Isolierung und Charakterisierung des testisspezifisch exprimierten Gens HASH der Maus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Changkyu Oh
aus Hongsung, Korea

Göttingen 2000

D7

Referent: Prof. Dr. W. Engel

Koreferent: Prof. Dr. U. Grossbach

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2000

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis 3

Verzeichnis der Abbildungen 8

Verzeichnis der Tabellen 9

I. Einleitung 10

1. Spermatogenese und Genexpression 10

2. Das HASH-Gen 12

3. Ziele der vorliegenden Arbeit 13

II. MATERIAL UND METHODEN 14

1. Chemikalien 14

2. Gebrauchswaren 16

3. Sterilisation 17

4. Puffer und Stammlösungen 17

5. Medien, Agarplatten und Antibiotika 22

5.1. Medien für Bakterien und Phagen 22

5.2. Antibiotika 22

5.3. X-Gal-Platten 23

5.4. Medien für Zellkultur 23

6. Verwendete Bakterienstämme, Vektoren, Gensonden, Bibliotheken und Zellinien 24

6.1. Bakterienstämme 24

6.2. Plasmide, Phagemide und Lamda-Vektor 24

6.3. Synthetische Oligonukleotide 25

6.4. Gensonde 25

6.5. Bibliotheken 25

6.6. Eukaryotische Zell-Linien 26

7. Mausstämme 26

8. Standardmethoden und –reaktionen in der Molekularbiologie 27

9. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren 27

9.1. Minipräparation von Plasmid-DNA 27

9.2. Plasmid-Minipräparation nach Qiagen-Protokoll 28

9.3. Maxipräparation von Plasmid-DNA 28
9.4. Maxipräparation von Plasmid-DNA über einen CsCl-Gradienten 29
9.5. Isolierung von Phagen-DNA 30
9.6. Isolierung genomischer DNA aus Organen 32
9.7. Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben 32
9.8. Isolierung von Poly $(A)^+$-RNA 33
9.9. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA 34

10. Enzymatische Modifikation von DNA: Klonierungstechniken 35
10.1. Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA 35
10.2. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA 35
10.3. Ligation eines DNA-Inserts in einen Plasmid-Vektor 36
10.4. Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation 36
10.5. Transformation von Bakterien 36

11. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 37
11.1. Horizontalgelelektrophorese 37
11.2. Vertikalgelelektrophorese 38
11.3. Elektrophorese von RNA im Agarosegel 38
11.4. Längenstandards 39

12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel 39
12.1. Isolierung von DNA-Fragmenten mit der "Geneclean"-Methode 39
12.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen 40

13. Transfertechniken von Nukleinsäuren 40
13.1. Transfer von DNA-Fragmenten: Southern-Blotting 40
13.2. Transfer von RNA aus Agarosegelen (Northern-Blotting) 41

14. Radioaktive Markierung von DNA 41
14.1. "random priming" 41
14.2. Endmarkierung von Oligonukleotiden 42
14.3. Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden und sythetischer Oligonukleotide 43

15. Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundene DNA oder RNA 43

16. Isolierung rekombinanter Klone aus einer Phagen-Bibliothek 44
16.1. Titerbestimmung der Phagen-Bibliothek 44
16.2. Ausplattieren der Phagen-Bibliothek 45
16.3. Transfer und Behandlung der Phagen auf Nitrocellulosefilter 45
16.4. Anreicherung und Isolierung der positiven, rekombinanten Phagen 46
16.5. Anlegen eines Phgenstocks 46

17. Methoden der "Polymerase Chain Reaction" (PCR) 47
17.1. PCR an Plasmid-DNA 47

17.2. PCR an genomischer DNA 48
17.3. "Reverse PCR" (RT-PCR) 49

18. MARATHON RACE-PCR 50
18.1. Konstruktion von MARATHON cDNA-Banken 50
18.2. Synthese der MARATHON cDNA-Banken 50
18.3. Screening der MARATHON cDNA-Banken 52

19. Sequenzierungsanalyse 53
19.1. Sequenzierungsreaktion 53
19.2. Sequenzierung-PCR 53
19.3. PAGE-Gel für die automatische Sequenzierung 54

20. Primer Extension Analyse 55

21. Verdauung der Poly (A)$^+$ - Schwanz von Gesamt-RNA 56

22. Herstellung von Paraffinschnitten aus Geweben, Organen und Embryonen 56

23. ´whole mount´ -*in situ*-Hybridisierung 58
23.1. Präparation der Maus-Embryonen 58
23.2. Vorbehandlung der Embryonen 58
23.3. Synthese von RNA-Proben: DIG-Markierung 59
23.4. Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden 60
23.5. Waschen nach der Hybridisierung 60
23.6. Detektion der Hybridisierungssignale 61

24. Proteinchemische Techniken 62
24.1. Isolierung von Gesamtprotein aus Gewebe 62
24.2. SDS-Polyacrylamidgel 62
24.3 ´Semi dry blot´ 63
24.4. Färbung von Polyacrylamidgelen 64
24.5. Reversible Färbung von ´Western blots´ 64
24.6. Immunumsetzung von Proteinfiltern 65
24.7. Immunlokalisierung von Proteinen in Paraffinschnitten 65

25. Herstellung des polyklonalen Antikörpers gegen das HASH-Peptid 66
25.1. Kopplung des synthetischen Peptids an BSA 66
25.2. Gewinnung eines polyklonalen Antiserums 66
25.3. Aufreinigung monospezifischer Antikörper 67

26. Techniken zur Herstellung von ´Knock out´-Mäusen 68
26.1. Routinekultur von ES-zellen 68
26.2. Elektroporation und Selektion von ES-Zellen 69
26.3. Isolierung von ES-Zellklonen und deren Kryokonservierung 69

26.4. Isolierung von 2.5 Tage alten Mausembryonen 70
26.5. Aggregation von ES-Zellen 71
26.6. Embryo-Transfer in pseudoträchtige Mäuse 72
26.7. Identifizierung von Chimären 72

***III. Ergebnisse* 73**

1. Isolierung der HASH-cDNA der Maus 73

2. Charakterisierung und Vervollständigung der HASH-cDNA der Maus 73
2.1. Expressionsanalyse des HASH-Gens der Maus 73
2.1.1. Expression des HASH-Gens in verschiedenen adulten Geweben 73
2.1.2. Expression des HASH-Gens während der Testisentwicklung 75
2.1.3. Analyse der Expression des HASH-Gens in Testes von verschiedenen Mausmutanten mit Keimzelldefekten 76
2.1.4. Embryonale Expression des HASH-Gens der Maus 77
2.1.4.1. Untersuchung der Expression des HASH-Gens während der Embryonalenentwicklung mittels RT-PCR 77
2.1.4.2. Identifizierung des Expressionsmusters des HASH-Gens während der Embryonalenentwicklung mittels ´whole mount´- *in situ*-Hybridisierung 79
2.2. Untersuchung zum alternativen Spleißen 81
2.2.1. Identifizierung der Länge der Poly(A)-Schwänze der drei HASH-Transkripte 81
2.2.2. 3´-alternatives Spleißen 83
2.2.3. Amplifikation der verschiedenen Exon-spezifischen cDNA-Fragmente mittels PCR bzw. RT-PCR 84
2.2.4. Northern-Blot-Analysen mit den verschiedenen Exon-spezifischen cDNA-Fragmenten 85
2.3. Versuche zur Identifizierung des 5´-Endes der drei HASH-mRNAs mit Hilfe der Marathon-RACE-PCR 87
2.3.1. Versuch zur Isolierung des 5´-Endes der HASHsoma 87
2.3.2. Versuch zur Isolierung des 5´-Endes der HASHgerm1.8 91
2.3.3. Versuch zur Isolierung des 5´-Endes der HASHgerm1.2 93
2.4. cDNA Struktur der drei HASH-Transkripte 95
2.5. Nukleotid- und Aminosäuresequenz der HASH-cDNA der Maus 96
2.6. Identifizierung des Translationsproduktes der HASH-mRNAs 99

3. Isolierung und Charakterisierung der genomischen HASH-Klone der Maus 102
3.1. Screenen der Phagen-Bibliothek mit dem cDNA-Fragment für Exon 3 und 4 102
3.2. Versuche zur Isolierung der Promotorregionen des HASH-Gens der Maus 106
3.2.1. Screenen der Cosmid-Bibliothek mit Exon 1 106
3.2.2. Screenen der Cosmid-Bibliothek mit dem cDNA-Fragment E8 108
3.3. Isolierung eines genomischen HASH Klons aus einer RZPD-Human-P1-Bibliothek 110
3.4. Chromosomale Lokalisation des HASH-Gens des Menschen 111

4. Herstellung HASH-defizienter Mäuse 113

4.1. Die Strategie zur Deletion des HASH-Gens der Maus 113

4.2. Isolierung und Klonierung des 5´-flankierenden Fragments 115

4.3. Isolierung und Klonierung des 3´-flankierenden Fragments 116

4.4. Isolierung und Klonierung der externen 5´-Sonde 118

4.5. Analyse der selektierten ES-Zellen nach Elektroporation 118

4.6. Aggregation bzw. Blastocysteninjektion von ES-Zellen 121

4.7. Statistische Analyse der Nachkommen mittels PCR 123

4.8. Genotypisierung von Nachkommen durch Southern-Blot-Analyse 126

4.9. Erklärung des Ereignisses in Genom der Versuchsmäuse 128

4.9.1. Southern-Blot-Hybridisierung mit der internen Probe 128

4.9.2. Integration des Konstrukts innerhalb des 5´-flankierenden Bereichs 129

4.10. Weitere Versuche zur Herstellung der homozygoten $HASH^{-/-}$-Mäuse 130

IV. Diskussion 131

1. Analyse der HASH-cDNAs der Maus 131

2. Analyse der Primärstruktur des HASH-Proteins der Maus 135

3. Expressionsanalyse des HASH-Gens in der Maus 139

4. Charakterisierung putativer Promotoren im HASH-Gen 142

5. Chromosomale Lokalisation des HASH-Gens des Menschen 147

6. Alternatives Spleißen der HASH-mRNAs 147

7. Versuch zur Herstellung von $HASH^{-/-}$-Knock out-Mäusen 149

7.1. Insertion des Konstruktes innerhalb des 5´-flankierenden Bereiches 151

7.2. Phänotyp der $HASH^{neo/neo}$-Insertionsmutante 154

V. Zusammenfassung 157

VI. Literatur 159

VII. Anhang 174

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide 174

Abkürzungen 175

Symbole für Aminosäuren 178

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1: Gewebespezifische Expression des HASH-Gens der Maus.....74
Abb. 2: Northern-Blot-Analyse der Expression des HASH-Gens der Maus in der postnatalen Testisentwicklung. 75
Abb. 3: Northern-Blot-Analyse zur Expression des HASH-Gens im Testis von verschiedenen Mutanten mit Keimzelldefekten. 77
Abb. 4: Expressionsanalyse des HASH-Gens der Maus während der Embryonalentwicklung mittels RT-PCR. 78
Abb. 5: ´Whole mount´-in situ-Hybridisierung. 80
Abb. 6: Northern-Blot-Hybridisierung zur Identifizierung der Größe bzw. der Länge des Poly(A)-Schwanzes der drei HASH-Transkripte der Maus. 82
Abb. 7: Schematische Darstellung der durch PCR amplifizierten, Exon-spezifischen Fragmente. 84
Abb. 8: Northern-Blot-Analyse zur Erklärung des alternativen Spleißen. 85
Abb. 9: Schematische Darstellung der zur Amplifikation des 5´-Endes der HASHsoma verwendeten Primer.....88
Abb. 10: Amplifikation des 5´-Endes der HASHsoma mit Hilfe der Marathon-PCR. 89
Abb. 11: Neue cDNA Information von 5´-Upstream des Exons 1 und Northern-Blot-Analyse 90
Abb. 12: Schematische Darstellung der zur Amplifikation des 5´-Endes der HASHgerm1.8 verwendeten Primern. 92
Abb. 13: Schematische Darstellung der zur Amplifikation des 5´-Endes der HASHgerm1.2 verwendeten Primern. 93
Abb. 14: Neue cDNA Information von 5´-Upstream des Exons 8 und Northern-Blot-Analyse. 94
Abb. 15: Schematische Darstellung der cDNA Struktur der drei HASH-Transkripte. 95
Abb. 16: Nukleotidsequenz der HASH-cDNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das HASH-Protein der Maus. 99
Abb. 17: Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen HASH-Antiserum..... 100
Abb. 18: Hybridisierungen der Restriktionsfragmente des genomischen Phagenklon hgmATG (A, B) und des Plasmidklons pZErO-hgmATG (C, D). 103
Abb. 19: Restrktionskarte und genomische Organisation des genomischen Klons pZErO-hgmATG und pZErO-K. 105
Abb. 20: Hybridisierung der Restriktionsfragmente der genomischen Cosmidklone Hcos-A und -B. 107
Abb. 21: Southern-Blot-Analyse des genomischen Cosmidklons Hcos-D. 109
Abb. 22: Hybridisierung des humanen genomischen P1-Klons hH1..... 110
Abb. 23: Chromosomale Lokalisation des HASH-Gens des Menschen..... 112
Abb. 24: Strategie zur Deletion des HASH-Gens der Maus. 114
Abb. 25: Restriktionsenzymatischer Nachweis der Orientierung des 5´-flankierenden Fragments im pPNT-Vektor. 116
Abb. 26: Restriktionsenzymatischer Nachweis der Umklonierung des 3´-flankierenden Fragments im

pPNT-H-5´ 117
Abb. 27: Southern-Blot-Analyse mit DNA positiver ES-Zellklone nach Elektroporation mit dem Targeting-Vektor pPNT-DHASH. 120
Abb. 28: Genotypisierung der Nachkommen der Chimäre #18 durch PCR (Hintergrund NMRI). 122
Abb. 29: Genotypisierung der 10.5 Tage alten Embryonen eines Wurfes der F2-Generation durch Southern-Blot-Analyse. 125
Abb. 30: Southern-Blot-Analyse zur Genotypisierung der F2-Generation (Hintergrund NMRI). 126
Abb. 31: Southern-Blot-Hybridisierung mit der internen Probe HIP. 129
Abb. 32: Vergleich der aus den cDNA-Sequenzen des HASH-Gens von Maus, Ratte und des Menschen abgeleiteten Aminosäuresequenzen. 137
Abb. 33: Schematische Darstellung der Lokalisierung der putativen Promoterregionen der drei HASH-Transkripte. 143
Abb. 34: Putative cis-ständige Elemente für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (A) und GATA (B) in der Promotorregion für das 2.6 Kb HASH-Transkript. 145
Abb. 35: Putative cis-ständige Elemente für den Transkriptionsfaktor AP-1 in der Promotorregion für das 1.2 Kb HASH-Transkript. 146
Abb. 36: Schematische Darstellung der Insertion des Konstruktes. 152
Abb. 37: Schematische Darstellung von Integrationsmöglichkeit des Targeting-Vektors. 153
Abb. 38: Abnormalität des Kopfes der 10.5 (A)- und 12.5 (B)-Tage alten HASH$^{neo/neo}$-Embryonen. 155

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Aggregationen bzw. aus den Blastocysteninjektionen. 121
Tab. 2: Quantitative Verteilung von Wildtyp- und heterozygoten Mäusen in der F1-Generation..... 123
Tab. 3: Vergleich der Verteilung von Wildtyp- heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F1- und F2-Generation auf NMRI-Hintergrund. 124
Tab. 4: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-Generation (Hintergrund NMRI). 127
Tab. 5: Zusammenstellung der homologen EST-Klone der HASH-cDNA (Maus, Ratte und Mensch); es wurden die Originaleinträge in den EST-Datenbanken übernommen. 134
Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung des HASH-Proteins der Maus. 136
Tab. 7: Zusammenstellung der putativen Phosphorylierungsstellen des HASH-Proteins. 137
Tab. 8: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-Generation auf dem Hintergrund 129/SvJ (A) und auf dem Hintergrund NMRI (B). 154

I. EINLEITUNG

1. Spermatogenese und Genexpression

Als Spermatogenese bezeichnet man den hochkomplexen Differenzierungsvorgang, in dessen Verlauf, ausgehend von der diploiden Spermatogonie, durch morphologische und funktionelle Veränderungen der Keimzellen reife Spermatozoen entstehen. Diese sind aufgrund ihrer Motilität und genetischen Ausstattung in der Lage, Oozyten zu befruchten und neue Individuen entstehen zu lassen. Die Samenzellbildung findet innerhalb der *Tubuli seminiferi* des Testis statt. Hier bauen die Keimzellen zusammen mit den Sertolizellen, die das somatische Grundgerüst bilden, das Keimepithel auf (Fawcett, 1979). Außerhalb dieser tubulären Strukturen besteht der Testis aus lockerem, interstitiellem Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen, Nervenfasern, intertubulär gelegenen, Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen und peritubulären Myoid-Zellen, welche die Wanderung der reifen Spermatozoen durch das Epithellumen ermöglichen. Im Gegensatz zum Menschen, bei dem der Ablauf der Spermatogenese 64 Tage andauert (Chubb, 1993), erfolgt der Spermatogeneseprozeß bei der Maus, auf die sich im folgenden alle Ausführungen beziehen, innerhalb von etwa 34 Tagen. Bei Säugern läßt sich die Spermatogenese prinzipiell in drei Phasen gliedern: 1) Die Proliferationsphase, in der sich die Spermatogonien durch mehrere mitotische Teilungen vermehren und anschließend zu primären Spermatozyten differenzieren; 2) Die meiotische Phase, in der das genetische Material der Spermatozyten durch ´crossing over´ rekombiniert und halbiert wird; 3) Die postmeiotische Phase (Spermiogenese), in der die haploiden Spermatiden zu befruchtungsfähigen Spermatozoen komplettiert werden (Russel, 1990).

Für den koordinierten Ablauf der Spermatogenese und die Ausbildung der hochspezialisierten Struktur und Funktion der Spermien ist die Expression zahlreicher Spermatogenese-spezifisch exprimierter Gene (etwa 2000) notwendig. Diese Gene können in zwei große Gruppen unterteilt werden: 1. Gene, die diploid exprimiert werden und 2. Gene, die haploid exprimiert werden. Als Beispiele seien das Proakrosingen für diploide Expression (Adham et al., 1989; Kremling et al., 1991; Kashiwabara et.al., 1990) und das Transitionsprotein 2 Gen für die haploide Expression (Luerssen et al., 1989; Kremling et al.,

1989; Kim et al., 1992; Schlüter et al., 1992) genannt. Andere Gene kodieren für keimzellspezifische Isoformen, deren Proteine auch in somatischen Zellen vorhanden sind. Beispiele für diese Gruppe sind die Gene für die Phosphoglyceratkinase-2 (Boer et al., 1987) und für das testisspezifische Isoenzym des ´angiotensin converting enzyme´ (Ehlers et al., 1989). Gene, die sowohl in den Keimzellen als auch in somatischen Organen exprimiert werden, produzieren häufig keimzellspezifische Transkripte. Sie können auf alternatives ´splicing´ der RNA, auf die Nutzung verschiedener Promotoren oder auf alternative Polyadenylierungssignale zurückgeführt werden (Oppi et al., 1987; Howard et al., 1990). Die Expression dieser Gene bleibt während der Spermatogenese häufig auf bestimmte Keimzellstadien beschränkt (Stern et al., 1983; Wilson et al., 1987) und wird sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation kontrolliert (Hecht, 1990; Kleene, 1993; Schäfer et al., 1995).

Die Regulation eines testisspezifisch exprimierten Gens erfordert einen komplexen Kontrollmechanismus. Dabei müssen Faktoren die gewebespezifische als auch entwicklungsspezifische Transkription des Gens gewährleisten. An diesen Prozeß sind sowohl spezifische als auch ubiquitär vorkommende Proteine (´*trans*-acting factors´ oder Transkriptionsfaktoren) beteiligt, die an die Promotorsequenzen des Gens (´*cis*-acting elements´) binden und so die Transkription regulieren (Jones et al., 1988; Mitchell und Tijan, 1989). Gene, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung oder in einem Gewebe gemeinsam exprimiert werden, haben in der Regel in der Promotorregion ´upstream´ des Transkriptionsstartpunktes analoge Sequenzen (Maniatis et al., 1987; Jones et al., 1988; Johnson et al., 1991). Diese *cis*-ständigen Elemente sollten einen essentiellen Einfluß auf das spezifische Expressionsmuster der Gene haben. Der Nachweis der Funktion dieser Sequenzen konnte mittels künstlicher Mutationen in der Protein-Bindungssequenz und dem daraus resultierenden Verlust der Bindungsspezifität erbracht werden (Wirth et al., 1987; Beato, 1989). Bislang wurde eine Vielzahl kurzer DNA-Sequenzen identifiziert, die für die basale Genexpression verantwortlich sind. Die *cis*-regulatorischen Elemente können mehrere *trans*-agierende Faktoren binden und somit die Spezifität der Genexpression wesentlich komplexer gestalten, als dies bei der Interaktion einer DNA-Sequenz mit einem einzigen Protein der Fall ist (Locker und Buzard, 1990). Die Erhöhung der Transkriptionseffizienz wird durch die Interaktion mit weiteren *trans*-agierenden Faktoren bewirkt (Ptashne und Gann, 1990). Bei den Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Proteine, die miteinander und zusätzlich mit der RNA-Polymerase II interagieren können und die Expression von Genen steuern.

2. Das HASH-Gen

Die cDNA für das Gen HASH (*H*anne *A*ho und Rahman *Sh*amsadin) wurde im Rahmen eines Versuches gefunden, bei dem ein Transkriptionsfaktor für das Proakrosingen isoliert werden sollte. Zwar wurde die cDNA durch das Screenen einer Testis-λgt11-Expressionsbibliothek der Ratte mit einem Promotorfragment (F4) des Proakrosingens, an das im ´gel retardation assay´ ein Protein aus Testisextrakten bindet, von Keime (1993) isoliert und weiterhin von Shamsadin (1995) und Aho (1997) charakterisiert. Aber in weiteren ´gel retardation assays´ zur Bestätigung konnten keine spezifische Interaktionen zwischen dem Fragment F4 und den Fusionsproteinen aus HASH-cDNA nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Expressionsanalysen mit HASH-cDNA zeigten jedoch eine testisspezifische Expression des HASH-Gens bei Ratte und Maus. Durch Northern-Blot-Experimente konnte nachgewiesen werden, daß das HASH-Gen in Testis von Ratte und Maus exprimiert ist, und zwar mit drei Transkripten mit eine Länge von 2.9 Kb, 2.3 Kb und 1.5 Kb. Zusätzlich konnte eine schwache Expression des 2.9 Kb Transkriptes in Ovar und Thymus der beiden Spezies und in Placenta der Maus nachgewiesen werden. Auf zellulärer Ebene konnte auch eine Expression für das 2.9 Kb Transkript in diploiden Keimzellen, ES-Zellen, Leydig- und Sertolizellen gezeigt werden. Die 2.3 Kb und 1.5 Kb Transkripte wurden dagegen nur in haploiden Keimzellen gefunden. In weiteren Northern-Blot-Analysen wurde bestätigt, daß die drei Transkripte des HASH-Gens durch alternatives Spleißen entstanden sind. Das HASH-Gen der Ratte wurde mit Hilfe mehrerer HASH-cDNA-Fragmente aus drei verschiedenen genomischen Bänken isoliert. Es konnten 12 Exons und 11 Introns charakterisiert werden. Das HASH-Gen hat eine Größe von über 100 Kb, und es liegt im Rattengenom als ´single copy´-Gen vor. Es wurde auf Chromosom 5 der Ratte, in der Region q34-q35, lokalisiert.

3. Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war eine möglichst detaillierte Charakterisierung des HASH-Gens der Maus.

Zunächst sollten die Sequenzen der HASH-cDNAs bei der Maus vervollständigt, die zugehörigen genomischen Klone isoliert und die genomische Organisation bestimmt werden. Weiterhin sollte die chromosomale Lokalisation des HASH-Gens bei Maus und Mensch identifiziert werden, um so weitere Informationen über das HASH Gen zu erhalten.

Ein weiterer Aspekt war die Analyse der spezifischen Expression in verschiedenen Organen und die Erstellung eines prä- bzw. postnatalen Expressionsprofils mit Hilfe von Northern-Blot-Hybridisierungen, RT-PCR und *in situ*-Hybridisierungen.

Das Hauptziel dieser Arbeit sollte aber sein, die Funktion des HASH-Gens bei der Maus zu studieren. Zu diesem Zweck sollte das Gen durch die Methode der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen inaktiviert werden. Über deren Aggregation oder Blastocysteninjektion sollten Chimären erzeugt und durch geeignete Verpaarungen Mäuse produziert werden, die das homolog rekombinierte Allel im heterozygoten (+/–) und homozygoten (–/–) Zustand enthalten. Weiterhin sollten die mit dieser Nullmutation einhergehenden funktionellen Veränderungen der Maus untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck, Darmstadt in p.A. Qualität bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
Ammoniumacetat	Fluka, Neu Ulm
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit, USA
Bindesilan	Fluka, Neu Ulm
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Blockierungspluver	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Biomol, Hamburg
Chloroform	Baker, Deventer, NL
Dextransulfat	Pharmacia, Freiburg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
DNase I (RNase-frei)	Pharmacia, Freiburg
dNTPs (100 mM)	Boehringer, Mannheim
Ethanol	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
FKS	Gibco/BRL, Eggenstein
Formaldehyd	Gibco/BRL, Eggenstein
Formamid	Fluka, Neu Ulm
Geneclean-Kit	Dianova, Hamburg
Glycerol	Gibco/BRL, Eggenstein

Guanidiniumthiocyanat	Fluka, Neu Ulm
Harnstoff	ICN Biomedicals Inc., Cleveland, USA
Heparin	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Biomol, Hamburg
Jetsorb Gel Extraction Kit/300	Genomed, Bad Oeynhausen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Klenow-DNA-Polymerase	Amersham, Braunschweig
Kb Ladder	Gibco/BRL, Eggenstein
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Lambda-DNA	Boehringer, Mannheim
Levamisole	Fulka, Neu Ulm
LMP-Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Pharmacia, Freiburg
Methylbenzoat	Fulka, Neu Ulm
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Multipriming Kit	Amersham, Braunschweig
Oligo (dT) Cellulose	Sigma, Deisenhofen
Orange-G	Sigma, Deisenhofen
PBS	Gibco/BRL, Eggenstein
Parablast	Sigma, Deisenhofen
Pikrinsäure	Fulka, Neu Ulm
Phenol	Gibco/BRL, Eggenstein
Plasmid-Midipräp Kit	Qiagen, Hilden
Phagen-Maxipräp Kit	Qiagen, Hilden
Polyethylenglycol 6000	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Radioaktiv markierte Reagenzien: [α^{32}P]-dCTP, [Υ^{32}P]-dATP	Amersham, Braunschweig
´Ready to go´ (DNA Labelling Kit)	Pharmacia, Freiburg
Restriktionsenzyme	Biolabs, Boehringer, BRL
Reverse Transkriptase	Gibco/BRL, Eggenstein
RNase A	Gibco/BRL, Eggenstein
RNase H	Gibco/BRL, Eggenstein
RNase Inhibitor	Boehringer, Mannheim
RNA-Längenstandard	Gibco/BRL, Eggenstein
RNA Now-Kit	ITC Biotchnology, Heidelberg

SDS	Serva, Heidelberg
Select Peptone	Gibco/BRL, Eggenstein
SP6 RNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T_4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T_4-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T_4-Polynukleotid-Kinase	Gibco/BRL, Eggenstein
T7 RNA-polymerase	Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Amersham, Braunschweig
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma, Deisenhofen
t-RNA (Bäckerhefe)	Boehringer, Mannheim
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Biomol, Hamburg
Xylencyanol	Bio-Rad, München
Zellkulturmedien	Gibco/BRL, Eggenstein; Sigma, Deisenhofen

2. Gebrauchswaren

Gebrauchswaren, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Schütt bzw. Krannich, Göttingen, bezogen.

Blottingpapier GB-003	Schleicher & Schüll, Dassel
DEAE-Membran NA45	Schleicher & Schüll, Dassel
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einmalfilter Minisart	Sartorius, Göttingen
NML (Porengrße 0.20 und 0.45 mm) Filterpapier 0858	Schleicher & Schüll, Dassel
Hybond C Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond N Membran	Amersham, Braunschweig
Membranfilter	Millipore, Morlsheim
NAP^{TM}5 Sepahdex G25-Säulen	Pharmacia, Freiburg
Nitrocellulosefilter BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Petrischalen	Greiner Nunc., Nürtingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, München

Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme (Hyperfilm™-MP)	Amersham, Braunschweig
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, München
Zentrifugengefäße u. –röhrchen	Beckmann, München
Zellkulturflaschen	Greiner Nunc., Nürtingen

3. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 60 min bei 120°C und 10^5 Pascal im Dampfdruckautoklaven (Webeco, Bad Schwartau) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengröße: 0.2 µm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert.

4. Puffer und Stammlösungen

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß in bidestilliertem oder DEPC behandeltem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert (siehe II.3.).

Acrylamid-Stammlösung (40%)	38 g Acrylamid 2 g Bisacrylamid auf 100 ml H_2O
BBL-Agar	10 g BBL Trypticase 5 g NaCl 6.5 g Agar auf 1000 ml H_2O
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml in Dimethylformamid

Bindesilan-Lösung	10 ml abs. Ethanol 30 µl Bindesilan 330 µl 10% Essigsäure
Denaturierungslösung	1.5 M NaCl 0.5 M NaOH
Denhardt´s-Lösung (50x)	1% BSA 1% Polyvinylpyrrolidon 1% Ficoll 400 in 20x SSC (pH 7.0)
dNTP-Mix	2 mM dATP 2 mM dGTP 2 mM dCTP 2 mM dTTP
Depurinierungslösung	0.25 M HCl
E-Puffer (10x)	300 mM NaH_2PO_4 50 mM EDTA
Elutionspuffer	1.5 M NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 mM EDTA
Färbelösung	4.5 µl NBT (75 mg/ml in 70% DMF) 3.5 µl BCIP (50 mg/ml in 70% DMF) ad 10 ml Puffer 3
Fixiergemisch	15 Vol. Pikrinsäure (gesätigt in dH_2O) 5 Vol. Formaldehyd 1 Vol. Essigsäure
GET-Puffer	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

Hybridisierungslösung I	5x SSPE-Lösung 5x Denhardt´s-Lösung 0.1% SDS
Hybridisierungslösung II	5x SSC 5x Denhardt´s-Lösung 10% Dextransulfat 0.1% SDS
Hybridisierungspuffer (5x)	1.5 M NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 5 mM EDTA
Kinasepuffer (10x)	100 mM Tris-HCl (pH 7.4) 100 mM $MgCl_2$ 100 mM DTT 1 mM ATP
Lachs-Spermien-DNA	100 µg/ml
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar auf 1000 ml H_2O
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl auf 1000 ml H_2O
Ligationspuffer (10x)	600 mM Tris-HCl (pH 7.5) 80 mM $MgCl_2$ 100 mM DTT
Lösung D	4.0 M Guanidiniumthiocyanat 25.0 mM Natriumcitrat (pH 7.0) 0.5% Sarcosyl

	0.1 M β-2-Mercaptoethanol
Lysis-Puffer I	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM EDTA 0.2 mg/ml Proteinase K 0.5% SDS
Lysis-Puffer II	0.35 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
Methylenblau-Lösung	0.5 M NaAc (pH 5.2) 0.04% Methylenblau
NaOH/SDS-Lösung	1% SDS 0.2 M NaOH
NBT	75 mg/ml in 70% Dimethylformamid
Neutralisierungslösung	1.5 M NaCl 1 M Tris-HCl (pH 7.0)
Phagenpuffer	10 mM $MgCl_2$ 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM NaCl
PBS-Puffer	130 mM NaCl 7 mM Na_2HPO_4 4 mM NaH_2HPO_4
PBT-Puffer	0.1% Tween-20 in PBS (1x)
RNase A	10 mg/ml in dH_2O 15 min bei 100°C im Wasserbad
SSC (20 x)	3 M NaCl 0.3 M Tri-Natriumcitrat

	(pH 7.0 mit NaOH)
SSPE (20 x)	0.02 M EDTA 0.2 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 3.6 M NaCl (pH 7.0 mit NaOH)
Stop-Mix I	95% Formamid 20 mM EDTA 0.05% Bromphenolblau 0.05% Xylencyanol
Stop-Mix II	15% Ficoll 400 200 mM EDTA 0.1% Orange G
TAE-Puffer	200 mM Tris 200 mM Essigsäure 5 mM EDTA (pH 8.0)
TBE-Puffer (5x)	445 mM Tris-HCl (pH 8.0) 445 mM Borsäure 10 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
TNE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8.0) 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Toluidinblau-Lösung	70 % Ethanol 1% Toluidinblau
TPE (10x)	0.8 M Tris-Phosphat (pH 8.0) 0.02 M EDTA
Waschlösung I	2x SSC

	0.1% SDS
Waschlösung II	0.2x SSC

5. Medien, Agarplatten und Antibiotika

5.1. Medien für Bakterien und Phagen

LB-Medium (pH 7.5):	1%	Trypton
	0.5%	Hefeextrakt
	0.5%	NaCl
	1.5%	Agar

Das LB-Medium wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

5.2. Antibiotika

Von den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin wurden Stammlösungen angesetzt, die steril filtriert und bei -20°C gelagert wurden. Das jeweils benötigte Antibiotikum wurde erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Wachstumsmedien auf 55°C zugegeben.

	Stammlösung	gelöst in	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	H_2O	50 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml	H_2O	50 µg/ml

5.3. X-Gal-Platten

Zur Herstellung von X-Gal-Platten (Blau-Weiß-Selektion) wurden dem LB-Agar (55°C) Ampicillin, IPTG und X-Gal in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

	Stammlösung	gelöst in	Endkonzentration
X-Gal	2%	N.N.-Dimethylformamid	0.0004%
IPTG	100 mM	H_2O	1 mM

5.4. Medien für Zellkultur

Die zur Kultur von eukaryotischen Zellen verwendeten Medien wurden gekauft (Biochrom, Berlin; Sigma, Deisenhofen) und vor Gebrauch je nach Kulturbedingung der Zellen mit fötalem Kälberserum (FKS) bzw. Pferdeserum (HS), Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin/ Gentamycin) und Glutamin versetzt und sterilfiltriert. Für die Zellkultur wurden folgende Medien verwendet:

ES-Zellmedium:
- DULBECCO´s MEM (DMEM)
- 0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren
- 1 mM Natrium-Pyruvat
- 10-6 M ß-Mercaptoethanol
- 2 mM L-Glutamin
- 20% FKS
- 1000 U/ml LIF

Fibroblasten-Zellmedium:
- DULBECCO´s MEM (DMEM)
- 2 mM L-Glutamin
- 10% FKS

Zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden folgenden Einfriermedien verwendet:

RI-ES-Zellen	30% ES-Zellmedium, 50% FKS, 20% DMSO
EmFi-Zellen	30% EmFi-Zellmedium, 50% FKS, 20% DMSO

6. Verwendete Bakterienstämme, Vektoren, Gensonden, Bibliotheken und Zellinien

6.1. Bakterienstämme

Zur Vermehrung der Vektoren bzw. der rekombinanten DNA wurden folgende Wirtsstämme eingesetzt:

E. coli Y 1008	Young and Davis, 1983
E. coli LE 392	Murray et al., 1977
E. coli HB 101	Bolivar und Beckmann, 1979
E. coli JM 109	Promega, Wisconsin, USA
E. coli DH5α	Hanahan et al., 1985
E. coli TOP10´	Invitrogen, Leek, Niederlande

6.2. Plasmide, Phagemide und Lamda-Vektor

EMBL3	Frischauf et al., 1983
Lambda gt11	Young and Davis, 1983
Lambda Fix II	Clontech, Palo Alto, USA
Lawrist 7	RZPD, Berlin
pBluesript SK (+/-)	Stratagene, La Jolla, USA
pGEM 3zf+	Promega, Wisconsin, USA

pGEM-T	Promega, Wisconsin, USA
pPNT	Tybulewicz et al., 1991
pUC 18	Norander et al., 1983
pZErO-2	Invitrogen, Leek, Niederlande

6.3. Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die für Experimente verwendet wurden, wurden von den Firmen NAPS (Göttingen) und ROTH (Karlsruhe) in der Konzentration von 100 pmol/ml hergestellt.

6.4. Gensonde

Bei Northern-Blot-Rehybridisierung wurde die Integrität der eingesetzten RNA mit der 1.6 kb langen cDNA für den humanen Elongationsfaktor 2 (hEF) überprüft (Rapp et al., 1989).

6.5. Bibliotheken

Maus Testis cDNA Bibliothek (Clontech):

Vektor:	Lambda gt 11
Wirtsstamm:	*E. coli* Y 1090r$^-$

Maus genomische Bibliothek (RZPD):

Vektor:	Lawrist 7
Wirtsstamm:	*E. coli* DH5α

6.6. Eukaryotische Zell-Linien

EmFi Embryonale Fibroblasten
Dr. Adham, Humangenetik, Göttingen
Adham et al., 1997

RI Embryonale Stammzellen der Passage 11
Dr. A. Nagi, Toronto, Kanada

7. Mausstämme

Für die Gewinnung von 2.5 Tage alten Mausembryonen wurden Weibchen des Stammes CD-1 nach natürlicher Verpaarung verwendet. Als Ammen-Mütter dienten pseudoträchtige Weibchen des Stammes NMRI. Sterile Männchen für die Bereitstellung von pseudoträchtigen Weibchen wurden durch Vasektomierung von Männchen des Stammes NMRI nach den Angaben von Hogan et al. (1994) generiert. Alle Mäuse wurden entweder über die Firma Charles River (Hannover) bezogen oder stammten aus institutseigenen Beständen. Für die Rückkreuzung der Chimären wurden Mäuse der Stämme CD-1 oder 129/SvJ benutzt.

8. Standardmethoden und –reaktionen in der Molekularbiologie

Alle gentechnologischen Arbeitsschritte wurden nach den eingeführten molekularbiologischen Standardmethoden 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 der Hersteller angesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Standartmethoden nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt:

- Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen
- Auffüllen von 5´überhängenden DNA-Enden mit dem Klenow-Enzym
- Ligation und Subklonierung von DNA-Fragmenten
- Herstellung kompetenter Bakterien
- Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA
- Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation)
- Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren
- Agarose-Gelelektrophorese von DNA

9. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

9.1. Minipräparation von Plasmid-DNA
(Sambrook et al., 1989)

Diese Methode dient der schnellen Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA, wobei die Qualität der DNA für eine Restriktionsanalyse sowie für die Sequenzierung ausreichend ist. 5 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Antibiotikum) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 1.5 ml Bakteriensuspension in

ein Eppendorfgefäß transferiert und bei 12000x g für 30 sec abzentifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Resuspension-Lösung resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl 0.2 M NaOH und 1% SDS wurden die Zellen aufgebrochen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurde die Suspension mit Neutralisierungspuffer (3 M KAc, pH 5.5) gemischt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 12000x g für 20 min und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chloroform gemischt. Durch Zentrifugation bei 12000x g für 3 min bei RT wurden Proteine und Membranbestandteile von der Plasmid-haltigen Phase getrennt. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 2.5 Vol. 100% Ethanol für 15 min bei -70°C. Durch den anschließenden Zentrifugationsschritt mit 12000x g für 15 min bei 4°C wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl H_2O aufgenommen.

9.2. Plasmid-Minipräparation nach Qiagen-Protokoll

Diese Methode wurde hauptsächlich bei zu sequenzierenden Plasmid-Proben angewendet, um eine hohe Ausbeute an Plasmid-DNA zu erzielen. Alle Schritte zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden dem Protokoll der Firma Qiagen entnommen. Die Ausbeute an Plasmid-DNA betrug 10-15 µg hochreine Plasmid-DNA.

9.3. Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der ´JETSTAR Plasmid Midi Kit´ (Genomed, Bad Oeynhausen) verwendet. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNA kann u.a. für Restriktionsanalysen, Hybridisierungsexperimente, zur Subklonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden. Das Verfahren beinhaltet eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) zur Präparation eines zellfreien Lysates sowie eine affinitätschromatographische Aufreinigung der DNA durch eine Säule aus dem Kit

(Genomed, Bad Oeyenhausen).

100 ml LB-Medium mit Antibiotika wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in 250 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen für 10 min bei 4°C und 4000x g zentrifugiert (Beckmann-zentrifuge, Rotor JS7.5), der Überstand dekantiert und das Pellet in 4 ml Puffer E1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer E2 wurden die Zellen lysiert, sowie Proteine und DNA durch die alkalischen Bedingungen denaturiert. Durch die im Puffer E1 enthaltene RNase wurde bakterielle RNA degradiert. Zur Vermeidung irreversibler Denaturierung der Plasmid-DNA wurde der Ansatz maximal 5 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Neutralisierung durch Zugabe von 4 ml Puffer E3 wurden Proteine und genomische DNA in Detergenz-Komplexen gebunden, während die Plasmid-DNA aufgrund ihrer kovalent geschlossenen zirkulären Form schneller renaturierte und in Lösung blieb. Um die Zelltrümmer und die ausgefällten Salzkomplexe zu sedimentieren, wurde der Ansatz für 10 min mit >15000x g bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine 10 ml Puffer E4 äquilibrierte Säule gegeben und die Säule zweimal mit jeweils 10 ml Puffer E5 gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurde durch Erhöhung der Salzkonzentration und des pH-Wertes mit 5 ml Puffer E6 eluiert. Die DNA wurde aus dem Eluat durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol gefällt, abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und in 100–200 µl H_2O aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

E1:	50	ml	Tris/HCl (pH8.0)	**E2:**	200	mM	NaOH
	10	mM	EDTA		1	%	SDS (w/v)
	100	µg/ml	RNase				
E3:	3	M	K-Acetat (pH 5.5)	**E4:**	600	mM	NaCl
	100	mM	Tris/HCl (pH 8.0)		100	mM	NaAc (pH 5.0)
					0.15	%	Triton X-100
E5:	800	mM	NaCl	**E6:**	1.25	M	NaCl
	100	mM	NaAc (pH 5.0)				

9.4. Maxipräparation von Plasmid-DNA über einen CsCl-Gradienten

Diese Methode wurde angewendet, um qualitativ hochwertige Plasmid-DNA für die ´*in situ*-Hybridisierung´ zu präparieren. 200 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 6000x g (4°C) für 15 min sedimentiert. Das Zell-Pellet wurde in 6 ml GET-Lösung, die 30 mg Lysozym enthielt, resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml GET-Lösung und 20 ml NaOH/SDS-Lösung wurde die Suspension für 15 min auf Eis inkubiert und mit 10 ml KAc versetzt. Nach 20 min Inkubationszeit auf Eis wurde der Ansatz für 10 min bei 10400x g (Beckmann, Rotor JS 7.5) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, mit 0.7 Vol. Isopropanol für 30 min bei RT gefällt, auf zwei Polyallomer-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 10 min (4°C) bei 12100x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 8 ml 1x TE-Puffer gelöst und mit 8 g CsCl und 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt, in Quick-Seal-Röhrchen überführt und für 17 h bei 248000x g (20°C) zentrifugiert. Die Plasmid-Bande wurde unter UV-Licht mit einer 1 ml Spritze abgezogen und dreimal mit 1 Vol. Butanol extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 3 Vol. 100% Ethanol 15 min bei RT ausgefällt, auf Eppendorfgefäße verteilt und 10 min bei 13000x g pelletiert. Das Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol getrocknet und in H_2O aufgenommen.

9.5. Isolierung von Phagen-DNA

Zur Vermehrung der Phagen wurde zunächst ein Phagen-Minilysat hergestellt. Dazu wurden 2 ml einer frischen Wirtsbakterienkultur mit 100 µl Phagenlösung für 20 min bei 37°C infiziert und in 12 ml LB-Medium mit 10 mM $MgCl_2$ und 0.2% Maltose überführt. Nach weiterer Inkubation bei 37°C und vollständiger Lyse wurden die Phagenpartikel durch Zugabe von 100 µl Chloroform (10 min weiteres Schütteln) aus den Bakterien freigesetzt. Durch Zentrifugation für 5 min mit 12000x g wurden die Bakterienzellreste sedimentiert und das im Überstand befindliche Phagen-Lysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Herstellung eines Phagen-Maxilysats wurden zunächst 200 ml LB-Medium/ 10 mM $MgCl_2$ mit 2 ml der entsprechenden Bakterienkultur angeimpft und bis zur OD_{600} = 0.5

bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden dem Ansatz 5 ml Phagen-Lysat zugesetzt und die vollständige Lyse der Bakteriensuspension nach 3-5 h bei 37°C erreicht. Durch Zugabe von 400 µl Chloroform und 10 min weitere Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien abgetötet und für 10 min bei 6000x g (4°C) sedimentiert. Die im Überstand befindliche Bakterien DNA bzw. -RNA wurden durch mit 800 µl DNase- und RNase- enthaltenden Puffer L1 für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 50 ml eiskaltem Puffer L2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt, 1 h auf Eis oder über Nacht bei 4°C für 15 min schüttelnd inkubiert, und anschließend die komplexierten Phagenpartikel mit 6000x g bei 4°C für 15 min sedimentiert. Das Phagenpellet wurde in 9 ml Puffer L3 resuspendiert. Dem Ansatz wurden 9 ml Puffer L4 zugegeben, anschließend 20 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert, auf Eis abgekühlt, 9 ml Puffer L5 vorsichtig zugemischt und 30 min mit 15000x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 10 min mit 15000x g bei 4°C zentrifugiert. Das partikelfreie Phagenlysat wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Säule (Quiagen-Tip 500) aufgetragen, mit 30 ml Puffer QC gewaschen und mit 12 ml Puffer QF eluiert. Die freigesetzte Phagen-DNA wurde nach Dilution mit 600 µl H_20 durch 0.7 Vol. Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation (10 min, 10000x g, 20°C) pelletiert. Die gewonnene Phagen-DNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50-100 µl H_20 aufgenommen.

Phagen-	10	mM	$MgCl_2$	**L1:**	300	mM	NaCl
Lösung:	10	mM	Tris/HCl (pH 7.5)		100	mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	0.1	mM	EDTA		10	mM	EDTA
					0.2	mg/ml	BSA
					20	mg/ml	RNase A
					6	mg/ml	DNase I
L2:	30	%	PEG 6000	**L3:**	100	mM	NaCl
	3	M	NaCl		100	mM	Tris/HCl (pH 7.5)
					25	mM	EDTA
L4:	4	%	SDS	**L5:**	3	M	KAc (pH 5.5)
QBT:	750	mM	NaCl	**QC:**	1	M	NaCl

	50	mM	MOPS (pH 7.0)	50 mM	MOPS (pH 7.0)
	15	%	Ethanol	15 %	Ethanol
	0.15	%	Triton X-100		
QF:	1.25	M	NaCl		
	50	mM	Tris/HCl (pH 8.5)		
	15	%	Ethanol		

9.6. Isolierung genomischer DNA aus Organen

Die Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzspitze von Mäusen bzw. aus kultivierten Zellen für eine anschließende Genotypisierung wurde nach der Methode von Laird et al. (1991) durchgeführt.

1–2 cm der Schwanzspitze von etwa 3 Wochen alten Mäusen wurden in 700 µl Lyis-Puffer unter Zugabe von Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol bei RT präzipitiert und durch eine anschließende Zentrifugation mit 12000x g bei RT für 10 min pelletiert. Nach einem Waschschritt mit 500 µl 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet in 100–200 µl H_2O gelöst und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

9.7. Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben

(modifiziert nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

Alle Glaswaren und Lösungen, die für die Experimente mit RNA benutzt wurden, wurden mit 0.1%-igem DEPC für 12 h behandelt, um sie von RNasen zu befreien. Zur Zerstörung des DEPC wurden Glaswaren und Lösungen anschließend für 20 min autoklaviert. 100 mg frisches Gewebe wurde in ein 15 bzw. 50 ml Falcon-Gefäß mit 1 ml RNA-NOW-Lösung (Biomol, Hamburg) gegeben. Das Gewebe wurde mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax

T25, Schütt, Göttingen) homogenisiert und die Suspension 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0.2 Vol. vorgekühltem Chloroform wurde der Ansatz vorsichtig geschwenkt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde dann mit 4000x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde zur Fällung der RNA mit 1 Vol. Isopropanol auf Eis für 10 min inkubiert und die RNA anschließend durch Zentrifugation (20 min, 4°C, 10000 x g) pelletiert. Danach wurde das RNA-Pellet in 70% Ethanol resuspendiert, erneut sedimentiert und in DEPC-H_20 gelöst. Die isolierte RNA konnte für die Gewinnung von Poly(A)$^+$-RNA und Northern-Blot-Analysen eingesetzt werden. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die RNA in 20 µg-Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei –70°C aufbewahrt.

9.8. Isolierung von Poly (A)$^+$-RNA

Die Anreicherung der Poly(A)$^+$-RNA (ca. 1-5% der Gesamt-RNA) erfolgte mit Hilfe des Dynabeads mRNA-Kits (Dynal, Hamburg). Das Prinzip der Methode beruht auf der Hybridisierung des Poly (A)-Schwanzes der mRNA mit Dynabeads Oligo $(dT)_{25}$. Mit Hilfe eines Magneten wird die gebundene mRNA separiert.

200 µl (1 mg) Dynabeads Oligo $(dT)_{25}$ wurden in einem Reaktionsgefäß in den Magnetständer eingebracht. Nach 30 Sekunden wurde der Überstand abgenommen und die Dynabeads mit 100 µl 2x Bindungspuffer gewaschen. Das Reaktionsgefäß wurde dann aus dem Magnetständer herausgenommen. Die Gesamt-RNA (75 µg) wurde mit DEPC-H_2O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht. Die RNA wurde 2 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die RNA zusammen mit 100 µl 2x Bindungspuffer zu den Dynabeads gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde dann in den Magnetständer eingebracht und nach 30 Sekunden wurde der Überstand entfernt. Die an die Dynabeads gebundene RNA wurde durch die Bindung der Dynabeads an den Magneten im Reaktionsgefäße zurückgehalten. Anschließend wurde zweimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Das Reaktionsgefäß wurde wieder aus dem Magnetständer herausgenommen, und die RNA wurde durch die Zugabe von 15 µl Elutionspuffer und Erhitzen auf 65°C von den Dynabeads eluiert. Das Reaktionsgefäß wurde sofort

wieder in den Magnetständer gestellt, wodurch die Dynabeads wieder von dem Magneten gebunden wurden und der Überstand, der die mRNA enthielt, abgenommen werden konnte.

9.9. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die exakte Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure ist für die Durchführung der meisten molekularbiologischen Analysen unabdingbar. Die Konzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (Typ 8452 A, Hewlett Packard, Hamburg) bestimmt. Nach Abgleichen der Nullwerte konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) festgelegt werden. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$C\ [\mu g/\mu l] = (E_{260} - E_{320}) \times f \times c$$

C = Konzentration der gemessenen Probe
E = Extinktion
f = Verdünnungsfaktor
c = $\text{Konzentration}_{\text{standard}}$ /$\text{Extinktion}_{\text{standard}}$
für doppelsträngige DNA: c = 0.05 µg/µl
für einzelsträngige DNA: c = 0.025 µg/µl
für RNA: c = 0.04 µg/µl
E_{230} = Absorptionsmaximum von Salzen
E_{260} = Absorptionsmaximum von DNA/RNA
E_{280} = Absorbtionsmaximum vieler Proteine
E_{320} = Nullwert

Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte 2.0 ± 0.2 betragen.

10. Enzymatische Modifikation von DNA: Klonierungstechniken

10.1. Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Nukleotid-Sequenzen (4-8 bp) und spalten endonukleolytisch. Die Spaltung von DNA durch die Restriktionsendonukleasen wurde in einem Volumen von mindestens 20 µl bei der enzymspezifischen Temperatur für 2-15 h durchgeführt, wobei pro µg DNA 5-10 U des jeweiligen Restriktionsenzyms eingesetzt wurden. Für Doppelspaltungen wurde entweder ein für beide Enzyme geeigneter Puffer genommen, oder es wurde zunächst nach Verdauung des ersten Enzyms ausgefällt, die DNA in H_20 gelöst und mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten. Die so gespaltene DNA wurde anschließend für weiterführende Analysen, wie z.B. gelektrophoretische Auftrennungen, Isolierungen von DNA-Fragmenten etc. verwendet.

10.2. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Religation von Vektor-DNA (die nur mit einem Enzym geschnitten ist) während der nachfolgenden Ligation zu verhindern, wurde das Plasmid dephosphoryliert. Dazu wurde nach der Restriktionsspaltung 1 U alkalische Phosphatase direkt zum Verdauungsansatz gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde anschließend das Enzym inaktiviert (10 min bei 70°C). Die dephosphorylierte DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Behandlung aufgereinigt und mit 2.5 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4.8) ausgefällt. Anschließend wurde das Pellet in einer Endkonzentration von 50 ng/µl in 1x TE aufgenommen.

10.3. Ligation eines DNA-Inserts in einen Plasmid-Vektor

Die geschnittenen, isolierten und nötigenfalls dephosphorylierten DNA-Fragmente konnten direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen des Plamid-Vektors ligiert werden. Für den Ligationsansatz wurden 30 ng Vektor-Plasmid-DNA, 30-120 ng DNA-Insert, 1 µl 10x Ligationspuffer, 1 µl 10 mM ATP und 1 µl T_4 DNA-Ligase (5 U/ml) eingesetzt. Der Ansatz wurde entweder 3 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

10.4. Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

(Dagert und Ehrlich, 1979)

200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (Certomat H Rundschüttler, Braun, Melsungen) bis zu einer OD_{600} = 0.5 vermehrt. Die Kultur wurde für 30 min auf Eis gestellt und dann bei 13000x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 100 µl eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Durch die Behandlung der Zellen mit $CaCl_2$ werden die Zellmembran durchlässiger. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ und 20% Glycerin aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Transformation gelagert.

10.5. Transformation von Bakterien

(nach Hanahan, 1985)

Zur Transformation der Bakterien mit den Plasmiden wurden die kompetenten Zellen zunächst auf Eis langsam aufgetaut. Danach wurde der Ligationsansatz mit 200 µl der kompetenten Bakterien gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 90 sec bei 42°C erhitzt. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz

mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 150-200 µl der transformierten Bakterien auf eine X-Gal-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

11. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA wird im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente hängt von deren Größe, der angelegten Spannung, der Agarosekonzentration sowie der Pufferzusammensetzung und der Pufferkonzentration ab.

11.1. Horizontalgelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese wurde hauptsächlich zur Auftrennung restringierter, rekombinanter DNA, zur Insertisolierung spezifischer DNA-Fragmente oder zur Kontrolle von PCR-Produkten verwendet. Dazu wurde die Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer (oder 1x TAE) durch Kochen gelöst, auf 60°C abgekühlt und in die vorgefertigten Gelträger überführt. Vorher wurde der Agaroselösung 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt, ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen flaches, mehrgliedriges Ringsystem zwischen benachbarten Basenpaaren interkaliert und so eine Sichtbarmachung unter UV-Licht ermöglicht. Nach vollständiger Verfestigung des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 1x Laufpuffer gefüllten Gelkammer bei konstanter Voltzahl (6-8 V/cm) durchgeführt.

11.2. Vertikalgelelektrophorese

Die vertikale Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung der enzymverdauten, genomischen DNA verwendet. Die geringe Dicke des Gels gewährleistet eine bessere Übertragung der DNA beim Blotten. Zum Abdichten der Innenkammer wurde ein 1.5%-iges Sockelgel aus Agarose gegossen. Nach der Erhärtung der Agarose wurde ein 1%-iges Gel darübergeschichtet. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x E-Puffer benutzt. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 15-20 Volt unter ständigem Umwälzen (Peristaltikpumpe Ismatec Sa, Zürich) des Laufpuffers durchgeführt.

11.3. Elektrophorese von RNA im Agarosegel

(Maniatis et al., 1982)

Um die Rückbildung der Sekundärstruktur der RNA während der Gelelektrophorese zu verhindern, wurde dem 1%-igen Agarosegel (gelöst in 1x E-Puffer) eine Formaldehyd-Lösung zugesetzt (Endkonzentration: 6.6%). Die RNA-Proben mußten vor der Auftrennung folgendermaßen behandelt werden:

x µl	RNA (= 20 µg Gesamt-RNA, bzw. bis 1 µg Poly(A)$^+$-RNA)
1 µl	10x E-Puffer
8 µl	deionisiertes Formamid
3 µl	Formaldehyd (37%-ige Lösung)
20 µl	Gesamtansatz

Dieses Gemisch wurde dann bei 68°C für 10 min denaturiert und für 5 min auf Eis gestellt. Die RNA-Proben wurden mit 0.2 Vol. Stop-Mix I versetzt und mit 60 Volt bei 4°C (mit Pufferumwälzung) gelelektrophoretisch aufgetrennt.

11.4. Längenstandards

Um die Größe der enzymatisch verdauten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde parallel zu den DNA-Proben die Lambda-DNA (DNA-molecular weight marker III, BRL) auf das Elektrophoresegel aufgetragen. Dadurch konnte die Größe der durch Restriktion erhaltenen Fragmente festgestellt werden. Bei der Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten wurde der "1 kb DNA Ladder"-Längenstandard (BRL, Eggenstein) verwendet. Durch Vergleich der Bandenstärke von Längenstandard und DNA-Probe konnte die Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

12.1. Isolierung von DNA-Fragmenten mit der "Geneclean"-Methode

Die Isolierung von Restriktionsfragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem ´Jet-sorb-Kit´ (Genomed, Bad Oeyenhausen). Die zu isolierende DNA-Bande wurde aus dem Gel geschnitten, das Gelstück gewogen und die entsprechenden Mengen an Puffer A1 und Glasmilch dazugegeben. Pro 100 mg Gelstück wurden 300 µl Puffer A1 und 10 µl Glasmilch eingesetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei 50°C inkubiert, wobei dieser alle 2 min gemischt wurde, um die Glasmilch in Suspension zu halten. Nach Anlagerung der DNA an die Glasmich wurde der Reaktionsansatz für 30 sec bei 12000x g zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einmal in 500 µl Puffer A1 gewaschen, um Agarosereste und andere Kontaminationen zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit jeweils 300 µl Puffer A2 gewaschen, danach der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und in 20 µl H_2O gelöst. Die DNA wurde 5 min bei 50°C eluiert, der Ansatz abzentrifugiert und der Überstand mit der darin enthaltenen DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die typische Ausbeute an DNA-Fragmenten >400 bp lag bei ca. 70-80% (<400 bp, ca. 50%).

12.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

Zunächst wurden die PCR-Produkte auf ein 5-8%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten PCR-Amplifikate wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in einem Eppendorfgefäß zermörsert und über Nacht bei 37°C in 500 µl 1x TE-Puffer aus dem Gel eluiert. Durch Zentrifugation (20 min, 13000x g, 4°C) wurden die Gelreste sedimentiert und die wässrige, DNA-enthaltende Phase mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert. Der Überstand wurde mit 0.1 Vol. 3 M NaAc (pH 6.0) und 2.5 Vol. Ethanol versetzt und die DNA für 15 min bei -70°C präpiziert. Nach einer erneuten Zentrifugation (20 min, 13000x g, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 10-20 µl H_2O gelöst. Zur Bestimmung der Konzentration bzw. der Reinheit wurde die DNA auf ein 1-5%-iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch analysiert.

13. Transfertechniken von Nukleinsäuren

13.1. Transfer von DNA-Fragmenten: Southern-Blotting
(Southern, 1975)

Mit Hilfe des Southern-Transfers werden DNA-Fragmente aus Agarosegelen auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zuerst für 10 min in 500 ml Depurinierungslösung (0.25 M HCl) eingelegt. Anschließend wurde es für 30 min in Denaturierungslösung überführt und dann für 30 min in Neutralisierungslösung behandelt. Das Gel wurde luftblasenfrei auf ein mit 20x SSC-Lösung getränktes Blottingpapier gelegt, welches in eine mit 20x SSC gefüllte Wanne eintauchte. Dieses Gel wurde von Plastikfolie so umschlossen , daß der kapillare Transport des 20x SSC nur durch das Gel erfolgen konnte. Ein Nitrocellulosefilter und zwei mit 2x SSC-Lösung getränkte Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Darauf wurden mehrere Schichten trockenes Papier gelegt und dann mit einem Gewicht (ca. 500 g) beschwert. Der Transfer

erfolgte über Nacht. Während einer Transferzeit von 12–20 h wird die konzentrierte 20x SSC-Lösung von den trocken Papierschichten durch das Gel und die Nylonmembran gezogen, wobei die DNA diffundiert und an der Membran haften bleibt (Kapillartransfer). Anschließend wurde die Position der Geltaschen auf der Nitrocellulose markiert. Der Filter wurde vom Gel abgenommen und in 2x SSC-Lösung kurz gewaschen, ´crossgelinked´ (120 J, UV Stratalinker 1800, Stratagene, Heidelberg) und zur Fixierung der DNA für 2 h bei 80°C gebacken.

13.2. Transfer von RNA aus Agarosegelen (Northern-Blotting)

Die RNA aus dem denaturierenden RNA-Gel wurde direkt nach der Elektrophorese ohne weitere Vorbehandlung auf einen Nitrocellulosefilter transferiert. Nach dem Transfer wurde die RNA in gleicher Weise wie die DNA an die Membran fixiert. RNA-Längenstandard enthaltende Spuren wurden vom Filter abgeschnitten, die RNA 15 min in 5% Essigsäure auf der Membran fixiert und 10 min in Methylenblau (0.04% in 0.5 M NaAc, pH 5.2) angefärbt. Der Filter wurde unter fließendem Wasse entfärbt und luftgetrocknet.

14. Radioaktive Markierung von DNA

14.1. "random priming"

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Sonden wurde die Methode des "random priming" (Feinberg und Vogelstein, 1983) verwendet. Diese Methode ermöglicht eine hohe Ausbeute an spezifisch radioaktiv markierten DNA-Sonden (1-5 x 10^9 cpm/µg DNA). Für die Markierung wurde der "Megaprime DNA Labelling™-Kit" der Firma Amersham Buchler (Braunschweig) benutzt. Pro Ansatz wurden 5 bis 25 ng DNA und 40 µCi [α-^{32}P]-dCTP eingesetzt. Die Konzentration von Random-Primer, Reaktionspuffer, dNTPs und Klenow-Enzym richtete sich nach den Angaben des Herstellers.

10 µl	5x Reaktionspuffer
5 µl	´primer solution´ (enthält auch dATP, dGTP und dTTP)
2 µl	Klenow-Polymerase
5 µl	[α-^{32}P]-dCTP

Zunächst wurde die doppelsträngige DNA für 5-10 min bei 100°C denaturiert. Mit Hilfe von Starter-Oligo$(dN)_6$, dNTPs, [α-^{32}P]-dCTP oder [α-^{32}P]-dATP und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurden die komplementären Stränge unter Einbau radioaktiver Nukleotide neu synthetisiert. Nach 45-60 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 µl EDTA, 10 µl tRNA, 11 µl 3 M NaAc (pH 6.0), 37 µl H_2O und 280 µl Ethanol abgestoppt. Nach 30 min Fällung auf Eis und 15 min Zentrifugation bei 15000x g (Biofuge A, Heraeus, Osterode) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 200 µl H_2O gelöst. Die spezifische Aktivität der DNA-Probe wurde im Szintillationszähler (Tri-Carb 4530, Packard Instruments, Warrenville, USA) gemessen. Sie liegt in der Regel zwischen 4 x 10^8 und 5 x 10^9 cpm/µg DNA.

14.2. Endmarkierung von Oligonukleotiden

(Maniatis et al., 1982)

Die radioaktive 5´-Endmarkierung von Oligonukleotiden wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase durchgeführt. Der Ansatz wurde wie folgt erstellt:

10 pmol	Oligonukleotid
1 µl	10x Kinase
5 µl	[γ-^{32}P]-ATP
10 U	Polynukleotidkinase

Nach 45 minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Reaktionsgemisch mit 0.5 M EDTA (pH 8.0) abgestoppt, und anschließend wurde die Probe über eine NAP-50 Säule aufgereinigt.

14.3. Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden und sythetischer Oligonukleotide

Die radioaktiven Sonden wurden durch Gelfiltration über eine Sephadex G-50 Medium Säule von Nukleotiden und niedermolekularen Substanzen getrennt. Hierfür wurde eine 1 ml Spritze mit etwas Glaswolle gefüllt (bis maximal zur 0.1 ml Marke) und das in TX-Puffer gelöste Sephadex G-50 Material in die Spritze gefüllt. Die Spritze wurde für 2 min bei 800x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Eluat verworfen, die fertigen Säulen wurden in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckelverschluß verbracht und mit diesem in ein 15 ml Falcon-Gefäß gestellt. Dem Markierungsansatz (50 µl) wurden 50 µl H_2O zugesetzt, der Ansatz auf die Säule aufgetragen und anschließend nochmals 2 min bei 800x g zentrifugiert. Das radioaktive Eluat enthielt nunmehr die markierten Fragmente, während Primer und Nukleotide auf der Säule verblieben.

Oligonukleotide wurden über NAP5-Säulen (Phamacia) aufgereinigt. Dazu wurden die Säulen zweimal mit Ampuwa gespült, dem 50 µl Reaktionsansatz 450 µl H_2O zugeben und der gesamte Ansatz auf die Säule gegeben. Das radioaktiv markierte DNA-Fragment wurde dann mit 1 ml Ampuwa in ein Schraubendeckelreaktionsgefäß eluiert.

15. Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundene DNA oder RNA

Die gebackenen Nitrocellulosefilter mit der gebundenen DNA bzw. RNA wurden für 10 min in 2x SSC-Lösung eingeweicht. Nach Füllung der Hybridisierungstubes mit 2x SSC-Lösung und Entfernung entstandener Luftblasen wurden die Filter mit 12 ml Hybridisierungslösung I für mindestens 2 h bei entsprechender Temperatur, die je nach Homologiegrad zwischen eingesetzter DNA-Sonde und zu hybridisiernder DNA oder RNA zwischen 58-68°C gewählt wurde, im Rollerofen (Bachofer, Reutlingen) präinkubiert. Hiermit sollten unspezifische Bindungsstellen an den Filtern abgesättigt werden. Die radioaktiv markierte DNA-Probe und 200 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml, geschert durch Ultraschall) wurden durch 5-10 min Kochen denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Die

benutzte Vorhybridisierungslösung wurde verworfen, und in die Hybridisierungstubes wurden 15 ml frische Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Probe gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei der entsprechenden Temperatur im Rollerofen. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter 10 min mit 2x SSC bei RT und anschließend je nach gewünschter Stringenz bei einer Temperatur von 55°–65°C gewaschen. Für eine geringe Stringenz wurde 2x mit Waschlösung I für 10 min und kurz mit Waschlösung II gewaschen, für eine höhere Stringenz wurde zusätzlich 2x 10 min mit Waschlösung II gewaschen. Die Filter wurden luftgetrocknet, in Folie eingelegt, in einer Röntgenfilmkassette befestigt und darauf Röntgenfilme (Hyperfilm™-MP, Amersham Buchler, Braunschweig) gelegt. Die Filme wurden für wenige Minuten bis zu mehreren Tagen bei -70°C exponiert und im Entwicklungsgerät Gevamatic 110 U (Agfa Gevaert, München) entwickelt.

16. Isolierung rekombinanter Klone aus einer Phagen-Bibliothek

Zur Isolierung von Phagen-Klonen aus einer Phagen-Bibliothek wurden die folgenden Versuchsschritte durchgeführt:

1. Titerbestimmung der Phagen-Bibliothek
2. Ausplattieren der Phagen-Bibliothek
3. Transfer und Behandlung der Phagen auf Nitrocellulose
4. Hybridisierung der Phagen-DNA mit einer radioaktiven DNA-Probe
5. Anreicherung und Isolierung der positiven, rekombinanten Phagen
6. Maxipräparation der Phagen-DNA

16.1. Titerbestimmung der Phagen-Bibliothek

Zunächst wurden 10 ml LB-Medium mit 10 µl 1 M $MgCl_2$ und 0.2% Maltose mit kompetenten Bakterien *E.coli* LE392 über Nacht bei 37°C in einem 50 ml Falconröhrchen inkubiert. Für das Screening einer Phagenbibliothek muß eine genügend

große Menge an Phagen ausplattiert werden. Um die entsprechende Menge an Phagenpartikeln einsetzten zu können, wird der aktuelle Titer der Phagensuspension bestimmt. Mit Hilfe von Phagenpuffer wurde eine Verdünnungsreihe aus einem Aliquot der Phagen-Bibliothek (10^{-2} bis 10^{-6}) hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Lyse der Bakterien entstanden charakteristische Phagenplaques (pfu = plaque forming units), so daß anhand des Verdünnungsfaktors der Titer der Phagen-Bibliothek errechnet werden konnte.

16.2. Ausplattieren der Phagen-Bibliothek

Die 300 µl Bakterienlösung LE 392 wurden mit verdünnter Phagenkonzentration 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 10 ml 45–50°C warmer TOP-Agarose dazugegeben und diese Mischung auf eine Agarplatte ausplattiert. Im Brutschrank wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

16.3. Transfer und Behandlung der Phagen auf Nitrocellulosefilter

Die Platten wurden aus dem Brutschrank genommen und für 1 h in den Kühlraum gestellt. Damit sollte verhindert werden, daß bei dem Transfer der Phagen auf die Filter BBL-Agar an den Filtern haften bleibt. Pro Platte wurden jeweils 2 Nitrocellulosefilter (Hanahan und Meselson, 1980) benötigt. Der 1. Filter wurde für 1 min bei RT auf die Platte gelegt. Die Position des Filters wurde mit einer Nadel markiert. Der 2. Filter wurde für ca. 10 min aufgelegt und an gleicher Stelle markiert. Die beide Filter wurden anschließend für ca. 3-5 min mit Denaturierungslösung, 10 min in Neutralisierungslösung und 10 min in 2x SSC eingeweicht (Benton und Davis, 1977). Nach dieser Behandlung wurden die Filter zum Trocknen auf Blottingpapier gelegt und anschließend für 2 h bei 80°C im Vakuumofen gebacken, damit die Phagen-DNA an die Nitrocellulose fixiert werden kann. Die Hybridisierung der Filter mit der radioaktiv markierten DNA-Probe wurde wie in Abschnitt II.15. durchgeführt.

16.4. Anreicherung und Isolierung der positiven, rekombinanten Phagen

Positive Signale auf den Röntgenfilmen wurden dazu genutzt, um die entsprechenden Phagenplaques auf den Agarplatten zu identifizieren. In dem Bereich von 0.3-0.5 cm^2 eines positiven Klons wurde der Agar mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 600 µl Phagenpuffer überführt. Um die restlichen Bakterien abzutöten, wurde 10 µl Chloroform hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert, damit die Phagen in den Phagenpuffer diffundieren konnten. Von dieser Suspension wurden Verdünngsreihen hergestellt. Das erste Rescreening sollte mit ca 1000-2000 pfu/Platte durchgeführt werden. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie unter II.16.2.3. beschrieben. Das Rescreening wurde solange durchgeführt, bis ein Einzelklon sicher isoliert werden konnte.
Der identifizierte positive Phagenklon wurde mit einer blauen Pipettenspitze aus der Platte gepickt und in 200 µl Phagenpuffer aufgenommen. Diese Phagenlösung wurde für die Herstellung des Phagen-Lysats und die Präparaton der Phagen-DNA verwendet.

16.5. Anlegen eines Phgenstocks

200 ml LB mit 10 mM $MgCl_2$ wurden mit 35 µl der Phagenlösung beimpft und bis zur Lyse geschüttelt. Das Lysat wurde wie unter II.9.5. bis zur Zugabe von Puffer L1 und anschließender Inkubation gleich behandelt. Anschließend wurde das Phagenpräzipitat pelletiert (10000x g, 15 min, 4°C) und in 2 ml Phagenpuffer resuspendiert. Um das PEG zu entfernen, erfolgte eine Extraktion mit 1 Vol. Chloroform. Der Stock wurde über 100 µl Chloroform bei 4°C gelagert. Abschließend wurde eine Titerbestimmung durchgeführt.

17. Methoden der "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

(Saiki et al., 1985)

Mit der Methode der PCR können kleinste Mengen genetischen Materials amplifiziert und somit für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht werden. Zwei synthetische Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden Abschnitt der DNA flankieren, dienen als Primer für die Taq-Polymerase. Durch sich wiederholende Zyklen - Denaturierung der DNA, Annealing der Primer und Synthese des zweiten Stranges - wird der DNA-Abschnitt, der durch die beiden Primer begrenzt ist, amplifiziert. Dabei dient jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren, wodurch ein expontentieller Anstieg der Menge des gewünschten DNA-Abschnitts erreicht wird. Durch die Zugabe der hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) des Archaebakteriums *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976) werden die spezifischen DNA-Stränge in 30-40 Zyklen in 10^6-facher Kopienzahl durch exponentielle Amplifikation erzeugt.

17.1. PCR an Plasmid-DNA

Die Methode wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente zu amplifizieren, die durch restriktionsenzymatische Spaltung nicht isoliert werden konnten. Dazu wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

x µl	Template-DNA (30–500 ng)
2 µl	Primer 1 (10 pmol/µl, sequenzspezifisch)
2 µl	Primer 2 (10 pmol/µl, sequenzspezifisch)
2 µl	dNTPs (10 mM)
5 µl	Taq-Polymerase Puffer (10x)
0.5 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl, Amersham)
ad 50 µl	ddH_2O

Der Ansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und 30-40 Zyklen der DNA-Amplifikation in einem Thermocycler (Perkin Elmer Cetus) unterworfen. Die Anzahl der Zyklen, die

einzelnen Temperaturschritte und die jeweilige Dauer der Zyklen mußte für jedes DNA-Fragment und die dafür eingesetzten Primer neu gewählt werden. Der Reaktionsansatz wurde folgendem Programm im Thermocycler unterworfen:

30–60 sec	95°C	Denaturieung
30–90 sec	50–65°C	Annealing
30–90 sec	72°C	Elongation

Vor Beginn des ersten Cyclus wurde 3–5 min bei 95°C denaturiert und danach schloß sich ein letzter Elongationsschritt von 7 min bei 72°C an. Nach Abschluß der PCR wurden 1/10 des Ansatzes mit Stopmix II gemischt und je nach Größe des PCR-Produkts auf ein 1-1.5%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

17.2. PCR an genomischer DNA

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen von genomischer DNA wurde die DNA wie unter II.9.6 beschrieben extrahiert und mit folgenden Substanzen zu einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert:

x µl	DNA (300-500 ng)
2 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
2 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
2 µl	dNTPs (10 mM)
5 µl	Taq-Polymerase Puffer (10x)
0.5 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl, Amersham)
ad 50 µl	ddH_2O

17.3. "Reverse PCR" (RT-PCR)

(Kogan et al., 1987)

Die Methode der reversen PCR basiert auf der Umschreibung von mRNA in cDNA (Synthese der komplementären DNA) und einer anschließenden PCR. Mit Hilfe der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen in Geweben detektiert werden.
10 µg Gesamt-RNA (II.9.7.) wurden mit 30 U DNase I (RNase-frei) 10 min bei 37°C inkubiert und im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl H_2O gelöst. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µl Primer (200 ng) zu der RNA dazugegeben, 10 min bei 70°C denaturiert und 15 min auf Eis inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden folgende Komponenten dazugegeben:

11 µl	Ansatz (RNA und Primer)
4 µl	5x Reverse Transkriptase-Puffer
2 µl	DTT (0.1 M)
1 µl	dNTPs (je 15 mM)
1 µl	RNase Inhibitor
1 µl	Reverse Transkiptase (Superscript, 200 U)
20 µl	Gesamtansatz

Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei RT und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der cDNA Synthese wurde der Reaktionsansatz 1:10 mit H_2O verdünnt und ein 1 µl Aliquot davon in eine PCR eingesetzt. Die Konzentration der Primer, des Puffers und des Enzyms entsprachen den unter II.17.1. gemachten Angaben. Um die Spezifität des PCR-Produkts zu erhöhen, wurde eine Nachamplifikation mit einem internen Primer (´nested primer´) und 1 µl des ersten PCR-Produkts als Template durchgeführt. Hierbei wurde die ´Annealing´-Temperatur auf 60-62°C erhöht. Das PCR-Produkt wurde entweder nach Subklonierung oder direkt sequenziert.

18. MARATHON RACE-PCR

18.1. Konstruktion von MARATHON cDNA-Banken

Für die Konstruktion von cDNA Banken wurde der MARATHON RACE Kit (Clontech) verwendet. Im Gegensatz zu Phagen-Banken wird bei dieser Methode der Screening-Prozeß rein über PCR durchgeführt. Nach einer Erst- und Zweitstrangsynthese nach dem Prinzip von Gubler und Hoffmann (1983) werden spezielle Linker an die doppelsträngige cDNA ligiert. Diese Primer sind partiell doppelsträngig mit einem glatten Ende und partiell einzelsträngig, wobei die zurückstehende 3´-OH-Gruppe durch eine Aminogruppe geblockt ist. Die Sequenz des einzelsträngigen Linkeranteils entspricht den Primern, die in der Screening PCR eingesetzt werden. Diese Linker-Primer finden erst eine Bindungsstelle, wenn durch Extension von genspezifischen Primern im Zuge des ersten PCR Cyclus diese geschaffen werden. Das Screenen der Bank wird dann mit Kombinationen von Linker-Primern und genspezifischen Primern durchgeführt. In getrennten Reaktionen werden die 5´- und 3´-Enden der gesuchten cDNA synthetisiert, aus denen dann in einer Fusions-PCR die gesamte cDNA konstruiert wird.

18.2. Synthese der MARATHON cDNA-Banken

Alle Reaktionen wurden nach dem Clontech MARATHON Protokoll und mit den Komponenten des Kits durchgeführt. Als Kontrolle wurde aus humaner Placenta Poly $(A)^+$ RNA (im Kit enthalten) mitgeführt. Für die Erststrang-Synthese wurden

1 µl Poly $(A)^+$ RNA (1 µg)
1 µl Erststrang-Primer (10 pmol ESP)
3 µl H_2O

gemischt und für 2 min bei 70°C inkubiert, dann 2 min auf Eis gehalten. Kondenswasser

wurde abzentrifugiert und durch Zugabe von

2 µl	Erststrang-Synthese-Puffer
1 µl	dNTP (10 mM)
1 µl	H_2O
1 µl	MMLV Reverse Transkriptase

wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 h Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion auf Eis beendet. Für die Zweitstrangsynthese wurden

48.4 µl	H_2O
16 µl	Zweitstrang-Synthese-Puffer
1.6 µl	dNTP (10 mM)
4 µl	Zweitstrang-Enzym-Cocktail (RNase H, *E. coli* DNA Polymerase I, *E. coli* DNA Ligase)

zugegeben und für 2 h bei 16°C inkubiert. Die Enden der doppelsträngigen cDNA wurden dann durch Zugabe von 5 U T4-DNA-Polymerase aufgefüllt, die Reaktion mit Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt. Das Pellet wurde in 10 µl H_2O aufgenommen und hiervon 2 µl auf einem Agarosegel getestet. 5 µl wurden in einer Ligationsreaktion eingesetzt, in der Linker an die Enden der cDNAs angefügt wurden.

5 µl	ds cDNA
2 µl	MARATHON cDNA Adapter (10 µM)
2 µl	5x Ligase Puffer
1 µl	T4-DNA-Ligase

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und dann mit Tris-EDTA Puffer auf eine geeignete Konzentration verdünnt.

18.3. Screening der MARATHON cDNA-Banken

Aliquote von 3 µl der verdünnten cDNA Banken wurden in Screening-PCRs mit je einem genspezifischen Primer und dem Linker-Primer AP1 eingesetzt. Die PCRs wurden mit 35 Cyclen durchgeführt:

94°C	30 sec	Denaturieung
64°C	30 sec	Annealing
68°C	30 sec	Elongation

Die Produkte wurden zur Kontrolle direkt sequenziert und dann die 5´- und 3´-Enden der Gene in Fusions-PCRs zusammengesetzt. 10–50 ng dieser Fragmente wurden in eine PCR mit 30 Cyclen eingesetzt:

94°C	30 sec	Denaturieung
68°C	30 sec	Annealing und Elongation

In diese PCRs wurden keine Primer eingesetzt, da die Fragmente über eine Hybridisierung des überlappenden Anteils aneinander binden und als Primer fungieren. Das Produkt dieser PCR wurde 1:100 in H_2O verdünnt und daraus 1 µl in einer PCR mit AP1 und einem Poly-dT Primer eingesetzt. In dieser PCR wurden 38 Cyclen mit folgenden Parametern durchgeführt:

94°C	30 sec	Denaturieung
52°C	10 sec	Annealing
68°C	30 sec	Elongation

Die entstehenden Produkte wurden dann über die in beiden Primern enthaltenen Not I – Schnittstellen kloniert.

19. Sequenzierungsanalyse

19.1. Sequenzierungsreaktion

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 statistisch unterbrochen DNA-Neusynthese. Doppelsträngige DNA wird denaturiert und ein Einzelstrang nach Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers durch eine DNA-Polymerase (Sequenase) aufgefüllt. Die limitierte Zugabe von ddNTPs bewirkt statistische, basenspezifische Synthesestopps (Kettenabbrüche), die im Vergleich die Position der 4 Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP in der Primärsequenz der DNA anzeigen.

19.2. Sequenzierung-PCR

Es wurde die ´Dye Terminator Cycle Sequencing´ (Perkin-Elmer) Methode angewendet. Dazu wurde das Protokoll des BigDyeTerminator Kits (ABI) befolgt. 0.5–1 µg Plasmid-DNA und 5 pmol des jeweiligen Sequenz-Primers wurden auf ein Volumen von 11 µl mit H_2O aufgefüllt und mit 4 µl Dye-Terminator-Mix versetzt. Dieser Mix enthielt dNTPs, mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs, Ampli-Taq-DNA-Polymerase sowie Reaktionspuffer. Um eine Evaporation zu verhindern, wurden die Proben mit 1 bis 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Perkin Elmer Thermocycler durchgeführt. Die Amplifikation der Kettenabbruchfragmente durch PCR bietet den Vorteil, daß nur relativ wenig Plasmid-DNA zur Sequenzierung eingesetzt werden muß. Nach Denaturierung bei 95°C wurden die Proben für 25 Cyclen folgendem Programm unterzogen:

98°C	30 sec	Denaturieung
50°C	15 sec	Annealing
60°C	4 min	Elongation

Nach der PCR wurden die Proben mit 80 µl H_2O aufgefüllt, unter Mineralöl abgezogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den Ansätzen wurden je 15 µl 3 M NaAc (pH 4.5) und 300 µl kalter, absoluter Ethanol pipettiert und die DNA 15 min mit 10000x g bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 2500x g zentrifugiert, luftgetrocknet, in 5 µl Formamid-Mix (50 mM EDTA pH 8.0; mit Formamid im Verhältnis 5:1) aufgenommen und auf ein 6.8%iges Sequenzgel aufgetragen.

19.3. PAGE-Gel für die automatische Sequenzierung

Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen Sequenzier Modell 373A (Applied Biosystem). Bei diesem Gerät regt ein Laser die Fluoreszenzfarbstoffe zur Lichtemission an, welche dann in einem ´photomultiplier´ verstärkt und in einem Detektor registriert wird. Die Auswertung erfolgt durch einen Computer.
Zunächst wurden für das Sequenzgel zwei Glasplatten gesäubert, zusammengebaut und die Sequenzgellösung mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Lösung wurde nach Zugabe von TEMED und APS luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisation des Gels für 2 h wurde der Vorlauf (1 h bei 1400 V) gestartet. Die Sequenzproben wurden vor dem Auftragen für 7 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte in 1x TBE-Puffer (Roth, Karlsruhe) bei 1400 V für 14 h.

20. Primer Extension Analyse

(modifiziert nach Domenjoud et al., 1990)

Diese Methode dient der Ermittlung des Transkriptionspunktes eines Gens. Das Prinzip der Methode beruht auf Anlagerung eines radioaktiv oder fluoreszenz markierten Primers an die mRNA und Synthese eines zweiten komplementären Stranges mit Hilfe des Enzyms, Reverse Transkriptase.

Der fluoreszenzmarkierte Primer (10 pmol) wurde mit 20 µg Maustestis-Gesamt-RNA auf 11µl DEPC-H_2O gemischt und für 10 min bei 70°C inkibiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die folgenden Komponenten zu dem Ansatz zugegeben:

4 µl	5x Reverse Transkriptase-Puffer
1 µl	15 mM dNTPs
1 µl	RNasin
1 µl	Reverse Transkriptase (BRL)
2 µl	DEPC-H_2O

Der Gesamtansatz im Volumen von 20 µl wurde für 1 h bei 42°C inkubiert. Die cDNA wurde über einer Ethanolfällung pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 5 µl Formamid-Mix (50 mM EDTA, pH 8.0; mit Formamid im Verhältnis 5:1) aufgenommen und auf ein 6.8%iges Sequenzgel für die automatische Sequenzierung aufgetragen.

21. Verdauung der Poly $(A)^+$ - Schwanz von Gesamt-RNA

(Kleene et al., 1984)

Durch die Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide (Poly $(dT)_{12-18}$) an den Poly $(A)^+$-Schwanz von mRNAs und anschließender Verdauung dieses künstlich hergestellten doppelsträngigen DNA/RNA-Hybrids durch RibonukleaseH (doppelstrangspezifisch) können unterschiedlich lange Poly $(A)^+$-Schwänze identifiziert werden.

Dazu wurden drei getrennte Ansätze von 20 µg Maustestis Gesamt-RNA mit 2 µg Oligo $(dT)_{12-18}$ versetzt und für 3 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden den Reaktionsansätzen 0.2 Vol. 5x Ribonukleasepuffer H zugegeben und für 15 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden durch Zugabe von 1 µl RibonukleaseH (BRL, 12 U/µl) bei 37°C verdaut (Reaktionszeit von 0-, 15- und 30 min) und danach sofort einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen. Die Überstände wurden mit 0.1 Vol. 3M NaAc (pH 4.8) und 2.5 Vol. Ethanol für 20 min bei –70°C präzipitiert und die verdauten RNA-Moleküle durch Zentrifugation (13000x g, 15 min, 4°C) sedimentiert. Danach wurden die Reaktionsansätzen mit 70%igem Ethanol gewaschen, wie unter II.11.3. beschrieben behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

22. Herstellung von Paraffinschnitten aus Geweben, Organen und Embryonen

Das frisch präparierte Material wurde direkt in das entsprechende Fixativ gegeben und je nach Größe des Präparats für eine Stunde bis zu einer Woche bei RT fixiert.

Bouin´sches Gemisch:	15 Teile	gesättigte Pikrisäure (filtriert)
	5 Teile	37%ige Formaldehylösung
	1 Teil	Eisessig
Fixiergemisch mit Glutaraldehyd:	50 mM	Na-Phosphatpuffer (pH 7.4)
	5.5%	Glutaraldehyd

	3%	NaCl
Fixiergemisch mit Paraformaldehyd:	4%	Paraformaldehyd
	10 ml	10x PBS
		ad 100 ml dH_2O

Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 96%) wurde das Gewebe entwässert. Um den Ethanol vor der Einbettung in das Paraffin vollständig zu entfernen, wurde das Gewebe über Nacht in Methylbenzoat inkubiert.

Für die Einbettung wurde das Paraffin im Wasserbad bei 58°C geschmolzen. Die Einbettung bestand aus mehreren Schritten, die sämtlich bei 58°C durchgeführt wurden. Für die Entfernung des Methylbenzoats wurde das Gewebe zweimal mit Benzol und zweimal in einem 1:1 Benzol/ Paraffin-Gemisch jeweils für 1 h inkubiert. Zur vollständigen Durchdringung des Gewebes mit dem Paraffin wurde das Präparat anschließend zweimal für 1 h in Paraffin inkubiert. Im Anschluß daran wurde die auf 58°C temperierte Einbettungsform etwa zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, das Gewebe in die Form überführt und mit Paraffin aufgefüllt. Nach der Aushärtung über Nacht wurde der Paraffinblock aus der Form genommen und bei 4°C gelagert.

Die Paraffinblöcke 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 diese auf einer 40°C warmen Heizplatte erwärmt. Die Schnitte wurden direkt auf den Ethanoltropfen aufgelegt und solange auf der Wärmeplatte belassen, bis das Ethanol vollständig verdampft war. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

23. ´whole mount´-*in situ*-Hybridisierung

(modifiziert nach Wilkinson und Nieto, 1993)

Die Methode der ´whole mount´- *in situ*-Hybridisierung ermöglicht einen dreidimensionalen und zellgenauen Nachweis der Expression von Genen in der frühen Embryogenese. Die ´whole mount´- *in situ*-Hybridisierung ist besonders geeignet für Embryonalstadien 7 – 13 Tage *post coitum* (pc) bzw. aus dem Embryonen isolierten Gewebe.

23.1. Präparation der Maus-Embryonen

Weibliche NMRI Mäuse wurden verpaart und am nächsten Morgen auf einen Varginalpfropf als äußeres Zeichen für die Kopulation kontrolliert. Embryonen (pc) wurden an den gewünschten Tagen präpariert und in 4% Paraformaldehyd in PBS 2 h bis über Nacht inkubiert. Danach folgten zweimal Waschschritte in PBT (0.1% Tween-20 in PBS) bei 4°C für 5 min. Die Embryonen wurden über eine aufsteigende Methanolreihe in PBT (25%, 50% und 75%, je 5 min) entwässert. Nach zweimaliger Inkubation in 100% Methanol für je 5 min konnte das Gewebe bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert werden.

23.2. Vorbehandlung der Embryonen

Die Behandlung der Embryonen vor der Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden erfolgte nach folgender Prozedur:

Rehydrieren (in einer absteigenden Methanolreihe in PBT)	75%, 50% und 25%, je 5 min
2x PBT	5 min
6% H_2O_2 in PBT (frisch)	1 h
3x PBT	5 min
10 µg/ml Proteinase K in PBT (frisch)	3–15 min

2 mg/ml Glycin in PBT (frisch)	5 min
2x PBT	5 min
0.2% Glutaraldehyd/ 4% Prarformaldehyd in PBT (frisch)	20 min
2x PBT	5 min

23.3. Synthese von RNA-Proben: DIG-Markierung

Die *in vitro* Transkripte wurden nach der Anleitung des DIG-RNA Labeling Kits (Boehringer, Mannheim) markiert. Folgende Reagenzien wurden zusammenpipettiert:

2 µl	10x Transkritipnspuffer
1 µl	0.2 M DTT
2 µl	NTP-Labeling-Mix (je 10 mM rATP, rCTP, rGTP 6.5 mM UTP und 3-5 mM DIG-UTP)
1 µg	Linearisierte Plasmid-DNA
0.5 µl	RNasin (100 U/µl)
1 µl	SP6-, T3- oder T7-RNA Polymerase (10 U/µl)
	ad 20 µl DEPC-H_2O

Für die Durchführung der Markierungsreaktion wurde dieser Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) abgestoppt. Die markierte RNA wurde mit Hilfe von 2.4 µl 4 M LiCl und 75 µl 100% Ethanol 30 min bei –70°C gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl DEPC-H_2O gelöst. Die Effizienz der Markierung und die Menge der synthetisierten RNA wurden mit Hilfe eines immunologischen Nachweises des eingebauten Digoxygenins überprüft. Dazu wurde aus der markierten RNA-Probe und aus markierter Kontroll-RNA bekannter Konzentration eine Verdünnungsreihe hergestellt, die auf eine Nylonmembran aufgetropft und luftgetrocknet wurde. Unter Verwendung des ´DIG-Nucleic Acid Detection´-Kits (Boehringer, Mannheim) wurden eingebauten DIG-Nukleotide mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Mit Hilfe der aufgetragenen markierten Kontroll-RNA ließ sich die Kozentration der markierten Probe abschätzen.

23.4. Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden

Es wurde 1 ml Hybridisierungslösung zugeben und mindestens 1 h bei 70°C präinkubiert. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 70°C im Wasserbad unter Schütteln durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Embryonen entweder in die 50% Formamid/ 5x SSC (pH 4.5) überführt und zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert oder anschließend mit der DIG-markierten RNA-Probe (0.5 µg/ml) hybridisiert.

Hybridisierungslösung:	50%	Formamid
	5x	SSC (pH 4.5)
	50 µg/ml	Hefe-tRNA
	1%	SDS
	50 µg/ml	Heparin

23.5. Waschen nach der Hybridisierung

Zum Waschen der Embryonen wurden folgene Schritte durchgeführt:

2x Lösung 1	30 min, 70°C
1x 1:1 (Lösung 1: Lösung 2)	10 min, 70°C
3x Lösung 2	5 min, RT
100 µg/ml RNase in Lösung 2	15–30 min, RT
1x Lösung 2	5 min, RT
1x Lösung 3	5 min, RT
2x Lösung 3	30 min, 65°C
3x TBST	5 min, RT
1x 10% FKS in TBST	5 min
1x 10% FKS in TBST	60 – 90 min

Lösung 1:	50%	Formamid
	5x	SSC (pH 4.5)
Lösung 2:	0.5 M	NaCL
	10 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	0.1%	Tween-20
Lösung 3:	50%	Formamid
	2x	SSC (pH 4.5)

23.6. Detektion der Hybridisierungssignale

Zur Detektion der hybridisierten RNA-Sonden wurden der Anti-DIG-AP (´alkaline phosphatase´) gekoppelte Antikörper (AK) der Firma Boehringer verwendet. Zur Behandlung des Anti-DIG-AP-Antikörpers wurden 3 mg Embryonenpulver in 0.5 ml TBST gegeben, 30 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Danach wurden 5 µl FKS und 1 µl Anti-DIG-AP-Antikörper zugegeben und 1 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde die Embryonen weiter über Nacht bei 4°C unter Schütteln in 1 ml Überstand mit 3 ml 1% FKS/TBST inkubiert. Zum Waschen der Embryonen am nächsten Tag wurden folgende Schritte durchgeführt:

3x TBST	5 min, RT
5x TBST	1 h, RT
3x NTMT	10 min, RT

Der Nachweis des Antikörpers erfolgte durch eine Farbreaktion. Dazu wurden die Embryonen in 4.5 µl NBT und 3.5 µl BCIP in 1 ml NTMT 30 min bis mehrere Stunden im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Embryonen in PBT gewaschen. Die Auswertung erfolgte durch Fotografie unter einem Lichtmikroskop (Zeiss).

TBST:	150 mM	NaCl
	100 mM	KCl
	250 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	1%	Tween-20
	2 mM	Levamisole
NTMT:	100 mM	NaCl
	100 mM	Tris/HCl (pH 9.5)
	50 mM	$MgCl_2$
	0.1%	Tween-20
	2 mM	Levamisole

24. Proteinchemische Techniken

24.1. Isolierung von Gesamtprotein aus Gewebe

Frisches Gewebe wurde in ein 15 bzw. 50 ml Falcon-Gefäß mit 1 Vol. SEM-Puffer gegeben. Das Gewebe wurde mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax T25, Schütt, Göttingen) homogenisiert, und die groben Gewebetrümmer wurden abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4°C). Der Proteinüberstand wurde nach Zugabe von 1 Vol. 2x SDS-Auftragspuffer zur Denaturierung 10 min im Wasserbad gekocht und danach auf Eis abgekühlt. 10 µl des Überstandes mit SDS-Auftragspuffer wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Die Lagerung der Proben erfolgt bei –80°C.

24.2. SDS-Polyacrylamidgel

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurden Gele mit 6%-20% Acrylamidgehalt

verwendet. Je nach Anwendung wurden auch Gele mit einem Gradienten der Acrylamidkonzentration benuzt. Bei der SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung der Proteine im wesentlichen aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte.

Zur Herstellung der SDS-PAA-Gele wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungen für das Trenngel zusammenpipettiert, kurz gemischt, entgast und zwischen die gesäuberten Glasplatten gefüllt. Das Trenngel wurde mit wenig Buthanol überschichtet und mindestens 1 h polymerisiert. Anschließend wurde das Buthanol abgeschüttelt. Die Lösungen für das Sammelgel wurden zusammenpipettiert, entgast und auf das Trenngel geschichtet. Der Gelkamm wurde luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wurden die Gele an die Elektrophoresekammaer angeklammert und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Elektrophorese der Proben erfolgt mit 10-15 mA über Nacht.

Herstellung der Gelösungen:

Trenngel (30 ml)				
Acrylamidkonzentration	6%	10%	12%	15%
H_2O	13.9 ml	11.9 ml	9.9 ml	6.9 ml
Acrylamidlösung (30%)	8.0 ml	10.0 ml	12.0 ml	15.0 ml
Lower-Tris (4x)	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
10% APS	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml
TEMED	18 µl	12 µl	12 µl	12 µl

Sammelgel (10 ml)	
H_2O	6.8 ml
Acrylamidlösung (30%)	1.7 ml
Upper-Tris (4x)	1.25 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	10 µl

24.3 ´Semi dry blot´

Proteine werden standardmäßig nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurden 18 Filterpapiere sowie ein PVDF-Filter in der

Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Für den ´semi dry blot´ wurden die Graphitplatten der Transferapparatur mit dH_2O abgerieben. 6 Filterpapiere wurden in 0.3 M Tris/HCl, pH 10.4/ 20% Methanol getränkt und luftblasenfrei auf die Anodenplatte aufgelegt. Darauf wurden 3 Filterpapiere, die in 25 mM Tris/HCl, pH 10.4/ 20% Methanol getränkt wurden, geschichtet. Die ´Immobilon-P´-Membran wurde in Methanol angefeuchtet, kurz in 25 mM Tris/HCl, pH 10.4/ 20% Methanol gewaschen und auf die Filterpapiere gelegt. Das Gel wurde von den Glasplatten gelöst, das Sammelgel wurde abgetrennt und verworfen, während das Trenngel vorsichtig auf die Membran aufgebraucht wurde. Anschließend wurden 9 Filterpapiere, die in 40 mM ε-Aminocapronsäure/ 25 mM Tris/HCl, pH 9.4/ 20% Methanol getränkt wurden, auf das Gel geschichtet. Nachdem die Kathodenplatte aufgebracht worden ist, erfolgt der Transfer für 1 h bei 0.8 mA/cm^2. Nach dem Transfer wurde die Membran entweder gefärbt oder mit einem monospezifischen Antikörper bzw. polyklonalen Antiserum umgesetzt.

24.4. Färbung von Polyacrylamidgelen

SDS-Gele wurden standardmäßig mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel ca 30 min in der Färbelösung geschwenkt. zur Differenzierung wurde das Gel anschließend für mehrere Stunden in Entfärberlösung bewegt, wobei der Entfärber mehrmals gewechselt wurde.

Färbelösung:	45%	Methanol
	9%	Essigsäure
	0.05%	Coomassie Brilliant Blue R250
Entfärberlösung:	5%	Methanol
	7.5%	Essigsäure

24.5. Reversible Färbung von ´Western blots´

(Pryor et al., 1992)

Proteine, die nach Elektrotransfer an Membranen gebunden sind, können reversibel mit Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB-R250) gefärbt werden. Zur Färbung wurde der Filter 5 min in 0.1% CBB-R250 in 50% Methanol geschwenkt. Der Filter wurde in einem Gemisch aus 1:2:1 dH_2O:Methanol:Essigsäure differenziert bzw. entfärbt. Nach vollständiger Entfärbung kann der Filter für eine Immunumsetzung verwendet werden.

24.6. Immunumsetzung von Proteinfiltern

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden vor der Umsetzung mit dem Antiserum 1 h mit Blockpuffer abgesättigt. Danach wurde der Proteinfilter in einer Plastiktüte mit 1 ml/ 10 cm^2 Antiserum (1:500 in Waschpuffer verdünnt) entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden 1 h in Waschpuffer (3–4 Wechsel) entfernt. Der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Zweitantikörper wurde 1:5000 in Waschpuffer verdünnt. Die Membran wird für 1 h in Antikörperlösung geschwenkt, danach wurden wiederum 3–4x für jeweils 15 min die nicht gebundenen Antikörper in Waschpuffer entfernt. Der Filter wurde anschließend 2 min in Puffer 3 umgepuffert, bevor er mit 1 ml/ 10 cm^2 Färbelösung in einer Plastiktüte eingeschweißt wurde. Die Farbentwicklung erfolgt in der Dunkelheit. Nach der Farbreaktion wurde der Filter in dH_2O kurz gewaschen und anschließend auf einem Filterpapier getrocknet.

24.7. Immunlokalisierung von Proteinen in Paraffinschnitten

Deparaffinierte Schnitte wurden 5 min in PBS/ 1% Triton X-100 permeabilisiert. Nachdem die Präparate 2x 5 min in PBS gewaschen worden waren, wurde um die Schnitte herum die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Unspezifische Bindungsstellen wurden 30 min mit 50–100 µl 5% Ziegen-Normalserum in PBT abgesättigt. Danach wurde erneut überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. Auf das Präparat wurden 10 µl der

monospezifischen Antikörperlösung gegeben und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt. Die Schnitte wurden 2 h in einer feuchten Kammer mit PBS als Puffer inkubiert. Unspezifisch bindende Antikörper wurden in PBT 4x 10 min abgewaschen. Der Zweitantikörper (Ziege-α-Kaninchen-alkalische Phosphatase) wurde 1:500 in PBT verdünnt. Pro Objektträger wurden 50–100 µl Antikörperlösung eingesetzt. Nach 2 h Inkubation in einer feuchten Kammer wurden nicht gebundene Antikörper 4x 10 min in PBT ausgewaschen. Das Gewebe wurde in Puffer 3 2 min umgepuffert, bevor 50 µl Färbelösung auf den Schnitt gegeben wurden. Die Farbreaktion erfolgte unter einem Deckglas und wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Durch Eintauchen der Objektträger in TE-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Danach wurden die Präparat in dH_2O kurz gewaschen und mit einem Tropfen ´Aqua-Polymount´ eingedeckelt.

25. Herstellung des polyklonalen Antikörpers gegen das HASH-Peptid

25.1. Kopplung des synthetischen Peptids an BSA

20 mg BSA (ca. 0.3 µMol) wurden in 0.5 ml 0.4 M Phosphatpuffer, pH 7.5 gelöst. 10 µMol des synthetisierten Peptids wurden in 1.5 ml PBS gelöst. BSA- und Peptid-Lösung wurden gemischt und unter ständigem Rühren zu 1 ml einer wässerigen Glutaraldehydlösung (2–15 µM Endkonzentration) in einem Zeitraum von 5 min tropfenweise zugegeben. Das Gemisch wurde für weitere 30 min gerührt. Nicht umgesetztes Glutaraldehyd wurde durch Zugabe von 0.1 Vol. 1 M Glycinlösung inaktiviert. Dazu wurde das Gemisch für weitere 30 min gerührt und anschließend gegen PBS über Nacht dialysiert.

25.2. Gewinnung eines polyklonalen Antiserums

Für proteinchemische Untersuchungen wurde ein polyklonales Antiserum gegen das HASH-Oligopeptid in Neuseeland Kaninchen erzeugt. Zur Präimmunisierung wurde ein 1:1

Gemisch aus dem synthetischen Peptid, das zur Steigerung der Immunogenität an BSA gekoppelt worden war, und „Freund´sches Complete Adjuvans“ subkutan verabreicht. Nach 3 Wochen erfolgte eine ´Boost´-Immunisierung mit einem Gemisch 1:1 aus dem gekoppelten Peptid und „Freund´schem Incomplete Adjuvans“. 14 Tage nach der 2. Immunisierung wurde dem Kaninchen durch Herzpunktion das Blut entnommen. Zur Gerinnung der zellulären Bestandteile wurde das Blut für eine Stunde bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C inkubiert. Die agglutinierten Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15 min, 10000x g) pelletiert. Das aliquotierte Serum wurde bei –80°C gelagert.

25.3. Aufreinigung monospezifischer Antikörper

Für eine genauere Analyse müssen die im polyklonalen Antiserum enthaltenen Antikörper gegen das gewünschte Protein von den übrigen Antikörpern getrennt werden. Hierzu wurde der Kopplungkomplex (Peptid-BSA) im PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Bande ausgeschnitten, mit 200 µl des polyklonalen Antiserums 1 h umgesetzt und dann 3x 10 min in Waschpuffer bewegt. Zur Elution der monospezifischen Antikörper von der Membran wurde der Filterstreifen 15 min mit 1 ml Elutionslösung heftig geschüttelt. Nachdem der Filterstreifen erneut in PBS gewaschen worden war, konnte er wieder mit dem polyklonalen Antiserum umgesetzt werden. Die eluierten Antikörper wurden in ein *Centrisart*-Röhrchen (Satorius, Göttingen) überführt und durch Zentrifugieren bei 2500x g konzentriert. Der Überstand wurde verworfen, die Restflüssigkeit mit PBS auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das KSCN vollständig aus der Antikörperlösung entfernt worden war (3–4 mal). Die monospezifische Antikörperlösung wurde mit 0.2% NaN_3 versetzt und bei 4°C gelagert.

Elutionslösung: 3 M KSCN
0.1% BSA
in 1x PBS

26. Techniken zur Herstellung von ´Knock out´-Mäusen

26.1. Routinekultur von ES-zellen

Die Isolation und gezielte Manipulation von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ist ein entscheidender Fortschritt im Rahmen der entwicklungsbiologischen Forschung bei Säugertieren. Die ersten ES-Zellen wurden von Evans und Kaufmann (1981) und Martin (1981) aus der inneren Zellmasse von Blastocysten des 129/Sv-Mausstammes isoliert. Bald danach wurde von Bradley et al. (1984) gezeigt, daß diese Zellen sich an der Entwicklung sämtlicher Gewebe des resultierenden Embryos, einschließlich der Keimdrüsen beteiligen, wenn sie in die Blastocysten injiziert werden. Die erste genetische Manipulation an ES-Zellen wurde von Robertson et al. (1986) und Gossler et al. (1986) durchgeführt. Diese Gruppen konnten zeigen, daß Mutationen im Genom von ES-Zellen von diesen durch die Keimbahn transmittiert werden. Die ersten erfolgreichen homologen Rekombinationen in ES-Zellen wurden fast gleichzeitig von Thomas und Capecchi (1987) sowie Doetschmann et al. (1987) publiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden ´Knock out´-Mäuse über die Aggregation von ES-Zellen mit 2.5 Tage alten Mausembryonen bzw. über die Blastocysteninjektion generiert. Für diesen Zweck wurden RI-ES-Zellen verwendet. RI-ES-Zellen der Passage 12 wurden zusammen mit Mitomycin C behandelten embryonalen Feederzellen (EmFi) auf 0.2% Gelatine-beschichteten Kulturschalen ausgesät. Das Kulturmedium wurde aufgrund der starken Ansäuerung durch die ES-Zellen täglich gewechselt. Eine erneute Passagierung wurde je nach Dichte der Zellen alle 2-3 Tage durchgeführt. Bei regulären Passagen wurden ES-Zellen in Trypsin/ EDTA-Puffer 1:3 bis 1:8 geteilt. Vor der erneuten Plattierung wurde die Trypsinlösung durch Zentrifugation mit 270x g für 5 min bei RT entfernt. Bei jeder Passage wurden Stocks der ES-Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

26.2. Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode zum Gentransfer. Sie basiert auf der Erkenntnis, daß biologische Membranen durch die Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert werden, ohne daß die Membranstruktur zerstört wird. Während der Phase erhöhter Durchlässigkeit kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen. Die Elektroporation der ES-Zellen wurde nach den Angaben von Joyner (1993) durchgeführt. Dazu wurden 7 x 10^6 bis 2 x 10^7 exponentiell wachsende Zellen nach der Trypsinisierung in 800 µl Elektroporationspuffer und 50 µg linearisierte DNA eingesetzt. Die linearisierte Konstrukt-DNA wurde zunächst mit Phenol/ Chloroform extrahiert, mit 100%igem Ethanol präzipitiert und zuletzt in 70%igem Ethanol gewaschen. Aus Sterilitätsgründen wurde das DNA-Pellet bei RT unter der Sterilbank luftgetrocknet und in 100 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Die ES-Zellen wurden nach der Trypsinisierung in 9 ml Elektroporationspuffer gewaschen, in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und nach erneuter Zentrifugation in einem Volumen von 700 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde in einer Küvette (Gene Pulser Cuvette, 0.4 cm, gap 50, BioRad) vereinigt und mit 240 V und 55 µF bei RT elektroporiert (Gene Pulser, BioRad). Anschließend wurden die ES-Zellen für 20 min auf Eis inkubiert und dann in fünf 100 mm-Kulturschalen auf embryonalen Feederzellen ausplattiert. Die Selektion in G418 (Positv-Selektion) und Gancyclovir (Negativ-Selektion) begann nach 12 bis 16 Stunden. Die Gancyclovir-Selektion wurde nach 5 Tagen beendet, während die G418-Selektion bis zur Isolierung resistenter Klone am Tag 8–9 aufrechterhalten wurde. Zur Kontrolle der Elektroporationseffizienz wurden die Zellen einer Kulturschale lediglich mit G418 selektioniert. Die Effizienz der Elektroporation lag normalerweise bei einer von 10^5 Zellen.

26.3. Isolierung von ES-Zellklonen und deren Kryokonservierung

Positive ES-Zellen wurden lichtmikroskopisch identifiziert. Resistente Kolonien wurden nach einer G418-Selektion über 8 bis 9 Tage isoliert. Dazu wurden die Kulturen einmal in PBS-

Puffer gewaschen und mit 10 ml PBS-Puffer überschichtet. Die Klone wurden mechanisch mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von den umgebenden embryonalen Feederzellen getrennt und bei 37°C in 1x Trypsin/ EDTA in 96-Loch-Platten dissoziiert. Der enzymatische Verdau wurde nach 5 min durch Zugabe von 50 µl ES-Zellmedium gestoppt. Die vereinzelten Klone wurden auf 24-Loch-Platten mit Feederzellen und frischem ES-Zellmedium übertragen und bei 37°C kultiviert. Nach 2 bis 3 Tagen wuchsen die Einzelklone zur Konfluenz und wurden erneut trypsinisiert. Eine Hälfte der Zellen wurde erneut auf Feederzellen ausgesät (master plate), während die andere Hälfte der Zellen auf einer Gelatine-behandelten Platte (duplicate plate) inkubiert wurde. Die auf Feederzellen wachsenden ES-zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit 100 µl Trypsin/ EDTA bei 37°C für 5 min dissoziiert, in 1 ml Kryogefäße (Nunc) überführt und nach Zugabe von 100 µl 2x Gefriermedium gemischt und bei –80°C eingefroren. Die für die DNA-Isolierung vorgesehenen Zellen wurden ebenfalls bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend der DNA-Extraktion unterworfen.
Homolog rekombinierte Klone wurden nach dem Auftauen bei 37°C in 10 ml kaltes ES-Zellmedium gegeben, bei 270x g für 5 min abzentrifugiert und auf Feederzellen in 24-Loch-Platten kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen vier Tage vor der Aggregation aufgetaut und kultiviert.

26.4. Isolierung von 2.5 Tage alten Mausembryonen

Mausembryonen des Stammes CD-1 wurden am Tag 2.5 nach der Befruchtung für die Aggregation mit rekombinierten ES-Zellen isoliert. Eine erfolgreiche Verpaarung läßt sich durch die Anwesenheit des Vaginalpfropfs (VP) bei begatteten Weibchen nachweisen. Dabei handelt es sich um Reste der Spermienflüssigkeit. Der Zeitpunkt des Vaginalpfropfs wird definitionsgemäß als 0.5 gerechnet. Es wurden jeweils zwei Weibchen mit einem Männchen verpaart. VP-positive Weibchen wurden für die Embryonenisolierung verwendet. Am Tag 2.5 wurden nach Abtöten der Mäuse die Ovidukte präpariert und mehrfach in warmen M2-Medium gewaschen. Danach wurden sie in eine mit M2-Medium gefüllte 60 mm-Kulturschale überführt. Unter dem Stereomikroskop wurden die Embryonen durch Ausspülen mittels einer mit M2-Medium gefüllten ausgezogenen Mundpipette aus dem Ovidukt herausgeschwemmt. Um Zell- und Gewebereste zu entfernen, wurden die

ausgespülten Embryonen mehrfach in frisches M2-Medium übertragen. Nach einem weiteren Waschschritt in M16-Medium wurden die Embryonen in eine vorbereitete 30 mm-Kulturschale in einen Tropfen M16-Medium unter Paraffinöl gegeben und bis zur Aggregation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Im Durchschnitt wurden pro Maus etwa 6–8 Embryonen isoliert.

26.5. Aggregation von ES-Zellen

Die isolierten 2.5 Tage alten Mausembryonen mußten vor der Aggregation mit den rekombinierten ES-Zellen von ihrer *Zona pellucida* befreit werden. Sie wurden deshalb in einem Tropfen Tyrode-Lösung unter Öl für etwa 1 min durch mehrfaches Ein- und Aussaugen mit der Mundpipette behandelt. Das Auflösen der *Zona pellucida* wurde durch das Stereomikroskop verfolgt. Die freien Embryonen wurden anschließend dreimal in frischem M16-Medium gewaschen und in die für die Aggregation vorgesehene 30 mm-Kulturschale in einen Tropfen M16-Medium übertragen. In dieser Schale befinden sich 10 bis 12 Tropfen M16-Medium, welche mit Paraffinöl überschichtet sind. In den Boden der Schale innerhalb eines jeden Tropfens werden mit einem feinen Bolzen kleine Vertiefungen eingestanzt, in denen die Embryonen mit den ES-Zellen aggregiert werden. Die Aggregation erfolgte nach der ´Sandwich´-Methode, d.h. zwischen zwei 2.5 Tage alte Embryonen wurden etwa 8–12 ES-Zellen gepackt und über Nacht kultiviert. Die rekombinierten ES-zellen wurden vier Tage vor der Aggregation auf Feederzellen ausgesät, zwei Tage später in subkonfluentem Zustand trypsinisiert und auf zwei 30 mm-Kulturschalen auf Feederzellen verteilt. Am Tag der Aggregation wurden die ES-zellen nur unvollständig mit 1x Trypsin/ EDTA dissoziiert (3 min bei 37°C) und in ein Schale mit M16-Medium übertragen. Jeweils ein ES-Zellhaufen wurde auf einen Embryo gelegt und mit dem zweiten Embryo bedeckt. Anschließend wurden die Aggregate vorsichtig in den Inkubator verbracht und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 bis zum Retransfer kultiviert.

Tyrode´s Säure:	800 mg	NaCl
	20 mg	KCl
	24 mg	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$
	10 mg	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$

100 mg Glocose
400 mg Polyvinylpyrrolidon
ad 100 ml mit dH_2O (pH 2.5 mit 5 M HCl)

26.6. Embryo-Transfer in pseudoträchtige Mäuse

Pseudoträchtige Weibchen des Stammes NMRI wurden durch die Verpaarung mit vasektomierten NMRI-Männchen gewonnen. Für den Embryonen-Retransfer wurden Weibchen am Tag 3.5 verwendet. Nach Betäubung der Maus wurde auf einer Seite der Rückenhaut ein 1 cm langer Schnitt auf Höhe der Nieren gesetzt. Über dem rötlich durchscheinendem Ovar wurde ein kleines Loch in die Unterhaut geschnitten und das Ovar mit einer Pinzette am anliegenden Fettgewebe herausgezogen. Mit Hilfe einer feinen Kanüle wurde in das nun freiliegende Uterushorn ein kleines Loch eingebracht. Die über Nacht kultivierten ES-Zellaggregate wurden mit einer fein ausgezogenen Mundpipette aus den Vertiefungen der Kulturschale herausgespült und mit möglichst wenig Medium in der Spitze der Pipette aufgenommen. Dabei wurden nur Aggregate berücksichtigt, die eindeutig das Blastocysten-Stadium erreicht hatten. Die Pipette wurde dann durch das Loch in den Uterus eingeführt und vorsichtig ausgeblasen. Durchschnittlich wurden etwa 10–12 Aggregate sowie 2–3 Wildtyp-Embryonen pro Maus übertragen. Nach erfolgtem Retransfer wurden die Wundränder aneinander gelegt und mit einer Klammer verschlossen. Nach Desinfektion der Wunde wurde die Maus bis zum Erwachen auf eine Wärmeplatte gelegt.

26.7. Identifizierung von Chimären

Chimären wurden anhand des Agouti-Fellmarkers identifiziert. Männliche Mäuse mit einem Chimerismus von mindestens 50% wurden auf den Ausgangsstamm zurückgekreuzt. Agoutifarbene Nachkommen der F1-Generation wurden im Alter von drei Wochen in einer Southern-Analyse genotypisiert.

III. ERGEBNISSE

1. Isolierung der HASH-cDNA der Maus

Eine partielle cDNA für das Gen HASH wurde im Rahmen von Experimenten isoliert, bei denen nach der cDNA für einen möglichen Transkriptionsfaktor des Proakrosingens gesucht wurde. Die cDNA wurde durch das Screenen einer Testis-λgt11-Expressionsbibliothek der Ratte mit einem Promotorfragment (F4) des Proakrosingens, an das im ´gel retardation assay´ ein Protein aus Testisextrakten bindet, von Keime (1993) isoliert und von Aho (1997) und Shamsadin (1995) weiter bearbeitet. In weiteren ´gel retardation assays´ konnten jedoch keine spezifischen Interaktionen zwischen dem Fragment F4 und den Fusionsproteinen aus HASH-cDNA nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Expressionsanalysen mit HASH-cDNA zeigten jedoch eine testisspezifische Expression des HASH-Gens bei Ratte und Maus. Durch Northern-Blot-Experimente konnte nachgewiesen werden, daß das HASH-Gen in Testis von Ratte und Maus exprimiert ist, und zwar mit drei Transkripten (2.9 Kb, 2.3 Kb und 1.5 Kb). Zusätzlich konnte eine schwache Expression des 2.9 Kb Transkriptes in Ovar und Thymus beider Spezies und in Placenta der Maus nachgewiesen werden. Aufgrund der Ergebnisse bei weiteren Northern-Blot-Analysen wurde angenommen, daß die drei Transkripte des HASH-Gens durch alternatives Spleißen entstehen. In dieser Arbeit sollte zunächst die cDNA des HASH-Gens vervollständigt und weiter charakterisiert werden.

2. Charakterisierung und Vervollständigung der HASH-cDNA der Maus

2.1. Expressionsanalyse des HASH-Gens der Maus

2.1.1. Expression des HASH-Gens in verschiedenen adulten Geweben

Um die Gewebespezifität der Expression des HASH-Gens zu analysieren, wurde das Northern-Blot-Experiment mit RNA aus verschiedenen Organen der adulten Maus durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA (je 20 µg) aus verschiedenen Organen der adulten Maus – Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz, Muskel, Niere, Ovar, Placenta, Thymus und Testis – mit der radioaktiv markierten cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7) hybridisiert (Abb. 1). Um die Integrität und Menge der untersuchten RNAs zu überprüfen, wurde der Northern-Blot mit der radioaktiv markierten cDNA-Sonde für den humanen Elongationsfaktor hEF-2 nachhybridisiert. Nach zweitägiger Exposition des Autoradiogramms zeigten sich drei Hybridisierungssignale in Testis-RNA mit einer Länge von 2.9 Kb, 2.3 Kb und 1.5 Kb. In Ovar, Placenta und Thymus wurde nur das große Transkript von 2.9 Kb detektiert. In anderen getesteten Geweben konnten auch nach einwöchiger Exposition des Autoradiogramms keine HASH-Transkripte nachgewiesen werden.

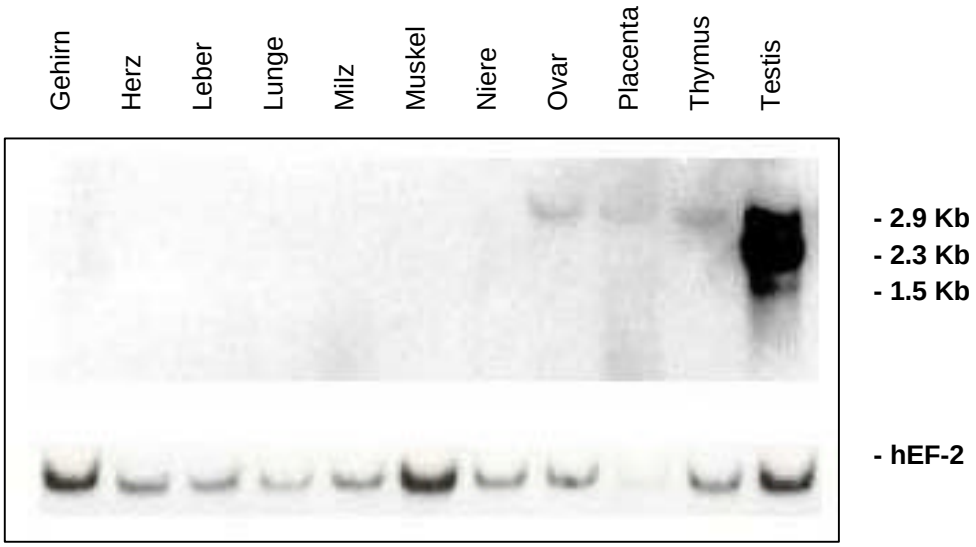


Abb. 1: Gewebespezifische Expression des HASH-Gens der Maus.

Gesamt-RNA (je 20 µg) aus Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Milz, Muskel, Niere, Ovar, Placenta, Thymus und Testis wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit der radioaktiv markierten cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7) hybridisiert. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug ca. 36 h. Die Integrität und Menge der aufgetragenen RNAs wurde durch Nachhybridisierung der Nitrocellulosemembran mit der Sonde für den humanen Elongationsfaktor hEF-2 überprüft.

2.1.2. Expression des HASH-Gens während der Testisentwicklung

Für die Untersuchung zur Expression des HASH-Gens während der postnatalen Testisentwicklung wurde eine Northern-Blot-Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus Testisgewebe von 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 und 60 Tage alten Mäusen durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1%igen denaturierenden Agarosegel wurde die RNA auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der radioaktiv markierten H-800 cDNA-Sonde (Abb. 7) hybridisiert (Abb. 2).

Wie Abbbildung 2 zeigt, hybridisiert die H-800 HASH-cDNA mit allen getesteten RNAs. Das größte Transkript (2.9 Kb) ist in RNA aus allen Testisstadien vorhanden, während die zwei kleineren Transkripte (2.3 Kb und 1.5 Kb) zum Zeitpunkt der ersten haploiden Differenzierungsstadien im Testis nachweisbar sind. Das zeigt die keimzellspezifische Expression der zwei kleineren Transkripte mit starker Intensität des mittleren Transkriptes.

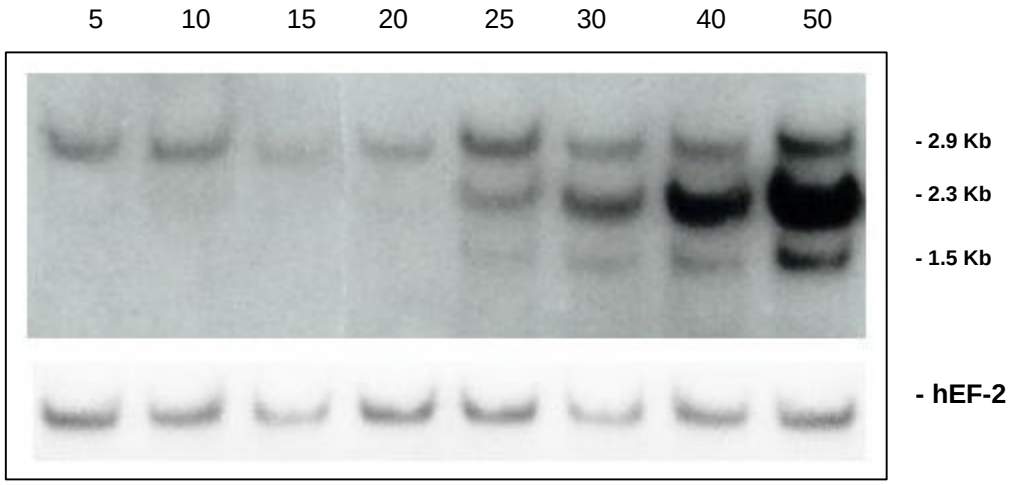


Abb. 2: Northern-Blot-Analyse der Expression des HASH-Gens der Maus in der postnatalen Testisentwicklung.

Gesamt-RNA (je 20 µg) aus Testes von 5, 10, 15, 20, 25, 30 40 und 50 Tage alten Mäusen wurde nach denaturierender Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der HASH cDNA Sonde H-800 (Abb. 7) hybridisiert. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug ca. 36 h. Die Integrität und Menge der aufgetragenen RNAs wurde durch Nachhybridisierung der Nitrocellulosemembran mit der Sonde für den humanen Elongationsfaktor hEF-2 überprüft.

2.1.3. Analyse der Expression des HASH-Gens in Testes von verschiedenen Mausmutanten mit Keimzelldefekten

Für die Untersuchung zur Expression des HASH-Gens bei verschiedenen Mutanten der Maus wurden jeweils 20µg Gesamt-RNA aus Testes der Mausmutanten W/W^v, Tfm/Y, olt/olt und qk/qk elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der radioaktiv markierten H-800 cDNA-Sonde (Abb. 7) hybridisiert.

Nach etwa zweitägiger Exposition konnten positive Hybridisierungssignale bei allen untersuchten RNAs nachgewiesen werden. Bei W/W^v- und Tfm/Y-Mutanten konnte nur das 2.9 Kb große Transkript gefunden werden. Das Fehlen der 2.3 Kb und 1.5 Kb großen Transkripte bei diesen Mutanten korreliert mit dem Fehlen von haploiden Keimzellen. In der Tfm/Y-Maus werden die Spermatogonien bis zur meiotischen Prophase differenziert, während die W/W^v-Maus keine Spermatogonien besitzt. Bei olt/olt- und qk/qk-Mutanten sind alle drei HASH-Transkripte zu identifizieren. In diesen Mutanten erfolgt die Spermatogenese bis zu haploiden Spermatiden. Das heißt, daß die zwei kleineren Transkripte (2.3 Kb und 1.5 Kb) erst in haploiden Keimzellen exprimiert werden (daher werden sie im folgenden als „HASHgerms“ bezeichnet), während das große Transkript (2.9 Kb) nur in somatischen Geweben nachweisbar ist (daher als „HASHsoma“ bezeichnet).

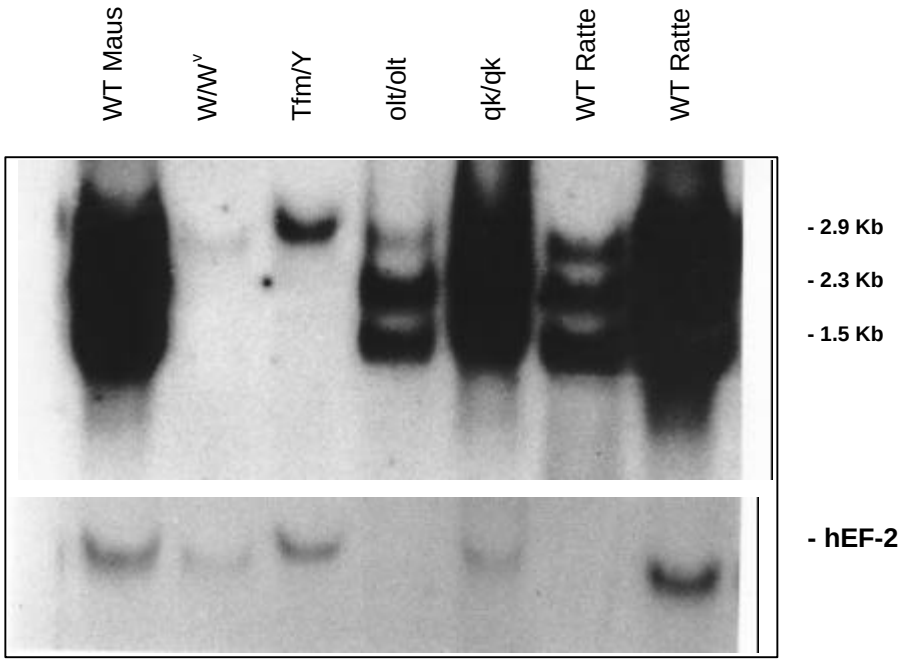


Abb. 3: Northern-Blot-Analyse zur Expression des HASH-Gens im Testis von verschiedenen Mutanten mit Keimzelldefekten.

Jeweils 20 µg Gesamt-RNA aus dem Testis verschiedener Mutanten (W/W^v-, Tfm/Y, olt/olt, qk/qk-Maus) sowie von Wildtyp-Maus und –Ratte (WT) wurde mit der HASH-cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7) hybridisiert. Die Kontrolle der verwendeten RNAs wurde durch eine Nachhybridisierung der Membran mit der cDNA für den humanen Elongationsfaktor hEF-2 durchgeführt.

2.1.4. Embryonale Expression des HASH-Gens der Maus

Wie im Abschnitt 2.1. erwähnt wurde, wird HASHsoma in verschiedenen adulten Geweben einschließlich Testis, Ovar, Thymus und Gehirn exprimiert. Durch die Northern-Blot-Analyse wurde nachgewiesen, daß die 2.9 Kb große HASH-mRNA in kultivierten ES-Zellen transkribiert ist (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigte der Vergleich der HASH-cDNA-Sequenz der Maus mit den cDNA-Sequenzen in Datenbanken, daß eine große Anzahl der embryonalen EST-Klone mit der HASH-cDNA-Sequenz identisch sind. Daher wurde die Expression des HASH-Gens während der embryonalen Entwicklung untersucht.

2.1.4.1. Untersuchung der Expression des HASH-Gens während der Embryonalenentwicklung mittels RT-PCR

Um Information über die Expression des HASH-Gens während der embryonalen Entwicklung zu erhalten, wurde zunächst die RT-PCR mit Gesamt-RNA aus Blastocysten, 8.5-, 9.5-, 10.5-, 11.5-, 12.5-, 13.5- und 14.5-Tage alten Embryonen durchgeführt. Es wurde 5 µg der isolierten RNA revers transkribiert und 200 ng der cDNA für die PCR unter Verwendung der genspezifischen Forward-Primer HA25 und Reverse-Primer HA42R (s. Anhang), deren Sequenzen in Exon 11 und 13 lokalisiert sind, eingesetzt. Die 210 Bp großen Amplifikate ließen sich in Blastocysten, 8.5-, 9.5-, 10.5-, 11.5- und 12.5-

Tage alten Embryonen nachweisen (Abb. 4). Bei 13.5-Tage alten Embryonen wurde ein schwaches Signal detektiert, während bei 14.5-Tage alten Embryonen kein Signal erhalten wurde. Die Integrität der verwendeten RNAs wurde nachfolgend durch die Amplifikation der mRNA für das Gen der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) mit den Primern HPRT-F und HPRT-R überprüft.

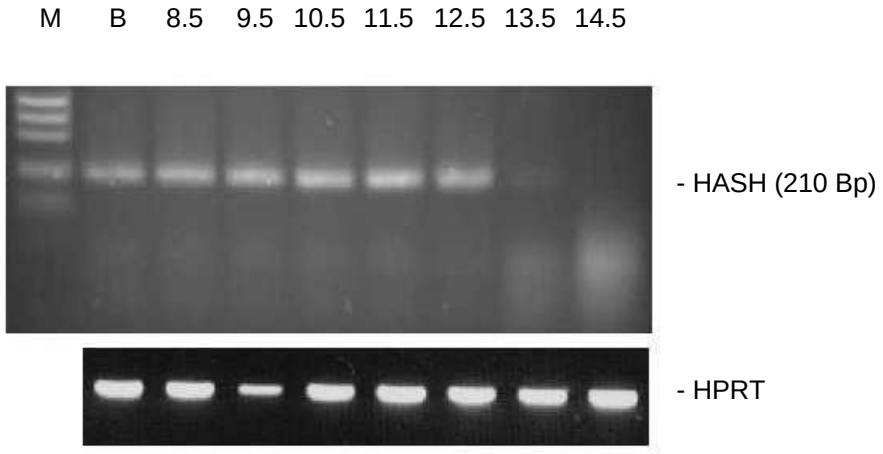


Abb. 4: Expressionsanalyse des HASH-Gens der Maus während der Embryonalentwicklung mittels RT-PCR.

Gelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (210 Bp), die durch RT-PCR unter Verwendung der HASH-spezifischen Forward-Primer HA25 und Reverse-Primer HA42R amplifiziert wurden. Die 210 Bp großen Amplifikate wurden in Blastocysten (B), 8.5-, 9.5-, 10.5-, 11.5-, 12.5- und 13.5-Tage alten Embryonen nachgewiesen. Die Integrität der verwendeten RNAs wurde nachfolgend durch die Amplifikation der mRNA für das Gen der Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) mit den Primern HPRT-F und HPRT-R überprüft.

2.1.4.2. Identifizierung des Expressionsmusters des HASH-Gens während der Embryonalenentwicklung mittels ´whole mount´-*in situ*-Hybridisierung

Aus dem Ergebnis der Expressionsuntersuchung durch RT-PCR während der embryonalen Entwicklung stellte sich folgende Frage: wo exprimiert das HASH-Gen im Embryo? Um diese Frage zu beantworten, wurde die ´whole mount´- *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden 9.5- und 10.5-Tage alte Embryonen präpariert und mit einer Digoxigenin-markierten ´antisense´ und ´sense´ cDNA-Sonde H1.2, die die Nukleotidsequenz von 648 bis 1880 der HASH-cDNA enthält (Abb. 16), hybridisiert. Dabei zeigte die Hybridisierung mit sowohl ´antisense´- als auch ´sense´-markierter Sonde einen hohen Hintergrund (Daten nicht gezeigt). Daher wurde eine neue Digoxigenin-markierte ´antisense´ und ´sense´ cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7), die die Nukleotidsequenz von 1881 bis 2678 der HASH-cDNA enthält (Abb. 16), synthetisiert und für die ´whole mount´- *in situ*-Hybridisierung eingesetzt (Abb. 5). Hierbei wurden Hybridisierungssignale hauptsächlich im Neuralrohr und in den Somiten bei 9.5- und 10.5-Tage alten Embryonen beobachtet (A, B, C und D in Abb. 5). Bei 10.5-Tage alten Embryonen wurde ein spezifisches Signal nur in der distalen Region der Beinknospe detektiert (Abb. 5A, I). Für die weitere Differenzierung der Expressionstopografie wurden die Embryonen im 2.5%igen Agarosegel eingebettet und dann transversal (E-I in Abb. 5) bzw. sagital (C und D) geschnitten.

In Sagitalschnitten bei 9.5 (C)- und 10.5 (D)-Tage alten Embryonen wurde die Hybridisierung im gesamten Neuralrohr von kaudal bis rostral beobachtet. In den Transversalschnitten sieht man nach Vergrößerung ein deutliches Hybridisierungssignal im dorsalen Bereich des Neuralrohres (F, G und H). In Abbildung F wird das Hybridisierungssignal im Notochord gezeigt. In Abbildung 5I ist das auf dem distalen Bereich der Beinknospe eingeschänkte Hybridisierungssignal mit Pfeil gekennzeichnet.

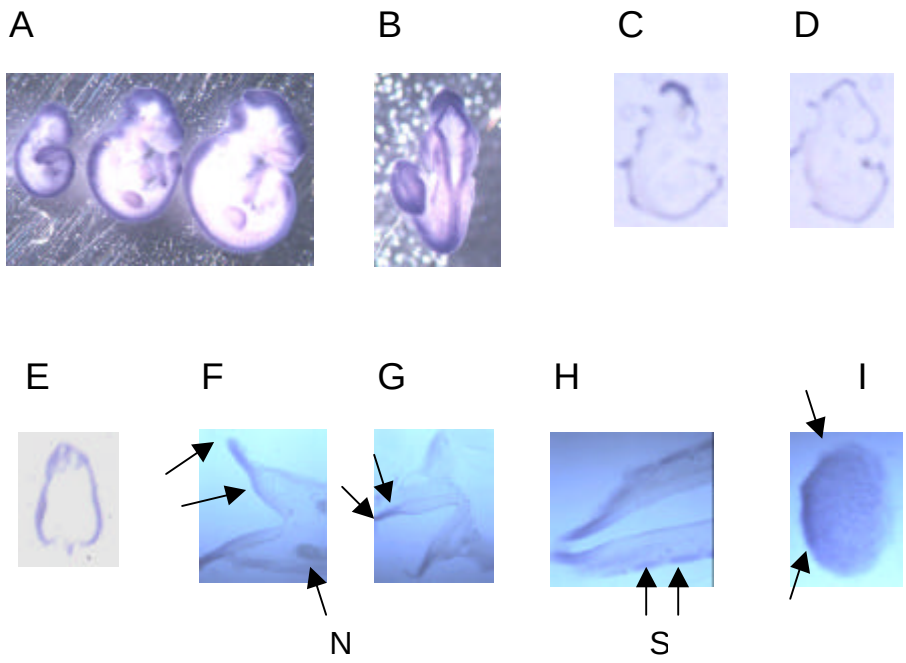


Abb. 5: ´Whole mount´-in situ-Hybridisierung.

*Für die ´whole mount´-*in situ*-Hybridisierung wurden 9.5- und 10.5-Tage alte Embryonen präpariert und und mit einer Digoxigenin-markierten ´antisense´ und ´sense´ cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7), die die Nukleotidsequenz von 1881 bis 2678 der HASH-cDNA enthält, hybridisiert.*

A. Rechte Seite der etwa 9-, 9,5- und 10.5-Tage alten Embryonen, die mit einer Digoxigenin-markierten ´antisense´ cDNA-Sonde H-800 hybridisiert wurden.

B. Dorsale Ansicht des 10.5-Tage alten Embryos aus A.

C und D. Sagitalschnitte von 9.5 (C)- und 10.5 (D)-Tage alten Embryonen.

E – I. Transversalschnitte eines 10.5-Tage-alten Embryos.

N = Notochord

S = Somit

2.2. Untersuchung zum alternativen Spleißen

Southern-Blot-Analyse haben ergeben, daß das HASH-Gen im Rattengenom als ´single copy´ Gen vorliegt (Aho, 1997). Um die drei unterschiedlich langen HASH-mRNAs zu erklären, kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht: 1. unterschiedlich lange Poly(A)-Schwänze; 2. das 3´-alternative Spleißen; 3. das intern-alternative Spleißen; 4. die Anwesenheit von drei verschiedenen Promotoren. Um diese Möglichkeiten zu prüfen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

2.2.1. Identifizierung der Länge der Poly(A)-Schwänze der drei HASH-Transkripte

Nach Beobachtungen von Gold und Hecht (1981) kann ein ungewöhlich langer Poly(A)-Schwanz für die Translationsregulation haploid exprimierter Transkripte im Testis wichtig sein. Daher wurde untersucht, ob der Unterschied in der Länge der drei HASH-Transkripte auf unterschiedlich lange Poly(A)-Schwänze zurückzuführen ist. Dazu war es notwendig, die exakten Längen der Poly(A)-Schwänze der drei HASH-cDNAs, insbesondere der HASHgerms, zu bestimmen.

Für diese Zwecke wurde Gesamt-RNA aus Testis mit RNaseH verdaut und anschließend eine Northern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden drei getrennte Ansätze von 10 µg Maustestis Gesamt-RNA mit 2 µg Oligo $(dT)_{12\text{-}18}$ versetzt und für 3 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde den Reaktionsansätzen 0.2 Vol. 5x Ribonukleasepuffer H zugegeben und für 15 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden durch Zugabe von 1 µl RNaseH (BRL, 12 U/µl) bei 37°C verdaut (Reaktionszeit 0-, 30- und 60 min) und danach sofort einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen. Die Überstände wurden mit 0.1 Vol. 3M NaAc (pH 4.8) und 2.5 Vol. Ethanol für 20 min bei –70°C präzipitiert und die verdauten RNA-Moleküle durch Zentrifugation (13000x g, 15 min, 4°C) sedimentiert. Danach wurden die Reaktionsansätze mit 70%igem Ethanol gewaschen, behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde die RNA mit der radioaktiv markierten HASH-cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7) hybridisiert (Abb. 6). Dieses Northern-Blot-Experiment, nach jeweils 30min (Bahn 3) und 60min (Bahn 4) Inkubation mit RNaseH, ergab, daß die Länge der Poly(A)-Schwänze der drei HASH-

Transkripte maximal 100 Bp beträgt. Die Unterschiede der drei HASH-Transkripte ist nicht auf die Länge der Poly(A)-Schwänze zurückzuführen. Im Vergleich mit dem RNA-Marker konnte festgestellt werden, daß die drei HASH Transkripte nach dem RNase H-Verdau eine Länge von 2.6 Kb („HASHsoma“ oder „HASHsoma2.6“), 1.8 Kb („HASHgerm1.8“) und 1.2 Kb („HASHgerm1.2“) haben.

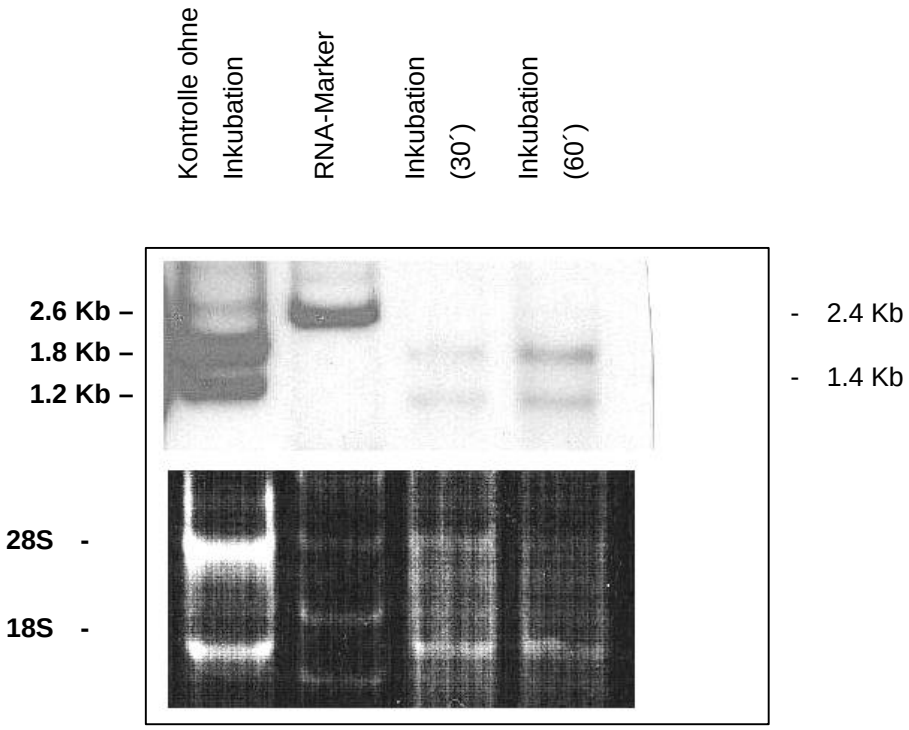


Abb. 6: Northern-Blot-Hybridisierung zur Identifizierung der Größe bzw. der Länge des Poly(A)-Schwanzes der drei HASH-Transkripte der Maus.

10 µg Maustestis Gesamt-RNA wurde mit 2 µg Oligo $(dT)_{12-18}$ versetzt und für 3 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde den Reaktionsansätzen 0.2 Vol. 5x Ribonukleasepuffer H zugegeben und für 15 min auf Eis gestellt. Die Proben wurden durch Zugabe von 1 µl RNaseH (BRL, 12 U/µl) bei 37°C für 0 min (Kontrolle), 30 min (Bahn 3) und 60 min (Bahn 4) verdaut und anschließend nach denaturierender Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der HASH cDNA Sonde H-800 (Abb. 7) hybridisiert. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug ca. 24 h. Zur Kontrolle der RNA-Proben wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt, um die 28S- und 18S-RNAs sichtbar zu machen.

2.2.2. 3´-alternatives Spleißen

In der 3´-flankierenden Region des HASH-Gens der Ratte wurde ein zweites Polyadenylierungssignal (AATAAA) identifiziert, das vom ersten Polyadenylierungssignal (ATGAAA) 705 Bp entfernt ist. Das Vorhandensein von zwei Polyadenylierungssignalen führte zur Annahme, daß die Unterschiede der HASH-mRNAs auf der Benutzung verschiedener Polyadenylierungssignale beruhen könnte. Es wurde diskutiert, ob die zwei Poly(A)-Signale mit dem alternativen Spleißen und der gewebespezifischen Expression des HASH-Gens im Zusammenhang stehen könnten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde zunächst für die Maus das cDNA-Fragment zwischen den Poly(A)-Signalen durch RT-PCR amplifiziert und anschließend für die Northern-Blot-Analyse verwendet (Abb. 8).
Für die Amplifikation des 3´-Fragmentes wurden der Forward-Primer HA42 (s. Anhang), der vor dem ersten Polyadenylierungssignal lokalisiert ist und Poly(dT) als Reverse-Primer eingesetzt. Um die spezifische Sonde zwischen den zwei Poly(A)-Signalen herzustellen, wurde dann die Nested-PCR mit den Primern H3F1 und H3R1 (s. Anhang), die jeweils nach dem ersten bzw. vor dem zweiten Poly(A)-Signal lokalisiert sind, durchgeführt (Abb. 7). Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden die PCR-Amplifikate (E13B) in den pGEM-T Vektor kloniert, sequenziert, dann wieder mit Enzymen herausgeschnitten und anschließend nach einer Elektrophorese aus dem Gel extrahiert. Das aufgereinigte cDNA-Fragment E13B zwischen den zwei Poly(A)-Signalen wurde radioaktiv markiert und für die Northern-Blot-Hybridisierung als Sonde verwendet (Bahn 8 in Abb. 8). Hierbei zeigte sich kein Hybridisierungsignal nach einwöchiger Exposition. Aus diesem Ergebnis konnte gefolgert werden, daß die Sequenz zwischen den zwei Polyadenylierungssignalen nicht transkribiert wird, also altenatives Spleißen in diesem Bereich der HASH-mRNA nicht realisiert ist.

2.2.3. Amplifikation der verschiedenen Exon-spezifischen cDNA-Fragmente mittels PCR bzw. RT-PCR

Um zu überprüfen, ob die drei HASH-Transkripte durch internes alternatives Spleißen entstehen, wurden RT-PCR Experimente mit verschiedenen Exon-spezifischen Primern durchgeführt. Trotz mehrmaligen Versuchen wurde kein alternatives Spleißprodukt gefunden (nicht dokumentiert). Das könnte darauf hinweisen, daß die Gewebespezifität und Phasenspezifität der HASH-Transkripte auf die Nutzung verschiedener Promotoren zurückzuführen ist. Es wurden daher verschiedene Exon-spezifische Fragmente durch PCR amplifiziert (Abb. 7), um die cDNA Struktur der drei HASH-Transkripten weiter zu analysieren.

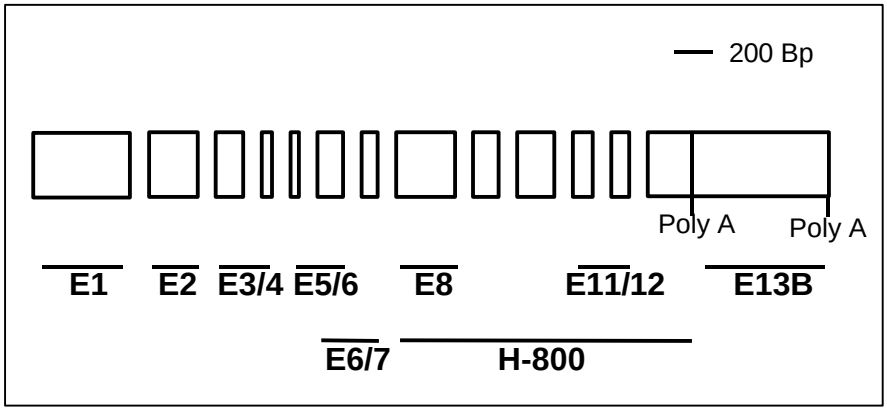


Abb. 7: Schematische Darstellung der durch PCR amplifizierten, Exon-spezifischen Fragmente.

Für die Exon-spezifische Amplifikation wurden folgende Primer (s. Anhang) eingesetzt: HA15 und HO10 für E1, HO7 und HO9 für E2, HO5 und HA71 für E3/4, HO3 und HA7 für E5/6, HA9 und H5R1 für E6/7, H5F1 und H5R2 für E8, HA25 und HA42R für E11/12, H3F1 und H3R1 für E13B.

2.2.4. Northern-Blot-Analysen mit den verschiedenen Exon-spezifischen cDNA-Fragmenten

Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden die PCR-Amplifikate in pGEM-T Vektor kloniert, sequenziert, dann wieder mit Enzymen herausgeschnitten und anschließend nach Elektrophorese aus dem Gel extrahiert. Die aufgereinigten Exon-spezifischen Fragmente wurden radioaktiv markiert und für Northern-Blot-Hybridisierungen als Sonden verwendet. Dabei wurde die cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7), die mit allen drei HASH-Transkripten hybridisiert, als Kontrolle benutzt.

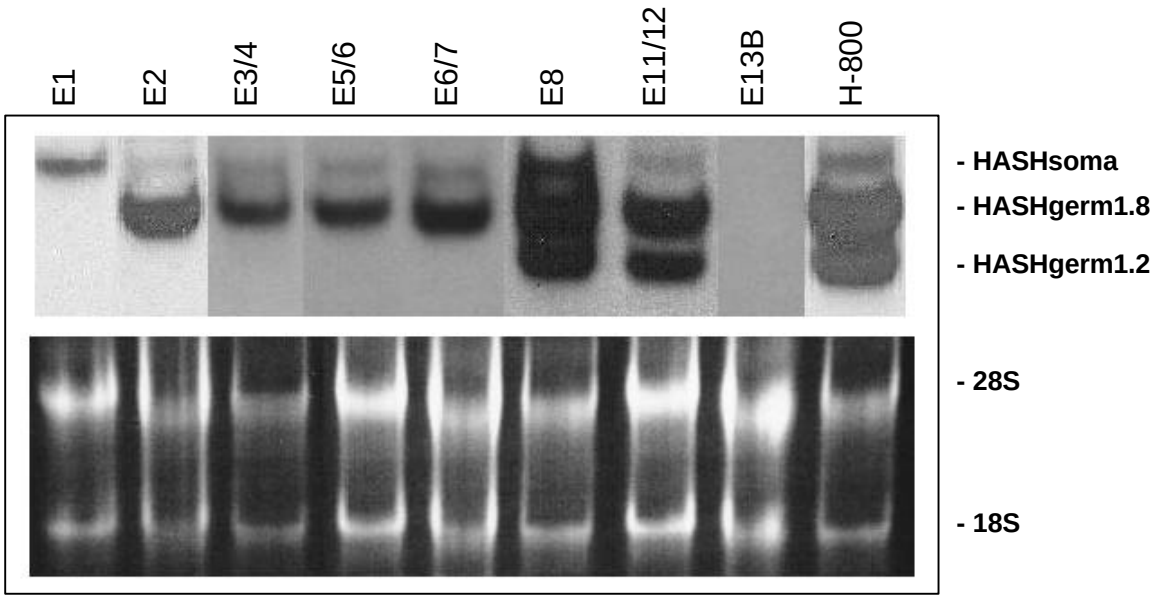


Abb. 8: Northern-Blot-Analyse zur Erklärung des alternativen Spleißen.

Gesamt-RNA (je 20 µg) aus Testes der adulten Maus wurde nach denaturierender Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit verschiedenen HASH-Sonden (Abb. 7) hybridisiert. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug etwa 16 bis 36 h. Zur Kontrolle der RNA-Proben wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt, um die 28S- und 18S-RNAs sichtbar zu machen.

Aus den Ergebnissen der Northern-Blot-Hybridisierungen mit verschiedenen Exon-spezifischen Fragmenten kann gefolgert werden, daß Exon 8 bis Exon 12 in allen drei HASH-mRNAs vorhanden ist, während Exon 2 bis Exon 7 in HASHsoma und HASHgerm1.8, aber nicht in HASHgerm1.2 vorhanden ist. Weiterhin konnte Exon 1 nur in HASHsoma gefunden werden. Aufgrund der Analysen kann angenommen werden, daß die drei HASH-Transkripte nur im 5´-Ende unterschiedlich sind.

Aus den Ergebnissen der Experimente in III.2.2.2.-2.2.4. konnten folgende Informationen erhalten werden:

1. Die drei HASH-mRNAs haben ein gemeinsames Poly(A)-Signal.
2. Es gibt kein internes Spleißen in der HASH-mRNA.
3. Die drei HASH-Transkripte können durch drei verschiedene Promotoren zustandekommen.
4. Für HASHsoma fehlt cDNA Information von ca. 400 Bp in 5´-Richtung.

2.3. Versuche zur Identifizierung des 5´-Endes der drei HASH-mRNAs mit Hilfe der Marathon-RACE-PCR

Für die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes der drei HASH-Transkripte wurde eine Primer-Extension durchgeführt. Dabei konnte kein gemeinsamer Transkriptionsstartpunkt für die drei HASH-mRNAs identifiziert werden (Daten nicht dokumentiert). Um weitere Informationen über den 5´-Bereich der drei HASH-cDNAs zu erhalten, wurde eine Marathon-RACE-PCR mit Testis-RNA durchgeführt. Für die Konstruktion der Maustestis cDNA-Bank unter Verwendung des Marathon RACE Kits (Clontech) wurde 1 µg Poly(A)-angereicherte RNA aus adultem Testis der Maus eingesetzt und mit dem Poly(dT)-Primer revers transkribiert. Nach Ligation der partiell einzelsträngigen Linker (Adapter) an die Enden der cDNAs wurden 2 µl Aliquots dieser Bank mit je einem genspezifischen und dem im Kit enthaltenen Adapter-Primer gescreent. Nach der Erst-Runden PCR wurde für die Amplifikation des 5´-Endes aus dem ersten Ansatz 1 µl als Template für eine Nested-PCR mit den genspezifischen, internen Primern eingesetzt.

2.3.1. Versuch zur Isolierung des 5´-Endes der HASHsoma

Für die Identifizierung des 5´-Endes der HASHsoma wurden der Adapter-Primer 1 (AP1) als Forward-Primer und e1_2fl (s. Anhang) als genspezifischer Reverse-Primer (Abb. 9) eingesetzt. Nach der Erst-Runden PCR wurde von den Reaktionsprodukten ein Aliquot von 5 µl gelelektrophoretisch über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt. In einer Zweit-Runden PCR wurde für die Amplifikation des 5´-Endes aus dem ersten Ansatz 1 µl als Template für eine Nested-PCR mit den Primern e1_1fl (Abb. 9; s. Anhang) und AP2 eingesetzt. Nach der Zweit-Runden PCR wurde von den Reaktionsprodukten ein Aliquot von 5 µl gelelektrophoretisch über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt (Abb. 10A). Nach dem Transfer der PCR-Produkte auf eine Nitrocellulosemembran wurde die DNA mit der radioaktiv makierten HASH-cDNA-Sonde E1 (Abb. 7) hybridisiert (Abb. 10B).

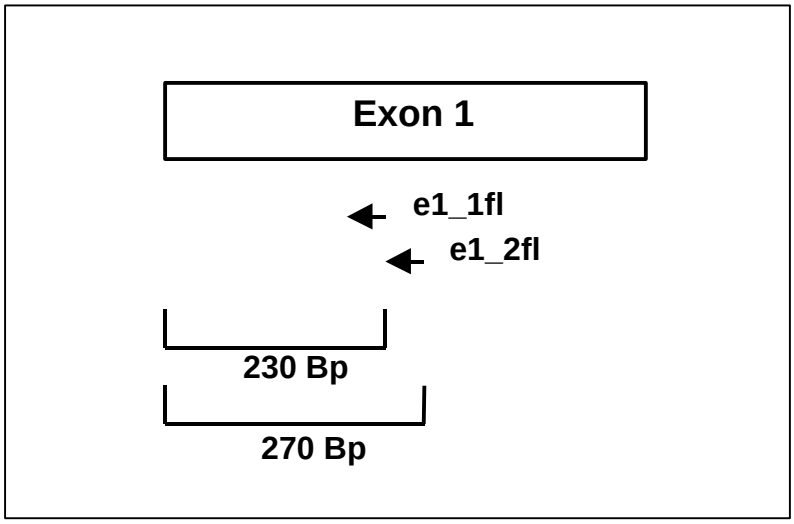


Abb. 9: Schematische Darstellung der zur Amplifikation des 5´-Endes der HASHsoma verwendeten Primer.

Die für die RACE-PCR des 5´-Endes der HASHsoma eingesetzten Primer e1_1fl und e1_2fl (s. Anhang), befinden sich 230 Bp bzw. 270 Bp downstream vom bekannten 5´-Ende des Exons 1 (502 Bp).

Wie Abbildung 10B zeigt, ergaben die Erst-Runden PCR und die Nested-PCR einen Pool (ca. 0.2 – 0.8 Kb) der spezifischen Amplifikation. Um die längste cDNA-Information von HASHsoma zu erhalten, wurden die Amplifikate aus dem oberen Bereich (>600 Bp, mit Box markiert in Bahn 1 der Abbildung 10A) aus einem 1.0%igen Agarosegel extrahiert und in den pGEM-T Vektor ligiert. Nach der Transformation wurden die Kolonien gescreent, um das längste Fragment zu erhalten.

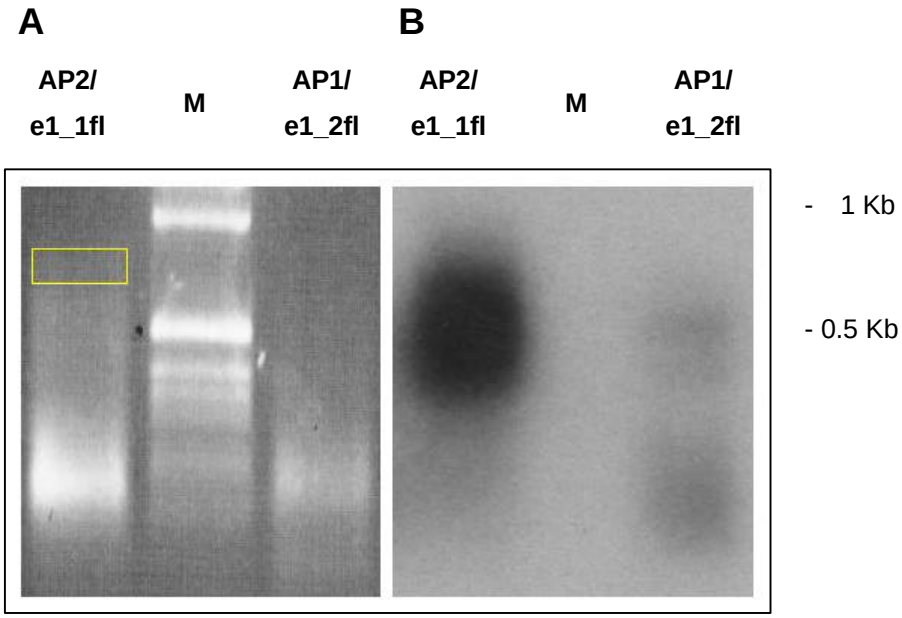


Abb. 10: Amplifikation des 5´-Endes der HASHsoma mit Hilfe der Marathon-PCR.

A. Elektrophoretische Auftrennung im 1.0%igen Agarosegel nach der Erst (Bahn 3)- und Zweit (Bahn 1)-Runden Marathon-RACE-PCR. Um die längste cDNA-Information von HASHsoma zu erhalten, wurden die Amplifikate aus dem oberen Bereich (>600 Bp, markiert mit Box in Bahn 1) aus einem 1.0%igen Agarosegel extrahiert.

B. Southern-Blot-Hybridisierung von Blot (A). Nach dem Transfer der PCR-Produkte auf eine Nitrocellulosemembran wurde die Amplifikations-DNA mit der radioaktiv makierten HASH-cDNA-Sonde E1 (Abb. 7) hybridisiert. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug etwa 30min.

In Abbildung 11A ist die neue cDNA Information von 5´-Upstream des Exons 1 schematisch dargestellt. Um zu überprüfen, ob die neu erhaltene cDNA-Information tatsächlich in den HASH-Transkripten vorhanden ist, wurde eine Northern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Wie Abbildung 11 zeigt, hybridisierte die durch die 5´-Marathon-RACE-PCR erhaltene, neue cDNA E1A nur mit HASHsoma. Durch Sequenzierung des genomischen Klons wurde festgestellt, daß diese neue cDNA Information zum Exon 1 gehört.

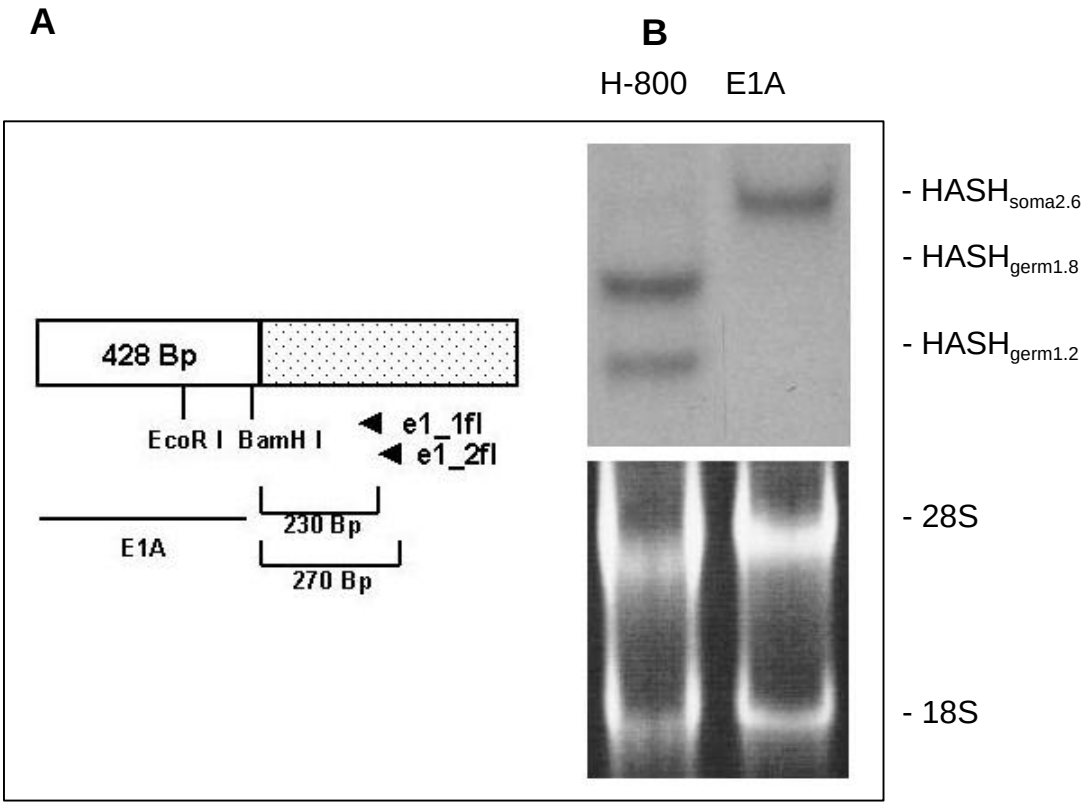


Abb. 11: Neue cDNA Information von 5´-Upstream des Exons 1 und Northern-Blot-Analyse

A. Schematische Darstellung der durch 5´-Marathon-RACE-PCR erhaltene, neue cDNA E1A.

B. Gesamt-RNA (je 10 µg) aus Testes der adulten Maus wurde nach denaturierender Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der HASH-cDNA-Sonde E1A (Abb.11A) hybridisiert. Hier wurde die cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7), die mit allen drei HASH-Transkripten hybridisiert, als Kontrolle benutzt. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug jeweils 16 bis 36 h. Zur Kontrolle der RNA-Proben wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt, um die 28S- und 18S-RNAs sichtbar zu machen.

2.3.2. Versuch zur Isolierung des 5´-Endes der HASHgerm1.8

Zur Identifizierung des 5´-Endes der HASHgerm1.8 wurde eine Marathon-RACE-PCR mit dem Adapter-Primer 1 (AP1) als Forward-Primer und HO6 als genspezifischem Reverse-Primer (Abb. 12) eingesetzt. Nach der Erst-Runden PCR wurde von den Reaktionsprodukten ein Aliquot von 5 µl gelelektrophoretisch über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt. In einer Zweit-Runden PCR wurde für die Amplifikation des 5´-Endes aus dem ersten Ansatz 1 µl als Template für eine Nested-PCR mit den Primern HO9 (Abb. 12) und AP2 eingesetzt. Nach der Zweit-Runden PCR wurde auch von den Reaktionsprodukten ein Aliquot von 5 µl gelelektrophoretisch über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der PCR-Produkte auf eine Nitrocellulosemembran wurde die DNA mit der radioaktiv makierten HASH-cDNA-Sonde E2 (Abb. 7) hybridisiert. Obwohl das Hybridisierungssignal kleiner als die erwartete Länge war, wurden die Amplifikate aus dem oberen Bereich (>200 Bp) aus einem 1.5%igen Agarosegel extrahiert und in pGEM-T Vektor ligiert. Nach Transformation, Minipräparation und Sequenzierungsanalyse der Plasmid-DNA wurde festgestellt, daß alle Amplifikate innerhalb von Exon 2 abgebrochen waren. Aus den Ergebnissen dieses Experimentes konnte daher nicht ausgeschlossen werden, daß sich das 5´-Ende der HASHgerm1.8 doch innerhalb von Exon 2 befindet. Der Abbruch der PCR-Amplifikate innerhalb von Exon 2 könnte aus dem hohem GC-Gehalt (87%) in Exon 2 resultieren.

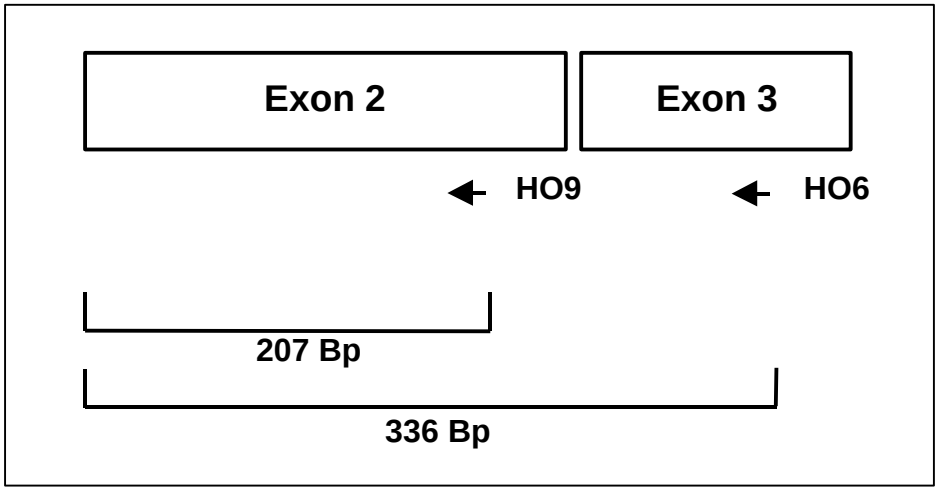


Abb. 12: Schematische Darstellung der zur Amplifikation des 5´-Endes der HASHgerm1.8 verwendeten Primern.

Die für die RACE-PCR des 5´-Endes der HASHgerm1.8 eingesetzten Primer, HO9 und HO6, befinden sich jeweils 207 Bp und 336 Bp downstream vom 5´-Ende des Exons 2.

2.3.3. Versuch zur Isolierung des 5´-Endes der HASHgerm1.2

Zur Identifizierung des 5´-Endes der HASHgerm1.8 wurde eine Marathon-RACE-PCR mit dem Adapter-Primer 1 (AP1) als Forward-Primer und H5R2 als genspezifischem Reverse-Primer (Abb. 13) eingesetzt. Nach der Erst-Runden PCR wurde von den Reaktionsprodukten ein Aliquot von 5 µl gelelektrophoretisch über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt. In einer Zweit-Runden PCR wurde für die Amplifikation des 5´-Endes aus dem ersten Ansatz 1 µl als Template für eine Nested-PCR mit den Primern HO4 (Abb. 13) und AP2 eingesetzt. Nach der Zweit-Runden PCR wurde auch von den Reaktionsprodukten ein Aliquot von 5 µl gelelektrophoretisch über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der PCR-Produkte auf eine Nitrocellulosemembran wurde die DNA mit der radioaktiv makierten HASH-cDNA-Sonde E8 (Abb. 7) hybridisiert.

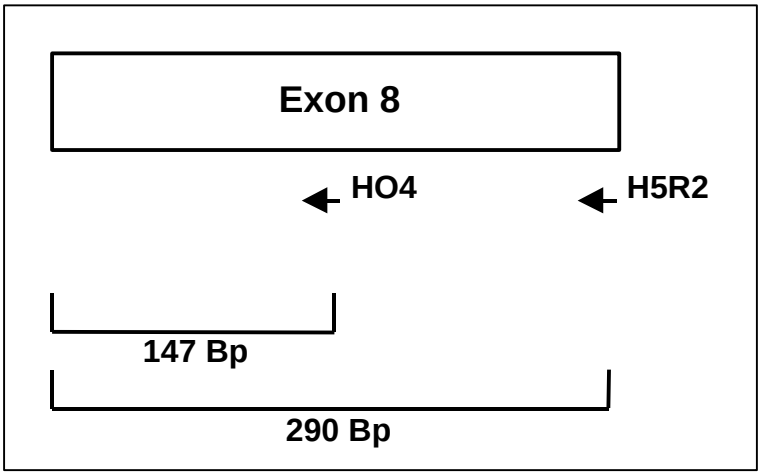


Abb. 13: Schematische Darstellung der zur Amplifikation des 5´-Endes der HASHgerm1.2 verwendeten Primern.

Die für die RACE-PCR des 5´-Endes der HASHgerm1.2 eingesetzten Primer, HO4 und H5R2, befinden sich jeweils 147 Bp und 290 Bp downstream vom 5´-Ende des Exons 8.

Um die längste cDNA-Information von HASHgerm1.2 zu erhalten, wurden die Amplifikate aus dem oberen Bereich (>150 Bp) aus einem 1.5%igen Agarosegel extrahiert und in den pGEM-T Vektor ligiert. Nach der Transformation wurden Kolonien gescreent, um den Klon mit dem längsten Fragment zu isolieren. In Abbildung 14A ist die neue cDNA Information des Exons 8A schematisch dargestellt.

Um zu üerprüfen, ob die neu erhaltene cDNA-Information tatsächlich in den HASH-Transkripten vorhanden ist, wurde eine Northern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Wie Abbildung 14B zeigt, hybridisiert die durch 5´-Marathon-RACE-PCR erhaltene neue 51 Bp cDNA nur mit HASHgerm1.2. Durch Sequenzierung und Sourthern-Blot-Anaylse des genomischen Klons wurde festgestellt, daß diese neue 51 Bp cDNA Information ein neues Exon zwischen Exon 7 und Exon 8 ist und nur zur HASHgerm1.2 gehört.

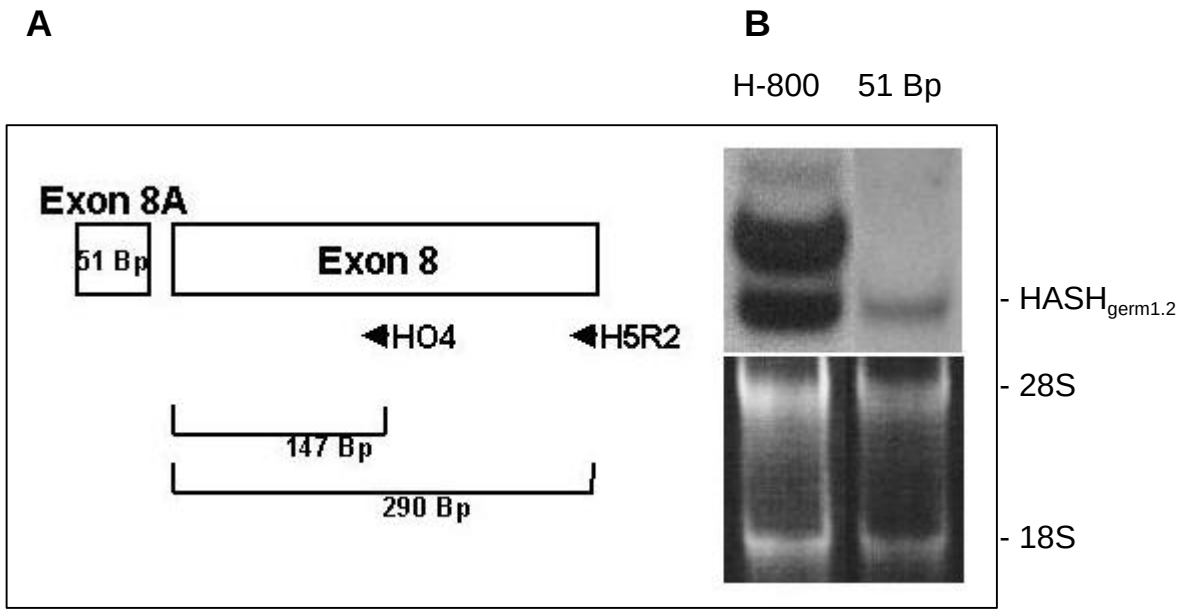


Abb. 14: Neue cDNA Information von 5´-Upstream des Exons 8 und Northern-Blot-Analyse.

A. Schematische Darstellung der durch 5´-Marathon-RACE-PCR erhaltenen neuen cDNA E8A.

B. Gesamt-RNA (je 10 µg) aus Testes der adulten Maus wurde nach denaturierender Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der HASH-cDNA-Sonde E8A (51 Bp) hybridisiert. Die Expositionszeit des Autoradiogramms betrug jeweils 24 bis 48 h. Zur Kontrolle der RNA-Proben wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt, um die 28S- und 18S-RNAs sichtbar zu machen.

2.4. cDNA Struktur der drei HASH-Transkripte

Aus den in den Abschnitten III.2.2. und 2.3. dargestellten Ergebnissen wurde die cDNA Struktur der drei HASH-Transkripte bestimmt und ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt. Das Exon 1 mit einer Länge von 948 Bp wird nur in HASHsoma und das Exon 8A mit einer Länge von 51 Bp nur in HASHgerm1.2 exprimiert. Der Unterschied zwischen den drei HASH-Transkripten beruht im wesentlichen auf dem 5´-Ende, was darauf hinweisen kann, daß jedes HASH-Transkript unter der Expressionsregulation eines eigenen Promoters steht.

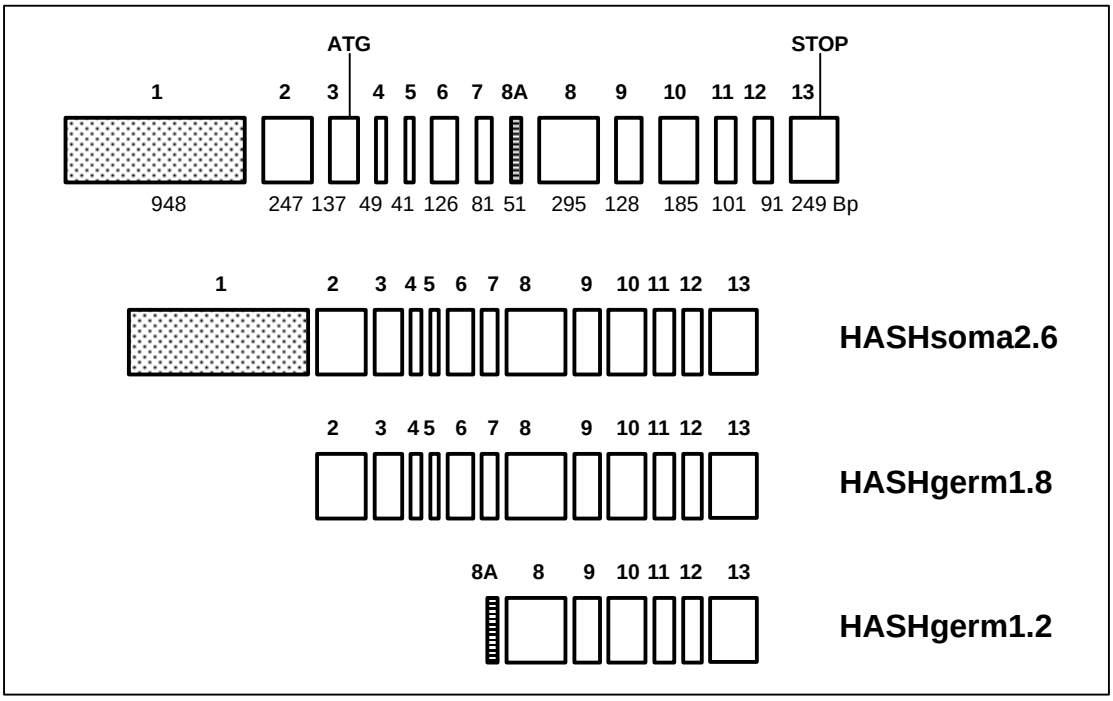


Abb. 15: Schematische Darstellung der cDNA Struktur der drei HASH-Transkripte.

2.5. Nukleotid- und Aminosäuresequenz der HASH-cDNA der Maus

Unter Einsatz der automatischen Sequenzierung der HASH-cDNA-Klone wurde die gesamte Nukleotidsequenz der drei HASH-Transkripte bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogrammes „GCG-Paket“ (Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) wurde aus den Sequenzen der cDNA-Klone die gesamte HASH-cDNA-Sequenz erstellt, der offene Leserahmen in der Sequenz ermittelt und die daraus ableitbare Aminosäuresequenz bestimmt (Abb. 16). Die cDNA-Sequenz des 2.6 Kb HASH-Transkripts hat eine Länge von 2678 Bp. Die kodierende Region beginnt an Position 1318 mit dem Initiationsstartkodon ATG (mit Box in Abb. 16 gekennzeichnet), welches sich innerhalb der Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation bei Eukaryoten (Kozak, 1989) befindet. Sie beinhaltet möglicherweise einen offene Leserahmen von 1290 Bp für HASHsoma und HASHgerm1.8 und ein anderen offenen Leserahmen von 789 Bp für HASHgerm1.2. Aber es ist noch unklar, ob die HASHsoma und HASHgerm1.8 dasselbe ATG als Translationsstartpunkt benutzen. Ein anderes ATG-Kodon ist an der Nukleotidposition 1144 (fett in Abb. 16) und ermöglicht einen offenen Leserahmen von 1464 Bp. Der 3´-nichttranslatierte Bereich erstreckt sich über 68 Bp. Der 3´-nichttranslatierte Bereich enthält ein Polyadenylierungssignal AATGAAA, das 18 Bp weit vom Poly(A)-Schwanz entfernt ist.

Der Vergleich der HASH-cDNA- und der daraus abgeleiteten Aminosäure-Sequenz mit den Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz in den Datenbanken EMBL und GenBank ergab keine signifikante Homologien zu bekannten Sequenzen.

```
      exon1
  1 - CCGAGTCAGGCGGAGCCCGAAGCCAATGCCTATTCGGAGAGGCCCAGGTTCCTGGCACTG - 60

 61 - GGCACAGGGCATTAGTTTAGGGAAGGCAAGCAGTTGGGGTATAGTCTTGTACTTGGAGGT - 120

121 - GGGGCAAGATGGGGTGCGGAGCTGGAGACACACCAGGCATATGGGGTACTCCACGACTGG - 180

181 - GGCTGGGCCGGGTGTGCCAAGCCACAGGCGCTGCAGAAGCTGGATCTGCAGGTCTCGTGC - 240

241 - AATTCTGCGGCGCCCCACATGGTCCACCAGGACTTGGGTGAGGGCCCCTGGGTCCTTGAA - 300

301 - TTCTGCAGGGTTCACCTTACTTGGCACACATCCCCTTACCGGCCTAGAGGACCTGGTGCT - 360

361 - TCTGGACTGAGGGCACTCCCGTGCTTGCTTCTTACTCTGGATCCCTTGAGGTGGTGAGCT - 420

421 - GGGGCCAGGCGGAAGTGGTCTTGGAGCTTTGAAAGTTCTGGAGGCGGGAAGGGGACTGAC - 480

481 - AGGAATGAGAAGAGGAATTTTGTAGCTGGGAAAGAAAGGAGCAGGTAAGAGGGGGAGAGA - 540

541 - CACAGAGCTGATAGTTGGAGGGAGAGGTGGAGTGTGGAGAGGGGAGTTTTTCACCAAAAT - 600

601 - AAGTACAGTTTTGGCGAAAGCAAGAGGGGGATCTTGGTAGAGAGGAAGAGGAAGGAAGAG - 660

661 - GAACAAAGTCAGAAGAGTCCAAAGAGTAGAAGTAAGGTCTAGGAAAGTGGGTCTGCATGG - 720

721 - TGGCGGGCAAAGGAAAGTGGGTCTGTGTGGTGGCGGGCAAAGGAAAGTGGGTCTGCGTGG - 780

781 - TGGCGGGCAAAGGAAAGTGGGAAGAAGGGAGGTCTGATGGGGAGAAGGAGATGCTAAGTT - 840

841 - GTGTGGAGGGGAGTCCACAAACCGTAGAGAGGACCTGAGGGAAACACGCTGGCGGTACTG - 900
                                                    exon2
901 – CATTCTGTAGCAGAACCTGGTTCTTGTTTTGAGGCAACATTGCCTTGACAGCGAGTCCGC - 960

961 - GCCCCGCGCTCAGCTGCTGTTCGGGCGGGACCCAGGCTGGACCGCGGGCCCCGGCCTGGG - 1020

1021 - GGCCACAGCTGCCACCTCCGCCGGCCACCTCATCTCCTCCCTGTCCCTCGTCCCGGCCCG - 1080

1081 - CGTCTTCCCGCCGTAGTCGGGCCGGAGGGCCGGGGTCCCTCCCCGCCGCCCTACCCTGCG - 1140
                                                        exon3
1141 – CGGATGCCGAAGGTGAAGGCGCTGCAATGCGCCCTGGCGCTGGAGATCCGCTCTGTAACT - 1200
     -    M  P  K  V  K  A  L  Q  C  A  L  A  L  E  I  R  S  V  T

1201 - TGTCCAGGAGTGGTGCTGAAAGACAAGGAGGACATCTATCTTAGTATCTGTGTGTTTGGC - 1260
     - C  P  G  V  V  L  K  D  K  E  D  I  Y  L  S  I  C  V  F  G

1261 - CAATACAAAAAGACACAATGTGTCCCAGCCACTTTTCCCCTGGTCTTCAATGCCAGAATG - 1320
     - Q  Y  K  K  T  Q  C  V  P  A  T  F  P  L  V  F  N  A  R  M
               exon4
1321 – GTGTTTGAAAAGGTGTTCCCGGAAGCAGTAGACCCTGGAGATGTGGTCGCACAGCTTGAG - 1380
     - V  F  E  K  V  F  P  E  A  V  D  P  G  D  V  V  A  Q  L  E
       exon5                                 exon6
1381 – TATGATACAGCAGTGTTTGAGTTGATACAGCTAGTTCCACCAGTGGGAGAAACACTGTCT - 1440
     - Y  D  T  A  V  F  E  L  I  Q  L  V  P  P  V  G  E  T  L  S

1441 - ACCTATGATGAAAATACACGAGATTTCATGTTCCCGGGTCCAAACCAAATGTCTGGACAC - 1500
     - T  Y  D  E  N  T  R  D  F  M  F  P  G  P  N  Q  M  S  G  H
```

```
                                                  exon7
1501 – CATGATTCAAACCGCCAGGTTACCATGAGGAGGATTTCTGGCCTAAGAGGAATTGCTCCA - 1560
     - H  D  S  N  R  Q  V  T  M  R  R  I  S  G  L  R  G  I  A  P

1561 - AAGCTGGAATTTTCTACAACTTCAGTGATCACTGAATGTCTGATAAGCTCAAGGAAGTGC - 1620
     - K  L  E  F  S  T  T  S  V  I  T  E  C  L  I  S  S  R  K  C

1621 – CGCACTCAG
     - R  T  Q
       exon8a
       GACCAACGTGGGAGAAGGTCCTGGAGCACACCAAGAAGAAAATGACCTGAT

                exon8
     -          GATAAATTTACTTACCATTCAGCTCCAGTTGAAAAATCCCACGGCAGACTG - 1680
     -          D  K  F  T  Y  H  S  A  P  V  E  K  S  H  G  R  L

1681 - CAATGCAGAACATCAAGATCACAGAAGAAAAAGTCCAAGTCACCCGAGAGGAGTAAATAT - 1740
     - Q  C  R  T  S  R  S  Q  K  K  K  S  K  S  P  E  R  S  K  Y

1741 - TGCATAAACACCAAGAACTACGAACAGCCTACGATTTCCTCAAAGTCACACTCTCCATCT - 1800
     - C  I  N  T  K  N  Y  E  Q  P  T  I  S  S  K  S  H  S  P  S

1801 - CCCTACACAAAAAGACGG[ATG]TGTGAGCTTTCCGAAGACACTCGGCGGCGGCTGGCCCAT - 1860
     - P  Y  T  K  R  R  M  C  E  L  S  E  D  T  R  R  R  L  A  H

1861 - TTAAATCTGGGACCCTATGAATTCAAAAAGGAAACAGATAAGCCTCCATTTGTGATTAGA - 1920
     - L  N  L  G  P  Y  E  F  K  K  E  T  D  K  P  P  F  V
       exon9
1921 – CATGTTGATCCCCCGAGTCCCAGAACTGACAATTTTTTTGGATCACCTGGCAGAGACTGT - 1980
     - H  V  D  P  P  S  P  R  T  D  N  F  F  G  S  P  G  R  D  C

1981 - GAACGAGATGGATGGGTCAGGATGCACAGCGATCATCCTCATATTGGCTGCTGCAGATCC - 2040
     - E  R  D  G  W  V  R  M  H  S  D  H  P  H  I  G  C  C  R  S
                exon10
2041 – AAGGACTACAAGGTTATCAGGTCACCACATGGGAGAGACTTTGAGGATCCCTTTGAAAGG - 2100
     - K  D  Y  K  V  I  R  S  P  H  G  R  D  F  E  D  P  F  E

2101 - TGTGAGGAATATTTGAGCCCAAGGACATGTAGCAAGCCCCAGCATTCTGCAAGGACCTTA - 2160
     - C  E  E  Y  L  S  P  R  T  C  S  K  P  Q  H  S  A  R  T  L

2161 - CTAGTCCATTCAGCACCTTCAACAACACCAAAGCATTGTGCAAGCCCTGTGCTAAATAGA - 2220
     - L  V  H  S  A  P  S  T  T  P  K  H  C  A  S  P  V  L  N
                   exon11
2221 – GCCTCTCTCAGGGAAAGATTCCACTCTGATTGGTGTTCACCTCCAAACTGTGATGAGATC - 2280
     - A  S  L  R  E  R  F  H  S  D  W  C  S  P  P  N  C  D  E
                                                        exon12
2281 – CATGACCGGGTAAAAGATGTCTTGAAATCACATCAAGCTCATGCAAGACATTTATGTGAT - 2340
     - H  D  R  V  K  D  V  L  K  S  H  Q  A  H  A  R  H  L  C  D

2341 - GAGAGAGACCCAGAGAGAGAAGACGAACTGGAACTGAAAAGAAGTCTTTTATATAGAGAC - 2400
     - E  R  D  P  E  R  E  D  E  L  E  L  K  R  S  L  L  Y  R  D
                                  exon13
2401 – TCCGCCTATGACAGTGACCCTGAATATAGCTCCTTTCAGCGGCCGCGTGGCTCTTTCCAT - 2460
     - S  A  Y  D  S  D  P  E  Y  S  S  F  Q  R  P  R  G  S  F  H

2461 - TTGGATGATGGTGAATGCTGGTCCAACAGAGCAGCCTCTTGTAAAGGGAAATCCCACCGA - 2520
     - L  D  D  G  E  C  W  S  N  R  A  A  S  C  K  G  K  S  H
```

```
2521 - CCCGTCTTTGAGAACAGCATGGACAAGATGTACAGGAACTTATACAAAAAAGCCTGTAGT - 2580
     - P  V  F  E  N  S  M  D  K  M  Y  R  N  L  Y  K  K  A  C  S

2581 - TCTGTTTCTCATACACAGGAAAGCTTCTGAGACCATCTACCATAAACTGTATAAGCGTCC - 2640
     - S  V  S  H  T  Q  E  S  F  *

2641 - ATGTCAACCTCTCAATGAAAGCGTTTGATGTGATCTGT                      - 2678
```

Abb. 16: Nukleotidsequenz der HASH-cDNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das HASH-Protein der Maus.

*Sie besteht aus 2678 Bp und der offene Leserahmen beginnt mit dem der Kozak´s Konsensus-Sequenz entsprechenden Startkodon ATG (mit Box gekennzeichnet) an Nukleotidposition 1318 für HASHsoma und HASHgerm1.8 bzw. an Nukleotidposition 1819 für HASHgerm1.2 und endet mit dem Stopkodon TGA (mit * und Box gekennzeichnet) an Nukleotidposition 2607. Ein anderes ATG-Kodon ist an der Nukleotidposition 1144 (fett) und ermöglicht einen offenen Leserahmen von 1464 Bp. Die Aminosäuresequenz ist im Einbuchstaben-Kode dargestellt. Das Polyadenylierungssignal AATGAAA an Nukleotidposition 2653 ist doppel unterstrichen.*

2.6. Identifizierung des Translationsproduktes der HASH-mRNAs

In der Nukleotid-Sequenz der HASH-cDNA befinden sich drei ATG-Kodons im selben Leserahmen an den Positionen 1144, 1318 und 1819 (Abb.16). Nur das zweite der drei ATG-Kodons entspricht der Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation bei Eukaryonten (Kozak, 1984). Aus diesen Befunden entstand in Bezug auf die drei HASH-Transkripte die folgende Frage: Für wieviele Proteine kodiert das HASH-Gen? Welche ATGs werden als Initiationskodons genutzt? Um diese Fragen zu bearbeiten, wurde ein polyklonaler Antikörper mit einem aus der cDNA abgeleiteten HASH-Peptid (unterstrichen in Abb. 16) hergestellt (s. II.25).

Durch Western-Blot-Analyse wurde das Serum nach der dritten ´Boost´-Immunisierung überprüft. Frisches Gewebe wurde in ein 15 ml Falcon-Gefäß mit 1 Vol. SEM-Puffer gegeben. Das Gewebe wurde mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax T25, Schütt, Göttingen) homogenisiert, und die groben Gewebetrümmer wurden abzentrifugiert (4000x g, 10 min,

4°C). Der Proteinüberstand wurde nach Zugabe von 1 Vol. 2x SDS-Auftragspuffer zur Denaturierung 10 min im Wasserbad gekocht und danach auf Eis abgekühlt. 10 µl des Überstandes in SDS-Auftragspuffer wurden im 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach eletrophoretischer Auftrennung wurde das gesamte Protein auf eine PVDF-Membran transferriert und mit dem gegen Leber-Proteinextrakt absorbierten Antiserum umgesetzt (Abb. 17).

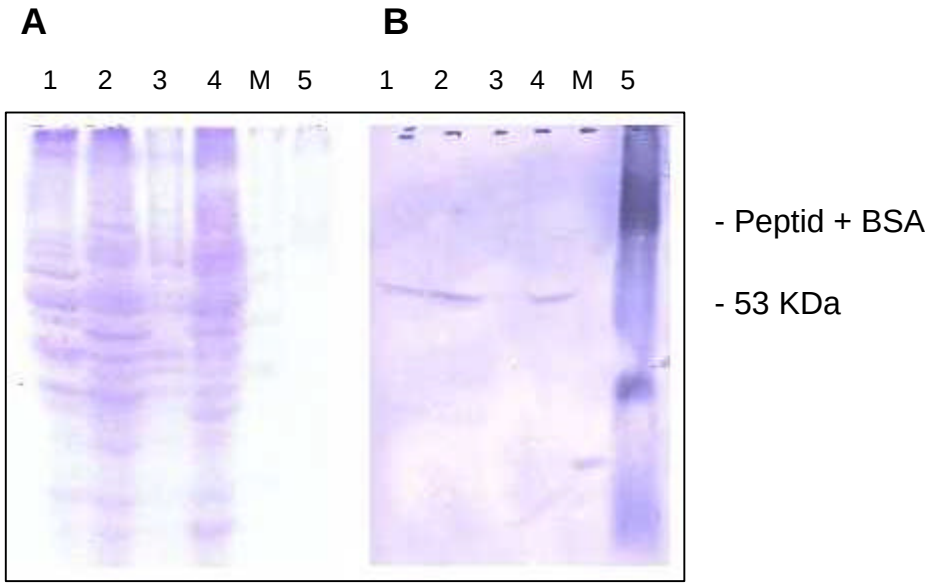


Abb. 17: Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen HASH-Antiserum.

A. Proteinextrakte aus Tymus (1), Gehirn (2), Ovar (3) und Testis (4) wurden im 10%igen SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. In Bahn 5 ist das mit dem BSA gekoppelte Peptid geladen. M = 10 kDa Protein-Marker (Gibco/BRL).

B. Das Gel (A) wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und mit dem gegen Leber-Proteinextrakt adsorbierten Antiserum umgesetzt. In Thymus (1), Gehirn (2) Ovar (3) und Testis (4) wurde eine Bande von etwa 53 KDa detektiert.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, kann in Thymus, Gehirn und Ovar, in denen nur HASHsoma exprimiert ist (s. III.2.1.1), eine Bande von etwa 53 KDa detektiert werden. Überraschenderweise wurde auch in Testisextrakt nur eine 53 KDa große Bande detektiert, obwohl drei HASH-Transkripte in Testis nachweisbar sind (s. III 2.1). Aus diesen Ergebnissen könnte gefolgert werden, daß die Transkripte für HASHgerm1.2 nicht translatiert werden. Es ist noch unklar, ob das andere keimzellspezifisch exprimierte Transkript HASHgerm1.8 zum Protein translatiert wird. Die Berechnung des Molekulargewichtes eines HASH-Proteins unter Berücksichtigung des ersten bzw. des zweiten ATG-Kodons beträgt 56.2 KDa bzw. 49.7 KDa. Unter Berücksichtigung einer postranslationalen Modifikation, z.B. durch Phosphorylierung, kann angenommen werden, daß das 53 KDa große HASH-Protein durch das zweite ATG-Kodon, das der Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation bei Eukaryonten entspricht, entsteht.

3. Isolierung und Charakterisierung der genomischen HASH-Klone der Maus

3.1. Screenen der Phagen-Bibliothek mit dem cDNA-Fragment für Exon 3 und 4

In der Dissertation von Aho (1997) wurden 8 genomische HASH-Klone der Ratte isoliert, die insgesamt 12 Exons des HASH-Gens enthalten. Das HASH-Gen der Ratte hat eine Größe von über 100 Kb, und es liegt im Rattengenom als ´single copy´-Gen vor. Für die Isolierung der genomischen Klone für das HASH-Gen der Maus wurde eine Lamda FIX II genomische Bibliothek (Clontech) gescreent. Als Sonde für das Screenen der genomischen Bank diente das durch RT-PCR (723P2F/HA71) generierte partielle cDNA-Fragment E3/4 (Abb. 7), welches das putative Initiationskodon für die Translation des HASH-Proteins enthält. Dieses Screenen mit dem cDNA-Fragment E3/4 wurde in erster Linie durchgeführt, um einen genomischen Klon des HASH-Gens für ´Knock out´-Experimente zu erhalten.

Nach zweimaligem Rescreenen wurde ein Phagenklon isoliert und aufgereinigt. Der Klon wurde mit hgmATG bezeichnet. Das genomische DNA-Insert von hgmATG wurde mit den Enzymen Apa I, Not I, Sst I, Xba I, Xho I, Apa I/ Not I, Apa I/ Sst I, Xho I/ Not I und Xho I/ Sal I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit der HASH-cDNA-Sonde ATG-E hybridisiert (Abb. 18A, B). Daraus konnte festgestellt werden, daß die Größe des einklonierten genomischen Fragmentes etwa 12.5 Kb betrug. Das 12.5 Kb große genomische Fragment des Phagen-Klons wurde mit dem Restriktionsenzym Not I geschnitten, in den pZErO-Vektor (Invitrogen) umkloniert (pZErO-hgmATG) und für die weitere Analyse eingesetzt.

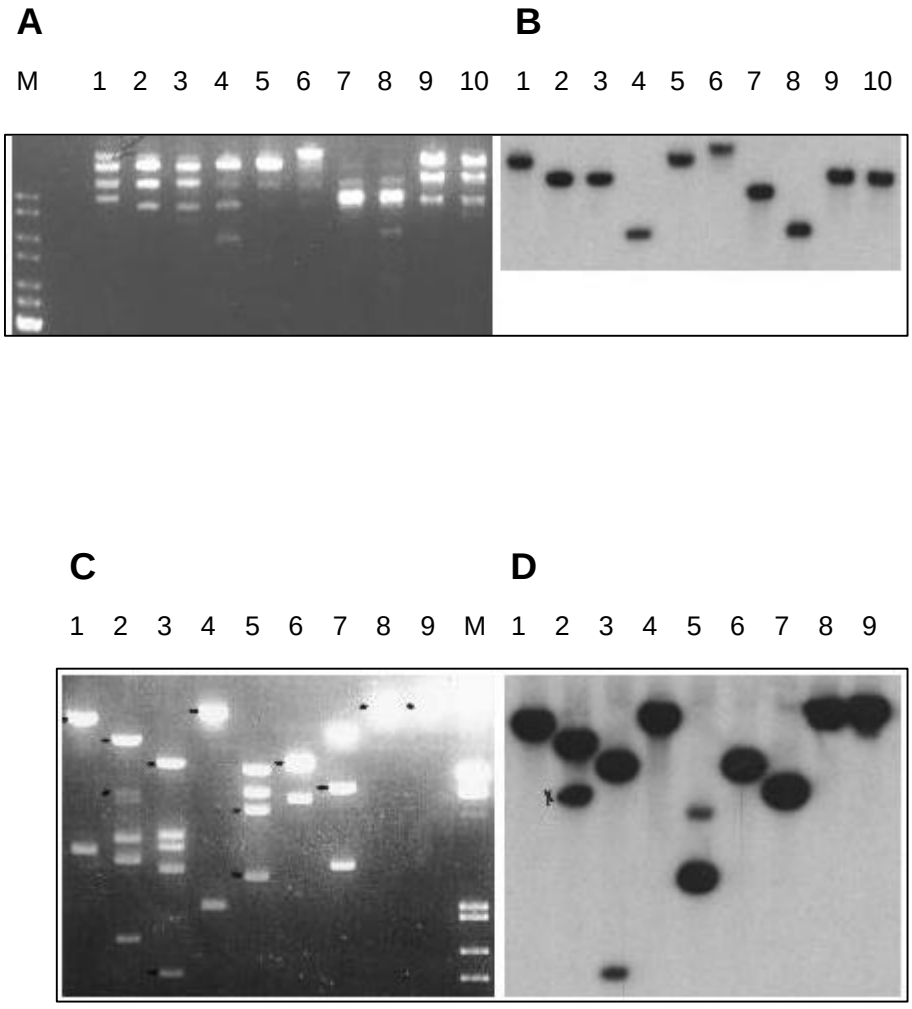


Abb. 18: Hybridisierungen der Restriktionsfragmente des genomischen Phagenklon hgmATG (A, B) und des Plasmidklons pZErO-hgmATG (C, D).

A. Restriktionsenzymatische Spaltung des Phagenklons hgmATG mit den Enzymen Apa I (1), Not I (2), Sst I (3), Xba I (4), Xho I (5), Apa I/ Not I (6), Apa I/ Sst I (7), Xho I/ Not I (8) und Xho I/ Sal I (9).

C. Restriktionsenzymatische Spaltung des Plasmidklons pZErO-hgmATG mit den Enzymen Apa I (1), BamH I (2), Hind III (3), Kpn I (4), Pst I (5), Sst I (6), Spe I (7), Xba I (8) und Xho I (9).

B und D. Hybridisierung mit der partiellen HASH-cDNA-Sonde E3/4 (Abb. 7). Nach der Gelelektrophorese (je A, C) wurde die DNA auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit der HASH-cDNA-Sonde E3/4 hybridisiert. Die Expositionszeit betrug ca. 2h (B) bzw. 1h (D).

M = I Kb Ladder-DNA (Gibco) in A und LamdaDNA (EcoR I / Hind III) in C als Marker

Das genomische DNA-Insert von pZErO-hgmATG wurde mit den Enzymen Apa I, BamH I, Hind III, Kpn I, Pst I, Sst I, Spe I, Xba I und Xho I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit der HASH cDNA-Sonde ATG-E hybridisiert (Abb. 18C, D). Weitere Southern-Blot-Hybridisierungen mit den partiellen HASH-cDNA-Sonden E2 (Abb. 7) bzw. E5/6 (Abb. 7), die die cDNA-Sequenzen von Exon 2 bzw. Exon 5 und 6 des HASH Gens enthalten, zeigten keine Hybridisierung (Daten nicht gezeigt). Damit konnte festgestellt werden, daß das 12.5 Kb lange, genomische Insert nur Exon 3 und Exon 4 des HASH-Gens enthält.

Um eine noch genauere Restriktionskarte von pZErO-hgmATG zu erhalten, wurde das genomische DNA-Insert mit folgenden Kombinationen von Enzymen doppelverdaut: BamH I/ Apa I, BamH I/ Kpn I, BamH I/ Xho I, Spe I/ Kpn I Spe I/ Xho I, Sst I/ Kpn I, Sst I/ Xho I, Pst I/ Kpn I, Pst I/ Xho I und Xba I/ Xho I (Daten nicht gezeigt). Hierbei hybridisierte ein 3.2 Kb großes Sst I/ Spe I-Fragment. Das 3.2 Kb große Sst I/ Spe I-Fragment wurde isoliert und in den Vektor pZErO (pZ-H-K) umkloniert. Weiterhin wurden ein 6.2 Kb Sst I-, ein 2.7 Kb Spe I/ Not I- und ein 1 Kb Not I/ Sst I- Fragment isoliert und jeweils in den Vektor pUC18 (pUC-H-5´) und pBluescript (pBS-H-3´ und pBSH5P) kloniert. Die Organisation des Plasmidklons pZErO-hgmATG und die Lokalisation aller subklonierten Fragmente sind in Abbildung 19A wiedergegeben. Anschließend wurden die genomischen Klone pZErO-hgmATG und pZ-H-K mit mehreren sequenzspezifischen Primern ansequenziert und mit Hilfe des Computerprogrammes ´GCG-Paket´ mit der Nukleotidsequenz der cDNA verglichen. Diese sequenzanalytische Auswertung ergab, daß der Subklon pZErO-K die beiden Exons 3 und 4 des HASH-Gens enthält. Die Position der Exons 3 und 4 im Subklon pZ-H-K wird in Abbildung 19B dargestellt.

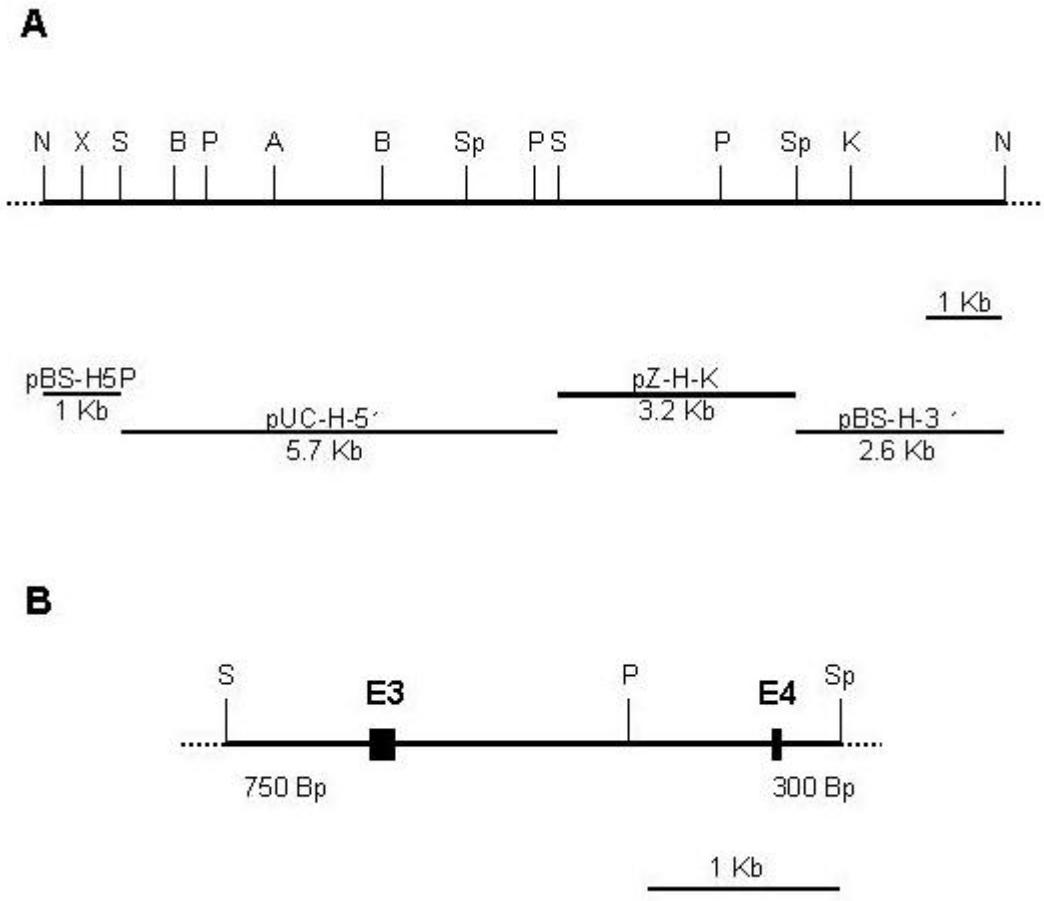


Abb. 19: Restrktionskarte und genomische Organisation des genomischen Klons pZErO-hgmATG und pZErO-K.

A. Die Restriktionskarte des genomischen Klons pZErO-hgmATG. Darunter befindet sich eine Längenangabe der entsprechenden DNA-Fragmente, die für die weitere Analyse subkloniert wurden. Die jeweiligen Subklone sind durch ihre Bezeichnung und Längenangabe der klonierten Fragmente wiedergegeben.

B. Die schematische Darstellung des genomischen Subklons pZErO-K zeigt die genaue Lokalisation der beiden Exons (E3 und E4).

3.2. Versuche zur Isolierung der Promotorregionen des HASH-Gens der Maus

Wie in Abschnitt 3.1. gezeigt, beinhaltet der genomische HASH-Klon hgmATG nur Exon 3 und Exon 4. Die Ergebnisse der RT-PCR und der Northern-Blot-Hybridisierung mit verschiedenen Exon-spezifischen Fragmenten (Abschnitt III.2.2.) weisen darauf hin, daß jedes HASH-Transkript durch einen eigenen Promotor reguliert wird. Daher wurden für das folgende Screenen die HASH-cDNA-Sonden E1, E2 und E8 eingesetzt. Das Screenen der verschiedenen genomischen Banken der Maus (Phagenbank von Clontech, P1- und BAC-Bank des RZPD) mit den cDNA-Sonden E1 und E8 brachte keine Erfolge. Die Sonde E2 ergab eine Reihe unspezifischer Signale, die auf den sehr hohen GC-Gehalt (87%) in der Sequenz des E2-Fragmentes zurückzuführen sind.

3.2.1. Screenen der Cosmid-Bibliothek mit Exon 1

Durch das Screenen einer genomischen Cosmid-Bibliothek der Maus des RZPD (Berlin) mit der HASH-cDNA-Sonde E1 (Abb. 7) wurden zwei Cosmidklone isoliert und jeweils mit Hcos-A, Hcos-B bezeichnet. Um einen spezifischen Klon zu erhalten, wurden die Klone Hcos-A und –B auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) wieder ausplattiert. Aus je 6 Kolonien wurde die genomische DNA isoliert, mit dem Enzym EcoR I verdaut und gelektrophoretisch aufgetrennt. Es zeigte sich, daß die Restriktionsmuster für alle Kolonien für Hcos-A bzw. für Hcos-B identisch waren. Die beiden Cosmidklone unterscheiden sich lediglich in einem Fragment: ein 1.4 Kb-Fragment im Klon Hcos-A und ein 4 Kb-Fragment im Klon Hcos-B (Abb. 20A).

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aller Fragmente wurden diese auf eine Membran transferriert und mit der HASH-cDNA-Sonde E1 hybridisiert (Abb. 20B). Hierbei hybridisierten ein 1.4 Kb großes EcoR I-Fragment aus Hcos-A und ein 4 Kb großes EcoR I-Fragment aus Hcos-B. Diese Restriktionsanalyse wies darauf hin, daß das Exon 1 enthaltende EcoR I- Fragment am 5´- oder 3´-Ende des klonierten Inserts lokalisiert ist. Zudem betrug die Größe der einklonierten genomischen Fragmente ca. 33 Kb bzw. 36 Kb. Deshalb wurde im folgenden lediglich der Cosmidklon Hcos-B für weitergehende Untersuchungen berücksichtigt. In der weiteren Southern-Blot-Analyse mit der durch RACE-

PCR erhaltenen cDNA-Sonde E1A (Abb. 11) wurde ein 5.5 Kb großes EcoR I-Fragment hybridisiert (Abb. 20C, D). Tatsächlich wurde durch die Ansequenzierung eine Schnittstelle für EcoR I im Exon 1 gefunden. Dieses 5.5 Kb EcoR I-Fragment sollte eine putative Promotorregion für HASHsoma enthalten.

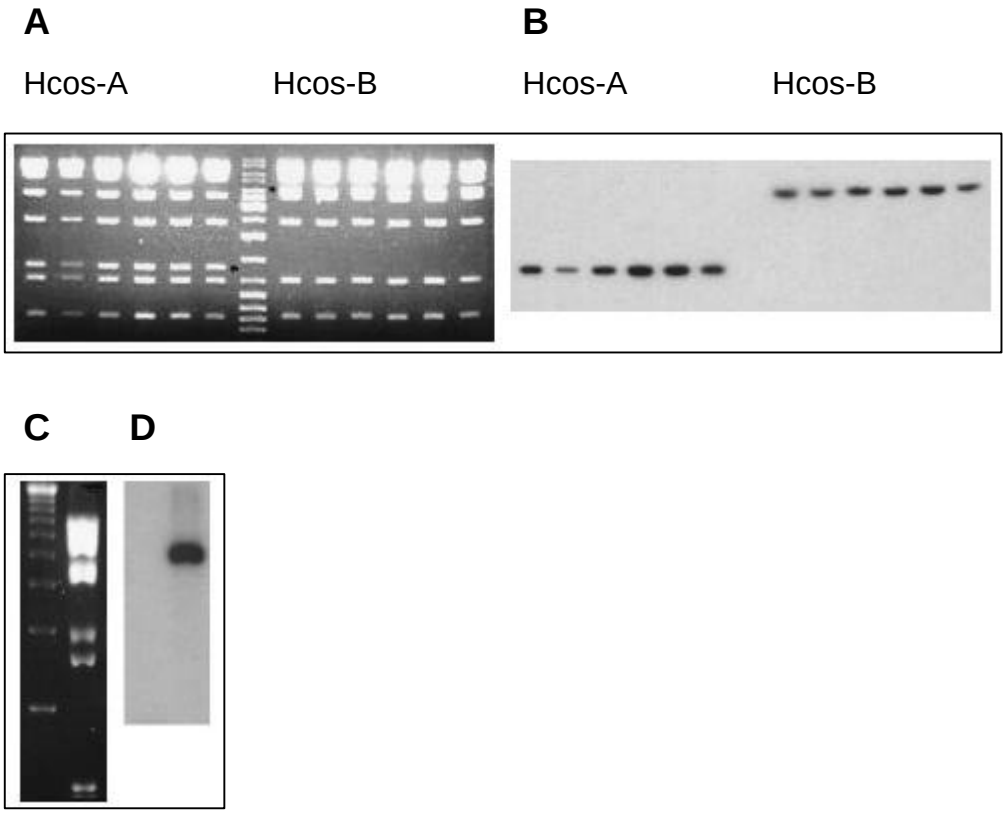


Abb. 20: Hybridisierung der Restriktionsfragmente der genomischen Cosmidklone Hcos-A und -B.

A. Restriktionsenzymatische Spaltung der Cosmidklone Hcos-A und -B mit dem Enzym EcoR I.

B. Hybridisierung mit der partiellen HASH cDNA-Sonde E1 (Abb. 7). Die Expositionszeit betrug ca. 1h.

M = Marker-DNA (Gibco)

C. Enzymatischer Verdau des Cosmidklons Hcos-B mit EcoR I.

D. Nach der Gelelektrophorese (C) wurde die DNA auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit der HASH cDNA-Sonde E1A (Abb. 11) hybridisiert. Die Expositionszeit betrug ca. 2h.

3.2.2. Screenen der Cosmid-Bibliothek mit dem cDNA-Fragment E8

Durch das Screenen einer genomischen Cosmid-Bibliothek der Maus des RZPD (Berlin) mit der HASH-cDNA-Sonde E8 (Abb. 7) wurde ein Cosmidklon isoliert und mit Hcos-D bezeichnet. Um einen spezifischen Klon zu erhalten, wurde der Klon Hcos-D auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) wieder ausplattiert. Aus 6 Kolonien wurde die genomische DNA isoliert, mit dem Enzym EcoR I verdaut und gelektrophoretisch aufgetrennt. Es zeigte sich, daß das Restriktionsmuster bei allen Kolonien identisch war.
Die DNA des Cosmidklons wurde mit den Enzymen BamH I, EcoR I, EcoR V und Xho I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferriert und mit der HASH-cDNA-Sonde E8 hybridisiert (Abb. 21A, B). Hierbei hybridisierte ein 3.4 Kb großes EcoR I-Fragment. Die Größe des einklonierten genomischen Fragmentes wurde mit ca. 35 Kb bestimmt. In der weiteren Southern-Blot-Analyse mit der durch RACE-PCR erhaltenen 51Bp langen cDNA-Sonde E8A (Abb. 14) wurde ein 1.4 Kb großes EcoR I-Fragment hybridisiert (Abb. 21C, D). Weitere Southern-Blot-Hybridisierungen mit der partiellen HASH-cDNA-Sonde E6/7 (Abb. 7) und der E9 (Abb. 7) zeigten keine Hybridisierung (Daten nicht gezeigt). Daraus konnte festgestellt werden, daß das ca. 35 Kb lange genomische Insert nur Exon 8A und Exon 8 des HASH-Gens enthält.

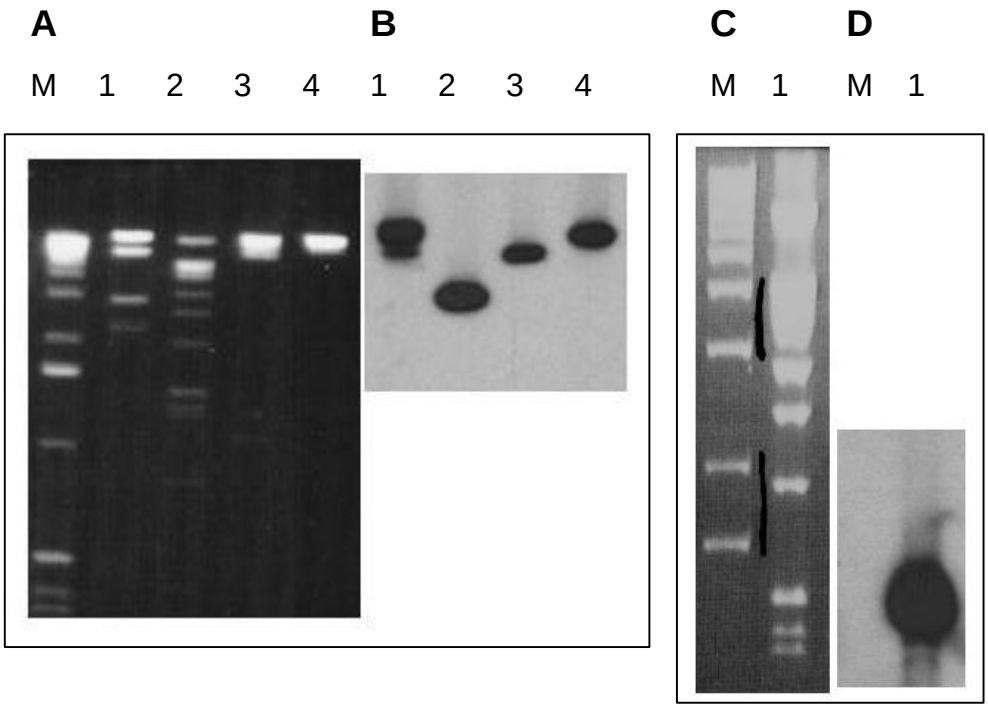


Abb. 21: Southern-Blot-Analyse des genomischen Cosmidklons Hcos-D.

A. Restriktionsenzymatische Spaltung des Cosmidklons Hcos-D mit den Enzymen BamH I (1), EcoR I (2), EcoR V (3) und Xho I (4).

B. Hybridisierung mit der partiellen HASH-cDNA-Sonde E8 (Abb. 7). Die Expositionszeit betrug ca. 2h.

C. Enyzmatischer Verdau des Cosmidklons Hcos-D mit EcoR I (Bahn 1).

D. Nach der Gelelektrophorese (C) wurde die DNA auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit der HASH-cDNA-Sonde E8A (Abb. 14) hybridisiert. Die Expositionszeit betrug ca. 1h.

M = 1 Kb Ladder DNA-Marker (Gibco)

3.3. Isolierung eines genomischen HASH Klons aus einer RZPD-Human-P1-Bibliothek

In der Dissertation von Aho (1997) wurde durch Zoo-Blot-Hybridisierung bestätigt, daß das HASH-Gen bei Säugern hochkonserviert ist. Der Vergleich der HASH-cDNA-Sequenz der Maus mit humanen EST-Klonen (AI240133, AA769927, AI139608 und AA758994) ergab eine ca. 88% Homologie. Um das HASH-Gen des Menschen zu isolieren, wurde eine Human-P1-Bibliothek mit der cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7) der Maus unter niedrig stringenten Bedingungen (60°C) gescreent. Dabei wurde ein P1-Klon isoliert und mit hH1 bezeichnet. Die DNA des P1-Klons wurde ohne Verdau auf das Gel aufgetragen, auf eine Nitrocelluosemembran geblottet und mit der HASH-cDNA-Sonde H-800 nochmals hybridisiert (Abb. 22).

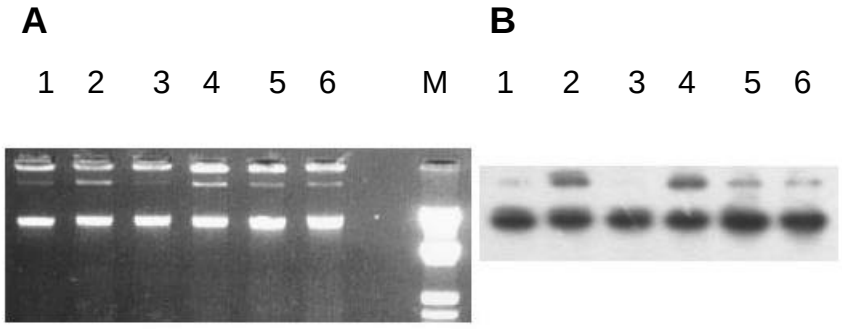


Abb. 22: Hybridisierung des humanen genomischen P1-Klons hH1.

A. Die DNA des hH1-Klons aus 6 verschiedenen Kolonien wurde ohne Verdau auf ein 0.8%iges Agarosegel aufgetragen.

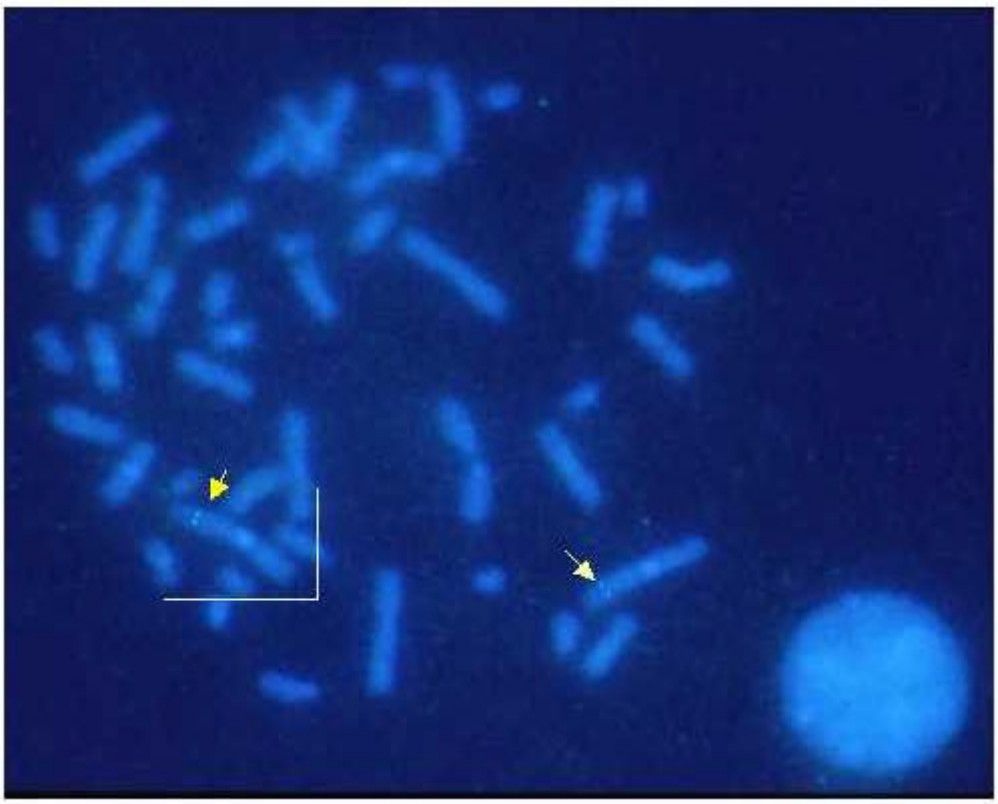
B. Hybridisierung mit der partiellen HASH cDNA-Sonde H-800 (Abb. 7) der Maus.

M = LamdaDNA (EcoR I / Hind III) als Marker

3.4. Chromosomale Lokalisation des HASH-Gens des Menschen

In der Dissertation von Aho (1997) wurde die chromosomale Lokalisation des HASH-Gens der Ratte identifiziert. Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) auf Metaphasenchromosomen der Ratte mit einem 7 Kb genomischen HASH-Fragment ergab, daß das HASH-Gen auf Chromosom 5 der Ratte in der Region q34-q35 lokalisiert ist. Einige bekannte Gene auf Chromosom 5 der Ratte wurden auf Chromosom 4 der Maus und Chromosom 1 des Menschen lokalisiert. Um diese chromosomale Lokalisation des HASH-Gens des Menschen zu bestätigen, wurde die FISH mit dem menschlichen HASH-P1-Klon hH1 an Metaphasenchromosomen des Menschen durchgeführt (Abb. 23). Die Kartierung zeigt, daß das HASH-Gen tatsächlich auf dem Chromosom 1 (Region p32-35) lokalisiert ist (Abb. 23).

A



B

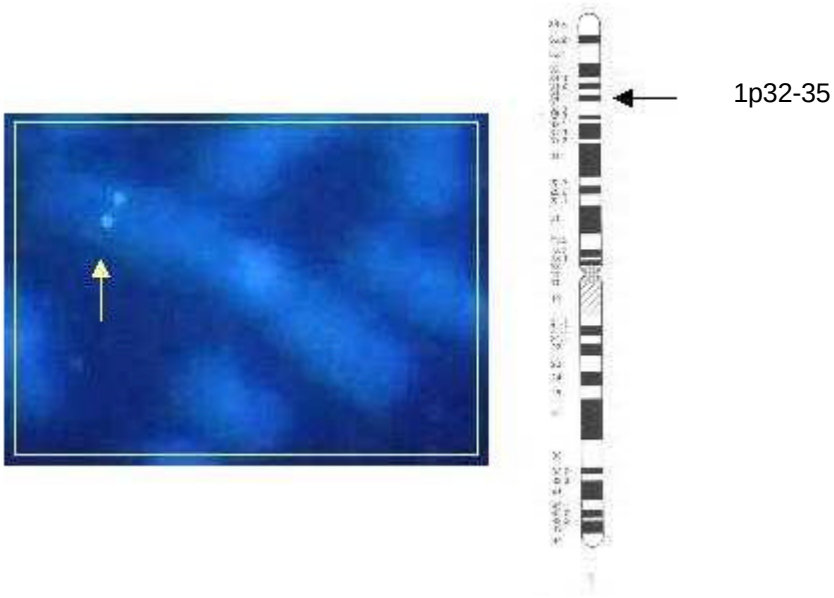


Abb. 23: Chromosomale Lokalisation des HASH-Gens des Menschen.

*A. Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde an Metaphasenchromosomen des Menschen durchgeführt. Als Sonde diente der menschliche HASH-P1-Klon hH1, der mit Hilfe des HASH-cDNA-Fragments H-800 (Abb. 7) der Maus isoliert wurde. Die Hybridisierungssignale sind mit Pfeilen gekennzeichnet.*

B. Die Box in Bild A ist in größerem Maßstab wiedergegeben. Rechts ist das menschliche Chromosom 1 dargestellt. Das HASH-Gen des Menschen lokalisiert in der Region p32-35 des Chromosoms 1.

4. Herstellung HASH-defizienter Mäuse

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die Funktion des HASH-Gens der Maus zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollte das Gen durch die Methode der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen inaktiviert werden. Für die homologe Rekombination in embryonalen Stamm (ES)-Zellen der Maus werden flankierende, genomische Fragmente einer Größe von 2-5 Kb benötigt. Durch die Verwendung isogener, d.h. aus dem selben Mausstamm stammender DNA, wird die Rekombinationsfrequenz erheblich gesteigert (Melton, 1994). Aus diesem Grund wurde der genomische Phagenklon hgmATG, der ca. 12.5 Kb des HASH-Gens enthält, aus einer 129er genomischen Bibliothek isoliert (s. II.16.). Die homologe Rekombination wurde in RI-ES-Zellen durchgeführt, die ihrerseits aus Blastocysten des Mausstammes 129/SvJ isoliert worden sind.

4.1. Die Strategie zur Deletion des HASH-Gens der Maus

Zum Zweck der Konstruktion des Targeting-Vektors und der Subklonierung geeigneter 5´- und 3´-flankierender Fragmente wurde im Vorfeld eine detaillierte Restriktionskarte der entsprechenden Subklone pUC-H-5´ und pBS-H-3´ (Abb. 19) angefertigt. Durch Sequenz- und Hybridisierungsexperimente zeigte sich, daß der Phagenklon hgmATG neben der 3.2 Kb großen Kernregion die beiden Exons E3 und E4 enthält, auch 6.7 Kb der 5´- und 2.7 Kb der 3´-flankierende Sequenz (Abb. 24). Im Exon 3 befindet sich ein ATG-Kodon als Translationsstartpunkt, das der Kozak´s Consensus-Sequenz entspricht. Die Deletion des HASH-Gens sollte den dieses ATG-Kodon enthaltenden Bereich betreffen, so daß sichergestellt ist, daß nach erfolgter Rekombination kein funktionelles HASH-Protein mehr entsteht. Die Inaktivierung in embryonalen Stammzellen sollte mit Hilfe eines Targeting-Vektors vom Replacement-Typ erfolgen, d.h. endogene Sequenzen im nativen Allel werden gegen speziesfremde DNA-Segmente durch ´crossing over´ in homologen Sequenzen ausgetauscht. Hierbei handelt es sich um die PGK-Neomycin-Kassette mit einer Größe von ca. 1.8 Kb, die für die positive Selektion der rekombinierten ES-Zellen essentiell ist. Die isolierten 5´- und 3´-flankierenden Segmente sollten in richtiger Anordnung in die

entsprechenden Klonierungsstellen des pPNT-Vektors (Tybulewicz, et al., 1991) eingefügt werden und die richtige Orientierung durch nachfolgende Restriktionsanalysen überprüft werden. Dadurch können die Rekombinationsereignisse in ES-Zellen aufgezeigt werden. Die vorgesehene Strategie für die Inaktivierung des HASH-Gens der Maus ist in Abbildung 24 dargestellt.

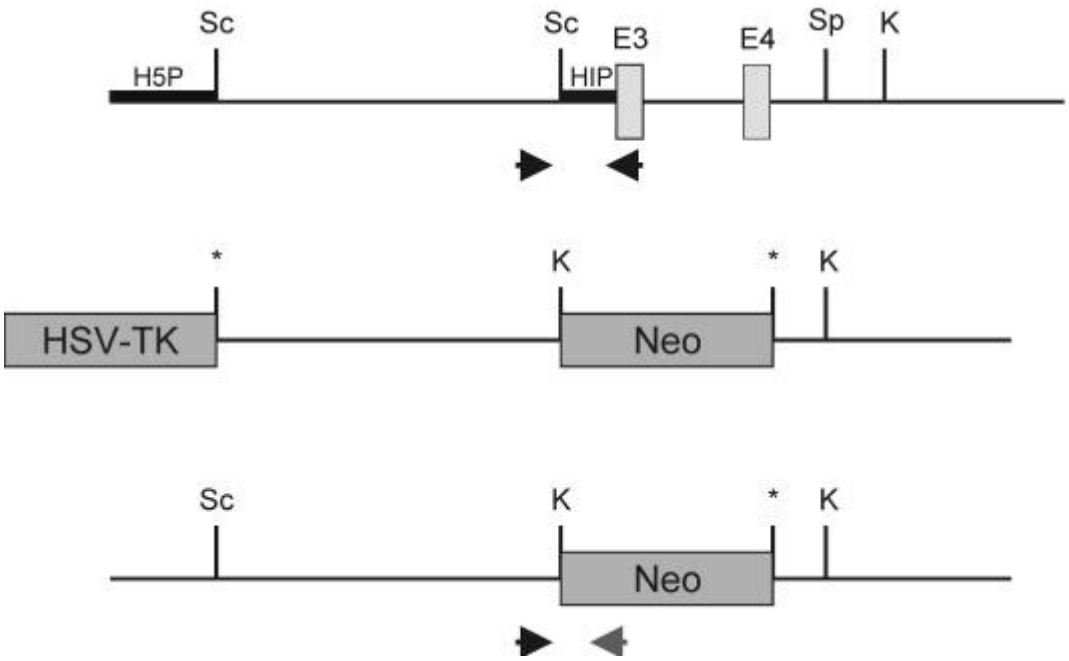


Abb. 24: Strategie zur Deletion des HASH-Gens der Maus.

Die schematische Darstellung zeigt den Vorgang der homologen Rekombination zur Deletion des HASH-Gens. Im oberen Teil findet sich das Wildtyp-Allel mit Exon 3 und Exon 4. In der Mitte ist der Targeting-Vektor dargestellt. Im unteren Teil ist das rekombinierte Allel mit der PGK-Neomycin-Kassette zwischen den Sst I- und Spe I-Schnittstellen abgebildet.
HSV-TK: Thymidinkinase Kassette von Herpes Simpex Virus
Neo: Neomycin-Kassette

4.2. Isolierung und Klonierung des 5´-flankierenden Fragments

Für die Klonierung des 5´-flankierenden Bereichs des Targeting-Vektors wurde das gesamte 5.7 Kb große Sst I-Fragment des Plasmids pZErO-hgmATG in dem Plasmidvektor pUC18 umkloniert (pUC-H-5´; s. Abb. 19). Aus dem Subklon pUC-H-5´ wurde die 5´-flankierende Region mit dem Restriktionsenzym Xba I herausgeschnitten und über ein 0.8%iges Agarosegel isoliert. Für die Klonierung dieses 5´-Xba I-Fragments wurde der Plasmidvektor pPNT auch mit dem Enzym Xba I verdaut und mit dem 5´-flankierenden Fragment ligiert. Nach der Transformation des Ligationsansatzes wurden die Kolonien mit der gesamten 2.7 Kb Not I/ Xho I-Sonde des Subklons pBS-H-3´ gescreeent. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurden isoliert und mit dem Enzym Kpn I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei sollte die richtige Orientierung des 5´-Fragments verifiziert werden. Die richtige Orientierung des 5´-Bereichs im pPNT-Vektor zeigte sich durch die Anwesenheit einer 8 Kb und einer 5 Kb großen Bande (pPNT-H-5´; Bahn 5 und 6 in Abb. 25). Ein falsch orientiertes Fragment ergab eine 11.5 Kb und eine 1.5 Kb große Bande im Agarosegel (Bahn 2 in Abb. 25).

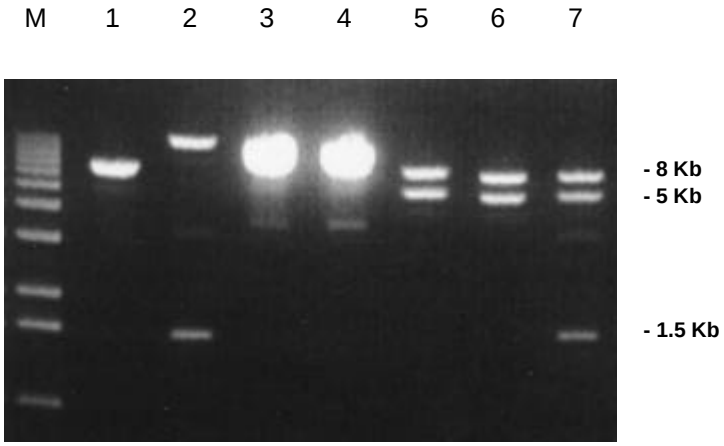


Abb. 25: Restriktionsenzymatischer Nachweis der Orientierung des 5´-flankierenden Fragments im pPNT-Vektor.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Kpn I verdauter DNA positiver Klone zeigte sich die richtige Orientierung des 5.7 Kb großen 5´-flankierenden Fragments durch eine 8 Kb und eine 5 Kb große Bande im Gel (Bahn 5 und 6). Die falsche Anordnung wurde ersichtlich durch eine 11.5 Kb und 1.5 Kb große Bande (Bahn 2). In Bahn 7 ist ein Klon mit Doppelintegration des 5´-flankierenden Fragments in umgekehrten Richtung zu sehen.
M = I Kb DNA-Ladder (Gibco/BRL)

4.3. Isolierung und Klonierung des 3´-flankierenden Fragments

Für die Klonierung des 3´-flankierenden Bereichs des Targeting-Vektors wurde das gesamte 2.7 Kb große Spe I/ Not I-Fragment des Plasmidklons pZErO-hgmATG in einen Plasmidvektor pBluescript umkloniert (pBS-H-3´; s. Abb. 19). Aus dem Subklon pBS-H-3´ wurde das 3´-flankierende Fragment mit den Restriktionsenzymen Not I/ Xho I wieder herausgeschnitten und über ein 0.8%iges Agarosegel extrahiert. Für die Klonierung dieses 3´-Fragments wurde der Plasmidvektor pPNT-H-5´ ebenfalls mit den Enzymen Not I/ Xho I verdaut und mit dem 3´-flankierenden Not I/ Xho I-Fragment ligiert. Nach der Transformation des Ligationsansatzes wurden die Kolonien mit der gesamten 2.7 Kb Not I/ Xho I-Sonde des Subklon pBS-H-3´ gescreeent. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde isoliert und mit dem Enzym Kpn I verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der richtige Klon pPNT-ΔHASH beim Verdau mit dem Enzym Kpn I zeigte sich durch die Anwesenheit einer 8.3 Kb, 5 Kb und 2.4 Kb großen Bande (Abb. 26).

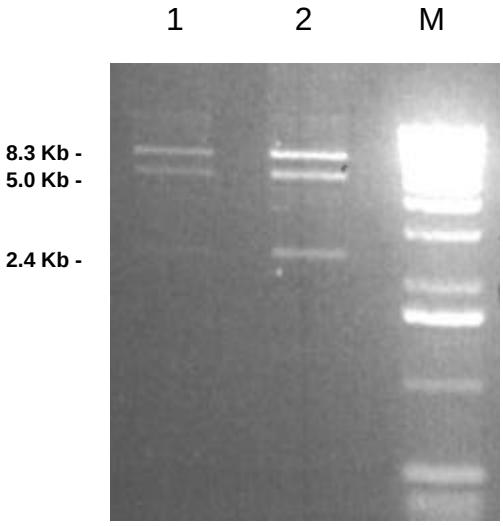


Abb. 26: Restriktionsenzymatischer Nachweis der Umklonierung des 3´-flankierenden Fragments im pPNT-H-5´.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Kpn I verdauter DNA positiver Klone zeigte sich die richtige Orientierung des 2.7 Kb großen 3´-flankierenden Fragments durch eine 8.3 Kb, 5 Kb und 2.4 Kb große Bande im Gel (Bahn 1 und 2).
M = 1 Kb DNA-Ladder (Gibco/BRL).

Nach Insertion der 5´- und 3´-flankierenden Regionen des HASH-Gens der Maus in den Transfer-Vektor pPNT wurden die Orientierung und die Vollständigkeit der genomischen Fragmente durch den Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen verifiziert. Dabei zeigten sich keine Abweichungen von den theoretischen Anforderungen an das ´Knockout´-Konstrukt (Daten nicht gezeigt). Zudem wurde durch enzymatischen Verdau festgestellt, daß sich der Targeting-Vektor pPNT-ΔHASH mit dem Enzym Not I linearisieren läßt (Daten nicht gezeigt).

4.4. Isolierung und Klonierung der externen 5´-Sonde

Für die Analyse korrekter Rekombinationsereignisse in den ES-Zellen war die Isolierung einer außerhalb des Konstrukts gelegenen Sonde notwendig. Deshalb wurde das Not I/Sst I-Fragment (1 Kb) des Phagenklons hgmATG herausgeschnitten, über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und dann in den Plasmidvektor pBluescript umkloniert (pBS-H5P). Diese 5´-Sonde H5P (Abb. 24) zeigte nach Hybridisierung mit genomischer DNA der Maus keine repetitiven Sequezen und wurde für die Southern-Blot-Analyse transfizierter ES-Zellen eingesetzt.

4.5. Analyse der selektierten ES-Zellen nach Elektroporation

Die RI-ES-Zellen wurden auf einem konfluenten ´Layer´ von kultivierten, mit Mitomycin C behandelten primären embryonalen Fibroblasten (EmFi) ausplattiert. Exponentiell wachsende ES-Zellen der Passage 12 wurden auf einer 90 mm Kulturschale (Nunc) bis zu einer Zahl von 7 x 10^6 Zellen kultiviert, durch Trypsinisierung geerntet und mit 40 µg des durch Not I-Verdau linearisierten Targeting-Vektors pPNT-ΔHASH elektroporiert. Die Zellen wurden nach dem DNA-Transfer für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend in fünf 60 mm Kulturschalen mit EmFi-Zellen ausplattiert. Die Selektion in G418 (Positiv-Selektion) und Gancyclovir (Negativ-Selektion) begann nach 12 bis 16 h. Die Gancyclovir-Selektion wurde nach 5 Tagen beendet, während die G418-Selektion bis zur Isolierung resistenter Klone am Tag 8-9 aufrechterhalten wurde.
Nach Selektion wurden insgesamt 72 positive Klone isoliert. Zunächst wurde die Hälfte der Zellen jedes Klons bei –80°C kryokonserviert, während die zweite Hälfte der Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und für die Genotypisierung herangezogen wurde. Die isolierte DNA aller ES-Zellklone wurde mit dem Enzym Kpn I verdaut und nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung einer Southern-Blot-Analyse mit der externen 5´-Sonde unterzogen. Hierbei sollte das endogene Allel des HASH-Gens der Maus durch eine ca. 17 Kb Bande charakterisiert werden, während das mutierte Allel durch die Insertion der Kpn I-Schnittstelle im 3´-Ende der Neomycin-Kassette ein Fragment von ca. 14 Kb ergibt (Abb.

27A). Um die richtige Integration und homologe Rekombination zu überprüfen, wurde die DNA aus den ES-Zellen auch mit der internen Neomycin-Sonde hybridisiert. Hierbei sollte eine unspezifische Integration der Neomycin-Kassette beim nicht richtig homolog rekombinierten Allel beliebig auftritt, während das homolog rekombinierte Allel durch die Insertion der Kpn I-Schnittstelle im 3´-Ende der Neomycin-Kassette ein Fragment von 2.4 Kb anzeigt (Abb. 27B).

Durch die Hybridisierung mit der externen 5´-Sonde wurden von 72 ES-Zellklonen 4 ES-Zellklone als positiv identifiziert (Abb. 27A). Homolog rekombinierte Klone lassen sich durch die Anwesenheit der zusätzlichen kleineren DNA-Bande (14 Kb) identifizierten. Die Hybridisierung mit der Neomycin-Sonde zeigte bei den ES-Zellklonen #31 und #71 ein erwartetes Signal mit einer Größe von 2.4 Kb, während sie beim ES-Zellklon #9 ein unerwartetes Hybridisierungssignal mit einer Größe von ca. 1.8 Kb zeigte (Abb. 27B). Interessanterweise zeigte die ES-Zellinie #67 sowohl ein erwartetes Signal mit einer Größe von 2.4 Kb als auch ein unerwartetes Signal mit einer Größe von ca. 1.8 Kb. Für die Erklärung zum unerwarteten Signal wurden zwei Möglichkeiten diskutiert: 1. ´Random-Integration´ und 2. die sog. ´Star-Aktivität´ des Restriktionsenzyms Kpn I wegen der langen Inkubation mit höherer Konzentration.

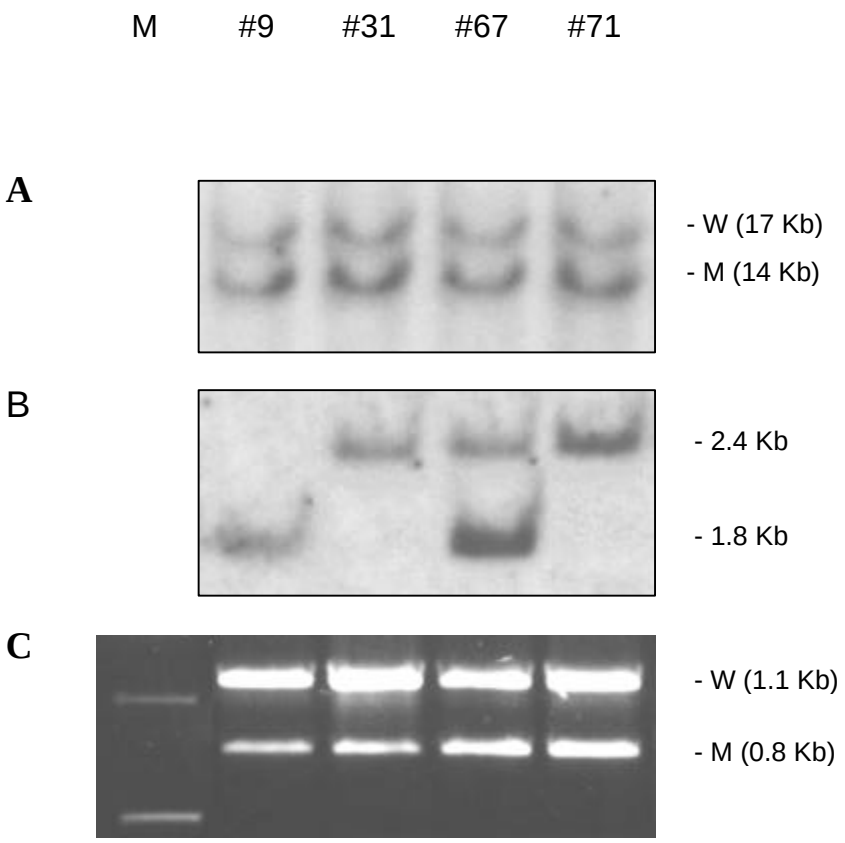


Abb. 27: Southern-Blot-Analyse mit DNA positiver ES-Zellklone nach Elektroporation mit dem Targeting-Vektor pPNT-DHASH.

A. Genomische DNA aus isolierten ES-Zellkolonien wurde mit Kpn I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der externen 5´-Sonde H5P (Abb. 24) hybridisiert. Das 17 Kb große Fragment repräsentiert das native Allel des HASH-Locus, während die 14 Kb Bande durch die Addition der Kpn I-Schnittstelle das rekombinante Allel anzeigt. Die Linien #9, #31, #67 und #71 sind heterozygot für die eingefügte Mutation.

B. Hybridisierung der selben Membran mit der internen Neomycin-Sonde. Die ES-Zellen #31 und #71 zeigen ein erwartetes Signal mit einer Größe von 2.4 Kb, während mit der DNA aus den ES-Zellen #9 ein zusätzliches Fragment mit ca. 1.8 Kb gefunden wurde.

C. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Analyse positiver ES-Zellen. 200 ng der genomischen DNA wurden einer PCR mit den HASH-Allel-spezifischen Primern und dem Neomycin-Kassette-spezifischen Primer (s. Abb. 24) unterzogen. Dabei wurde eine Wildtyp-Amplifikat mit einer Größe von 1.1 Kb und eine Amplifikat des mutierten Allels mit einer Größe von 0.8 Kb festgestellt.

M = I Kb DNA-Ladder (Gibco/BRL)

4.6. Aggregation bzw. Blastocysteninjektion von ES-Zellen

Nach genomischer Charakterisierung der isolierten ES-Zellklone wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Für die Aggregation bzw. Blastocysteninjektion mit 2.5 Tage alten Mausembryonen des Mausstammes CD-1 wurden die Zellen vier Tage vor der Aggregation bzw. Blastocysteninjektion aufgetaut, auf Feederzellen ausgesäht und nach zwei Tagen im subkonfluenten Zustand erneut trypsinisiert und auf zwei 30 mm Kulturschalen verteilt. Für die Aggregation bzw. Blastocysteninjektion wurden zunächst die homolog rekombinierten ES-Zellklone #31 und #71 und später #67 verwendet. Die Aggregate bzw. injizierten Blastocysten wurden in Ammenmäuse retransferriert, die geborenen Chimären anhand des Agouti-Fellmarkers identifiziert und durch Rückkreuzung mit Mäusen des Stammes NMRI auf Keimbahn-Transmission getestet. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse aus den Aggregationen bzw. aus den Blastocysteninjektionen zusammengefaßt.

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Aggregationen bzw. aus den Blastocysteninjektionen.

ES-Zellinie	männliche Chimären	weibliche Chimären	Agouti-Färbung	Keimbahn-Transmission
#31	5	1	5-30%	-
#67	9	-	50-100%	ja
#71	1	5	10-50%	-

Die Genotypisierung der Nachkommen nach der Rückkreuzung zeigte, daß zwei männliche Chimären, die nach Blastocysteninjektion mit der Zellinie #67 generiert werden waren, eine Keimbahn-Transmission des mutierten HASH-Allels realisierten. Bei den übrigen Chimären beteiligten sich die ES-Zellen mit dem rekombinierten Allel nicht an der

Keimbahn. Nachkommen der transmittierenden Chimären, erkennbar an der braunen Fellfarbe, wurden durch eine PCR-Analyse genotypisiert (Abb. 28). Dabei war etwa die Hälfte der analysierten Mäuse heterozygot für die HASH Deletion. Heterozygote Mäuse zeigten keinerlei Auffälligkeiten. Um die Einflüsse des genetischen Hintergrunds auf die Auswirkung der HASH-Deletion zu verringern, wurden die männlichen Chimären #18 und #27 auch mit weiblichen Mäusen der Mäusestämme 129/SvJ und C57BL/6 verpaart.

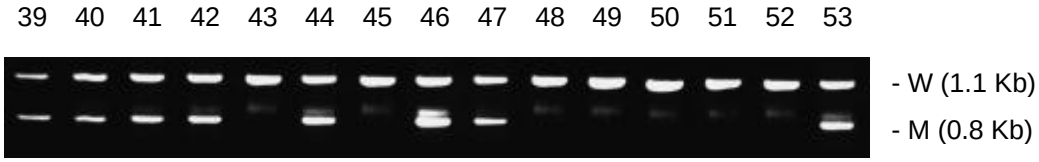


Abb. 28: Genotypisierung der Nachkommen der Chimäre #18 durch PCR (Hintergrund NMRI).

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im 1%igen Agarosegel zur Genotypisierung der Nachkommen aus der Verpaarung der Chimäre #18 mit weiblichen Mäusen des Mausstammes NMRI. 200 ng genomische DNA wurden einer PCR mit den HASH-Allel-spezifischen Primern und dem Neomycin-Kassette-spezifischen Primer (s. Abb. 24) unterzogen. Dabei wurden eine Wildtyp-Amplifikat mit einer Größe von 1.1 Kb und eine Amplifikat vom mutierten Allel mit einer Größe von 0.8 Kb erhalten.

4.7. Statistische Analyse der Nachkommen mittels PCR

Durch Verpaarung der männlichen Chimären, die das mutierte HASH-Allel durch die Keimbahn transmittierten, mit weiblichen Mäusen der Stämme NMRI, 129/SvJ und C57BL/6 wurden in der F1-Generation heterozygote und Wildtyp-Nachkommen generiert.

Für die Genotypisierung der Nachkommen wurde bei drei Wochen alten Mäusen etwa 1 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und die genomische DNA extrahiert. 200 ng der genomischen DNA wurden einer PCR mit den HASH-Allel-spezifischen Primern und dem Neomycin-Kassette-spezifischen Primer (s. Abb. 24) unterzogen. Dabei wurden ein Wildtyp-Amplifikat mit einer Größe von 1.1 Kb und ein Amplifikat vom mutierten Allel mit einer Größe von 0.8 Kb erhalten.

Bei NMRI (Verpaarung der Chimäre #18 mit weiblichen NMRI-Mäusen) betrug die Zahl der heterozygoten Mäuse 36 (50.7%) bei einer Gesamtzahl von 71 in fünf Würfen. Bei 129/SvJ (Verpaarung der Chimäre #18 mit weiblichen 129/SvJ-Mäusen) betrung der Anteil heterozygoter Nachkommen bei 3 Würfen mit insgesamt 30 Nachkommen 16 Tiere (53.3%). Die Zahl der heterozygoten Mäuse war 10 (43.5 %) bei einer Gesamtzahl von 23 in drei Würfen auf C57BL/6 Hintergrund (Verpaarung der Chimäre #27 mit weiblichen C57BL/6-Mäusen). Diese Zahlen aus drei separaten Linien entsprechen den Erwartungen nach den Mendel´schen Vererbungsgesetzen. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse aus den Verpaarungen für die F1-Generation zusammengefaßt.

Tab. 2: Quantitative Verteilung von Wildtyp- und heterozygoten Mäusen in der F1-Generation.

Hintergrund	Anzahl der Würfe	Gesamtzahl	Wildtyp	Heterozygot
NMRI	5	71	35 (49.3%)	36 (50.7%)
129/SvJ	3	30	14 (46.7%)	16 (53.3%)
C57BL/6	3	23	13 (56.5%)	10 (43.5%)

Männliche und weibliche heterozygote Mäuse auf jedem der drei Hintergründe wurden zum Zweck der Generierung homozygoter Mäuse miteinander verpaart. Nach der Verpaarung heterozygoter Eltern konnten keine homozygoten Mäuse durch PCR-Genotypisierung identifiziert werden. In Tabelle 3 ist der Vergleich der Verteilung der genotypisierten Nachkommen zwischen F1- und F2-Generation auf NMRI-Hintergrund dargestellt.

Tab. 3: Vergleich der Verteilung von Wildtyp- heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F1- und F2-Generation auf NMRI-Hintergrund.

Generation	Anzahl der Würfe (Wurfgröße)	Gesamtzahl	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
F1	5 (14.2)	71	35 (49.3%)	36 (49.7%)	-
F2	9 (10.7)	97	31 (32.0%)	66 (68.0%)	- (0%)

Aus neun Verpaarung heterozygoter Tiere (auf NMRI-Hintergrund) wurden insgesamt 97 Nachkommen mit einer durchschnitlichen Wurfgröße von 10.7 geboren. Die Zahl der heterozygoten betrug 66 (68%), während unter den 97 Nachkommen keine homozygote Maus gefunden werden konnte. Die signifikante Reduktion der Wurfgröße in der F2-Generation im Vergleich mit der F1-Generation ist erkennbar. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, daß HASH-defiziente Mäuse während der embryonalen Entwicklung absterben.

Für die weitere Charakterisierung der HASH-defizienten Mäuse wurden embryonale Stadien untersucht. Nach der Verpaarung heteroyzgoter NMRI-Mäuse wurden die Embryonen am Tag 10.5 und 11.5 präpariert. Bei drei Embryonen von insgesamt 12 wurden Abnormalitäten des Kopfes (Reduktion der Kopfgröße) unter dem Binokular beobachtet. Insbesondere war der Bereich des Mesencephalons stark reduziert, das Mittelhirn stark abgeflacht. Um festzustellen, ob diese Abnormalität des Kopfes als Phänotyp der Deletion des HASH-Gens gewertet werden kann, wurde die Genotypisierung der Embryonen durch PCR durchgeführt. Überraschenderweise wurden die Embryonen mit Kopfabnormalität als heterozygote identifiziert. Um das Ergebnis der Genotypisierung durch PCR zu überprüfen, wurde dann die Southern-Blot-Analyse mit der DNA der oben genannten 12 Embryonen durchgeführt. Die Hybridisierung mit der externen Probe H5P (Abb. 24) zeigte, daß vier der 12 Embryonen homozygot waren (Abb. 29). Die Embryonen in Bahn 1, 2 und 3, die eine Abnormalität im Kopf hatten und als heterozygot mittels PCR identifiziert worden waren, wurden damit als homozygot nach Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert. Außerdem wurde der Embryo in Bahn 8 der Abbildung 29, der morphologisch keine Abnormalität zeigte, ebenfalls als homozygot identifiziert.

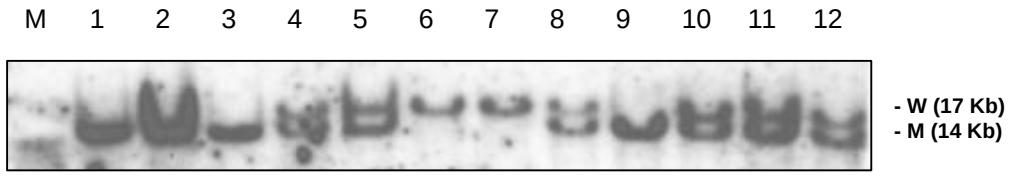


Abb. 29: Genotypisierung der 10.5 Tage alten Embryonen eines Wurfes der F2-Generation durch Southern-Blot-Analyse.

Genomische DNA aus 10.5-Tage alten Embryonen wurde mit Kpn I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran transferriert und mit der externen 5´-Sonde H5P hybridisiert. Das 17 Kb große Fragment repräsentiert das normale Allel des HASH-Locus, während die 14 Kb Bande durch die Addition der Kpn I-Schnittstelle das rekombinante Allel anzeigt.
M = 1 Kb Ladder-DNA (GibcoBRL)

4.8. Genotypisierung von Nachkommen durch Southern-Blot-Analyse

Um die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen PCR- und Southern-Genotypisierung klar zu machen, wurde bei allen Mäusen der F2-Generation die Genotypisierung durch Southern-Blot-Hybridisierung mit der externen Probe H5P (Abb. 24) durchgeführt. In Abbildung 30 ist exemplarisch das Autoradiogramm einer Hybridisierung der DNA von Tieren aus der F2-Generation (NMRI-Hintergrund) dargestellt. Dabei wurden die Mäuse 68, 86, 92, 93 und 94 in Abb. 30, die durch PCR als heterozygot typisiert worden waren, nun als homozygot identifiziert.

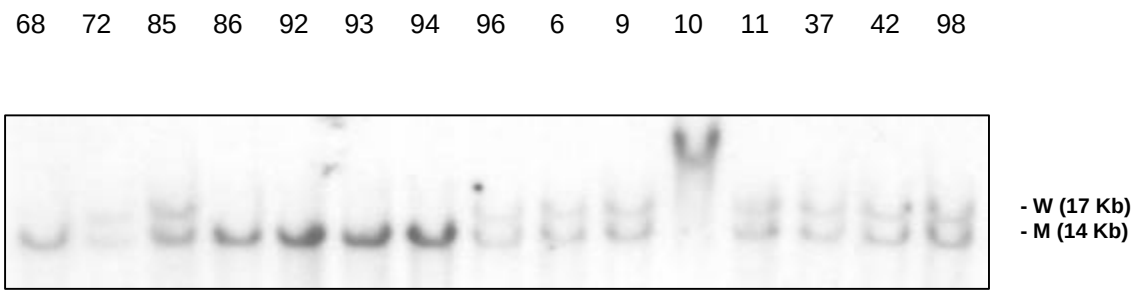


Abb. 30: Southern-Blot-Analyse zur Genotypisierung der F2-Generation (Hintergrund NMRI).

Hybridisierung genomischer DNA von Mäusen der F2-Generation, die durch PCR als heterozygot typisiert worden waren, mit der 5´-Sonde des HASH-Gens. Das Wildtyp-Allel zeigt ein Signal bei 17 Kb, das mutierte Allel bei 14 Kb. Die Mäuse 68, 86, 92, 93 und 94 sind homozygot für die eingefügte Mutation.

In Tabelle 4 ist die quantitative Verteilung der durch die Southern-Blot-Hybridisierung genotypisierten Nachkommen der F2-Generation (auf NMRI-Hintergrund) im Vergleich mit den Ergebnissen nach PCR-Genotypisierung dargestellt. Der Anteil homozygoter Nachkommen belief sich bei 9 Würfen mit insgesamt 97 Nachkommen auf 17 Tiere (17.5%), während die Zahl der Wildtyp-Mäuse 31 (32.0%) betrug. Hier findet man eine geringe Reduktion sowohl bei heterozygoten als auch homozygoten Tieren.

Tab. 4: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-Generation (Hintergrund NMRI).

Analysemethode	Gesamtzahl	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
PCR	97	31 (32.0%)	66 (68.0%)	- (0%)
Southern-Hybridisierung	97	31 (32.0%)	49 (50.5%)	17 (17.5%)

Homozygote Nachkommen unterscheiden sich nach einer äußeren, makroskopischen Analyse in keiner Weise von ihren heterozygoten bzw. Wildtyp-Geschwistern und zeigen keine Auffälligkeiten. Durch die Verpaarung von sechs mutanten Männchen mit Wildtyp-Weibchen und von acht mutanten Weibchen mit Wildtyp-Männchen wurde es festgestellt, daß alle homozygoten Mäuse fertil sind.

4.9. Erklärung des Ereignisses in Genom der Versuchsmäuse

Das HASH-Allel bei diesen Mäusen sollte wegen der unterschiedlichen Ergebnisse bei der PCR- und bei der Southern-Genotypisierung genauer charakterisiert werden. Es soll darauf hingewiesen werden, daß die homologe Rekombination durch ´crossing over´ in den ursprünglichen ES-Zellen mit der externen Probe H5P festgestellt worden war. Für die weitere Charakterisierung wurden eine externe Probe in der 3´-flankierenden Region bzw. eine interne Probe, die im deletierten Bereich lokalisiert, benötigt. Wegen repetitiver Sequenzen war die Herstellung einer externen Probe im 3´-flankierenden Bereich des Konstrukts nicht möglich.

4.9.1. Southern-Blot-Hybridisierung mit der internen Probe

Zunächst wurde überprüft, ob bei den Mäusen das putative Translationsstartkodon in Exon 3 tatsächlich deletiert ist. Dazu wurde die interne Probe HIP (Abb. 24), die in der 5´-Region des Exons 3 lokalisiert, mit PCR amplifiziert, sequenziert und auf den Blot in Abbildung 30 hybridisiert. Damit sollte nur das Wildtyp-Allel des HASH-Gens mit einer Größe von 17 Kb detektiert werden. Wie die Abbildung 31 zeigt, wurde eine unerwartete, zusätzliche Bande mit einer Größe von 11 Kb sichtbar, was bedeutet, daß bei diesen Mäusen die Deletion der beiden Exons durch homologe Rekombination nicht stattgefunden hat.

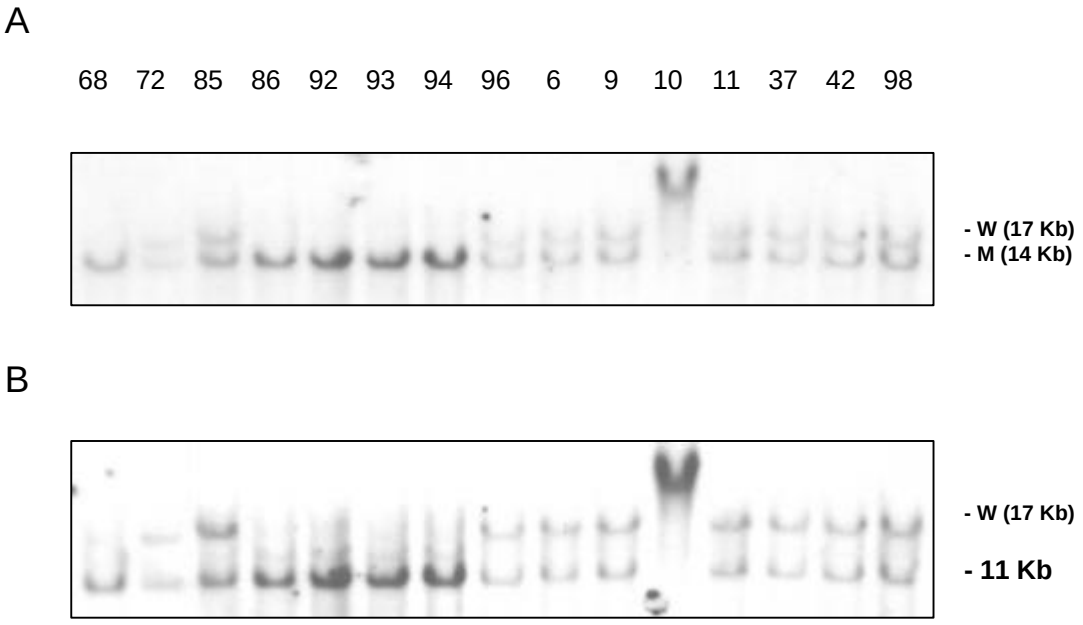


Abb. 31: Southern-Blot-Hybridisierung mit der internen Probe HIP.

A. Hybridisierung genomischer DNA von Mäusen der F2-Generation, die durch PCR als heterozygot identifiziert wurden, mit der 5´-Sonde des HASH-Gens. Das Wildtyp-Allel zeigt ein Signal bei 17 Kb, das mutierte Allel bei 14 Kb. Die Mäuse 68, 86, 92, 93 und 94 sind homozygot für die eingefügte Mutation.

B. Nachhybridisierung der selben Membran mit der internen Sonde HIP (Abb. 24). Damit sollte nur das Wildtyp-Allel des HASH-Gens mit einer Größe von 17 Kb detektiert werden. Hierbei wurde jedoch eine unerwartete, zusätzliche Bande mit einer Größe von 11 Kb hybridisiert.

4.9.2. Integration des Konstrukts innerhalb des 5´-flankierenden Bereichs : $HASH^{neo/neo}$-Insertion- statt $HASH^{-/-}$-Knock out-Mäuse

Aus allen Daten einschließlich der Ergebnisse der Southern-Blot-Hybridisierung wurde eine mögliche Erklärung für die Ereignisse in Genom der Versuchsmäuse herausgefunden werden. Normalerweise findet der Genaustausch zur Inaktivierung durch die homologe Rekombination statt, die durch ´crossing over´ in beiden 5´- und 3´-flankierenden Bereichen vermittelt wird. Statt homologer Rekombination in den 5´- und 3´-flankierenden Bereichen erfolgte bei uns die Integration des vollständigen oder partiellen Konstrukts innerhalb der 5´-flankierenden Region. Das könnte passiert sein durch

ein ´crossing over´ nur in einem flankierenden Fragment, in diesem Fall im 5´-flankierenden Fragment, und anschließender Integration des freihängenden 3´-Endes im 5´-flankierenden Bereich. Dadurch wurde die Neomycin-Kassette als Selektionsmarker innerhalb von Introns 2 zwischen Exon 2 und Exon 3 des HASH-Gens der Maus inseriert ($HASH^{neo/neo}$-Insertion).

4.10. Weitere Versuche zur Herstellung der homozygoten $HASH^{-/-}$-Mäuse

Wie in Tabelle 1 erwähnt wurde, haben bei mehreren Verpaarungen Chimären, die aus den ES-Zellen #31 und #71 generiert wurden, keine Keimbahn-Transmission gezeigt. Um neue Chimären zu erzeugen, wurden die Aggregationen und die Blastocysten-Injektionen erneut mit den ES-Zellen #31 und #71 durchgeführt. Trotz mehrmaliger Versuche ist es nicht gelungen, eine Chimäre zu produzieren. Ein Grund dafür könnte die Alterung der ES-Zellen sein. Daher wurde die Elektroporation in RI-ES-Zellen mit dem Targeting-Vektor pPNT-ΔHASH erneut durchgeführt. Durch Southern-Blot-Hybridisierung mit der externen 5´-Sonde H5P (Abb. 24) und der internen Sonde HIP (Abb. 24) bzw. Neo wurden die zwei ES-Zell-Klone, #72 und #96 (von insgesamt 97 Neo-positiven ES-Zellen) als heterozygot für die eingefügte Mutation identifiziert (Daten nicht gezeigt).

IV. DISKUSSION

1. Analyse der HASH-cDNAs der Maus

Mit Hilfe einer partiellen HASH-cDNA der Ratte (800 Bp; Aho, 1997) konnten drei überlappende cDNA-Klone aus einer Maustestis-cDNA-Bibliothek isoliert werden. Die Vervollständigung der HASH-cDNA der Maus erfolgte über die Amplifikation des 5´- bzw. 3´-Bereiches mit Hilfe der Marathon-RACE-PCR (s. III.2.3). Aus den Sequenzen der cDNA-Klone und der RACE-PCR-Produkte konnte die gesamte HASH-cDNA-Sequenz mit Hilfe des Computerprogrammes „GCG-Paket“ (Genetics Computer Group, Wisconsin, USA) erstellt werden. Die HASH-cDNA-Sequenz hat eine Länge von 2678 Bp. Das erste ATG-Kodon befindet sich an Position 1144 (Abb. 16), und das zweite ATG liegt an Position 1318 (Abb. 16). Die flankierende Sequenz des zweiten ATG ist CC**A**GA**ATGG** und korreliert mit der Kozak-Konsensussequenz CC**A/G**CC**ATGG** für den eukaryotischen Translationsstart, wobei ein Purin in der Position –3 und ein Guanin in der Position +4 in allen eukaryotischen mRNAs konserviert sind (Kozak, 1989). Der putative, offene Leserahmen beginnt mit dem zweiten Translationsstartkodon an Position 1318 und hat eine Länge von 1290 Bp (kodiert für 430 Aminosäuren). Der 3´-nichttranslatierte Bereich erstreckt sich über 68 Bp und enthält ein modifiziertes Polyadenylierungssignal AATGAAA (Sheets et al., 1990), das 18 Bp vom Poly(A)-Schwanz entfernt ist. Solche modifizierten Polyadenylierungssignale wurden u. a. für das Transitionsprotein 2 (ATTAAA; Kleene und Flynn, 1987; Luerssen et al., 1989) und für Untereinheiten von cAMP-abhängigen Proteinkinasen in männlichen Keimzellen (Oyen et al., 1990) beschrieben.

Die mehrmaligen Versuche zur Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des HASH-Gens mittels der Primer-Extension-Analyse ergaben keine eindeutigen, sondern multiple Signale für den Transkriptionsstartpunkt. Auch die Ergebnisse der Amplifikation mit Hilfe der Marathon-RACE-PCR im 5´-Bereich und die anschließende Hybridisierung des PCR-Produktes (Abb. 11) lassen die Annahme zu, daß beim HASH-Gen multiple Transkriptionsstartpunkte genutzt werden. Es sind zahlreiche Gene mit multiplen Transkriptionsstartpunkten bekannt. Bei dem Gen für die Thymidylat-Synthase startet z.B.

die Transkription an verschiedenen Stellen über einen Bereich von 90 Basen des sog. ´initiation window´ (Geng und Johnson, 1993).

Im 5´-nichttranslatierten Bereich an Position 948 bis 1143 (ca. 200 Bp) der HASH-cDNA-Sequenz von Maus und Ratte befindet sich eine GC-reiche Region (87%). Es ist bekannt, daß eine GC-reiche Region im 5´-nichttranslatierten Bereich sowohl bei der transkriptionellen als auch bei der translationellen Regulation eine Rolle spielt. Das Gen für die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV), als ein Beispiel für eine transkriptionelle Regulation über eine GC-reiche Region im 5´-nichttranslatierten Bereich, hat einen 89 Bp langen, in beiden Richtungen vollfunktionellen Promotor vor dem ATG (Qvist et al., 1998). Die humane Basonuklin-mRNA, als ein Beispiel für eine translationelle Regulation über eine GC-reiche Region im 5´-nichttranslatierten Bereich, bildet infolge des hohen GC-Gehaltes eine stabile Sekundärstruktur und dadurch wird ihre Translation inhibiert (Tang und Tseng, 1999). Es ist also vorstellbar, daß die GC-reiche Region im 5´-nichttranslatierten Bereich des HASH-cDNA eine ähnliche Rolle wie die des DPP IV- bzw. des Basonuklin-Gens spielt, nämlich bei der transkriptionellen bzw. translationellen Regulation.

Auffällig ist, daß die 5´-UTR (5´-untranslated region) der HASH-cDNA eine Wiederholungssequenz von 30 Bp enthält. Die dreifache Wiederholung der 30 Bp-Nukleotide befindet sich an Position 701 (617 Bp vor dem ATG-Kodon); dieser Anteil des Gens ist nur in der 2.6 Kb HASH-mRNA vorhanden. In der Literatur wurden Repeats für Trinukleotide (z. B. für CAG, CTG oder TTA usw.) beschrieben. Die Expansion dieser Trinukleotidsequenzen (´expansion mutation´) ist als Ursache bei genetisch bedingten Erkrankungen bekannt, etwa bei der Chorea Huntington, beim Martin-Bell-Syndrom und bei der Mytonendystrophie (Margolis et al., 1999). Bislang gibt es keine Hinweise in der Literatur, daß auch Repeats von 30 oder mehr Basenpaaren in der 5´-nichttranslatierten Region tatsächlich für erblich bedingte Erkrankungen in Frage kommen. Die Repeats könnten wichtig sein als *cis*-ständige Elemente, oder sie könnten über die Beeinflußung der Sekundärstruktur der mRNA die Transkriptstabilität verändern.

Nach den Ergebnissen von Gold und Hecht (1981) kann ein ungewöhlich langer Poly(A)-Schwanz für die Translationsregulation haploid exprimierter Transkripte im Testis wichtig sein. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, daß das haploide Genom in der Spermiogenese inaktiv ist und die gesamte Spermatogenese der Kontrolle des diploiden Genoms unterliegt. Durch Isolierung von mRNAs aus fraktionierten Pachytänspermatozyten, frühen runden Spermatiden und sich elongierenden Spermatiden wurde gezeigt, daß nur 50% der mRNA in den frühen runden Spermatiden mit Polysomen assoziiert vorliegt, d.h. translatiert wird (Stern et al., 1983). Es wurde angenommen, daß im Spermatidenzytoplasma ein Vorrat an mRNA vorhanden ist, der aus der diploiden Phase der Spermatogenese stammt und in den sich elongierenden Spermatiden translatiert wird (Eddy et al., 1993; Hecht, 1993). Zwischenzeitlich konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, daß es Genexpression in den haploiden Spermatiden gibt, die Transkripte über mehrere Tage konserviert und dann im Verlauf der Spermiogenese translatiert werden. Als Beispiele seien an dieser Stelle die mRNAs für die Gene Transitionsprotein 1 und 2 (TP 1 und TP2), Protamin 1 und 2 (P1 und P2) und MCS (´selenoprotein in the mitochondrial capsule´) genannt (Schäfer et al., 1995).
Die Verzögerung der Translation der haploid exprimierten Gene kann auf den ungewöhnlich langen Poly(A)-Schwanz der mRNAs zurückgeführt werden (Kleene, 1989). Um zu überprüfen, ob dieser Kontrollmechanismus für die Translation der haploidspezifischen HASH-Transkripte gilt, wurde die Länge des Poly(A)-Schwanzes der HASH-mRNAs durch Verdau mit RNaseH analysiert. Sie beträgt maximal 100 Bp (Abb. 6). Dieser Befund läßt die Annahme zu, daß keine Translationsregulation der HASH-mRNAs in der Spermatogenese aufgrund eines ungewöhnlich langen Poly(A)-Schwanzes stattfindet.

.

Der Vergleich der HASH-cDNA-Sequenz mit den Nukleotidsequenzen in den Datenbanken EMBL sowie GenBank zeigte keine signifikante Homologie zu bekannten Sequenzen, während der Vergleich mit den EST-Datenbanken Homologien zu einer Vielzahl von EST-Klonen von Maus, Ratte und Mensch ergab. In Tabelle 5 sind die zur HASH-cDNA homologen Klone aus den EST-Datenbanken zusammengefaßt. Die Homologie auf Nukleotidebene zwischen der HASH-cDNA von Ratte und Maus beträgt ca. 97%. Dabei beschränken sich die hochkonservierten Bereiche bei den HASH-Genen von Maus und Ratte nicht nur auf den kodogenen Bereich, sondern weisen einen ebenso hohen Homologiegrad in der 5´- und 3´-nichttranslatierten Region auf. Die Homologie zwischen der HASH-cDNA von Maus und der vier EST-Sequenzen des Menschen beträgt ca. 88%.

Tab. 5: Zusammenstellung der homologen EST-Klone der HASH-cDNA (Maus, Ratte und Mensch); es wurden die Originaleinträge in den EST-Datenbanken übernommen.

ID	Beschreibung	Homologie
AF032967	Mus musculus strain C3H/HeN mRNA preferentially expressed in LPS-normoresponsive macrophages	948/975 (97%)
AA839623	vw97e07.r1 Soares 2NbMT Mus musculus cDNA clone	679/719 (94%)
AI747975	ul04f09.y1 Sugano mouse kidney mkia Mus musculus cDNA clone	559/568 (98%)
AA387131	vc22a04.r1 Ko mouse embryo 11 5dpc Mus musculus cDNA clone	512/514 (99%)
AI046732	uh54d12.r1 Soares mouse embryonic stem cell NMES Mus musculus cDNA clone	479/488 (98%)
W34515	mc57c11.r1 Soares mouse embryo NbME13.5 14.5 Mus musculus cDNA clone	536/560 (95%)
AI046560	uh27b01.r1 Barstead mouse testis MPLRB11 Mus musculus cDNA clone	500/515 (97%)
AA790543	vw17g06.r1 Soares mouse mammary gland NbMMG Mus musculus cDNA clone	455/462 (98%)
AI412950	EST241250 Normalized rat brain, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone	424/450 (94%)
AA615706	vo79h08.r1 Barstead mouse myotubes MPLRB5 Mus musculus cDNA clone	420/436 (96%)
AA273873	vb96a08.r1 Soares mouse lymph node NbMLN Mus musculus cDNA clone	299/301 (99%)
AI240133	qh34c10.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone	413/456 (90%)
AA769927	ah95d05.s1 Soares NFL T GBC S1 Homo sapiens cDNA clone	275/310 (88%)
AI139608	qd79e09.x1 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone	273/309 (88%)
AA758994	ai29d03.s1 Soares testis NHT Homo sapiens cDNA clone	272/309 (88%)

2. Analyse der Primärstruktur des HASH-Proteins der Maus

Mit Hilfe des Computerprogramms (ORF finder, NCBI) wurde für die HASH-cDNA ein offener Leserahmen ermittelt, der sich von Position 1144 bis 2607 der HASH-cDNA-Sequenz erstreckt. Das daraus abgeleitete Translationsprodukt hat ein Molekulargewicht von ca. 56.2 KDa. An Position 1318 der cDNA befindet sich ein mit der Kozak-Konsensussequenz kompatibles zweites ATG-Kodon. Legt man dieses ATG zugrunde, dann kann ein Polypeptid mit ca. 49.7 KDa abgeleitet werden. Die Western-Blot-Analyse mit dem gegen ein HASH-Oligopeptid hergestellten HASH-Antiserum (Abb. 17) ergab, daß ein HASH-Protein mit einer Größe von ca. 53 KDa in Testis, Ovar, Thymus und Gehirn vorhanden ist. Unter Berücksichtigung einer posttranslationellen Modifikation, z.B. durch Phosphorylierung (Cruzalegui et al., 1999) oder die Bindung von ATP/GTP (Husain et al., 1995), ist der Schluß zulässig, daß das 53 KDa große HASH-Protein das tatsächlich entstehende HASH-Protein ist und durch das zweite ATG-Kodon an Position 1318 der cDNA, das der Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation bei Eukaryonten entspricht, entsteht.

Die Aminosäurezusammensetzung des HASH-Proteins ist in Tabelle 6 dargestellt, wobei die basischen Aminosäuren Arginin (9.5%), Lysin (6.3%) und Histidin (5.1%) häufig vorkommen und damit das HASH-Protein als basisch (isoelektrischer Punkt: pI = 8.57) einzustufen ist. Die Aminosäure Serin, die eine als Phosphorylierungsstelle fungierende Hydroxyl(-OH)-Gruppe besitzt, ist am häufigsten (11.6%) vertreten. Mit Hilfe des Computerprogramms („MotifFinder“ und „PPSEARCH“) wurden einige Serin enthaltende Sequenzmotive als putative Phosphorylierungstellen identifiziert (Tab. 7).

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung des HASH-Proteins der Maus.

Die Aminosäurezusammensetzung ist aus der entsprechenden HASH-cDNA abgeleitet. Die Anzahl der Aminosäuren und ihr prozentualer Anteil im Gesamtprotein sind angegeben. Relativ häufig vorkommende Aminosäuren (H, R und S) sind fett markiert.

Aminosäure	Anzahl	Anteil (%)	Aminosäure	Anzahl	Anteil (%)
A	16	3.7	M	8	1.9
C	17	4.0	N	12	2.8
D	30	7.0	P	33	7.7
E	31	7.2	Q	13	3.0
F	18	4.2	**R**	41	9.5
G	16	3.7	**S**	50	11.6
H	22	5.1	T	22	5.1
I	11	2.6	V	21	4.9
K	27	6.3	W	3	0.7
L	25	5.8	Y	14	3.3

Aufgrund der Analysen mit den Computerprogrammen „SOSUI“ (Prediction of Transmembrane Segments; Hirokawa et al., 1998) und „TSEG“ (Prediction of Membrane Proteins; Kihara et al., 1998), bei denen keine Transmembranmotive gefunden werden konnten, wurde das HASH-Protein als ein lösliches Protein eingestuft. Durch eine weitere Computeranalyse mit dem Programm „PSORT“ (Prediction of Protein Sorting Signals; Nakai and Horton, 1999) wird die zelluäre Lokalisation des HASH-Proteins wie folgt vorhergesagt: im Kern mit einer Wahrscheinlichkeit von 47.8%, im Cytoplasma von 30.4%, in den Mitochondrien von 8.7% und als cytoskelettales Protein von 13.0%.

Mit Hilfe der Computerprogramme „MotifFinder“ (http://motif.genome.ad.jp/MOTIF.html) und „PPSEARCH“ (http://www2.ebi.ac.uk/ppsearch/) wurden in der Protein-Datenbank „Prosite“ einige Motive der HASH-Proteinsequenz ermittelt. Dabei wurden mehrere konservierte Sequenzen für Phosphorylierungsstellen (Tab. 7) und eine hochkonservierte ATP/GTP-Bindungsstelle (AASCKGKS) an Position 392-399 identifiziert.

Tab. 7: Zusammenstellung der putativen Phosphorylierungsstellen des HASH-Proteins.

Gefundenes Motiv	Positon	Aminosäure-Sequenz	Phosphorylierungsstelle der
cAMP_phospho_site	71 – 74 130 – 133 190 - 193	RRIS KKKS KKET	cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase
CK2_phospho_site	41 – 44 303 – 307 366 – 369	STYD SLRER SDPE	Caseinkinase II
TYR_phospho_site	102 – 108 134 - 142	RTQDKFT KSPERSKYC	Tyrosinkinase

Die Sequenzhomologie zwischen Maus und Ratte beträgt 97.9% in 430 Aminosäuren (Abb. 32). Die Aminosäuresequenz des humanen HASH-Proteins wurde aus vier humanen EST-Klonen (AI240133, AA769927, AI139608 und AA758994 in Tab. 5) abgeleitet und zeigt zu der der HASH-Aminosäuresequenz der Maus eine Identität von 88.7 % (90.3% Ähnlichkeit) über einen Abschnitt von 231 Aminosäuren (Abb. 32). Dieser hohe Homologiegrad zwischen den drei Spezies läßt die Annahme zu, daß das HASH-Gen bzw.-Protein bei diesen drei Spezies hoch konserviert ist.

Abb. 32: Vergleich der aus den cDNA-Sequenzen des HASH-Gens von Maus, Ratte und des Menschen abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

M=Maus; R=Ratte; H=Mensch.

: = Identität; . = Ähnlichkeit

```
                10        20        30        40        50        60
M-HASH   MVFEKVFPEAVDPGDVVAQLEYDTAVFELIQLVPPVGETLSTYDENTRDFMFPGPNQMSG
         ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::.::
R-HASH   MVFEKVFPEAVDPGDVVAQLEYDTAVFELIQLVPPVGETLSTYDENTRDFMFPGPNQISG
                                                          :::  ::  .
H-HASH                                                    FMFRKPNVWT-

                70        80        90        100       110       120
M-HASH   HHDSNRQVTMRRISGLRGIAPKLEFSTTSVITECLISSRKCRTQDKFTYHSAPVEKSHGR
         :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: :::
R-HASH   HHDSNRQVTMRRISGLRGIAPKLEFSTTSVITECLISSRKCRTQDKFTYHSAPVEKPHGR
          :.:::.:::::::::::: ::.:::::::::::::::::::.::::: :: :::::::::
H-HASH   -HESNRRVTMRRISGLRGNAPRLEFSTTSVITECLISSRKCHTQDKFIYHLAPVEKSHGR

                130       140       150       160       170       180
M-HASH   LQCRTSRSQKKKSKSPERSKYCINTKNYEQPTISSKSHSPSPYTKRRMCELSEDTRRRLA
         ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
R-HASH   LQCRTSRSQKKKSKSPERSKYCINTKNYEQPTISSKSHSPSPYTKRRMCELSEDTRRRLA
         :: ::::::::::::::::::::.::::::::::::::::::::::::::::::::::::
H-HASH   LQNRTSRSQKKKSKSPERSKYCINAKNYEQPTISSKSHSPSPYTKRRMCELSEDTRRRLA

                190       200       210       220       230       240
M-HASH   HLNLGPYEFKKETDKPPFVIRHVDPPSPRTDNFFGSPGRDCERDGWVRMHSDHPHIGCCR
         ::::::::::::::::::::::::::::.:::::::::::::::::::::::::.::::
R-HASH   HLNLGPYEFKKETDKPPFVIRHVDPPSPRADNFFGSPGRDCERDGWVRMHSDHPHLGCCR
         ::::::::::::::::::::
H-HASH   HLNLGPYEFKKETDKPPFVI

                250       260       270       280       290       300
M-HASH   SKDYKVIRSPHGRDFEDPFERCEEYLSPRTCSKPQHSARTLLVHSAPSTTPKHCASPVLN
         .::::::::::::::::::::.::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
R-HASH   AKDYKVIRSPHGRDFEDPFERCEDYLSPRTCSKPQHSARTLLVHSAPSTTPKHCASPVLN

                310       320       330       340       350       360
M-HASH   RASLRERFHSDWCSPPNCDEIHDRVKDVLKSHQAHARHLCDERDPEREDELELKRSLLYR
         ::::::::::::::::::::::::::::::::::.::::.::::.:::::::::::::::
R-HASH   RASLRERFHSDWCSPPNCDEIHDRVKDVLKSHQAHGRHLCEERDPEKEDELELKRSLLYR
                                                          ::::::::: :
H-HASH                                                    ELELKRSLLCR

                370       380       390       400       410       420
M-HASH   DSAYDSDPEYSSFQRPRGSFHLDDGECWSNRAASCKGKSHRPVFENSMDKMYRNLYQKAC
         ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
R-HASH   DSAYDSDPEYSSFQRPRGSFHLDDGECWSNRAASCKGKSHRPVFENSMDKMYRNLYQKAC
         :::::::::::: :.:::.:::::::: ::::::: :::::::.:::::::::::::.::
H-HASH   DSAYDSDPEYSSCQQPRGTFHLDDGEYWSNRAASYKGKSHRPIFENSMDKMYRNLYKKAY

                430
M-HASH   SSVSHTQESF
         ::::::::::
R-HASH   SSVSHTQESF
         ::.:::::::
H-HASH   SSASHTQESF
```

3. Expressionsanalyse des HASH-Gens in der Maus

Für die Untersuchung der Expression des HASH-Gens in der Maus wurde die Hybridisierung von Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben der Maus mit der HASH-cDNA H-800 durchgeführt (Abb. 1). Dabei wurden drei Transkripte für das HASH-Gen im Testis mit einer Größe von 2.6 Kb, 1.8 Kb und 1.2 Kb identifiziert, während in der RNA aus Ovar, Thymus, Placenta und Gehirn nur ein Transkript von 2.6 Kb nachweisbar war. Dieses Expressionsmuster in der Maus entspricht dem des HASH-Gens in der Ratte (Aho, 1997). Es wurde allerdings ein Unterschied zwischen Maus und Ratte in der Intensität der einzelnen Transkripte beobachtet. In der Maus ist im Testis das 1.8 Kb Transkript prominent, während im Testis der Ratte das 1.2 Kb Transkript bevorzugt darstellbar ist. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß das HASH-Gen verschiedene Promotoren besitzt, die die Transkription der verschiedenen mRNAs in verschiedenen Spezies unterschiedlich regulieren.

Um zu klären, welches der drei HASH-Transkripte in welcher Phase der Spermatogenese nachweisbar ist, wurde die Gesamt-RNA aus Testes von 5- bis 50-Tage alten Mäusen mit der HASH-cDNA H-800 hybridisiert (Abb. 2). Das größte Transkript von 2.6 Kb konnte in der RNA aus Maustestes aller Enwicklungsstadien identifiziert werden, während die 1.8 Kb- und 1.2 Kb-Transkripte erst in der RNA aus 25-Tage altem Testis detektiert werden konnten. Bei der Maus beginnt am Tag 15 der postnatalen Testisentwicklung die Meiose. Die ersten haploiden Stadien werden am Tag 20 gefunden (Clermont et al., 1992). Unter Berücksichtigung dieser Angaben kann gefolgert werden, daß das 2.6 Kb HASH-Transkript in allen Spermatogenesestadien exprimiert ist, während die 1.8 Kb und 1.2 Kb HASH-mRNAs nur in haploiden Keimzellen exprimiert sind. Um diese haploide Expression weiter zu bestätigen, wurde ein Northern-Blot mit Gesamt-RNA aus Testis von W/W^{V}-, Tfm/Y-, olt/olt, qk/qk-Mausmutanten, bei denen die Spermatogenese in unterschiedlichen Stadien unterbrochen ist, mit der HASH-cDNA H-800 hybridisiert (Abb. 3). Die Hybridisierungen zeigten, daß in den Testes der W/W^{V}- und Tfm/Y-Mausmutanten nur ein Transkript von 2.6 Kb vorhanden ist, während bei den olt/olt- und qk/qk-Mausmutanten alle drei HASH-Transkripte detektiert werden können. Bei den Testes von W/W^{V}- und Tfm/Y-Mausmutanten fehlen die haploiden Zellen (Koshimizu et al., 1992; Gaspar et al., 1991), was mit dem Fehlen der zwei HASH-Transkripte von 1.8 Kb und 1.2 Kb korreliert. Da bei der

W/W^{V}-Mutante keine Keimzellen im Testis vorhanden sind, muß das Signal des 2.6 Kb HASH-Transkriptes aus somatischen Zellen (Leydig- und Sertolizellen) stammen. Bei den Mausmutanten olt/olt und qk/qk ist die Spermatogenese nach der Phase der frühen, runden Spermatiden bzw. mittleren bis elongierten Spermatiden blockiert (Moutier, 1976; Sidman et al. 1964). Die Detektion der HASH-Transkripte von 1.8 Kb und 1.2 Kb bei der olt/olt- und qk/qk-Mausmutanten kann daher auf das Vorhandensein der haploiden Keimzellen zurückgeführt werden. Diese Experimente bestätigen, daß die 1.8 und 1.2 Kb HASH-Transkripte nur in haploiden Keimzellen exprimiert werden.

Obwohl die drei HASH-Transkripte im Testis der Maus exprimiert sind, zeigte die Western-Blot-Analyse mit dem gegen ein HASH-Oligopeptid gerichteten polyklonalen HASH-Antikörper, daß nur ein 53 KDa großes HASH-Protein im Testisextrakt vorhanden ist. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, daß das keimzellspezifisch exprimierte 1.2 Kb HASH-Transkript nicht translatiert wird. Es ist noch unklar, ob das zweite keimzellspezifisch exprimierte 1.8 Kb HASH-Transkript translatiert wird. Mit der *in situ*-immun-histochemischen Färbung von Testisschnitten mit dem HASH-Antiserum könnte diese Frage beantwortet werden. Diese Arbeiten werden derzeit durchgeführt.

Außer in Ovar, Placenta, Thymus und Gehirn wird das HASH-Transkript von 2.6 Kb auch in Lymphknoten und in der Milchdrüse der adulten Maus und in embryonalen Muskelzellen detektiert. Die Expression in Lymphknoten, Milchdrüsen und Muskelzellen ergibt sich aus dem Nachweis von EST-Klonen in der Datenbank. Diese Befunde führen zur Annahmme, daß das HASH-Protein nicht nur eine Funktion in der Spermatogenese, sondern auch in der Entwicklung anderer Organe besitzt. In einer weiteren Northern-Blot-Analyse wurde untersucht, in welchen anderen Zelltypen von Testis das große Transkript von 2.6 Kb exprimiert wird. Es wurde Gesamt-RNA aus kultivierten Sertoli- und Leydigzellen mit der HASH-cDNA H-800 hybridisiert (Daten nicht gezeigt). Nur das große Transkript von 2.6 Kb wurde in beiden getesteten Zelltypen nachgewiesen. Ein bekanntes Gen, welches ein ähnliches Expressionsmuster wie das HASH-Gen zeigt, ist das c-kit-Proto-Onkogen, das für einen Transmembranprotein-Rezeptor kodiert (Sorrentino et al., 1991). Im Northern-Blot erhält man drei Transkripte der Größen von 5.5 Kb, 3.5 Kb und 2.3 Kb. Das 5.5 Kb große Transkript (c-kit) wird in ES-Zellen (embryonale Stammzellen) und in Sertolizellen wie auch in den prämeiotischen Stadien der Spermatogenese exprimiert. Die 3.5 Kb und 2.3 Kb c-kit Transkripte konnten nur in haploiden Keimzellen nachgewiesen werden. Dieses Gen

spielt also eine wichtige Rolle nicht nur in der embryonalen, sondern auch in der postnatalen Testisentwicklung (Yoshinaga et al., 1991).

Der Vergleich der HASH-cDNA-Sequenz der Maus mit den in der Datenbank vorhandenen EST-Sequenzen aus embryonalen Stadien ergab eine beachtliche Übereinstimmung (Tab. 5). Daher wurde die Expression des HASH-Gens während der embryonalen Entwicklung der Maus untersucht. Mittels RT-PCR ließ sich die Expression des HASH-Gens in Blastocysten, 8.5-, 9.5-, 10.5-, 11.5- und 12.5-Tage alten Embryonen nachweisen (Abb. 4). Bei 13.5-Tage alten Embryonen wurde noch ein schwaches Signal detektiert, während bei 14.5-Tage alten Embryonen kein Signal mehr zu erhalten war. Um zu analysieren, wo genau das HASH-Gen im Embryo exprimiert wird, wurde die ´whole mount´-*in situ*-Hybridisierung mit 9.5- und 10.5-Tage alten Embryonen durchgeführt (Abb. 5). Hierbei wurden Hybridisierungssignale hauptsächlich im Neuralrohr und in Somiten bei 9.5- und 10.5-Tage alten Embryonalstadien beobachtet. Bei 10.5-Tage alten Embryonen war das Signal spezifisch nur in der distalen Region der Beinknospe zu beobachten. Im Sagitalschnitt von 9.5- und 10.5-Tage alten Embryonen wurde das ganze Neuralrohr von kaudal bis rostral hybridisiert. Mit einer Vergrößerung in Querschnitt wurde beobachtet, daß sich das Hybridisierungssignal deutlich auf den dorsalen Bereich des Neuralrohrs und auf den distalen Bereich der Beinknospe beschränkt. Weiterhin zeigte sich ein schwaches Hybridisierungssignal im Notochord.

Die Segregation von Zellen in ganz unterschiedliche Differenzierungswege ist essentiell für die Morphogenese in der frühen embryonalen Entwicklung (Übersicht bei Le Douarin und Kalcheim, 1999). Ein Beispiel für einen solchen morphologischen Differenzierungsprozess ist die Segregation der Neuralleistenzellen vom Neuralrohr. Die Vorläufer der Neuralleistenzellen entstehen aus dem Neuroepithel (Ektoderm), das die Spitze der Neuralfalte bildet. Während und nach Schließen der Neuralfalte entstehen die Neuralleistenzellen aus der sog. ´roof plate´-Region des Neuralrohrs. Aus Neuralleistenzellen differenzieren sich eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, z. B. Nervenzellen des peripheren Nervensystems, Zellen des Binde- und Fettgewebes, Hautzellen, Melanozyten, endokrine Zellen (Le Douarin und Kalcheim, 1999). Einige Gene, z.B. Pax3 (Tremblay, et al., 1995), slug (Nieto et al., 1994), AP-2 (Zhang et al., 1996; Schorle et al., 1996), Wnt-1/3a (Ikeya et al., 1997), N-Cadherin (Hatta und Takeichi, 1986) und cad-7 (Nakagawa and Takeichi, 1995) sind spezifisch im dorsalen Bereich des Neuralrohrs exprimiert und ihre

Translationsprodukte sind in die Generierung der Neuralleistenzellen involviert. Das Expressionsmuster des HASH-Gens in 9.5- und 10.5-Tagen alten Embryonen könnte darauf hinweisen, daß das HASH-Gen der Maus eine Rolle bei der Spezifizierung und Differenzierung der Neuralleistenzellen des dorsalen Neuralrohrs spielen könnte.

4. Charakterisierung putativer Promotoren im HASH-Gen

Bei der Ratte wurden insgesamt acht genomische Phagen-Klone des HASH-Gens, die 12 Exons enthalten, isoliert und charakterisiert (Aho, 1997). Die Restriktionskartierung der genomischen Fragmente der Phagen-Klone ergab, daß das HASH-Gen der Ratte sich über eine Länge von mehr als 100 Kb erstreckt. Durch Sequenzierung wurden alle Exon-Intron-Übergänge identifiziert. Dabei folgen alle Exon-Intron-Übergänge des HASH-Gens der Ratte der „GT-AG“-Regel (Breathnach und Chambon, 1981). Alle Introns beginnen mit den Nukleotiden GT in der ´splicing donor´-Sequenz und enden mit den Nukleotiden AG in der ´splicing acceptor´-Sequenz. Außerdem haben alle Spleißstellen eine hohe Homologie zu den von Breathnach und Chambon für Spleißstellen der proteinkodierenden Gene der Eukaryonten ermittelten Konsensussequenz.

Bei der Maus wurden im Rahmen dieser Arbeit ein genomischer Phagen-Klon und zwei genomische Cosmidklone isoliert und charakterisiert (Abschnitt III.3). Die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente und der Northern-Blot-Hybridisierungen mit verschiedenen Exon-spezifischen Fragmenten (Abschnitt III.2.2.) weisen darauf hin, daß jedes der drei HASH-Transkripte durch einen eigenen Promotor charakterisiert ist (Abb. 15 und 33). Um die einen putativen Promotor für jedes Transkript des HASH-Gens enthaltenden genomischen Klone zu isolieren, wurde eine genomische Cosmidbank mit den cDNA-Fragmenten E1, E2 und E8 gescreent. Mit E1 und E8 wurde jeweils ein genomischer Cosmid-Klon (Hcos-B und Hcos-D) isoliert, während die Hybridisierung mit der Sonde E2 zu unspezifischen Signalen führte, die auf den sehr hohen GC-Gehalt (87%) in der Sequenz des E2-Fragmentes zurückzuführen sind. Durch die Restriktionskartierung und Southern-Blot-Analyse wurde festgestellt, daß der genomische Cosmidklon Hcos-B nur Exon 1 enthält, während Hcos-D zwei Exons (Exon 8A und Exon 8) enthält. Das HASH-Gen der Maus in den drei genomischen Klonen, die nur

5 Exons von 14 enthalten, erstreckt sich über eine Länge von 70 Kb. Alle Exon-Intron-Übergänge des HASH-Gens in den drei genomischen Klonen folgen der „GT-AG“-Regel (Breathnach und Chambon, 1981).

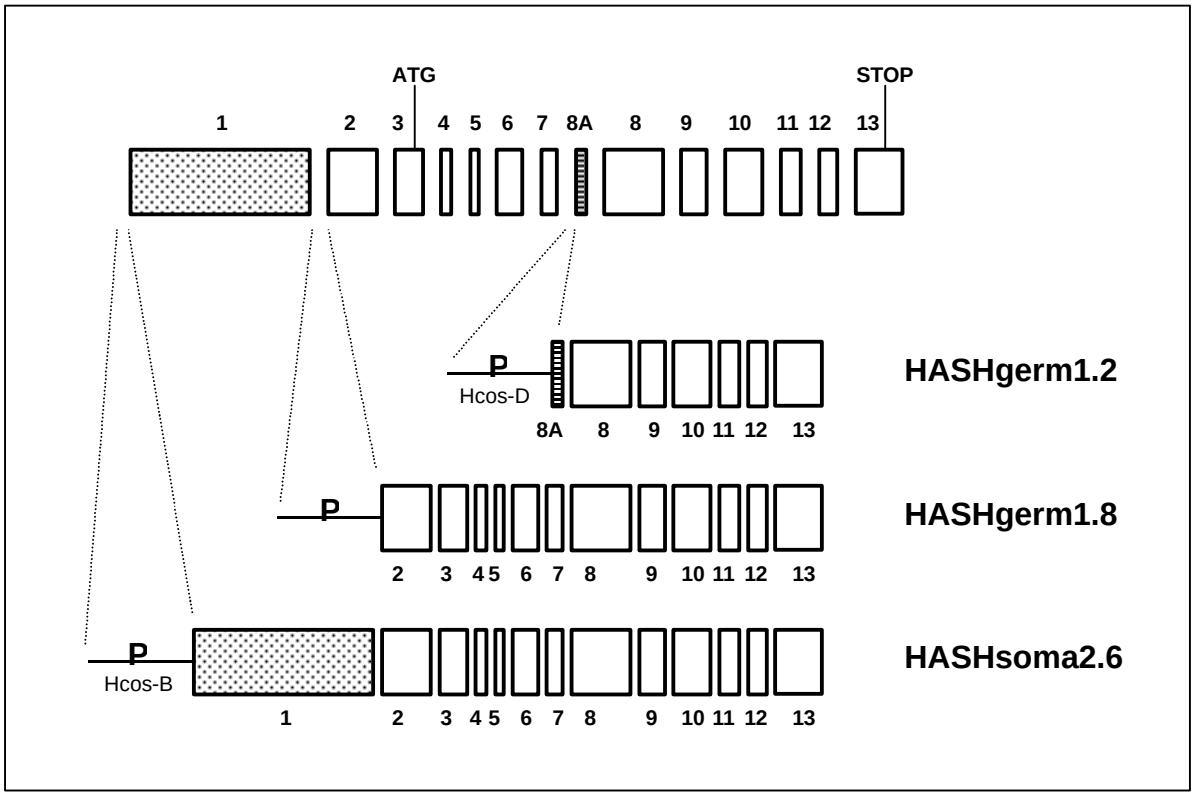


Abb. 33: Schematische Darstellung der Lokalisierung der putativen Promoterregionen der drei HASH-Transkripte.

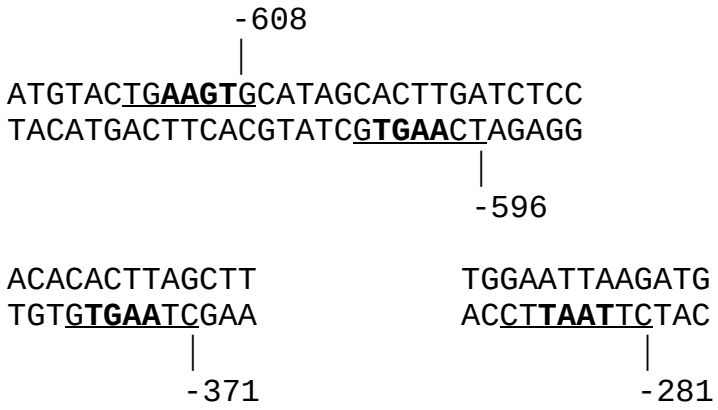
Die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente und der Northern-Blot-Hybridisierungen mit verschiedenen Exon-spezifischen Fragmenten weisen darauf hin, daß jedes der drei HASH-Transkripte durch einen eigenen Promotor charakterisiert ist. P = putative Promotorregion.

Konstitutive Promotorelemente, die die Initiation und Aktivierung der Trankription vermitteln, sind bei vielen eukaryotischen Genen in einem Bereich 5´-wärts des Transkriptionsstartpunktes zu finden (Lewin, 1990). Zur Charakterisierung der *cis*-ständigen Elemente, die an der Regulation der Expression des HASH-Gens beteiligt sein können, wurde ein ca. 800 Bp großer 5´-flankierender Bereich der beiden genomischen Cosmidklone (Hcos-B, Hcos-D) ab dem 5´-Ende des Exons 1 bzw. des Exons 8A (Abb. 7) sequenziert und hinsichtlich putativer *cis*-ständiger Sequenzen mit Hilfe des Computerprogramms „MatInspector“ (Quandt et al. 1995) untersucht. In beiden Sequenzen wurde keine TATA-Box im konventionellen Abstand von –25 bis –35 Nukleotiden gefunden. TATA-Box-lose Promotoren sind für viele eukaryotische Gene beschrieben worden (Goodrich et al., 1996). Ein weiteres ubiquitär vorkommendes Promotorelement stellt die CCAAT-Box dar, die sich in der Regel ca. –75 Nukleotiden vom Transkriptionsstartpunkt befindet (Maity and de Crombrugghe, 1998). Es konnte in beiden Sequenzen keine CCAAT-Box gefunden werden.

In der 5´-flankierenden Sequenz des HASH-Gens im Cosmidklon Hcos-B wurden mehrere *cis*-ständige Elemente für die zwei *trans*-Faktoren (Transkriptionsfaktoren) Nkx 2.5 und GATA gefunden. An den Positionen -281, -371, -596 und -608 kann eine Sequenz für die Bindung des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 gefunden werden (Abb. 34, A). Nkx2.5 wurde ursprünglich bei *Drosophila* isoliert und als *tinman* bezeichnet (Bodmer, 1993). Nkx2 Gene in Wirbeltieren kodieren eine Subfamilie der Homeodomäne-enthaltenden Transkriptionsfaktoren, die für die Morphogenese und die Zelldifferenzierung während der Embryogenese (Evans et al., 1995; Newman and Krieg, 1998; Tanaka et al., 1998; Tonissen et al., 1994) eine wichtige Rolle spielen. In Embryonen der Maus sind einige Nkx2 Gene im ventralen Bereich des Neuroektoderms und im Neuralrohr exprimiert, während andere Nkx2 Gene vor allem im Mesendoderm und in den sich daraus entwickelnden Organen wie Herz und Darm exprimiert sind (Harvey, 1996; Pabst et al., 2000). An den Positionen -543 und -683 liegt eine homologe Sequenz für die Bindung des Transkriptionsfaktor GATA (Abb. 34, B). Die GATA-Familie kodiert einen Zinkfinger-enthaltenden Transkriptionsfaktor, der die Zelltyp-spezifische Transkription reguliert (Jiang and Evans, 1996; Kelly et al., 1993). In der letzten Zeit wurde bekannt, daß GATA-2 und GATA-3 in den sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung im Zentralnervensystem exprimiert sind (George et al., 1994; Nardelli et al., 1999). Es wurde auch gezeigt, daß bei GATA-$2^{-/-}$-Mäusen die embryonale Neurogenese stark gestört ist (Tsai et al., 1994). Die

anderen Mitglieder der GATA-Familie, GATA-4/5/6 sind an der Herz-Organogenese (Laverriere et al., 1994) beteiligt.

A. *cis*-Elemente für den Nkx2.5-Transkriptionsfaktor



B. *cis*-Elemente für den GATA-Transkriptionsfaktor

Abb. 34: Putative cis-ständige Elemente für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 (A) und GATA (B) in der Promotorregion für das 2.6 Kb HASH-Transkript.

cis-Elemente sind unterstrichen und ´core´-Sequenzen sind fett geschrieben.

Interessanterweise wurde von Jiang et al. (1996) beschrieben, daß durch die Interaktion zwischen GATA-4/5/6- und Nkx2.5-Transkriptionsfaktoren die Differenzierung des Myokards reguliert wird. Aufgrund dieses Befundes könnte vermutet werden, daß beim HASH-Gen der Maus ähnliche regulatorische Interaktionen zwischen GATA- und Nkx2-Transkriptionsfaktoren in den *cis*-Elementen stattfinden. Die spezifische Expression des HASH-Gens im dorsalen Bereich des Neuralrohrs bei der embryonalen Entwicklung (Abb. 5) könnte durch das Zusammenspiel mit den GATA- und Nkx-Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

Aus Untersuchungen bei einigen testisspezifisch exprimierten Genen wurde vermutet, daß die Transkriptionskontrolle für die Regulation der testisspezifischen Expression eine wichtige Rolle spielen muß (Hecht, 1998). Für die Regulation der Genexpression spielen Interaktionen zwischen Transkriptionfaktoren (*trans*-Elemente) und Sequenzen im Promotorbereich der Gene (*cis*-Elemente) eine entscheidende Rolle (Engel et al., 1992). Die 5´-flankierende Region des HASH-Gens im Cosmidklon Hcos-D, das den testisspezifischen Promotor für das kleine, testisspezifisch exprimierte HASH-Transkript von 1.2 Kb besitzen sollte, sollten Informationen bezüglich der Transkriptionsfaktoren und möglichen Kofaktoren geben, die an der Modulation und Regulation der Expression des 1.2 Kb HASH-Transkriptes beteiligt sind. In der 5´-flankierenden Sequenz des HASH-Gens im Cosmidklon Hcos-D sind mehrere putative *cis*-ständige Elemente für den Transkriptionsfaktor AP-1 nachweisbar. An den Positionen -102, -178, und –454 liegt eine homologe Sequenz für die Bindung des Transkriptionsfaktor AP-1 (Abb. 35). Nach Cohen et al. (1993) könnte der Transkriptionsfaktor-Komplex AP1, der aus mehreren Komponenten, z.B. c-fos, fra-1, fra-2 c-jun und junB besteht, eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation in verschiedenen Stadien der Spermatogenese spielen.

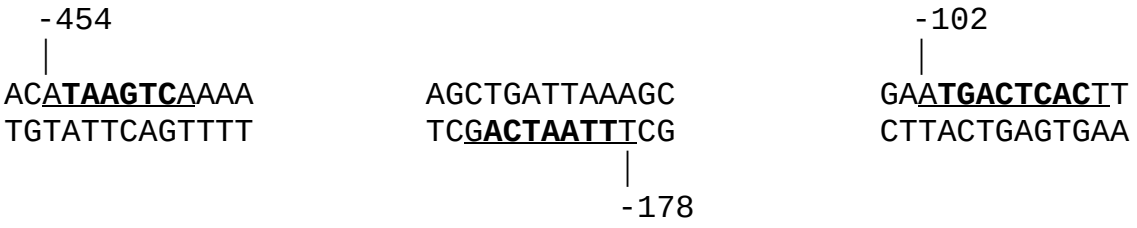


Abb. 35: Putative cis-ständige Elemente für den Transkriptionsfaktor AP-1 in der Promotorregion für das 1.2 Kb HASH-Transkript.

cis-Elemente sind unterstrichen und ´core´-Sequenzen sind fett geschrieben.

5. Chromosomale Lokalisation des HASH-Gens des Menschen

Mit Hilfe der FISH (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung)-Methode wurde das HASH-Gen der Ratte auf Chromosom 5q34-35 lokalisiert (Aho, 1997). Auf Chromosom 5 der Ratte sind bislang 14 Gene lokalisiert worden (http://www.il-st-acad-sci.org/genecats/rno05.html; Truett et al., 1995). Die meisten Gene in dieser Region sind als Kopplungsgruppe auf Chromosom 4 der Maus lokalisiert. Es wird angenommen, daß die Gene auf Chromosom 5 der Ratte eine syntäne Gruppe auf Chromosom 4 der Maus darstellen. Diese Gene wurden beim Mensch während der Evolution auf drei Chromosomenabschnitte verteilt: 1p32, 8q11 und 9p22-q32 (Yamada et al., 1994). In der Nähe des HASH-Lokus (5q34-35) bei der Ratte ist das Gen für einen Glukosetransporter (GLUT1) lokalisiert. Beim Menschen ist das GLUT1 Gen auf Chromosom 1p32 lokalisiert. Daher vermutet, daß das HASH-Gen beim Menschen ebenfalls auf Chromosom 1p32 lokalisiert ist. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine FISH-Analyse mit einem genomischen humanen P1-Klon durchgeführt, der mit Hilfe der HASH-cDNA der Maus aus einer humanen P1-Bibliothek isoliert wurde. Die Kartierung mittels FISH zeigte, daß das menschliche HASH-Gen auf Chromosom 1 (Region p31-35) lokalisiert ist (Abb. 22). In dieser Region beim Menschen sind bislang etwa 200 Gene lokalisiert worden (OMIM; Online Mendelian Inheritance in Man).

6. Alternatives Spleißen der HASH-mRNAs

In Testis-RNA der Maus konnten in Northern-Blot-Analysen drei HASH-Transkripte von 2.6 Kb, 1.8 Kb und 1.2 Kb nachgewiesen werden (Abb. 1). Anhand von Southern-Blot-Analysen wurde festgestellt, daß nur eine Kopie des HASH-Gens im Genom der Maus vorhanden ist (Aho, 1997). Daher wurde davon ausgegangen, daß die drei Transkripte des HASH-Gens durch alternatives Spleißen zustandekommen.

Bei der Gewebedifferenzierung ist die Synthese verschiedener Proteine in unterschiedlichen Zelltypen zu definierten Zeitpunkten der Entwicklung wichtig. In Bakterien kann die differentielle Genexpression auf den Ebenen der Transkription und der Translation beeinflußt

werden. Bei Eukaryonten gibt es zusätzlich die Möglichkeit der Regulation auf der Ebene des RNA-´processing´. Alternatives Spleißen spielt dabei eine wichtige Rolle für die Synthese verschiedener Proteine (Breitbart und Nadal-Ginard, 1987; Shen et al., 1991; Mettus et al., 1994). Es wurden mehrere Möglichkeiten für alternatives Spleißen genannt (Smith et al., 1989), z.B. alternative Promotoren, alternative Poly(A)-Signale oder alternatives Exon-Spleißen. Um zu klären, wie drei HASH-Transkripte entstehen, wurden RT-PCR- und Northern-Blot-Analysen bei der Maus durchgeführt.

In der 3´-flankierenden Region des HASH-Gens der Ratte wurde ein zweites Polyadenylierungssignal (AATAAA), das vom ersten Polyadenylierungssignal (ATGAAA) 705 Bp entfernt ist, identifiziert. Das Vorhandensein der zwei Polyadenylierungssignale führte zur Annahme, daß die unterschiedlichen HASH-mRNAs auf die Nutzung der beiden Polyadenylierungssignale zurückzuführen sind. In der Literatur gibt es Beispiele für Gene, die mehrere Polyadenylierungssignale besitzen. Als Beispiele für solche Gene können die Gene für alpha- und beta-Tropomyosin genannt werden (Medford et al., 1984; Helfman et al., 1986). Um unsere Annahme zu überprüfen, wurde zuerst das cDNA-Fragment zwischen den beiden Poly(A)-Signalen durch RT-PCR amplifiziert und anschließend für die Northern-Blot-Analyse verwendet. Dabei konnte kein Signal detektiert werden, so daß davon auszugehen war, daß die Sequenz zwischen den zwei Polyadenylierungssignalen der Maus nicht transkribiert wird und in keinem Zusammenhang mit einem alternativen Spleißen der HASH-mRNA steht. Um zu überprüfen, ob die drei HASH-Transkripte durch ein internes, alternatives Spleißen entstehen, wurden RT-PCR-Experimente mit verschiedenen Exon-spezifischen Primern durchgeführt. Trotz mehrmaliger Versuche wurde kein alternatives Spleißprodukt gefunden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Gewebespezifität und Phasenspezifität der HASH-Transkripte mit unterschiedlichen Promotoren im Zusammenhang stehen können.

Aus den Ergebnissen der Northern-Blot-Hybridisierung mit verschiedenen Exon-spezifischen Fragmenten konnte festgestellt werden, daß die drei HASH-Transkripte sich nur im 5´-Bereich unterscheiden. Dieser Befund führte zu der Annahme, daß das HASH-Gen verschiedene Promotoren besitzt, die die Transkription der verschiedenen mRNAs spezifisch in den unterschiedlichen Zellen regulieren. Die Funktion multipler Promotoren liegt darin, daß sie in verschiedenen Zellen aktiviert werden. Bei anderen Genen wurden bereits multiple Promotoren beschrieben. Für das homöotische Gen Antennapedia, das in der

frühen Entwicklung bei *Drosophila* eine wichtige Rolle spielt, konnten zwei Promotoren und zwei Transkriptionsstartpunkte identifiziert werden (Frischer et al., 1986; Kaufmann et al., 1990). Das Transkript vom ersten Promotor ist in diesem Fall wichtig für die Entwicklung des dorsalen Thorax, während das Transkript vom zweiten Promotor für die Entwicklung des ventralen Thorax entscheidend ist (Frischer et al., 1986).

Zusammenfassend führen die Ergebnisse zu der Schlußfolgerung, daß sich die drei HASH-mRNAs im 5´-Bereich voneinander unterscheiden und im HASH-Gen mehrere Promotoren und Transkriptionsstartpunkte realisiert sind.

7. Versuch zur Herstellung von HASH$^{-/-}$-Knock out-Mäusen

Die moderne Mausgenetik verfügt über eine potente Methode für die funktionelle Analyse von Genen, die sogenannt „Knock out“-Methode (Capecchi, 1989). Unter „Knock out“ versteht man die funktionelle Deletion (Nullmutation) eines Gens, die durch die homologe Rekombination in ES-Zellen ermöglicht werden kann. Um die Funktion des HASH-Gens der Maus zu studieren, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, das HASH-Gen der Maus mit Hilfe der homologen Rekombination zu inaktivieren. Die partielle Deletion im HASH-Gen sollte den ATG-Kodon enthaltenden Bereich betreffen, so daß sichergestellt wird, daß nach erfolgter Rekombination kein funktionelles HASH-Protein mehr entstehen kann. Die Inaktivierung des Gens in den ES-Zellen sollte mit Hilfe eines Targeting-Vektors vom Replacement-Typ erfolgen, d.h. die endogenen Sequenzen im nativen Allel werden gegen speziesfremde DNA-Segmente durch ´crossing over´ in homologen Sequenzen ausgetauscht (Abb. 24). Nach Elektroporation des Targeting-Vektors in ES-Zellen und nach entsprechender Selektion wurden vier ES-Zell Klone (#9, #31, #67 und #71) durch die Hybridisierung mit der 5´-externen Sonde als homologe Rekombinanten identifiziert (Abb. 26A). Die Rehybridisierung mit der Neomycin-Sonde zeigte bei den ES-Zellklonen #31 und #71 ein erwartetes Signal mit einer Größe von 2.4 Kb, während sich bei dem ES-Zellklon #9 ein unerwartetes Hybridisierungssignal mit einer Größe von 1.8 Kb zeigte (Abb. 26B). Dieses 1.8 Kb große Hybridisierungsfragment mit der Neomycin-Sonde kann nicht als „Random-Integration“ betrachtet werden, weil die Hybridisierung mit der 5´-externen Sonde zeigte, daß

der ES-Zell Klon #9 im Lokus des HASH-Gens homolog rekombiniert ist. Eine externe Probe außerhalb des Konstruktes diente zur Bestätigung der homologen Rekombination. Der ES-Zellklon #67 zeigte sowohl ein erwartetes Signal mit einer Größe von 2.4 Kb als auch ein unerwartetes Signal mit einer Größe von 1.8 Kb. Zur Herstellung der Chimären wurden die ES-Zellklone #31 und #71 für die Aggregation bzw. Blastocysten-Injektion verwendet. Trotz mehrmaliger Versuche wurden keine Chimären erhalten. Daher wurde dann der ES-Zellklon #67 für die Blastocysten-Injektion eingesetzt. Es wurde davon ausgegangen, daß die zusätzliche Integration des Neomycin-Gens im ES-Zellklon #67 durch die Verpaarung der Mäuse segregiert werden kann. Von den insgesamt neun erzeugten Chimären mit dem ES-Zellklon #67 transmittierten zwei männliche Tiere die Mutation durch die Keimbahn (Tab. 1). Bei +/- heterozygoten Mäusen der F1-Generation wurden keinerlei Auffälligkeit gefunden. Bei der Genotypisierung der F2-NMRI-Mäuse mit Hilfe der PCR wurde keine einzige -/- homozygote Maus gefunden (Tab. 2). Daraus wurde gefolgert, daß HASH-defiziente Mäuse während der embryonalen Entwicklung absterben. Die embryonale Lethalität der HASH$^{-/-}$-Mäuse schien mit dem Expressionsmuster des HASH-Gens in der embryonalen Entwicklung gut korreliert zu sein. Bei der weiteren Untersuchung embryonaler Stadien wurde eine Abnormalität im Kopf bei drei von zwölf Embryonen beobachtet. Besonders der Bereich des Prosencephalons war stark reduziert. Um zu bestätigen, daß diese Abnormalität des Kopfes als Folge der Deletion des HASH-Allels anzusehen ist, wurde die Genotypisierung der betroffenen Embryonen mit Hilfe der PCR durchgeführt. Überraschendeweise wurden die Embryonen mit dieser Kopfabnormalität als Heterozygote identifiziert. Um das Ergebnis der Genotypisierung durch PCR zu überprüfen, wurde dann eine Southern-Blot-Analyse mit den oben genannten 12 Embryonen durchgeführt. Die Hybridisierung mit der externen Probe (5H-P) zeigte, daß vier der 12 Embryonen Homozygote waren (Abb. 28). Die Embryonen, die eine Abnormalität im Bereich des Kopfes zeigten und mittels PCR als heterozygot identifiziert worden waren, wurden jedoch nach Southern-Blot-Hybridisierung als homozygot klassifiziert. Ferner wurde ein Embryo, der morphologisch keine Abnormalität zeigte, auch als homozygot identifiziert.

7.1. Insertion des Konstruktes innerhalb des 5´-flankierenden Bereiches

Zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse der Genotypisierung mittels PCR und Southern-Blot-Hybridisierung wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Für die genaue Charakterisierung war eine Rehybridisierung mit einer internen Sonde notwendig, obwohl die homologe Rekombination durch ´crossing over´ in den ursprünglichen ES-Zellen mit der externen Sonde bestätigt worden war. Bei der Rehybridisierung mit der internen Sonde wurde das Wildtyp-Allel des HASH-Gens mit einer Größe von 17 Kb und das Mutante-Allel mit einer Größe von 10 Kb detektiert, obwohl mit dem mutierten Allel keine Hybridisierung vorkommen darf. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß bei diesen Mäusen keine partielle Deletion des HASH-Gens durch die homologe Rekombination vorhanden ist. Aus allen Daten der Southern-Blot-Hybridisierungen wurde eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der PCR und bei der Southern-Blot-Hybridisierung abgeleitet. Normalerweise findet der Genaustausch zur Inaktivierung des betreffenden Gens durch die homologe Rekombination statt, die durch ´crossing over´ in den 5´- und 3´-flankierenden Bereichen vermittelt wird. Es kann angenommen werden, daß statt der homologen Rekombination in den 5´- und 3´-flankierenden Bereichen eine Integration des vollständigen oder partiellen Konstruktes innerhalb der 5´-flankierenden Region stattgefunden hat (Abb. 36).

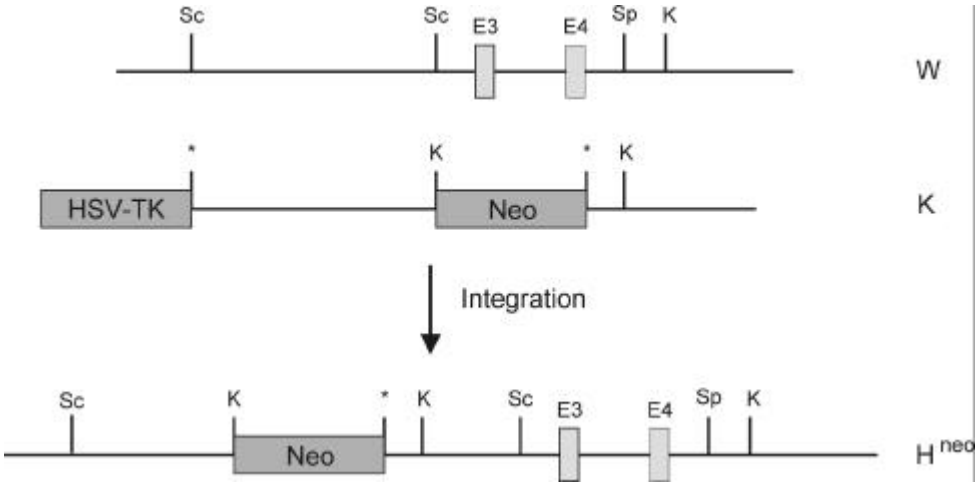


Abb. 36: Schematische Darstellung der Insertion des Konstruktes.

Durch eine Integration des vollständigen oder partiellen Konstruktes innerhalb der 5´-flankierenden Region statt der homologen Rekombination in den 5´- und 3´-flankierenden Bereichen ergibt sich das HASH^{neo}-Insertionsallel.

W = Wildtyp-Allel; K = Konstrukt; H^{neo} = HASH^{neo}-Insertionsallel

Eine ähnliche Beobachtung wurde von einer Gruppe in Kanada im Jahr 1992 beschrieben (Moens et al., 1992). Für die funktionelle Analyse des N-myc Gens versuchte diese Gruppe ein Allel des Gens N-myc durch die homologe Rekombination in ES-Zellen zu inaktivieren. Dabei wurden 4 homolog-rekombinierte ES-Zellen durch Southern-Blot-Hybridisierung mit der 5´-externen Sonde und mit der Neomycin-Sonde und durch PCR-Analyse identifiziert. Von diesen ES-Zellklonen zeigte nur ein ES-Zellklon mit dem rekombinierten Allel eine Keimbahntransmission. Durch die nachfolgende Southern-Blot-Hybridisierung mit einer internen Sonde wurde jedoch festgestellt, daß das N-myc Gen in diesem ES-Zellklon nicht deletiert war. Weitere Southern-Blot-Hybridisierungen ergaben, daß wie in unserem ES-Zellklon #67 der größte Teil des Targeting-Vektors im Intron der 5´-flankierenden Region inseriert war.

Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Insertionsrekombination ist, daß der linearisierte Targeting-Vektor nach der Elektroporation teilweise degradiert, in ES-Zellen wieder rezirkularisiert und durch die ´single insertion-type recombination´ zwischen dem endogenen Bereich und der homologen Region des Targeting-Vektors integriert wird (Abb. 37, B). Es ist auch möglich, daß der Targeting-Vektor vor der Integration in die ES-Zellen concatamerisiert wird und ein Concatamer entsteht, das an beiden Enden die 5´-flankierende Region enthält. Dann findet die homologe Rekombination zwischen dem endogenen Bereich und der flankierenden Region des Concatamers statt (Abb. 37, A). Die Southern-Blot-Hybridisierung der DNA des ES-Zellklons #67 mit der Neomycin-Sonde zeigt (Abb. 24B), daß das unerwartete Signal von 1.8 Kb als Ergebnis der Concatamerisierung anzusehen ist. Ohne Rücksicht auf den möglichen Mechanismen, ist die Insertionsrekombination sehr selten (Hasty et al. 1991).

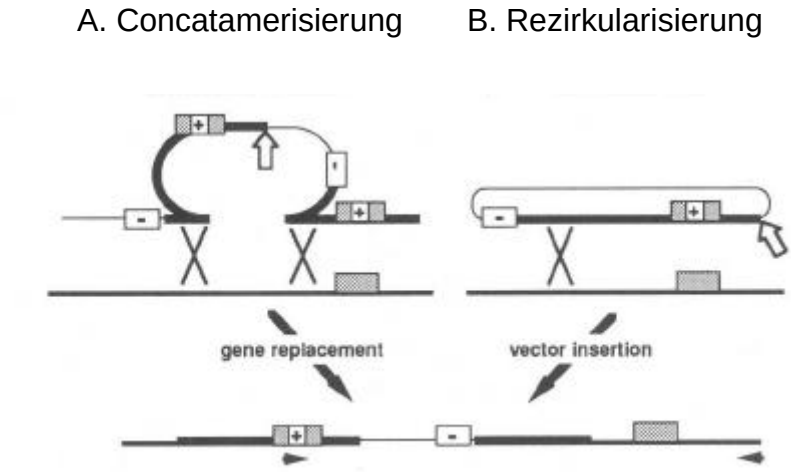


Abb. 37: Schematische Darstellung von Integrationsmöglichkeit des Targeting-Vektors.

A. Der Targeting-Vektor wird vor der Integration in die ES-Zellen concatamerisiert, und es entsteht ein Concatamer, das an beiden Enden die 5´-flankierende Region enthält. Dann findet die homologe Rekombination zwischen dem endogenen Bereich und der flankierenden Region des Concatamers statt.

B. Der linearisierte Targeting-Vektor wird in ES-Zellen wieder rezirkularisiert und durch die ´single insertion-type recombination´ zwischen dem endogenen Bereich und der homologen Region des Targeting-Vektors integriert.

7.2. Phänotyp der HASH$^{neo/neo}$-Insertionsmutante

Alle geborene HASH$^{neo/neo}$-Nachkommen waren nach der Geburt lebensfähig und zeigten keine äußerlich erkennbaren Abnormalitäten oder Veränderung in Kopf- und Körpergröße. Ebenso zeigten alle Tiere ein normales Paarungsverhalten. In Tabelle 8 ist die quantitative Verteilung der durch die Southern-Blot-Hybridisierung genotypisierten Nachkommen der F2-Generation (Hintergrund 129/SvJ und NMRI) dargestellt. Aus dem Vergleich der genotypisierten Nachkommen auf dem Hintergrund 129/SvJ mit denen auf dem Hintergrund NMRI (Tab. 8) ergibt sich; 1. daß die Lethalität bei 129/SvJ-Hintergrund viel größer ist als bei NMRI-Hintergrund, und 2. daß nicht alle HASH$^{neo/neo}$-Mäuse während der embryonalen Entwicklung absterben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß im Bezug auf die embryonale Lethalität der genetische Hintergrund wichtig ist.

Tab. 8: Quantitative Verteilung von Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen in der F2-Generation auf dem Hintergrund 129/SvJ (A) und auf dem Hintergrund NMRI (B).

A. Hintergrund 129/SvJ

+/+		+/-		-/-	
12 (34.3%)		20 (57.1%)		3 (8.6%)	
Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
7	5	7	13	1	2

B. Hintergrund NMRI

+/+		+/-		-/-	
31 (32.0%)		49 (50.5%)		17 (17.5%)	
Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
n	n	14	35	5	12

n= nicht analysiert

Bei 10-Tage alten HASH$^{neo/neo}$-Embryonen wurden Abnormalitäten des Kopfes (Öffnung des Neuralrohrs, Reduktion der Kopfgröße) beobachtet (Abb. 38). Besonders der Bereich des Prosencephalon war stark reduziert, wodurch das Vorderhirn abgeflacht erschien. Nach dem Schließen des Neuralrohrs ist die intensive Expansion des Prosencephalon-Ventrikels sehr charakteristisch für diese Stadien (Lee und Jessell, 1999; Rubenstein und Shimamura, 1998). Es kann daher vermutet werden, daß das HASH-Protein beim Verschluß oder bei der Proliferation des Neuralrohrs eine Rolle spielt. Kürzlich wurde ein den HASH$^{neo/neo}$-Embryonen sehr ähnlicher Phänotyp bei den ´flat-top´-Embryonen beschrieben (Hentges et al. 1999). Bei der ´flat-top´-Mutation handelt es sich um eine chemisch induzierte Mutation. Bei den homozygoten Embryonen findet sich eine deutliche Reduktion des Prosencephalons, ebenfalls mit abgeflachten Vorderhirn. Interessanterweise wurde das ´flat-top´-Gen bei der Maus auf Chromosom 4 (ca. 76cM) und beim Menschen auf Chromosom 1p35-36 lokalisiert. In dieser Region liegt aush das HASH-Gen. Es ist denkbar, daß das ´flat-top´-Gen und das HASH-Gen identisch sind.

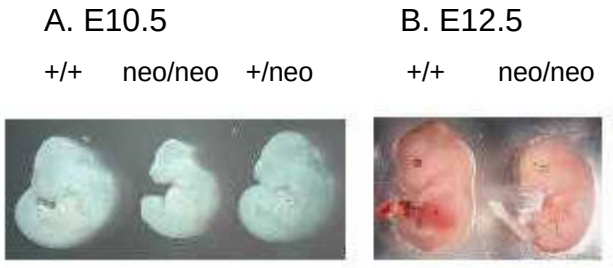


Abb. 38: Abnormalität des Kopfes der 10.5 (A)- und 12.5 (B)-Tage alten HASH$^{neo/neo}$-Embryonen.

Besonders der Bereich des Prosencephalon ist stark reduziert, wodurch das Vorderhirn abgeflacht erscheint.

+/+ = Wildtyp; neo/neo = HASH$^{neo/neo}$-Insertionsembryonen

Warum führt die $HASH^{neo/neo}$-Insertion im Intron 2 des HASH-Gens bei den meisten homozygoten auf dem Hintergrund 129/SvJ zu embryonaler Lethalität? Das Signalmolekül Sonic hedgehog (Shh) reguliert die verschiedene Differenzierungsprozesse während der Entwicklung bei Vertebraten (Echelard et al., 1993; Ekker et al., 1995). Die Ergebnisse vieler Experimente weisen darauf hin, daß die räumliche und zeitliche Expressionsregulation des Shh-Gens essentiell für das ´patterning´ eines Embryos ist (Krauss et al., 1993; Johnson et al., 1994; Barth und Wilson, 1995). Kürzlich identifizierte die Gruppe von Strähle zwei Enhancer-Elemente (ar-A und ar-C) in Intron 1 und Intron 2 des Shh-Gens (Müller et al, 1999). Es wurde auch festgestellt, daß das Enhancer-Element ar-A in Intron1 bzw. das Enhancer-Element ar-C in Intron 2 die Expression von Shh im Notochord bzw. im ´floor plate´ vermittelt, woraus geschlossen werden kann, daß die Enhancer-Elemente in den Intronen bei der zeitlichen und räumlichen Genexpression eine wichtige Rolle spielen. Daraus könnte die Spekulation ausgehen, daß das Intron 2 des HASH-Gens ein Enhancer-Element für seine eigene Expression während der embryonalen Entwicklung enthält.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe der Marathon-RACE-PCR konnte die gesamte HASH-cDNA der Maus ermittelt werden. Sie besteht aus 2678 Bp und beinhaltet einen offenen Leserahmen von 1290 Bp. Der 3´-nichttranslatierte Bereich enthält ein modifiziertes Polyadenylierungssignal, das 18 Bp weit vom Poly(A)-Schwanz, der eine Länge von ca. 100 Nukleotiden besitzt, entfernt ist. Die Homologie der isolierten HASH-cDNA der Maus beträgt zu der der Ratte 97% und zu den EST-Klonen des Menschen 88%. Der Vergleich der HASH-cDNA und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen in den Datenbanken EMBL und GenBank ergibt keine signifikante Homologien zu bekannten Sequenzen.

2. Durch Northern-Blot-Analysen konnte nachgewiesen werden, daß das HASH-Gen im Testis der Maus exprimiert ist, und zwar mit drei Transkripten (2.6 Kb, 1.8 Kb und 1.2 Kb). Es konnte auch eine schwache Expression des 2.6 Kb Transkripts in Ovar, Placenta, Thymus und Gehirn nachgewiesen werden. Bei weiteren Expressionsuntersuchungen während der postnatalen Testisentwicklung konnte gezeigt werden, daß das 2.6 Kb HASH-Transkript in der RNA von 5- bis 60-Tage alten Testes vorhanden ist, während die zwei kleineren HASH-Transkripte (1.8 Kb und 1.2 Kb) zum Zeitpunkt der ersten haploiden Differenzierungsstadien (Spermatiden) im Testis nachweisbar werden. Untersuchungen an Testis-RNA von verschiedenen Mausmutanten mit Keimzelldefekten ergaben, daß die zwei kleineren HASH-Transkripte (1.8 Kb und 1.2 Kb) erst in haploiden Keimzellen exprimiert werden, während das große Transkript (2.6 Kb) nur in somatischen Geweben nachweisbar ist.

3. Die Expression während der embryonalen Entwicklung wurde mithilfe der RT-PCR-Analyse an Gesamt-RNA aus Blastocysten, 8.5-, 9.5-, 10.5-, 11.5-, 12.5-, 13.5- und 14.5-Tagen alten Embryonen analysiert. Transkripte des HASH-Gens ließen sich in Blastocysten, 8.5-, 9.5-, 10.5-, 11.5- und 12.5-Tagen alten Embryonen nachweisen. Bei 13.5-Tage alten Embryonen wurde ein schwaches Signal detektiert, während bei 14.5-Tage alten Embryonen kein Signal mehr erhalten wurde. Mit Hilfe der ´whole mount´- *in situ*-Hybridisierung konnte nachgewiesen werden, daß das HASH-Gen hauptsächlich im Neuralrohr und in den Somiten bei 9.5- und 10.5-Tage alten Embryonen exprimiert ist. In

Sagitalschnitten wurde die Expression nur im dorsalen Neuralrohr von kaudal bis rostral beobachtet.

4. Aus den Ergebnissen der RT-PCR-Experimente mit verschiedenen Exon-spezifischen Primern und der Northern-Blot-Hybridisierungen mit verschiedenen Exon-spezifischen Fragmenten konnte gezeigt werden, daß die drei HASH-Transkripte durch drei verschiedene Promotoren zustandekommen.

5. Ein polyklonaler Antikörper wurde mit einem aus der cDNA abgeleiteten HASH-Peptid hergestellt. In der Western-Blot-Analyse konnte in Thymus, Gehirn und Ovar, in denen nur HASHsoma (2.6 Kb) exprimiert ist, eine Bande von 53 KDa detektiert werden. Im Testisextrakt wurde ebenfalls nur eine 53 KDa große Bande detektiert, obwohl drei HASH-Transkripte in Testis nachweisbar sind.

6. Durch Screenen einer Human-P1-Bibliothek mit der cDNA-Sonde (H-800) der Maus wurde ein humaner HASH-Klon isoliert. Mit Hilfe der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) wurde das HASH-Gen des Menschen auf Chromosom 1p32-35 kartiert.

7. Es wurde im Rahmen sehr zeitaufwendiger Experimente versucht, eine Knock-out Maus für das HASH-Gen zu erzeugen. Es konnten zwar Chimären erhalten werden, aber keine, die das mutierte HASH-Allel über die Keimbahn weitergeben. Hingegen trat der äußerst seltene Fall der Insertionsmaus auf: $HASH^{neo/neo}$-Insertionsmäuse, die durch die Integration des Konstrukts innerhalb der 5´-flankierenden Region des Exons 3 entstanden sind, zeigten eine partielle Lethalität während der embryonalen Entwicklung. Bei den Embryonen mit der $HASH^{neo/neo}$-Insertion war die Entwicklung des Kopfes stark gestört. Insbesondere war der Bereich des Prosencephalons stark reduziert. Alle geborenen $HASH^{neo/neo}$-Nachkommen waren jedoch nach der Geburt lebensfähig und zeigten keine äußerlich erkennbaren Abnormalitäten oder Veränderungen in Kopf- und Körpergröße. Ebenso zeigten alle Tiere ein normales Paarungsverhalten. Der variable Phänotyp der embryonalen Lethalität bei der $HASH^{neo/neo}$-Insertionsmutation hängt vom genetischen Hintergrund ab.

VI. LITERATUR

Adham, I. M., Klemm, U., Maier, W. M., Hoyer-Fender, S., Tsaousidou, S. and Engel, W. (1989). Molecular cloning of preproacrosin and analysis of its expression pattern in spermatogenesis. Eur J Biochem. 182(3), 563-568.

Adham, I. M., Nayernia, K. and Engel. W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. Mol. Reprod. Dev. 46, 370-376.

Aho, H. (1997). Zur Struktur und Expression zweier keimzellspezifischer Gene: MCS und HASH. Dissertation, Universität Göttingen.

Ausubel, F. M. (1992). Current protocols in molecular biology. Wiley & Sons Inc, New York, USA.

Barth, A. K. and Wilson, S. W. (1995). Expression of zebrafish nk2.2 is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. Development. 121, 1755-1768.

Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. Cell 56, 335-344.

Benton, W. D. and Davis, R. W. (1977). Screening lamdagt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. Science 196, 180-182.

Birnboim, F. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Acids Res. 7, 1512-1523.

Bodmer, R. (1993). The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. Development. 118, 719-729.

Boer, P. H., Adra, C. N., Lau, Y. F. and McBurney, M. W. (1987). The testis-specific phosphoglycerate kinase gene pgk-2 is a recruited retroposon. Mol Cell Biol. 7(9), 3107-3112.

Bolivar, F. and Beckmann, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloing vectors. Methods Enzymol. 68, 245-260.

Bradley, A., Evans, M. J. Kaufman, M. H. and Robertson, E. (1984). Formation of germline chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature. 309, 255-256.

Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organisation and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383.

Breitbart, R. E. and Nadal-Ginard, B. (1987). Developmentally induced muscle-specific transfactors control the differential splicing of alternative and constitutive Troponin T exons. Cell. 49, 793-803.

Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. Science. 244, 1288-1292.

Chien, A., Edgar, D. B. and Trela, J. M. (1976). Desoxyribonucleic acid polymerase from the extremely thermophile Thermus aquaticus. J. Bacteriol. 127, 1550.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162, 156-159.

Chubb, C. Genetic Control of Spermatogenesis and Steroidgenesis; in „Cell and Molecular Biology of the Testis“, Hrsg. v. Desjardins, C. and Ewing, L. R.; Oxford Univ. Press, Oxford 1993, pp. 90-107.

Clermont, Y., Oko., R. and Hermo, L. (1992). Cell biology of mammalian spermatogenesis. In „Cell and molecular biology of the Testis“ Hrsg.: Ewing, L. and Desjardins, C., Oxford University Press, New York, 332-376.

Cohen, D. R., Vandermark, S. E., McGovern, J. D. and Bradley, M. P. (1993). Transcriptional regulation in the testis: a role for transcription factor AP-1 complexes at various stages of

spermatogenesis. Oncogene 8, 443-455.

Cruzalegui, F. H., Cano, E. and Treisman, R. (1999). ERK activation induces phosphorylation of Elk-1 at multiple S/T-P motifs to high stoichiometry. Oncogene 18, 7948-7957.

Dagert, M. and Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene 6, 23-28.

Doetschman, T., Gregg, R. G., Maeda, N. Hooper, M. L., Melton, D. W., Thompson, S. and Smithies, O. (1987). Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. Nature. 330, 576-578.

Domenjoud, L., Nussbaum, G., Adham, I. M., Greeske, G. and Engel, W. (1990). Genomic sequences of human protamines whose genes, PRM1 and PRM2, are clustered. Genomics 8, 127-133.

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacqes, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, amember of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell. 75, 1417-1430.

Eddy, E. M., Welch, J. E. and O´Brien, D. A. (1993). Gene expression during spermatogenesis. In „Molecular Biology of the Male Reproductive System“ (D. de Kretser. Ed.). Academic Press, San Diego, CA. pp. 181-232.

Ehlers, M. R., Fox, E. A., Strydom, D. J. and Riordan, J. F. (1989). Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. Proc Natl Acad Sci 86(20), 7741-7745.

Ekker, S. C., Ungar, A. R., Greenstein, P., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Moon, R. T. and Beachy, P. A. (1995). Patterning activity of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. Curr. Biol. 5, 944-955.

Engel, U., Beug, H., LaVail, J. H., Zenke, M. W., Mayo, K., Leonard, M. W., Foley, K. P., Yanag, Z., Kornhauser, J. M., Ko L. J., Lim, K.-C., George, K. M. and Breigel, K. (1992). *Cis* and *trans* regulation of tissue-specific transcription. J. Cell Sci. 16(Suppl.), 21-31.

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154-156.

Evans, S. M., Yan, W., Murillo, M. P., Ponce, J., and Papalopulu, N. (1995). *tinman*, a *Drosophila* homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of *tinman*. Development. 121, 3889-3899.

Fawcett, D. W. (1979). The cell biology of gametogenesis in the male. Perspect Biol Med. 22, 56-73.

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

Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poutska, A. and Murray, N. (1983). Lamda replacement vectors carrying polylinker sequences. J. Mol. Biol. 170, 827-842.

Frischer, L. E., Hagen, F. S. and Garber, R. L. (1986). An inversion that disrupt the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. Cell. 47, 1017-1023.

Gaspar, M. L., Meo, T., Bourgarel, P., Guenet, J. L. and Tosi, M. (1991). A single base deletion in the Tfm androgen receptor gene creates a short-lived messenger RNA that directs internal translation initiation. Proc Natl Acad Sci. 88, 8606-8610.

Geng, Y. and Johnson L. F. (1993). Lack of an initiator element is responsible for multiple transcriptional initiation sites of the TATA-less mouse thymidylate synthase promoter. Mol Cell Biol. 13, 4894-4903.

George, K. M., Leonard, M. W., Roth, M. E., Lieuw, K. H., Kioussis, D., Grosveld, F., and Engel, J. D. (1994). Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene.

Development. 120, 2673-2686.

Gold, B. and Hecht, N. B. (1981). Differential compartimentalization of messenger ribonucleic acid in murine testis. Biochemistry. 20, 4871-4877.

Goodrich, J. A., Cutler, G. and Tjian, R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. Cell. 84, 825-830.

Gossler, A., Doetschman, T., Korn, R., Serfling, E. and Kemler, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 9065-9069.

Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating complimentary DNA libraries. Gene. 25, 263-269.

Hanahan, D., and Meselson, M. (1980). Plasmid screening at high colony density. Gene. 10, 63-67.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning a practical approach. Glover, D. M. (Hrsg.), IRL Press, Oxford-Washington D. C.

Harvey, R. (1996). Nkx-2 homeobox genes and heart development. Dev Biol. 178, 203–216.

Hasty, P., Rivera-Perez, C., Chang, N. and Bradley, A. (1991). Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stemm cells. Mol. Cell Biol. 11, 4509-4517.

Hatta, K. and Takeichi, M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. Nature. 320, 447-449.

Hecht, N. B. (1990). Regulation of „haploid expressed genes“ in male germ cells. J. Reprod. Fert. 88, 679-693.

Hecht, N. B. (1993) Gene expression during male germ cell development. In „Cell and

Molecular Biology of the Testis“ (C. Desjardins and L. L. Ewing, Eds.). Oxford Univ. Press, New York, NY. pp400-432.

Hecht, N. B. (1998). Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. BioEssays. 20, 555-561.

Helfman, D. M., Cheley, S., Kuismanen, E., Finn, L. A. and Yamawaki-Kataoka, Y. (1986). Nonmuscle and muscle tropomyosin isoforms are expressed from a single gene by alternative RNA splicing and polyadenylation. Mol. Cell Biol. 6, 3582-3595.

Hentges, K., Thompson, K. and Peterson, A. (1999). The flat-top gene is required for the expansion and regionalization of the telencephalic primordium. Development. 126(8), 1601-1609.

Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S. (1998). SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins. Bioinformatics. 14, 378-379.

Hogan, B., Constantini, F. and Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo. A Laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Howard, T. E., Shai, S. Y., Langford, K. G., Martin, B. M. and Bernstein, K. E. (1990). Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. Mol Cell Biol. 10(8), 4294-4302.

Husain, I., Tomkinson, A. E., Burkhart, W. A., Moyer, M. B., Ramos, W., Mackey, Z. B., Besterman, J. M. and Chen J. (1995) Purification and characterization of DNA ligase III from bovine testes. Homology with DNA ligase II and vaccinia DNA ligase. J Biol Chem. 270, 9683-9690.

Ikeya, M., Lee, S. M. K., Johnson, J. E., McMahon, A. P. and Takada, S. (1997). Wnt signaling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. Nature 389, 966-970.

Jiang, Y. and Evans, T. (1996). The Xenopus GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac

specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. Dev. Biol. 174, 258-270.

Johnson, P. A., Bunick, D. and Hecht, N. B. (1991). Protein binding regions in the mouse and rat protamine-2 genes. Biol. Reprod. 44, 127-134.

Johnson, R. L., Laufer, L., Riddle, R. D. and Tabin, C. (1994). Ectopic expresseion of sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. Cell. 79, 1165-1173.

Jones, N. C., Rigby, P. W. J. and Ziff, E. B. (1988). *Trans*-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies of DNA tumor viruses. Genes. Dev. 2, 267-281.

Joyner, A. (1993). Gene Targeting: A practical Approach. Oxford University Press, New York.

Kashiwabara, S., Baba, T., Takada, M., Watanabe, K., Yano, Y. and Arai, Y. (1990). Primary structure of mouse proacrosin deduced from the cDNA sequence and its gene expression during spermatogenesis. J Biochem 108(5), 785-791.

Kaufmann, T. C., Seeger, M. A. and Olsen, G. (1990). Molecular and genetic organization of the Antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster. Adv. Genet. 27, 309-362.

Keime, S. (1993). Die 5´-nichttranslatierte Region des Proakrosingens der Ratte: DNA-Protein-Interaktionen und partielle cDNA Klone für zwei potentielle DNA-bindende Proteine. Dissertation, Universität Göttingen.

Kelley, C., Blumberg, H., Zon, L. I. and Evans, T. (1993). GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. Development. 118, 817-827.

Kihara, D., Shimizu, T. and Kanehisa, M. (1998). Prediction of Membrane Proteins Based on Classification of Transmembrane Segments. Protein Engineering. 11, 961-970.

Kim, Y., Kremling, H., Tessmann, D. and Engel, W. (1992). Nucleotide sequence and exon-

intron structure of the bovine transition protein 1 gene. DNA Seq. 3(2), 123-125.

Kleene, K. C., Distel, R. J. and Hecht, N. B. (1984). Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermatogenesis in the mouse. Dev. Biol. 105, 71-79.

Kleene, K. C. and Flynn, J. F. (1987). Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. J. Biol. Chem. 262, 17272-17277.

Kleene, K. C. (1989). Poly(A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis in the mouse. Development. 106, 367-373.

Kleene, K. C. (1993). Multiple controls over the efficiency of translation of the mRNAs encoding transition proteins, protamines, and the mitochondrial capsule selenoprotein in late spermatids in mice. Dev Biol. 159(2), 720-731.

Kogan, S. C., Doherty, M. and Gitschier, J. (1987). An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. N. Engl. J. Med. 317, 985-990.

Koshimizu, U., Watanabe, D., Tajima, Y and Nishimune, Y. (1992). Effects of W (c-kit) gene mutation on gametogenesis in male mice: agametic tubular segments in W^f/W^f testes. Development. 114, 861-867.

Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. Nucleic Acids Res. 12, 857-872.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: An update. J. Cell Biol. 108, 229-241.

Krauss, S., Concordet, J. P. and Ingham, P. W. (1993). A functionally conserved homolog of the Drosophila segment polarity gene hedgehog is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. Cell. 75, 1431-1444.

Kremling, H., Luerssen, H., Adham, I. M., Klemm, U., Tsaousidou, S. and Engel, W. (1989). Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and its evolutionary conservation in mammals. Differentiation. 40(3), 184-190.

Kremling, H., Keime, S., Wilhelm, K., Adham, I. M., Hameister, H. and Engel, W. (1991). Mouse proacrosin gene: nucleotide sequence, diploid expression, and chromosomal localization. Genomics. 11(4), 828-834.

Laird, P. W., Zijderwald, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. and Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. Nuc. Acids Res. 19, 4293.

Laverriere, A. C., NacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R. E., Burch, J. B. E. and Evans, T. (1994). GATA-4/5/6: A subfamily of three transcription factors expressed in developing heart and gut. J. Biol. Chem. 269, 23177-23184.

Le Douarin, N. M. and Kalcheim, C. (1999). The Neural Crest. New York. Cambridg Univ. Press. Second Edition.

Lee, K. J. and Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. Ann. Rev. Neurosci. 22, 261-294.

Lewin, B. (1990). Gene IV. Cell Press, Cambridge.

Locker, J. and Buzard, G. (1990). A dictionary of transcription control sequences. DNA Seq. 1, 3-11.

Luerssen, H., Maier, W. M., Hoyer-Fender, S. and Engel, W. (1989). The nucleotide sequence of rat transition protein 2 (TP2) cDNA. Nucleic Acids Res. 17, 3585.

Maity, S. N. and de Crombrugghe, B. (1998). Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. Trends Biochem Sci. 23, 174-178.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour, New York, USA.

Maniatis, T., Goodbourn, S. and Fisher, J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue specific gene expression. Science 236, 1237-1245.

Margolis, R. L., McInnis, M. G., Rosenblatt, A. and Ross, C. A. (1999). Trinucleotide repeat expansion and neuropsychiatric disease. Arch Gen Psychiatry. 56, 1019-1031.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 7634-7638.

Medford, R. M., Nguyen, H. T., Destree, A. T., Summers, E. and Nadal-Ginard, B. (1984). A novel mechanism of alternative RNA splicing for the developmentally regulated generation of troponin T isoforms from a single gene. Cell. 38, 409-421.

Melton, D. W. (1994). Gene targeting in the mouse.Bioessays 16(9), 633-638.

Mettus, R. V., Litvin, J., Wali, A., Toscani, A. Latham, K., Hatton, K. and Reddy, E. P. (1994). Murine A-myb: evidence for differential splicing and tissue-specific expression. Oncogene. 9, 3077-3086.

Mitchell, P. J. and Tijian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science 245, 371-378.

Moens, C. B., Auerbach, A. B., Conlon, R. A., Joyner, A. L. and Rossant, J. (1992). A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. Genes Dev. 6, 691-704.

Moutier, R. (1976). New mutations causing sterility restricted to the male in rats and mice. In: The Laboratory Animal in the Study of Reproduction (Antikatziedes, T. H., Erichsen, S. and Spiegel, A. Eds.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 115-117.

Müller, F., Chang, B. E. Albert, S., Fischer, N., Tora, L. and Strähle, U. (1999). Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehogin floor plate and notochord.

Development. 126, 2103-2116.

Murray, N. E., Brammer, W. J. and Murray, K. (1977). Lambda phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol. Gen. Genet. 150, 53-56.

Nakagawa, S. and Takeichi, M. (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. Development. 121, 1321-1332.

Nakai, K. and Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. Trends Biochem Sci. 24, 34-36.

Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y. and Orkin, S. H. (1999) Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. Dev Biol. 210, 305-321.

Newman, C. S., and Krieg, P. A. (1998). *Tinman*-related genes expressed during heart development in *Xenopus*. Dev. Genet. 22, 230-238.

Nieto, M. A., Sargent, M. G., Wilkinson, D. G. and Cooke, J. (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by slug, a zinc finger gene. Science. 264, 835-839.

Norander, J. Kempe, T., and Messing, J. (1983). Constuction of improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis. Gene 26, 101-161.

Oppi, C., Shore, S. K. and Reddy, E. P. (1987). Nucleotide sequence of testis-derived c-abl cDNAs: implications for testis-specific transcription and abl oncogene activation. Proc Natl Acad Sci. 84(23), 8200-8204.

Oyen. O., Myklebust, F., Scott, J. D., Cadd, G. G., McKnigt, G. S., Hansson, V. and Jahnsen, T. (1990). Subunits of cAMP proteinkinase show differential and distinct expression patterns during germ cell line differentiation: Alternative polyadenylation in germ cells gives rise to unique smaller-sized mRNA species. Biol. Reprod. 43, 46-54.

Pabst, O., Herbrand, H., Takuma, N. and Arnold, H. H. (2000). Nkx2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. Dev Genes Evol. 210, 47-50.

Pryor, I. L., Xu, W. and Hamilton, D. W. (1992). Immunodetection after complete destaning of coomassie blue-stained proteins on Immobilon-PVDF. Analy. Bioch. 202, 100-104.

Ptashne, M. and Gann, A. A. F. (1990). Activators and targets. Nature 346, 329-331.

Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector – New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Research. 23, 4878-4884.

Qvist, H., Sjostrom, H. and Noren, O. (1998). The TATA-less, GC-rich porcine dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) promoter shows bidirectional activity. Biol Chem. 379, 75-81

Rapp, G., Klaudiny, J., Hagendorff, G., Luck, M. R. and Scheit, K. H. (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, 1071-1075.

Robertson, E., Bradley, A. Kuehn, M. and Evans, M. (1986). Germline transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vectors. Nature. 323, 445-448.

Rubenstein, J. L. R. and Shimamura, K. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. Ann. Rev. Neurosci. 21, 445-477.

Russell, L. D. Barriers to Entry of Substances into Seminiferous Tubules: Compatibility of Morphological and Physiological Evidence. In „ Banbury Report 34: Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis“, Hrsg. v. Allen, J. W., Bridges, B. A., Lyon, M. F., Moses M. J. and Russell L. D.; Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1990, pp. 3-17.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis., K. B., Horn., G. T. Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1885). Enzymatic Amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230, 1350-1354.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). In "Molecular cloning: A Laboratory manual". 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.

Schäfer, M., Nayernia, K., Engel, W. and Schäfer, U. (1995). Translational control in spermatogenesis. Devel. Biol. 172, 344-352.

Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R. and Mitchell, P. J. (1996). Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. Nature. 381, 235-238.

Schlüter, G., Kremling, H. and Engel, W. (1992). The gene for human transition protein 2: nucleotide sequence, assignment to the protamine gene cluster, and evidence for its low expression. Genomics. 14(2), 377-383.

Shamsadin, A. R. (1995). Zur Struktur eines Gens, dessen Produkt an der Regulation des Proakrosingens beteiligt ist. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

Sheets, M. D., Ogg, S. C. and Wickens, M. P. (1990). point mutations in AAUAAA and the poly(A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. Nucleic Acids Res. 18, 5799-5805.

Shen, W.-F., Detmer, K., Simonitch-Eason, T. A., Lawrence, H. J. and Largman, C. (1991). Alternative splicing of the HOX 2.2 homeobox gene in human hematopoietic cells and murine embryonic and adult tissues. Nucleic Acids Res. 19, 539-545.

Sidman, R. L., Dickie, M. M. and Apple, S. H. (1964). Mutant mice (quaking and jimpy) with deficient myelination in the central nervous system. Science. 144, 309-312.

Smith, C. W. J., Patton, J. G. and Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. Annu. Rev. Genet. 23, 527-577.

Sorrentino, V., Giorgi, M., Geremia, R., Besmer, P. and Rossi, P. (1991). Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. Oncogene. 6, 149-151.

Southern, E. M. (1975). Determination of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Stern, L., Gold, B. and Hecht, N. B. (1983). Gene expression during mammalian spermatogenesis. I. Evidence for stage-specific synthesis of polypeptides *in vivo*. Biol Reprod. 28, 483-496.

Tanaka, M., Kasahara, H., Bartunkova, S., Schinke, M., Komuro, I., Inagaki, H., Lee, Y., Lyons, G. E. and Izumo, S. (1998). Vertebrate homologs of *tinman* and *bagpipe*: Roles of the homeobox genes in cardiovascular development. Dev. Genet. 22, 239-249.

Tang. W and Tseng, H. (1999). A GC-rich sequence within the 5'-untranslated region of human basonuclin mRNA inhibits its translation. Gene. 237, 35-44.

Thomas, K. R. and Cappechi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. Cell. 51, 503-512.

Tonissen, K. F., Drysdale, T. A., Lints, T., Harvey, R. P. and Krieg, P. A. (1994). Xnkx-2.5, a *Xenopus* gene related to Nkx-2.5 and *tinman*: Evidence for a conserved role in cardiac development. Dev. Biol. 162, 325-328.

Tremblay, P., Kessel, M. and Gruss, P. (1995). A transgenic neuroanatomical marker identifies cranial neural crest deficiencies associated with the Pax3 mutant splotch. Dev. Biol. 171, 317-329.

Truett, G. E., Jacob, H. J., Miller, J., Drouin, N., Smoller, J. W., Lander, E. S. and Leibel R. L. (1995). Genetic map of rat chromosome 5 including the fatty (fa) locus. Mammal Genome. 6, 25-30.

Tsai, F.-Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W., and Orkin, S. H. (1994). An early hematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. Nature 371, 221-226.

Tybulewicz, V. L. J., Crawford. C. E., Jackson, P. K. Bronson, R. T. and Mulligan, R. C. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. Cell. 65, 1153-1163.

Wilkinson, D. and Nieto, A. M. (1993). In „Guide to techniques in mouse development“, Academic Press, New York, pp 361-372.

Wilson, K. and Ashworth, A. (1987). Mammalian spermatogenic gene expression. Trends in Genet. 3, 351-355.

Wirth, T., Staudt, L. and Baltimore, D. (1987). An octamer oligonucleotide upstream of TATA-motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. Nature 329, 174-178.

Yamada, J., Kuramoto, T. and Serikawa, T. (1994). A rat genetic linkage map and comparative maps for mouse or human homologous rat genes. Mamm. Genome. 5, 63-83.

Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T. and Nishikawa, S. (1991). Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. Development. 113, 689-699.

Young, R. A. and Davis, R. W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194-1198.

Zhang, J., Hagopian-Donaldson, S., Serbedzija, G., Elsemore, J., Plehn-Dujowich, D., McMahon, A. P., Flavell, R. A. and Williams, T. (1996). Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. Nature. 381, 238-241.

VII. ANHANG

Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

HA7	CTT AGA CCA GAA ATC CTC CTC
HA15	GGA GCT TTG AAA GTT CTG GAG
HA25	GTG TTC ACC TCC AAA CTG TGA TGA
HA42R	CAA ATG GAA AGA GCC ACG CGG CCG
HA71	ACC ACA TCT CCA GGG TCT CAC TGC
HA723P2	ATG CCG AAG TGA AGG CGC TGC AAT
HO1	AGG AGA TGC TAA GTT GTG TGG
HO2	AGG GAC AGG GAG GAG ATG AGG
HO3	GCA CAG CTT GAG TAT GAT ACA GC
HO4	GAG GAA ATC GTA GGC TGT TCG
HO5	GTA TCT GTG TGT TTG GCC
HO6	GTG GCT GGG ACA CAT TGT GTC
5H1	GCA TTT TAA GGG GTA TGG TTG G
5H2	GGA AGG GCT GAT TGG TTT TAG
HO7	CGC GCT CAG CTG CTG TTC
HO8	GGA GGG ACC CCG GCC CTC
HO9	GCC TTC ACC TTC GGC ATC
HO10	TCC TCT CTA CGG TTT GTG G
HO11	GAG ACA CAG AGC TGA TAG
HO12	CTT CTT CCC ACT TTC CTT TGC
H5F1	CTT ACC ATT CAG CTC CAG TTG
H5R1	CTG AGT GCG GCA CTT CCT TGA
H5R2	GTC TAA TCA CAA ATG GAG GCT
H3F1	CAG ATG TTC ACT GAG TAA CAG
H3R1	CAT TCA TGG TCT CTC CTA GTG
HE11R1	CAC ATA AAT GTC TTG CAT GAG
HE12F1	GAG AGA GAC CCA GAG AGA GAA
HE12R1	CTA TAT TCA GGG TCA CTG TCA

1H5R1	CGA ATA GGC ATT GGC TTC GGG
5H3	CAT CCA CCT GTG TTC AGG GAC
3H1	GCA CCA AGC TTA AAT CTT AGG
3HR	CAG GGA AAT CAA GAC ACT TTT C
3H5f1	GAC CAA CGT GGG AGA AGG
3H5r1	CAT CAG GTC ATT TTC TTC
Neo3	CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG AG
E1-1FL	(FL)CT CTT CCT TCC TCT TCC TCT C
E1-2FL	(FL)GA CCT TAC TTC TAC TCT TTG G
E3-1FL	(FL)CT TGT CTT TCA GCA CCA CTC C
E3-2FL	(FL)GT GGC TGG GAC ACA TTG TGT C
E8-1FL	(Fl)GA AAT CGT AGG CTG TTC GTA G
E8-2FL	(FL)CT TCG GAA AGC TCA CAC ATC C
Hpe1	(FL)CC CAG CTA CAA AAT TCC TCT TCT C
Hpe2	(FL)CC TGC TCC TTT CTT TCC CAG CTA C
Hpe3	(FL)CG AGG GAC AGG GAG GAG ATG AGG T
Hpe4	(FL)AA GAC GCG GGC CGG GAC GAG GGA C

Abkürzungen

A	Purinbase Adenin; Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5-triphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
C	Pyrimidinbase Cytosin
ca.	circa
Ci	Curie
cpm	"counts per minute"(Zählrate)

Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxynucleotidtriphosphate
DEAE	Diethylaminoethan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethlsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/sec^2); Gramm
G	Purinbase Guanin
GET	Glukose EDTA Tris
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
hsv-tk	Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase
IPTG	Isopropyl-ß-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LMP-Agarose	low melting point-Agarose
Lsg.	Lösung
m	milli
M	Molar
mCi	Millicurie
MG	Molekulargewicht
µ	mikro

mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	nano
N	Normal
OD	Optische Dichte
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	"Polymerase chain reaction"
PEG	Polyethylenglycoll
pfu	"plaque forming unit"
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAsin	Ribonukleaseinhibitor
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard saline citrat
sec	Sekunde
T	Pyrimidinbase Thymidin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tfm	testikuläre Feminisierung
TNP	Transitionsprotein
Tris	Tris- (hydroxymethyl) aminomethan
t-RNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-ß-Galactosid
z. B.	zum Beispiel

Symbole für Aminosäuren

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

Danksagung

Als erstes danke ich Herrn Professor Dr. W. Engel für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und seiner ständigen Bereitschaft zur ideellen und finanziellen Unterstützung. Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Engel für die mühsame Durchsicht des Manuskriptes danken.

Besonders danke ich Dr. I. M. Adham für die hilfreichen Tips und anregenden Diskussionen, stete Unterstüzung und kompetente Betreuung dieser Arbeit.

Bei Rahman Shamsadin, Mahmoud Sallam und Radu Niculai möchte ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft herzlich bedanken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Dem Graduiertenkolleg „Molekularegenetik der Entwicklung“ möchte ich für die finanzielle Unterstützng danken.

Abschließend möchte ich meiner Frau, meinem Sohn und meinen Eltern danken, die mir das Studium der Biologie in Deutschland ermöglichten und mich auch während dieser Arbeit bedingungslos und mannigfaltig unterstützt haben.

º Ã Ç Ñ¾ Æ À »¹ Ã ½ ú» Ç À ¸ ÎÁ ö Ý Á öÀ Ì Ø îÁ Ö Å¾ Æ Á ë Í¾ î Ó Ì ²Ã µ ø ¸ ¸¹ ø° » ç ÍÇ Ô ² ¸ Ð ç¿ µ À »µ å ³ Ï Ù

Á À Ç Ô À ¸ Û µ³ ª ¦± â Ú ÔÇ Ï Â» Ç Q Ï Â¾ Æ »À ± Ì Í» ý í úÀ Ã À Ç½ A Ç Ã » ´ Ã¿ Â À ¸ Îº ¿ ©Á Ö Â» Ç Q Ï Â¾ Æ é° ¤ ® ¦ Ô° » ç Í± â Ï »À Q Ñ Ù

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Oh
Vorname:	Changkyu
Geburtsdatum:	23. Sep. 1967
Geburtsort:	Honsung, Korea
Familienstand:	verheiratet seit April 1992, ein Sohn
Staatsangehörigkeit:	koreanisch
03. 1995 - 09. 1996	Zivildienst anstelle des Wehrdienstes

Ausbildungsdaten:

03. 1973 - 02. 1979	Besuch der Grundschule, Korea
03. 1979 - 02. 1985	Besuch der Hauptschule (Gymnasium), Korea
03. 1985 - 02. 1989	Studium (Biologie) an der Universität Yonsei, Korea
10. 1989 - 09. 1990	Deutschkurs für ausländische Studenten an der Georg-August-Universität in Göttingen
11. 1990 - 10. 1994	Hauptdiplom (Biologie) an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen (Hauptfach: Biochemie)
10. 1993 - 10. 1994	Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Dr. E. Schweizer am Institut für Biochemie, Erlangen
ab Dezember. 1996	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. W. Engel im Rahmen des Graduiertenkollegs “Molekulare Genetik der Entwicklung”