikroinjektor Typ 5242 baut einen Dauerdruck auf) zwischen 30-300 hPa eingestellt. Zur Mikroinjektion stach man vorsichtig bis in den männlichen Vorkern hinein. Ein leichtes Anschwellen des Kerns zeigte die Aufnahme von Flüssigkeit (1-2 pl) an. Waren alle vorgelegten Oocyten auf diese Weise injiziert, wurden die noch intakten Eizellen einmal in M16-Medium gewaschen und in einem frischen M16-Tropfen unter Mineralöl bis zum Retransfer bei 37°C und 5 CO₂ inkubiert.

2.30.5 Retransfer mikroinjizierter Oocyten

Die am Tag 1,5 zum Zweizeller entwickelten Embryonen wurden in die Eileiter eines Tag 1 scheinsschwangeren Weibchens (NMRI) retransferiert. Dazu wurden am Vorabend des Retransfers mehrere Weibchen im Alter zwischen 2-3 Monaten mit vasktomierten Männchen verpaart. Nach positiver VP-Kontrolle wurde je eine Maus mit Rompun/KETAVET (0,01 ml/1 g Körpergewicht) narkotisiert. Die Rückengegend der bäuchlings auf einer Wärmeplatte liegenden Maus wurde desinfiziert und das Fell im Bereich der Leiste durch einen ca. 10 mm langen Schnitt aufgetrennt. Über dem durchscheinenden Ovar wurde die Unterhaut aufgeschnitten und das Ovar am anliegenden Fettgewebes herausgezogen. Das Ovar wurde mit einer Gefäßklemme (angebracht am Fettgewebe) so orientiert festgelegt, dass Ovidukt und Uterus gut zu erkennen waren. Mit zwei Pinzetten wurde danach die Bursa angerissen und die Ampulle freigelegt. Ein Tropfen Adrenalinlösung verhinderte das Einbluten. Das Infundibulum wurde mit einer Pinzette hervorgehoben und mit der anderen Pinzette vorsichtig aufgeweitet. In die sog. Retransferkapillare, einer besonders schmal ausgezogenen Pasteurpipette, waren vorher M2-Medium, eine Luftblase und 10-20 Zweizeller perlschnurartig aufgesogen worden. Mit einer Pinzette hielt man das Infundibulum des Ovidukts fest, die Spitze der Retransferkapillare wurde in das Infundibulum eingeführt und die Zellen hineingeblasen. Das unter dem Binokular gut sichtbare Erscheinen der Luftblase im Eileiter zeigte den erfolgreichen Retransfer an. Nach erfolgtem Retransfer wurden die Organe in die richtige Lage zurückgebracht, die Wundränder aneinandergelegt und geklammert und die Wunde zur Desinfektion mit

Leukase-Puder behandelt. Die Maus wurde dann bis zum Aufwachen aus der Narkose in ein Zellstofftuch eingewickelt und auf eine Wärmeplatte gelegt, wobei die Augen durch aufgelegte Wassertropfen vor der Austrocknung geschützt wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Überexpression von *Insl3* in weiblichen Mäusen

Der Descensus der Hoden von der embryonalen Position caudal der Niere zur adulten scrotalen Lage (*Descensus testis*) wird durch die Entwicklung des Gubernaculums verursacht. Ursächlich hierfür ist die Wirkung des Insulin-like 3 Genprodukts (*Insl3*). Die Deletion dieses Gens verhindert die Entwicklung des Gubernaculums und verursacht einen bilateralen Cryptorchismus (Zimmermann et al., 1999). *In vitro* Experimente führten zu der Vermutung, dass *Insl3* zusammen mit Androgenen das Wachstum des Gubernaculums induziert. Um *in vivo* zu untersuchen, ob die *Insl3*-gesteuerte Gubernaculumentwicklung von Androgenen abhängig ist, wurden die nachfolgenden Experiment durchgeführt.

3.1.1 Generierung des *Insl2/Insl3* Konstruktes

Zur Generierung des *Insl2/Insl3* Fusionskonstruktes wurde das BamHI/XbaI-Fragment des Vektors pRIP1-Tag, das den *Insulin II* Promotor aus *Rattus norvegicus* enthält (-695 bis +8), in den pZero-Vektor subkloniert (Invitrogen, San Diego, USA). Der resultierende Vektor wurde pZ-RIP genannt. Ein genomisches *Insl3*-Fragment mit einer künstlichen NotI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer XhoI-Schnittstelle am 3'-Ende wurde über eine PCR an genomischer Maus-DNA mit Primern, die die Nukleotide -2 bis +1329 überspannen, amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit NotI/XhoI doppelt restriktionsenzymatisch gespalten und in pZ-RIP subkloniert. Der resultierende Vektor wurde pZ-RIP-*Insl3* genannt. Die Nukleotidsequenz des amplifizierten *Insl3*-Fragments wurde über DNA-Sequenzierung verifiziert.

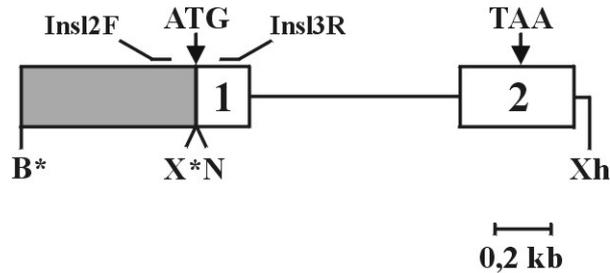


Abb. 5: Schematische Darstellung des *Ins2/Ins3*-Konstrukts

Das *Ins2/Ins3*-Konstrukt besteht aus einem 570 Bp Promotorfragment des Insulin II Gens der Ratte (graue Box) und aus 22 Bp der 5'-nichttranslatierten Region. Daran ist das gesamte murine *Ins3* Gen einschließlich 2 Bp der 5'- nichttranslatierten und 24 Bp der 3' flankierenden Region fusioniert. Die nummerierten Boxen kennzeichnen die Lage der Exons, die dünnen Linien zeigen die intronischen Bereiche und die 3'-flankierende Region. Dargestellt sind außerdem der Translationsstartpunkt (ATG), das Stopcodon (TAA), die für den Nachweis des Transgens erforderlichen Primer Ins2F und Ins3R (2.8.2) und die für die Herstellung des transgenen Kontruktes wichtigen Restriktionsschnittstellen (B, BamHI; X, XbaI; N, NotI, Xh, XhoI, *,diese Restriktionsschnittstellen gehen nach dem Klonieren verloren).

3.1.2 Herstellung transgener *Ins2-Ins3* Mäuse

Um transgene Mäuse zu erzeugen, wurde das *Ins2/Ins3* Hybridgen aus dem Vektor pZ-RIP-*Ins3* durch die Restriktionsendonukleasen SpeI/ApaI herausgespalten, durch Agarosegelelektrophorese gereinigt und in männliche Vorkerne befruchteter Oocyten der Mauslinie FVB/N mikrokoinjiziert. Um das *Ins2/Ins3* Transgen nachzuweisen, wurde durch eine PCR (Primer Ins3F, 2.8.2; Ins3R, 2.8.2) in 35 Zyklen, eine Denaturierungsphase von 30 Sekunden bei 94°C, einer Annealingphase von 30 Sekunden bei 54°C und eine Elongationsphase von 45 Sekunden bei 72°C ein DNA-Fragment amplifiziert, das die Verbindung zwischen dem *Ins2* Promotor der Ratte und dem *Ins3* Gen der Maus umspannt. Alternativ dazu wurde an aus Mäuseschwänzen gewonnener, mit SstI geschnittener genomischer DNA durch Southern-Hybridisierung mit einer 570 Bp großen Sonde aus dem *Ins2*-Promotor das transgene *Ins2/Ins3*-Allel in einem Weibchen und vier Männchen nachgewiesen. Die Phänotypen der transgenen

Tiere waren in den Nachkommen aller fünf Foundertiere identisch. Deshalb wurde nur eine transgene Linie (L4) für alle weiteren Experimente verwendet.

3.1.3 Untersuchung des Expressionsmusters des transgenen Allels mittels Northern-Blot-Analyse

Um zu untersuchen, ob das *Insl2/Insl3* Transgen transkribiert wird, wurde eine Northern-Blot-Analyse mit jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben von 3-Monate alten Wildtyp und hemizygoten *Insl2/Insl3* Mäusen mit einer *Insl3* cDNA Sonde hybridisiert. Wie in Abb. 6 gezeigt, exprimiert die transgene Maus *Insl3* in Testis und Pankreas, aber nicht in anderen Geweben wie Milz, Gehirn, Leber und Herz. In Wildtypmäusen wird *Insl3* nur im Testis exprimiert. Die Expression von *Insl3* im Pankreas hatte keinen Einfluss auf die endogene Genexpression im Testis. Der Unterschied der Genexpression zwischen Testis und Pankreas in hemizygoten *Insl2/Insl3* Mäusen lässt sich durch Unterschiede in der aufgetragenen RNA-Menge erklären. Die Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA Sonde des humanen Elongations-Faktors-2 zeigte, dass deutlich mehr Testis RNA als Pankreas RNA aufgetragen wurde.

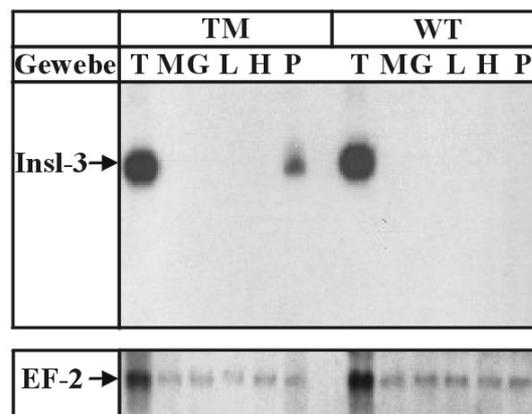
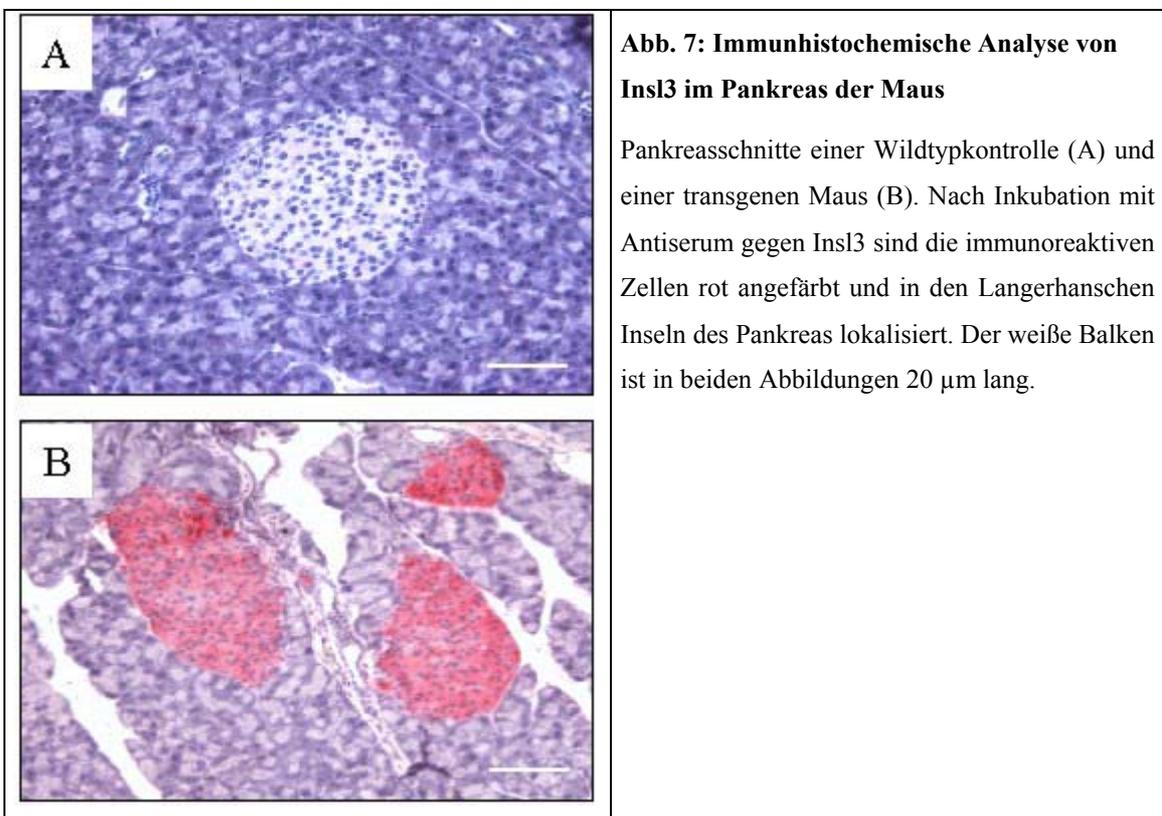


Abb. 6: Analyse der *Insl3* Expression in adulten Geweben von Wildtyp- (WT) und transgenen Mäusen (TM) mittels Northern Blot

Gesamt-RNA (10 µg) aus verschiedenen Geweben (T, Testes; M, Milz; G, Gehirn; L, Lunge; H, Herz; P, Pankreas) von adulten Wildtyp- und transgenen Mäusen wurde mit einer *Ins13* cDNA-Sonde hybridisiert. Die Kontrolle der Integrität der verwendeten RNAs erfolgte durch Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA-Sonde des humanen Elongations-Faktors-2 (EF-2).

3.1.4 Immunhistochemische Analyse des transgenen Proteins

Um die Expression des transgenen Allels auf zellulärer Ebene im Pankreas exakt zu bestimmen, wurde Pankreasgewebe immunhistochemisch untersucht. Dazu wurden Dünnschnitte aus Pankreasgewebe hergestellt und mit polyklonalen Anti-Maus *Ins13* Antikörpern inkubiert. Die Langerhanschen Inseln wurden stark angefärbt (Abb. 7B), während sich die von Wildtyp-Mäusen nicht anfärbten (Abb. 7A). Demgegenüber zeigten die exokrinen Pankreaszellen weder in transgenen, noch in nichttransgenen Mäusen entsprechende Färbereaktionen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das transgene Allel ausschließlich in den Langerhanszellen des Pankreas exprimiert und translatiert wird.



3.1.5 Transabdominaler Abstieg der Ovarien und die Entwicklung des *Processus vaginalis* in transgenen Weibchen

Das weibliche Foundertier und die weiblichen Nachkommen der vier männlichen Foundertiere wiesen bilaterale Inguinalhernien auf (Abb. 8C), welche sich im Erscheinungsbild vom Scrotum männlicher Wildtypmäuse unterscheiden (Abb. 8A). Dieser Phänotyp verstärkt sich bei transgenen Weibchen nach der dritten postnatalen Woche. Nach Präparation der abdominalen Haut zeigt das freigelegte Abdomen die Entwicklung des *Processus vaginalis* in hemizygoten Weibchen. (Abb. 8F). Die Entwicklung des *Processus vaginalis* in transgenen Weibchen ist beidseitig und lateral ausgerichtet, im Gegensatz zu männlichen Tieren, welche eine caudales Wachstum in diesem Bereich zeigen (Abb. 8D). Die Inguinalhernie beinhaltet peritoneales Gewebe und Darmschlingen. In allen transgenen Weibchen sind die aus den Müllerschen Gängen abgeleiteten Genitalorgane gut entwickelt und formen den Oviduct, den Uterus und die obere Vagina, während die aus den Wolfschen Gängen abgeleiteten Genitalorgane fehlen (Abb. 8I). Dies kann durch die Abwesenheit von Androgenen bzw. durch die fehlende Wirkung des Anti-Müller-Hormons in transgenen Weibchen erklärt werden. Die Ovarien sind oberhalb der Blase lokalisiert und durch das gut entwickelte Cranial suspensory ligament (CSL) sowie durch das Gubernaculum mit dem Abdomen verbunden (Abb. 8I). Es wurde in transgenen Weibchen beobachtet (Abb. 8I), dass der Abstieg der Ovarien in eine inguinale Position die Ausbildung eines V-förmigen Uterus stört. Die Entwicklung beider Ligamente in transgenen Weibchen verhindert den Abstieg der Ovarien in einen entwickelten *Processus vaginalis*. Um zu untersuchen, ob die Regression des CSL unter dem Einfluss von Androgen den Abstieg der Ovarien verursacht, wurden schwangere Mäuse zwischen Tag 12,5 und Tag 17,5 der Schwangerschaft mit Dihydrotestosteron behandelt. Die Ovarien der behandelten transgenen Weibchen wanderten in die Inguinalhernie (Abb. 8F).

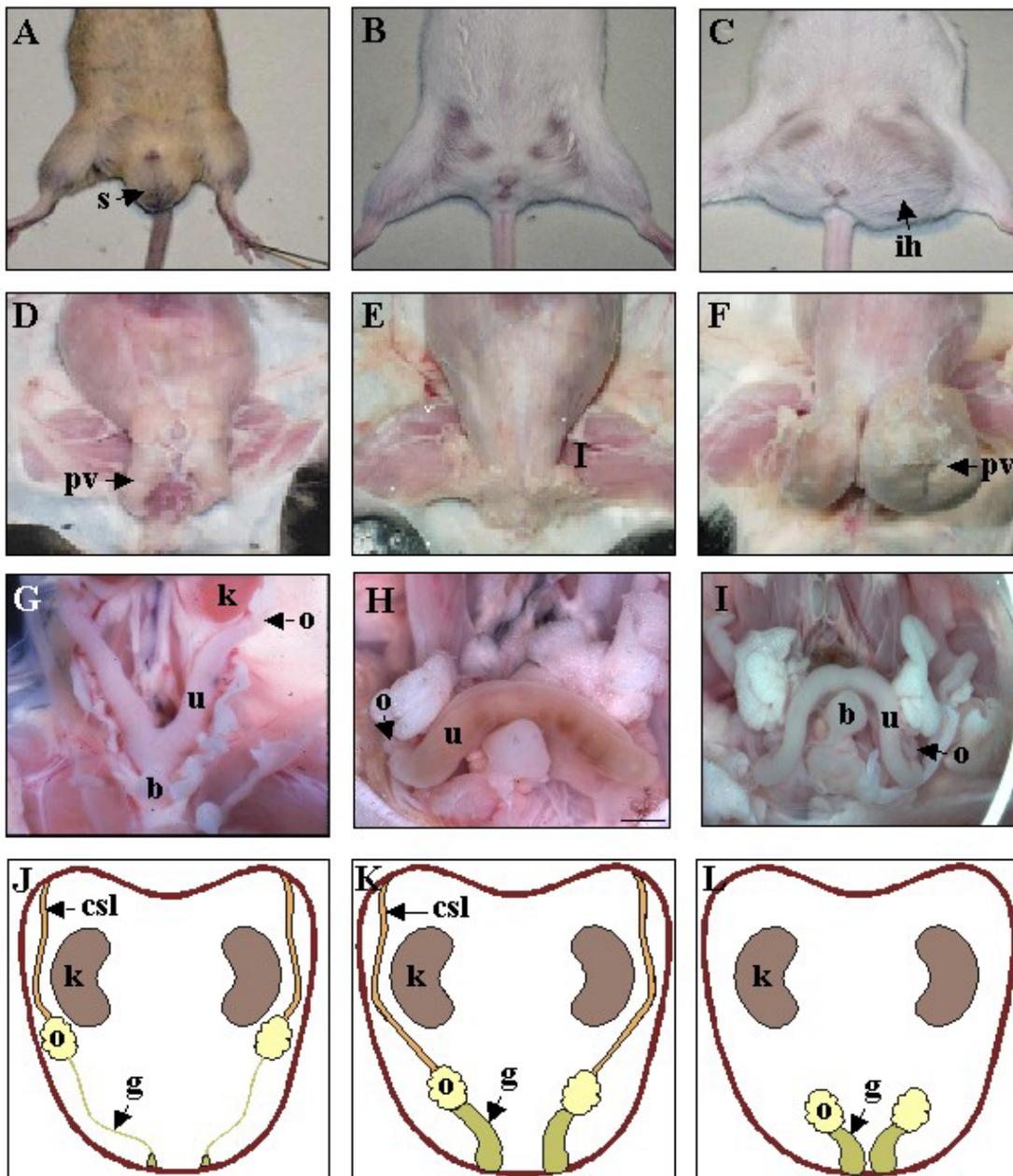


Abb. 8: Die Entwicklung des *Processus vaginalis* und des *Descensus ovari* bei transgenen weiblichen Tieren

A-C, inguinale Region einer 3-Monate alten männlichen Maus (A), einer weiblichen Wildtyp-Maus (B) und einer weiblichen transgenen Maus (C). Dargestellt sind außerdem das Scrotum (s) bei der männlichen Maus und eine unilaterale Inguinalhernie (ih) bei der transgenen weiblichen Maus.

D-F, zeigt die Entwicklung des *Processus vaginalis* (pv) in einer 3-Monate alten Wildtyp-Maus (D) und in einer 3-Monate alten transgenen weiblichen Maus (F). Zum Vergleich ist das Ausbleiben der Entwicklung des *Processus vaginalis* in einer 3-Monate alten weiblichen Wildtyp-Maus dargestellt (E). G

zeigt die präparierte abdominale Region einer 6-Wochen alten weiblichen Wildtyp-Maus. Die Ovarien (o) liegen benachbart zu den Nieren (k) und dem V-förmigen Uterus. H, im Genitaltrakt einer 6-Wochen alten weiblichen transgenen Maus sind die Ovarien über der Blase (b) lokalisiert. I, im Genitaltrakt einer mit Dihydrotestosteron behandelten, weiblichen transgenen Maus wandern die Ovarien in die Inguinalhernie. J-L, schematische Darstellung der Entwicklung des Cranial Suspensory Ligaments (CSL) und des Gubernaculums (g) in weiblichen Wildtyp-Mäusen (J), weiblichen transgenen Mäusen (K) und in Dihydrotestosteron-behandelten transgenen Weibchen (L).

Während der Embryonalentwicklung der männlichen Maus differenziert sich das Gubernaculum in einen Gubernaculum cord und einen Gubernaculum bulb, der sich im Zentrum zu mesenchymalen Zellen und in der äußeren Schicht zu Muskelzellen differenziert, die für die transabdominale Wanderung der Testes verantwortlich sind. Die Arretierung der Gubernaculumentwicklung in weiblichen Wildtypmäusen führt zum Verbleiben der Ovarien in der Nähe der dorsocaudalen Region der Nieren. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Phänotyp in transgenen Weibchen ursächlich mit der fetalen Gubernaculumentwicklung zusammenhängt, wurde die Gubernaculumentwicklung in weiblichen transgenen Mäusen durch rasterelektronenmikroskopische und histologische Analysen untersucht und mit weiblichen und männlichen Wildtypmäusen verglichen (Abb. 9A-C). Das Gubernaculum am Tag 17,5 dpc erstreckt sich zwischen der Gonade und der Inguinalregion und wird in einen cranialen (Gubernaculum cord) und einen caudalen (Gubernaculum bulb) Bereich eingeteilt. Im Wildtypmännchen und im transgenen Weibchen ist der Gubernaculum cord verkürzt. Der Gubernaculum bulb ist vergrößert und differenziert sich in mesenchymale Zellen im Zentrum und Myoblastzellen im umgebenden Gewebe (Abb. 9D). In Wildtypweibchen ist der Gubernaculum bulb undifferenziert (Abb. 9E) und besteht aus einzelnen mesenchymalen Zellen. Als Konsequenz aus der Gubernaculumentwicklung sind die Testes in Wildtypmäusen und die Ovarien in transgenen Weibchen im distalen Bereich des Abdomens lokalisiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Ins13* die Entwicklung des Gubernaculums sowohl in Wildtypmännchen als auch in transgenen Weibchen induziert.

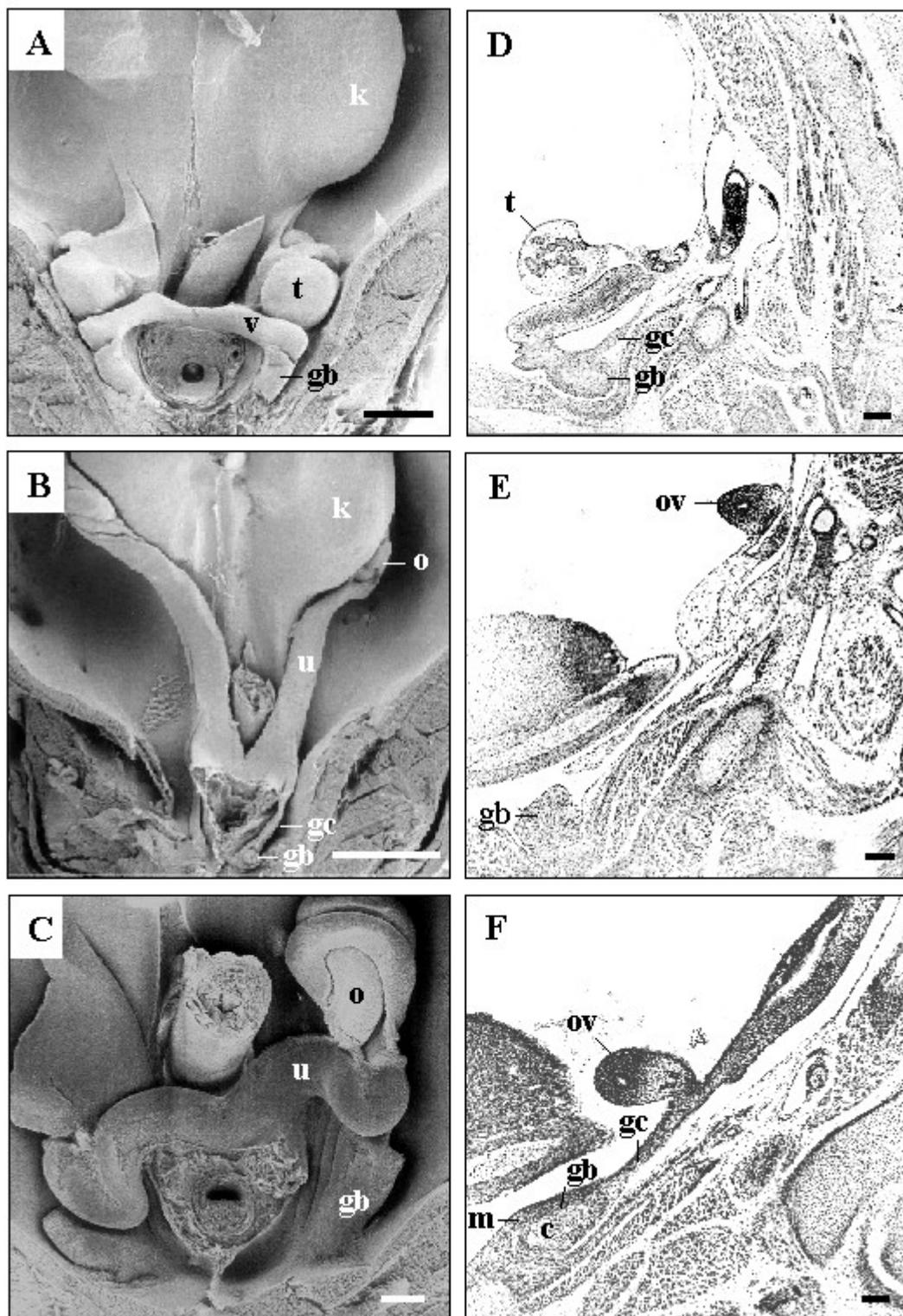


Abb. 9: Darstellung der Entwicklung des Gubernaculum in transgenen Weibchen (17,5 dpc)

A-C. Rasterelektronenmikroskopische Analyse des Genitaltraktes während der pränatalen Entwicklung (17,5 dpc). A, Verdickung des Gubernaculum in männlichen Wildtypmännchen (gb, Gubernaculum bulb, t,

Testis;v, Vas deferens;k, Niere) und transgenen Weibchen (C:gb, Gubernaculum bulb;u ,Uterus;o, Ovarien), sowie ausbleibende Entwicklung in Wildtyp-Weibchen (B:gb, Gubernaculum bulb; gc, Gubernaculum cord;u, Uterus;o, Ovarien;k, Niere).

D-F. Die histologische Analyse am Tag 17,5 zeigt ein gut entwickeltes Gubernaculum in Wildtyp-Männchen (D) und in transgenen Weibchen (F), dargestellt durch die Differenzierung in mesenchymale Zellen im Zentrum, umgeben von einer äußeren Schicht Muskelzellen. In Wildtyp-Weibchen (E) ist das Gubernaculum undifferenziert.

b, Blase;o, Ovar;ov, Oviduct;t, Testis;v, vas deferens, Maßstab: A, 500 μm ; B, 1000 μm ; C, 200 μm ; D-F, 100 μm .

3.1.6 Fertilität transgener Weibchen

Die männlichen Nachkommen aus Verpaarungen transgener Männchen bzw. transgener Weibchen mit Wildtyptieren waren fertil. Demgegenüber war die Fertilität transgener Weibchen reduziert. Die Wurfgröße transgener Weibchen war verglichen mit der von Wildtypweibchen (9.6 ± 1.7) signifikant geringer (4.3 ± 1.9) (Tabelle 2). Der Prozentsatz hemizygoter gegenüber Wildtypnachkommen unterschied sich nicht vom erwarteten Verhältniss (54% transgen, 46% Wildtyp, n=87).

Tabelle 2: Reduzierte Fertilität transgener Weibchen

parentale Genotypen		Gesamtzahl Nachkommen	Nachkommen pro Wurf (x) ^a
Männchen	Weibchen		
Wildtyp	Wildtyp	45	9.6 ± 1.7^c
Wildtyp	Insl2-Insl3	42	$4.3^b \pm 1.9^c$

^aNachkommen pro Wurf: Anzahl Lebendgeburten/Anzahl Nachkommen
^bNachkommenzahl unterscheidet sich signifikant zwischen Wildtyp- und Insl2/Insl3-Weibchen ($P < 0.0001$, *t* Test)
^c \pm Standardabweichung

Dies zeigt, dass die Wurfgröße vom Genotyp der Mutter und vom Genotyp ihrer Nachkommen abhängt. Um den Grund für die reduzierte Fertilität zu finden, wurden die Follikelentwicklung und die Überlebensrate der Embryonen während der

Schwangerschaft untersucht. Die histologische Analyse der Ovarien 3-Monate alter Weibchen zeigte eine normale Entwicklung der Follikel und des Corpus luteum. Transgene Weibchen wurden mit Wildtypmännchen verpaart, abgetötet und die Anzahl der lebenden Embryonen gezählt. Am Tag 8.5 dpc war die Anzahl lebender Embryonen von transgenen Weibchen genauso groß wie bei Wildtypweibchen. Am Tag 10.5, 12.5 und 14.5 dpc war die Zahl der Embryonen deutlich reduziert.

Tabelle 3: Effekt der Überexpression von *Ins13* auf die embryonale Überlebensrate

Genotyp schwangerer Weibchen	durchschnittl. Anzahl der Lebendgeburten			
	E8.5	E10.5	E12.5	E14.5
Wildtyp	10.0 (4)	9.5 (4)	9.8 (5)	9.5 (4)
<i>Ins12-Ins13</i>	10.3 (4)	5.5 (4)	5.0 (4)	5.5 (4)

In Klammern, Anzahl der untersuchten schwangeren Weibchen

Es wurde gezeigt, dass die Expression von *Ins13* in Ovarien von Wildtypmäusen zwischen Tag 8.5 und 17.5 dpc auf nicht detektierbare Werte zurückgeht (Tabelle 3). Um zu untersuchen, ob der Tod der Embryonen in transgenen Weibchen ursächlich mit der Überexpression von *Ins13* im Pankreas in der Mitte der Schwangerschaft zusammenhängt, wurde während der Schwangerschaft Gesamt-RNA aus dem Pankreas gewonnen und einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Dabei zeigte sich, dass sich die *Ins13* Transkriptmenge innerhalb der untersuchten Schwangerschaftsperiode im Pankreas transgener Mäuse nicht verändert (Abb. 10A). Diese Ergebnisse zeigen, dass die reduzierte Wurfgröße der transgenen Weibchen durch den Tod der Embryonen in der Mitte der Schwangerschaft hervorgerufen wird und nicht durch fehlerhafte Implantation oder Oogenese. Es ist möglich, dass die hohen Mengen *Ins13*-Protein im transgenen Pankreas die Ursache für den Tod der Embryonen im Uterus sind.

3.1.7 „Rescue“-Experiment zur Untersuchung der Wirkung des *Ins12/Ins13* Transgens bei *Ins13*-defizienten Männchen

Der Anstieg der *Insl3* Expression im Wildtypetestis am Tag 25 post partum ließ vermuten, dass *Insl3* eine Rolle in der männlichen Fertilität spielt. Um dies zu untersuchen, wurde das Expressionsmuster des transgenen Allels in einer Northern-Blot-Analyse mit Gesamt-RNA aus dem Pankreas von 10-, 20-, 30-, und 60 Tage alten transgenen Männchen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression des *Insl2-Insl3* Gens während der postnatalen Entwicklung gleich bleibt (Abb. 10B). Die Wirksamkeit des transgenen Allels beim Descensus testis in *Insl3*-defizienten Männchen wurde in *Insl2-Insl3* transgenen *Insl3*^{-/-} Männchen untersucht. Die anatomische Analyse von 17.5 Tage alten Feten und adulten *Insl2-Insl3: Insl3*^{-/-} Männchen zeigte einen normalen Abstieg der Hoden in die Inguinalregion am Tag 17.5 dpc und ins Scrotum bei adulten Mäusen (hier nicht gezeigt). Eine Verpaarung dieser Tiere mit Wildtypweibchen führte zu Schwangerschaften mit normaler Nachkommenszahl.

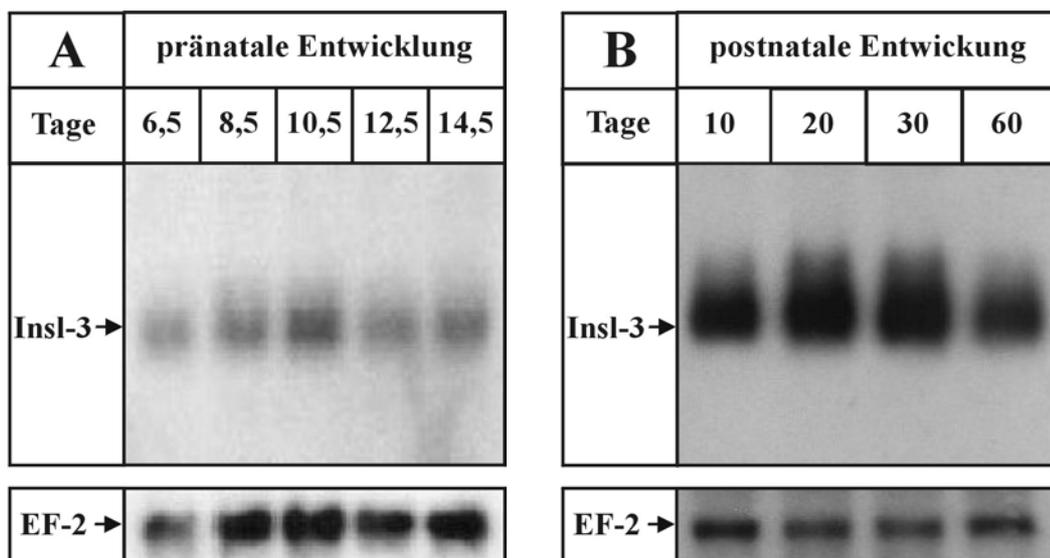


Abb. 10: Northern-Blot-Analyse der *Insl3* Expression während der pränatalen- (A) und postnatalen Entwicklung (B) bei männlichen Mäusen.

A, Northern-Blot mit Gesamt-RNA (10 µg) aus Pankreas von transgenen Männchen in verschiedenen Schwangerschaftsstadien. B, Northern-Blot mit Gesamt-RNA (10 µg) aus Pankreas von transgenen Männchen in verschiedenen Stadien der postnatalen Entwicklung. Die Kontrolle der Integrität der verwendeten RNAs erfolgte durch Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA-Sonde für den humanen Elongations-Faktor-2 (*EF-2*).

Dies zeigt, dass das im Pankreas produzierte *Ins13*-Protein den cryptorchiden Phänotyp in *Ins13*-defizienten männlichen Mäusen aufheben kann. Ausserdem wurde gezeigt, dass die vorübergehende Zunahme der *Ins13* Expression während der postnatalen Entwicklung die Fertilität männlicher Mäuse nicht beeinflusst.

3.2 Untersuchungen zur Charakterisierung des *Ins13*-Promotors *in vitro*

Zimmermann et al. (1998) haben gezeigt, dass 160 Bp des 5'-nichttranslatierten Bereichs des *Ins13* Promotors für die Transaktivierung des *Ins13* Gens *in vitro* ausreichen. Innerhalb dieses Promotorbereiches wurden 3 *cis*-agierende Promotorelemente identifiziert (SF1/1, SF1/2 und SF1/3), an die der Transkriptionsfaktor Steroidogenic Factor-1 (SF-1) bindet (Abb. 11). Es wurde auch gezeigt, dass SF-1 für die Transaktivierung des *Ins13* Promotors hauptverantwortlich ist.

3.2.1 Untersuchung der DNA/Protein-Interaktionen innerhalb des M2-Sequenzelements des *Ins13* Promotors auf Gewebespezifität

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Thamm, 1998) wurde ein weiteres *cis*-agierendes Element innerhalb der 160 Bp Promotorregion identifiziert (Abb. 11). Es wurde dabei in Gel Retardation Assays mit Kernproteinen verschiedener Zelllinien und somatischen Geweben gezeigt, dass transagierende Proteine gewebespezifisch an die M2 Box binden (Thamm 1998).

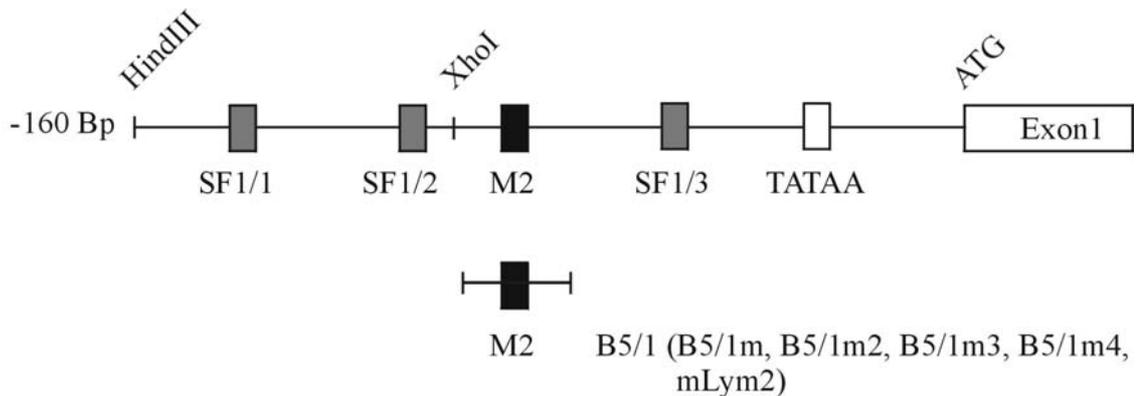


Abb. 11: Darstellung der 160 Bp Promotorregion des *Ins3* Gens bei der Maus

An die grau unterlegten Boxen bindet der Transkriptionsfaktor SF-1. Schwarz unterlegt ist die in dieser Arbeit untersuchte Box M2. Zur weiteren Eingrenzung der Bindungsstelle wurden die Fragmente B5/1 bzw. die mutierten Fragmente B5/1m, B5/1m2, B5/1m3, B5/1m4 und mLym2 hergestellt.

3.2.2 Untersuchung der Bindungsspezifität der M2 bindenden Proteine mit mutierten Oligonukleotiden des *Ins3*-Promotors

Um die Spezifität der Bindung bzw. die an der Komplexbildung beteiligten Nukleotide des M2-Elements genau zu lokalisieren, wurden eine Reihe von Oligonukleotiden hergestellt, die sich vom nativen Promotorfragment in je drei unterschiedlichen Basenpaaren unterscheiden (Abb. 12).

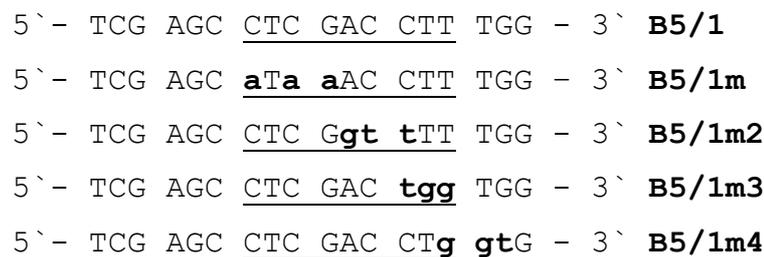


Abb. 12: Darstellung der Oligonukleotide zur Untersuchung der Bindungsspezifität des M2 bindenden Proteine

Die fett gedruckten Buchstaben markieren die mutierten Basen. Die Sequenz der konservierten Box M2 ist unterstrichen.

Um die Leydigzellspezifität der M2 bindenden Proteine zu untersuchen, wurden auch Kernproteine der steroidogenen und SF-1 exprimierenden Zelllinien MA10 und Y1 in den Bandshiftexperimenten eingesetzt (Abb. 14). Wie in Abb. 13 zu sehen ist, wird in MA10-Zellen im Gegensatz zu den Y1-Zellen das *Insl3*-Gen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor SF-1 exprimiert sowohl in MA10- als auch in Y1-Zellen (nicht gezeigt).

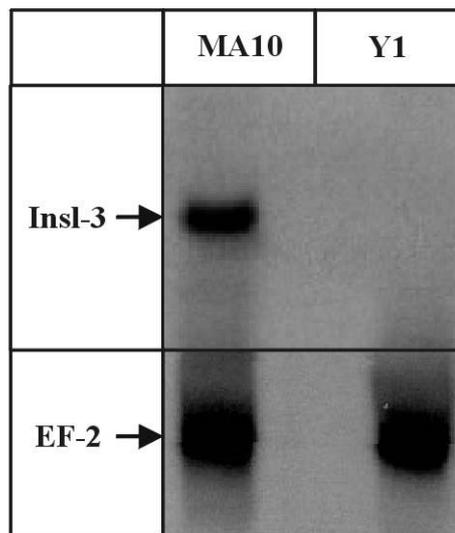


Abb. 13: Northern-Blot Analyse der Expression des *Insl3* Gens in kultivierten MA10- bzw. Y1-Zellen

Gesamt-RNA (je 20µg) aus MA10- bzw. Y1-Zellen wurde mit der cDNA-Sonde für *Insl3* hybridisiert. Die Kontrolle der Integrität der verwendeten RNAs erfolgte durch Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA-Sonde für den humanen Elongations-Faktor-2 (EF-2).

Durch Inkubation des ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP-markierten Fragmentes B5/1 mit Kernproteinextrakten der Leydig-Zelllinie MA10 konnten im Bandshiftexperiment drei spezifische DNA/Protein-Komplexe identifiziert werden (Abb. 14). Bei Inkubation mit Kernproteinextrakten aus kultivierten Zellen der steroidogenen, *Insl3*-negativen Nebennierenzelllinie Y1 waren ebenfalls drei Komplexe vorhanden. Die Komplexe C1 und C2 waren in allen beobachteten Bandshifts in Y1-Zellen stärker als in MA10-Zellen. Konkurrenz des Fragmentes B5/1 mit unmarkiertem Fragment B5/1 führte in

beiden Zelllinien zur völligen Aufhebung der Komplexe. Bei Konkurrenz mit den mutierten Oligonukleotiden B5/1m und B5/1m4 (Abb. 12) wurden die Shifts sichtbar schwächer, der Komplex C3 verschwand völlig (Abb. 14). Durch Zugabe der unmarkierten Fragmente B5/1m2 bzw. B5/1m3 zu Kernproteinextrakten aus Y1-Zellen wurden die Komplexe C1 und C2 abgeschwächt, der Komplex C3 verschwand völlig. Bei Inkubation mit Kernproteinextrakten aus MA10-Zellen blieb nur der Komplex C2 schwach erhalten, die Komplexe C1 und C3 verschwanden völlig.

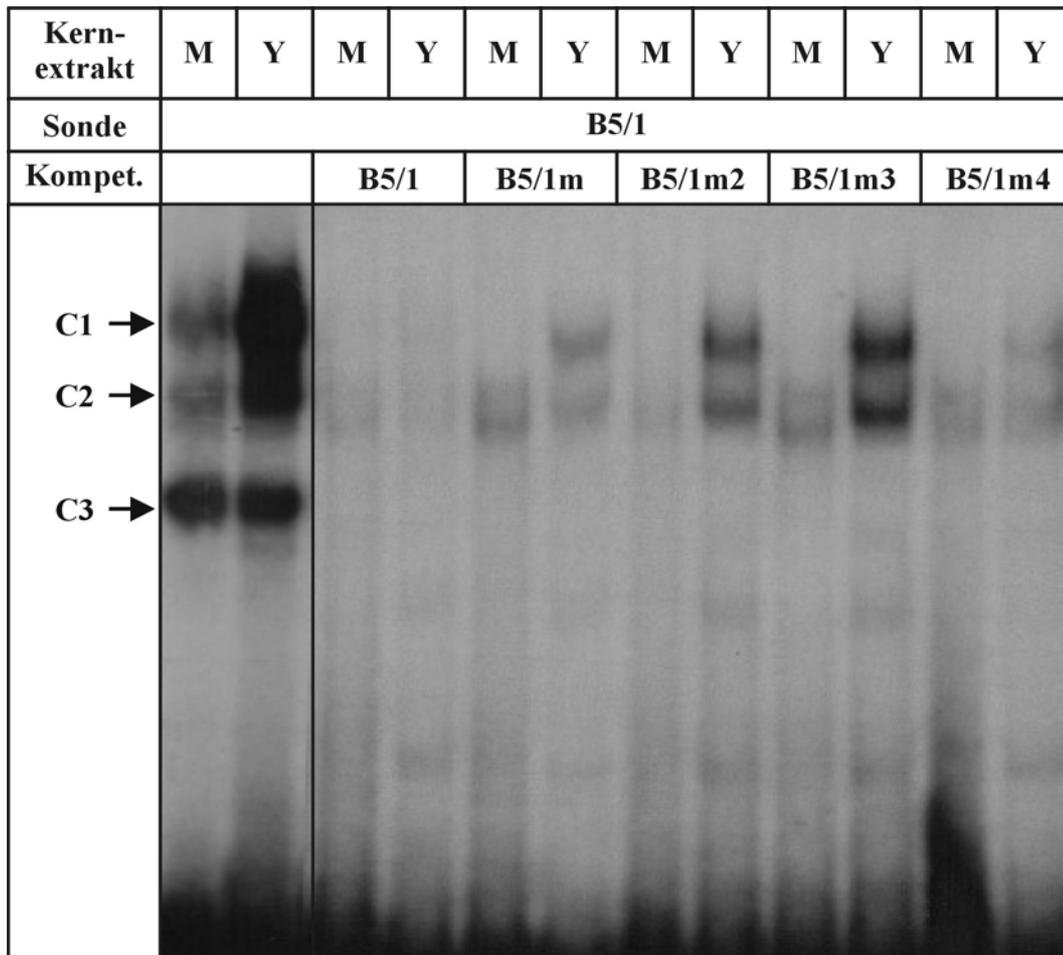


Abb. 14: Gel Retardation Assay mit den Fragmenten B5/1, B5/1m, B5/1m2, B5/1m3, B5/1m4

Das Fragment B5/1 bildete mit Kernproteinextrakten aus MA10-Zellen (M) drei Komplexe (C1, C2 und C3). Mit Kernproteinextrakten aus kultivierten Nebennierenzellen (Y) zeigen sich ebenfalls drei Komplexe. Die Komplexe des B5/1-Fragmentes konnten durch 100fachen Überschuß an nicht markiertem Fragment B5/1, B5/1m, B5/1m2, B5/1m3 und B5/1m4 aufgehoben bzw. unterschiedlich stark

abgeschwächt werden. In den Konkurrenzexperimenten wurde das unmarkierte Fragment in 100fachem Überschuß eingesetzt.

Um die Bedeutung der mutierten Basen in den Fragmenten B5/1m2 und B5/1m3 für die Komplexbildung genauer zu untersuchen, wurden diese Fragmente radioaktiv markiert und mit Kernproteinextrakten aus kultivierten MA10 bzw. Y1-Zellen inkubiert.

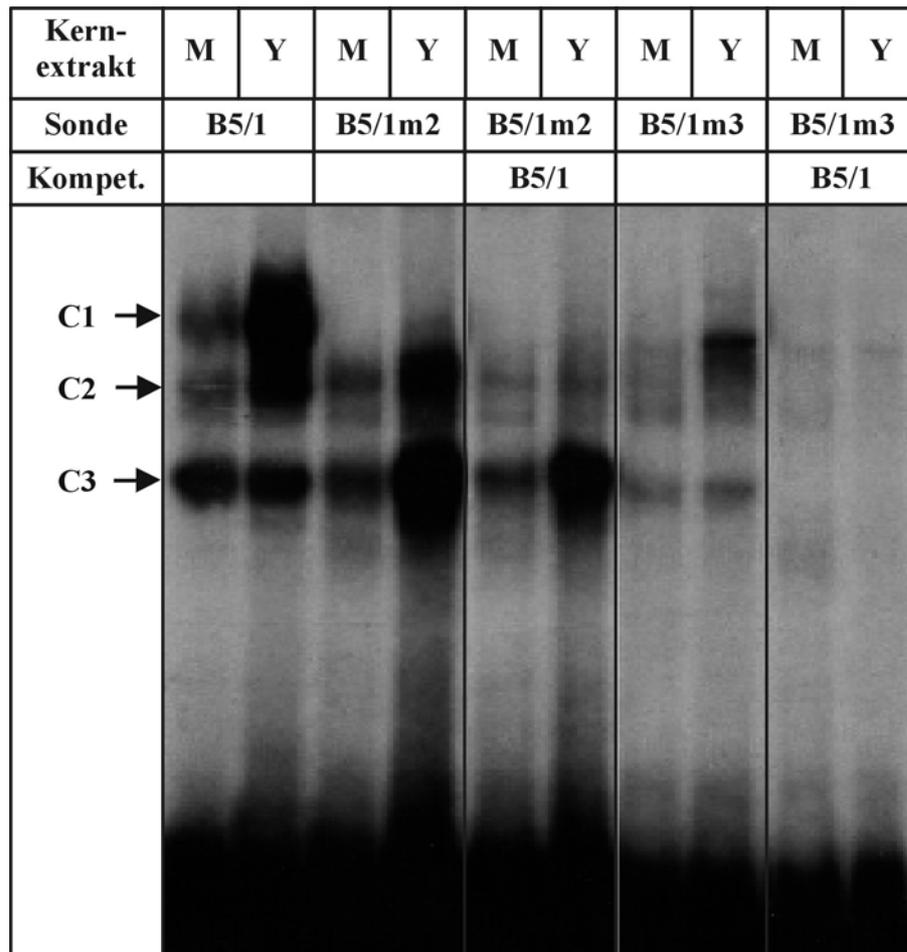


Abb. 15: Gel Retardation Assay mit den Fragmenten B5/1, B5/1m2 und B5/1m3

Das Fragment B5/1m2 zeigt im Gegensatz zum Fragment B5/1 nach Inkubation mit Kernproteinextrakten aus MA10-Zellen (M) und Y1-Zellen (Y) zwei Komplexe (C2 und C3). Durch Zugabe von unmarkiertem Fragment B5/1 schwächt sich der Komplex C2 in beiden Proteinextrakten ab. Das Fragment B5/1m3 zeigt nach Inkubation mit Kernproteinextrakt aus MA10-Zellen und Y1-Zellen ebenfalls zwei Komplexe, die sich durch Zugabe von unmarkiertem Fragment B5/1 auflösen. Für Konkurrenzexperimente wurde das unmarkierte Fragment in 100fachem Überschuß eingesetzt.

Mit dem radioaktiv markierten Fragment B5/1m2 nach Inkubation mit MA10 Kernproteinen wurde die Auflösung des Komplexes C1 beobachtet, während die Komplexe C1 und C2 unverändert blieben. Bei Inkubation mit Kernproteinen aus Y1-Zellen löste sich der Komplex C1 ebenfalls vollständig auf, während sich der Komplex C3 im gleichen Maße verstärkte. Durch Zugabe von unmarkiertem Fragment B5/1 in 100fachem Überschuß schwächte sich in beiden Zellextrakten der Komplex C2 ab, der Komplex C1 löste sich auf und die Intensität des Komplexes C3 blieb unverändert.

Mit dem radioaktiv markierten Fragment B5/1m3 nach Inkubation mit MA10 und Y1 Kernproteinenextrakten wurden die Komplexe C2 und C3 schwächer, der Komplex C1 löste sich auf. Durch Zugabe des unmarkierten Fragments B5/1 lösten sich alle Komplexe auf.

Damit wurde die Bindungsspezifität der M2 bindenden Proteine an das Fragment B5/1 nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass die in den Fragmenten B5/1m2 und B5/1m3 mutierten Basen (Abb. 12) an der Bildung der DNA/Protein-Komplexe beteiligt sind.

3.2.3 Datenbankanalyse des Sequenzelements M2

Zur Identifizierung von transagierenden Faktoren, die an die M2-Box binden, wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt (Abb. 16). Dabei zeigte sich, zusätzlich zu den bereits analysierten Transkriptionsfaktoren HNF-4 und CoupTF (Thamm 1998), eine 100%ige Homologie zur Konsensusbindungssequenz von Transskriptionsfaktoren der *Myb*-Genfamilie.

5` - TCG AGC **CTC GAC CTT** TGG GTG CTG - 3` ***Ins13 Promotor***

Abb. 16: Die fettgedruckten Basen markieren die Sequenz der konservierten Box M2. Die Konsensusbindungssequenz der *Myb*-Genfamilie ist unterstrichen.

3.2.4 Untersuchung des Sequenzelements M2 auf Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren

Um festzustellen, ob die Transkriptionsfaktoren der *Myb*-Genfamilie für die Bindung an den *Insl3* Promotor in Frage kommen, wurde Gesamt-RNA aus MA10- und Y1-Zelllinien mit cDNA-Sonden von *a-Myb*, *b-Myb* (Abb. 17) und *c-Myb* (nicht gezeigt) hybridisiert. Die Exposition des Autoradiogramms zeigt, dass *b-Myb* (Abb. 17) und *c-Myb* (nicht gezeigt) im Gegensatz zu *a-Myb* in kultivierten MA10-Zellen exprimiert werden. Alle drei untersuchten Gene werden in steroidogenen, *Insl3*-negativen Y1-Zellen exprimiert.

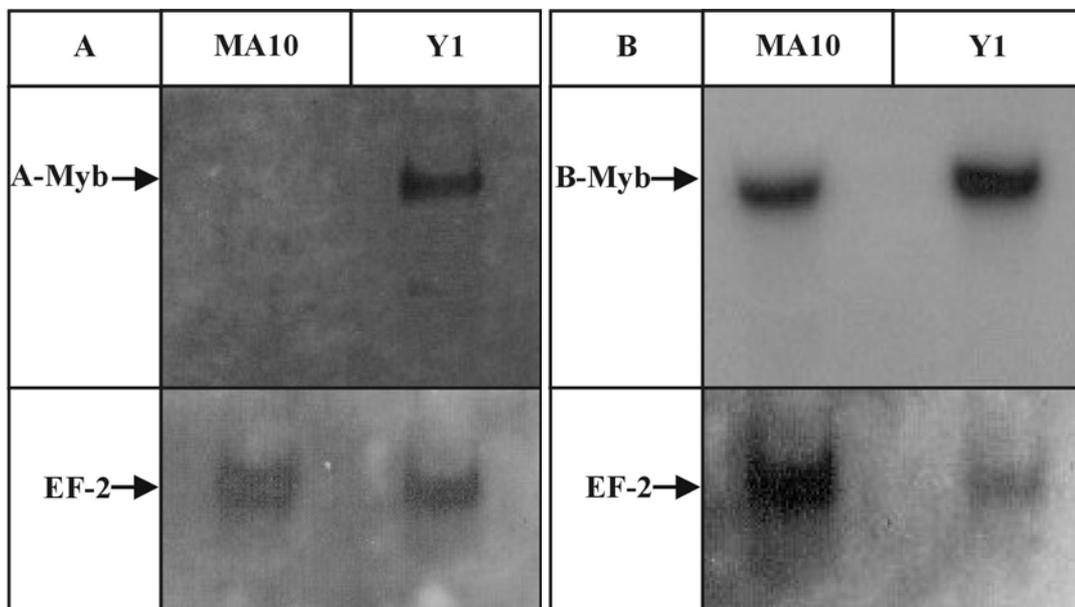


Abb. 17: Northern-Blot-Analyse der Expression des *a-Myb* und *b-Myb* Gens der Maus in kultivierten MA10- bzw. Y1-Zellen

Gesamt-RNA (je 20µg) aus kultivierten MA10- und Y1-Zellen wurde mit der cDNA-Sonde für *a-Myb* und *b-Myb* hybridisiert. Die Kontrolle der Integrität der verwendeten RNAs erfolgte durch Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA-Sonde für den humanen Elongations-Faktor-2 (EF-2).

Um zu testen, ob die in den Leydigzellen translatierten Proteine b-Myb und c-Myb an die M2-Box des Promotors des *Insl3* Gens binden, wurden Kernproteinextrakte aus kultivierten MA10- und Y1-Zellen mit dem anti-b-Myb- bzw. dem anti-c-Myb-

Antikörper und anschließend mit ($\alpha^{32}\text{P}$) dCTP-markiertem M2/1-Fragment inkubiert. Im Parallellexperiment wurden die Kernproteinextrakte zunächst mit dem radioaktiv markierten M2/1-Fragment und anschließend mit den Antikörpern inkubiert (Supershift). Jedoch konnten weder durch Prä-Inkubation mit den Antikörpern noch durch „Supershift“-Inkubation die gebildeten Komplexe in ihrer Stärke verändert, aufgelöst bzw. verschoben werden (nicht gezeigt).

Damit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Transkriptionsfaktoren a-Myb, b-Myb und c-Myb nicht als transagierende Proteine mit der M2-Box in Frage kommen.

3.2.5 Untersuchungen zur Bedeutung des M2 Sequenzelements für die Transaktivierung des *Ins13* Promotors

Durch Untersuchung der 5'-flankierenden Region des *Ins13*-Gens der Maus sollte die Bedeutung des M2 Sequenzelements für die Expression des *Ins13* Gens bestimmt werden. Es wurden Transfektionsexperimente mit MA10-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden 2 unterschiedlich lange Fragmente (160 Bp und 700 Bp) der 5'-flankierenden Region des *Ins13*-Gens in den Vektor pGL3-basic vor das rekombinante Gen für das Enzym Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1987) kloniert.

3.2.5.1 Klonierung von „Luciferase“-Konstrukten unter der Kontrolle des *Ins13* Promotors

Ausgangspunkt der Erstellung der *Ins13/Luciferase*-Konstrukte bildete einerseits der 3,2 Kb große genomische Klon pBam-1, der die 5'-flankierende Region vor dem Transkriptionsstartpunkt sowie Exon 1 und partiell Exon 2 des *Ins13* Gens der Maus umfaßt, und andererseits die Vektoren pCAT 0,16 und pCAT 0,16 Δ M2, die 160 Bp der 5'-flankierenden Regionen umfassen. Unter Verwendung der Primer Lyk10 und Lyk11 wurde durch PCR an pCAT 0,16 bzw. pCAT 0,16 Δ M2 ein 160 Bp großes Fragment amplifiziert. Der Primer Lyk10 enthält eine HindIII-Schnittstelle, der Primer Lyk11 enthält eine NheI-Schnittstelle am 5'-Ende. Die PCR-Amplifikate wurden aus dem Gel

isoliert, mit den Restriktionsenzymen HindIII und NheI doppelt geschnitten und das restriktionsenzymatisch gespaltene PCR-Produkt isoliert. Diese PCR-Fragmente wurden in den pGL3-Vektor kloniert und anschließend zur Kontrolle sequenziert. Die erhaltenen Produkte wurden als pGL3 0,16 (Abb. 18A) und pGL3 0,16 Δ M2 (Abb. 18B) bezeichnet.

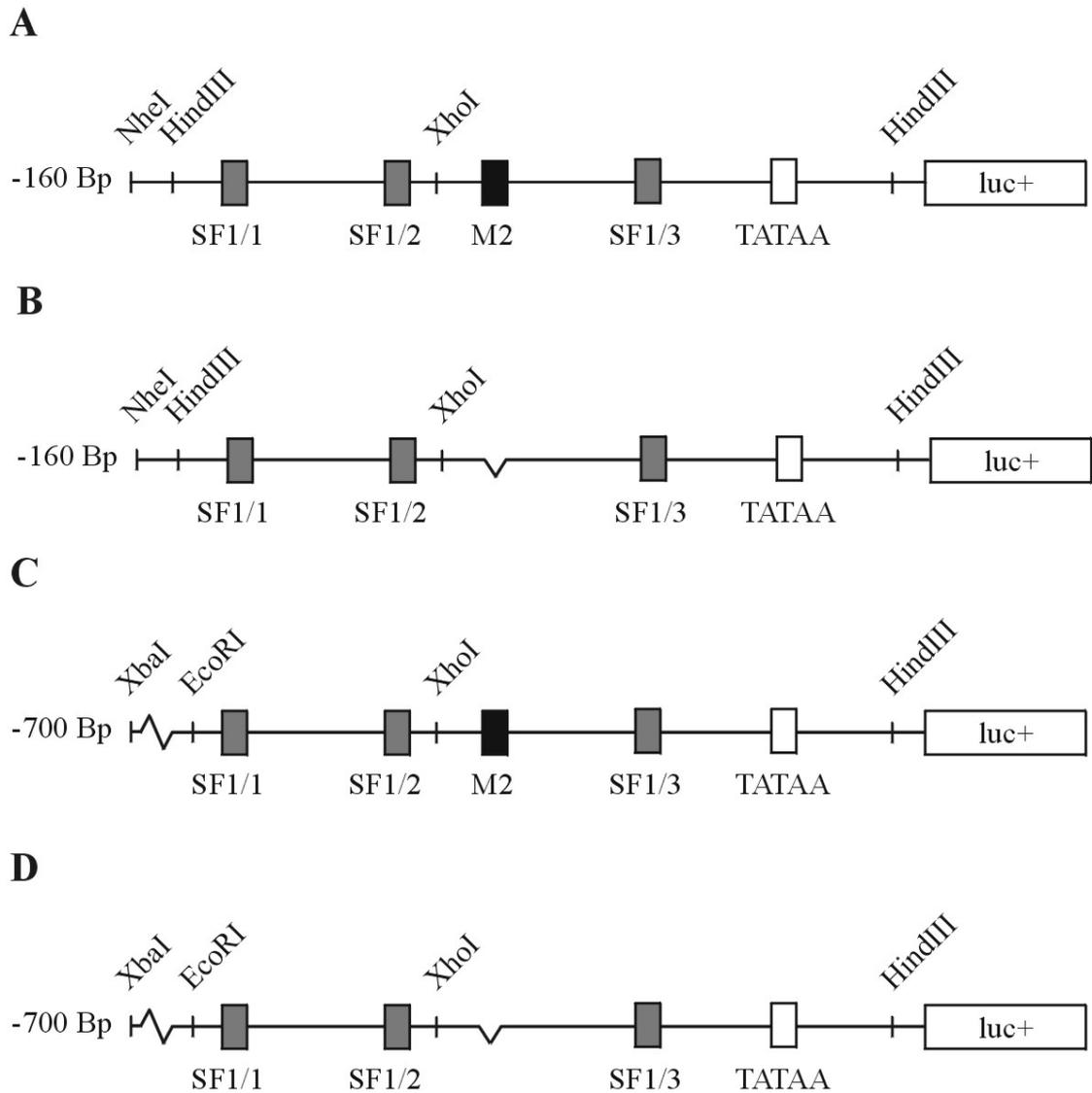


Abb. 18: Darstellung der *Ins13*/Luciferase-Konstrukte

Das Konstrukt pGL3 0,16 (A) enthält 160 Bp des nativen *Ins13* Promotors. Im Konstrukt pGL3 0,16 Δ M2 (B) wurde das M2 Element durch eine gleichlange „Nonsense“-Sequenz ersetzt. Die Konstrukte pGL3 0,7 (C) und pGL3 0,7 Δ M2 (D) enthalten 700 Bp des nativen *Ins13* Promotors, das M2 Element wurde im

Falle von pGL3 0,7 Δ M2 (**D**) wieder ersetzt. Die Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SF-1 sind grau unterlegt (SF-1/1, SF-1/2 und SF-1/3). Zur Vereinfachung sind nur die Restriktionsschnittstellen dargestellt, die im nativen Promotor vorkommen bzw. während des Klonierungsprozesses relevant sind (XbaI, EcoRI, XhoI und HindIII). Am 3'-Ende ist das Gen für Luciferase dargestellt (luc+). Die TATAA-Box ist weiß dargestellt.

Zur Herstellung eines Fragmentes, das 700 Bp der 5'-flankierenden Region erhält, wurde zunächst der genomische Klon pBamI mit EcoRI und XhoI doppelt restriktionsenzymatisch gespalten, aus dem Gel isoliert und in den Vektor pBlueScript II SK +/- subkloniert. Der so entstandene Vektor wurde in DH5 α -Zellen amplifiziert, sequenziert und anschließend mit XhoI und XbaI doppelt restriktionsenzymatisch gespalten. Das entstandene 700 Bp Fragment wurde aus dem Gel isoliert, in die Vektoren pGL3 0,16 bzw. pGL3 0,16 Δ M2 kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Die erhaltenen Produkte wurden als pGL3 0,7 (Abb. 18C) und pGL3 0,7 Δ M2 (Abb. 18D) bezeichnet.

3.2.5.2 Zur Bedeutung des M2 Sequenzelements für die Transaktivierung von *Ins13* durch Bestimmung der „Luciferase“-Aktivität

Zur Feststellung der Bedeutung des M2 Sequenzelements für die Transaktivierung des *Ins13* Promotors wurden MA10-Zellen mit den Transaktivatoronstrukten (Abb. 18A-D) transient transfiziert und das Aktivierungspotential der darin klonierten Promotorfragmente über die Messung der relativen Luciferaseaktivität bestimmt. Es wurden für jedes Experiment Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur statistischen Absicherung wurden die Experimente jeweils 5 mal wiederholt. Die Normalisierung der Luciferaseexpression erfolgte über die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität (β -Gal) des cotransfizierten Vektors pCMV- β Gal. Eine Normalisierung erfolgte, indem der zu interpretierende Luciferasewert durch den zugehörigen β -Gal-Wert, welcher auf konstanter Expression beruht, dividiert wurde. Zum Vergleich der durch die verschiedenen Konstrukte hervorgerufenen Aktivierungen wurden die nach der Induktion gemessenen, normalisierten Werte der immer mitgeführten Transfektion des Vektors pGL3 0,16 (Abb. 18A) als 100 % gesetzt. Es wurde von Schwärzler (1997)

gezeigt, dass die in diesem Konstrukt enthaltene 160 Bp 5'-flankierende Region des *Ins13* Gens alle wesentlichen regulatorischen Elemente (*cis*-ständige Elemente) enthält und für die Transaktivierung von Reportergenen in Leydigzellen ausreichend ist. Alle anderen erhaltenen Werte wurden auf diese Aktivität bezogen. Eine deutliche Reduktion der Transaktivierung (auf 30%) konnte beobachtet werden, wenn im transfektierten Konstrukt (Abb. 18B) das Sequenzelement M2 durch eine „Nonsense“- Sequenz ausgetauscht wurde (Abb. 19). Nach Transfektion mit den Konstrukten pGL3 0,7 (Abb. 18C) und pGL3 0,7 Δ M2 (Abb. 18D) wurde eine Verdopplung der relativen Luciferaseaktivität beobachtet (Abb. 19). Der Austausch des Sequenzelements M2 im Konstrukt pGL3 0,7 Δ M2 durch eine „Nonsense“-Sequenz führte nicht zu einer Änderung der Luciferaseaktivität. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass an das Sequenzelement M2 ein putatives Repressorprotein bindet. Außerdem zeigten sie im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schwärzler (1997), dass in der 700 Bp 5'-flankierenden Region zusätzliche regulatorische Elemente vorhanden sind, die das *Ins13* Gen transaktivieren.

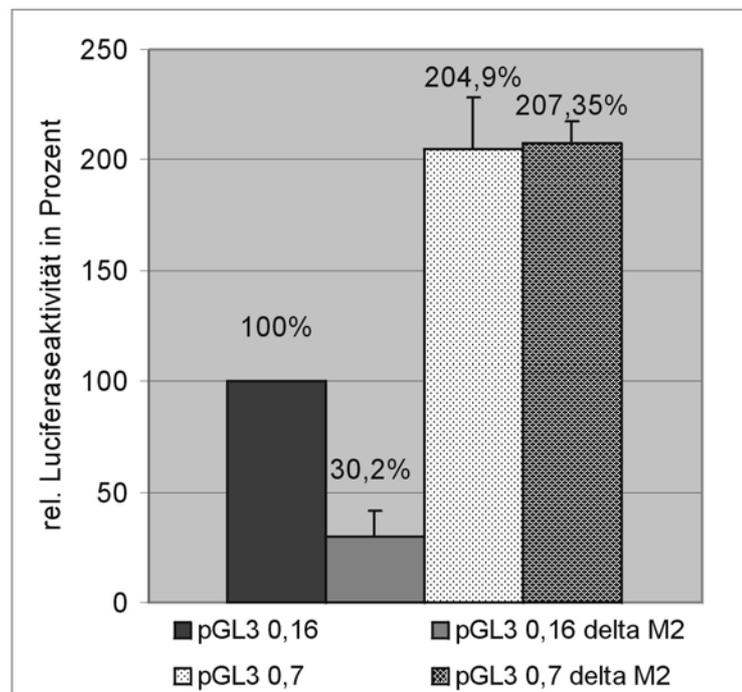


Abb. 19: Darstellung der Luciferaseaktivität in MA10 Zellen durch verschiedene *Ins13*/ Luciferase-Konstrukte

Darstellung der Luciferaseaktivität in MA10-Leydig-Zellen nach transienter Transfektion mit pGL3 0,16 (Abb. 18A), pGL3 0,16 Δ M2 (Abb. 18B), pGL3 0,7 (Abb. 18C) und pGL3 0,7 Δ M2 (Abb. 18D). Die gemessene Luciferaseaktivität wurde jeweils über die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität (Kotransfektion von pCMV β -Gal) normalisiert.

3.2.6 Untersuchungen zur SF-1-abhängigen Transaktivierung von *Insl3*

Durch Untersuchung der 5'-flankierenden Region des *Insl3* Gens der Maus in den steroidogenen Zelllinien MA10 und Y1 sollte der Einfluß des M2 Sequenzelements auf die SF-1 abhängige Transaktivierung von *Insl3* untersucht werden. Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Zelllinien MA10 und Y1 exprimieren beide den für die Transaktivierung von *Insl3* notwendigen Transkriptionsfaktor SF-1 (steroidogenic factor-1). Im Gegensatz zur Leydig-Zelllinie MA10 wird *Insl3* jedoch in der Nebennieren-Zelllinie Y1 trotz Vorhandensein von SF-1 nicht exprimiert. Um den Einfluß des M2-Sequenzelementes auf die Transaktivierung von *Insl3* in der Zelllinie Y1 zu untersuchen, wurden die im Kapitel 3.2.5.1 beschriebenen Luciferasekonstrukte transient transfiziert. Um die Expression von SF-1 sicherzustellen bzw. den Einfluss einer Überexpression von SF-1 auf die Transaktivierung von *Insl3* zu untersuchen, wurde in einigen Experimenten der Expressionsvektor pCMV-SF-1 cotransfiziert.

3.2.6.1 Untersuchung der SF-1-abhängigen Transaktivierung durch Bestimmung der „Luciferase“-Aktivität in steroidogenen Zelllinien

Es wurden für jedes Transfektionsexperiment Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Normalisierung der Luciferaseexpression erfolgte wieder über die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität (β -Gal) des cotransfizierten Vektors pCMV- β -Gal. Zum Vergleich der durch die verschiedenen Konstrukte hervorgerufenen Aktivierungen wurden die nach der Induktion gemessenen normalisierten Werte der immer mitgeführten Transfektion von MA10-Zellen mit dem Konstrukt pGL3 0,16 (Abb. 18A) als 100 % festgesetzt. Wurde zusätzlich dazu der Expressionsvektor pCMV-SF-1 cotransfiziert, konnte eine Reduktion der Transaktivierung auf ca. 50% beobachtet

werden (Abb. 20). Eine Transfektion von Y1-Zellen mit den Konstrukten pGL3 0,16 (Abb. 18A) und pGL3 0,16 Δ M2 (Abb. 18B) führte zu einer drastischen Reduktion auf 28% (pGL3 0,16) bzw. 26% (pGL3 0,16 Δ M2). Die Transfektion von Y1-Zellen mit den Konstrukten pGL3 0,7 (Abb. 18C) und pGL3 0,7 Δ M2 (Abb. 18D) führte ebenfalls zu einer drastischen Abnahme der Transaktivierung des Reportergens auf ca. 8% (pGL3 0,7) bzw. 12% (pGL3 0,7 Δ M2). Diese Reduktion konnte auch durch die Überexpression von SF-1 nach Kotransfektion der Zellen mit dem Expressionsvektor pCMV-SF-1 nicht aufgehoben werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von SF-1 in MA10-Zellen zu einer Reduktion der Reporteraktivität führt und dass die Luciferaseaktivität in Y1-Zellen signifikant reduziert ist.

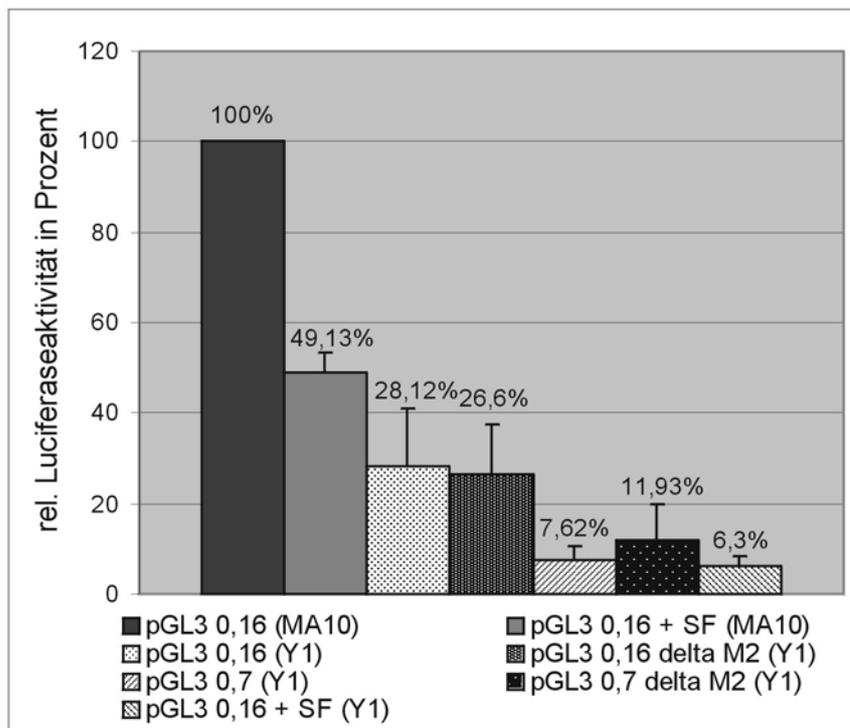


Abb. 20: Darstellung der Luciferaseaktivität in MA10- bzw. Y1-Zellen durch verschiedene *Insl3*/Luciferase-Konstrukte

Darstellung der Luciferaseaktivität in den Leydigzellen (MA10) und in den Nebennierenzellen (Y1) nach transienter Transfektion mit den Konstrukten pGL3 0,16 (Abb. 18A), pGL3 0,16 Δ M2 (Abb. 18B), pGL3 0,7 (Abb. 18C) und pGL3 0,7 Δ M2 (Abb. 18D), sowie nach Kotransfektion mit pCMV-SF-1. Die

gemessene Luciferaseaktivität wurde jeweils über die Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität (Kotransfektion von pCMV β -Gal) normalisiert.

3.3 Untersuchungen zur Charakterisierung des *Insl3*-Promotors *in vivo*

3.3.1 Generierung und Verifizierung der *Insl3/CAT*-Konstrukte

Ausgangspunkt der hergestellten *Insl3/CAT* Konstrukte (Schwärzler, 1997), die für die Erzeugung transgener Mäuse verwendet wurden (Abb. 21B), war der 3,2 Kb große, genomische Klon pBam-1, der 2 Kb der 5'-nichttranslatierten Region und Exon 1 und Exon 2 des *Insl3*-Gens der Maus umfaßt (Abb. 21A). Durch PCR am pBam-1 Klon wurden ein 160 Bp bzw. 700 Bp großes Fragment amplifiziert und über primergenerierte Restriktionsschnittstellen in den Vektor pCAT-basic kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Diese Deletionsklone (Abb. 21B) wurden zur Erzeugung transgener Mäuse linearisiert und in den paternalen Vorkern befruchteter Oocyten microinjiziert.

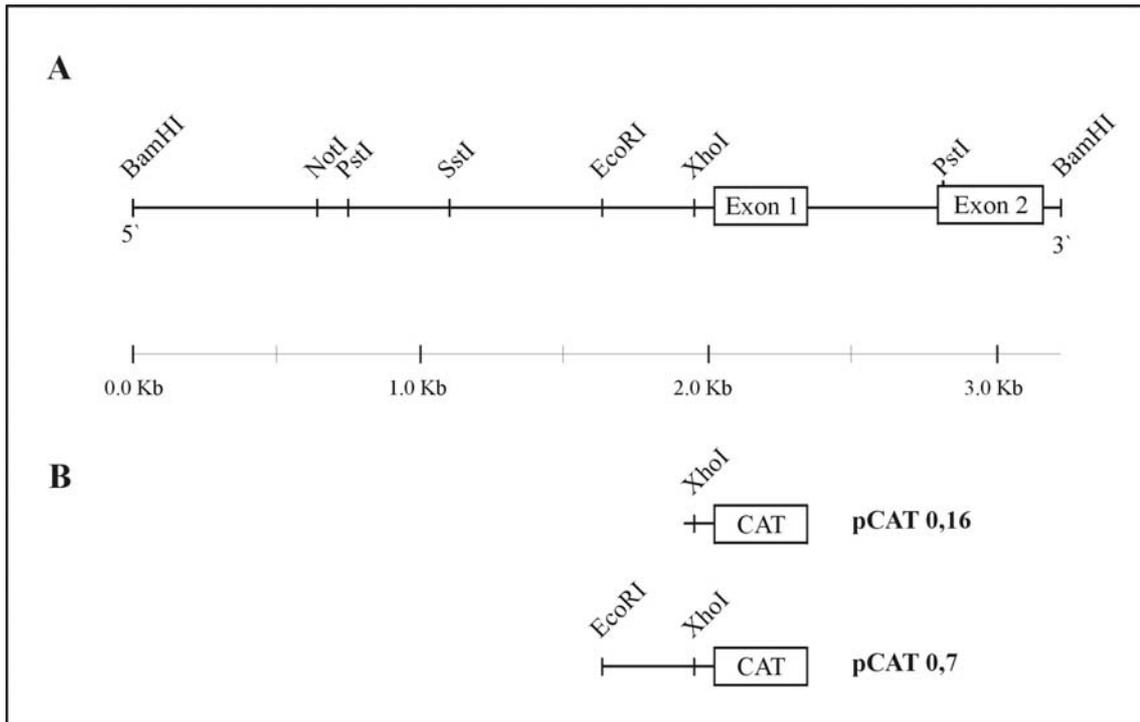


Abb. 21: Darstellung der *Ins13/CAT*-Konstrukte zur Herstellung von transgenen Mäusen

Restriktionskarte des nativen 5'-flankierenden Bereichs des *Ins13* Gens der Maus mit den für die Herstellung der Konstrukte verwendeten Restriktionsschnittstellen und den Exons 1 und 2 des *Ins13*-Gens (A). Die zur Herstellung der transgenen Mauslinien verwendeten Konstrukte sind nach der Länge des klonierten 5'-flankierenden Bereichs benannt (B). Zur Vereinfachung sind nur die Restriktionsschnittstellen dargestellt, die im nativen Promotor vorkommen bzw. während des Klonierungsprozesses relevant sind (BamHI, NotI, PstI, SstI, EcoRI und XhoI). Am 3'-Ende der Reportergenkonstrukte ist das Gen für Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) dargestellt.

3.3.2 Erzeugung transgener Mäuse

Durch Erzeugung von transgenen Mauslinien sollte der *in vitro* (Zellkulturexperimente) ermittelte Promotorbereich, der für die spezifische Expression des *Ins13* Gens verantwortlich ist (Zimmermann et al., 1998), *in vivo* bestätigt werden. Hierzu wurden zwei unterschiedlich lange Fragmente der 5'-flankierenden Region des *Ins13* Gens in den Vektor pCAT-basic vor das Gen der bakteriellen Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) kloniert (Abb. 21) und zur Herstellung von transgenen Mäuse in befruchtete Oozyten mikrokoinjiziert. Nach der Mikroinjektion der linearisierten DNA in den

paternalen Vorkern und Retransfer in scheinsschwangere Mäuse (Stamm FVB) wurden 9 transgene Mäuse (Founder) erzeugt, von denen 6 das transgene Allel transmittierten. Mauslinien mit 700 Bp 5'-flankierender Region wurden mit Bö1, Bö2, Bö3, usw. bezeichnet, Mauslinien, die ein transgenes Allel mit 160 Bp 5'-flankierender Region enthielten, wurden mit Th1, Th2, Th3 usw. bezeichnet.

3.3.3 Untersuchung der Expressionsmuster der transgenen Allele mittels Northern-Blot-Analyse

Durch Northern-Blot-Hybridisierungsexperimente sollten diejenigen Mauslinien, die das transgene Allel transmittieren, auf deren gewebespezifische Transkription untersucht werden.

Dazu wurden stets gleiche Mengen an RNA (20 µg) aus Testis und anderen somatischen Geweben auf ein nicht-denaturierendes Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNAs wurden mit der cDNA-Sonde für CAT hybridisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Mauslinien (Bö1, Bö6 und Bö7) mit 700 Bp 5'-flankierender Region des *Ins13* Gens im Konstrukt (Abb. 21B) das Reportergen testisprominent exprimieren (Abb. 22), während die Mauslinien (Th3, Th4 und Th5) mit 160 Bp 5'-flankierender Region des *Ins13* Gens im Konstrukt (Abb. 21B) keine Expression zeigen (nicht gezeigt). Um eine pränatale Expression der Mauslinien TH4 und Th5 zu untersuchen, wurde RNA aus genotypisierten 17,5 bzw. 18,5 Tage alten Embryonen präpariert und im Northern-Blot mit der cDNA-Sonde für CAT hybridisiert. Es konnte jedoch in dem untersuchten pränatalen Zeitraum keine Expression des CAT Reportergens festgestellt werden.

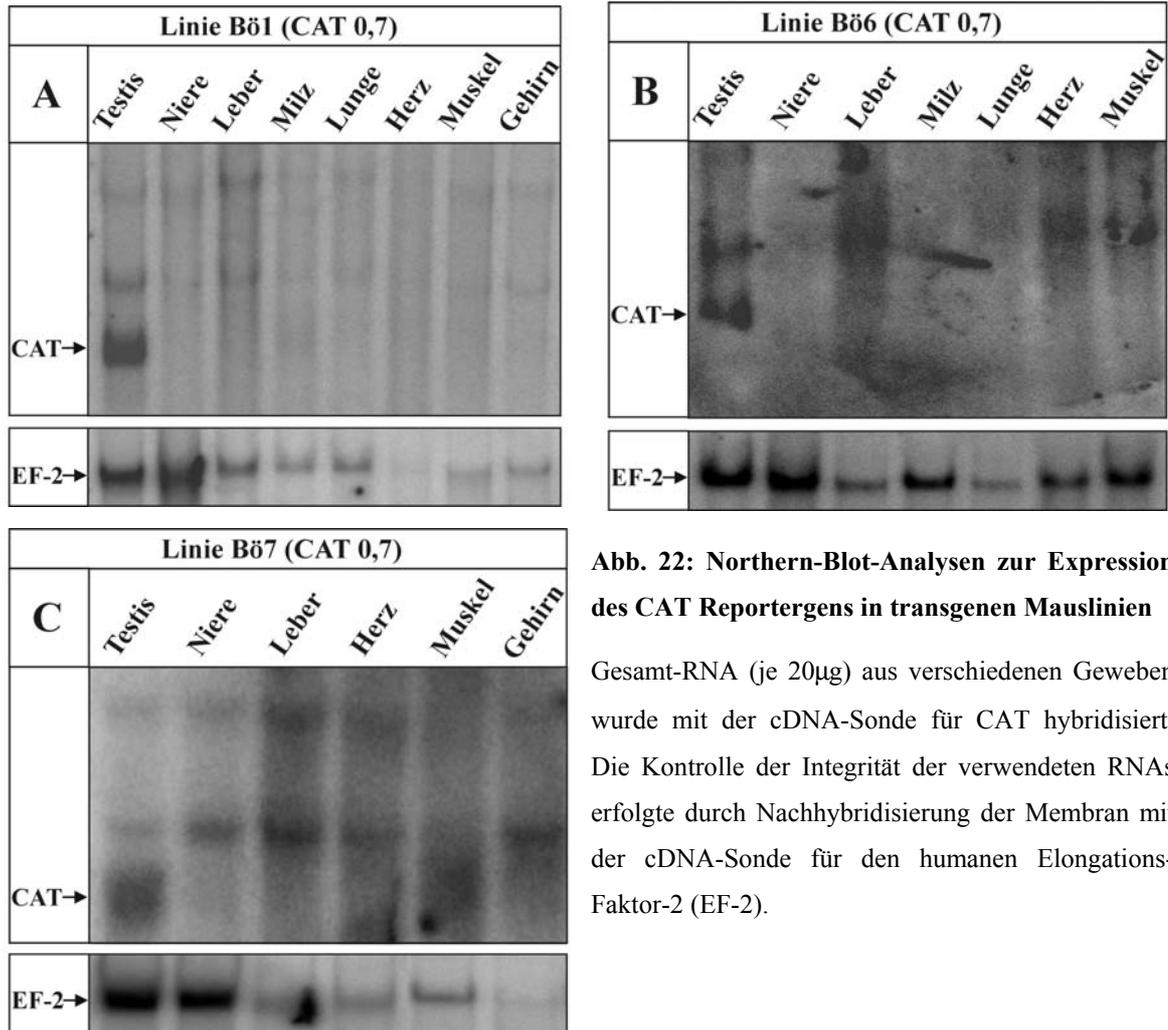


Abb. 22: Northern-Blot-Analysen zur Expression des CAT Reportergens in transgenen Mauslinien

Gesamt-RNA (je 20 μ g) aus verschiedenen Geweben wurde mit der cDNA-Sonde für CAT hybridisiert. Die Kontrolle der Integrität der verwendeten RNAs erfolgte durch Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA-Sonde für den humanen Elongationsfaktor-2 (EF-2).

3.3.4 Statistische Analyse der Wurfgrößen und Genotypen

Um den Einfluß des transgenen Allels auf die Embryonalentwicklung der Maus zu untersuchen, wurden eine statistische Analyse der Wurfgrößen vorgenommen und eine Genotypisierung der Nachkommen durchgeführt.

In der F1- bzw. der F2-Generation unterschied sich die Zahl der Nachkommen dabei nicht vom Erwartungswert (Abb. 23).

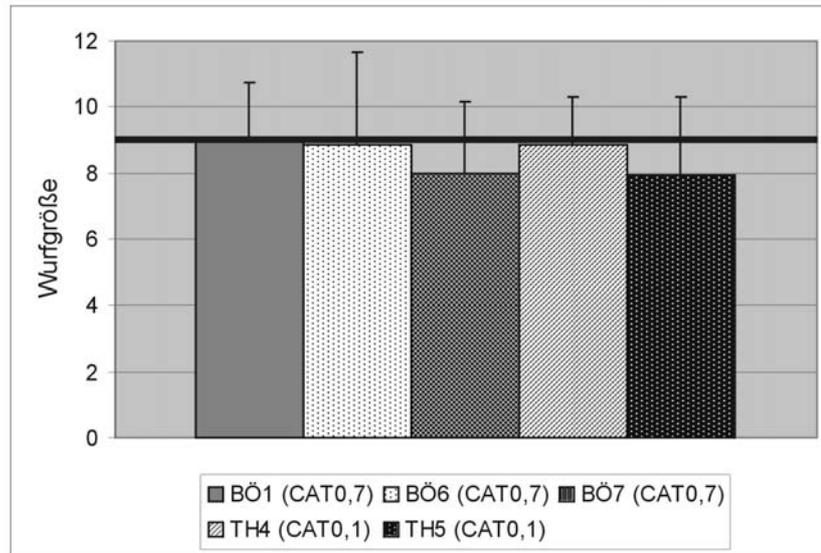


Abb. 23: Darstellung der gemittelten Wurfgrößen der transgenen Mauslinien

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wurfgrößen der transgenen Mauslinien BÖ1, BÖ6, BÖ7 (CAT0,7) und Th4, Th5 (CAT0,1). Die horizontale Linie kennzeichnet die bekannte durchschnittliche Nachkommenzahl im Mausstamm FVB.

Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte über eine Dot-Blot Analyse oder durch eine standardisierte PCR an genomischer DNA. Dabei wurde unter Verwendung der Primer CAT forward (2.8.2) und CAT revers (2.8.2) ein 276 Bp Fragment aus dem Exon 1 des CAT-Gens amplifiziert. Da eine Unterscheidung homozygoter von heterozygoten Mäusen über PCR-Techniken nur schwer möglich ist, wurden PCR-getestete Tiere der F2-Generation mit Wildtypmäusen rückgekreuzt. Sind die Nachkommen der Rückkreuzung alle heterozygot, ist das Elterntier homozygot. Sind nur 50% der Nachkommen heterozygot, ist das Elterntier heterozygot für das transgene Allel. Um die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Genotypisierungen zu minimieren, wurden je 6 weibliche und 6 männliche Tiere verpaart. Die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Genotypen ist in der Formel 3.9 angegeben.

$$P(\gamma) = \left[\frac{2}{3} \right]^{12} = 6,83 \cdot 10^{-3} \% \quad (\gamma = \text{falsch-positiver Genotyp}) \quad (3.8)$$

Damit konnten für die Mauslinien Th4 und Th5 (beide CAT0,1) homozygote Tiere nachgewiesen und eine Zucht etabliert werden. Die Rückkreuzungsexperimente mit den Mauslinien Bö1 und Bö6 (beide CAT0,7) führten nicht zur Identifikation von homozygoten Tieren.

Die Tabelle 3.4 zeigt die quantitative Verteilung von Wildtyp- und PCR-positiven FVB-Mäusen nach der Genotypisierung. Bei den Mauslinien Th4 und Th5 betrug der Anteil der homozygot/heterozygoten Tiere aus 5 (Th5:12) Würfen der F1-Generation 28 (Th5: 67), und zwar bei einer Gesamtzahl von 43 (Th5: 104) Tieren. Dies entspricht in etwa den nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen zu erwartenden 66% . Bei den Mauslinien Bö1 und Bö6 betrug der Anteil der heterozygoten Tiere aus 31 (Bö6: 5) Würfen der F1-Generation 124 (Bö6: 11), bei einer Gesamtzahl von 284 (Bö6: 39) Tieren. Dieser Befund entspricht nicht den nach den Mendelschen Vererbungsgesetzen erwarteten 66%. Da in den Rückkreuzungen keine homozygoten Tiere identifiziert werden konnten, wird davon ausgegangen, dass es sich bei den positiv getesteten Tieren sämtlich um heterozygote Tiere gehandelt hat. Die prozentuale Verteilung der Genotypen ist in Tabelle 3.4 wiedergegeben.

Tabelle 3.4: Quantitative Verteilung von Wildtyp- und PCR-positiven FVB-Mäusen in der F2-Generation. Homo- und heterozygote Tiere sind bei der Genotypisierung mit Hilfe der PCR nicht zu unterscheiden, daher wird angegeben, ob im Rückkreuzungsexperiment homozygote Tiere identifiziert werden konnten.

Linie	Generation	Anzahl der Würfe	Gesamtzahl der Tiere	homozygote Tiere (+/+)	heterozygot/homozygot (+/-) / (+/+)	Wildtyp (-/-)
Th4	F2	5	43	ja	28 (68,3%)	15 (36,7%)
Th5	F2	12	104	ja	67 (64,4%)	37 (35,6%)
Bö1	F2	31	284	nein	124 (43,6%)	160 (56,4%)
Bö6	F2	5	39	nein	11 (28,2%)	28 (71,8%)

Dies lässt darauf schließen, dass homozygote Nachkommen der Mauslinien (Bö1 und Bö6) lethal sind.

3.4 Isolierung und Charakterisierung eines cDNA-Fragmentes, das für das M2 transagierende Protein codiert

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Thamm, 1998) wurde mit Hilfe des One-Hybrid Systems ein cDNA-Fragment isoliert, das für das M2 transagierende Protein in Frage kommt. Die Sequenzierung des Fragments und eine Datenbankrecherche ergaben, dass es sich dabei um ein 972 Bp großes cDNA-Fragment aus dem *Hsp110*-verwandten, testisprominent exprimierten Gen *Apg-1* handelt. Das One-Hybrid System dient dazu cDNA-Fragmente zu isolieren, deren Proteine an *cis*-agierende, regulatorische DNA-Sequenzen binden. Außerdem kann es dazu verwendet werden, die DNA-Bindungsdomäne in transagierenden Proteinen zu identifizieren. Das One-Hybrid

System geht davon aus, dass eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus physikalisch und funktionell unterschiedlichen DNA-Bindungsdomänen und Aktivierungsdomänen (AD) bestehen. Die Methode erlaubt es, Fusionsproteine in Hefestämmen zu exprimieren, die gleichzeitig an ihre Zielsequenz binden und die Transkription der Reportergene aktivieren.

3.4.1 Untersuchung der Bindungsspezifität eines Apg-1-Fusionsproteins aus dem One-Hybrid System mittels Gel Retardation Assay

Zur Analyse der Bindungsspezifität des Fusionsproteins wurden Kernproteinextraktionen aus den rekombinanten Hefestämmen K2 und K3, eines anderen rekombinanten Hefestammes und des Kontrollstammes YM4271 durchgeführt, mit dem Fragment M2/1 und zur Kontrolle mit dem Fragment B4/2 inkubiert und in einer Gel Retentionsanalyse gelelektrophoretisch analysiert. Das Fragment M2/1 ist ein Oligonukleotid, das im Gegensatz zum Fragment B4/2 das M2-*cis* agierende Element des *Ins13* Promotors in 3facher Kopie enthält. Inkubationen von Kernproteinextrakten mit dem Fragment B4/2 ergaben ebenso wie Inkubationen mit Kernproteinextrakten aus nicht rekombinierter Hefe keine Komplexe. Nur Kernproteinextrakte aus den rekombinanten Hefen K2 und K3 ergaben DNA/Protein-Komplexe Abb. 24.

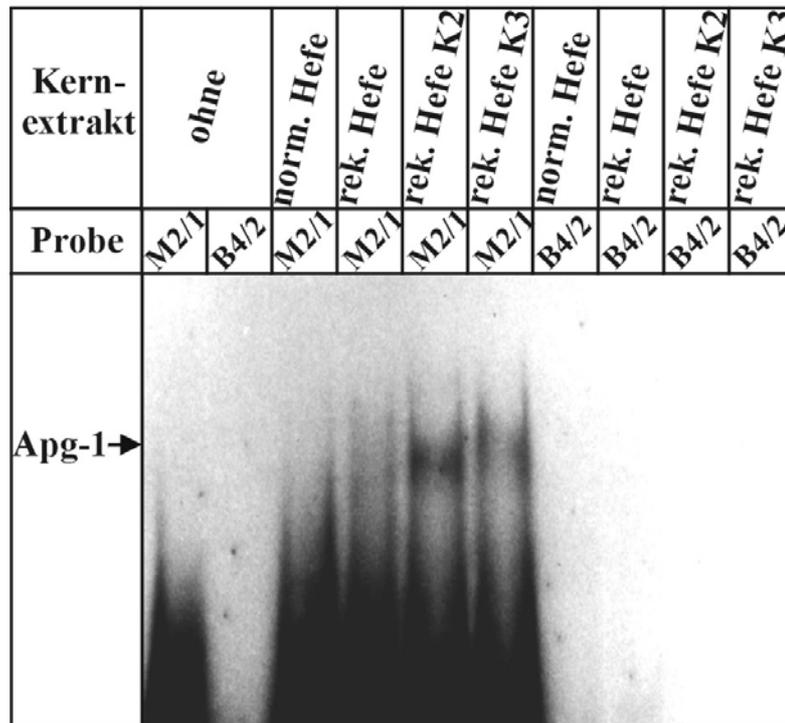


Abb. 24: Gel Retardation Assay mit den Fragmenten M2/1 und B4/2

Das Fragment M2/1 zeigt nach Inkubation mit Kernproteinextrakten aus beiden rekombinanten Klonen K2 und K3 einen schwachen Komplex. Nach Inkubation mit Kernproteinextrakten aus Kontrollstämmen konnten keine Bindungskomplexe identifiziert werden. Das Kontrollfragment B4/2 zeigt nach Inkubation mit Kernproteinextrakten ebenfalls keine DNA/Protein-Komplexe.

Die gebildeten Komplexe liefern einen Hinweis darauf, dass die Bindung des klonierten Fusionsproteins an das Fragment M2/1 spezifisch ist. Der gebildete Komplex ist schwach, weil die aus den rekombinanten Hefekolonien gewonnenen Kernproteinextrakte niedrig konzentriert waren.

3.4.2 Klonierung eines *Apg-1*-cDNA-Fragmentes in den Expressionsvektor pSKA-IBA2 zur Herstellung eines hochkonzentrierten, rekombinanten Proteins

Um eine Beteiligung von *Apg-1* an der Regulation des *Ins13* Gens zu untersuchen, wurde das identifizierte cDNA-Fragment des *Apg-1*-Gens in den Expressionsvektor

pASK-IBA2 kloniert. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Proteinextrakte hoch genug konzentriert sind, um eine zweifelsfreie spezifische Bindung des rekombinanten Proteins an den *Ins13* Promotor nachzuweisen. Außerdem kann das so gewonnene Protein zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden. Es wurde unter Verwendung der Primer APG-GFP F1 (2.8.2) und APG-GFP R1 (2.8.2) ein 1152 Bp langes cDNA Fragment des *Apg-1* Gens amplifiziert, aus dem Gel isoliert und mit Sal I und Eco RI doppelt restriktionsenzymatisch geschnitten. Das geschnittene cDNA Fragment wurde in den Vektor pASK-IBA2 kloniert (Abb. 25).

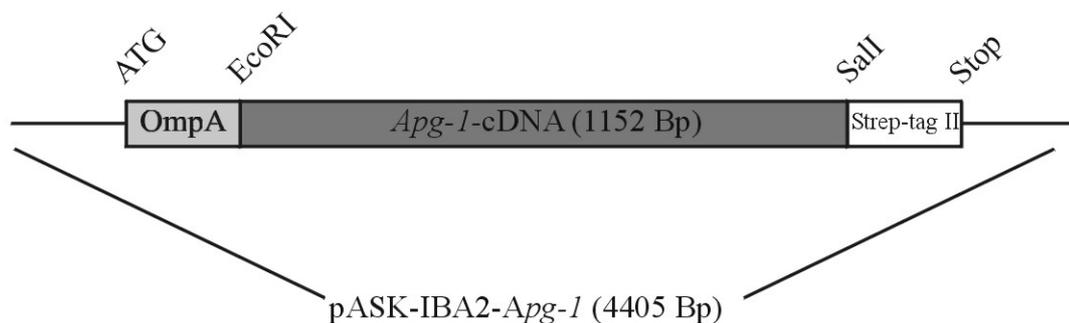


Abb. 25: Schematische Darstellung des Konstruktes pASK-IBA2-*Apg-1* zur Herstellung des rekombinanten Proteins

Das Konstrukt pASK-IBA2-*Apg-1* enthält ein 1152 Bp langes cDNA Fragment des Gens *Apg-1*. Die rekombinante cDNA steht unter der transkriptionellen Kontrolle des *tetA* Promotors. Eine *ompA*-Signalsequenz sorgt für die periplasmatische Exkretion des rekombinanten Proteins. Die Interaktion zwischen *Strep-tag II* (NH₂-WSHPQFEK-COOH₂; (Schmidt et al., 1996) und StrepTactin (Voss und Skerra, 1997) erlaubt es, das rekombinante Protein über Säulenaффinitätschromatographie aufzureinigen. Zur Vereinfachung sind nur die Restriktionsschnittstellen dargestellt, die während des Klonierungsprozesses relevant waren.

3.4.3 Untersuchung der Bindungsspezifität des *Apg-1*-Fusionsproteins aus dem pASK-IBA2-System mittels Gel Retardation Assay

Zur Mengenkontrolle der mit dem *Strep-tag*-System hergestellten rekombinanten Proteine wurde der Proteinextrakt nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine geeignete Membran elektrotransferiert und diese angefärbt. Dabei zeigte sich, dass

durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin die Produktion des rekombinanten Apg-1-Proteins induziert wird (Abb. 26). Außerdem wird bei diesem Verfahren das endogene Protein BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein) aus *E.coli* produziert.

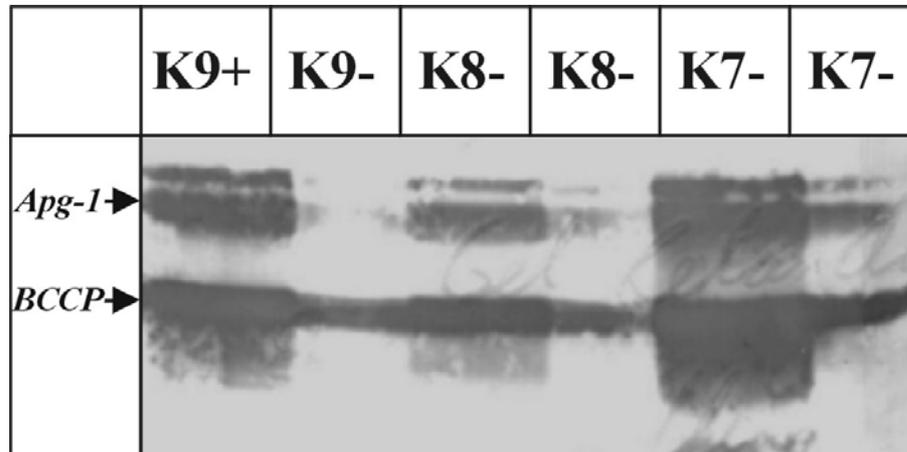


Abb. 26: Western Blot Analyse rekombinanter Apg-1-Proteine in verschiedenen Proteinextrakten

Aufgetragen wurden sechs Proteinextrakte aus den rekombinanten Klonen K7-K9. Dabei wurde jeder Klon einmal mit (K7+, K8+;K9+) und einmal ohne Anhydrotetrazyklin (K7-,K8-,K9-) kultiviert. Dargestellt ist das rekombinante Protein Apg-1 (42 kDa) und das endogene Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP, 22 kDa)

Für die Gel Retentionsanalyse wurden im weiteren nur Proteinextrakte aus dem rekombinanten Klon K7+ verwendet. Dabei zeigte sich, dass das rekombinante Apg-1-Protein aus dem Klon K7+ einen Komplex mit dem in der markierten Sonde M2/1 dreifach enthaltenen *cis*-agierenden Promotorelement M2 bildet. Konkurrenz mit den unmarkierten Fragmenten M2/1 und B4/2 löst den Komplex auf (Abb. 27). Das Fragment B4/2 ist das native Promotorfragment, welches das *cis*-agierende Promotorelement M2 enthält. Wird ein anderes rekombinantes Protein (Sall2) verwendet, so zeigt sich nur eine sehr schwache Bindung zum untersuchten Promotorfragment. Das ist als eine unspezifische Bindung zu betrachten.

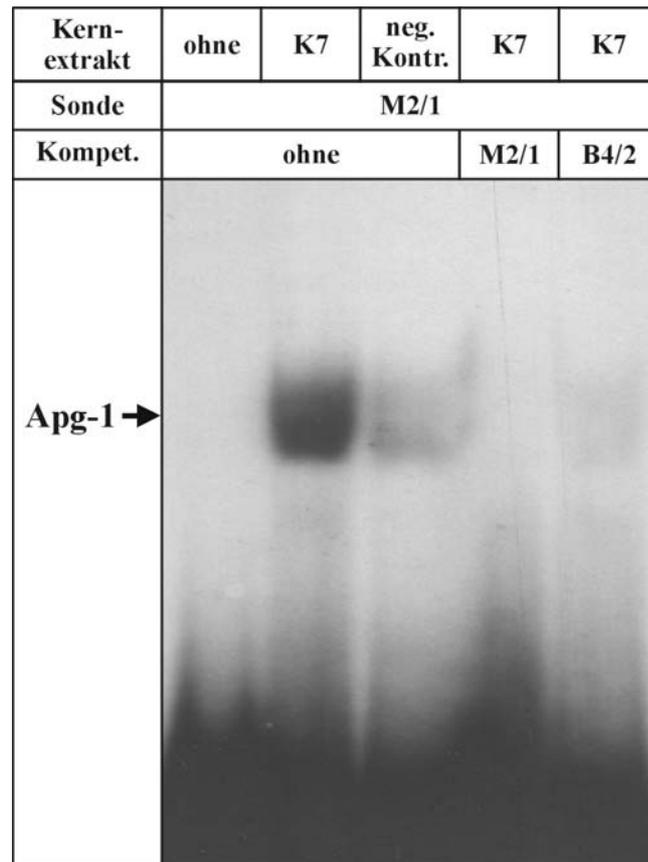


Abb. 27: Gel Retardation Assay mit rekombinantem Apg-1 Proteinextrakt und den Fragmenten M2/1 und B4/2

Das Fragment M2/1 zeigt nach Inkubation mit Proteinextrakten aus dem rekombinanten Klon K7 einen starken Komplex. Durch Zugabe von unmarkiertem M2/1 in 100fachem Überschuß wird der Komplex aufgelöst, ebenso wie nach Zugabe von unmarkiertem B4/2 in 100fachem Überschuß. Als Negativkontrolle wurde das rekombinante Protein für Sall2 zur Inkubation eingesetzt.

Damit wurde die Bindungsspezifität des Fusionsproteins an das *cis*-agierende *Ins13*-Promotorfragment M2 eindeutig nachgewiesen. Das rekombinierte Protein kann nun zur Herstellung von Antikörpern eingesetzt werden.

3.4.4 Untersuchung der Expression des *Apg-1*-Gens in der postnatalen Testisentwicklung

Das *Insl3* Peptid ist ein Ledigzell-spezifisches Hormon, das am Descensus der Hoden aus ihrer embryonalen Position caudal der Niere in ihre adulte, scrotale Position beteiligt ist (*Descensus testis*) (Zimmermann et al., 1999). Pränatale Expressionsstudien der Maus haben ergeben, dass das *Insl3* Transkript in den embryonalen Testes ab dem Tag 13,5 dpc nachgewiesen werden kann. Postnatal kann das *Insl3* Transkript während der gesamten Testisentwicklung nachgewiesen werden, wobei die Transkriptmenge nach drei Wochen allmählich ansteigt und im adulten Testis ihr Maximum erreicht (Zimmermann et al., 1997). Es wurde angenommen, dass das mit dem *Strep*-tag System identifizierte, testisprominent exprimierte Gen *Apg-1* direkt mit der Regulation der Expression des *Insl3* Gens während der postnatalen Entwicklung zusammenhängt. Es wurde eine Northern-Blot-Analyse mit RNA aus verschiedenen postnatalen Testisstadien und mit dem radioaktiv markiertem *Apg-1*-cDNA-Fragment als Sonde durchgeführt. Dabei wurden zwei Banden bei 3,0 bzw. 3,5 Kb festgestellt. Das 3,0 Kb-Transkript zeigt eine ansteigende Expression während der postnatalen Entwicklung, das 3,5 Kb-Transkript zeigt ein reziprokes Expressionsmuster (Abb. 28). Es wurde angenommen, dass es sich bei diesen Banden um verschiedene Spleißprodukte der *Apg-1* mRNA handelt.

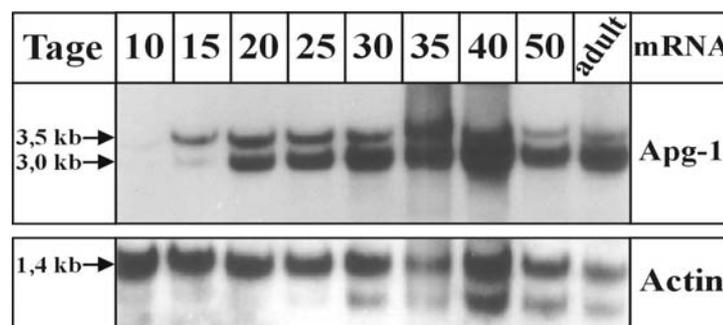


Abb. 28: Analyse der Expression des *Apg-1* Gens der Maus in der postnatalen Testisentwicklung mittels Northern-Blot

20 µg Gesamt-RNA wurde aus Maus-Testesstadien für Northern-Blot-Analysen eingesetzt. Die RNAs wurden mit der *Apg-1*-cDNA-Sonde hybridisiert. Es sind zwei unterschiedliche mRNA Spezies zu sehen.

Die obere Bande hybridisiert bei 3,5 Kb, die untere Bande bei 3,0 Kb. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde mit der cDNA für das humane β -Actin nachhybridisiert.

Aufgrund des erhaltenen Expressionsmusters wurde vermutet, dass es sich bei dem 3,0 Kb-Transkript um ein Spleißprodukt der *Apg-1*-mRNA handelt, dessen Proteinprodukt in der Spermatogenese eine Rolle spielt.

Das 3,5 Kb-Transkript zeigt im Gegensatz zum Expressionsmuster des *Ins13*-Gens eine absteigende Expression im hier gezeigten Zeitraum. Dies könnte, da es sich bei *Apg-1* um ein Heat Shock-verwandtes Gen handelt, darauf zurückzuführen sein, dass die Expression des Gens von der umgebenden Temperatur abhängig ist. Während des Descensus der Hoden von der caudalen Nierenposition in der Körperhöhle zur adulten, scrotalen Position kommt es zu einem Abfall der Umgebungstemperatur.

3.4.5 Untersuchungen zur temperaturabhängigen Expression des *Apg-1*-Gens

Um eine mögliche temperaturabhängige Expression beider mRNA-Spezies des *Apg-1*-Gens zu bestätigen, wurde Gesamt-RNA aus Testes von adulten Wildtyp-Mäusen, von *Ins13* defizienten knock-out Mäusen, deren Testes die embryonale Position beibehalten, und von Wildtyp-Mäusen, deren Testes operativ ins Abdomen verpflanzt und nach vier Monaten präpariert wurden, gewonnen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit der c-DNA-Sonde für *Apg-1* hybridisiert. Dabei zeigte sich, dass in den Wildtyp-Mäusen die 3,0 Kb-RNA-Bande stärker ist als die 3,5 Kb-RNA-Bande. In *Ins13* defizienten Mäusen fehlt die 3,5 Kb-RNA völlig. Bei operativ behandelten Wildtyp-Mäusen ist die 3,5 Kb-RNA-Bande stärker als die 3,0 Kb-RNA-Bande (Abb. 29). Außerdem wurde Gesamt-RNA präpariert, die aus Leydigzellen gewonnen wurde. Die Zellen wurden bei 37°C bzw. bei 32°C kultiviert. In der RNA aus Leydigzellen, die bei 32°C kultiviert wurden, sind beide Transkripte schwächer als bei Leydigzellen, die bei 37°C kultiviert wurden.

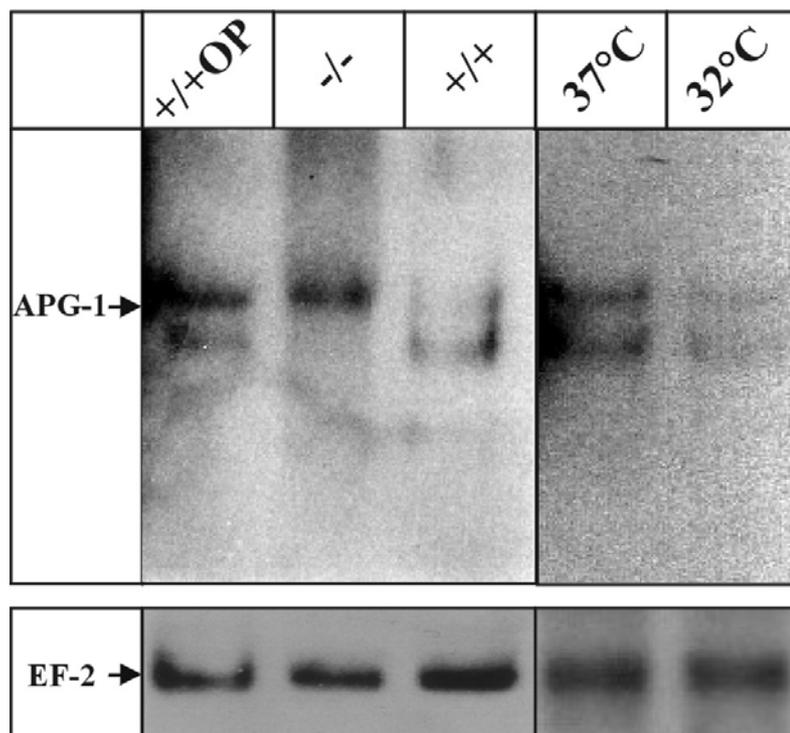


Abb. 29: Analyse der Expression des *Apg-1* Gens im Wildtyp-, im *Ins13*^{-/-} und im künstlich cryptorchiden Testis der Maus mittels Northern-Blot

Gesamt-RNA (je 20µg) aus dem Testis einer Wildtyp- (+/+), einer *Ins13* defizienten (-/-) und einer operierten Wildtyp-Maus (+/+OP) wurde mit der cDNA-Sonde für *Apg-1* hybridisiert. Die Kontrolle der verwendeten RNAs erfolgte durch Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA-Sonde für den humanen Elongations-Faktor-2 (EF-2).

Dieses Ergebniss liefert einen Hinweis darauf, dass die Expression des 3,0 Kb großen mRNA-Transkripts temperatursensitiv reguliert wird.

3.5 Subzelluläre Lokalisation eines Apg-1-GFP-Fusionsproteins

3.5.1 Klonierung eines Apg-1-GFP-Fusionsproteins mit dem pEGF-C1-Vektorsystem

Es wurden zwei cDNA-Fragmente des *Apg-1*-Gens in den Expressionsvektor pEGFP-C1 kloniert. Dabei wurde einerseits unter Verwendung der Primer APG-GFP F1 (2.8.2) und APG-GFP R1 (2.8.2) ein 1152 Bp langes cDNA Fragment und andererseits unter Verwendung der Primer APG-GFP F2 (2.8.2) und APG-GFP R2 (2.8.2) ein 771 Bp langes cDNA Fragment des *Apg-1* Gens amplifiziert, aus dem Gel isoliert und mit Sal I und Eco RI doppelt restriktionsenzymatisch geschnitten. Die geschnittenen cDNA Fragmente wurde in den Vektor pEGFP-C1 kloniert (Abb. 31).

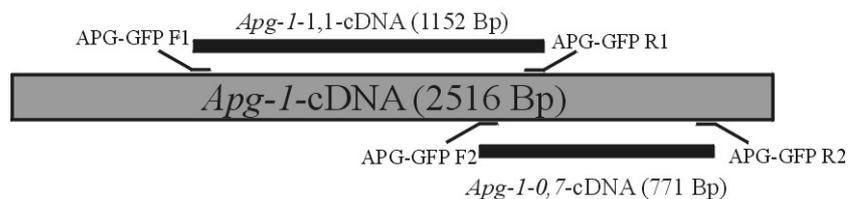


Abb. 30: Schematische Darstellung der amplifizierten Apg-1-cDNA-Fragmente

An einer Maus cDNA-Bibliothek wurden mit den Primern APG-GFP F1, APG-GFP R1, APG-GFP F2 und APG-GFP R2 (2.8.2) zwei *Apg-1*-cDNA-Fragmente (1152 Bp und 771Bp) amplifiziert (schwarze Balken) und in den Vektor pEGF-C1 kloniert (Abb. 31).

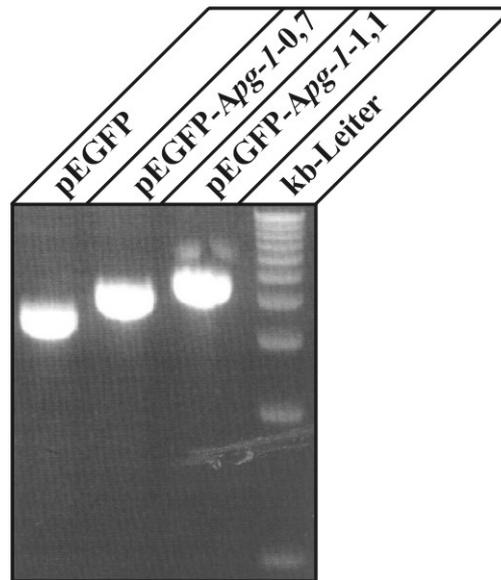


Abb. 32: Restriktionsenzymatische Analyse der Expressionsvektoren

Ethidiumbromid gefärbtes 1,2%iges Agarosegel der mit Sall/EcoRI restriktionsenzymatisch gespaltenen Expressionsvektoren. Dargestellt sind von links nach rechts: Expressionsvektor pEGFP (4,7 Kb), Expressionskonstrukte pEGFP-*Apg-1-0,7* (5,4 Kb) und pEGFP-*Apg-1-1,1* (5,8 Kb).

3.5.2 Detektion der Fluoreszenz des Apg-1-GFP-Fusionsproteins zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation des Apg-1 Proteins wurden die murinen Zellen NIH/3T3 (Fibroblasten) mit 2 μ g der Expressionskonstrukte GFP-0,7-*Apg-1* und GFP-1,1-*Apg-1* (Abb. 31) transient transfektiert. Zur Kontrolle der Expressionsaktivität wurden die Zellen mit dem Vektor pEGFP-C1 transfektiert (Abb. 31). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Methanol fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Olympus BX60). Die mikroskopische Untersuchung der transfizierten NIH/3T3-Zellen zeigte, dass das GFP-0,7-*Apg-1*-Fusionsprotein (Abb. 31) sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern vorkommt. Für das GFP-0,7-*Apg-1*-Fusionsprotein (Abb. 31) konnten keine transfektierten Zellen erhalten werden. Die Untersuchung der nukleären Morphologie der transfektierten Zellen durch DAPI-Gegenfärbung ergab, dass sich alle Zellen in der Interphase befanden.

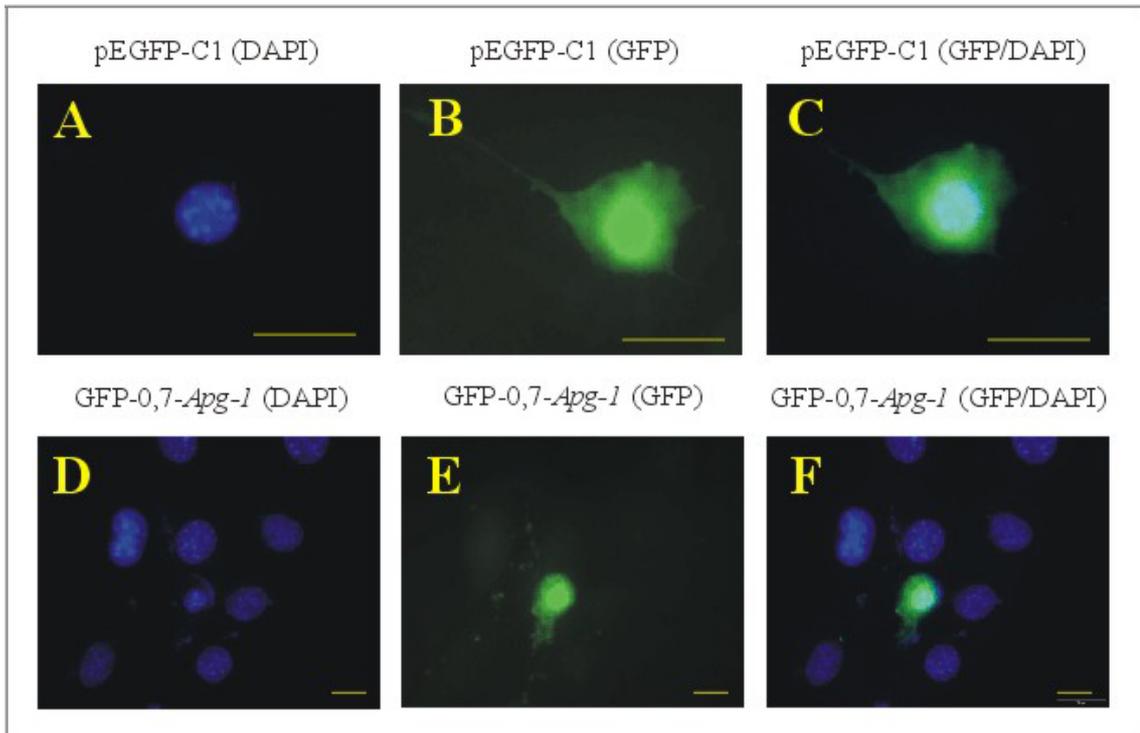


Abb. 33: Transfektion der murinen Zellen NIH/3T3 mit dem *GFP-Apg-1*-Fusionskonstrukt

DAPI-Färbung der Zellkerne transfektierter Fibroblasten mit dem Vektor pEGFP-C1 (A). GFP-Färbung des Cytoplasmas und des Zellkerns einer transfektierten Fibroblastenzelle (B). 3% der Zellen waren transfektiert. Überlagerungsbild der DAPI-Färbung (Kern) und des GFP-Proteins in Kern und Cytoplasma (C). (D) DAPI-Färbung der Zellkerne von GFP-0,7-*Apg-1*-transfektieren Zellen. (E) Lokalisation des GFP-Apg-1-Fusionsproteins im Kern und im Cytoplasma transfektierter Zellen. Ungefähr 3% der Zellen wurden transfektiert (die grüne Färbung stammt vom GFP Protein). (F) Überlagerungsbild der DAPI-Färbung (Kern) und des GFP-Apg-1-Fusionsproteins im Kern und im Cytoplasma. Der weiße Balken ist 10 μm lang.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das GFP-0,7-Apg-1-Fusionsprotein sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern vorkommt. Damit kommt Apg-1 für eine Beteiligung an der transkriptionellen Kontrolle des *Ins13*-Gens in Frage.

4 Diskussion

4.1 Zur Überexpression von *Insl3* in transgenen weiblichen Mäusen

Cryptorchismus in *Insl3*-defizienten männlichen Mäusen wird durch die ausbleibende Entwicklung des Gubernaculums während des pränatalen Wachstums hervorgerufen (Zimmermann et al., 1999; Nef und Parada, 1999). Synergistische Effekte anderer testikulärer Faktoren bei der Induktion der Gubernaculumentwicklung können in den hier vorgestellten Experimenten nicht ausgeschlossen werden. Emmen et al. (1998) zeigten, dass Gubernacula, die mit Testes aus *Insl3*^{+/-}- und *Insl3*^{+/+}-Mäusen bzw. synthetischem Androgen (R1881) kokultiviert wurden, sich sowohl unter dem Einfluss von *Insl3* als auch von synthetischem Androgen *in vitro* weiterentwickelten. Neben dem *Insl3*-Faktor spielen eine Reihe anderer Faktoren eine wichtige Rolle beim koordinierten Ablauf der morphologischen Differenzierung während der Gubernaculumentwicklung (Adham, 2001). So konnte durch die Deletion der Homeobox-Gene *Hoxa-10* und *Hoxa-11* bei Mäusen ebenfalls ein bilateraler Cryptorchismus erzeugt werden (Hsieh-Li et al., 1995; Satokata et al., 1995). Die anatomische Analyse der homozygot defizienten *Hoxa-10* und *Hoxa-11* Mäuse hat dabei ergeben, dass der bilaterale Cryptorchismus wie bei *Insl3* defizienten Mäusen auf die fehlende Differenzierung der myogenen Anteile des Gubernaculums zurückzuführen ist. Bei *Tfm*-Mäusen, die keinen funktionsfähigen Androgenrezeptor haben, sind das cranial suspensory ligament (CSL) und das Gubernaculum normal ausgebildet und die Testes in einer intermediären Position zwischen den Ovarien und den Testes gelegen. Bei östrogenbehandelten *Tfm*-Embryonen bleibt die Entwicklung des Gubernaculums aus (Hutson 1987). Aufgrund der hemmenden Wirkung von Östrogen und der induzierenden Wirkung von *Insl3* und *Hoxa-10* und *Hoxa-11* auf die Gubernaculumentwicklung stellt sich die Frage, ob die Wirkung dieser vier Faktoren auf die Gubernaculumentwicklung über eine gemeinsame Genkaskade erfolgt. Die Ergebnisse von Emmen et al. (2000) zeigen, dass die Expression des *Insl3*-Gens im

Testis von östrogenbehandelten Embryonen reprimiert ist. Dies führt zu der Annahme, dass die hemmende Wirkung von Östrogen auf die Gubernaculumentwicklung über die reprimierte Expression des *Insl3* Gens erfolgt. Die Untersuchungen von Ma et al. (1998) haben gezeigt, dass Östrogen die Expression des *Hoxa-10* Gens reguliert. Um die Einordnung des *Insl3*-Faktors in diese Genkaskade genauer zu untersuchen wurde das Expressionsmuster der Gene für *Hoxa-10* und *Hoxa-11* bei *Insl3* defizienten Embryonen bestimmt. Mittels RT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass beide Gene im Testis und im Gubernaculum bei *Insl3* defizienten Embryonen exprimiert werden (Adham, unpublizierte Ergebnisse). Diese Resultate deuten daraufhin, dass *Insl3* die Expression von *Hoxa-10* und *-11* nicht reguliert. Es sollte weiterführend untersucht werden, ob über die Transskriptionsfaktoren *Hoxa-10* bzw. *Hoxa-11* die Expression des *Insl3* Gens in den Leydigzellen reguliert wird.

(Gorlov et al., 2002) wiesen kürzlich an homozygoten transgenen Mäusen mit einer Insertionsmutation im *Great* Gen (**G** protein-coupled **r**eceptor **a**ffecting **t**estis **d**escent) einen bilateralen intra-abdominalen Cryptorchismus nach. Das *Great* Gen gehört zur Genfamilie der G-proteingebundenen Rezeptoren. Weitere Mitglieder sind FSHR, LHR und TSHR. Die Expression dieses Gens ist auf Testes, Gehirn und Skelettmuskel beschränkt. Die höchste Expression wird im Gubernaculum erreicht. Mäuse mit defizientem *Great* Gen sind infertil. Ursächlich dafür ist die ausbleibende Entwicklung des Gubernaculums. Aufgrund der großen Ähnlichkeit des testikulären Phänotyps von transgenen Mäusen mit Mutation im *Great* Gen und *Insl3* defizienten Knockout Mäusen, könnte *Insl3* als endogener Ligand für den *Great* Rezeptor in Frage kommen. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass das *Insl3* verwandte Relaxinhormon in der Lage ist den *Great* Rezeptor über einen Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)-abhängigen Signalweg zu aktivieren.

4.1.1 Descensus der Ovarien in transgenen *Insl2/Insl3* Weibchen

In dieser Arbeit wird nun gezeigt, dass *in vivo* *Insl3* unabhängig von der Androgeneinwirkung für die Induktion und Entwicklung des Gubernaculums verantwortlich ist (3.1).

Dazu wurden transgene Mäuse erzeugt, die während der prä- und postnatalen Entwicklung aktives *Insl3* im Pankreas überexprimierten (Adham et al., 2002).

Die gewebespezifische Expression des Transgens wurde durch die Einführung regulatorischer Sequenzen des gut charakterisierten *Insulin II* Gens der Ratte stromaufwärts des *Insl3* Gens erreicht. In *Insl2:Insl3* transgenen Mäusen sollte der Pro-*Insl3*-Faktor in den prä- und postnatalen β -Zellen des Pankreas produziert und das aktive *Insl3* ins Blut ausgeschüttet werden. Der Einsatz von *Insulin II* Promotorsequenzen zur Überexpression von *Insl3* hatte zweierlei Gründe: Zum einen beginnt die Expression von Insulin im sich entwickelnden Pankreas der männlichen und weiblichen Maus am Tag 12,5 dpc (Yoshinari und Daikoku, 1982; Teitelman und Lee, 1987). Dadurch setzt die pankreatische Expression von *Insl3* in männlichen und weiblichen Mäusen zu einem Zeitpunkt ein, zu dem normalerweise das Wachstum und die Ausdifferenzierung des Gubernaculum beginnt. Demgegenüber wird nur in männlichen Embryonen endogenes *Insl3* exprimiert. Zweitens prozessieren β -Zellen Pro-Insulin zu Insulin. Dies sollte auch für die Katalyse von Pro-*Insl3* zu bioaktivem *Insl3* gelten.

Es wurden unabhängig voneinander insgesamt 5 transgene Linien erzeugt. Die Expression von *Insl3* in den Langerhansschen Inseln im Pankreas wurde durch immunhistochemische und RNA-Analysen nachgewiesen (Abb. 7; Abb. 6). Phänotypische Analysen der transgenen Weibchen haben gezeigt, dass die Ovarien über der Harnblase lokalisiert sind und durch das cranial suspensory ligament (CSL) und das Gubernaculum mit der Bauchdecke verbunden sind. Aufgrund der Entwicklung dieser beiden Ligamente ist bei den transgenen weiblichen Mäusen die Position der Ovarien ähnlich wie die Position der Testes bei *Tfm*-Mäusen, bei denen aufgrund der fehlenden Androgenwirkung und der Synthese von *Insl3* beide Ligamente weiterentwickelt sind. Der Descensus der Ovarien in die Inguinalregion wird in transgenen Weibchen durch den V-förmigen Uterus behindert. Die Entwicklung beider Ligamente in transgenen Weibchen verhindert den Descensus der Ovarien in den entwickelten *Processus vaginalis*. Die Verpaarung von *Insl2/Insl3* homozygoten Männchen mit homozygoten *Insl3*^{-/-} Weibchen führte zu *Insl2/Insl3: Insl3*^{+/-} Mäusen. Die Nachkommen dieser Kreuzung waren hemizygot für das *Insl2/Insl3* Allel und heterozygot für *Insl3*-null Gen. Eine Verpaarung dieser Mäuse erbrachte *Insl2/Insl3: Insl3*^{-/-} Tiere. Durch diese

funktionelle Komplementierung des transgenen Allels wurde der bilaterale Cryptorchismus in *Insl3*^{-/-}-Männchen rückgängig gemacht. Dies beweist die zentrale Bedeutung von *Insl3* für die Gubernaculumentwicklung und das Vermögen von β -Zellen im Pankreas pro-Insl3 zu biologisch aktivem Insl3 zu prozessieren und in den Blutkreislauf zu entlassen, damit es am Zielort seine Wirkung entfalten kann. Büllesbach et al. (1999) haben gezeigt, dass INSL3 in postpubertären Männern in der Blutbahn zirkuliert. Weiterhin zeigt die Weiterentwicklung des Gubernaculums in weiblichen transgenen Mäusen, die während der fetalen Entwicklung keiner Androgenwirkung unterliegen, dass Androgene bei der Gubernaculumentwicklung keine Rolle spielen.

Die Asymmetrie der Gonadenposition in echten Hermaphroditen, in denen die Testes auf der einen Seite deszendieren, während demgegenüber contralateral Ovarien oder Ovotestes caudal der Niere verbleiben, lässt vermuten, dass Insl3 das Gubernaculum über einen exokrinen Weg erreicht und dort lokal wirkt. Demgegenüber zeigt die Induktion der Gubernaculumentwicklung in *Insl2-Insl3: Insl3*^{-/-} Männchen durch pankreatisches *Insl3*, dass die Wirkung von Insl3 durch einen endokrinen Sekretionsweg vermittelt wird. Für das endogene Insl3 ist jedoch auch vorstellbar, dass die Wirkung des Insl3-Faktors parakriner Natur ist. Dabei könnte das Insl3 Hormon auf die intratubulären Sertolizellen wirken, die ihrerseits einen bisher unbekanntem Faktor sezernieren, der die Differenzierung des Gubernaculums stimuliert. Die Wirkung des in β -Zellen des Pankreas produzierten Insl3-Faktors auf die Gubernaculumentwicklung spricht jedoch für eine direkte endokrine Wirkung auf die Gubernaculumentwicklung.

4.1.2 Anatomische Aspekte des *Processus vaginalis*

Der Descensus testis ist bei Mäusen ein zweistufiger Prozess. Während der ersten Stufe, dem intraabdominalen Abstieg zwischen Tag 15,5 dpc und Tag 17,5 dpc, sorgen die Entwicklung des Gubernaculums und die Regression des CSL für eine Wanderung der Testes in die Inguinalregion.

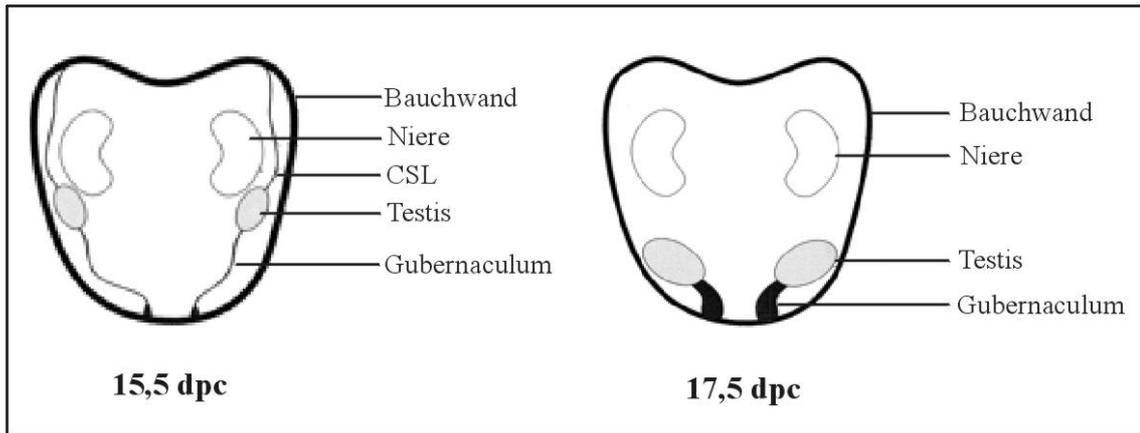


Abb. 34: Schematische Darstellung des intrabdominalen Descensus der Testes

Am Tag 15,5 dpc sind die Testes in männlichen Embryonen caudal der Niere lokalisiert. Sie sind durch das Gubernaculum und das Cranial Suspensory Ligament (CSL) mit der Bauchdecke verbunden. Bis zum Tag 17,5 dpc führt die Entwicklung des Gubernaculums und die Regression des CSL im männlichen Embryo zum transabdominalen Abstieg der Testes in die Inguinalregion.

Während der zweiten Phase, dem inguinoscrotalen Abstieg bis zum vierten postnatalen Tag, wandern die Testes durch die Invagination der äußeren Myoblastzellschicht des Gubernaculums und dessen caudale Erweiterung ins Scrotum hinein (Abb. 4). Zu Beginn dieses Prozesses nimmt der innerhalb der inguinalen Region liegende Teil des Gubernaculums an Umfang beträchtlich zu. Durch die morphologische Differenzierung sowie die Invertierung des „Gubernaculum bulb“ wird der *Processus vaginalis* ausgebildet. Die abschließende Kontraktion des schon differenzierten Gubernaculums führt zur Verlagerung des Nebenhodens und des Testis in das neugebildete Scrotum. Bei der Maus findet die transabdominale Phase zwischen den Tagen 15,5 und 17,5 der Embryonalentwicklung statt, während die inguinoscrotale Phase am Tag 25 nach der Geburt abgeschlossen ist (O'Shaughnessy und Sheffield, 1991). Im Gegensatz dazu werden beim Menschen beide Phasen des Descensus testis vor der Geburt beendet. Mehrere Experimente zeigen, dass der inguino-scrotale Abstieg der Testes durch Androgene gesteuert wird (Baumans et al., 1983; McMahon et al., 1995). In der hier vorgestellten Arbeit wird gezeigt, dass die Entwicklung des *Processus vaginalis* in transgenen Weibchen die Beteiligung androgen-vermittelter Aktivität beim Invaginationsprozess des Gubernaculums und der Formation des *Processus vaginalis*

ausschließt. Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass bei Männern mit vollständiger Androgeninsensitivität Inguinalhernien festgestellt wurden (Hutson und Beasley, 1988; Heyns und Hutson, 1995). Die Entwicklung des *Processus vaginalis* in transgenen *Insl2/Insl3* Weibchen zeigt Gemeinsamkeiten mit der Ausbildung von kongenitalen Inguinalhernien bei Mädchen. Bei weiblichen transgenen Mäusen wird zwar auch der *Processus vaginalis* entwickelt, jedoch kommt es aufgrund der direkten Verbindung zur inguinalen Region sowie der Wirkung des intraabdominalen Drucks zu der Verlagerung eines Teils des Darms (3.1.5). Inguinalhernien kommen insbesondere bei Frühgeburten mit geringem Geburtsgewicht vor. Jungen sind dabei 8 mal häufiger betroffen als Mädchen (Boocock und Todd, 1985; Skinner und Grosfeld, 1993; Kapur et al., 1998). Klinisch wird eine Inguinalhernie bei Mädchen als eine Schwellung bzw. Ausbuchtung der Inguinalregion definiert, die durch intraabdominalen Druck vergrößert wird. In den Inguinalhernien finden sich Darmschlingen und manchmal Ovarien (Oudesluys-Murphy et al., 2000). Die phänotypische Ähnlichkeit zwischen den transgenen weiblichen Mäusen und den kongenitalen Inguinalhernien von Mädchen führt zur Annahme, dass die Entwicklung des Gubernaculum bzw. der Entwicklung des *Processus vaginalis* in betroffenen Mädchen auf die ektopische Expression von *Insl3* während der pränatalen Entwicklung zurückzuführen ist.

Die ausbleibende Entwicklung des *Processus vaginalis* bei Wildtyp-Weibchen und bei männlichen *Insl3*^{-/-} Tieren, bei denen die Entwicklung des Gubernaculum ausbleibt, führt zu der Annahme, dass das Gubernaculum das Ausgangsgewebe für den *Processus vaginalis* ist. Es bleibt noch zu untersuchen, ob *Insl3* direkt an der Entwicklung des *Processus vaginalis* beteiligt ist.

4.1.3 Wirkung der Überexpression von *Insl3* auf die weibliche Fertilität

Da die weiblichen Tiere aller transgenen Mauslinien eine reduzierte Fertilität zeigen (Tabelle 2), wird davon ausgegangen, dass dieser Befund nicht darauf zurückzuführen ist, dass das transgene Allel in ein anderes aktives Gen integriert wurde. Histologische Untersuchungen ergaben, dass die Follikelentwicklung transgener Mäuse normal

verlaufen. Die Schwangerschaften transgener Weibchen verliefen bis Tag 8,5 dpc normal, zwischen Tag 10,5 dpc und Tag 14,5 dpc verstarben jedoch die Hälfte der Embryos. In Wildtyp-Mäusen bleibt die *Insl3* Expression in den Ovarien von Tag 0,5 dpc bis Tag 8,5 dpc konstant und fällt zwischen Tag 8,5 dpc und Tag 18,5 dpc stark ab. Ab Tag 18,5 dpc steigt sie wieder an. Das lässt darauf schließen, dass die kontinuierliche Überexpression von pankreatischem *Insl3* während der Schwangerschaft ursächlich für die reduzierte Fertilität der transgenen Weibchen ist. Dieser Befund spiegelt den Phänotyp eines anderen Mausmodells mit einer Mutation im 5 α -Reductase Type 1 Gen (*Srd5 α 1*) wieder. Die Erhöhung von Östrogen in *Srd5 α 1*^{-/-}-Mäusen führt ebenfalls zu einer Reduktion der Anzahl von Lebendgeburten (Mahendroo et al.; 1997). In diesem Zusammenhang bleibt die Frage zu klären, welche Gewebe in transgenen Weibchen von der Überexpression von *Insl3* betroffen sind und wie die Überexpression von *Insl3* die Lethalität der Embryonen verursacht.

4.2 Analyse des *Insl3* Promotors

Zimmermann et al. (1997) isolierten und sequenzierten ein etwa 2 Kb Fragment des 5'-flankierenden Bereichs des *Insl3* Gens der Maus. Dabei konnte der Transkriptionsstartpunkt auf 3 Nukleotide vor dem Translationsstartpunkt ATG festgelegt werden. Durch Transfektionsexperimente mit deletierten *Insl3* Promotorfragmenten, die die Expression des Gens für Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) steuern (Zimmermann et al., 1998), konnte ein 160 Bp langer Promotorbereich identifiziert werden, der die *cis*-ständigen Elemente, die die zeitliche und räumliche Expression des *Insl3* Gens vermitteln, enthält.

Innerhalb der 5'-flankierenden Region des *Insl3* Gens der Maus findet sich an der Position -36 bis -32 ein konventionelles TATA-Box Bindungsmotif, sowie stromaufwärts an der Position -53 bis -48 eine SP-1 Bindungsstelle. In den meisten eukaryontischen Promotoren befindet sich die TATA-Box ungefähr 20-40 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt und ist für die Initiation der Transkription verantwortlich. An das TATA-Element bindet der Transkriptionsfaktor TFIID (Dyran und Tjian, 1985; Jones et al., 1988). Durch Vergleich der 5'-flankierenden Sequenzen

Müllerian Hormone“ vorhanden ist (Rice et al., 1991; Morohashi et al., 1992; Ikeda, 1996). SF-1 wird in steroidogenen Geweben, einschließlich Nebennierenrinde, Testis, Ovar, Placenta sowie im Fettgewebe exprimiert, wobei die Expression mit der Verteilung der steroidogenen P-450s im Gewebe korreliert (Honda et al., 1993). Desweiteren konnte das SF-1 Transkript im Hypothalamus und in der Hypophyse nachgewiesen werden (Honda et al., 1993). In den Gonaden der Maus kann SF-1 ab dem Tag 9,5 dpc nachgewiesen werden (Shen et al., 1994). Nach der Gonadendifferenzierung bleibt die Expression von SF-1 auf Sertoli- und Leydigzellen begrenzt, während im pränatalen Ovar keine Expression festgestellt wurde. Die Expressionsmuster des „Anti Müllerian Hormone“ Gens und der steroidogenen P-450 Gene (Koopman et al., 1990; Zwingman et al., 1993; Morohashi et al., 1994) in entwickelten Testes korrelieren mit dem Expressionsprofil des SF-1 Gens (Shen et al., 1994). Weiterhin korrelieren sie mit dem Expressionsmuster des *Insl3* Gens der Maus, welches pränatal ab Tag 13,5 im Testis, jedoch nicht im embryonalen Ovar nachweisbar ist (Zimmermann et al., 1997). Anhand von SF-1 Nullmutanten konnte bei Mäusen die Funktion dieses Transkriptionsfaktors analysiert werden. Bei den SF-1 defizienten Tieren beginnen ab Tag 12,5 die Gonaden zu degenerieren. Dadurch wurde gezeigt, dass die Funktion des SF-1 Proteins in der Regulation der Entwicklung der undifferenzierten Gonaden besteht. Zudem ist SF-1 an der Entwicklung der Nebenniere beteiligt (Luo et al., 1994). Bei SF-1 knockout Mäusen unterbleibt die Entwicklung der Nebennieren.

Durch Transfektionsexperimente von Zimmermann et al. (1998) , in denen Konstrukte des 160 bp umfassenden Promotorbereichs des *Insl3* Gens vor dem Reportergen CAT mit mutierten SF-1 Bindungsstellen verwendet wurden, konnte eine unmittelbare Aktivierung des Reportergens in Abhängigkeit von der Anzahl der vorhandenen SF-1 Sequenzmotive aufgezeigt werden. Es wurde außerdem ein 0,16 *Insl3*/CAT-Konstrukt mit einem Expressionsvektor für das SF-1 Protein in Hela-Zellen, die üblicherweise *Insl3* nicht exprimieren, cotransfiziert. Es zeigte sich, dass die CAT-Aktivität des *Insl3* Konstrukts stark anstieg, im Vergleich zur CAT-Aktivität der HeLa-Zellen, die nur mit dem 0,16 *Insl3*/CAT-Konstrukt transfiziert waren (Schwärzler, 1997). Diese Befunde machen eine Beteiligung des SF-1 Faktors an der Regulation des *Insl3* Gens als aktivierenden Transkriptionsfaktor offenkundig. Außerdem wird aufgrund der

Erkenntnisse über die Beteiligung des SF-1 Faktors an der Regulation von Genen, die an der Differenzierung der Gonaden beteiligt sind darauf geschlossen, dass auch das *Insl3* Gen mit den drei SF-1 Bindungssequenzen in der Promotorregion dieser Differenzierungskaskade angehört.

4.2.1 Analyse der DNA/Protein Interaktionen

Thamm (1998) fand in seiner Diplomarbeit ein weiteres *cis*-agierendes Element (M2-Box) innerhalb der 160 Bp Promotorregion (Abb. 11). Dabei wurde in Gel Retardation Assays mit Kernproteinen verschiedener Zelllinien und somatischen Geweben gezeigt, dass transagierende Proteine gewebespezifisch an die M2 Box binden. Die an der Bindungsspezifität beteiligten Nukleotide der M2-Box konnten in dieser Arbeit genau lokalisiert werden (3.2.2). Eine Datenbankrecherche ergab eine hohe Homologie zwischen der reversen Sequenz des M2-Elements zu den Konsensusbindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren HNF-4 und CoupTF, sowie den Konsensusbindungssequenzen von Transkriptionsfaktoren der *Myb*-Genfamilie (Abb. 16).

Der Transkriptionsfaktor HNF-4 (Hepatocyte nuclear factor 4) wurde in embryonaler Leber, Niere und Darm nachgewiesen und kontrolliert als Aktivator die Regulation vieler Gene im Fettsäure-, Cholesterol- und Glucose-Metabolismus sowie der Harnstoffbiosynthese, der Blutgerinnungskaskade und der Leberzellendifferenzierung (Sladek, 1993). HNF-4 ist ein evolutionär stark konserviertes Mitglied der Steroidhormonrezeptor Superfamilie. Mäuse, in denen HNF-4 homozygot deletiert ist, sterben während der Embryogenese. Histologische Untersuchungen zeigen Apoptose im embryonalen Ectoderm ab dem Tag 6,5 dpc, wenn dort normalerweise die Gastrulation beginnt. Die Differenzierung des Mesoderms beginnt mit 24 Stunden Verspätung. Dies zeigt, dass die Expression von HNF-4 im Endoderm für die Gastrulation und die Ausbildung des Ectoderms unerlässlich ist (Chen et al., 1994).

Der Transkriptionsfaktor CoupTF (chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor) ist ebenfalls ein Mitglied der Steroidhormonrezeptor-Superfamilie und

reprimiert die hormonelle Induktion anderer Steroidrezeptoren in Zellproliferations- und Differenzierungsprozessen (Kieback et al., 1996).

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass beide Transkriptionsfaktoren in antagonistischer Manier die Expression des Gens für die Ornithintranscarbamylase (OTC), einem Enzym des Ornithinzyklus, in der Rattenleber regulieren. Beide Transkriptionsfaktoren binden dabei aufgrund ihrer stark homologen Konsensus-Bindungssequenzen an dieselben *cis*-agierenden Elemente, wobei HNF-4 als ubiquitärer Transaktivator und CoupTF im OTC-Gen gewebespezifisch als Repressor wirkt (Kimura et al., 1992). Es zeigt sich das CoupTF vermittelte Genregulation vom Promotorkontext abhängt, da andere Promotoren durch diesen Transkriptionsfaktor aktiviert werden.

Die *Myb*-Genfamilie besteht aus *a-Myb*, *b-Myb*, *c-Myb* und *v-Myb*. Diese Gene kodieren für nukleäre Proteine, die als Transkriptionsfaktoren wirken. Die Transaktivierung von Genen durch Proteine der *Myb*-Genfamilie hängt stark vom Zelltyp und vom Promoterkontext ab. Dies lässt darauf schließen, dass zelltypspezifische Cofaktoren die Transaktivierung vermitteln.

Während die C-terminalen Domänen von *a-Myb* und *c-Myb* einen negativen regulatorischen Effekt auf die Transkription der Zielgene ausüben, wirkt die C-terminale Domäne von *b-Myb* als positiver Regulator. Eine oder mehrere dieser Proteine wechselwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie Ets-2, CEBP und NF-M. Die Expression dieser Genfamilie wird außerdem durch den Zellzyklus reguliert. Eine Inhibition ihrer Funktion durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden führt zu einer Beeinträchtigung des Zellzyklus, der Zellteilung oder Zelldifferenzierung. Mitglieder dieser Genfamilie zeigen ein unterschiedliches räumliches und temporäres Expressionsmuster, was eine unterschiedliche Funktion dieser Gene nahelegt.

Knockout-Experimente demonstrieren die essentielle Rolle der *Myb*-Proteine während der Embryonalentwicklung. Der Verlust der *c-Myb* Funktion führt durch Störungen der Haematopoese zu embryonaler Lethalität (Mucenski et al., 1991). *a-Myb*^{-/-}-Mäuse zeigen Wachstumsstörungen, Spermatogenesedefekte bzw. Fehlbildungen in der Brustentwicklung bei weiblichen Mäusen. *c-Myb* spielt außerdem eine essentielle Rolle während der Tumorigenese (Weston, 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Gel Retardation Assays eindeutig nachgewiesen werden, dass die beschriebenen Transkriptionsfaktoren nicht als transagierende Proteine mit der M2-Box in Frage kommen (3.2.4).

Um die Bedeutung des M2-Sequenzelements für die Transaktivierung des *Insl3* Promotors zu untersuchen, wurden Transfektionsexperimente mit der MA10 Leydigzelllinie durchgeführt (3.2.5). Hierfür wurden 2 Promotorfragmente (160 Bp und 700 Bp) der 5'-flankierenden Region des *Insl3*-Gens in den Vektor pGL3-basic vor das Gen für das Enzym Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1987) (Abb. 18) kloniert. Die Analyse der Luciferaseaktivität der Konstrukte pGL3 0,16 und pGL3 0,16ΔM2, die 160 Bp der 5'-flankierenden Regionen umfassen, ergab, dass sich die Transaktivierung der Reportergens signifikant reduziert, wenn das M2-Sequenzelement deletiert ist (Abb. 19). Die Luciferaseaktivität der Konstrukte pGL3 0,7 und pGL3 0,7ΔM2, die 700 Bp der 5'-flankierenden Regionen umfassen unterschied sich kaum voneinander, war jedoch stärker wie bei den Konstrukten pGL3 0,16 und pGL3 0,16ΔM2. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Sequenzelement M2 als *cis*-agierendes Element für Bindung von putativen Repressorproteinen an den *Insl3* Promotor in Frage kommt. Außerdem wird postuliert, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schwärzler (1997) in der 700 Bp 5'-flankierenden Region zusätzliche regulatorische Elemente vorhanden sind, die das *Insl3* Gen transaktivieren.

Durch Untersuchung der 5'-flankierenden Region des *Insl3* Gens der Maus in den steroidogenen Zelllinien MA10 und Y1 wurde der Einfluß des M2 Sequenzelements auf die SF-1 abhängige Transaktivierung von *Insl3* untersucht (3.2.6). Die verwendeten Zelllinien MA10 (Leydigzellen) und Y1 (Nebennierenzelllinie) exprimieren beide den für die Transaktivierung von *Insl3* notwendigen Transkriptionsfaktor SF-1 (steroidogenic factor-1). Im Gegensatz zur Leydig-Zelllinie MA10 wird *Insl3* jedoch in der Nebennieren-Zelllinie Y1 trotz Vorhandensein von SF-1 nicht exprimiert. Dabei zeigte sich, dass das Vorhandensein von SF-1 in Y1-Zellen nicht ausreicht, um eine Transaktivierung des Reportergens wie in MA10-Zellen zu erreichen (Abb. 20). Eine Überexpression von SF-1 in MA10-Zellen durch Kotransfektion mit dem Expressionsvektor pCMV-SF-1 führte zu einer Reduktion der Reportergenaktivität und die Luciferaseaktivität in Y1-Zellen wurde signifikant reduziert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es weitere transagierende Elemente im *Insl3*-Promoter ausserhalb

des untersuchten Promoterbereichs gibt, die eine Leydigzellspezifische Expression von *Ins13* vermitteln.

4.2.2 Expressionanalyse des *Apg-1* Gen der Maus im Testis

Im Rahmen einer Untersuchung zur Identifizierung des transagierenden Faktors, der an das M2-Promoterelement bindet, wurde mit Hilfe des „One Hybrid Systems“ eine *Apg-1* cDNA aus einer testis cDNA Bibliothek isoliert.

In Northern Blot Experimenten wurden zwei *Apg-1* Transkripte festgestellt (3,0 Kb und 3,5 Kb; Abb. 28). Beide Transkripte sind auch in der Leydigzelllinie MA10 nachweisbar (Abb. 29). Es wird angenommen, dass es sich bei der 3,0 Kb mRNA um ein Spleißprodukt der *Apg-1* mRNA handelt, deren Expression während der Spermatogenese induziert wird (Abb. 28). Das 3,5 Kb mRNA Spleißprodukt zeigt im Gegensatz dazu eine absteigende Expression im gleichen Zeitraum. Daher wird vermutet, dass die Expression dieser RNA Spezies von der umgebenden Temperatur während des Descensus testis abhängt.

4.2.3 Zur temperaturabhängigen Expression des *Apg-1* Gens

Kaneko et al. (1997) zeigten, dass *Apg-1* und *Hsp110* in testikulären und somatischen Zellen durch einen Hitzeschock von 32°C auf 37°C induziert werden. Die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Hinweis auf die temperatursensitive Regulation von *Apg-1* (3.4.5). In operativ behandelten Wildtyp-Mäusen, die künstlich cryptorchid gemacht wurden, zeigte die Northern Blot Analyse, dass die 3,5 Kb mRNA stärker als die 3,0 Kb mRNA exprimiert wird (Abb. 29). In *Ins13* defizienten Mäusen deren Testes ebenfalls in der embryonalen Position caudal der Niere verbleiben, fehlt die 3,0 Kb mRNA Bande völlig. Zellkulturexperimente mit Gesamt RNA, die aus Leydigzellen präpariert wurde, die bei 37°C bzw. 32°C kultiviert wurden, zeigten kein eindeutiges Ergebnis (Abb. 29). Dies wird darauf zurückgeführt, dass immortalisierte Zelllinien häufig veränderte Expressionsmuster zeigen und deswegen bei der hier bearbeiteten Fragestellung nicht als Untersuchungssystem geeignet sind. Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass die 3,0 Kb mRNA temperatursensitiv reguliert wird. Da

sich während des *Descensus testis* das Temperaturmilieu in den Leydigzellen ändert, liegt eine Regulation von *Insl3* durch *Apg-1* nahe. Analysen zur subzellulären Lokalisation ergaben, dass das Apg-1 Protein sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern vorkommt und somit als transagierender Faktor der *Insl3* Expression in Frage kommt (3.5.2).

Um die Beteiligung von *Apg-1* an der Regulation des *Insl3* Gens zu untersuchen, wurde das identifizierte cDNA-Fragment des *Apg-1*-Gens im Expressionsvektor pASK-IBA2 überexprimiert (3.4). Das Fusionsprotein wurde im Western Blot mengenkontrolliert (Abb. 26) und als Proteinextrakt in Gel Retardation Assays eingesetzt (Abb. 27). Dabei zeigte sich nach Inkubation mit Proteinextrakten eine starke Komplexbildung des Fusionsproteins mit der M2-Box. Konkurrenz mit unmarkierter Sonde führte zur Auflösung des Komplexes. Da im Proteinextrakt nur *Apg-1* Fusionsprotein enthalten war (Abb. 26), konnte somit die Bindungsspezifität an das *cis*-agierende *Insl3*-Promoterfragment M2 nachgewiesen werden.

4.2.4 Analyse der transgenen Mäuse

Um die Ergebnisse zur 5'-nichttranslatierten Region, die zur Transaktivierung des *Insl3* Gens notwendig ist (Zimmermann et al., 1998) *in vivo* zu bestätigen, wurden die in Abb. 21 dargestellten Konstrukte in den paternalen Vorkern superovulierter Oocyten der Maus mikorinjiziert und zwecks Generierung von Foundertieren in scheinsschwangere Weibchen der Mauslinie FVB retransferiert. Von den insgesamt 9 erzeugten transgenen Tieren (Founder) transmittierten lediglich 6 das Transgen durch die Keimbahn. Unabhängig vom Genotyp waren alle Nachkommen nach der Geburt lebensfähig und zeigten keine äußerlich erkennbaren Veränderungen in Körpergröße und Gewicht. Ebenso zeigten alle Tiere ein normales Paarungsverhalten. Die Verpaarung transgener Mäuse untereinander zeigte, dass alle Tiere uneingeschränkt fertil waren und sich hinsichtlich der Wurfgröße nicht vom Erwartungswert dieses Mausstammes unterschieden (Abb. 23).

Es stellte sich heraus, dass nur Mauslinien mit 700 Bp 5'-flankierender Region des *Insl3* Gens im Konstrukt (Abb. 21B, Linien B01, B06 und B07) das Reportergen

testisprominent exprimierten (Abb. 22). Mauslinien mit 160 Bp 5`-flankierender Region des *Insl3* Gens im Konstrukt (Abb. 21B, Linien Th3, Th4 und Th5) zeigten keine Expression. Dies lässt, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.5, schliessen, dass für eine Transaktivierung des *Insl3* Gens *in vivo* regulatorische Elemente außerhalb der 160 Bp 5`-flankierenden Region notwendig sind.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die *Ins13*-gesteuerte Gubernaculumentwicklung von Androgenen abhängig ist und ob die Überexpression von *Ins13* in weiblichen Embryonen zur Entwicklung des Gubernaculums führt und damit den Descensus der Ovarien induziert. Zu diesem Zweck wurden transgene Mäuse hergestellt, in denen *Ins13* unter der Kontrolle des *Insulin II*-Promoters steht.

Darüberhinaus sollten Fragen zur Regulation des *Ins13* Gens bearbeitet werden. Hierbei wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente mit transgenen Mäusen durchgeführt.

- Weibliche *Ins12/Ins13* transgene Tiere weisen bilaterale Inguinalhernien auf (Abb. 8C). Dieser Phänotyp verstärkt sich bei transgenen Weibchen nach der dritten postnatalen Woche. In allen transgenen Weibchen sind die aus den Müllerschen Gängen abgeleiteten Genitalorgane gut entwickelt und formen den Oviduct, den Uterus und die obere Vagina, während die aus den Wolfschen Gängen abgeleiteten Genitalorgane fehlen (Abb. 8I). Dies kann durch die Abwesenheit von Androgenen bzw. durch die fehlende Wirkung des Anti-Müller-Hormons in transgenen Weibchen erklärt werden.
- Die Ovarien sind oberhalb der Blase lokalisiert und durch das gut entwickelte Cranial suspensory ligament (CSL) sowie durch das Gubernaculum mit dem Abdomen verbunden (Abb. 8I). Die Entwicklung beider Ligamente in transgenen Weibchen verhindert den Abstieg der Ovarien in einen entwickelten *Processus vaginalis*.
- Unter dem Einfluss von Dihydrotestosteron während der Schwangerschaft wandern die Ovarien behandelter Weibchen in die Inguinalhernie. Damit wurde gezeigt, dass die Regression des CSL durch den Einfluss von Androgen den Abstieg der Ovarien verursacht.
- Die Fertilität transgener Weibchen ist reduziert und wird durch den Tod der Embryonen in der Mitte der Schwangerschaft verursacht. Es ist möglich, dass

die hohen Mengen an Insl3-Protein im transgenen Pankreas die indirekte Ursache für den Tod der Embryonen im Uterus sind.

- Die Wirksamkeit des transgenen Allels beim Descensus testis in *Insl3*-defizienten Männchen wurde in *Insl2-Insl3* transgenen *Insl3*^{-/-} Männchen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass das im Pankreas produzierte Insl3-Protein den cryptorchiden Phänotyp in *Insl3*-defizienten männlichen Mäusen aufheben kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass β -Zellen einen Enzymmechanismus besitzen, der pro-*Insl3* zu aktivem Protein prozessieren kann. Außerdem weisen die Ergebnisse auf einen endokrinen Sekretionsweg von *Insl3* hin. Die vorübergehende Zunahme der *Insl3* Expression während der postnatalen Entwicklung beeinflusst die Fertilität männlicher Mäuse nicht.
- Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *cis*-agierendes Element innerhalb der 160 Bp Promotorregion identifiziert (Abb. 11) und charakterisiert. Es wurde dabei in Gel Retardation Assays mit Kernproteinen verschiedener Zelllinien und somatischen Geweben gezeigt, dass transagierende Proteine an die M2 Box binden. Es wurde außerdem die Bindungsspezifität der M2 bindenden Proteine an das Promoterfragment B5/1 nachgewiesen. Dadurch wurde gezeigt, dass die in den Fragmenten B5/1m2 und B5/1m3 mutierten Basen (Abb. 12) an der Bildung der DNA/Protein-Komplexe beteiligt sind.
- Untersuchungen der Luciferaseaktivität in MA10 Zellen durch verschiedene *Insl3*/Luciferasekonstrukte führt zur Annahme, dass an das Sequenzelement M2 ein putatives Repressorprotein bindet.
- Das an die M2-Box bindende transagierende Protein wurde als Expressionsprodukt des *Hsp110*-verwandten, testisprominent exprimierten Gens *Apg-1* identifiziert.
- Um diese Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen, wurden transgene Mäuse generiert, die zwei unterschiedlich lange Fragmente der 5`-flankierenden Region des *Insl3* Gens vor dem Gen der bakteriellen Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) im Genom inseriert (Abb. 21) haben. Dabei zeigte sich, dass für eine Transaktivierung des *Insl3* Gens *in vivo* regulatorische Elemente außerhalb der 160 Bp 5`-flankierenden Region notwendig sind.

- Die subzelluläre Lokalisation eines Apg-1/GFP Fusionsproteins erbrachte sowohl ein Vorhandensein im Cytoplasma als auch im Zellkern. Damit kommt es als transagierendes Protein für eine Bindung mit dem *Insl3*-Promoter in Frage.
- Die Bindungsspezifität des Fusionsproteins an das *cis*-agierende *Insl3*-Promotorfragment M2 konnte eindeutig nachgewiesen werden.
- Untersuchungen zur temperaturabhängigen Expression des *Apg-1* Gens während des *Descensus testis* liefern einen Hinweis auf die Funktion von Apg-1 als Repressor des *Insl3* Gens.

6 Literatur

Adham, I. M., E. Burkhardt, M. Benahmed und W. Engel (1993). Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J Biol Chem* **268** (35): 26668-72.

Adham, I. M. (2001). Habilitation, Universität Göttingen

Adham, I. M., J. M. Emmen und W. Engel (2000). The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position. *Mol Cell Endocrinol* **160** (1-2): 11-6.

Adham, I. M., G. Steding, T. Thamm, E. E. Bullesbach, C. Schwabe, I. Paprotta und W. Engel (2002). The overexpression of the insl3 in female mice causes descent of the ovaries. *Mol Endocrinol* **16** (2): 244-52.

Ascolim M. (1981). Characterisation of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* **108**: 88-95

Ausubel, F. M. (1995). Current protocols in molecular biology. *Wiley & Sons Inc. New York*.

Baumans, V., G. Dijkstra und C. J. Wensing (1983). The role of a non-androgenic testicular factor in the process of testicular descent in the dog. *Int J Androl* **6** (6): 541-52.

Bell, G. I., J. P. Merryweather, R. Sanchez-Pescador, M. M. Stempien, L. Priestley, J. Scott und L. B. Rall (1984). Sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin-like growth factor II. *Nature* **310** (5980): 775-7.

- Bell, G. I., W. F. Swain, R. Pictet, B. Cordell, H. M. Goodman und W. J. Rutter (1979). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding human preproinsulin. *Nature* **282** (5738): 525-7.
- Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100** : 243-55.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7** (6): 1513-23.
- Blundell, T. L. und R. E. Humbel (1980). Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* **287** (5785): 781-7.
- Bolivar, F. und K. Backman (1979). Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. *Methods Enzymol* **68** : 245-67.
- Boocock, G. R. und P. J. Todd (1985). Inguinal hernias are common in preterm infants. *Arch Dis Child* **60** (7): 669-70.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** : 248-54.
- Brinster, R. L., H. Y. Chen, M. E. Trumbauer, M. K. Yagle und R. D. Palmiter (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82** (13): 4438-42.
- Bronstein, I., J. Fortin, P. E. Stanley, G. S. Stewart und L. J. Kricka (1994). Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal Biochem* **219** (2): 169-81.

Bullesbach, E. E., R. Rhodes, B. Rembiesa und C. Schwabe (1999). The relaxin-like factor is a hormone. *Endocrine* **10** (2): 167-9.

Burkhardt, E., I. M. Adham, B. Brosig, A. Gastmann, M. G. Mattei und W. Engel (1994). Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (INSL3). *Genomics* **20** (1): 13-9.

Byskov, A. G. und Hoyer, P. E. (1988). Embryology of mammalian gonads and ducts. In: Knobil, E., Neill, J., Ewing, L. L., Greenwald, G. S., Marbert, C. L. und Pfaff, D. W. (Hrsg.). The physiology of reproduction. Raven Press, New York.

Cate, R. L., E. G. Ninfa, D. J. Pratt, D. T. MacLaughlin und P. K. Donahoe (1986). Development of mullerian inhibiting substance as an anti-cancer drug. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51** (Pt 1): 641-7.

Chassin, D., A. Laurent, J. L. Janneau, R. Berger und D. Bellet (1995). Cloning of a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta. *Genomics* **29** (2): 465-70.

Chen, W. S., K. Manova, D. C. Weinstein, S. A. Duncan, A. S. Plump, V. R. Prezioso, R. F. Bachvarova und J. E. Darnell, Jr. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* **8** (20): 2466-77.

Chien, A., D. B. Edgar und J. M. Trela (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* **127** (3): 1550-7.

Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** (1): 156-9.

Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16** (20): 9677-86.

Conklin, D., C. E. Lofton-Day, B. A. Haldeman, A. Ching, T. E. Whitmore, S. Lok und S. Jaspers (1999). Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily. *Genomics* **60** (1): 50-6.

Costa, G. L., A. Grafsky und M. P. Weiner (1994). Cloning and analysis of PCR-generated DNA fragments. *PCR Methods Appl* **3** (6): 338-45.

Dagert, M. und S. D. Ehrlich (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* **6** (1): 23-8.

de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski und S. Subramani (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7** (2): 725-37.

Denhardt, D. T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **23** (5): 641-6.

Deryckere, F. und F. Gannon (1994). A one-hour minipreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques* **16** (3): 405.

Dull, T. J., A. Gray, J. S. Hayflick und A. Ullrich (1984). Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature* **310** (5980): 777-81.

Dynan, W. S. und R. Tjian (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* **316** (6031): 774-8.

Emmen, J. M., A. McLuskey, I. M. Adham, W. Engel, M. Verhoef-Post, A. P. Themmen, J. A. Grootegoed und A. O. Brinkmann (2000). Involvement of insulin-like

factor 3 (Ins13) in diethylstilbestrol- induced cryptorchidism. *Endocrinology* **141** (2): 846-9.

Emmen, J. M., A. McLuskey, J. A. Grootegoed und A. O. Brinkmann (1998). Androgen action during male sex differentiation includes suppression of cranial suspensory ligament development. *Hum Reprod* **13** (5): 1272-80.

Feinberg, A. P. und B. Vogelstein (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132** (1): 6-13.

Gershoni, J. M. und G. E. Palade (1982). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal Biochem* **124** (2): 396-405.

Gorlov, I. M., Kamat, A., Bogatcheva, N. V., Jones E., Lamb D. J., Truong A., Bishop C. E., McElreavey K. and Agoulnik A. I. (2002). Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism. *Hum Mol Genet.* **11** (19): 2309-18.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166** (4): 557-80.

Hanes, J., J. Freudenstein, G. Rapp und K. H. Scheit (1992). Construction of a plasmid containing the complete coding region of human elongation factor 2. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373** (4): 201-4.

Heyns, C. F. und J. M. Hutson (1995). Historical review of theories on testicular descent. *J Urol* **153** (3 Pt 1): 754-67.

Hodge, R. (1994). Preparation of RNA gel blots. *Methods Mol Biol* **28** : 49-54.

Honda, S., K. Morohashi, M. Nomura, H. Takeya, M. Kitajima und T. Omura (1993). Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* **268** (10): 7494-502.

Hsieh-Li, H. M., D. P. Witte, M. Weinstein, W. Branford, H. Li, K. Small und S. S. Potter (1995). Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* **121** (5): 1373-85.

Hudson, P., J. Haley, M. John, M. Cronk, R. Crawford, J. Haralambidis, G. Tregear, J. Shine und H. Niall (1983). Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature* **301** (5901): 628-31.

Hutson, J. M. (1986). Testicular feminization: a model for testicular descent in mice and men. *J Pediatr Surg* **21** (3): 195-8.

Hutson, J. M. (1987). Exogenous oestrogens prevent transabdominal testicular descent in mice and men. *J Pediatr Surg* **21**: 195-198

Hutson, J. M. und S. W. Beasley (1988). Embryological controversies in testicular descent. *Semin Urol* **6** (2): 68-73.

Hutson, J. M., S. Hasthorpe und C. F. Heyns (1997). Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev* **18** (2): 259-80.

Ikeda, Y. (1996). SF-1: a key regulator of development and function in the mammalian reproductive system. *Acta Paediatr Jpn* **38** (4): 412-9.

Jain, V. K. und I. T. Magrath (1991). A chemiluminescent assay for quantitation of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of beta-galactosidase in lacZ-transfected cells. *Anal Biochem* **199** (1): 119-24.

Jansen, M., F. M. van Schaik, A. T. Ricker, B. Bullock, D. E. Woods, K. H. Gabbay, A. L. Nussbaum, J. S. Sussenbach und J. L. Van den Brande (1983). Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* **306** (5943): 609-11.

Johnson, K. R. (1991). Improved oligonucleotide labeling and hybridization assay for endogenous nonectropic murine leukemia proviruses. *Mamm Genome* **1** (4): 260-2.

Jones, N. C., P. W. Rigby und E. B. Ziff (1988). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev* **2** (3): 267-81.

Jost, A. (1953). Studies on sex differentiation in mammals. *Rec. Prog. Horm. Res.* **8**: 379-418

Kaneko, Y., H. Nishiyama, K. Nonoguchi, H. Higashitsuji, M. Kishishita und J. Fujita (1997). A novel hsp110-related gene, apg-1, that is abundantly expressed in the testis responds to a low temperature heat shock rather than the traditional elevated temperatures. *J Biol Chem* **272** (5): 2640-5.

Kapur, P., M. G. Caty und P. L. Glick (1998). Pediatric hernias and hydroceles. *Pediatr Clin North Am* **45** (4): 773-89.

Kieback, D. G., T. Levi, P. Kohlberger, U. Fiedrich, M. F. Press, H. E. Rosenthal, V. J. Mobus, I. B. Runnebaum, X. W. Tong und M. J. Tsai (1996). Chicken ovalbumin upstream promoter--transcription factor (COUP-TF) expression in human endometrial cancer cell lines. *Anticancer Res* **16** (6B): 3371-6.

Kimura, M., A. Lukinius, J. L. Ericsson und L. Grimelius (1992). Distribution of insulin binding sites on Leydig cells of rat testes using insulin-coated gold particles. *Histochemistry* **97** (3): 213-20.

- Koopman, P., A. Munsterberg, B. Capel, N. Vivian und R. Lovell-Badge (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* **348** (6300): 450-2.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (259): 680-5.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch und A. Berns (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19** (15): 4293.
- Leydig, F. (1850). Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Analdrüsen der Säugetiere. *Z.Wiss.Zool.* **2**: 1-57.
- Loh, E. Y., J. F. Elliott, S. Cwirla, L. L. Lanier und M. M. Davis (1989). Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science* **243** (4888): 217-20.
- Lok, S., D. S. Johnston, D. Conklin, C. E. Lofton-Day, R. L. Adams, A. C. Jelmberg, T. E. Whitmore, S. Schrader, M. D. Griswold und S. R. Jaspers (2000). Identification of INSL6, a new member of the insulin family that is expressed in the testis of the human and rat. *Biol Reprod* **62** (6): 1593-9.
- Luo, X., Y. Ikeda und K. L. Parker (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77** (4): 481-90.
- Ma, L., G. V. Benson, H. Lim, S. K. Dey und R. L. Maas (1998). Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Dev Biol* **197** (2): 141-54.

Mahendroo, M. S., K. M. Cala, D. P. Landrum und D. W. Russell (1997). Fetal death in mice lacking 5alpha-reductase type 1 caused by estrogen excess. *Mol Endocrinol* **11** (7): 917-27.

McMahon, D. R., S. A. Kramer und D. A. Husmann (1995). Antiandrogen induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididymal malformations. *J Urol* **154** (2 Pt 1): 553-7.

Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* **101** : 20-78.

Morohashi, K., S. Honda, Y. Inomata, H. Handa und T. Omura (1992). A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem* **267** (25): 17913-9.

Morohashi, K., H. Iida, M. Nomura, O. Hatano, S. Honda, T. Tsukiyama, O. Niwa, T. Hara, A. Takakusu, Y. Shibata und et al. (1994). Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. *Mol Endocrinol* **8** (5): 643-53.

Mucenski, M. L., K. McLain, A. B. Kier, S. H. Swerdlow, C. M. Schreiner, T. A. Miller, D. W. Pietryga, W. J. Scott, Jr. und S. S. Potter (1991). A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65** (4): 677-89.

Murray, N. E., W. J. Brammar und K. Murray (1977). Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol Gen Genet* **150** (1): 53-61.

Nef, S. und L. F. Parada (1999). Cryptorchidism in mice mutant for *Insl3*. *Nat Genet* **22** (3): 295-9.

O'Shaughnessy, P. J. und J. W. Sheffield (1991). Effect of temperature and the role of testicular descent on post-natal testicular androgen production in the mouse. *J Reprod Fertil* **91** (1): 357-64.

Oudesluys-Murphy, A. M., H. T. Teng und H. Boxma (2000). Spontaneous regression of clinical inguinal hernias in preterm female infants. *J Pediatr Surg* **35** (8): 1220-1.

Patel, D. J., S. A. Kozlowski, S. Ikuta und K. Itakura (1984). Dynamics of DNA duplexes containing internal G.T, G.A, A.C, and T.C pairs: hydrogen exchange at and adjacent to mismatch sites. *Fed Proc* **43** (11): 2663-70.

Pour, P. M. und R. E. Hauser (1987). Exocrine secretion of pancreatic hormones: possible mechanisms. *Int J Pancreatol* **2** (4): 277-87.

Rapp, G., J. Klaudiny, G. Hagendorff, M. R. Luck und K. H. Scheit (1989). Complete sequence of the coding region of human elongation factor 2 (EF- 2) by enzymatic amplification of cDNA from human ovarian granulosa cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* **370** (10): 1071-5.

Rice, D. A., A. R. Mouw, A. M. Bogerd und K. L. Parker (1991). A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol* **5** (10): 1552-61.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239** (4839): 487-91.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A Laboratorial manual. Zweite Auflage. *Cold Spring Harbour, New York, USA*.

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (12): 5463-7.

Satokata, I., G. Benson und R. Maas (1995). Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* **374** (6521): 460-3.

Schafer, A. J. und P. N. Goodfellow (1996). Sex determination in humans. *Bioessays* **18** (12): 955-63.

Schmidt, T. G., J. Koepke, R. Frank und A. Skerra (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* **255** (5): 753-66.

Schöttler, P. (1996). Diplomarbeit, Universität Göttingen.

Schwärzler, A. (1997). Diplomarbeit, Universität Göttingen

Seipp, S. und W. Buselmaier (1994). Isolation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) cDNA from the distal half of mouse chromosome 16: further indication of a link between Alzheimer's disease and glycolysis. *Neurosci Lett* **182** (1): 91-4.

Shen, W. H., C. C. Moore, Y. Ikeda, K. L. Parker und H. A. Ingraham (1994). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* **77** (5): 651-61.

Skinner, M. A. und J. L. Grosfeld (1993). Inguinal and umbilical hernia repair in infants and children. *Surg Clin North Am* **73** (3): 439-49.

Sladek, F. M. (1993). Orphan receptor HNF-4 and liver-specific gene expression. *Receptor* **3** (3): 223-32.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98** (3): 503-17.

Strickland, S. und V. Mahdavi (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15** (2): 393-403.

Tashima, L. S., A. D. Hieber, F. C. Greenwood und G. D. Bryant-Greenwood (1995). The human Leydig insulin-like (hLEY I-L) gene is expressed in the corpus luteum and trophoblast. *J Clin Endocrinol Metab* **80** (2): 707-10.

Teitelman, G. und J. K. Lee (1987). Cell lineage analysis of pancreatic islet development: glucagon and insulin cells arise from catecholaminergic precursors present in the pancreatic duct. *Dev Biol* **121** (2): 454-66.

Thamm, T. (1998). Diplomarbeit, Universität Göttingen

Thompson, T. A., M. N. Gould, J. K. Burkholder und N. S. Yang (1993). Transient promoter activity in primary rat mammary epithelial cells evaluated using particle bombardment gene transfer. *In Vitro Cell Dev Biol* **29A** (2): 165-70.

Toppari, J. und M. Kaleva (1999). Maldescendus testis. *Horm Res* **51** (6): 261-9.

Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (9): 4350-4.

van der Schoot, P. und W. Elger (1992). Androgen-induced prevention of the outgrowth of cranial gonadal suspensory ligaments in fetal rats. *J Androl* **13** (6): 534-42.

Vogelstein, B. und D. Gillespie (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (2): 615-9.

Voss, S. und A. Skerra (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* **10** (8): 975-82.

Weber, K. und M. Osborn (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* **244** (16): 4406-12.

Wensing, C. J. (1986). Testicular descent in the rat and a comparison of this process in the rat with that in the pig. *Anat Rec* **214** (2): 154-60.

Weston, K. (1999). Reassessing the role of C-MYB in tumorigenesis. *Oncogene* **18** (19): 3034-8.

Yoshinari, M. und S. Daikoku (1982). Ontogenetic appearance of immunoreactive endocrine cells in rat pancreatic islets. *Anat Embryol (Berl)* **165** (1): 63-70.

Zimmermann, S. (1997). Doktorarbeit, Universität Göttingen

Zimmermann, S., P. Schottler, W. Engel und I. M. Adham (1997). Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development. *Mol Reprod Dev* **47** (1): 30-8.

Zimmermann, S., A. Schwarzler, S. Buth, W. Engel und I. M. Adham (1998). Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Mol Endocrinol* **12** (5): 706-13.

Zimmermann, S., G. Steding, J. M. Emmen, A. O. Brinkmann, K. Nayernia, A. F. Holstein, W. Engel und I. M. Adham (1999). Targeted disruption of the *Insl3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol* **13** (5): 681-91.

Zwingman, T., R. P. Erickson, T. Boyer und A. Ao (1993). Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (3): 814-7.

7 Anhang

Publikationen

The overexpression of the insl3 in female mice causes descent of the ovaries.

Adham, I. M., G. Steding, T. Thamm, E. E. Bullesbach, C. Schwabe, I. Paprotta und W. Engel (2002).

Mol Endocrinol **16** (2): 244-52.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. W. Engel für die Überlassung des interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken. Weiterhin danke ich Ihm für die schnelle Korrektur des Manuskripts und seine Aufmunterung in kritischen Phasen dieser Dissertation.

Herrn PD Dr. Ibrahim Adham danke ich für ständige Ansprechbarkeit, Hilfsbereitschaft und engelsgleiche Geduld bei all meinen Fragen und Problemen. Seine zahlreichen Ideen und Anregungen trugen entscheidend zu meiner Motivation und zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Dr. Riedesel und Frau S. Schmidt des Max Planck-Instituts für Experimentelle Medizin danke ich für die methodische Unterstützung im Rahmen der Erzeugung transgener Mäuse und der *Ins13* defizienten knock-out Maus.

Den Mitgliedern des Labors 125 danke ich für die stets gute Arbeitsatmosphäre und die Toleranz gegenüber meinen Launen und Macken.

Danke an alle übrigen Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik für die warme Herzlichkeit und freundliche Unterstützung in allen methodischen und theoretischen Fragen. Insbesondere danke ich Dr. Peter Burfeind, Dr. Jürgen Neesen, Dr. Gregor Schlüter, Dr. Ulrich Sancken und PD Dr. Jürgen Kohlhase für die stete Diskussionsbereitschaft und hilfreiche Tipps.

Christian Schlittchen, Enno Rehling und Katja Zedel danke ich für Ihr wundervolles Programm und so manchen Ausflug in virtuelle Realitäten.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die großzügige Alimentation und Toleranz gegenüber meiner ständigen Abwesenheit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Tarvo Thomas Olavi Thamm geboren am 8. November 1970 in Osnabrück als einziges Kind der Eheleute Dietrich Thamm und Britta Thamm, geb. Salo
Ausbildung:	
August 1977 - Juli 1981	Besuch der Grundschule Haste in Osnabrück
August 1981 - Juli 1983	Besuch der Orientierungstufe Thomas-Morus- Schule in Osnabrück
August 1983 - Mai 1990	Besuch des Gymnasiums Carolinum in Osnabrück
Oktober 1990 - Oktober 1991	Wehrdienst in der Stabskompanie des 1. Heereskorps Münster
ab Oktober 1991	Studium der Biologie an der Universität Osnabrück
Juni 1993	Diplomvorprüfung in den Fächern Botanik, Chemie, Physik und Genetik
März 1996 - Dezember 1996	Praktikum am Institut für medizinische Genetik der städtischen Kliniken Osnabrück
März 1997- Dezember 1998	Experimentelle Arbeiten zur Diplomarbeit am Institut für Humangenetik in Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. W. Engel mit dem Thema: „Untersuchungen zur Regulation der Expression

des Ley I-L Hormongens bei der Maus (*Mus musculus*)“

Januar 1998

Diplomprüfung in den Fächern Pflanzenphysiologie, Genetik und Mikrobiologie

ab März 1998

Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. W. Engel, wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Humangenetik in Göttingen

Eidesstattliche Erklärung: Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Göttingen, den 16.12.2002

(Tarvo Thamm)