

**Promotoranalyse und Expressionsstudien
der murinen und humanen *fork head* homologen
Gene *Foxq1* und *FOXQ1***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Bastian Pasche

aus Kassel

Göttingen 2001

D7

Referent: Prof. Dr. W. Engel

Korreferent: Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 30.1.2002

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Fork head</i> / Winged Helix Transkriptionsfaktoren	1
1.2 Das <i>Foxq1</i> -Gen der Maus	4
2 Material und Methoden	7
2.1 Chemikalien	7
2.2 Gebrauchswaren	7
2.3 Sterilisation	7
2.4 Vektoren	8
2.5 Bakterien und Hefen	8
2.6 cDNA Bibliothek	8
2.7 Expressionsarray	9
2.8 Zelllinien	9
2.9 Enzyme	10
2.10 DNA-/RNA-Größenmarker	10
2.11 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	11
2.12 Oligonukleotide	11
2.13 Lösungen, Puffer und Medien	13
2.13.1 Lösungen für die Arbeiten mit Bakterien	13
2.13.2 Lösungen für die Aufreinigung und Analyse von DNA	13
2.13.3 Lösungen für die Aufreinigung und Analyse von RNA	14
2.13.4 Lösungen für die Generierung von Deletionsklonen	15
2.13.5 Lösungen für die Hybridisierung von Nukleinsäuren	15
2.13.6 Lösungen für die <i>in situ</i> Hybridisierung	16
2.13.7 Medien für die Zellkultur	17
2.13.8 Puffer für den Luciferase-Assay	18
2.13.9 Puffer für die Kernproteinextraktion und die DNA/Protein- bindung	19
2.13.10 Puffer und Medien für das Arbeiten mit Hefe	20

2.14	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	21
2.14.1	Isolierung genomischer DNA aus Gewebe	21
2.14.2	Plasmidpräparation aus Bakterien	21
2.14.3	Plasmidpräparation aus Hefe	22
2.14.4	Präparation von Gesamt-RNA	23
2.15	Klonierung von DNA-Fragmenten	23
2.15.1	Restriktion von DNA	23
2.15.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	23
2.15.3	Ligation	24
2.15.4	Herstellung kompetenter Bakterien	24
2.15.4.1	Herstellung hitzeschock-kompetenter Bakterien	24
2.15.4.2	Herstellung elektro-kompetenter Bakterien	24
2.15.5	Transformation von Bakterien	25
2.15.5.1	Transformation hitzeschock-kompetenter Bakterien	25
2.15.5.2	Transformation elektro-kompetenter Bakterien	25
2.16	Gelelektrophoretische Methoden	25
2.16.1	Auftrennung von DNA über Agarosegele	25
2.16.2	Native Polyacrylamidgele	26
2.16.3	Auftrennung von RNA über Formaldehyd-Agarosegele	26
2.16.4	Fragmentisolierung	26
2.17	Markierungen	26
2.17.1	Random prime Markierung	26
2.17.2	Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden	27
2.17.3	<i>in vitro</i> Transkription	27
2.18	Transfertechniken und Hybridisierungen	28
2.18.1	Southern Blot	28
2.18.2	Northern Blot	28
2.18.3	Hybridisierung radioaktiv markierter DNA an Nukleinsäuren	28
2.19	Polymerase-Ketten-Reaktion	29
2.19.1	Standard-Polymerase-Ketten-Reaktion	29
2.19.2	Nichtradioaktive Sequenzierung	29
2.19.3	Ortsspezifische Mutagenese	30

2.20	<i>in situ</i> Hybridisierung an Magenschnitten	31
2.20.1	Fixierung des Gewebes	31
2.20.2	Vorbehandlung der Objektträger	31
2.20.3	Herstellung der Paraffinschnitte	32
2.20.4	Hybridisierung und Detektion	32
2.21	Zellkultur	33
2.21.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	33
2.21.2	Zellkultivierung	33
2.21.3	Kultivierung embryonaler Stammzellen	34
2.21.4	Mitomycinbehandlung	34
2.21.5	Transfektion eukaryontischer Zellen	34
2.21.5.1	Transfektion mit Effectine	34
2.21.5.2	Transfektion durch Elektroporation	35
2.21.6	Gewinnung von ES-Einzelklonen	35
2.21.7	DNA-Präparation aus Einzelklonen	35
2.22	Reporter-Gen-Assays	36
2.22.1	Zellernte	36
2.22.2	Messung der Luciferaseaktivität	37
2.22.3	Messung der Luciferaseaktivität mit dem Dual Luciferase Assay	37
2.22.4	Messung der β -Galaktosidaseaktivität	37
2.23	Gel Retardation Assay	37
2.23.1	Isolierung von Kernproteinen	38
2.23.2	Bradford Assay	38
2.23.3	Protein / DNA-Bindungsreaktion	39
2.23.4	Gelelektrophoretische Auftrennung der Protein/DNA-Komplexe	39
2.24	Arbeiten mit Hefe	40
2.24.1	Das One Hybrid System	40
2.24.2	Hefetransformation	41
2.24.3	Anlegen von Stocks	42
2.24.4	3-Aminotriazoltest	42
2.24.5	Vorbereitung der Maus-Nieren-cDNA-Bibliothek zur Nutzung im One Hybrid System	42

3	Ergebnisse	44
3.1	Homologie des <i>mFoxq1</i> -Gens	44
3.1.1	Sequenzierung des <i>rHFH-1</i> -Gens der Ratte	45
3.2	Kernlokalisierung von mFoxq1	47
3.3	Promotoranalyse	49
3.3.1	Sequenzierung des humanen <i>hFOXQ1</i> -Promotors	49
3.3.2	Luciferase-Assay	52
3.3.3	Gel Retardation Assay	56
3.3.4	Expression von Sp-Faktoren in <i>Drosophila</i> Schneider Zellen	61
3.3.4.1	Gel Retardation Assay mit Kernproteinen aus SL2-Zellen	61
3.3.4.2	Reportergenassays unter Verwendung von Sp- Expressionsvektoren	63
3.3.5	Hefe One Hybrid System	66
3.4	Expression von <i>hFOXQ1</i>	67
3.4.1	Vergleich des Expressionsmusters von <i>mFoxq1</i> und <i>hFOXQ1</i>	68
3.4.2	Überexpression in Karzinomen	70
3.4.3	Zellspezifische Expression: <i>in situ</i> Hybridisierung	71
3.5	Generierung von <i>mFoxq1</i> ^{-/-} -Mäusen	76
3.5.1	Konstruktion des Knock-out Vektors	76
3.5.2	Herstellung rekombinanter ES-Zellen	77
4	Diskussion	80
4.1	Struktur des <i>mFoxq1</i> -Gens	80
4.2	Promotoranalyse	83
4.3	Expression von <i>hFOXQ1</i> und <i>mFoxq1</i>	89
4.4	Generierung von <i>Foxq1</i> ^{-/-} -Mäusen	92
4.5	Ausblick	96
5	Zusammenfassung	97
6	Literatur	99

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-Propansulfonat
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cM	Centimorgan
cpm	Zerfälle pro Minute
D	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid
U	Enzymeinheit (unit)
kb	Kilobase
LIF	Leukämie inhibierender Faktor

min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten (messenger-)Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OT	Objekträger
PAA	Polyacrylamid
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	Piperazin-1,4-bis[2-Ethansulfonsäure]
Poly[dIdC]	Polydeoxyinosindeoxycytidinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

Aminosäuren

A	Ala	Alanin
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

1 EINLEITUNG

Die Entwicklung eines Organismus mit seinen vielfältigen Organen und unterschiedlichen Geweben aus einer einzelnen befruchteten Eizelle ist ein komplexer Vorgang. Dabei müssen die Gene in einem komplizierten Netzwerk reguliert werden. Diese Regulation geschieht zu einem großen Teil auf der Ebene der Transkription, dabei spielen die Transkriptionsfaktoren eine große Rolle. Diese trans-agierenden Proteine interagieren mit spezifischen cis-ständigen Promotorelementen und können so die Transkription der Gene aktivieren oder reprimieren. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten oder konservierter Sequenzen werden die Transkriptionsfaktoren in verschiedene Familien eingeteilt. Dazu gehören beispielsweise die Helix-Turn-Helix-Proteine, die Helix-Loop-Helix-Proteine, die Zink-Finger-Proteine und die Leucin-Zipper-Proteine.

1.1 *Fork head* / Winged Helix Transkriptionsfaktoren

Im Jahr 1989 wurden erstmals Transkriptionsfaktoren beschrieben, die keiner der bekannten Familien zugeordnet werden konnten. Das von Weigel et al. (1989) isolierte *Drosophila*-Gen *fork head* ist ein regionenspezifisch exprimiertes Gen, das für die korrekte Ausbildung der Terminalstrukturen des *Drosophila*-Embryos verantwortlich ist. Mutationen des *fork head* Gens führen zur Transformation von Darmgewebe zu ektopischen Kopfstrukturen. Aufgrund der Lokalisation des *fork head* Proteins im Zellkern wurde angenommen, dass es sich bei diesem Protein um einen Transkriptionsfaktor handelt. Wenig später wurde bei Nagetieren das *HNF-3 α* -Gen beschrieben, dessen Genprodukt strukturelle Ähnlichkeiten zum *fork head* Protein aufweist (Costa et al., 1989; Lai et al., 1990). Ein Sequenzbereich von 110 Aminosäuren zeigte eine starke Homologie zwischen *HNF-3 α* und dem *Drosophila* *fork head* Protein, dieser Bereich stellt die DNA-Bindungsdomäne dar.

Die genaue Struktur dieser Bindungsdomäne wurde 1993 von Clark et al. (1993) mit Hilfe von Kokristallisationsexperimenten mit *HNF-3 γ* aufgeklärt. Die hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne ist eine Modifikation des Helix-Turn-Helix-Motivs und besteht aus drei α -Helices, drei β -Faltblättern sowie zwei

verbindenden Flügeln. Diese Flügel, bestehend aus wenigen Aminosäuren, flankieren die Kernstruktur aus α -Helices und β -Faltblättern. Aufgrund dieser Form, die an die Flügel eines Schmetterlings erinnert, ist auch der Name Winged Helix Proteine entstanden (Abb. 1). Die Abfolge der einzelnen Elemente der DNA-Bindungsdomäne ist wie folgt: NH_2 – α -Helix 1 – β -Faltblatt 1 – α -Helix 2 – α -Helix 3 – β -Faltblatt 2 – Flügel 1 – β -Faltblatt 3 – Flügel 2 – COOH . Beim Kontakt mit der DNA liegt α -Helix 3 in der großen Furche der DNA-Doppelhelix und ist hauptsächlich an der DNA-Bindung beteiligt. Winged Helix Proteine binden die DNA als Monomer (Brennan, 1993).

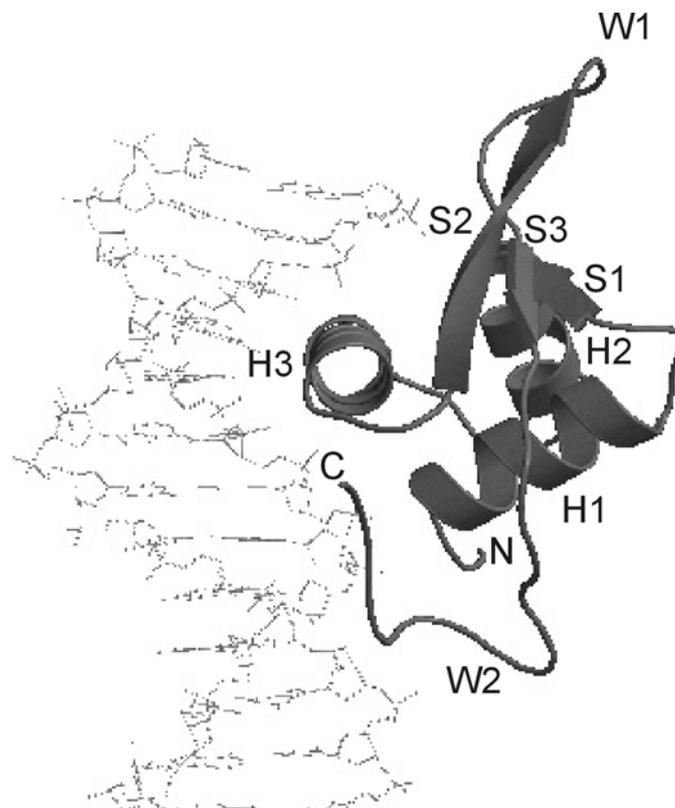


Abb. 1 : Schema des Winged Helix Proteins HNF-3 γ

Aus: Clark et al. (1993). Im Schema des HNF-3 γ Proteins sind deutlich die beiden Flügel (W1 und W2) zu erkennen. Zwischen den drei α -Helices (H1 bis H3) sind die 3 β -Faltblätter (S1 bis S3) angeordnet. Für den Kontakt mit der DNA ist vor allem Helix 3 verantwortlich.

Um die Bindungsdomäne zu stabilisieren, befinden sich am Übergang der dritten Helix zum zweiten Faltblatt vier Aminosäuren, die ein Magnesiumion komplexieren. Wird in diesem LeuSerNnnAsnNnnNnnPhe-Motiv (mit Nnn als beliebiger Aminosäure) das Leucin (Leu) gegen ein weiteres Phenylalanin (Phe) ersetzt, so geht die Bindungsfähigkeit des Proteins verloren (Häcker et al., 1995).

Außer der DNA-Bindungsdomäne finden sich in vielen Winged Helix Proteinen zwei weitere Domänen, die reich an sauren Aminosäuren und/oder Serinen oder Glycinen sind und Transkriptionsaktivierungsdomänen darstellen (Hellqvist et al., 1996; Pani et al., 1992). Wurden die Winged Helix Proteine zunächst ausschließlich als Aktivatoren beschrieben, so wurden mittlerweile aber auch Winged Helix Proteine beschrieben, die als Repressoren wirken (Hromas et al., 1999; Schubert et al., 2001; Yang et al., 2000).

Inzwischen wurden über 100 *fork head* Gene in den unterschiedlichsten Spezies gefunden, z. B. in Hefe, in Nematoden, im Zebrafisch, im Krallenfrosch, im Huhn, in der Maus und auch im Menschen. Um die Bezeichnung der Gene zumindest bei den Chordaten zu vereinheitlichen, werden die *fork head* Gene seit 2000 (Kaestner et al., 2000) als *Fox*-Gene („*fork head box*“) bezeichnet und entsprechend ihrer Homologie in der DNA-bindenden Domäne in Subklassen eingeteilt.

Die Funktionen einzelner *Fox* Gene sind inzwischen untersucht worden und es zeigt sich, dass *Fox* Gene bei vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. So konnten Ang und Rossant (1994) und Winnier et al. (1997) zeigen, dass *Fox* Gene für die Embryonalentwicklung der Maus wichtig sind. Auch an der Regulation des Zellzyklus (Medema et al., 2000; Zhu et al., 2000), an der Regulation der gewebespezifischen Genexpression (Costa et al., 1989; Hellqvist et al., 1996) und an der Tumorentstehung (Kastury et al., 1994; Li und Herskowitz, 1993) sind *Fox* Gene beteiligt.

Inzwischen werden für verschiedene menschliche Erbkrankheiten Mutationen in *Fox* Genen verantwortlich gemacht. So findet man bei Patienten mit Glaukomen häufig Mutationen des *FOXC1*-Gens (Mears et al., 1998; Nishimura et al., 1998), dem Lymphödem-Distichiasis-Syndrom liegen Mutationen des *FOXC2*-

Gens zugrunde (Bell et al., 2001; Fang et al., 2000; Finegold et al., 2001) und Mutationen im *FOXL1*-Gen führen zum Blepharophimosis/Ptoisis/Epicathus inversus Syndrom (Crisponi et al., 2001). Bei Patienten mit schweren Sprech- und Sprachstörungen wurden Mutationen im *FOXP2*-Gen gefunden (Lai et al., 2001).

Über die Regulation der zellspezifischen Expression der *Fox*-Gene ist bislang wenig bekannt. Promotorstudien sind bislang nur für die *fork head* Gene *HNF-3 α* (*Foxa1*; Peterson et al., 1997), *HNF-3 β* (*Foxa2*; Nishizaki et al., 2001; Samadani et al., 1995), *XFD-1'* (*FoxA4b*; Friedle et al., 1998) und *FREAC-4* (*FOXD1*; Cederberg et al., 1999) beschrieben worden. Dabei wurden neben ubiquitär vorkommenden Promotorelementen auch Bindungsstellen für zellspezifisch exprimierte Transkriptionsfaktoren ermittelt. Im *Foxa1*-Promotor wurde auch eine autoregulative Region gefunden. Für das *Foxa2*-Gen wurden neben dem Promotor noch drei Enhancersequenzen identifiziert, die die Transkription von *Foxa2* positiv und negativ regulieren können (Sasaki und Hogan, 1996). Diese Sequenzen sind hochkonserviert und sind auch z. B. bei Maus, Huhn und Fisch (Nishizaki et al., 2001) zu finden.

1.2 Das *Foxq1*-Gen der Maus

Das *Foxq1*^{*}-Gen wurde von Frank und Zoll (1998) aus einer Nieren-cDNA-Bibliothek der Maus isoliert. Das 2,7 kb umfassende *mFoxq1* Transkript wurde in allen getesteten Embryonalstadien (ab Tag 10,5 p.c.) und in der adulten Maus detektiert. Die stärkste Expression findet man in Magen und Niere, schwache Expression wurde im adulten Gehirn, in Leber, Lunge, Testis und Darm gefunden. Dagegen beschreiben Hong et al. (2001) eine starke *mFoxq1* Expression in der Leber und nur eine schwache in der Niere.

Durch *in situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten der Niere konnte eine zellspezifische Expression von *mFoxq1* in der äußeren Medulla, in den

* Zur besseren Unterscheidung der homologen Gene wird dem *Foxq1*-Gen bzw. Protein im Folgenden ein „m“ für „Maus“ vorangestellt, entsprechendes gilt für die Gene/Proteine von Mensch (h) und Ratte (r).

Markstrahlen und im Transitionsepithel des Nierenbeckens nachgewiesen werden (Frank und Zoll, 1998). Das *mFoxq1*-Gen ist auf Maus-Chromosom 13, etwa 16,8 cM vom Zentromer entfernt, lokalisiert (Frank und Zoll, 1998; Hong et al., 1999). Das in unserer Arbeitsgruppe isolierte *hFOXQ1*-Gen des Menschen wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung auf die syntäne Region auf Chromosom 6p23-25 gemappt (Bieller et al., 2001).

Über die Regulation des *mFoxq1*-Gens ist bisher wenig bekannt, Computeranalysen zeigen jedoch, dass innerhalb der Promotorregion keine TATA-Box liegt.

Das *mFoxq1* Protein umfasst 400 Aminosäuren und beinhaltet neben der 110 Aminosäuren umfassenden DNA-Bindungsdomäne (*fork head* Domäne) zwei Regionen, die reich an Serinen, Glycinen und sauren Aminosäuren sind. Diese beiden Regionen flankieren die DNA-Bindungsdomäne und sind auch im humanen *hFOXQ1* Protein zu finden. Die *fork head* Domäne des menschlichen und des murinen Proteins ist identisch und findet sich auch im *rHFH-1* Protein der Ratte wieder (Clevidence et al., 1993). Dieses 439 Aminosäuren umfassende *rHFH-1* Protein zeigt jedoch ein verkürztes N-terminales Ende und große Unterschiede im C-terminalen Bereich des Proteins im Vergleich zu den Proteinen von Mensch und Maus. Diese Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind sehr interessant, da die Nukleotidsequenzen aller drei Gene sehr große Homologien aufweisen. Die chromosomale Lokalisation des *rHFH-1*-Gens auf Rattenchromosomen wurde bisher nicht durchgeführt, aber Avraham et al. (1995) konnten mit einer *rHFH-1* cDNA-Sonde zeigen, dass ein *rHFH-1* homologes Gen, ebenso wie *mFoxq1*, auf Chromosom 13 der Maus lokalisiert ist. Eine solche Clusterung eng verwandter *fork head* Gene auf einem Chromosom wurde bereits für die humanen Gene *HBF-1* (*FOXG1b*) und *HBF-2* (*FOXG1a*) gezeigt, die auf Chromosom 14q lokalisiert sind (Wiese et al., 1995).

Ziele der vorliegenden Arbeit:

Trotz der großen Homologie zwischen dem *rHFH-1*-Gen der Ratte und dem murinen *mFoxq1*-Gen unterscheiden sich die abgeleiteten Aminosäuresequenzen deutlich. Deshalb sollte das *rHFH-1*-Gen nachuntersucht werden, um mögliche Sequenzfehler zu korrigieren und um festzustellen, ob das *rHFH-1*-Gen nicht doch das homologe Gen zu *mFoxq1* ist.

Weiterhin sollte durch Promotorstudien die Regulation von *Foxq1* untersucht werden. Mit Hilfe von Reporterassays und Gel Shift Experimenten sollten die cis-ständigen Promotorelemente identifiziert und die daran bindenden Transkriptionsfaktoren ermittelt werden.

Nach der Isolierung des humanen *hFOXQ1*-Gens aus einer genomischen Bank sollte das gewebespezifische Expressionsmuster von *hFOXQ1* beim Menschen ermittelt und mit dem der Maus verglichen werden. Weiterhin sollte die zellspezifische Expression des *mFoxq1*-Gens im Magen der adulten Maus näher untersucht werden.

Schließlich sollten mit Hilfe der homologen Rekombinationen *mFoxq1*^{-/-} Mäuse generiert werden, um die Funktion von *mFoxq1* während der Embryogenese zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien waren von p.A.-Qualität und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Fluka (Seelze), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham (Freiburg) bezogen.

2.2 Gebrauchswaren

Blottingpapier GB 003	Schleicher & Schüll (Dassel)
Dialyseschläuche	Serva (Heidelberg)
Einmalfilter Minisart NMI	Sartorius (Göttingen)
Hybond N Membran	Amersham (Freiburg)
Röntgenfilme	Amersham (Freiburg)
Objektträger und Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)

Sonstige Plastik-Einwegartikel wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickhausen), Nunc (Wiesbaden) oder Sarstedt (Sarstedt) bezogen.

2.3 Sterilisation

Die Sterilisation erfolgte für 20 min bei 120°C und 10^5 Pascal im Dampfdruckautoklaven (Webeco, Bad Schwartau) oder durch Sterilfiltration (Porengröße 0,2 μm). Gebrauchswaren wurden autoklaviert oder für 5-10 h bei 200°C hitzesterilisiert.

2.4 Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pBluescript SK(+/-)	Stratagene (La Jolla, USA)
pGEM-T	Promega (Mannheim)
pGL3-Basic	Promega (Mannheim)
pGL3-Control	Promega (Mannheim)
pHisi	Clontech (Heidelberg)
pHisi1	Clontech (Heidelberg)
pLacZ	Clontech (Heidelberg)
pPACHD	Prof. G. Suske (Marburg)
pPACSp1	Prof. G. Suske (Marburg)
pPACSp3	Prof. G. Suske (Marburg)
pPACUSp3	Prof. G. Suske (Marburg)
pPNT	Tybulewicz et al. (1991)
pRL-SV40	Promega (Mannheim)
pZErO-2	Invitrogen (Groningen, NL)
p97b	Prof. G. Suske (Marburg)
QuanTox	Qbiogene (Heidelberg)

2.5 Bakterien und Hefen

Die Hitzeschock-kompetenten Bakterienzellen *Escherichia coli* DH5 α und *Epicurian Coli* XL1-Blue stammten von Stratagene (La Jolla, USA) und *E. coli* JM109 von Promega (Mannheim). *Epicurian coli* Sure, elektrokompetente Zellen, stammten von Stratagene (La Jolla, USA). Im Yeast One Hybrid System wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* YM4271 von Clontech (Heidelberg) verwendet.

2.6 cDNA Bibliothek

Für den Hefe One Hybrid Screen wurde die „Mouse Kidney MATCHMAKER cDNA Library“ der Firma Clontech (Heidelberg) verwendet. Dazu wurde die mRNA aus männlichen BALB/c-Mäusen in cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs

mit einer Größe von 0,4 bis 4 kb wurden über die Restriktionsstellen *EcoRI* und *XbaI* in den Vektor pACT2 kloniert. Die Bibliothek enthält $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone.

2.7 Expressionsarray

Für die Expressionsanalyse des humanen *FOXQ1*-Gens wurde der „Multiple Tissue Expression (MTE) Array“ der Firma Clontech (Heidelberg) verwendet.

2.8 Zelllinien

Name	Beschreibung
ES	Die Embryonalen Stammzellen RI (Passage 12) stammten von Dr. A. Nagi (Toronto, Kanada)
Fibroblasten	Die Embryonale Fibroblasten-Zelllinie wurde von Dr. I. Adham (Institut für Humangenetik, Göttingen) zur Verfügung gestellt (Adham et al., 1997).
MA10	Die Zelllinie wurde aus einem Testis-Leydigzelltumor der Maus isoliert (Ascoli, 1981). Sie wurde von Prof. Dr. Mario Ascoli (Iowa, USA) zur Verfügung gestellt.
NIH3T3	Diese Maus-Nieren-Fibroblasten-Zelllinie wurde mit dem Pyloma- und SV40-Virus transformiert und ist über die American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich. Sie wurde von Dr. Frank Strutz (Universitätsklinik Göttingen) zur Verfügung gestellt.
NPI	Diese Zelllinie wurde aus Epithelzellen des distalen Tubulus der Maus-Niere gewonnen. Diese spontan in der Zellkultur transformierte Zelllinie wurde von Dr. Frank Strutz (Universitätsklinik Göttingen) zur Verfügung gestellt
SL2	Die Schneiderzelllinie SL2 (Schneider, 1972) stammt aus <i>Drosophila</i> Embryonen und wurde von Prof. Dr. Guntram Suske (IMT, Marburg) zur Verfügung gestellt.

2.9 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
AMV Reverse-Transkriptase	Promega (Mannheim)
DNase I (Rnase frei)	Roche (Mannheim)
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Roche (Mannheim)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
Restriktionsenzyme	Life Technologies (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt/M.), Promega (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
RNaseA	Serva (Heidelberg)
RNasin	Promega (Mannheim)
T4 DNA-Ligase	Life Technologies (Karlsruhe)
T3 RNA-Polymerase	Roche (Mannheim)
T7 RNA-Polymerase	Roche (Mannheim)
Sp6 RNA-Polymerase	Roche (Mannheim)
Taq DNA Polymerase	Finnzyme (Espoo, Finnland)

2.10 DNA-/RNA-Größenmarker

	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Marker	1 kb DNA Ladder	Life Technologies (Karlsruhe)
	25 bp DNA Ladder	Life Technologies (Karlsruhe)
	DNA Molecular Weight Marker III	Roche (Mannheim)
RNA-Marker	0,24-9,5 kb RNA Ladder	Life Technologies (Karlsruhe)

2.11 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Bezeichnung	Hersteller
DIG RNA Labelling Kit	Roche (Mannheim)
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega (Mannheim)
DYEnamic ET terminator Cycle sequencing premix kit	Amersham (Freiburg)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen (Hilden)
JetStar Plasmid Midi Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
MicroSpin S-200 HR Columns	Amersham (Freiburg)
OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen (Hilden)
QIAfilter Plasmid Giga Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Rediprime II Labelling Kit	Amersham (Freiburg)
RNeasy Mini/Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Tropix Galacto-Light	Applied Biosystems (Weiterstadt)

2.12 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide T3, T7 und Sp6 wurden von Amersham (Freiburg) bezogen, alle anderen Oligonukleotide wurden von Roth (Karlsruhe) und NAPS (Göttingen) synthetisiert.

Oligos für PCRs:

Bezeichnung 5'-----3'

AB12	ACCGCCAGTGAAGAACCCCTCC
AB6	CGCCTCCCGCACTCTGTTCG
CL1	CGCCATCGACAGCATTTCTCA
FH2.21	CTAGAGCCCACATTCCAACC
FH3.2	CGGAAAAGCGTCTCTCTCGG
GL2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
MR-F1	GCTCCCTGCCCCGCCGCT
MR-R1	CAWGAAATRGAAAAGAACRGCTT
MR-R2	SGGTAGGACAGGTGCGGAC
Mut-F	AGCACCAGCGCGCGCATGAAATTG
Mut-R	GCGATGAGAGCGATGTAGGAGTATG
OH5MA	GCAGCATGTCCGCGCTGGCGCTCTAGAGCAGAATCTCGC CTCC
OH5MS	GGAGGCGAGATTCTGCTCTAGAGCGCCAGCGCGGACATG CTGC
RV3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
Sp6	AGGTGACACTATAGAATAC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC

Oligos für Gel Retardation Experimente (2.23):

Bezeichnung 5'-----3'

BS1F	TGGCCGTGGGCGCCAGGCCCCGCCCCCG
BS1R	CCGCGGGGGCGGGGCCTGGGCGCCACG
BS2F	TGGCCGTGGGCGC
BS2R	TGGGCGCCACG
BS3F	AGGCCCGCCCCCG
BS3R	CCGCGGGGGCGGGG
BS4F	AGGCCAAAACCCG
BS4R	CCGCGGGTTTTGGG
BS5F	GGCGCCAGGCC
BS5R	CGGGGCCTGGGC
BS10F	TCGGCCACCTAGTTCCCCACCCCCT
BS10R	GCCAGGGGGTGGGGGAAGTGGTGG
BS11F	TCGGCCACCTAGTTCCCAAACCCCCT
BS11R	GCCAGGGGTTTTGGGAAGTGGTGG

2.13 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Wasser angesetzt, das über ein Milli-Q-Wassersystem (Millipore, Eschborn) aufgereinigt wurde.

2.13.1 Lösungen für die Arbeiten mit Bakterien

LB-Agar-Platten	1,5% Agar in LB-Medium
LB-Medium	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O pH 7,0
TSS	10% Polyethylenglykol (M 8000) 5% DMSO 50 mM MgCl ₂

Medienzusätze wurden getrennt sterilfiltriert und den autoklavierten Medien in den angegebenen Endkonzentrationen zugegeben.

Ampicillin	50 µg/ml in H ₂ O
IPTG	0,5 mM in H ₂ O
Kanamycin	50 µg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	12,5 µg/ml in H ₂ O
X-Gal	40 µg/ml in N,N-Dimethylformamid

2.13.2 Lösungen für die Aufreinigung und Analyse von DNA

Hefe-Lysis-Puffer	2% Triton X-100 1% SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1,0 mM EDTA
Lysispuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 100 mM EDTA

S1	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
S2	200 mM NaOH 1% SDS
S3	2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1
Stopp-Mix 1	40% Saccharose 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
Stopp-Mix 2	1 mg/ml Orange G 10 mM EDTA 15% Ficoll 400
TBE (5x)	445 mM Tris 445 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8,0
TE (1x)	10 mM Tris/HCl, pH 7,6 1 mM EDTA

2.13.3 Lösungen für die Aufreinigung und Analyse von RNA

Lösungen für das Arbeiten mit RNA wurden mit DEPC-behandeltem Millipore-Wasser angesetzt.

DEPC-H ₂ O	0,1% Diethylpyrokarbonat in H ₂ O üN bei RT inkubieren und anschließend autoklavieren
10x MOPS	0,2 M MOPS, pH 7,0 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA sterilfiltriert

RNA-Blot Färbelösung	0,02% Methylenblau 0,3 M Natriumacetat, pH 5,5
RNA-Ladepuffer	50% Glycerin 1 mM EDTA 25% Orange G 0,025% Ethidiumbromid
RNA-Probenpuffer	1,5x MOPS 9,25% Formaldehyd 60% Formamid

2.13.4 Lösungen für die Generierung von Deletionsklonen

Klenow-Mix	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM MgCl ₂ 0,1 U/μl Klenow-Fragment der DNA Polymerase
Ligationspuffer (5x)	250 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM MgCl ₂ 5 mM ATP 5 mM DTT 25% Polyethylenglykol (M 8000)
dNTP-Mix	je 0,125 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

2.13.5 Lösungen für die Hybridisierung von Nukleinsäuren

Denaturierungslösung	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris/HCl, pH 5,5 1,5 M NaCl
RNA-Blotfärbelösung	0,04% Methylenblau 0,5 M NaOAc pH 5,2

SSC (20x)	3 M NaCl 0,15 M Natriumcitrat
-----------	----------------------------------

2.13.6 Lösungen für die *in situ* Hybridisierung

Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Millipore-Wasser angesetzt.

Denhardt's (50x)	5 g Ficoll 400 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml H ₂ O
Fixierlösung	60% Ethanol 30% Formalin (= 37% Formaldehyd) 10% Eisessig
Glycin (10x)	40 mg/ml Glycin in H ₂ O
Hybridisierungslösung	50% Formamid 5x SSC 200 µg/ml tRNA 0,1% Tween 20 0,1% CHAPS 1x Denhardt's 100 µg/ml Heparin
MAB	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 mit NaOH
MAB-B	MAB mit 1% BSA
MAB-B-KFS	MAB-B mit 10% fötalem Kälberserum
1% Organosilan	1% (v/v) gamma-Aminopropyl- trithoxysilan in H ₂ O pH 3,45

PBS	150 mM NaCl 80 mM Na ₂ HPO ₄ 21 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	PBS 0,1% Tween
4% PFA	4% Paraformaldehyd in PBS
Waschpuffer 1	5x SSC 50% Formamid 1% SDS
Waschpuffer 2	0,5 M NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 0,1% Tween-20

2.13.7 Medien für die Zellkultur

Medien, Seren und Antibiotika wurden von Life Technologies (Heidelberg) oder Pan (Aidenbach) bezogen, das insektengetestete fötale Kälberserum stammte von der Firma PAA (Cölbe). Alle Seren wurden hitzeinaktiviert (30 min bei 56°C) und sterilfiltriert.

Einfríermedium	90% Zelllinien-spezifisches Medium 10% DMSO
ES-Einfríermedium	30% ES-Medium 50% fötales Kälberserum 20% DMSO
ES-Medium	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (mit 4,5 g/l Glukose) 20% fötales Kälberserum 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1x Nichtessentielle Aminosäuren 1000 U/ml LIF 0,1 mM Mercaptoethanol

ES-Lysispuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,5 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 mM NaCl 100 µg/ml Proteinase K
Fibroblasten-Medium	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (mit 4,5 g/l Glukose) 10% fötales Kälberserum 2 mM L-Glutamin
MA10-Medium	Way-Mouth Medium 15% Pferdeserum 50 µg/ml Gentamycin
NPI- und NIH3T3-Medium	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin) 10% fötales Kälberserum 200 U/ml Penicillin 200 µg/ml Streptomycin
Selektionsmedium I	ES-Medium 0,3 µg/ml Neomycin 0,5 µg/ml Gancyclovir
Selektionsmedium II	ES-Medium 0,3 µg/ml Neomycin
SL2-Medium	Schneiders <i>Drosophila</i> -Medium 10% insektengetestetes fötales Kälberserum 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.13.8 Puffer für den Luciferase-Assay

Diluent-Buffer	100 mM Natriumphosphat 0,1 mM MgCl pH 8,0
----------------	---

Glycylglycin Puffer	25 mM Glycylglycin pH 7,8 15 mM MgSO ₄ 4 mM EGTA Biolid
Luciferase Assay Puffer	35 µl 100 mM Kaliumphosphat 2,2 µl 100 mM Dithiothreitol 2,2 µl 200 mM ATP 165 µl Glycylglycin Puffer
Luciferinlösung	1 ml Luciferin-Stock 4 ml Glycylglycinpuffer 40 µl 1M DTT
Luciferin-Stock	55 mg DTT (MG 154,2) 35,7 ml Glycylglycin Puffer 10 mg Luciferin pH 7,8
Lysis-Puffer	100 mM Kaliumphosphat 0,2% Triton-X 100 0,5 mM DTT pH 7,8

Die Zusammensetzungen von „Passive Lysis Buffer“, „Luciferase Assay Reagents II“ und „Stop&Glow Buffer“ aus dem Dual Luciferase Assay Kit (Promega, Mannheim) werden vom Hersteller nicht angegeben.

2.13.9 Puffer für die Kernproteinextraktion und die DNA/Proteinbindung

10x Bindungspuffer	100 mM HEPES, pH 8,0 1 mM EDTA 20 mM DTT 17% Glycerin 50 mM MgCl ₂ 100 mM KCl
Kernproteinpuffer A	1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 10 mM HEPES, pH 7,9

Kernproteinpuffer C	1,5 mM MgCl ₂ 0,42 mM NaCl 0,2 mM EDTA 25% Glycerin 20 mM HEPES, pH 7,9
Kernproteinpuffer D	0,1 mM KCl 0,2 mM EDTA 20% Glycerin 20 mM HEPES, pH 7,9

Den Kernproteinpuffern wurde jeweils vor dem Gebrauch hinzugefügt:

0,5 mM DTT
0,5 mM PMSF
0,5 µg/ml Leupeptin
0,7 µg/ml Pepstatin
1 µg/ml Aprotinin

2.13.10 Puffer und Medien für das Arbeiten mit Hefe

Minimalmedium (SD-Medium)	6,7 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren 20 g/l Agar 100 g/l 10 x Drop Out Supplement 2% Glucose 200 mg/l Adenin-Hemisulfat 200 mg/l L-Arginin-HCl 200 mg/l L-Histidin-HCl-Monohydrat 300 mg/l L-Isoleucin 1000 mg/l L-Leucin 300 mg/l L-Lysin-HCl 200 mg/l L-Methionin 500 mg/l -Phenylalanin 2000 mg/l L-Threonin 200 mg/l L-Tryptophan 300 mg/l L-Tyrosin 200 mg/l Uracil 1500 mg/l L-Valin eventuell 15 mM 3-Amino-1,2,4- Triazol
---------------------------	--

In Abhängigkeit vom gewünschten Selektivmedium wurden eine oder mehrere Aminosäuren ausgelassen.

PEG/LiAc	40% Polyethylenglycol 3350 100 mM LiAc 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
1xTE/LiAc	100 mM LiAc 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
YPD-Medium (Vollmedium)	20 g/l Pepton 10 g/l Hefeextrakt 2% Glucose 20 mg/l Adenin Hemisulfat 20 g/l Agar (bei festem Medium) pH 5,8 mit HCl

2.14 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.14.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Das Gewebe wurde gewogen und mit einem Skalpell zerkleinert. Je 100 mg Gewebe wurden 850 µl Lysispuffer (2.13.2), 100 µl 10% SDS, 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 15 µl RNaseA (10 mg/ml) hinzugefügt und in einem Glas-Homogenisator komplett zerkleinert. Diese Suspension wurde für 3 h bei 50°C inkubiert und die DNA anschließend mit Phenol, mit Phenol:Chloroform (1:1) und schließlich mit Chloroform extrahiert. Der Überstand wurde mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 Vol Isopropanol versetzt, gemischt und die DNA mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach Waschen mit 70% Ethanol und Lufttrocknung wurde die DNA in TE gelöst.

2.14.2 Plasmidpräparation aus Bakterien

Alle Plasmidpräparationen basieren auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Für kleinere DNA-Mengen wurde eine Mini-Präparation von 3 ml üN Kultur durchgeführt. Dazu wurden die Zellen pelletiert, in 200 µl S1 (2.13.2)

resuspendiert und mit 200 µl S2 versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 350 µl S3 hinzugefügt, gemischt und bei 10000 x g abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, mit 70% EtOH gewaschen und in 1x TE (2.13.2) aufgenommen.

Für größere DNA-Mengen wurden der JET Star Plasmid Midi Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) oder der QIAGEN Plasmid Giga Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Für die Isolierung endotoxinfreier DNA, die für Transfektionen gebraucht wurde, wurde das Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) benutzt. Alle Kits beruhen ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, die DNA wird jeweils auf Silica-Gel-Säulen gebunden, verschiedenen Waschschritten unterzogen, nach der Elution mit 2,5 Vol Isopropanol gefällt und in TE gelöst.

2.14.3 Plasmidpräparation aus Hefe

nach Hoffman und Winston (1987) und Kaiser und Auer (1993)

Im Hefe One Hybrid Screen (2.24.1) werden Hefezellen mit Plasmid-DNA aus einer cDNA-Bibliothek transfektiert. Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus transfektierten Hefeklonen wurden 1,5 ml einer üN Kultur für 5 min bei RT und 16000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Hefe-Lysis-Puffer (2.13.2) aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,3 g säuregewaschenen Glaskügelchen (Ø 425-600 µm) wurde der Ansatz 2 min kräftig durchgemischt und für 5 min zentrifugiert (RT, 16000 x g). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gemischt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,1 Vol 3 M NaAc und 2,5 Vol Ethanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 min bei 4°C und 16000 x g) wurde das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Die aufgereinigte Plasmid-DNA enthielt noch genomische DNA der Hefe, so dass sie zwar für die PCR und für die Transformation von Bakterien, nicht aber für Sequenz- oder Restriktions-Analysen genutzt werden konnte. Für diese Analysen mussten zunächst Bakterien mit der isolierten Plasmid-DNA transfor-

miert und anschließend die Plasmid-DNA wieder aus den Bakterien isoliert werden (2.14.2).

2.14.4 Präparation von Gesamt-RNA

Für die Präparation von RNA aus Gewebe wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. 20 bis 30 mg Gewebe wurden in Guanidinisothiocyanat-haltigem Lysepuffer homogenisiert und 3 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Vol 70% Ethanol gemischt, auf die Silica-Gel-Membran der mitgelieferten Zentrifugensäulchen pipettiert und bei 8000 x g für 15 sec zentrifugiert. Nach zwei Waschschrinen wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.15 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.15.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Hilfe von Typ-II Restriktionsendonukleasen nach allgemeinen Standardvorschriften (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Diese Enzyme hydrolysieren DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Empfehlungen der Enzymhersteller gewählt. In der Regel wurde das zwei- bis dreifache der empfohlenen Enzymmenge für eine Reaktionszeit von 1 bis 2 h bzw. üN eingesetzt.

2.15.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Selbstligation von geschnittenen Plasmidvektoren zu verhindern, wurde das 5'-Ende linearer Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte nach Fällung der geschnittenen Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 µl durch Zugabe von 5 U Enzym je 10 pmol DNA für 30 min. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt.

2.15.3 Ligation

DNA-Fragmente wurden kovalent nach Sambrook et al. (1989) verknüpft. Für die Ligation wurden 0,1 pmol Vektor-DNA und 0,3 pmol Insert-DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde in der Regel in einem Volumen von 10 µl 1x Ligationspuffer unter Einsatz von 1 U Enzym und 1 mM ATP bei einer Temperatur von 16°C üN durchgeführt.

2.15.4 Herstellung kompetenter Bakterien

2.15.4.1 Herstellung hitzeschock-kompetenter Bakterien

(Chung et al., 1989)

15 ml LB-Medium wurden mit Bakterien aus einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 4,5 ml der Vorkultur wurden zu 100 ml LB-Medium gegeben und so lange bei 37°C geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 erreicht war. Die Zellen wurden pelletiert (1000 x g, 10 min, 4°C), in 10 ml eiskaltem TSS (2.13) resuspendiert und in 150 µl Aliquots eingefroren.

2.15.4.2 Herstellung elektro-kompetenter Bakterien

50 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) wurden mit einer Einzelkolonie *Epicurian coli* Sure angeimpft und üN inkubiert. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurden 250 ml LB_{kan}-Medium beimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 erreicht war. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis inkubiert und bei -7°C und 7000 x g für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit 250 ml eiskaltem Wasser und anschließend dreimal mit vorgekühltem 10% Glycerin gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen, die Bakterien im verbleibenden Rest der Flüssigkeit resuspendiert, in 100 µl Ansätzen aliquotiert und kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei -80°C.

2.15.5 Transformation von Bakterien

2.15.5.1 Transformation hitzeschock-kompetenter Bakterien

(Hanahan, 1983)

150 µl hitzeschock-kompetente Bakterien (2.15.4.1) wurden auf Eis aufgetaut und zum Ligationsansatz (2.15.3) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis folgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C. Nach 10 min bei RT wurden 800 µl vorgewärmtes LB-Medium hinzugegeben und die Bakteriensuspension bei 37°C für eine Stunde leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agar-Platten (2.13.1) ausplattiert.

2.15.5.2 Transformation elektro-kompetenter Bakterien

Die Transformation elektro-kompetenter Zellen dient der *in vivo* Amplifikation von Plasmiden, die aus Hefe isoliert wurden und nicht für die Transformation von hitzeschock-kompetenten Zellen geeignet sind.

100 µl der *Epicurian coli* Sure Zellen (2.15.4.2) wurden vorsichtig aufgetaut und zu 4 µl aus Hefe isolierter DNA gegeben. Der Transformationsansatz wurde einem Stromstoß von 2000 V für 1 s ausgesetzt. Zur Revitalisierung wurden die Bakterienzellen mit 700 µl LB-Medium versetzt und für 30 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 bis 350 µl Zellen auf LB_{amp}-Platten ausplattiert.

2.16 Gelelektrophoretische Methoden

2.16.1 Auftrennung von DNA über Agarosegele

Zur Analyse und Größenbestimmung von DNA wurden 0,8% bis 2%-ige Agarosegele mit 0,4 µM Ethidiumbromid eingesetzt. Die DNA-Lösungen wurden mit 1/6 Vol Probenpuffer (Sambrook et al., 1989) versetzt und bei 10 V/cm für 1 bis 2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE (2.13.2).

Aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid mit der DNA-Doppelhelix konnte die DNA unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht werden.

2.16.2 Native Polyacrylamidgele

Polyacrylamidgele wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt und für die Auftrennung kleiner DNA-Fragmente und Bandshift-Analysen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Gelkammer, als Laufpuffer diente 1x TBE (2.13.2).

2.16.3 Auftrennung von RNA über Formaldehyd-Agarosegele

Die Auftrennung von RNA erfolgte in horizontalen 0,8% oder 1,5%-igen Formaldehydgelen nach Sambrook et al. (1989). Die RNA-Proben (max. 6 µl) wurden in 12 µl Probenpuffer 10 min bei 65°C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 6 µl RNA-Ladepuffer wurden die Proben aufs Gel geladen und bei 30 V üN in 1x MOPS (2.13.3) elektrophoretisch aufgetrennt.

2.16.4 Fragmentisolierung

Nach Auftrennung des zu eluierenden DNA-Fragmentes in einem Agarosegel und anschließender Ethidiumbromid-Färbung wurde die DNA mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten. Die Elution der DNA wurde unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.17 Markierungen

2.17.1 Random prime Markierung

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde der RediPrime II Kit (Amersham, Freiburg) benutzt. 20 bis 25 ng DNA wurden in 46 µl TE gelöst, 5 min denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Dieser Ansatz wurde mit 4 µl [α ³²P]dCTP (10 µCi/µl) und dem RediPrime-Ansatz gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl 0,5 M EDTA und

46 µl TE gestoppt, und die markierten Fragmente wurden über eine MicroSpin S-200 HR Säule (Amersham, Freiburg) aufgereinigt.

2.17.2 Radioaktive Endmarkierung von Oligonukleotiden

Für die Gel Retardation Assays (2.23) wurden radioaktiv endmarkierte Oligonukleotide verwendet. Dazu wurden komplementäre Oligonukleotide mit überhängenden 5'-Enden synthetisiert (Roth, Karlsruhe). Diese wurden aneinandergelagert, indem jeweils 500 pmol Oligonukleotide aufgekocht und langsam auf RT abgekühlt wurden. Mit Klenow-Enzym und [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP wurden die Enden aufgefüllt und die Fragmente über MicroSpin G-25 Säulen (Amersham, Freiburg) aufgereinigt. Die Markierung wurde im Flüssigszintillationsmessgerät (Canberra/Packard, Dreieich) kontrolliert und die Fragmente auf 20000 cpm/µl verdünnt.

2.17.3 *in vitro* Transkription

Für die *in situ* Hybridisierung (2.20) wurden DNA-Proben *in vitro* transkribiert. Dazu wurde das gewünschte DNA-Fragment in den Vektor pGEM-T kloniert, der Bindungsstellen für die T7- und die Sp6-RNA-Polymerase trägt. Das Plasmid wurde linearisiert und über Fragmentisolierung (2.16.4) aufgereinigt. Für die Synthese wurde folgender Ansatz verwendet:

- 1 µl linearisierte Plasmid-DNA (= 1 µg)
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 10 µl DIG RNA Labelling mix
- 1 µl RNasin (RNase Inhibitor)
- 2 µl RNA-Polymerase (Sp6 oder T7)
- 4 µl Wasser

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 2 µl (10 U/µl) DNase I gestoppt, das Fragment mit LiCl (Endkonzentration 100 mM) und Ethanol gefällt, luftgetrocknet, in 100 µl TE gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.18 Transfertechniken und Hybridisierungen

2.18.1 Southern Blot

(Southern, 1975)

Nach der Gelelektrophorese (2.16.1) wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt, 30 min in Denaturierungslösung und zweimal 20 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer erfolgte mit 20x SSC üN auf eine Hybond-N-Nylonmembran (Amersham, Freiburg). Anschließend wurde die DNA bei 80°C für 2 h an die Membran fixiert.

2.18.2 Northern Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde durch Diffusion nach der von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Methode 12 bis 16 h lang auf eine Hybond-N-Nylon-Membran (Amersham, Freiburg) transferiert. Anschließend wurde die RNA bei 80°C für 2 h an die Membran fixiert. Der Membranstreifen, der den Größenmarker enthält, wurde abgeschnitten, für 15 min in 5% Essigsäure inkubiert und für 10 min in Blotfärbelösung (2.13.5) gefärbt. Nach dem Entfärben in Wasser wurden die Banden markiert und die Membran getrocknet.

2.18.3 Hybridisierung radioaktiv markierter DNA an Nukleinsäuren

Die Vorhybridisierung und Hybridisierung der Membran erfolgte in derselben Hybridisierungslösung bei 60 bis 65°C. Für Southernhybridisierungen wurde der „Membrane Hybridization Buffer (KPL, Gaithersburg, USA), für Northernhybridisierungen der „Rapid-hyb Buffer“ (Amersham, Freiburg) verwendet. Für den MTE Array (2.7) wurde die vom Hersteller mitgelieferte „ExpressHyb“ Hybridisierungslösung (Clontech, Heidelberg) benutzt. Allen Hybridisierungslösungen wurde denaturierte Lachs-DNA in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugefügt. Hybridisiert wurde üN mit einer α -[³²P]dCTP markierten Sonde (2.17.1). Danach wurde die Membran 5 min bei RT mit 2x SSC, zweimal 10 min bei Hybridisierungstemperatur mit 2x SSC/0,1% SDS und zweimal

10 min mit 0,2x SSC/1% SDS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Autoradiographie bei -70°C für ein oder mehrere Tage.

2.19 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.19.1 Standard-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die spezifische Amplifikation (Mullis und Faloona, 1987) von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde in Minicyclern von Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim), Applied Biosystems (Weiterstadt) und MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. 10 bis 20 ng Plasmid-DNA oder 1 bis 2 μg genomische DNA wurden in 20 μl 1x Reaktionspuffer mit je 0,5 mM dNTPs, je 10 pmol Primern, 5% DMSO sowie 2 U *Taq* DNA Polymerase nach folgendem Programm amplifiziert:

5 min	95°C	} 35 Zyklen	Vordenaturierung
1 min	94°C		Denaturierung
1 min	$50 - 64^{\circ}\text{C}$		Annealing
1 – 2 min	72°C		Elongation
5 min	72°C		terminale Elongation

2.19.2 Nichtradioaktive Sequenzierung

Die nichtradioaktive Sequenzierung basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger et al., 1977), wobei vier Didesoxynukleotide zum Einsatz kommen, die jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, die während der gelelektrophoretischen Analyse über Laserabtastung automatisch detektiert werden. Die Sequenzreaktion wurde mit 1 bis 2 μg Plasmid-DNA mit 10 pmol sequenzspezifischem Primer und 4 μl ET-Mix (DYEnamic ET terminator Cycle sequencing Kit der Firma Amersham, Freiburg) in einem Gesamtansatz von 10 μl nach folgendem Programm durchgeführt:

20 sec	95°C	} 25 Zyklen	Denaturierung
15 sec	$50 - 64^{\circ}\text{C}$		Annealing
1 min	72°C		Elongation

Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte mit der automatischen Sequenzanlage ABI 373 A der Firma Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim).

2.19.3 Ortsspezifische Mutagenese

Mit Hilfe des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene (La Jolla, USA) wurden gezielt Mutationen in Plasmid-DNA eingefügt. Dazu wurden zwei sequenzspezifische Primer eingesetzt, die die gewünschte Mutation in der Mitte ihrer Sequenz enthielten. Die DNA, die mutiert werden sollte, lag nach der Midipräparation (2.14.2) methyliert vor. An dieser DNA wurde mit den Mutations-Primern eine PCR durchgeführt, wodurch nicht-methylierte mutierte Tochterstränge entstanden. In 50 µl 1x Reaktionspuffer wurden 5 bis 1000 ng Plasmid-DNA mit je 125 ng Mutagenese-Primer und 2,5 U *Pfu* Turbo DNA-Polymerase gemischt und nach folgendem Programm amplifiziert:

30 sec	95°C	} 25 Zyklen	Vordenaturierung
30 sec	95°C		Denaturierung
1 min	55°C		Annealing
1 min je kb Plasmidlänge	68°C		Elongation

Auf einem 1% Agarose-Gel wurde die Neusynthese der DNA überprüft. Zu den positiven Ansätzen wurde jeweils 1 µl *DpnI* Restriktionsenzym (10 U) gegeben und 1 h bei 37°C verdaut. Dabei hydrolysierte *DpnI* die DNA hinter jedem methylierten Adenin, der nicht-methylierte, die Mutation enthaltende Tochterstrang wurde nicht hydrolysiert. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* XL1-Blue superkompetenten Zellen (2.15.5). Die Überprüfung der DNA-Sequenzen hinsichtlich der Mutationen erfolgte durch Restriktionsanalyse oder Sequenzierung.

2.20 *in situ* Hybridisierung an Magenschnitten

2.20.1 Fixierung des Gewebes

Der frisch präparierte Magen einer adulten Maus wurde kurz in eiskaltem PBS geschwenkt und anschließend für mindestens 3 Tage entweder in 4% PFA oder in Fixierlösung fixiert. Danach wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je ein Tag 80%, 90%, 95%, 100% EtOH) entwässert und schließlich für wenigstens 14 Tage in Methylbenzoat eingelegt. Dabei wurde das Methylbenzoat mehrmals gewechselt. Nach einer dreitägigen Inkubation in flüssigem Paraplast wurde das Gewebe in Paraplast eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.20.2 Vorbehandlung der Objektträger

nach Tourtellotte et al. (1987)

Während die Schnitte des PFA-fixierten Gewebes auf „SuperFrost Plus“ Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht wurden, wurden für die fixierlösungsfixierten Gewebeschnitte herkömmliche Glasobjektträger vorbehandelt. Dazu wurden die Objektträger (OT) 20 min in 0,1 M HCl gekocht und danach 2 mal 5 min in H₂O gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 min in 96% EtOH gelegt, getrocknet und üN in 1x Denhardt's (2.13.6) inkubiert. Nach 20minütiger Fixierung in Ethanol:Eisessig (3:1) wurden die OT in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 70%, 50%, 30% EtOH, je 5 min) rehydriert und üN bei 70°C in 1% Organosilan (pH 3,4) inkubiert. Schließlich wurden sie 5 mal 5 min in H₂O gewaschen und üN bei 100°C ausgeheizt. In diesem Zustand können die beschichteten OT bis zu 6 Monate aufbewahrt werden.

Die Aktivierung der OT erfolgte in 10% Glutaraldehyd in PBS, pH 7,0, für 30 min. Anschließend wurden sie 5 min in H₂O gewaschen, bevor die Aktivierung in 0,1 M Natrium-m-Perjodat 15 min unter dem Abzug stabilisiert wurde. Schließlich wurden die OT 3 mal 5 min in PBS gewaschen und üN bei 42°C getrocknet. Im aktivierten Zustand können die OT mindestens 8 Wochen verwendet werden.

2.20.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Das eingebettete Gewebe wurde mit einem Mikrotom (JUNG RM 2035 der Firma Leica, Nussloch) mit einer Schnittdicke von 10 µm geschnitten. Die Schnitte wurden auf 58°C warmes DEPC-Wasser gelegt, mit einem OT aufgenommen und getrocknet. Die Schnitte wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.20.4 Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung und Detektion der mRNA wurde mittels synthetischer Antisense-RNA-Sonden (2.17.3) durchgeführt.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte auf 60°C erwärmt, um das Paraplast zu schmelzen. Anschließend wurden sie 2 mal 10 min in Roticlear (Roth, Karlsruhe) deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (96% EtOH für 2 mal 10 min, 70%, 50%, 30% EtOH für je 5 min) entwässert und in H₂O (2 min), PBS (2 mal 10 min) und PBT (2 mal 10 min) gespült. Durch Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 10 µg/ml) und Inkubation bei 37°C für 15 min wurde das Gewebe für die RNA-Sonde durchlässig gemacht. Durch Zugabe von Glycin wurde das Enzym inhibiert. Nach 10 min folgten für je 5 min zwei Waschschriffe mit PBT.

Unspezifische Signale wurde durch die Behandlung mit Essigsäureanhydrid reduziert. Zunächst folgte ein Waschschriff für je 5 min mit 0,1 M Triethanolamin (pH 7,8), anschließend wurde Essigsäureanhydrid bis zu einer Endkonzentration von 0,25% hinzugefügt und unter schwachem Schütteln für 5 min inkubiert. Dieser Schriff wurde einmal wiederholt, danach wurden die Schnitte 2 mal 5 min mit PBT gewaschen, mit 4% PFA für 20 min refixiert und schließlich 5 mal mit PBT gewaschen.

Nach dem Abtropfen wurden die Schnitte mit 100-150 µl Hybridisierungslösung für 1 h prähybridisiert, dann wurde die denaturierte Sonde hinzugefügt, die Schnitte mit einem sterilen Deckglas bedeckt und in einer Feuchtkammer bei 60°C üN hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte abgekühlt, die Deckgläser mit 2x SSC abgeschwemmt, die OT 2 mal 30 min bei 50°C in Waschpuffer 1 und anschlie-

ßend bei 37°C für 15 min in Waschpuffer 2 gewaschen. Nach Zugabe von RNase A (Endkonzentration 20 µg/ml) wurden die Schnitte 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgten mehrere Waschschrirte mit PBT (2 mal 10 min), MAB (2 mal 5 min), MAB-B (15 min) und MAB-B-FKS (60 min). Auf die abgetropften OT wurden jeweils 40-60 µl präabsorbierte Anti-DIG gekoppelte AP gegeben. Die Schnitte wurden mit Deckgläsern abgedeckt und in einer Feuchtkammer zunächst 2 h bei 37° und anschließend üN bei 4°C inkubiert.

Nach 3 Waschschrirten mit MAB (je 20 min) wurden die Schnitte kurz mit Wasser gespült und anschließend mit 150-200 µl BM Purple AP Substrat (Roche, Mannheim) für 45-60 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Fixierung in 3,7% Formaldehyd (15 min) wurden unspezifische Färbungen durch Waschen mit Methanol entfernt. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% 100% für je 5 min) wurden die Schnitte in Euparol (Aqua-Mount) eingedeckelt.

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Olympus BX60 Mikroskop (Olympus, Hamburg).

2.21 Zellkultur

2.21.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden bei 37°C schnell aufgetaut, in vorgewärmtem Medium aufgenommen und 5 min bei 200 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Medium resuspendiert und in einer 25 cm² Kulturflasche ausplattiert.

Zum Einfrieren wurde eine voll bewachsene 75 cm² Kulturflasche trypsinisiert, die Zellen vereinzelt und 5 min bei 200 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml Aliquots langsam (üN bei -70°C) eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.21.2 Zellkultivierung

Alle Mauszelllinien (NPI, MA10, NIH3T3, Fibroblasten) wurden in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit, die *Drosophila* Schneider Zellen bei 25°C ohne Begasung mit CO₂ kultiviert. Alle 1 bis 2 Tage wurde das Wachstum der Zellen kontrolliert und das Medium gewechselt. Waren die Zellen

dicht gewachsen, wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA vereinzelt. Die Zellen wurden einmal in Medium gewaschen und dann in neue Kulturflaschen aufgeteilt.

2.21.3 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Damit sich die ES-Zellen in der Kultur nicht differenzieren, wurden zwei Maßnahmen getroffen. Zum einen wurden die ES-Zellen auf einer Schicht Fibroblastenzellen kultiviert, die durch Mitomycinbehandlung (2.21.4) an weiteren Zellteilungen gehindert wurden. Zum anderen war im ES-Medium LIF enthalten, das eine Differenzierung der Zellen verhindert. Die Zellen wurden bei 37°C und hoher Luftfeuchte bei 5% CO₂-Begasung inkubiert.

2.21.4 Mitomycinbehandlung

Um die Zellteilung der Fibroblasten zu verhindern, wurden die Zellen für 2 h bei 37°C mit Mitomycin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in mit 0,1% Gelatine beschichtete Petrischalen ausplattiert.

2.21.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

2.21.5.1 Transfektion mit Effectine

24 h vor der Transfektion mit Effectine (Qiagen, Hilden) wurden die Zellen passagiert und in 6-Well-Platten mit einer Dichte von $1,4 \times 10^5$ Zellen/Well (NIH3T3), 6×10^5 Zellen/Well (NPI, MA10) oder 2×10^6 Zellen/Well (SL2) ausplattiert. In 100 µl EC Puffer wurden 0,5 bis 2 µg DNA mit 8 µl Enhancer pro µg DNA vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Effectine pro µg DNA hinzugefügt und gründlich gemischt. Während der 10minütigen Inkubation wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt, danach wurden 600 µl Medium in den Transfektionsansatz gegeben, gemischt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet (2.22).

2.21.5.2 Transfektion durch Elektroporation

ES-Zellen einer voll bewachsenen 10 cm Petrischale wurden trypsiniert und vereinzelt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, 5 min bei 200 x g abzentrifugiert und in 600 µl PBS resuspendiert. 100 µg DNA (Konzentration 0,5 µg/µl in PBS) wurde hinzugegeben, gemischt, in eine GenePulser-Küvette (Biorad, München) überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit dem BioRad GenePulser bei 240 V und 500 µF. Anschließend wurden die Zellen weitere 20 min auf Eis inkubiert, in 30 ml ES-Medium aufgenommen und in zwei 10 cm Petrischalen ausplattiert.

2.21.6 Gewinnung von ES-Einzelklonen

Transfizierte ES-Zellen wurden jeweils 4 Tage mit Selektionsmedium I und II behandelt. Die Zugabe von Neomycin bewirkt, dass nur solche Zellen wachsen können, die das transfizierte Plasmid mit dem Gen für die Neomycin-Resistenz in das Genom integriert haben. Die Zugabe von Gancyclovir bewirkt, dass Zellen, die das Thymidinkinase (*tk*)-Gen tragen, absterben. Es sollten also nur die ES-Zellen überleben, bei denen eine homologe Rekombination mit der Plasmid-DNA stattgefunden hat und bei denen das *tk*-Gen nicht in das Genom integriert ist. Nach der Selektion wurden die Einzelklone in 24-Well-Platten überführt und weitere drei Tage kultiviert. Danach wurden die Klone geteilt, ein Teil wurde eingefroren (2.21.1), der andere Teil wurde für die DNA-Präparation verwendet.

2.21.7 DNA-Präparation aus Einzelklonen

Gut bewachsene ES-Einzelklone wurden für die DNA-Präparation lysiert. Zu den Zellen wurde 500 µl/Well ES-Lysispuffer hinzugefügt und üN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde in jedes Well 500 µl Isopropanol hinzugefügt und 15 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dabei fiel die DNA als weißer Faden aus. Das Puffer/Isopropanol-Gemisch wurde vorsichtig abpipettiert und die DNA mit je 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in frische Reaktionsgefäße mit je 80 µl TE-Puffer überführt, bei geöffnetem Deckel 10 min bei 65°C inkubiert, um Ethanolreste zu entfernen, und üN bei 4°C gelöst.

2.22 Reporter-Gen-Assays

Zur Analyse der cis-regulatorischen Elemente im *Foxq1*-Promotor wurden verschiedene Abschnitte des Promotors in einen Reportervektor kloniert, der das Luciferase-Gen enthält. Das rekombinante Gen des Enzyms Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (de Wet et al., 1986) wird als Reporter-Gen verwendet (Halbwertszeit in transfektierten Zellen ca. 3 h; Thompson et al. (1993), da die auf die Oxidation des Käfer-Luciferins zurückzuführende Biolumineszenzreaktion gut nachgewiesen werden kann. Der quantitative Nachweis der Aktivität erfolgt über die Messung von Lichtemissionsreaktionen in RLUs („relative light units“) in einem Luminometer (Typ LB 953, Fa. Berthold, Bad Wildbad). Nach der automatischen Injektion des Substrats durch das Luminometer startet die lichtemittierende Reaktion in <1 sec und ist bei einer Zugabe des Substrats im Überschuss über einen bestimmten Zeitraum proportional zur Luciferaseaktivität der Probe. Dadurch kann die Transkription des Reporter-Genes indirekt bestimmt werden.

Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde in den Mauszelllinien ein *Renilla reniformis* (gemeine Seefeder; Lorenz et al. (1991) Luciferase exprimierender, in der Drosophilazelllinie ein β -Galaktosidase exprimierender Vektor im Verhältnis 1:10 bis 1:20 mit den zu testenden Konstrukten kotransfiziert.

2.22.1 Zellernte

48 h nach der Transfektion (2.21.5.1) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 200 μ l 1x Passive Lysis Buffer (Dual Luciferase Assay, Promega, Mannheim) bedeckt, mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Proteine messen zu können, wurden mit drei Einfrier-/Auftauzyklen (jeweils 5 min auf Eis, 5 min 37°C, 10 sec vortexen) die Zellmembranen zerstört. Die *Drosophila*-Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 150 μ l Lysis Puffer (2.13.8) bedeckt, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um nicht lysierte Zellen abzutrennen, wurde die Suspension für 2 min bei RT und 15000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.22.2 Messung der Luciferaseaktivität

Zu 30 µl des Zellextrakts wurden 200 µl Luciferase Assay Puffer (2.13.8) gegeben. Um die Luciferase-Aktivität zu messen, wurde der Reaktionsansatz mit 100 µl Luciferinlösung versetzt. Die Messung erfolgte für 20 sec im Luminometer der Firma EG&G Berthold (Bad Wildbad).

2.22.3 Messung der Luciferaseaktivität mit dem Dual Luciferase Assay

20 µl des Zellextraktes wurden mit 100 µl Luciferase Assay Reagens II versetzt und die Lichtemission der *Photinus* Luciferase für 20 sec im Luminometer gemessen. Durch Zugabe von 100 µl Stop&Glow Buffer wurde die Lichtemission der *Photinus* Luciferase gelöscht und gleichzeitig die Reaktion mit der *Renilla* Luciferase gestartet. Die Lichtemission wurde ebenfalls für 20 sec gemessen.

2.22.4 Messung der β -Galaktosidaseaktivität

Zur Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurde der „Tropix Galacto-Light“ Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Zur Herstellung des Reaktionspuffers wurde Galacton 1:100 mit Diluent-Buffer verdünnt. 7 µl des Zellextrakts wurden mit 70 µl des Reaktionspuffers versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Luminometer wurden zum Reaktionsansatz 100 µl „Light Emission Accelerator“ gegeben. Die Messung erfolgte für 30 sec im Luminometer.

2.23 Gel Retardation Assay

Beim Gel Retardation Assay werden Interaktionen zwischen kurzen Promotorelementen und Kernproteinen *in vitro* untersucht. Dazu werden die zu untersuchenden Promotorelemente radioaktiv markiert (2.17.2) und mit Kernproteinen aus Gewebe oder kultivierten Zellen inkubiert. Bei der anschließenden Auftrennung über ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel können Protein-DNA-Komplexe über ihre verzögerte Laufgeschwindigkeit von freier DNA unterschieden werden (Garner und Revzin, 1981).

2.23.1 Isolierung von Kernproteinen

nach Dignam et al. (1983)

Um eine Degradierung der Proteine zu vermeiden, wurde die gesamte Präparation im Kühlraum durchgeführt, alle Puffer waren auf 4°C vorgekühlt. Für die Isolierung von Kernproteinen aus kultivierten Zellen wurden zwei voll bewachsene Kulturflaschen trypsiniert, zweimal in PBS gewaschen und in 5 ml Kernproteinpuffer A (2.13.9) resuspendiert. Für die Kernproteinisolierung aus Gewebe wurde 300 mg Gewebe in 5 ml Kernproteinpuffer A mit einem elektrischen Homogenisator (Ultraturrax T25, Schütt, Göttingen) zerkleinert.

Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurde das Lysat für 20 min bei 4°C und 400 x g zentrifugiert, das Pellet in 3 ml Kernproteinpuffer A aufgenommen und in einem Glashomogenisator 10 mal homogenisiert. Um die Zellkerne zu pelletieren, wurde das Lysat bei 4°C und 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Die Zellkerne wurden in 500 µl Kernproteinpuffer C resuspendiert, in einen kleinen Glashomogenisator überführt und durch 10maliges Homogenisieren mechanisch zerstört. Das Lysat wurde 30 min auf Eis unter Rühren inkubiert, für 30 min bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert und der Überstand in autoklavierte Dialyseschläuche (Serva, Heidelberg) überführt. Die Kernproteine wurden für 2 h in 200 ml Kernproteinpuffer D unter Rühren dialysiert, in 50 µl Volumina aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Konzentration der Proteine wurde nach der Methode von Bradford (2.23.2) bestimmt.

2.23.2 Bradford Assay

Die Konzentration der Kernproteine wurde mit Hilfe des Biorad Protein Assays (Biorad, München) bestimmt, der auf dem Bradford-Assay (Bradford, 1976) beruht. Diesem Assay liegt das Prinzip zugrunde, dass Coomassie Brilliant Blau G250 durch die Bindung an Protein vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird. Dabei ändert sich die Wellenlänge des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm. Liegt der Farbstoff im Überschuss vor, ist die Änderung des Absorptionsmaximums proportional zur gebundenen Proteinmenge. Daher wurden die Messungen immer auf eine Eichgerade mit verschie-

denen Mengen an BSA (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 µg) bezogen. Für die Messung wurde das vorgefertigte Bradford-Reagenz 1:5 mit Wasser verdünnt. In Mikrotiterplatten wurden jeweils 20 µl der BSA-Standards und der verdünnten Proben vorgelegt und mit 280 µl Bradford-Reagens gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die OD₅₉₅ in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Microplate Reader 450, Biorad, München) gemessen. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Proteinmenge wurde unter Verwendung der Eichgerade berechnet.

2.23.3 Protein / DNA-Bindungsreaktion

Für die Bindungsreaktion wurden 15 µg Kernprotein, 2 µl 10 x Bindungspuffer (2.13.9), unterschiedliche Mengen Poly[dIdC] (ICN, Eschwege) zur Verhinderung unspezifischer Bindungen und Wasser in einem Gesamtvolumen von 15 µl gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl markierter DNA (100000 cpm, 2.17.2) wurden die Ansätze weitere 20 min auf Eis inkubiert und dann auf ein natives 6%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Referenz für die Laufstrecke wurde eine Tasche des Gels mit Stopp-Mix 1 (2.13.2) beladen.

2.23.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der Protein/DNA-Komplexe

Die Proben wurden in einem 6%-igen Polyacrylamidgel (2.16.2) aufgetrennt. Nach Auftragen der Proben wurde eine Vorelektrophorese für 30 min bei 120 V und 4°C durchgeführt, die eigentliche Elektrophorese fand bei 4°C und 200 V für 2 bis 2,5 h statt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TBE verwendet.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 15 min in 1x TBE, das 10% Glycerin enthielt, gelegt. Anschließend wurde das Gel 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und in einer Frischhaltefolie für 1 bis 3 Tage bei -70°C über einem Röntgenfilm exponiert.

2.24 Arbeiten mit Hefe

2.24.1 Das One Hybrid System

Das One Hybrid System bietet die Möglichkeit zu untersuchen, welche Proteine an cis-agierende, regulatorische DNA-Sequenzen (Promotorsequenzen) eines Gens binden und dadurch die Transkription des dazugehörigen Gens beeinflussen (Li und Herskowitz, 1993). Hierfür werden cDNA-Bibliotheken verwendet, bei denen eine ubiquitäre Aktivierungsdomäne (Gal4AD) mit der Sequenz eines möglichen DNA-Bindungsproteins gekoppelt ist (Abb. 2).

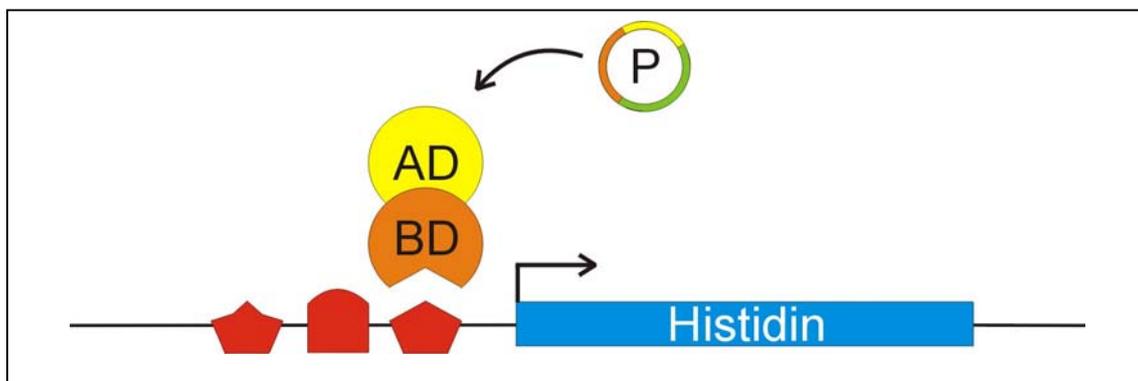


Abb. 2: Schematische Darstellung des One Hybrid Systems

Das Plasmid (P) der cDNA-Bibliothek enthält ein Fusionsgen, das Protein dieses Fusionsgens besitzt eine Aktivierungsdomäne (gelb) und eine DNA-Bindungsdomäne (orange). Kann das Fusionsprotein an eines der Promotorelemente (rot) binden, wird das Reportergen Histidin aktiviert.

Als erstes wurde ein rekombinantes Konstrukt hergestellt, bei dem ein Sequenzbereich aus der identifizierten Promotorregion des *Foxq1*-Gens mit dem Reportergen Histidin (*His3*) gekoppelt wurde. Im zweiten Schritt wurden kompetente Hefezellen, die kein Histidin synthetisieren können, mit dem linearisierten Promotor-Reportergenkonstrukt transformiert. Das Reportergen besitzt einen Minimalpromotor, so dass Hefezellen, die das Promotor-Reportergenkonstrukt ins Genom integrieren, das *His3*-Gen exprimieren und Histidin synthetisieren können. Die Selektion transformierter Hefezellen wurde daher auf Histidin-Mangel-Platten durchgeführt.

Beim Screening der cDNA-Bibliothek wurde der Minimalpromotor des Reportergens durch Zugabe von 15 mM 3AT/I Medium inaktiviert (2.24.4), wodurch nur noch Hefezellen wachsen konnten, bei denen Fusionsproteine durch Bindung an die zu untersuchende Promotorsequenz das *His3*-Gen aktivieren (dritter Schritt).

Abschließend wurden die Plasmide der positiven Klone isoliert (2.14.3) und sequenziert.

2.24.2 Hefetransformation

Die Hefezellen mussten zweimal transformiert werden: zunächst wurde durch Transformation das Promotor-Reportergenkonstrukt in das Hefegenom integriert, anschließend wurden die positiven Hefezellen mit der cDNA-Bibliothek transformiert, um die Interaktionen zwischen dem Promotorelement und den von der cDNA-Bibliothek codierten Proteinen zu untersuchen.

Maximal drei Wochen alte Hefekolonien wurden in 30 ml YPD Medium suspendiert und üN inkubiert. Nach 16 bis 18 Stunden wurde die üN Kultur in 300 ml YPD Medium überführt und weiter inkubiert. Nachdem die Kultur eine OD_{600} von 0,5 erreicht hatte, wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 50 ml TE gewaschen und in 1,5 ml 1xTE/LiAc (2.13.10) aufgenommen.

Zu 2 µg (Integration des Konstrukts ins Genom) bzw. 20 µg (Transformation mit der cDNA-Bibliothek) DNA und 0,1 mg bzw. 2 mg Lachs-DNA wurden 0,1 ml bzw. 1 ml resuspendierte Zellen gegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 0,6 ml bzw. 6 ml PEG/LiAc wurden die Zellen für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 70 µl bzw. 700 µl DMSO zum Transformationsansatz gegeben und der Hitzeschock (15 min, 42°C) durchgeführt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Hefezellen abzentrifugiert, in YPD Medium aufgenommen und eine Erholungsphase (1 h Schütteln bei 30°C) gewährt. Jeweils der gesamte Ansatz wurde auf einer bzw. auf 12 Mangelmedium-Platten ausplattiert. Nach 7 bis 14 Tagen konnten die erfolgreich transformierten Zellen identifiziert werden.

2.24.3 Anlegen von Stocks

Um die Hefestämme mit integrierten Promotor-Reportergeren Konstrukten immer wieder nutzen zu können, wurden von diesen Stämmen Aliquots bei -70°C eingefroren. Dabei wurde dasselbe Verfahren wie bei Bakterien angewendet: Zu 500 μl einer $\bar{u}\text{N}$ Kultur wurden 500 μl steriles Glycerin gegeben, nach gründlichem Mischen konnten die Zellen nun bei -70°C aufbewahrt werden.

2.24.4 3-Aminotriazoltest

Beim One Hybrid System wird beim Screening der cDNA-Bibliothek der Minimalpromotor des *His3*-Reportergens durch Zugabe von 3-Aminotriazol inhibiert. Zur Ermittlung der 3-Aminotriazol-Konzentration, die gerade kein Wachstum mehr ermöglicht, wurden die Hefestämme mit integriertem Promotor-Reportergeren-Konstrukt auf His-Mangel-Platten ausplattiert, die 15, 30, 45 bzw. 60 mM 3-Aminotriazol enthielten. Für das Screening der cDNA-Bibliothek wurden die rekombinanten Kolonien eingesetzt, die selbst bei einer Konzentration von 15 mM 3-Aminotriazol nicht mehr wuchsen.

2.24.5 Vorbereitung der Maus-Nieren-cDNA-Bibliothek zur Nutzung im One Hybrid System

Um die cDNA-Bibliothek für die Hefetransformation nutzen zu können, musste sie getitert, amplifiziert und die DNA aus den Bakterien isoliert werden.

Zunächst wurde der Titer der Maus-Nieren-cDNA-Bibliothek (Clontech, Heidelberg) ermittelt. Hierfür wurden mit LB-Medium $1:10^3$ und $1:10^6$ -Verdünnungen der Bibliothek angesetzt, jeweils 1 μl ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Nach 48 h wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt. Mit folgenden Formeln wurde der Titer berechnet:

$$1:10^3\text{-Verdünnung: } \frac{\text{Koloniezahl} \times 10^3 \times 10^3}{\text{ausplattiertes Volumen}} = \text{cfu/ml}$$

$$1:10^6\text{-Verdünnung: } \frac{\text{Koloniezahl} \times 10^3 \times 10^6}{\text{ausplattiertes Volumen}} = \text{cfu/ml}$$

Die cDNA-Bibliothek enthielt $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone. Um die Hefezellen mit allen verschiedenen Plasmiden der cDNA-Bibliothek zu transformieren, wurde die $1,05 \times 10^7$ Klonen (dreifache Anzahl der unabhängigen Klone) entsprechende Menge der cDNA-Bibliothek in einer üN Kultur vermehrt und mit dem QIAfilter Plasmid Giga Kit (Qiagen, Hilden) präpariert (2.14.2).

3 ERGEBNISSE

3.1 Homologie des *mFoxq1*-Gens

Im Rahmen dieser Dissertation sollte das *fork head* Gen *mFoxq1* der Maus näher untersucht werden. Nachdem in unserer Arbeitsgruppe das menschliche Homolog zu *mFoxq1*, *hFOXQ1*, kloniert wurde (Bieller et al., 2001), zeigte sich eine große Homologie beider Nukleotidsequenzen zur *rHFH-1* cDNA der Ratte

mFoxq1	1	MKLEVFVPRAAHGDKMGSDLEGAGSSDVPSPLSAAGDDSLGSDGDCAANSPAAGSGAGDL	
rHFH-1	1	MGSDLEGAGSSDVPSPLSAAGDDSLGSDGDCAANSPAAGSGAGDL	
mFoxq1	61	EGGGGERNSSGGPSAQDGPPEATDDSRQTASAAGPCAGGVGG EGGARSKPYTRRPKPPYSY	
rHFH-1	46	EGGGGERNSSGGASTQDDPEVTDGSRQTASVGPVPCAGSVGG EGGARSKPYTRRPKPPYSY	
mFoxq1	121	I ALIAMAIRDSAGGRLTLAEINEYLMGK F PF F RGSYTGWRNSVRHNLSLNDC F VK V LRDP	
rHFH-1	106	I ALIAMAIRDSAGGRLTLAEINEYLMGK F PF F RGSYTGWRNSVRHNLSLNDC F VK V LRDP	
mFoxq1	181	S RPWGKDN Y WMLNPSE Y TFADGV F RRRR R KLS H RTTVSASGLRPEEAPPGPAGTPQAAP	
rHFH-1	166	S RPWGKDN Y WMLNPSE Y TFADGV F RRRR R KLS H RTTVSASGYGGGS-PPGPAGTPQPAP	
mFoxq1	241	AARSSPIARSPARQEERSSPASKFSSSFAIDSILSKPFRSRRDGDSALGVQLPWGAAPCP	
rHFH-1	225	TAGSSPIARSPARQEEGSSPASKFSSSFAIDSILSKPFRSRRDGTRLWGCSYPGALLPAR	
mFoxq1	301	PLRAYPALLPAAPGGALLPLCAYGASEPTLLASRGTEVQPAAPLLLAPLSTAAPAKPFRG	
rHFH-1	285	RCAPIPRSFPRRPAVPCCRSVLTARRAHAAGVARGRGAARGAPVRGAPLHRGPSQAISRS	
mFoxq1	361	PETAGAAHLYCPLRLPTALQAAAACGPGPHLSYPVETLLA	
rHFH-1	345	GDRRRGAPVLPPTAAHGPAAGGRGLRSGSAPVLPGGDAASLTGAWSSAGGSRVELGAPFVM	
rHFH-1	405	EGTFCHGGWNAGSRAVHFPPSPRNRDFSTLHQMC	

Abb. 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von mFoxq1 und rHFH-1

Die von den publizierten Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen eine identische DNA-Bindungsdomäne (fett), große Unterschiede im C-terminalen Bereich sowie einen verkürzten N-terminalen Bereich bei rHFH-1

(Clevidence et al., 1993). Die aus der publizierten Nukleotidsequenz von *rHFH-1* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt allerdings nur 66,5% identische Aminosäuren im Vergleich zur Aminosäuresequenz von *mFoxq1* (Frank und Zoll, 1998). Die DNA-Bindungsdomäne sowie die angrenzenden Bereiche beider putativen Proteine sind zwar identisch, im C-terminalen Bereich finden sich jedoch nahezu keine identischen Aminosäuren mehr. Darüber hinaus liegt der Translationsstart des *rHFH-1*-Proteins näher an der DNA-Bindungsdomäne als der des *Foxq1*-Proteins. Zudem ist das *rHFH-1* Protein 39 Aminosäuren größer als das *Foxq1*-Protein. Daher wurde das *mFoxq1*-Gen zunächst *Hfh-1L* (*HFH-1 Like*) genannt.

Eine wiederholte Sequenzanalyse ergab dann jedoch, dass möglicherweise mehrere Nukleotide der *rHFH-1* Sequenz fehlten (Abb. 5). Deshalb sollte das *rHFH-1*-Gen nachsequenziert werden.

3.1.1 Sequenzierung des *rHFH-1*-Gens der Ratte

Für die Sequenzierung des *rHFH-1*-Gens wurden zunächst zwei PCRs an genomischer Ratten-DNA durchgeführt. Mit den Primerkombinationen FH3.1 und MR-R1 sowie FH2.5 und MR-R2 (2.12) wurden zwei Fragmente von 1,6 kb und 0,6 kb Länge amplifiziert (Abb. 4). Das erste Fragment entspricht mit 1,6 kb Länge genau der Größe des entsprechenden cDNA-Fragmentes. Daher besteht auch das *rHFH-1*-Gen vermutlich nur aus einem Exon.

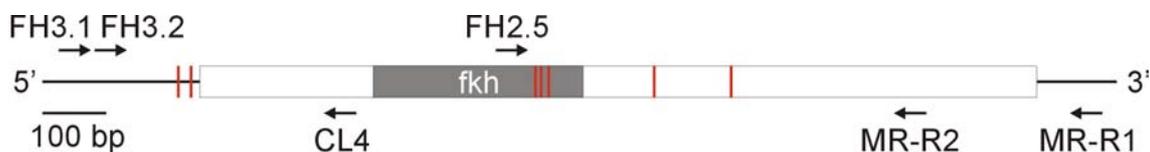


Abb. 4: Lage der Primer für die Sequenzierung von *rHFH-1*

In der schematischen Darstellung des *rHFH-1*-Gens ist die Lage der verwendeten Primer eingezeichnet. Die kodierende Region ist als weißer Balken eingezeichnet, die *fork head* (fkh) DNA-Bindungsdomäne ist grau hinterlegt. Die Positionen der 7 vermutlich fehlenden Nukleotide sind rot markiert.

Mit den Primern FH3.2 und MR-R2 wurde an dem 1,6 kb PCR-Produkt eine zweite PCR durchgeführt und das entstandene 1,3 kb Fragment mit den Primern FH3.2 und CL4 direkt sequenziert. Das 0,6 kb PCR-Fragment wurde in den Vektor pGEM-T kloniert und mit Standardprimern sequenziert. Die Sequenzierungen bestätigten, dass das *rHFFH-1*-Gen sieben Nukleotide mehr enthält, als in der publizierten Sequenz angegeben. In Abb. 5 sind die zusätzlichen Nukleotide aufgeführt.

Diese zusätzlichen Nukleotide führen zu einem veränderten offenen Leserahmen. Das aus der erweiterten *rHFFH-1* Nukleotidsequenz abgeleitete Protein umfasst 400 Aminosäuren und zeigt nun 95% identische Aminosäuren im Vergleich zu *mFoxq1*. Daher wurde nun auch das Rattengen *rHFFH-1* als Homolog zu *mFoxq1* nach der neuen Nomenklatur (Kaestner et al., 2000) in *rFoxQ1* umbenannt.

<i>mFoxq1</i>	-6	GCCGGC ATG AAATTGGAGGTGTTTCGTCCCACGCGCAGCCACGGGGACAAAATGGGCAGC
<i>rFoxQ1</i>	-49	GCCGGCATGAAATTGGAGGTGTTTCGTCCCACGCGCAGCCACGGGGACAAA ATG GGCAGC
...		
<i>mFoxq1</i>	634	CTCAGCCACCGGACCACAGTCTCCGCGTCCGGGCTGCGGCCGGAGGAAGCCCCACCCGGA
<i>rFoxQ1</i>	589	CTCAGCCACCGGACCACAGTCTCCGCATCGGGCTACGGCCGGAGGAAGCCCCACCCGGA
...		
<i>mFoxq1</i>	845	GCGACGGCGACTCGGCTCTGGGGGTGCAGCTACCCCTGGGGCGCCGCTCCCTGCCCGCCGC
<i>rFoxQ1</i>	797	GCGACGGCGACCCGGCTCTGGGGGTGCAGCTACCCCTGGAGCGCTGCTCCCTGCCCGCCGC
<i>mFoxq1</i>	905	TGCGCGCCTATCCCGCGCTCCTTCCC GCGGCCCGGTGGCGCTCTGCTACCGCTCTGTG
<i>rFoxQ1</i>	856	TGCGCGCCTATCCCGCGCTCCTTCCC GCGTCGTCGGCGGTGCCCTGCTGCCGCTCTGTG
<i>mFoxq1</i>	965	CTTACGGCGCAAGCGAGCCTACGCTGCTGGCGTCGCGCGGGACCGAGGTGCAGCCCCGCGG
<i>rFoxQ1</i>	916	CTTACGGCGCGGCGAGCCCACGCTGCTGGCGTCGCGCGGGGCCGAGGTGCAGCCCCGCGG

Abb. 5: Sequenzvergleich von *mFoxq1* und *rHFH-1*

Drei Sequenzabschnitte der Gene *mFoxq1* und *rHFH-1* zeigen eine hohe Homologie, identische Nukleotide sind mit einem senkrechten Strich verbunden. Die putativen Startkodons ATG sind jeweils fett markiert, die 7 durch Sequenzanalysen gefundenen zusätzlichen Nukleotide in der *rHFH-1* Sequenz sind kursiv notiert und grau hinterlegt. Die Nummerierung bezieht sich auf das Startkodon (A = +1).

3.2 Kernlokalisierung von *mFoxq1*

Um seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben zu können, muss das *mFoxq1*-Protein im Zellkern lokalisiert sein. Zum Nachweis der Kernlokalisierung von *mFoxq1* wurde der kodierende Bereich der *mFoxq1* cDNA in den Vektor pEGFP-C1 kloniert. Dieser enthält das Green Fluorescent Protein (GFP) unter der Kontrolle des viralen SV40 Promotors. Dabei wurde die *mFoxq1* cDNA in den selben Leserahmen wie das GFP-Gen kloniert, so dass in transfektierten Zellen ein *mFoxq1*-GFP-Fusionsprotein gebildet wird. Dieses kann unter UV-Bestrahlung detektiert werden.

Zellen der Nierenzelllinie NPI wurden anschließend entweder mit der DNA des Fusionsvektors *mFoxq1*-GFP oder mit pEGFP-C1-DNA als Kontrolle transfek-

tiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Methanol fixiert und unter UV-Bestrahlung mikroskopiert, die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (Abb. 6). Nach Transfektion mit pEGF-C1 waren Zytoplasma und Zellkern

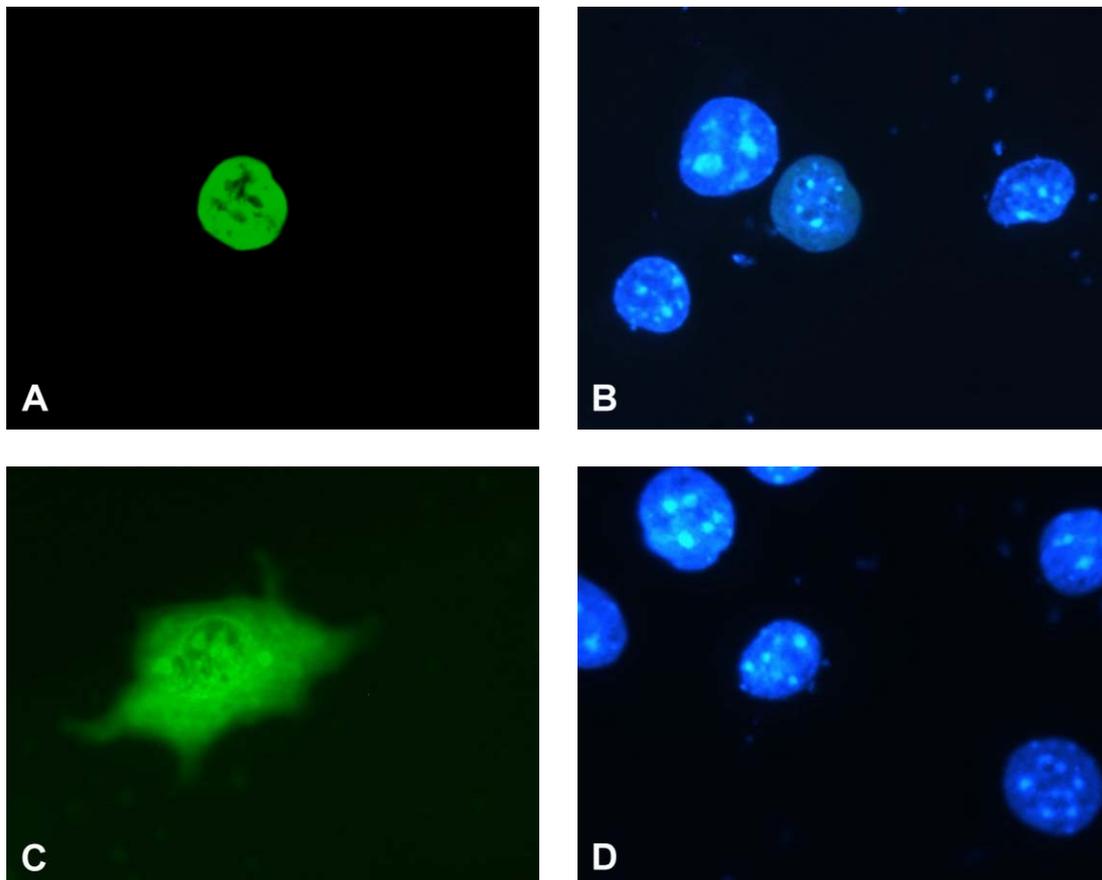


Abb. 6 : Kernlokalisierung von mFoxq1

Zellen der Nierenzelllinie NPI wurden transient mit GFP-Vektoren transfiziert. **A** Das GFP-Signal nach der Transfektion mit mFoxq1-GFP (Fusionskonstrukt) ist ausschließlich im Zellkern nachweisbar; **B** dieselben Zellen wie in A, Zellkerne mit DAPI gefärbt; **C** Das GFP-Signal nach Transfektion mit pEGFP-C1 (Kontrolle) ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden; **D** dieselben Zellen wie in C, Zellkerne mit DAPI gefärbt

gleichmäßig gefärbt, dagegen zeigte sich nach der Transfektion mit mFoxq1-GFP eine Lokalisation des Proteins ausschließlich im Zellkern. Der Transport des Fusionsproteins in den Zellkern ist ein starker Hinweis darauf, dass mFoxq1 ein Kernlokalisierungssignal besitzt und im Zellkern lokalisiert ist.

3.3 Promotoranalyse

Voruntersuchungen des murinen *mFoxq1*-Gens hatten eine gewebespezifische Expression vor allem in Magen und Niere gezeigt (Frank und Zoll, 1998). Daher sollte mit Hilfe einer Promotoranalyse untersucht werden, welche Transkriptionsfaktoren an der Regulation von *mFoxq1* beteiligt und für die gewebespezifische Expression verantwortlich sind.

3.3.1 Sequenzierung des humanen *hFOXQ1*-Promotors

Die Nukleotidsequenzen von *mFoxq1* und seinen Homologen bei Mensch und Ratte, *hFOXQ1* und *rFoxQ1*, zeigen eine sehr starke Ähnlichkeit. Es liegt daher nahe, dass auch die Regulation dieser Gene Ähnlichkeiten aufweist. Ein Vergleich der Promotorsequenzen von Maus und Mensch sollte daher zeigen, ob tatsächlich konservierte Bereiche im Promotor vorliegen. Während die Sequenz eines 2,4 kb Bereiches vor dem Startkodon des *mFoxq1*-Gens bekannt war (Frank und Zoll, 1998), lag lediglich die cDNA-Sequenz des humanen *hFOXQ1*-Gens vor. Daher wurden mehrere Subklone eines genomischen Phagenklons von *hFOXQ1* (Bieller et al., 2001) sequenziert, darunter ein Bereich von 1,7 kb vor dem Startkodon (Abb. 7).

Durch den Vergleich der murinen und menschlichen Promotorsequenzen konnte ein Bereich von etwa 370 bp identifiziert werden, in dem die Homologie 79% betrug (Abb. 8). Dieser homologe Bereich ist bei der Maus –487 bis –850 bp vor ATG lokalisiert, beim Menschen ist der Bereich etwa 30 bp in 5' Richtung verschoben. Außerhalb dieser Region beträgt die Homologie lediglich 25%. Innerhalb der konservierten Region ist zudem an Position –608 der putative Transkriptionsstart des *mFoxq1*-Gens lokalisiert (Frank und Zoll, 1998).

```

-1736 ACGCCCCGGGCGCCCTGGGGTGAGGAACGGTCCCCCCTTTTCGAGATTGTCCGACACTGGT
-1676 GCCAGTGAGGTCACAGCAAAAAGTCCCAAAGGAATATTGGAAAGAAATGGCCGTGAACCGG
-1616 TTGTGTTCTTGCCCCGCCCCGGGAACACGCCCTCTCCGTCGTTCCCTGTTGACTGTCAG
-1556 ATCCCGGAACCAAGCGGCGGAGCTCGGCGGCATCTGAGGCTTCCGCAGGGACACAAGTG
-1496 CAGGCACAGCCCAGCACCCCTGCGCCAGACACAGCCGCCCCAGGGGAAGAGGAGGACGCTG
-1436 TCCTCCCGCAGGAGTCACCAGCCAGGTAAAGAAAAAGGTAAAGTAAGACAAAGAAAAGTG
-1376 AAAGTCGGAGCCCATTTAGTGAGCAAGAGTAAAGGTCATCCAAAAAGGCGCATAACAATTT
-1316 CAAGCCCAGGAGTGCATTCATTAAAACAAGAGGAAAAGACAAGATGGTCCTTCAAAGGAG
-1256 CTCATAGGAAGGGGACAGCACAAAGGCTCCCGAAAGAGGTCACTGCAAGTGTCTGCGCA
-1196 ATTTCTGTTTACGACCTCTGCAAGTACGACAGGGGTTTGCCTTTCGTAAGCAGCATCGTTT
-1136 TCACTACTACAGAAGCACATACGCCGCGTGCAGCTTAGGCCCGAGCAAAGTCCCCTGCTCC
-1076 CCTAGACCCAGTCCCTTCAGGTGTCCCCCTAGGGGAACGTGTGGCGTGTCCCCCAACCAG
-1016 GCGCACTCGCCTAAACTGCGTCCCCGAACTCCAGGGCGCAGGGAGCCCTCGCGGGCTGCC
-956 CGGGGCTGGGGCCACACCTGAACGGAGGAGCCGGCTGGCGGAGCGGCCCGCGCGCA
-896 CACACGCACTCACAGACACGCGCAAACCCACAGCGGCGCGCGCTCCCCATTGGCGG
-836 GAGGAGGAAGGCGGGGCGGCCGACCCAAAACAACAACCTGCGCCAGCGACTTTGCCGC
-776 CGCGCTGCAGTGTGGCCTCCGCTGGTGCAGCGCCCGTTGGGGAGCTGGGGAACTGGGGAG
-716 CCGCCACCACCTCGGCCACCTCGTTCCCCCACCCCTTGCCGTCCGCGCTCAGGCCCGGCC
-656 CCCGCGGAGCCGCCGAGGGTTATATTGGGCCGGCCCGAAGGTGGAGGCGAGACGCAGCC
-596 GCGGCAGGCCAGCGGGGAGATGCTGCCCGGAGGCTGGGAGCGGGAAGGCGGCTGCGGGC
-536 GCAGCGCCTCGGGGACTCGCTCCGCGGGTGTCAAGGCTGAAGGCGCCGGACCTTCCC
-476 CCACGGTGGCACGCACATCATCCGGCACCATTTCCGTGCCCCGAAGACGCCCGCGGGGA
-416 CCTGGGACCGCCAGTGAAGAACCCTCCTGGGCTCTTTAACGAGCAGCAGATGCGCATGC
-356 TGCTTCTCTCCGGCAGGAAAGCCTTCTAAGCCCGGCGTGTCTCGGGCACCCGAGGGTGGAA
-296 CCGCGGCCCTGCACACACTCACCCCAAAGTCTCAACGTGCAACCGAAGGCGACACCCAC
-236 CCAACTCCTCCCTCTCCGCCCCATAGTCCACCCAACACTTATAGCCCCCTCAAAGAAAAA
-176 GCCCAGCGGAAGAGGACTCCGGAAAAGTGACTATCTCGGAAGACCAGGGTAGAGCTCCCG
-116 GGAGAAAAAGGCGAAGATCCCCGGCCCCGGATCGCCATCCCCCTCCCTGGCACCAGCTTC
-56 TCTAGGCTGCGCGAAGGAAGAGGGTACGACGCCGGGGAGGGACTGGGTGCGCGGGCATG

```

Abb. 7 : Promotorsequenz von *hFOXQ1*

Darstellung von 1,7 kb der Promotorsequenz des menschlichen *hFOXQ1*-Gens. Das Startkodon ATG ist fett gedruckt.

Bei der Analyse des homologen Bereichs mit dem Computerprogramm MatInspector (Quandt et al., 1995) wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren MZF-1 (Myeloid Zink-Finger 1), NF-Y (Nuclear Factor Y) und mFoxq1 sowie Faktoren der Sp-Familie gefunden, eine TATA-Box konnte jedoch nicht identifiziert werden.

<i>mFoxq1</i>	-850	CGCGCACACCCT-AGCCGTGCGCTCGCTCCCCATTGGCGAGACCGA--AA
<i>hFOXQ1</i>	-882	CGCGCAAACCCACAGCGGCGCGCGCTCCCCATTGGCGGGAG-GAGGAA
		MZF1 NF-Y
<i>mFoxq1</i>	-803	GGCGGGGGCCGCCAGACCCAAAACAAACAACCTGCGCCCGCGGAGATTT
<i>hFOXQ1</i>	-833	GG-CGGGGCCGCC-GACCCAAAACAAACAACCTGCGCCAGCG-AC-TTT
		Sp-Faktor mFoxq1
<i>mFoxq1</i>	-753	TGTGGCCGCGCCCGCGTGGCCTCGGCCTGATGAACGCC--TTGGGGGG
<i>hFOXQ1</i>	-787	-GCCGCCGCGCTGCAGTGTGGCCTCCGCCTGGTGCGCGCCGTGGGGAG
		MZF1
<i>mFoxq1</i>	-705	A-----GCCGCGGCCACCTCGGCCACCTAGTTCCCCCACCC
<i>hFOXQ1</i>	-738	CTGGGGAACCTGGGGAGCCGCCACCACCTCGGCCACCTCGTTCCCCCACCC
		Sp-Faktor
<i>mFoxq1</i>	-669	CCTGGCCGTGGGCGCCCAAGCCCCGCCCCCGCGGAGCCGCCGCAGGGTTA
<i>hFOXQ1</i>	-688	CTTG-CCGTCCGCGCTCAGGCCCGCCCCCGCGGAGCCGCCGCAGGGTTA
		Sp-Faktor
<i>mFoxq1</i>	-619	TATTGGGCGGACCGAAGGTGGAGGCGAGATTCTGCTGCGGCCGGCCAGC
<i>hFOXQ1</i>	-639	TATTGGGCGGCCCCAAGGTGGAGGCGAGACGCAGCCGCGGCAGGCCAGC
		↑
<i>mFoxq1</i>	-569	GCGGACATGCTGCCCGGGAAGCCGGG-G-GTGGCAAGGCGGCTGCGGGTG
<i>hFOXQ1</i>	-589	GGGAGATGCTGCCCGGAGGCTGGGAGCG-GG-AAGGCGGCTGCGGGCG
<i>mFoxq1</i>	-517	CGGCGGCCTCGAAGACTCCTTTCTATGGGCT
<i>hFOXQ1</i>	-541	CAGCGGCCTCGGGGACTCGCCTCCGCGGGTG

Abb. 8: Sequenzvergleich des homologen Promotorbereiches von *mFoxq1* und *hFOXQ1*

Der Sequenzvergleich zeigt einen Bereich hoher Homologie zwischen dem murinen und dem humanen Promotor. Identische Basen sind durch einen senkrechten Strich verbunden. Die Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren, die mit dem Computerprogramm MatInspector (Quandt et al., 1995) ermittelt wurden, sind farbig dargestellt: Sp-Faktor (rot), MZF-1 (blau), mFoxq1 (grün), NF-Y (gelb). Der Pfeil kennzeichnet den putativen Transkriptionsstart.

3.3.2 Luciferase-Assay

Der durch Computeranalyse ermittelte zum humanen Promotor homologe Promotorbereich des *mFoxq1*-Gens sollte noch weiter untersucht werden. Einerseits sollte untersucht werden, an welchen der durch Computeranalysen identifizierten Bindungsstellen tatsächlich Transkriptionsfaktoren binden. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob der homologe Bereich den gesamten Promotor darstellt.

Um diese Fragen zu klären, wurden Reporteragen-Assays (2.22) durchgeführt. Unterschiedlich große Fragmente des 2,4 kb umfassenden 5' Bereichs von *mFoxq1* wurden in den Vektor pGL3-Basic (Promega, Mannheim) kloniert, der das Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* enthält. Die Lage der verschiedenen Konstrukte und ihre Größen sind in Abb. 9 dargestellt. Mit diesen Konstrukten wurden Zellen der Linien NPI und MA10 transfektiert (2.21.5.1). Da in den NPI-Zellen *mFoxq1* transkribiert wird, musste nach der Transfektion mit Konstrukten, die den gesamten Promotorbereich beinhalten, Luciferase gebildet werden. Die MA10-Zellen exprimieren kein *mFoxq1* und dienten als Kontrolle. Ein weiteres Plasmid, pLucControl, trägt den viralen SV40-Promotor vor dem Luciferasegen und diente als Positivkontrolle. Die Luciferaseaktivität, die nach der Transfektion mit pLucControl gemessen wurde, wurde als 100% festgesetzt und alle anderen Werte daran orientiert. Zur Normalisierung der Messwerte bezüglich Zellzahl und Transfektionseffizienz wurde bei allen Transfektionen der Vektor pRL-SV40 (Promega, Mannheim), der das Gen der *Renilla* Luciferase unter der Kontrolle des SV40-Promotors trägt, kotransfektiert.

Nach der Transfektion beider Zelllinien mit den Konstrukten pLucBsu36, pLucXho, pLucCsp und pLucSst, die nur kurze, bis zu 641 bp umfassende Promotorfragmente beinhalten, war lediglich eine gering erhöhte Luciferase-Aktivität zu verzeichnen (Abb. 9). Nach der Zell-Transfektion mit dem Konstrukt pLucAccB7(2), das 666 bp des *mFoxq1*-Promotors beinhaltet, stieg die Luciferase-Expression deutlich an. Bei Verwendung des Konstrukts pLucSfi (mit einem 691 bp umfassenden Promotorfragment) stieg die Luciferaseaktivität nochmals an. Nach der Transfektion mit Konstrukten, die größere Promotorfragmente be-

inhalten, blieb die Luciferase-Expression in den NPI-Zellen auf diesem Niveau, auch die Transfektion mit einem Plasmid, das ein 6,6 kb Promotorfragment trägt, zeigte eine Aktivität von etwa 30% (nicht gezeigt). In den MA10-Kontrollzellen nahm die Luciferase-Aktivität nach der pLucBssh-Transfektion wieder ab und verblieb auch bei Konstrukten mit größeren Promotorfragmenten auf niedrigem Niveau.

In dem Sequenzabschnitt des Promotors, der für die Aktivierung der Luciferase verantwortlich war (Position –641 bis –691), befinden sich zwei Bereiche mit starker Homologie zu den Bindungsstellen der Sp-Faktoren. Um zu überprüfen, ob tatsächlich an diese Bindungsstellen die für die Aktivierung verantwortlichen Transkriptionsfaktoren binden, wurden in die drei Konstrukte pLucBssh, pLucSfi und pLucAccB7(2) Mutationen eingeführt. Dabei wurde in den Sp-Bindungsstellen B bzw. C die Kernsequenz der Sp-Faktoren (GGCG), die für die Bindung notwendig ist, durch AAAA ersetzt. Dadurch sollte die putative Bindung der Sp-Faktoren verhindert werden. In der Folge sollte die Luciferaseaktivität geringer sein oder sogar vollständig fehlen. Die Transfektionsexperimente bestätigten diese Vermutung (Abb. 10). Fand man bei Verwendung von pLucAccB7(2) eine Luciferaseaktivität von 21,7% (NPI) bzw. 15,9% (MA10), so war nach der Transfektion mit dem mutierten Konstrukt pLucAccB7(2)^C, das keine Sp-Bindungsstelle mehr enthält, keine Luciferaseaktivität feststellbar. Auch bei Verwendung der mutierten pLucSfi- und pLucBssh-Konstrukte war eine deutliche Reduktion der Aktivität festzustellen. Auffällig war jedoch, dass die Luciferaseaktivitäten der Einfachmutanten und der Doppelmutanten in der selben Größenordnung lagen. Bei den pLucBssh-Mutanten, die noch eine dritte Sp-Bindungsstelle (A) sowie weitere Transkriptionsfaktorbindungsstellen tragen, war die Luciferaseaktivität gegenüber den pLucSfi-Mutanten leicht erhöht.

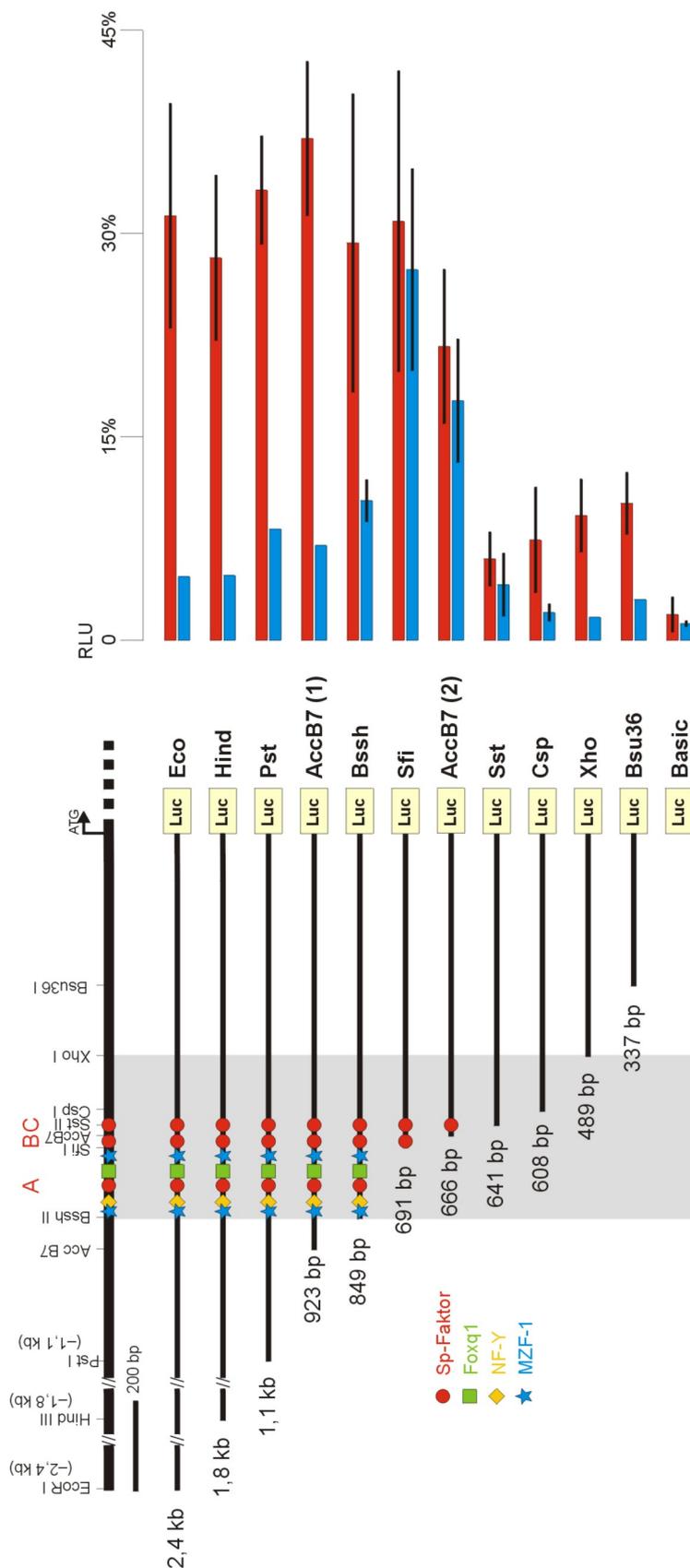


Abb. 9 : Schema der Luciferase-Konstrukte und Ergebnisse der Transfektionen
 Verschiedene Fragmente des *mFoxq1*-Promotors wurden in den Vektor pGL3-Basic als Promotor des Luciferase-Gens kloniert. Die Positionen der bei der Computeranalyse gefundenen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren sind farblich markiert: Sp-Faktor (rot), mFoxq1 (grün), NF-Y (orange), MZF-1 (blau). Die drei Bindungsstellen der Sp-Faktoren sind außerdem mit A, B und C gekennzeichnet. Der Bereich großer Homologie zwischen Maus- und Mensch-Promotor ist grau hinterlegt. Die relativen Lichteinheiten (RLU) nach der Transfektion mit pLuc Control wurden 100% gesetzt und die weiteren Werte daran orientiert. Die Messergebnisse der NPI-Zellen sind mit roten, die Messergebnisse der MA10-Zellen mit blauen Balken dargestellt. Die Standardabweichungen sind als schwarze Striche eingezeichnet.

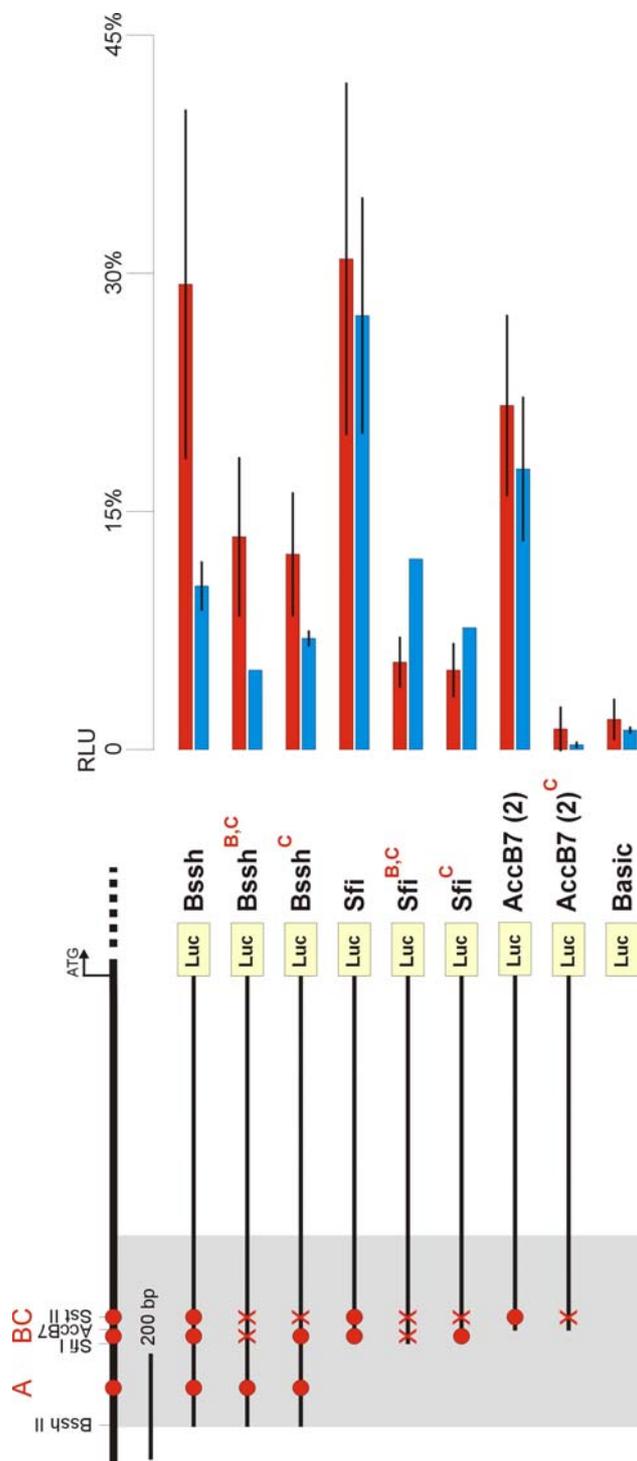


Abb. 10 : Schema der Mutationskonstrukte und Ergebnisse der Transfektionen
 In den Luciferasekonstrukten pLucBssH, pLucSfi und pLucAccB7(2) wurden die Sp-Bindungsstellen C bzw. B und C mutiert. Die intakten Bindungsstellen sind mit einem roten Kreis, die mutierten mit einem roten x gekennzeichnet. Zum Vergleich sind die Messwerte für die Konstrukte pLucBssH, pLucSfi, pLuc AccB7(2) und pLucBasic aus Abb. 9 aufgeführt. Die Messergebnisse nach der Transfektion der NPI-Zellen sind mit roten, die der MA10-Zellen mit blauen Balken dargestellt. Die Standardabweichungen sind als schwarze Striche eingezeichnet.

3.3.3 Gel Retardation Assay

Mit Hilfe von Gel Retardation Experimenten (2.23) sollte überprüft werden, ob es tatsächlich Sp-Faktoren sind, die an den *mFoxq1*-Promotor binden, und um welche es sich handelt. Da sich die Bindungssequenz von Sp2 (GGTGTGGG) von den Bindungssequenzen der anderen Sp-Faktoren (GGGGCGGGG) unterscheidet (Suske, 1999), können nur Sp1, Sp3 oder Sp4 an den *mFoxq1*-Promotor binden. Während *Sp1* und *Sp3* ubiquitär exprimiert werden, findet man *Sp4*-Expression vor allem im Gehirn und im zentralen Nervensystem (Suske, 1999). Da *Sp4* also nicht in den Geweben mit starker *mFoxq1*-Expression exprimiert wird, wurden in den weiteren Versuchen nur die beiden Faktoren Sp1 und Sp3 näher untersucht.

Für die Gel Retardation Experimente wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide mit Kernproteinen aus drei verschiedenen Geweben (Niere und Magen als Positivkontrolle, Muskel als Negativkontrolle) inkubiert und in einem PAGE-Gel aufgetrennt. Nach der Autoradiographie wurden die erhaltenen Bandenmuster ausgewertet. Dabei wurden die Banden näher untersucht, die bei den Reaktionen mit Kernproteinen aus Niere und Magen, nicht aber bei der Reaktion mit Kernproteinen aus Muskelgewebe auftraten.

Die Lage der verschiedenen Oligonukleotide sind in Abb. 11 eingezeichnet.

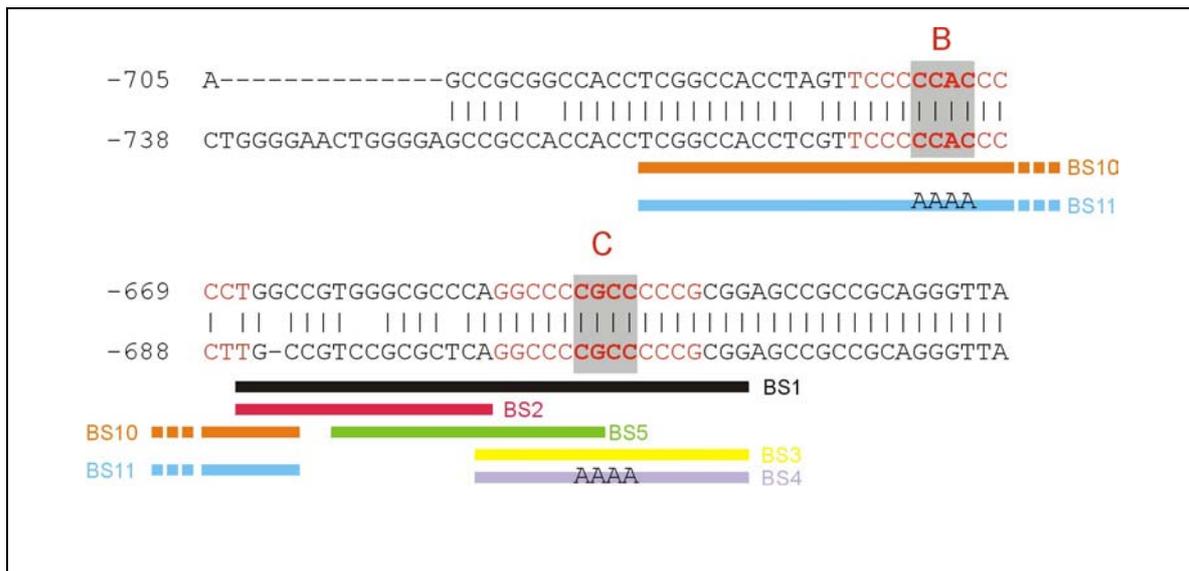


Abb. 11 : Lage der im Gel Retardation Assay verwendeten Oligonukleotide

Die verschiedenen doppelsträngigen Oligonukleotide sind mit BS bezeichnet und nummeriert. Die Sequenzen der beiden Sp-Bindungsstellen B und C sind rot markiert, die Kernsequenzen sind jeweils fett dargestellt und grau hinterlegt. In den Oligonukleotiden BS4 und BS11 sind die Mutationen der Kernsequenz mit AAAA eingezeichnet.

Bei der Untersuchung der Sp-Bindungsstelle B mit den Oligonukleotiden BS10 und BS11 zeigten sich nach der Bindung von BS10 an Kernproteine aus Niere und Magen zwei Banden, die auch nach Konkurrenz mit 6 µg Poly[dIdC] erhalten blieben (Abb. 12, Pfeile). Die obere der beiden Banden war dabei stärker als die untere, keine der Banden fand man bei der Bindung der Oligonukleotide an Kernproteine aus Muskelgewebe. Wurde in der Reaktion das mutierte Fragment BS11 eingesetzt, so traten beide Banden nicht mehr auf. Schließlich wurden der Reaktion von Kernproteinen aus Nierengewebe mit BS10 noch Antikörper gegen Sp1 bzw. Sp3 (Polyklonale Antikörper, hergestellt und zur Verfügung gestellt von Prof. G. Suske, Marburg) zugegeben. Bei Zugabe von anti-Sp1 traten weiterhin beide Banden auf, bei Zugabe von Anti-Sp3 trat die untere Bande nicht mehr auf, während die obere Bande noch schwach erkennbar war. Bei Kombination beider Antikörper verschwand auch die obere Bande vollständig. Offensichtlich bindet vor allem der

Transkriptionsfaktor Sp3 an die Bindungsstelle B, in geringem Maß kann jedoch auch Sp1 an diese Bindungsstelle binden.

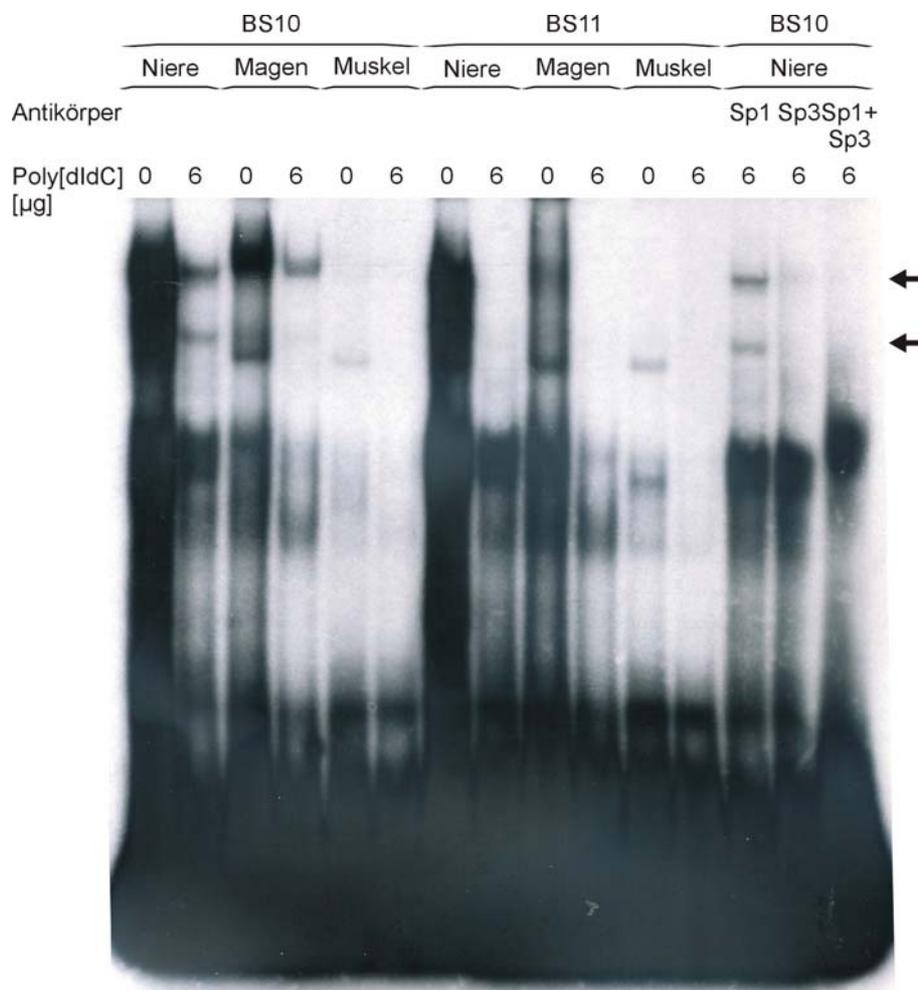


Abb. 12 : Gel Retardation Assay zur Analyse der putativen Sp-Bindungsstelle B

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide BS10 und BS11 wurden mit jeweils 15 μ g Kernproteinen aus Niere, Magen oder Muskel mit oder ohne Zugabe von Poly[dIdC] (6 μ g) inkubiert. Für die Antikörperreaktionen wurden jeweils 200 ng Antikörper eingesetzt.

Zur Untersuchung der Sp-Bindungsstelle C wurden das Oligonukleotid BS1 sowie seine Teilfragmente BS2, BS3 und BS5 (Abb. 11) verwendet. Neben drei Banden, die bei allen Reaktionen erkennbar waren (Abb. 13, Pfeilköpfe), gab es eine Bande, die nur bei BS1 und BS3, die die Sp-Bindungsstelle C enthalten, zu

erkennen war (Abb. 13, Pfeil). Für die weitere Analyse wurde nun das Fragment BS3 verwendet.

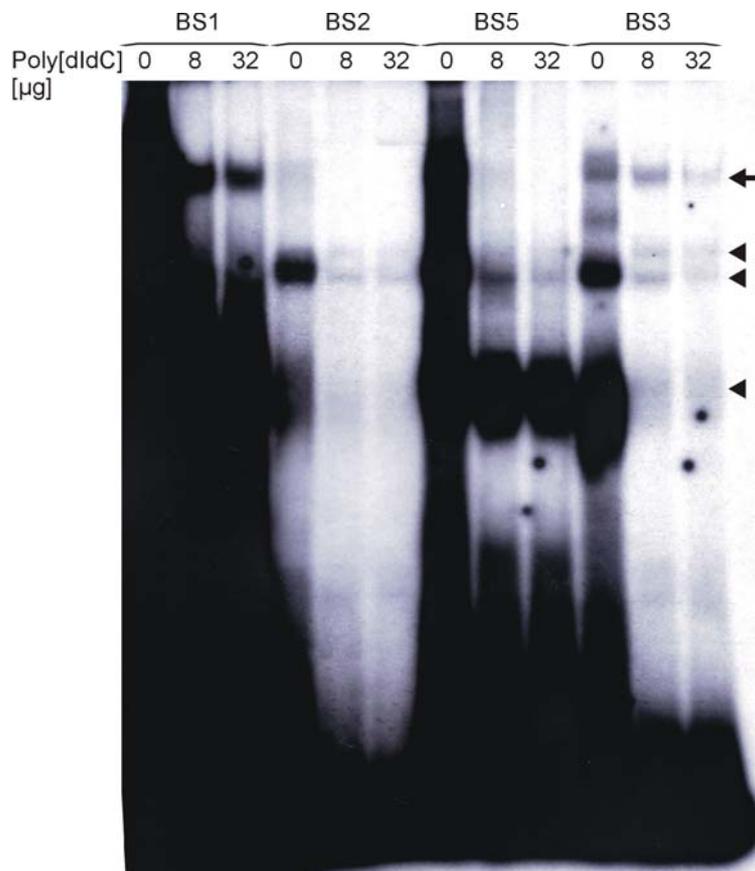


Abb. 13 : Gel Retardation Assay zur Analyse der putativen Sp-Bindungsstelle C

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide BS1, BS2, BS3 und BS5 wurden mit jeweils 15 µg Kernproteinen aus NPI-Zellen inkubiert. Zur Kompetition wurden 0, 8 oder 32 µg Poly[dIdC] zugegeben. Die Pfeilköpfe markieren Banden, die bei allen Fragmenten erkennbar sind, die Pfeile markieren die Bande, die nur bei den Fragmenten BS1 und BS3 zu finden ist.

Zur Untersuchung der Sp-Bindungsstelle C wurde im Oligonukleotid BS3 ebenfalls eine Mutation eingefügt (Oligonukleotid BS4). Bei der Inkubation der Kernproteine mit BS4 wurden keine DNA/Protein-Komplexe mehr gebildet (Abb. 14). Die Inhibierung der Komplexbildung durch Zugabe von Antikörpern zur Reaktion mit BS3 zeigte jedoch ein etwas verändertes Bild im Vergleich zu BS10. Bei Zugabe von Anti-Sp1 blieb die untere Bande erhalten, während die obere Bande deutlich schwächer zu erkennen war. Bei Zugabe von Anti-Sp3

verschwand die untere Bande, die obere Bande dagegen blieb erhalten. Bei gleichzeitigem Einsatz beider Antikörper war keine der beiden Banden mehr erkennbar. Offensichtlich ist die obere der beiden Banden eine Doppelbande, die sowohl Sp1- als auch Sp3-gebundene Oligonukleotide enthält, während an der DNA/Proteinkomplexbildung der unteren Bande ein verkürztes Sp3-Protein beteiligt ist. An die Sp-Bindungsstelle C bindet Sp1 deutlich stärker als Sp3.

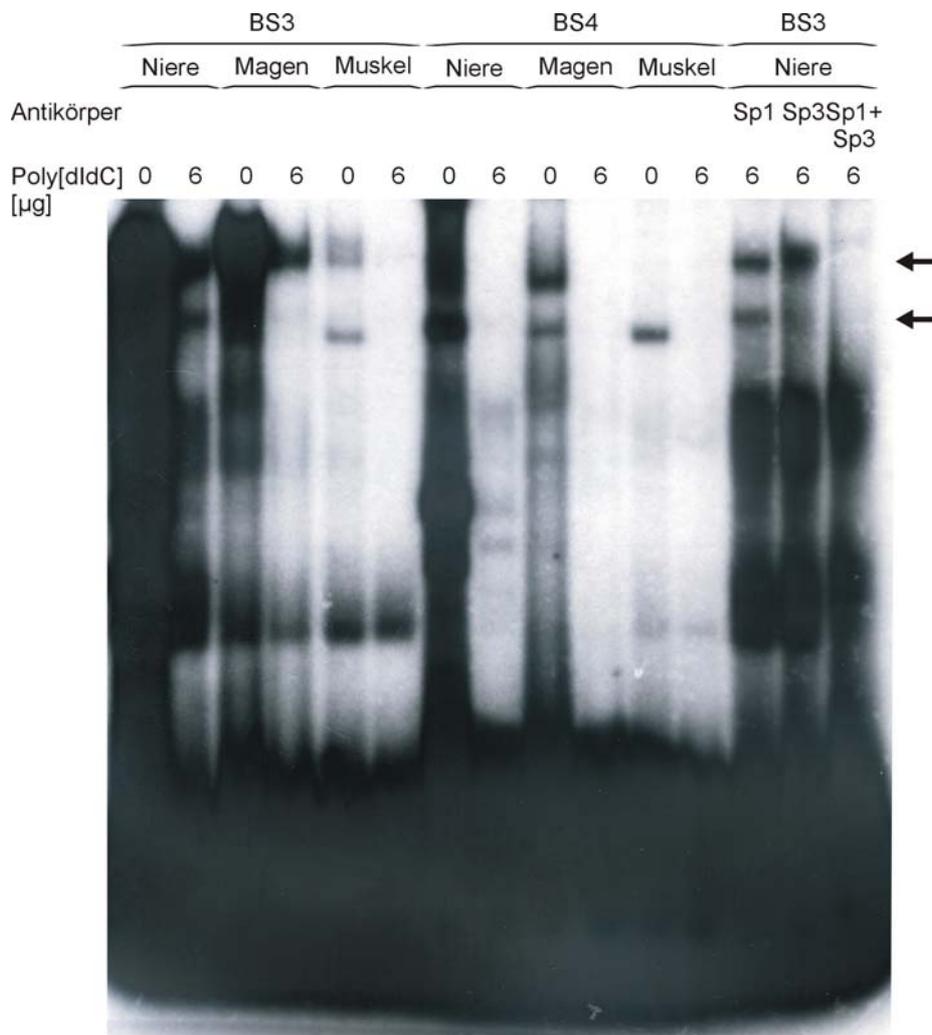


Abb. 14 : Weitere Analyse der Sp-Bindungsstelle C

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide BS3 und BS4 wurden mit jeweils 15 µg Kernproteinen aus Niere, Magen oder Muskel mit oder ohne Zugabe von Poly[dIdC] (6 µg) inkubiert. Für die Inhibitionsreaktionen wurden jeweils 200 ng Antikörper eingesetzt. Die Pfeile markieren die DNA/Proteinkomplexe mit den Sp-Faktoren.

3.3.4 Expression von Sp-Faktoren in *Drosophila* Schneider Zellen

Um die Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an der Regulation von *mFoxq1* nachzuweisen, wurden Expressionsvektoren für beide Transkriptionsfaktoren verwendet, die von Prof. G. Suske, Marburg, zur Verfügung gestellt wurden. In allen Expressionsvektoren ist der cDNA der Actin5C-Promotor vorgeschaltet. Der Vektor pPACSp1 enthält die *Sp1*-cDNA, die für das 778 Aminosäuren umfassende Protein kodiert, die Vektoren pPACUSp3 und pPACSp3 enthalten die *Sp3*-cDNA. Im Vektor pPACUSp3 ist der SP3-cDNA-Sequenz ein künstliches ATG vorgeschaltet, so dass das vollständige 697 Aminosäuren umfassende Sp3 Protein gebildet wird. Dem Vektor pPACSp3 fehlt dieses ATG, so dass nur ein verkürztes Sp3-Protein gebildet wird, dem eine der beiden Aktivierungsdomänen fehlt (G. Suske, persönliche Mitteilung). Dieses verkürzte Protein wird im Folgenden mit Sp3* bezeichnet.

Die Expressionsvektoren wurden in zwei verschiedenen Versuchen eingesetzt. Zum einen wurden sie in *Drosophila* Schneider-Zellen (Zelllinie SL2; Schneider (1972) exprimiert, die selbst keine Sp-Faktoren bilden können (Ahlgren et al., 1999; Suske, 2000). Aus transfektierten und nicht transfektierten Zellen wurden Kernproteine isoliert, die in Gel Retardation Experimenten eingesetzt wurden. Zum anderen wurden die Schneider-Zellen mit den Expressionsvektoren und den Luciferasekonstrukten aus 3.3.2 kotransfektiert und die Aktivität der Luciferase bestimmt.

3.3.4.1 Gel Retardation Assay mit Kernproteinen aus SL2-Zellen

Bei den Gel Retardation Experimenten wurden 15 µg Kernproteine aus transfektierten und nicht transfektierten SL2-Zellen mit den markierten Oligonukleotiden BS3 und BS10 inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Kernproteine aus Niere eingesetzt. Auf der Autoradiographie ist deutlich zu erkennen, dass mit Kernproteinen aus nicht transfektierten SL2-Zellen keine DNA/Proteinkomplexe gebildet werden, die denen mit Nierenproteinen entsprechen (Abb. 15). Der zu erkennende Komplex wird mit einem kleineren Protein gebildet. Bei Verwendung von Kernproteinen aus pPACSp1 bzw. pPACUSp3 transfektierten SL2-Zellen ist dagegen ein deutlicher Komplex zu

erkennen, der die gleiche Größe hat wie der DNA/Proteinkomplex mit Kernproteinen aus Nierengewebe. Bei der Intensität der Banden zeigen sich Unterschiede. Während an der Bindungsstelle C (entsprechend BS3) nur eine schwache Sp3-Bindung zu erkennen ist, ist diese an der Bindungsstelle B (BS10) stärker ausgeprägt. Sp1 bindet an beide Bindungsstellen.

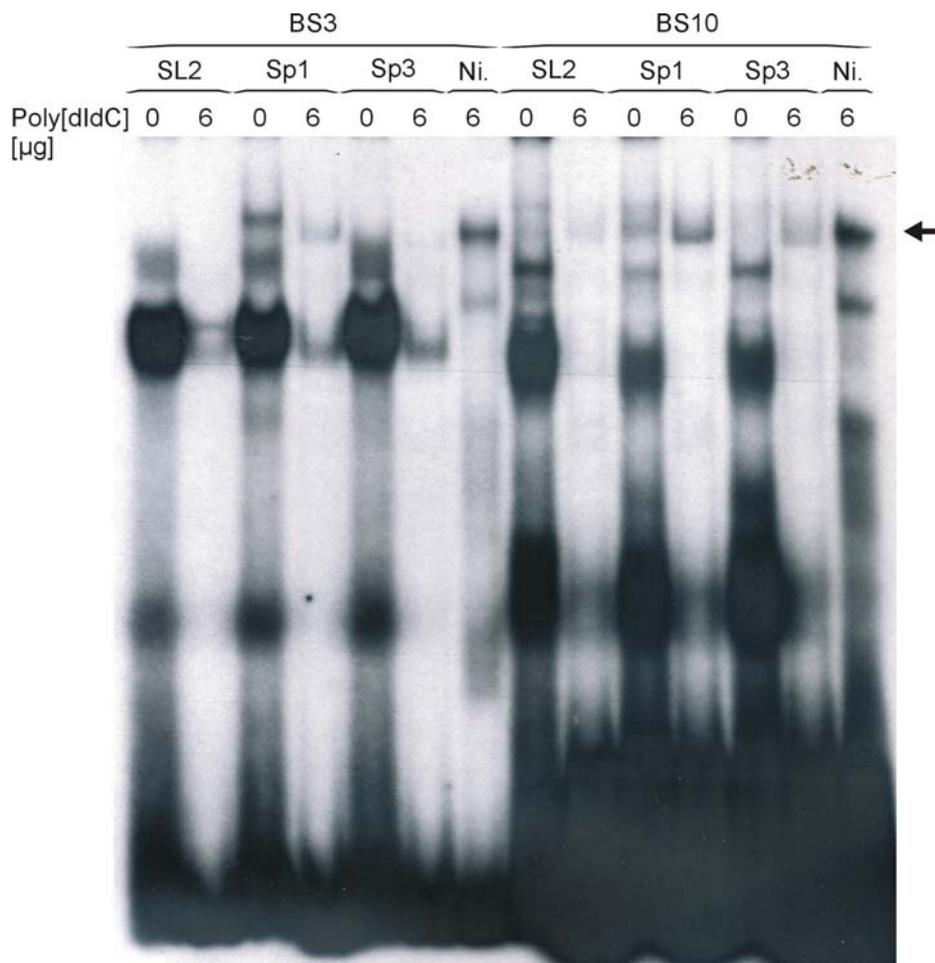


Abb. 15 : Gel Retardation Assay mit Kernproteinen aus SL2-Zellen

15 µg Kernproteine aus transfektierten und nicht transfektierten SL2-Zellen sowie aus Niere wurden mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden BS3 und BS10 inkubiert. Zur Kompetition wurden 6 µg Poly[dIdC] eingesetzt. Der Pfeil weist auf die spezifischen DNA/Protein-Komplexe mit Sp1 und Sp3.

SL2, Kernproteine aus nicht transfektierten SL2-Zellen; Sp1, Kernproteine aus pPACSp1-transfektierten SL2-Zellen; Sp3, Kernproteine aus pPACU-Sp3-transfektierten SL2-Zellen; Ni., Kernproteine aus Nierengewebe

3.3.4.2 Reporterassays unter Verwendung von Sp-Expressionsvektoren

Konnte bisher gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den *mFoxq1*-Promotor binden können, so sollte abschließend untersucht werden, ob diese Faktoren auch in der Lage sind, im *in vitro* Modell ein vom *mFoxq1*-Promotor reguliertes Gen zu aktivieren.

Dazu wurden die Luciferasekonstrukte aus 3.3.2 in *Drosophila* Schneiderzellen mit unterschiedlichen Kombinationen der Sp-Expressionsvektoren kotransfiziert. Dabei wurden jeweils 1 µg Luciferasevektor, 1 µg Sp-Expressionsvektor und 0,05 µg Kontrollvektor transfiziert. Zur Normalisierung der Messwerte bezüglich Zellzahl und Transfektionseffizienz konnte hier nicht der Kontrollvektor pRL-SV40 genutzt werden, da der SV40-Promotor selbst von Sp1 reguliert wird (Dyran und Tjian, 1983). Daher wurde der Vektor p97b (Prof. G. Suske, Marburg) benutzt, der das β -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle des copia-Elements enthält. Das copia-Element ist ein 5 kb großes Retrotransposon aus *Drosophila melanogaster*, das als Promotor agieren kann und sehr hohe Transkriptionsraten induziert (Saunders et al., 1989). Der Galaktosidase-Assay wurde wie beschrieben (2.22) durchgeführt.

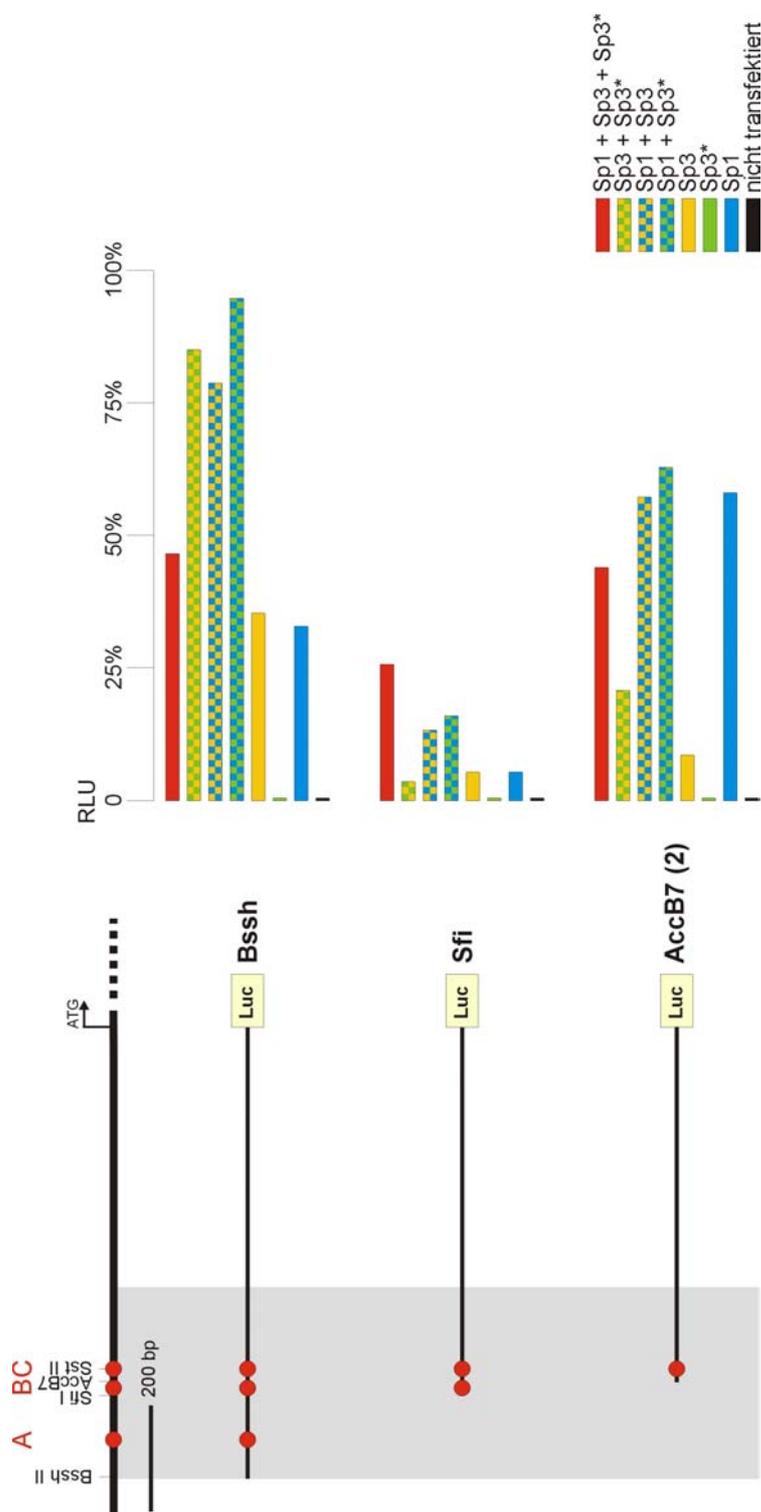


Abb. 16 : Luciferaseassay zur Analyse der drei verschiedenen Sp-Bindungsstellen
Drosophila Schneiderzellen wurden mit den Konstrukten pLucBssh, pLucSfi und pLucAccB7(2) sowie mit verschiedenen Kombinationen der Expressionsvektoren pACSp1, pACSp3 und pACUSp3 transfiziert. Die höchste gemessene Lichteinheit (RLU) wurde 100% gesetzt und alle anderen Werte daran orientiert. Die relativen Lichteinheiten sind mit farbigen Balken dargestellt: schwarz (ohne Sp-Faktor), blau (pACUSp1), grün (pACUSp3), orange (pACSp3) und Kombinationen davon. Die RLU nach der Kotransfektion mit allen drei Sp-Faktoren ist rot gekennzeichnet.

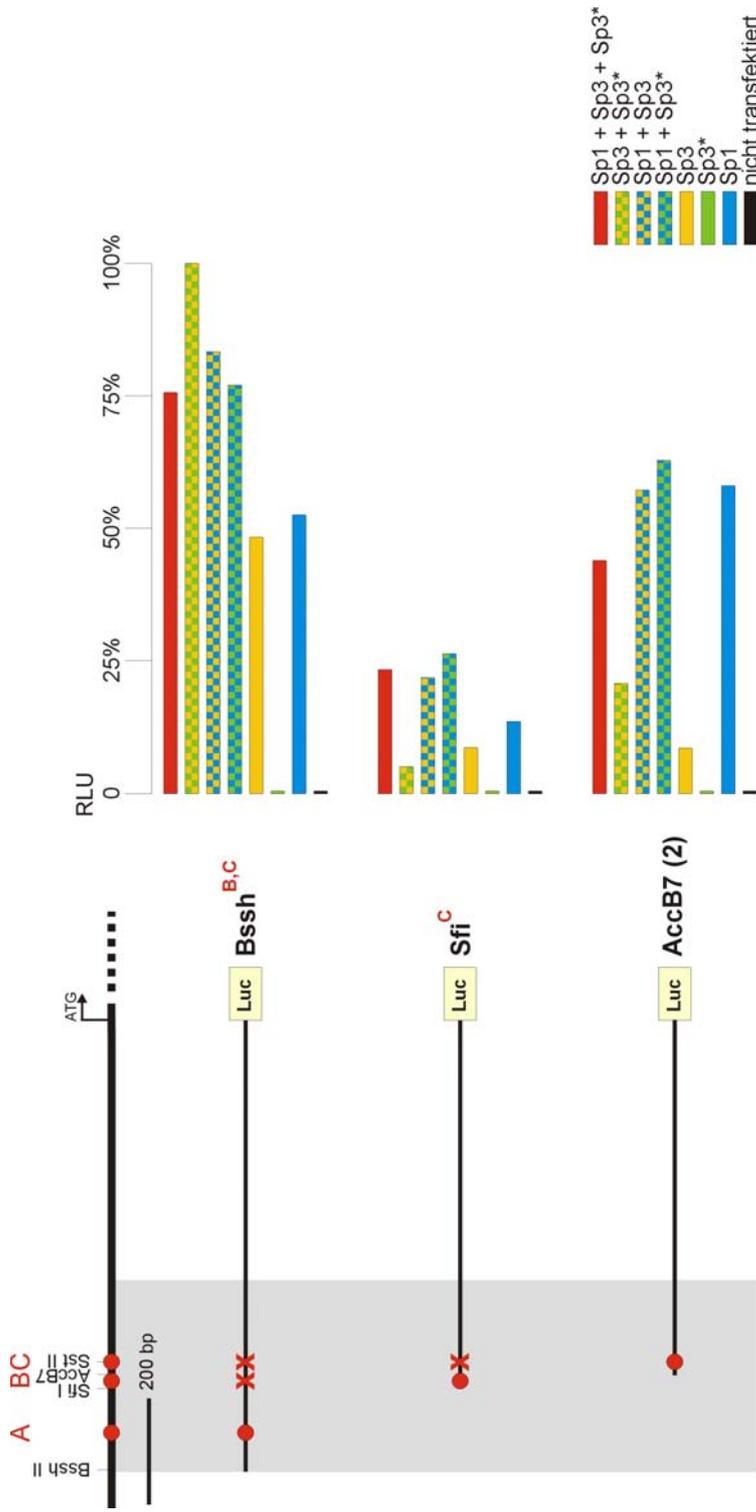


Abb. 17 : Luciferaseassay zur Analyse der drei verschiedenen Sp-Bindungsstellen
Drosophila Schneiderzellen wurden mit den Konstrukten pLucBssh^{B,C}, pLucSfi^C und pLucAccB7(2) und verschiedenen Kombinationen der Expressionsvektoren pACSp1, pACSp3 und pACUSp3 transfiziert. Die höchste gemessene Lichteinheit (RLU) wurde 100% gesetzt und alle anderen Werte daran orientiert. Die relativen Lichteinheiten sind mit farbigen Balken dargestellt: schwarz (ohne Sp-Faktor), blau (pACUSp1), grün (pACUSp3), orange (pACSp3) und Kombinationen davon. Die RLU nach Kotransfektion mit allen drei Sp-Faktoren ist rot gekennzeichnet.

3.3.5 Hefe One Hybrid System

Die Ergebnisse der Luciferaseexperimente (3.3.2) ließen vermuten, dass nicht nur Sp1 und Sp3 an der Regulation von *mFoxq1* beteiligt sind. Insbesondere die Ergebnisse der Kontrolltransfektionen in MA10-Zellen (Abb. 9) ließen den Schluss zu, dass zumindest ein negativ regulierender Transkriptionsfaktor an den *mFoxq1*-Promotor bindet.

Um weitere Gene zu identifizieren, die in die Regulation von *mFoxq1* involviert sind, wurde ein Hefe One Hybrid Screen durchgeführt (2.24.1). Meistens wird dabei das „klassische“ Verfahren angewendet, bei dem eine putative Bindungsstelle in dreifacher Kopie vor ein Reporter gen kloniert wird. Dagegen beschrieben Wei et al. (1999) die Möglichkeit, im One Hybrid Konstrukt ein größeres Promotorfragment, das unterschiedliche Bindungsstellen beinhaltet, in einfacher Kopie zu verwenden. Damit entspricht dieses Konstrukt auch eher den natürlichen Gegebenheiten. Für den One Hybrid Screen zur Untersuchung des *mFoxq1*-Promotors wurde das Verfahren nach Wei et al. (1999) angewendet.

Für die Analyse des *mFoxq1*-Promotors wurde die Region –580 bis –850 bp vor ATG benutzt, die nach den Ergebnissen der Reporter genassays alle wichtigen Bindungsstellen enthält. Dazu wurde in den Vektor pLucBssh (3.3.2) mittels ortsspezifischer Mutagenese an Position –579 bis –584 eine *XbaI*-Schnittstelle eingeführt. Mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* (Schnittstelle im Vektor, 5' der *BssHI*-Schnittstelle des *mFoxq1*-Promotors lokalisiert) und *XbaI* wurde ein 270 bp-Fragment herausgeschnitten und in die Vektoren pHisi und pHisi1 kloniert. Nach der Transformation von *E. coli* DH5 α wurde ein positiver Klon identifiziert (pHisi^{*mFoxq1*}), der das *mFoxq1*-Promotorfragment im Vektor pHisi enthielt.

Das Plasmid pHisi^{*mFoxq1*} wurde mit *XhoI* linearisiert und über die nichttranslatierten Bereiche in das Hefegenom von *Saccharomyces cerevisiae* YM4271 integriert. Durch das im pHisi enthaltene Histidingen sollten Hefeklone, die den Vektor ins Genom integriert haben, in der Lage sein, selbst Histidin zu bilden und auf His-Mangelplatten zu wachsen. Daher wurden die Hefeklone zur Kontrolle der Integration auf Histidin-Mangelplatten selektioniert. Beim anschlie-

ßenden 3-Aminotriazoltest (2.24.4), bei dem der dem Histidin-Gen vorgeschaltete Minimalpromotor durch Zugabe von 3-Aminotriazol inhibiert wird, waren die Klone 7 und 8 schon bei einer 3-Aminotriazol-Konzentration von 15 mM nicht mehr in der Lage zu wachsen. Daher wurde für die weitere Analyse Klon 7 verwendet.

Die „Mouse Kidney MATCHMAKER cDNA Library“ (Clontech, Palo Alto, USA) besteht aus pACT2-Plasmiden, die für Fusionsproteine, bestehend aus einer Aktivierungsdomäne und jeweils verschiedenen Fragmenten einer murinen Nieren-cDNA-Bibliothek, codieren. Der Titer der cDNA-Bibliothek wurde bestimmt und die Plasmid-DNA durch eine Giga-Präparation isoliert (2.14.2).

Anschließend wurde Klon 7 mit 20 µg dieser Plasmid-DNA transfektiert. Bei positiver Interaktion eines Fusionsproteins mit dem *mFoxq1*-Promotorfragment sollten das *His3*-Gen aktiviert und die Klone auf Histidin/Leucin-Mangelplatten selektioniert werden. Insgesamt wurden 202 Klone identifiziert, die auf diesen Mangelmediumplatten wuchsen. Nach wiederholter Überprüfung durch nochmaliges Ausplattieren der Klone auf Histidin/Leucin-Mangelplatten wurden fünf Klone als positiv bewertet. Aus diesen fünf Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und in elektrokompente *Epicurian coli* Sure Zellen transformiert. Anschließend wurde die DNA aus den Bakterien isoliert und sequenziert. Trotz verschiedener Modifikationen (Zusatz verschiedener Volumina DMSO, vorherige Linearisierung des Plasmids, Verkürzung des Plasmids durch Restriktionsspaltung mit *XhoI* und *ScaI*) war eine Sequenzierung der fünf Plasmide nicht möglich.

3.4 Expression von *hFOXQ1*

Das Gen *mFoxq1* zeigt eine starke Expression in Magen und Niere, eine deutlich schwächere in Leber, Lunge, Darm, Gehirn und Testis (Frank und Zoll, 1998). Da die Gene *mFoxq1* und *hFOXQ1* sowie die davon abgeleiteten Proteine eine große Homologie zeigen, sollte das Expressionsmuster von *hFOXQ1* untersucht und mit dem von *mFoxq1* verglichen werden. Weiterhin sollte mittels *in situ* Hybridisierung die genaue zelluläre Expression von *mFoxq1* im Magen der Maus untersucht werden.

3.4.1 Vergleich des Expressionsmusters von *mFoxq1* und *hFOXQ1*

Zur Untersuchung des *hFOXQ1*-Expressionsmusters wurde der „Human MTE Array“ (Clontech, Palo Alto, USA) mit einer 627 bp großen *hFOXQ1* 5'-Sonde hybridisiert. Diese Sonde wurde mittels PCR mit den Primern AB6 und AB12 (2.12) am genomischen Klon von *hFOXQ1* hergestellt und umfasst 416 bp der 5' untranslatierten Region sowie die ersten 211 bp nach ATG. Nach einer 30minütigen Vorhybridisierung bei 60°C wurde der Filter üN bei 60°C hybridisiert.



Abb. 18 : Lage der Primer für die Generierung der *hFOXQ1* 5' Sonde
In der schematischen Darstellung des *hFOXQ1*-Gens ist die Lage der verwendeten Primer eingezeichnet. Die kodierende Region ist als weißer Balken eingezeichnet, die *fork head* (fkh) DNA-Bindungsdomäne ist grau hinterlegt.

Nach der Hybridisierung mit der *hFOXQ1* 5' Sonde zeigte sich eine starke Expression des *hFOXQ1*-Gens in Magen, Trachea, Blase und Speicheldrüse (Abb. 19; B5, H7, C8 und E9) und eine signifikante Expression im Duodenum, in der Prostata und in der fötalen Leber (Abb. 19; C5, E8 und D11). In allen Gehirn-Geweben, Ösophagus, Appendix, Colon ascendens sowie fötaler und adulter Niere und Lunge konnte eine schwache *hFOXQ1*-Expression gezeigt werden (Abb. 19; Spalten 1-3, A5, G5, H5, C11, A7, G11, A8). In anderen Geweben, darunter Herz, Skelettmuskel, Milz, Thymus und adulte Leber (Abb. 19; A4, B7, C7, D7 und A9), konnte keine *hFOXQ1*-Expression nachgewiesen werden. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit dem Expressionsmuster des murinen *mFoxq1*-Gens, allerdings ist die Expression von *mFoxq1* in der Niere deutlich stärker und in der adulten Leber der Maus konnte eine schwache *mFoxq1* Expression nachgewiesen werden (Frank und Zoll, 1998).

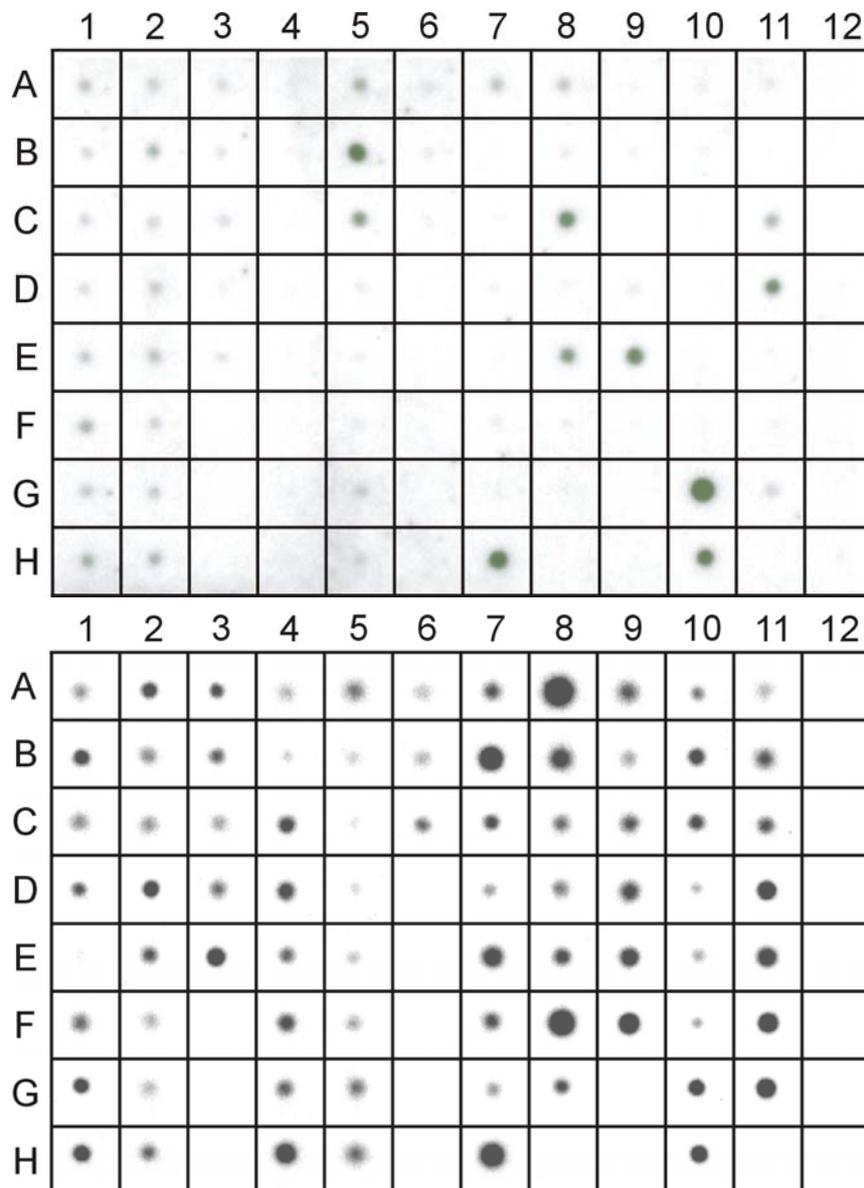


Abb. 19 : Hybridisierung des MTE Multiple Tissue Array (Clontech, Palo Alto, USA)

oben Hybridisierung mit der *hFOXQ1* 5'-Sonde; **unten** Hybridisierung mit einer humanen Ubiquitin-Sonde.

Anordnung der RNA-Proben auf dem Array: A1, Gesamt-Hirn; B1, Hirnrinde; C1, Frontallappen; D1, Parietallappen; E1, Occipitallappen; F1, Temporallappen; G1, Gyrus paracentralis; H1, Pons; A2, Cerebellum, links; B2, Cerebellum, rechts; C2, Corpus callosum; D2, Amygdala; E2, Nucleus caudatus; F2, Hippocampus; G2, Medulla oblongata; H2, Putamen; A3, Substantia nigra; B3, Nucleus accumbens; C3, Thalamus; D3, Hypophyse; E3, Rückenmark; A4, Herz; B4, Aorta; C4, Vorhof, links; D4, Vorhof, rechts; E4, Kammer, links; F4, Kammer, rechts; G4, Kammerscheidewand; H4,

Herzspitze; A5, Ösophagus; B5, Magen; C5, Duodenum; D5, Jejunum; E5, Ileum; F5, Ileocoecum; G5, Appendix; H5, Colon ascendens; A6, Colon transversum; B6, Colon descendens; C6, Rectum; A7, Niere; B7, Skelettmuskel; C7, Milz; D7, Thymus; E7, periphere Leukocyten; F7, Lymphknoten; G7, Knochenmark; H7, Trachea; A8, Lunge; B8, Plazenta; C8, Blase; D8, Uterus; E8, Prostata; F8, Hoden; G8, Ovar; A9, Leber; B9, Pankreas; C9, Nebenniere; D9, Schilddrüse; E9, Speicheldrüse; F9, Mamma; A10, Promyelozyten-Leukämie, Zelllinie HL-60; B10, Zelllinie Hela S3; C10, Chronische myeloische Leukämie, Zelllinie K-562; D10, Lymphoblastische Leukämie, Zelllinie MOLT-4; E10, Burkitt's Lymphom, Zelllinie Raji; F10, Burkitt's Lymphom, Zelllinie Daudi; G10, Colorectales Adenokarzinom, Zelllinie SW480; H10, Lungenkarzinom, Zelllinie A549; A11, fötales Gehirn; B11, fötales Herz; C11, fötale Niere; D11, fötale Leber; E11, fötale Milz; F11, fötaler Thymus; G11, fötale Lunge; A12, Hefe Gesamt-RNA; B12, Hefe tRNA; C12, *E. coli* rRNA; D12, *E. coli* DNA; E12, Poly r(A); F12, menschliche c₀t-1 DNA; G12, menschliche DNA (100 ng); H12, menschliche DNA (500 ng)
Alle Zelllinien stammen von der American Type Culture Collection (ATCC).

3.4.2 Überexpression in Karzinomen

In den Zelllinien eines Alveolar- und eines Adenokarzinoms des Colons wurde eine verstärkte Expression von *hFOXQ1* festgestellt. Um zu untersuchen, ob diese Überexpression auch im Tumorgewebe vorhanden ist, wurde ein Northern Blot mit normaler und Tumor-RNA von Patienten mit Lungen- bzw. Adenokarzinom des Colons durchgeführt. Die Gewebeprobe wurden von Prof. L. Füzesi (Abt. Gastroenteropathologie der Universitätsklinik Göttingen) zur Verfügung gestellt. Jeweils 10 µg der frisch präparierten Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und üN geblottet. Nach der Hybridisierung mit der 627 bp *hFOXQ1* 5'-Sonde (3.4.1) ist die Überexpression im Tumorgewebe von Colon- und Lungenkarzinomen deutlich erkennbar (Abb. 20).

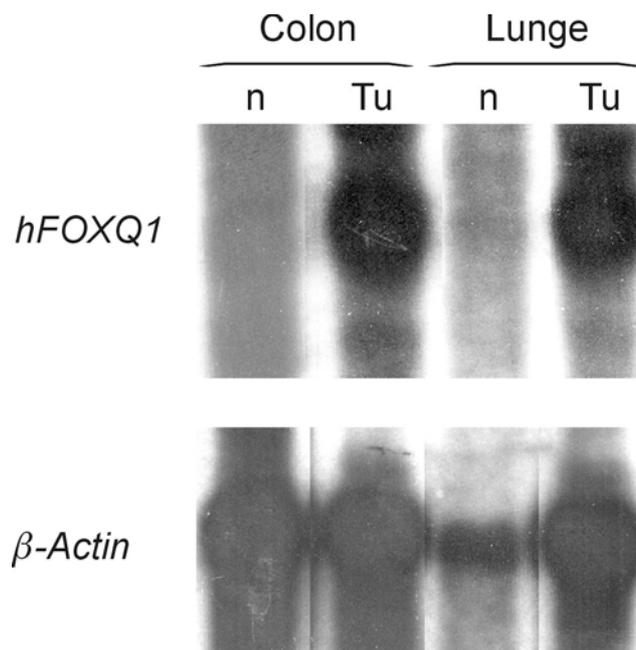


Abb. 20 : Überexpression von *hFOXQ1* in Karzinomen

Je 10 µg Gesamt-RNA aus normaler Colonschleimhaut (Colon, n), aus einem Adenokarzinom (Colon, Tu), aus normaler Lunge (Lunge, n) und aus einem Alveolarkarzinom (Lunge, Tu) wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer Sonde für *hFOXQ1* (oben) und *β-Actin* (unten) hybridisiert.

3.4.3 Zellspezifische Expression: *in situ* Hybridisierung

Die Expressionsanalyse des menschlichen *hFOXQ1*-Gens bestätigte die starke Expression im Magen, die bereits für das *mFoxq1*-Gen gezeigt wurde. Nachdem die zellspezifische Expression von *mFoxq1* in der Niere bereits durch Frank und Zoll (1998) untersucht worden war, sollte nun die zellspezifische Expression von *mFoxq1* im Magen näher untersucht werden. Dazu wurden die Mägen adulter Mäuse (Linie NMRI) präpariert, fixiert und geschnitten. Zur Hybridisierung wurde eine 377 bp umfassende *mFoxq1* 3'-Sonde verwendet. Dazu wurde mit den Primern CL1 und MR-R2 (2.12) ein PCR-Fragment amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Die Richtung des einklonierten Fragments sowie Korrektheit der Sequenz wurden überprüft. Das Plasmid wurde linearisiert und mit den RNA-Polymerasen T7 (anti-sense) und Sp6

(sense) *in vitro* transkribiert. Mit beiden Sonden wurden mehrere Magenschnitte hybridisiert.



Abb. 21 : Lage der Primer für die Generierung der *mFoxq1* 3' Sonde

In der schematischen Darstellung des *mFoxq1*-Gens ist die Lage der verwendeten Primer eingezeichnet. Die kodierende Region ist als weißer Balken eingezeichnet, die *fork head* (fkh) DNA-Bindungsdomäne ist grau hinterlegt.

Das Ergebnis der *in situ* Hybridisierung (Abb. 23) zeigt, dass die Hybridisierungssignale ausschließlich in der Magenschleimhaut und nicht in den darunter liegenden Muskel- und Bindegewebsschichten zu finden sind. Zur genauen Auswertung ist es daher notwendig, sich den Aufbau einer Magendrüse der Schleimhaut anzusehen. In Abb. 22 ist ein Schema einer solchen Drüse abgebildet. Die Magendrüse der Maus wird in vier Regionen (Pit, Isthmus, Neck, Basis) eingeteilt, die durch die in ihr vorkommenden Zelltypen charakterisiert werden (Karam und Leblond, 1992).

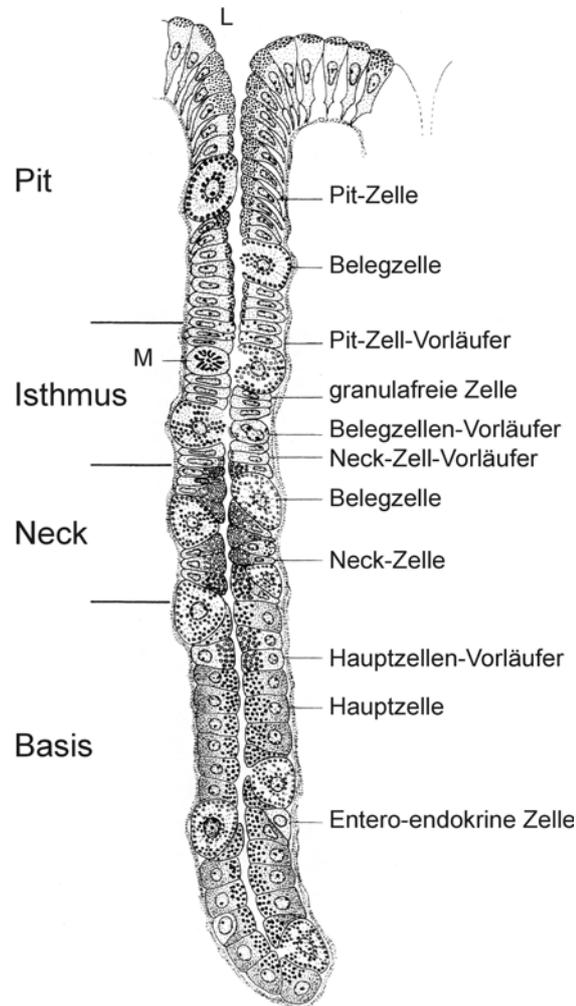


Abb. 22 : Schema einer Magendrüse der Maus

verändert nach Karam und Leblond (1993a). Die Magendrüse wird in 4 Regionen aufgeteilt, die durch die in ihnen vorkommenden Zelltypen charakterisiert werden. Weitere Erläuterungen im Text. M = Zelle in der Mitose, L = Lumen des Magens

Von zentraler Bedeutung ist die Isthmus-Region, in der die granulafreien Zellen zu finden sind, die die Stammzellen des Magens darstellen. Aus diesen Zellen entwickeln sich Vorläuferzellen der in den Magendrüsen vorkommenden Zellen. Sie wandern im Laufe ihrer Differenzierung in die Region, in der sie ihre endgültige Position finden. So wandern die Pit-Zell-Vorläufer in Richtung des Magenslumens und differenzieren sich zu schleimproduzierenden Pit-Zellen aus. Diese stellen den größten Anteil der Zellen in der Pit-Region. Aus den Neck-Vor-

läuferzellen bilden sich während der Wanderung Richtung Basis Neckzellen, die sich noch weiterdifferenzieren können zu Hauptzellen-Vorläufern und schließlich zu Hauptzellen, die den größten Anteil der Zellen in der Basisregion stellen. Die Hauptzellen produzieren den Pepsinvorläufer Pepsinogen. Die Belegzellen-Vorläufer wandern in beide Richtungen und differenzieren sich zu den salzsäureproduzierenden Belegzellen, die in allen vier Regionen vorkommen. Schließlich finden sich in den Magendrüsen noch Entero-endokrine Zellen, die vor allem in der Basis-Region vorkommen, vereinzelt aber auch in den drei anderen Regionen zu finden sind. Auch wenn bisher keine direkten Vorläuferzellen dieser Zelltypen beschrieben wurden, gehen Karam und Leblond (1993c) davon aus, dass auch die Entero-endokrinen Zellen aus den granulafreien Zellen hervorgehen.

Die Übersichtsaufnahme der *in situ* Hybridisierung (Abb. 23 A) zeigt stärker gefärbte Areale sowohl im Bereich der Schleimschicht im Magenlumen als auch in der Basisregion der Magendrüsen. Bei stärkerer Vergrößerung wird deutlich, dass die intensivere Färbung in der Schleimschicht nicht bestimmten Zelltypen zugeordnet werden kann. Während sich die einzelnen Zellen gut gegeneinander abgrenzen lassen, ist die Färbung gleichmäßig verteilt. Darüber hinaus stimmt die Abgrenzung der Färbung nicht mit etwaigen Zellwänden überein. Anders ist die Situation in der Basisregion, hier ist die Färbung klar mit einzelnen Zellen korreliert. Bei 510facher Vergrößerung (Abb. 23 C) sind die gefärbten Hauptzellen deutlich erkennbar, dazwischen liegende Entero-endokrine Zellen und Belegzellen zeigen keine Hybridisierungssignale.

Die Kontrollhybridisierung mit der sense-Sonde zeigt keinerlei Färbung (Abb. 23 D).

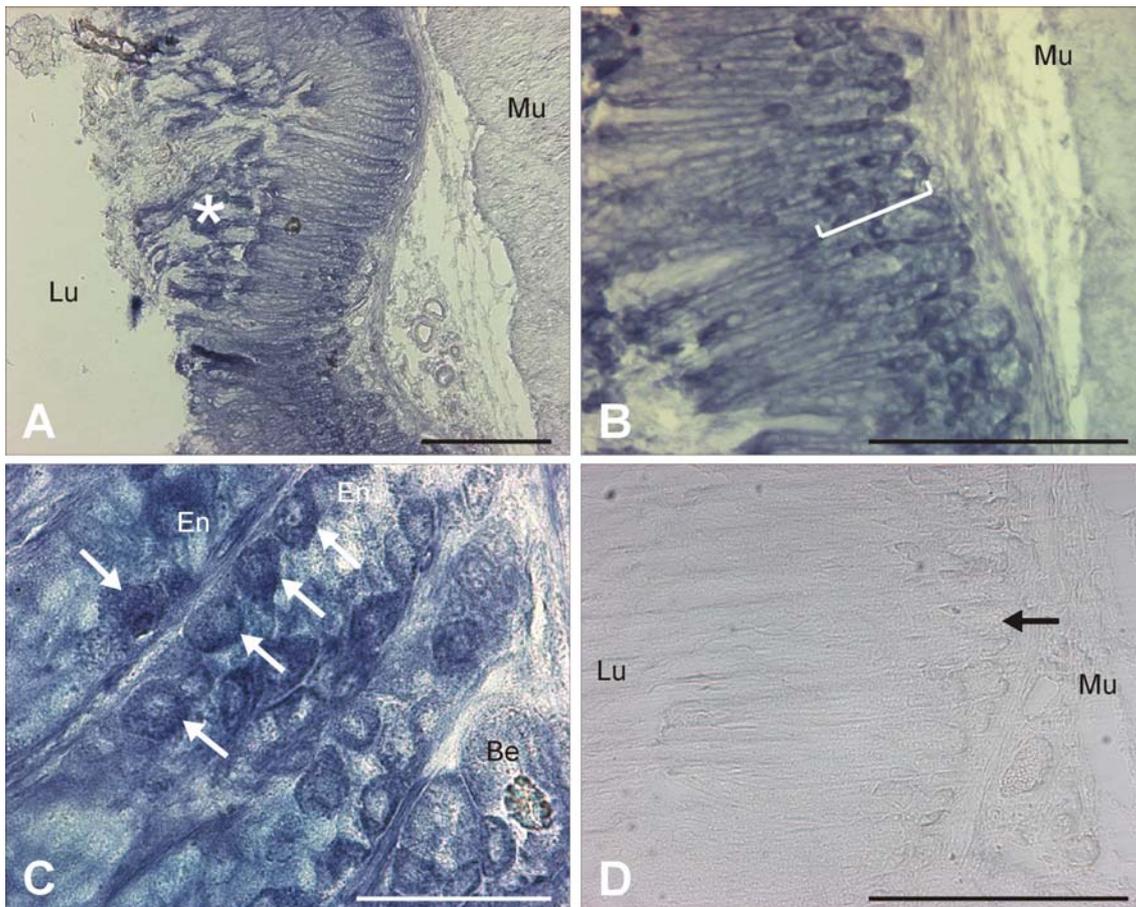


Abb. 23 : Zelluläre Lokalisation von *mFoxq1* im Magen

A Die anti-sense Färbung (85x) zeigt eine deutliche Färbung der Basis der Magendrüsen, die intensivere Färbung in der Schleimschicht (Stern) ist nicht auf die Zellen beschränkt und unspezifisch. Die Muskelschicht ist frei von Hybridisierungssignalen; **B** In der 170fachen Vergrößerung ist zu erkennen, dass die angefärbten Zellen ausschließlich in der Basisregion (weiß markiert) zu finden sind; **C** Bei noch stärkerer Vergrößerung (510x) ist zu erkennen, dass ausschließlich die Hauptzellen angefärbt sind (weiße Pfeile), Entero-endokrine Zellen (En) und Belegzellen (Be) sind ungefärbt; **D** Die Kontrollhybridisierung mit der sense-Sonde (170x) zeigt keinerlei Anfärbungen. Der Pfeil weist auf die Basis der Magendrüse.

Lu = Magenlumen; Mu = Muskelschicht; die schwarzen Messbalken in A, B und D entsprechen 200 µm; der weiße Messbalken in D entspricht 50 µm

3.5 Generierung von *mFoxq1*^{-/-}-Mäusen

Um die Funktion des *mFoxq1*-Gens während der Embryogenese zu untersuchen, sollte ein Knock-out-Mausmodell generiert werden. Dazu wurde zunächst ein Knock-out Vektor kloniert.

3.5.1 Konstruktion des Knock-out Vektors

Das *mFoxq1*-Gen ist ein single-copy Gen und besteht nur aus einem einzelnen Exon. Daher sollte die kodierende Sequenz von 1,2 kb vollständig entfernt werden. Ausgangspunkt für die Generierung des Knock-out Vektors war ein Phagenklon aus einer genomischen Bibliothek der Mauslinie 129/sv, dessen ca. 15 kb umfassendes Insert die vollständige kodierende Sequenz des *mFoxq1*-Gens enthielt (Frank und Zoll, 1998). Durch restriktionsenzymatische Spaltung mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* wurde das 15 kb Insert in zwei Fragmente von 4,8 kb und 10 kb Länge unterteilt, die in den Vektor QuanTox (Qbiogene, Heidelberg) kloniert wurden. Das 4,8 kb große Fragment enthielt die gesamte kodierende Sequenz des *mFoxq1*-Gens, daher konnte das 10 kb große Fragment als 5'-flankierende Region im Knock-out Konstrukt verwendet werden (Abb. 24).

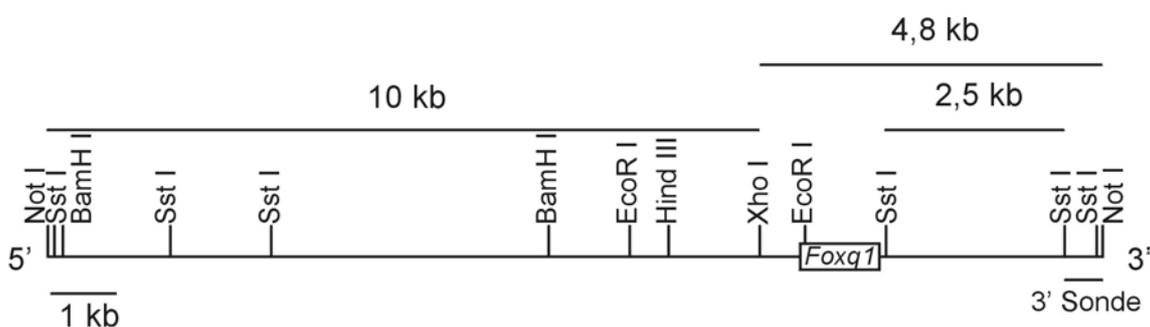


Abb. 24 : Restriktionskarte des 15 kb *mFoxq1*-Phagenklons

Das 4,8 kb *XhoI* / *NotI*-Fragment enthält die gesamte kodierende Sequenz des intronlosen *mFoxq1*-Gens (weißer Balken). Am 3' Ende ist die Position der 453 bp umfassenden externen 3' Sonde eingezeichnet.

Das 4,8 kb große Fragment wurde durch Restriktionsspaltung mit *SstI* in weitere Fragmente unterteilt. Ein 2,5 kb großes Fragment wurde als

3'-flankierende Region verwendet und zunächst in die *Sst*I-Schnittstelle des Vektors pZErO-2 (Invitrogen, Groningen, NL) einkloniert. Diese Schnittstelle wird von einer *Kpn*I und einer *Bam*HI-Schnittstelle flankiert, die für eine gerichtete Umklonierung verwendet wurden. Mehrere Klone wurde sequenziert und ein Klon ausgewählt, bei dem das 2,5 kb-Fragment in 5'→3' Richtung zwischen den Schnittstellen *Bam*HI (5') und *Kpn*I (3') orientiert war. Mit Hilfe dieser Enzyme wurde das Fragment wieder ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pPNT (Tybulewicz et al., 1991) kloniert (pPNT^{4,8}). Anschließend wurde das 10 kb-Fragment in die *Not*I und *Xho*I-Schnittstellen von pPNT^{4,8} kloniert (pPNT^{mFoxq1}). Das 453 bp umfassende *Sst*I-Fragment aus dem 4,8 kb-Fragment wurde in den Vektor QuanTox kloniert und in den folgenden Hybridisierungen als externe 3'-Sonde verwendet.

3.5.2 Herstellung rekombinanter ES-Zellen

Zur Herstellung rekombinanter ES-Zellen wurden die kultivierten ES-Zellen mit 100 µg *Not*I-linearisiertem pPNT^{mFoxq1}-Vektor transfektiert. Bei erfolgreich verlaufener homologer Rekombination wird die gesamte kodierende Sequenz von mFoxq1 durch das Neomycin-Gen ersetzt (Abb. 25). Die im Knock-out-Vektor im 3' Bereich lokalisierte Thymidinkinase wird dabei nicht mitintegriert.

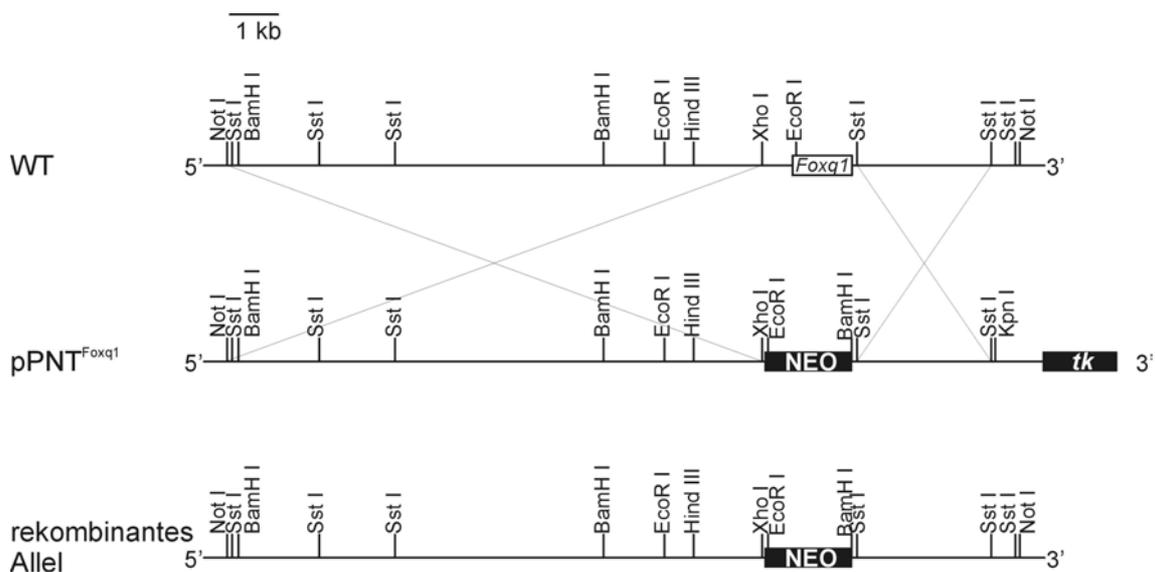


Abb. 25 : Schema der homologen Rekombination

Bei der homologen Rekombination zwischen dem Wildtypallel (WT) und dem Knock-out Vektor pPNT^{mFoxq1} wird im rekombinanten Allel das vollständige *mFoxq1*-Gen durch das Neomycin-Gen ersetzt. Die Thymidinkinase (*tk*) des Knock-out-Vektors wird nicht mitintegriert.

Die transfektierten ES-Zellen wurden zunächst mit Neomycin und Gancyclovir, später nur noch mit Neomycin selektiert. Die erfolgreiche Rekombination wurde durch einen Southern Blot nachgewiesen. DNA aus Wildtypmäusen (Linie 129/sv) sowie aus den verschiedenen Klonen der transfektierten ES-Zellen wurde mit *Bam*HI gespalten und in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und die Membran mit der externen 3' Sonde (Abb. 24) hybridisiert. Die WT-DNA zeigt eine einzelne Bande bei etwa 10 kb, beim rekombinanten Allel wird ein 5 kb kürzeres Fragment erwartet. Bei 220 getesteten Klonen aus drei unabhängigen Transfektionen konnten bisher drei Rekombinationsereignisse nachgewiesen werden. In Abb. 26 ist ein Southern Blot beispielhaft dargestellt. Das verkürzte rekombinante Allel bei Klon 27 ist deutlich zu erkennen.

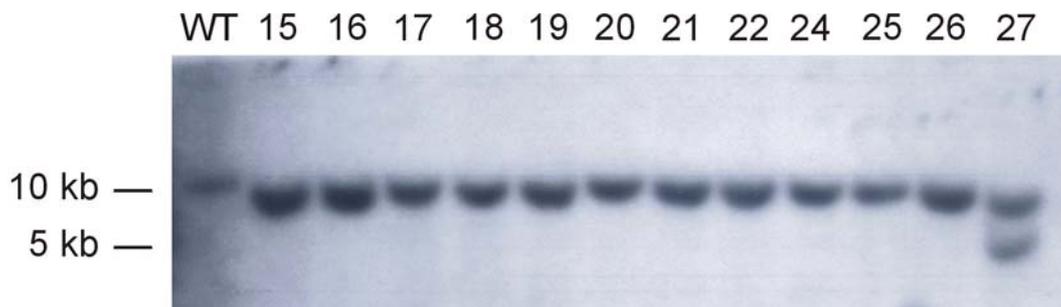


Abb. 26 : Southern Blot zur Detektion rekombinanter ES-Zellen

DNA aus Wildtypmäusen (Linie 129/sv, WT) und aus den ES-Klonen 15 bis 27 wurde mit *Bam*HI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit der externen 3' Sonde. Bei Klon 27 ist unterhalb der 10 kb Wildtyp-Bande die rekombinante 5 kb Bande zu erkennen.

Die korrekte Rekombination wurde durch die Nachhybridisierung mit der Neomycin-Sonde bestätigt. Anschließend wurden die rekombinierten ES-Klone noch einmal kultiviert und erneut DNA gewonnen, um die Rekombination mit Hilfe des Southern Blots noch einmal zu bestätigen.

Aufgrund der beschränkten Zeit durch das Fehlen rekombinanter ES-Zellen nach den ersten beiden Transfektionen war es nicht mehr möglich, die ES-Zellen in Blastozysten zu injizieren.

4 DISKUSSION

4.1 Struktur des *mFoxq1*-Gens

Das *mFoxq1*-Gen ist ein *fork head* Gen, das viele Charakteristika „typischer“ *fork head* Gene aufweist. Das *mFoxq1*-Gen enthält wie das homologe menschliche Gen *hFOXQ1* nur ein Exon (Frank und Zoll, 1998; Bieller et al., 2001). Für das homologe *rFoxQ1*-Gen der Ratte konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es ebenfalls kein Intron besitzt. Auch die meisten anderen *fork head* Gene besitzen keine oder nur sehr wenige Introns. So gehören *Foxb2* (Kaestner et al., 1996b), *Foxc1* (Hiemisch et al., 1998), *Foxc2* (Winnier et al., 1997), *Foxd2* (Kaestner et al., 1996a; Wu et al., 1998) und *Foxl1* (Kaestner et al., 1996a) ebenfalls zu den intronlosen *fork head* Genen, während *Foxa1*, *Foxa3* (Kaestner et al., 1994) und *Foxb1* (Kaestner et al., 1996b) ein Intron besitzen. *Foxn1* bildet mit 8 Introns eine große Ausnahme (Nehls et al., 1994).

Mit einer Größe von 400 Aminosäuren ist das *mFoxq1* Protein durchschnittlich groß. Die meisten Winged Helix Proteine umfassen zwischen 400 und 500 Aminosäuren, es wurden aber auch einige kleinere und größere Winged Helix Proteine beschrieben. So ist das *Foxb1* Protein (Kaestner et al., 1996b) lediglich 325 Aminosäuren groß, während das *Foxm1* Protein (Korver et al., 1997) mit 757 Aminosäuren das größte bisher identifizierte murine Winged Helix Protein darstellt. Das homologe Rattenprotein zu *mFoxq1*, *rFoxQ1*, umfasst 400 Aminosäuren, während das humane *hFOXQ1* Protein drei Aminosäuren größer ist. Ein geringer Unterschied in der Proteingröße zwischen homologen Proteinen ist bei den Winged Helix Proteinen nicht ungewöhnlich. Auch die humanen Proteine *FOXA1*, *FOXC2* und *FOXD2* sind 5 bis 7 Aminosäuren größer als die homologen Mausproteine, dagegen sind die humanen *FOXB1* und *FOXA3* Proteine gleich groß bzw. 5 Aminosäuren kleiner als die entsprechenden Mausproteine.

Die DNA-Bindungsdomäne der drei untersuchten Proteine *mFoxq1*, *rFoxQ1* und *hFOXQ1* ist identisch, während die Identität der Aminosäuren des

gesamten Proteins 82% (Maus-Mensch) bzw. 95% (Maus-Ratte) beträgt. Die höhere Homologie der Mausproteine zu den Rattenproteinen verglichen mit Maus- zu Menschproteinen trifft auch auf andere Winged Helix Proteine zu. So liegt die Identität der Aminosäuren des Foxa3 Proteins im Vergleich zu den homologen Proteinen von Mensch und Ratte bei 87% bzw. 94%, bei Foxd2 beträgt die Identität 88% bzw. 93%. Wie bei mFoxq1 ist die DNA-Bindungsdomäne in den meisten Winged Helix Proteinen etwa in der Mitte des Proteins angeordnet, allerdings finden sich auch hier Ausnahmen. So ist bei den Proteinen Foxb1, Foxb2 (Kaestner et al., 1996b) und Foxf1 (Hellqvist et al., 1996) die DNA-Bindungsdomäne am aminoterminalen Ende des Proteins lokalisiert.

Das mFoxq1 Protein besitzt außer der DNA-Bindungsdomäne noch zwei weitere, etwa 30 Aminosäuren umfassende Regionen, die zwischen den homologen Proteinen der drei Spezies konserviert sind. Die beiden Regionen flankieren die DNA-Bindungsdomäne und sind durch 60 bzw. 33 Aminosäuren von ihr getrennt. Beide Regionen sind reich an Serinen, Glycinen und sauren Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure). Diese Aminosäuren sind charakteristisch für Aktivierungsdomänen in Transkriptionsfaktoren (Mitchell und Tjian, 1989). Entsprechende Aktivierungsdomänen finden sich auch in vielen anderen Winged Helix Proteinen, z. B. in den Proteinen Foxf1 (Mahlpuu et al., 1998) und Foxf2 (Blixt et al., 1998; Hellqvist et al., 1998). Obwohl das mFoxq1 Protein diese putativen Aktivierungsdomänen besitzt, beschrieben Hoggatt et al. (2000) mFoxq1 als Repressor. Im Rahmen ihrer Promotorstudien von Genen, die spezifisch in der glatten Muskulatur exprimiert werden, führten sie einen Hefe One Hybrid Screen durch. Bei Verwendung eines Promotorfragments des Telokin-Gens identifizierten sie dabei das *mFoxq1*-Gen. In Transfektionsexperimenten mit der Zelllinie A10, die aus glatter Muskulatur stammt, konnten sie zeigen, dass mFoxq1 die Gene für Telokin, SM22 α , smMHC (smooth muscle myosin heavy chain) und sm α -Actin herunterreguliert.

Aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten und Unterschiede werden die *fork head* Gene in verschiedene Untergruppen eingeteilt (Kaufmann und Knöchel, 1996) und nach der einheitlichen Nomenklatur (Kaestner et al., 2000) mit Buch-

staben gekennzeichnet („*FoxA*“). Sehr eng verwandte *fork head* Gene werden der selben Untergruppe zugeteilt und mit zusätzlichen Ziffern voneinander unterschieden („*FoxA1*“). In seltenen Fällen werden die Gene auch noch durch einen weiteren Buchstaben von den verwandten Genen unterschieden („*FoxA4a*“). In der Untergruppe A sind beispielsweise bei der Maus die Gene *Foxa1*, *Foxa2* und *Foxa3* bekannt (Kaestner et al., 1994), außerdem wurden beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* noch die Gene *FoxA4a* und *FoxA4b* (Dirksen und Jamrich, 1992; Knöchel et al., 1992) und bei der Seescheide *Ciona intestinalis* das Gen *FoxA5* (Corbo et al., 1997) beschrieben. Auch in fast allen anderen Untergruppen der *fork head* Gene existieren wenigstens zwei eng verwandte Gene.

Von verschiedenen eng verwandten *fork head* Genen ist bekannt, dass sie sich in ihrem Expressionsmuster überlappen, teilweise ähnliche Funktionen haben oder die Funktion der verwandten Gene übernehmen können. So wurde gezeigt, dass Knock-out-Mäuse für *Foxc1* und *Foxc2* ähnliche Nieren- und Herzfehlbildungen zeigen. Entsprechende Fehlbildungen wurden auch bei *Foxc1/Foxc2* doppelt heterozygoten Mäusen beobachtet (Kume et al., 2000b; Winnier et al., 1999). Zur Erklärung des normalen Phänotyps der *Foxa3* Knockout-Mäuse wird eine Übernahme der *Foxa3*-Funktion durch die verwandten Proteine *Foxa1* und *Foxa2* diskutiert (Kaestner et al., 1998).

Die Fox-Untergruppe Q ist bisher die einzige, in der in mehreren Spezies nur ein einzelnes Gen beschrieben wurde. Damit stellen das *mFoxq1*-Gen und seine Homologen bei Ratte und Mensch eine Besonderheit dar. Allerdings gibt es noch einzelne *fork head* Gene, die bisher erst in einer oder zwei Spezies identifiziert wurden und die daher noch nicht in die Fox-Klassifikation eingeordnet wurden. Dazu gehören z. B. die Maus-Gene *Fkh10* (Hulander et al., 1998), *fkh3* (Kaestner et al., 1993) und *PFrk* (Treier et al., 1998). Unter der Internetadresse <http://www.biology.pomona.edu/fox.html> ist der aktuelle Stand der Fox-Nomenklatur zu finden.

4.2 Promotoranalyse

Für die Initiation und Aktivierung der Transkription sind konstitutive Promotorelemente notwendig, die bei vielen eukaryontischen Genen in einem Bereich von etwa 100 bp 5' des Transkriptionsstartpunktes liegen (Lewin, 1990). Zu diesen Promotorelementen gehören z. B. die TATA-Box und die CAAT-Box. An der gewebespezifischen Regulation der Transkription können weitere Faktoren beteiligt sein, die an spezifische Bindungsstellen, die in einem Bereich von >100 bp 5' des Transkriptionsstarts lokalisiert sind, binden.

Innerhalb der Promotorsequenzen der Gene *mFoxq1* und *hFOXQ1* liegt ein etwa 370 bp umfassender Bereich mit hoher Homologie, der etwa 500 bp vor ATG beginnt. Die Computeranalyse zeigt in diesem Bereich Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter MZF1 (Myeloid Zink-Finger 1), NF-Y (Nuclear Factor Y), Faktoren der Sp-Familie sowie die Bindungssequenz für Foxq1. Dagegen konnte im *mFoxq1* Promotor keine TATA-Box identifiziert werden.

MZF-1 ist ein Transkriptionsfaktor der Zinkfinger-Familie, der vor allem im Rückenmark exprimiert und als Repressor beschrieben wird (Morris et al., 1994; Perrotti et al., 1995). Die Reporter-Experimente mit der Kontrollzelllinie MA10 zeigen, dass nach Transfektion mit dem 691 bp *mFoxq1*-Promotorsequenz beinhaltenden Konstrukt pLucSfi die Luciferase aktiviert wird. Nach Transfektion des Konstruktes pLucBssh, das 849 bp des *mFoxq1*-Promotors beinhaltet, geht die Luciferase-Expression deutlich zurück. Daher liegt nahe, dass in dem 158 bp umfassenden Sequenzabschnitt, der die beiden Konstrukte unterscheidet, zumindest ein Repressor bindet, der an der zellspezifischen Expression von *mFoxq1* beteiligt ist. Da die MZF-1-Bindungsstelle innerhalb dieses 158 bp-Abschnittes liegt ist nicht auszuschließen, dass in den MZF-1 exprimierenden Geweben dieser Transkriptionsfaktor die Expression von *Foxq1* reprimiert.

NF-Y besteht aus drei Untereinheiten, deren Proteine jeweils glutaminreiche und serin-threoninreiche Domänen besitzen (Hooft van Huijsduijnen et al., 1987). NF-Y bindet an die CAATT-Box, wirkt als Aktivator und ist z. B. an der Regulation von Albumin (Mantovani et al., 1992) und β -Actin (Danilition et al.,

1991) beteiligt. Für eine Reihe von Genen wurde außerdem ein Zusammenwirken von NF-Y und Sp-Faktoren bei ihrer Regulation beschrieben. So wurde für die Gene der Carnitinpalmitoyltransferase I (*CPT-I α* ; Steffen et al. (1999) und der Fettsäuresynthase (Roder et al., 1999) eine Interaktion von NF-Y und Sp1 gezeigt, an der Regulation des Gens für die extrazelluläre signalabhängige Proteinkinase 2 (*ERK2*) sind NF-Y und Sp3 beteiligt (Sugiura und Takishima, 2000). Auch für die Regulation des *mFoxq1*-Gens ist ein solches Zusammenwirken denkbar.

Bindungsstellen für Sp-Faktoren sind in TATA-losten Promotoren sehr verbreitet (Pugh und Tjian, 1990). Für die Initiation der Transkription durch Sp1 ist allerdings die Bindung von Sp1 an einen Koaktivator und einen weiteren Faktor notwendig, die den Kontakt zum Transkriptionsinitiationskomplex herstellen (Abb. 27).

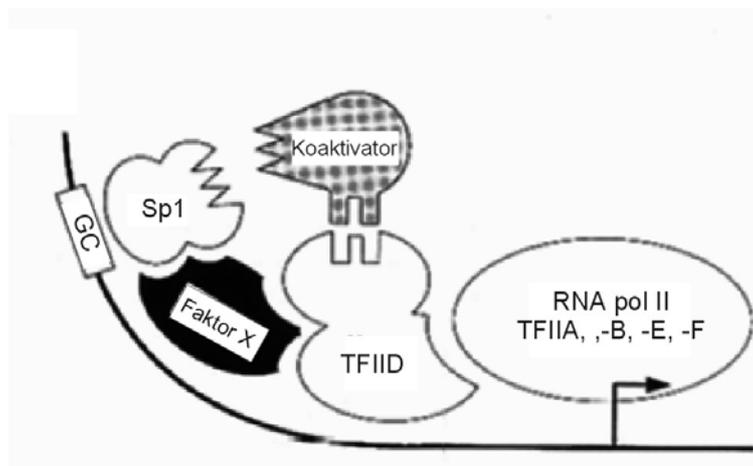


Abb. 27 : Schematisches Modell für die Sp1-vermittelte Aktivierung von Genen mit TATA-losten Promotoren

aus: Pugh und Tjian (1990). Das dargestellte Modell zeigt die Aktivierung der Transkription durch die Bindung an den Transkriptionsinitiationskomplex TFIID durch einen Koaktivator und einen weiteren Faktor X.

Charakteristisch für die Proteine der Sp-Familie sind drei Zinkfinger, die am COOH-Ende des Proteins lokalisiert sind. An die im Promotor nachgewiesenen Bindungsstellen können sowohl Sp1 als auch Sp3 und Sp4 binden (Philipsen und Suske, 1999; Suske, 1999). Während *Sp4* vorwiegend im Gehirn und

zentralen Nervensystem exprimiert ist, findet man für *Sp1* und *Sp3* eine ubiquitäre Expression. Alle drei Faktoren wirken in der Regel als Aktivatoren, lediglich für *Sp3* wird auch eine Repressorwirkung beschrieben (Hagen et al., 1994). Da *Sp4* aufgrund seines Expressionsmusters als Regulator des *Foxq1*-Gens ausschied, wurden die beiden Faktoren *Sp1* und *Sp3* näher untersucht. Beide Proteine besitzen zwei Aktivierungsdomänen (Hagen et al., 1992), im *Sp3*-Protein befindet sich noch zusätzlich eine Repressordomäne (Dennig et al., 1996). Das *Sp3*-Gen besitzt zwei verschiedene Translationsstartpunkte; da der zweite Translationsstart zwischen den beiden Aktivierungsdomänen liegt, fehlt dem vom zweiten ATG aus translatierten *Sp3*-Protein eine Aktivierungsdomäne (Kennett et al., 1997).

Sp1 wurde erstmals als Aktivator des viralen SV40-Gens beschrieben (Dyran und Tjian, 1983). Seitdem konnte bei *in vitro* Experimenten eine Beteiligung von *Sp1* an der Aktivierung unterschiedlichster Gene gezeigt werden, darunter das Wilms' Tumor-1-Gen (Cohen et al., 1997) oder das Gen für Apolipoprotein A1 (Lamon-Fava et al., 1992). Mehr als 2000 Publikationen beschäftigen sich bislang mit der Genregulation durch *Sp1*. Für viele Gene konnte durch *in vitro* Experimente eine Aktivierung durch *Sp1* nachgewiesen werden. Dagegen konnten Marin et al. (1997) zeigen, dass in *Sp1* Knock-out-Embryonen viele untersuchte Gene, die aufgrund experimenteller Befunde von *Sp1* reguliert sein sollen, genauso stark exprimiert werden wie in Wildtyp-Embryonen. Lediglich die Expression des *MeCP2*-Gens und des Gens für die Thymidinkinase war stark reduziert. Um die normale Expression putativer *Sp1*-Zielgene zu erklären, diskutieren Marin et al. (1997) eine Übernahme der *Sp1*-Funktion durch *Sp3*. Aufgrund des Absterbens der *Sp1*^{-/-}-Embryonen am Tag 10,5-11 p.c. vermuten sie, dass *Sp1* eine wichtige Rolle bei der Regulation von Genen spielt, die für den Erhalt der zellulären Strukturen verantwortlich sind.

Das *Sp3*-Gen wurde erstmals von Hagen et al. (1992) beim Menschen beschrieben, 1998 wurde von Yajima et al. (1998) das murine *Sp3*-Gen kloniert. In vielen Publikationen wird eine Genregulation durch *Sp3* beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass *Sp3* die Gene *c-myc*, *c-fos* und *TGF-β1* (Udvadia et al., 1995) sowie das *IL-10*-Gen (Tone et al., 2000) und die Gene für α2(I) Kollagen

(Ihn und Trojanowska, 1997) und für Alkalische Phosphatase des Leber/Knochen/Nieren-Typs (Yusa et al., 2000) aktivieren kann. Dagegen reprimiert Sp3 das $\alpha 1(\text{II})$ Prokollagen-Gen (Ghayor et al., 2001) und die Gene für die TGF- β Rezeptoren I und II (Ammanamanchi und Brattain, 2001).

Schließlich konnte im *mFoxq1* Promotor eine mFoxq1 Bindungsstelle identifiziert werden. Diese Bindungsstelle wurde von Overdier et al. (1994) unter Verwendung des Rattenproteins rFoxQ1 charakterisiert. Aufgrund der identischen DNA-Bindungsdomäne von mFoxq1 und rFoxQ1 kann davon ausgegangen werden, dass auch mFoxq1 an diese Bindungsstelle bindet. Damit ist eine Autoaktivierung des *mFoxq1*-Gens denkbar. Eine Autoaktivierung wird auch bei den *fork head* Genen *Foxa1* (Peterson et al., 1997) und *Foxa2* (Samadani et al., 1995) diskutiert.

Für das *mFoxq1*-Gen konnte gezeigt werden, dass Sp1 und das vollständige Sp3-Protein in der Lage sind, die Transkription zu aktivieren. Mit der Aktivierung von *mFoxq1* durch Sp1 und Sp3 kann nicht die gewebespezifische Expression erklärt werden. Um diese zu erklären, sind verschiedene Modelle denkbar:

Zum einen könnten der oder die Koaktivatoren, die für eine Sp1-vermittelte Transkription notwendig sind, gewebespezifisch exprimiert sein und so die spezifische Expression von *mFoxq1* regulieren.

Zweitens ist es möglich, dass das Sp1/Sp3-Verhältnis für die Regulation eines Gens verantwortlich ist. Eine Änderung der Expressionstärke verschiedener Gene durch veränderte Sp1/Sp3-Verhältnisse konnte z. B. von Hata et al. (1998) und Apt et al. (1996) gezeigt werden.

Drittens können im Bereich des *mFoxq1* Promotors gewebespezifische Transkriptionsfaktoren binden. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente mit der Kontrollzelllinie MA10 (3.3.2) lassen den Schluss zu, dass innerhalb eines 158 bp umfassenden Sequenzabschnittes zumindest ein negativ regulierender Faktor binden und die Transkription von *mFoxq1* reprimieren kann. Mit Hilfe des Hefe One Hybrid Systems sollten solche Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die für die gewebespezifische Expression von *mFoxq1* verantwortlich sind. Dabei wurden fünf Klone isoliert, deren Genprodukte an den *mFoxq1*-Promotor binden können. Trotz vielfacher Modifikationen war eine

Sequenzierung dieser Klone nicht möglich. Die Herstellerfirma der cDNA-Bibliothek, die dieses Problem bereits von anderen Anwendern kennt, hält Sequenzfehler in den Primerbindungssequenzen der Plasmide für nicht auszuschließen.

Viertens ist es denkbar, dass in großer Entfernung vom Gen liegende Enhancer für die gewebespezifische Expression verantwortlich sind. Solche Enhancer wurden z. B. für das *Foxa2*-Gen identifiziert (Nishizaki et al., 2001; Sasaki und Hogan, 1996).

Über die Regulation anderer *fork head* Gene ist nicht viel bekannt, bisher wurden erst wenige Promotorstudien an *fork head* Genen durchgeführt. So grenzten Peterson et al. (1997) beim *Foxa1*-Gen den Promotorbereich auf eine 520 bp umfassende Region unmittelbar 5' des Transkriptionsstarts ein. In dieser Region wurden durch Computeranalysen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren ermittelt, darunter für den gewebespezifisch exprimierten Thyroid Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1) und den ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor Sp1. Bindungsstellen für *Foxa1* lassen außerdem Autoaktivierung vermuten. In der Leberzelllinie HepG2 war diese Promotorregion ausreichend, um in einem Reportergen-Assay die Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) zu aktivieren (Peterson et al., 1997). Clevidence et al. (1998) generierten transgene Mäuse, in deren Genom das β -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle eines 4 kb Promotorbereiches des *Foxa1*-Gens stand. Dieser Bereich wurde gewählt, da er neben den von Peterson et al. (1997) analysierten 520 bp noch Bindungsstellen für Retinolsäure enthält. Embryonen aus zwei verschiedenen transgenen Linien wurden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien analysiert, und in vielen *Foxa1* exprimierenden Geweben, z. B. in der sich entwickelnden Leber und im sich entwickelnden Darm, konnte β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings deckte sich die β -Galaktosidase-Expression nicht vollständig mit dem *Foxa1*-Expressionsmuster. So konnte in 11 Tage alten Embryonen keine β -Galaktosidase in der sich entwickelnden Lunge nachgewiesen werden, obwohl dort das *Foxa1*-Gen exprimiert wird. In den Knorpelanlagen der Gliedmaßen findet man dagegen β -Galaktosidase-Expression, obwohl in diesem Gewebe *Foxa1* nicht exprimiert

wird (Clevidence et al., 1998). Daher wird spekuliert, dass möglicherweise weiter entfernt liegende, regulatorische Einheiten für das gewebespezifische Expressionsmuster von *Foxa1* verantwortlich sind. Mit Hilfe von transgenen Mäusen könnte auch für das *mFoxq1*-Gen gezeigt werden, ob der in dieser Arbeit untersuchte 370 bp große Promotorbereich für die gewebespezifische Expression von *mFoxq1* ausreichend ist.

Bei der Untersuchung des *Foxa2* Promotors analysierten Samadani et al. (1995) eine 250 bp umfassende Region, die in 5' Richtung an den Transkriptionsstartpunkt angrenzt. Innerhalb dieser Region konnten sie Bindungsstellen für Mitglieder der C/EBP (CAAT/enhancer binding protein) Familie von Transkriptionsfaktoren und für IRF-1 (Interferon response factor 1) identifizieren. Außerdem ist im *Foxa2* Promotor eine Bindungsstelle für Foxa2 Proteine lokalisiert, so dass auch für dieses Gen eine Autoaktivierung angenommen wird (Samadani et al., 1995). In weiteren Untersuchungen konnten Sasaki und Hogan (1996) zeigen, dass für die gewebespezifische Expression von *Foxa2* regulatorische Elemente notwendig sind, die mehrere kb von der kodierenden Region entfernt liegen. Sie identifizierten im Bereich von 14 bis 15 kb vor dem Transkriptionsstart eine Region, die für die Expression von *Foxa2* im Primitivknoten und in der Wirbelsäulenanlage eine Rolle spielt. Die *Foxa2*-Expression in der Bodenplatte („floor plate“) des Neuralrohres wird von Faktoren reguliert, die in einem Bereich zwischen 6 kb und 10 kb hinter dem Transkriptionsstart lokalisiert sind. Nishizaki et al. (2001) zeigten schließlich, dass innerhalb dieser Enhancerbereiche Sequenzabschnitte liegen, die zwischen Maus, Huhn und Fisch konserviert sind. Untersuchungen an Embryonen transgener Mäuse zeigten, dass diese homologen Sequenzabschnitte für die gewebespezifische Expression von *Foxa2* notwendig sind (Nishizaki et al., 2001). Ob an der Regulation des *mFoxq1*-Gens ebenfalls solche weit entfernt liegenden Enhancer beteiligt sind, könnte durch Ermittlung DNase I hypersensitiver Regionen (Cockerill, 2000) geprüft werden.

Im *FOXD1* Promotor konnten Cederberg et al. (1999) drei Bindungsstellen für den Ets-1 Transkriptionsfaktor identifizieren, die innerhalb von 152 bp vor dem Transkriptionsstart liegen. Eine dieser Bindungsstellen ist 3' von der TATA-Box

lokalisiert. Mit DNase Footprint-Experimenten unter Verwendung von rekombinantem Ets-1 Protein konnten diese Bindungsstellen bestätigt werden. Mit Reporteragen-Assays konnte unter Verwendung von *Ets-1*-Expressionsvektoren gezeigt werden, dass Ets-1 in der Nieren-Zelllinie COS-7 in der Lage ist, Reporterogene zu aktivieren, die unter der Kontrolle des *FOXD1*-Promotors stehen (Cederberg et al., 1999). Ob dieser Promotorbereich für die zellspezifische Expression von *FOXD1* im Organismus ausreicht, wurde nicht untersucht.

4.3 Expression von *hFOXQ1* und *mFoxq1*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das humane *hFOXQ1*-Gen ein spezifisches Expressionsmuster mit starker Expression in Magen, Trachea, Blase und Speicheldrüse sowie schwächerer Expression z. B. in Duodenum, Niere und Lunge aufweist. Dieses Expressionsmuster deckt sich mit dem Expressionsmuster von *mFoxq1*. Eine Expression in Herz, Skelettmuskel und Milz konnte weder für *hFOXQ1* noch für *mFoxq1* gezeigt werden. Für das *rFoxQ1*-Gen sind nur wenig Expressionsdaten publiziert. Clevidence et al. (1993) konnten mit Northern Blot Analysen eine schwache *rFoxQ1* Expression in Niere und Lunge feststellen, während in Gehirn, Herz, Leber, Dünndarm und Milz keine Expression gezeigt werden konnte. Die fehlende Expression von *rFoxQ1* in Herz und Milz deckt sich mit den Daten von Maus und Mensch, während im Gehirn, in der Leber und im Dünndarm im Gegensatz zur Ratte bei Maus und Mensch zumindest geringe Transkriptmengen von *mFoxq1* bzw. *hFOXQ1* nachweisbar waren. Die Expression des *rFoxQ1*-Gens im Magen wurde nicht untersucht.

Außer den *fork head* Genen der Q-Unterfamilie werden noch weitere *fork head* Gene im Magen exprimiert. So wurde für die Gene *Foxa1-3*, *Foxd2* und *Foxl1* die Genexpression im Magen beschrieben. In Tabelle 1 sind die Expressionsmuster verschiedener speziell auch im Magen exprimierter *fork head* Gene aufgeführt.

Tabelle 1: Expressionsmuster magenexprimierter *fork head* Gene der adulten Maus

	Magen	Dünndarm	Dickdarm	Leber	Lunge	Niere	Herz	Milz	Thymus	Skelettmuskel	Gehirn	Testis	Referenz
<i>Foxa1</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Kaestner et al., 1994 Lai et al., 1991
<i>Foxa2</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Kaestner et al., 1994 Lai et al., 1991
<i>Foxa3</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	Kaestner et al., 1994 Lai et al., 1991
<i>Foxf2</i>	+	+	?	-	+	-	?	-	?	?	-	-	Aitola et al., 2000 Miura et al., 1998
<i>Foxl1</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Kaestner et al., 1996a
<i>Foxq1</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	?	-	+	+	Frank und Zoll, 1998

Die Expression der Gene in den verschiedenen Geweben wurde nachgewiesen (+), nicht nachgewiesen (-), nicht getestet (?)

Alle magenexprimierten *fork head* Gene werden auch im Darm exprimiert. Der Umkehrschluss gilt jedoch nicht, denn das *Foxd2*-Gen wird beispielsweise im Darm, nicht aber im Magen exprimiert (Wilken, 1998). In der Aufstellung der magenexprimierten *fork head* Gene nimmt das *Foxl1*-Gen eine besondere Stellung ein, da es nicht wie die anderen Gene in der endodermalen Mukosa des Magens, sondern in der vom Mesoderm abstammenden Magenwand exprimiert wird.

Unter den magenexprimierten *fork head* Genen hat das *mFoxq1*-Gen ein Expressionsmuster, das sich deutlich von den anderen aufgeführten Genen unterscheidet. Als einziges *fork head* Gen ist es außer in Magen und Darm auch in Leber und Niere exprimiert, während die anderen Gene lediglich in einem der beiden Organe exprimiert werden.

Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass das *mFoxq1*-Gen in den Hauptzellen des Magens exprimiert wird. Diese Zellen differenzieren

sich aus den Stammzellen (*granule free cells*), die in der Isthmus-Region der Magendrüse liegen (Abb. 22), und wandern von dort während ihrer Differenzierung zur Basis der Drüsen. Aufgrund ihres Differenzierungszustandes werden verschiedene Entwicklungsstadien unterschieden. Über die Neck-Zell-Vorläufer, Neckzellen und Hauptzellen-Vorläufer entstehen schließlich die Hauptzellen (Karam und Leblond, 1993b; Lee und Leblond, 1985). Diese pyramidenförmigen Hauptzellen besitzen dichte, lichtbrechende Sekretgranula, in denen die Pepsin-Vorstufe Pepsinogen gebildet wird. Je ausdifferenzierter die Hauptzellen sind, umso mehr nimmt die Zahl der Sekretgranula zu (Karam und Leblond, 1993b; Karam, 1999).

Die *in situ* Hybridisierungen zeigen, dass *Foxq1* sowohl in den Hauptzellen-Vorläufern als auch in den Hauptzellen exprimiert wird. Dagegen findet sich in den weniger differenzierten Neck-Zell-Vorläufern und Neckzellen noch keine *mFoxq1*-Expression. Auch die in der Basisregion des Magens vorkommenden Belegzellen und Entero-endokrinen Zellen zeigen keine *mFoxq1*-Expression.

Auch andere *fork head* Gene werden in dieser Region der Magendrüse exprimiert. So konnte Janssen (2001) zeigen, dass die *Foxa1*, *Foxa2* und *Foxa3*-Gene ebenfalls in den Hauptzellen exprimiert werden. Die *Foxa2*-Expression war allerdings auf die ausdifferenzierten Hauptzellen beschränkt, während *Foxa1* und *Foxa3* bereits in den Neck-Zell-Vorläufern exprimiert werden und in allen Differenzierungsstadien nachgewiesen werden können.

Für das humane *hFOXQ1*-Gen konnte weiterhin eine Überexpression in zwei Karzinomzelllinien festgestellt werden. Northern Blot Analysen mit Tumorgewebe aus einem Colon-Adenokarzinom und einem Alveolarkarzinom bestätigten die Überexpression von *hFOXQ1* in Tumoren. Eine Rolle von *hFOXQ1* bei der Tumorgenese kann damit nicht ausgeschlossen werden.

Auch andere *fork head* Gene werden mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht. So wurden bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie Chromosomen-Translokationen gefunden, die zur Bildung von Fusionsproteinen mit Beteiligung von FOXO4 führten (Parry et al., 1994). Translokationen, die zu FOXO1a-Fusionsproteinen führten, wurden in Patienten mit alveolären Rhabdomyosarkomen identifiziert (Galili et al., 1993; Shapiro et al.,

1993). Für das *FOXD1*-Gen konnte eine Regulation durch die Tumorsuppressorgene *WT-1* und *p53* gezeigt werden. Daher wird spekuliert, dass auch das *FOXD1*-Gen an der Tumorgenese beteiligt ist (Ernstsson et al., 1996). Die *fork head* Gene *FOXK1* (Li et al., 1991) und *FOXN1* (Li et al., 1992) sind auf Chromosomenabschnitten lokalisiert, die an Translokationen in Tumorpatienten beteiligt sind. Deshalb wird auch für diese Gene eine Beteiligung an der Tumorentstehung diskutiert.

4.4 Generierung von *Foxq1*^{-/-}-Mäusen

Die Generierung von Knock-out-Mäusen, bei denen das zu untersuchende Gen durch homologe Rekombination entfernt wurde, wird bereits seit einigen Jahren zur Analyse der Genfunktion verwendet. Seit der Etablierung der Techniken zur homologen Rekombination in Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) Anfang der 90er Jahre sind viele Gene ausgeschaltet und die sich entwickelnden Tiere analysiert worden. Die Funktion vieler Gene konnte so näher charakterisiert werden. Allerdings lassen sich auch mit dieser Technik nicht immer alle Fragen zur Genfunktion beantworten. Zunächst kann die Funktion mancher Gene nur während der Embryonalentwicklung untersucht werden, da die Funktionen, die diese Gene möglicherweise im adulten Tier übernehmen, durch das Fehlen bestimmter Strukturen oder Organe im adulten Tier nicht weiter untersucht werden können. Weiterhin führt die Entfernung mancher Gene zu so schweren Fehlbildungen, dass die Tiere bereits in einem sehr frühen embryonalen Stadium absterben und deshalb nicht während der gesamten Embryogenese untersucht werden können. Schließlich gibt es Gene, deren Funktionen von anderen Genen mit übernommen werden können, so dass sich Tiere, denen bestimmte Gene fehlen, trotzdem zu gesunden Tieren entwickeln können.

Die Funktion mehrerer *fork head* Gene ist mit Hilfe dieser Technik näher untersucht worden. In Tabelle 2 sind die bisher publizierten *fork head* Knock-out-Mäuse aufgeführt.

Tabelle 2: *fork head* Gene, die mit Hilfe von Knockout-Mäusen untersucht wurden

Gen	Referenz
<i>Foxa1</i>	Kaestner et al., 1999
<i>Foxa2</i>	Ang und Rossant, 1994
<i>Foxa3</i>	Kaestner et al., 1998
<i>Foxc1</i>	Kume et al., 1998
<i>Foxc2</i>	Iida et al., 1997
<i>Foxd1</i>	Hatini et al., 1996
<i>Foxd2</i>	Kume et al., 2000a
<i>Foxf1</i>	Mahlapuu et al., 2001
<i>Foxl1</i>	Kaestner et al., 1997
<i>fkhl0</i>	Hulander et al., 1998

Für das *fkhl0*-Gen wurde noch kein Name nach der neuen einheitlichen Nomenklatur (Kaestner et al., 2000) vergeben.

Mit den Knock-out-Mäusen für die Gene *Foxa1-3* und *Foxl1* wurden auch *fork head* Gene untersucht, die im Magen exprimiert werden (Tabelle 1).

Embryonen von *Foxa1* Knock-out-Mäusen waren morphologisch unauffällig und hatten auch das gleiche Geburtsgewicht wie Wildtypmäuse. Nach der Geburt wuchsen sie jedoch deutlich langsamer als Wildtypmäuse und starben meist zwischen dem 10. und 14. Tag nach der Geburt; keines der Tiere wurde älter als vier Wochen. Die Tiere erreichten im Alter von 8 bis 10 Tagen ihr Maximalgewicht, danach nahmen sie stark ab und starben aufgrund von Hypoglykämie und Dehydration. Da das *Foxa1*-Gen stark in der Leber exprimiert wird, untersuchten Kaestner et al. (1999) die Genexpression leberexprimierter Gene. Duncan et al. (1998) konnten zeigen, dass in *Foxa1* defizienten ES-Zellen, die sich in Suspensionskultur zu viszeralem Endoderm differenzieren, die leberspezifischen Gene *HNF-1 α* und *HNF-4 α* verstärkt exprimiert wurden. Dagegen stellten Kaestner et al. (1999) fest, dass alle getesteten Gene, darunter auch *HNF-1 α* und *HNF-4 α* , in den *Foxa1* Knock-out-Mäusen normal exprimiert wurden. Allerdings stellten sie fest, dass das Hormongleichgewicht in diesen Mäusen gestört war. Während die Kortikosteroidmenge deutlich erhöht war, war die Produktion von Insulin und Glukagon stark reduziert. Durch Reporter-Experimente konnte gezeigt werden, dass *Foxa1* das Glukagon-Gen aktivieren

kann (Kaestner et al., 1999). Mögliche Auswirkungen des *Foxa1* Knock-outs auf die Entwicklung und Funktion des Magens wurden nicht beschrieben.

Bereits 1994 versuchten Ang und Rossant (1994), *Foxa2*-defiziente Mäuse zu generieren. Da die Verpaarung heterozygoter *Foxa2*^{+/-}-Tiere nicht zu homozygoten *Foxa2*^{-/-}-Nachkommen führte, wurden die Embryonen näher untersucht. Es zeigte sich, dass *Foxa2*^{-/-}-Embryonen bereits ab Tag 6,5 p.c. massive Störungen in der mesodermalen, der neuralen und der endodermalen Entwicklung aufwiesen. Am Tag 9,5 p.c. waren diese Embryonen wesentlich kleiner als die heterozygoten oder die Wildtyp-Embryonen und am Tag 11,5 p.c. waren alle *Foxa2*^{-/-}-Embryonen resorbiert. An Schnitten von Embryonen der Entwicklungsstufen Tag 8,5 p.c. und 9,5 p.c. wurde unter anderem untersucht, ob Darmstrukturen erkennbar waren. Während die Embryonen von Tag 8,5 p.c. keinerlei Darmstrukturen aufwiesen, wurden bei einzelnen Embryonen von Tag 9,5 p.c. darmähnliche Strukturen beobachtet, die ventral des Rückenmarks lokalisiert waren. Expressionsanalysen zeigten, dass in diesen Zellen *Foxa1* exprimiert wird. Ang und Rossant (1994) spekulieren daher, dass für die endodermale Entwicklung sowohl *Foxa1* als auch *Foxa2* eine wichtige Rolle spielen und daher ein vollständiges Fehlen endodermaler Strukturen erst bei einem *Foxa1/Foxa2*-Doppel-Knock-out zu beobachten sein sollte.

Die Knock-out-Mäuse für das *Foxa3*-Gen zeigten keinen Phänotyp (Kaestner et al., 1998). Obwohl das *Foxa3*-Gen in Wildtypmäusen bereits ab Tag 8,5 p.c. exprimiert wird und im gesamten Endoderm nachgewiesen werden kann (Monaghan et al., 1993), waren Leber, Pankreas und Magen-Darmtrakt der *Foxa3* Knock-out-Mäuse morphologisch unauffällig. Für die korrekte Ausbildung der endodermalen Organe scheint *Foxa3* nicht notwendig zu sein. Allerdings zeigte die Expressionsanalyse leberexprimierter Gene, dass einzelne Gene wie *TAT* (Tyrosinaminotransferase), *Tf* (Transferrin) und *PEPCK* (Phosphoenolpyruvatcarboxykinase) herunterreguliert werden, während die Expression der beiden *fork head* Gene *Foxa1* und *Foxa2* deutlich erhöht war. Hier vermuten Kaestner et al. (1998), dass entweder *Foxa3* in Wildtyp-Mäusen die beiden Gene *Foxa1* und *Foxa2* reprimiert oder dass diese beiden Gene stärker exprimiert werden, um die fehlende Funktion von *Foxa3* auszugleichen.

Foxl1 Knock-out-Mäuse (Kaestner et al., 1997) kamen mit normalem Geburtsgewicht zur Welt, die weitere Gewichtszunahme war jedoch reduziert und die Tiere starben ein bis drei Wochen nach der Geburt. Aufgrund der verringerten Gewichtszunahme wurde der Magen-Darm-Trakt der Tiere näher untersucht. Obwohl das *Foxl1*-Gen nicht in der Mukosa, sondern in der vom Mesoderm abgeleiteten Magenwand exprimiert wird, zeigten sich in den *Foxl1*^{-/-}-Mäusen drastische Veränderungen der Mukosa. So war die Mukosa adulter Mäuse sechsmal dicker als die von Wildtypmäusen. Die Magendrüsen waren durch Vakuolen in den Oberflächenzellen und eine Verzweigung der Drüsen erweitert, das Mesenchymgewebe der Submukosa war aufgelockerter als in Wildtyptieren. Eine genauere Analyse der Magendrüsen zeigte, dass in den *Foxl1*^{-/-}-Mäusen keine Belegzellen vorhanden waren. Daher spekulieren Kaestner et al. (1997), dass *Foxl1* eine wichtige Rolle bei der Interaktion von mesenchymalen und epithelialen Zellen spielt.

Bei der *Foxa3* Knock-out-Maus kann der normale Phänotyp mit einer möglichen Übernahme der Funktion durch die nahe verwandten Gene *Foxa1* und *Foxa2* erklärt werden (Kaestner et al., 1998). Die *Foxl1* Knock-out-Maus zeigt dagegen einen deutlich veränderten Phänotyp. Eine mögliche Übernahme einzelner Funktionen durch eng verwandte *fork head* Gene ist hier nicht wahrscheinlich, da bei der Maus bislang nur ein *fork head* Gen der L-Unterfamilie bekannt ist. Das gilt auch für das *mFoxq1*-Gen, weitere *fork head* Gene der Q-Unterfamilie wurden bisher nicht beschrieben. Daher liegt nahe, dass auch eine *mFoxq1* Knock-out-Maus einen Phänotyp zeigen wird. Einen weiteren Anhaltspunkt, dass *mFoxq1*^{-/-} Mäuse vermutlich einen Phänotyp zeigen werden, lieferten Hong et al. (2001) mit ihrer Analyse der Satin-Maus. Diese Maus, erstmals 1955 von Major (1955) beschrieben, wird durch ein seidig schimmerndes Fell charakterisiert. Die vier verschiedenen Haar-Typen im Fell der Maus sind vorhanden, die Haare sind jedoch dünner als die der Wildtypmäuse. Hong et al. (2001) konnten zeigen, dass dem Satin-Phänotyp eine 67 bp Deletion im *mFoxq1*-Gen zugrundeliegt. Diese Deletion führt zu einem verkürzten, 376 Aminosäuren umfassenden Protein, das jedoch noch die vollständige DNA-

Bindungsdomäne enthält. Über weitere Fehlbildungen der Satin-Maus, insbesondere im Magen-Darm-Trakt, ist nichts bekannt.

4.5 Ausblick

Die wichtigste Aufgabe in der Analyse der *mFoxq1* Funktion ist die Generierung von Knock-out-Mäusen. Nachdem die homologe Rekombination in drei Klonen stattgefunden hat, müssen nun die ES-Zellen in Blastocysten injiziert werden, um chimäre Tiere zu erhalten. Durch Kreuzung der Chimären mit Wildtypieren werden heterozygote Mäuse gewonnen, die dann zur Erzeugung homozygoter *mFoxq1*^{-/-} Mäuse verwendet werden. Diese Tiere sollten insbesondere auf Fehlbildungen des Magen-Darm-Traktes hin untersucht werden.

Zur weiteren Funktionsanalyse sollten Reporter-gen-Assays unter Verwendung von *mFoxq1*-Expressionsvektoren durchgeführt werden. Diese Experimente sollten darüber Aufschluss geben, ob *mFoxq1* eine aktivierende oder reprimierende Funktion ausübt. Mit Hilfe von Deletionskonstrukten könnten dann die Aktivierungs- bzw. Repressordomänen ermittelt werden.

Mit Hilfe von transgenen Mäusen, die ein Reporter-gen unter der Kontrolle des 370 bp umfassenden *mFoxq1*-Promotors tragen, könnte gezeigt werden, ob dieser Bereich für die gewebespezifische Expression ausreichend ist. Die Ermittlung DNase I hypersensitiver Regionen (Cockerill, 2000) könnte zur Identifizierung weiter entfernt liegender regulatorischer Einheiten beitragen.

Um weitere Gene zu isolieren, die an der Regulation der *mFoxq1*-Expression beteiligt sind, sollte der Hefe One Hybrid Screen mit einer anderen cDNA-Bibliothek wiederholt werden. Um mögliche Kofaktoren der Sp1-vermittelten *mFoxq1*-Expression zu identifizieren, sollte auch ein Hefe Two Hybrid Screen durchgeführt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das murine *fork head* Gen *mFoxq1* und seine Homologen bei Mensch und Ratte näher untersucht.

Durch Sequenzierung des Rattengens *rHFH-1* konnten sieben Nukleotide identifiziert werden, die in der publizierten cDNA-Sequenz nicht vorhanden waren. Durch diese zusätzlichen Nukleotide ändert sich der offene Leserahmen und das putative, 400 Aminosäuren umfassende Protein zeigt 95% identische Aminosäuren und eine identische DNA-Bindungsdomäne im Vergleich zum murinen *mFoxq1*-Protein. Das *rHFH-1*-Gen besitzt, ebenso wie *mFoxq1*, kein Intron. Da weiterhin die publizierten Expressionsdaten von *rHFH-1* in Einklang mit dem Expressionsmuster von *mFoxq1* stehen, wurde das *rHFH-1*-Gen nach der neuen einheitlichen Nomenklatur als homologes Gen zu *mFoxq1* in *rFoxQ1* umbenannt.

Nach der Sequenzierung des 5' Bereichs des zum *mFoxq1*-Gen homologen humanen *hFOXQ1*-Gens konnte eine 370 bp umfassende Region identifiziert werden, die eine hohe Homologie zwischen murinem und humanem Promotorbereich aufweist. Innerhalb dieser Region, die etwa 500 bp vor dem Startkodon beginnt, wurden durch Computeranalysen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren gefunden, darunter drei Bindungsstellen (A, B, C) für Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie. In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die beiden Bindungsstellen B und C für die Aktivierung des *mFoxq1*-Gens notwendig sind. Mit Hilfe von Gel Retardation Experimenten wurde nachgewiesen, dass sowohl Sp1 als auch Sp3 an die Bindungsstellen binden können. Weiterhin konnte durch Transfektionsexperimente gezeigt werden, dass sowohl Sp1 als auch Sp3 in der Lage sind, *mFoxq1* zu aktivieren.

Mit Hilfe von Northern Blot Analysen wurde das Expressionsmuster von *hFOXQ1* ermittelt und mit der Expression von *mFoxq1* verglichen. Dabei stimmte die starke Expression des *hFOXQ1*-Gens im Magen mit der des *mFoxq1*-Gens überein. Der starken Expression des *mFoxq1*-Gens in der Niere stand eine nur schwache *hFOXQ1*-Expression in der menschlichen Niere gegenüber. Schließlich konnte sowohl in Karzinomzelllinien als auch in

Tumorgewebe aus Lungen- und Colonkarzinomen eine Überexpression von *hFOXQ1* nachgewiesen werden.

Um die zellspezifische Expression von *mFoxq1* zu untersuchen, wurden *in situ* Hybridisierungen an Magenschnitten der Maus durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass *mFoxq1* ausschließlich in Hauptzell-Vorläufern und Hauptzellen der Magendrüsen exprimiert wird.

Mit Hilfe von Knock-out-Mäusen sollte die Funktion von *mFoxq1* aufgeklärt werden. Dazu wurde ein Knock-out-Konstrukt hergestellt, das die gesamte kodierende Sequenz des *mFoxq1*-Gens durch das Neomycin-Gen ersetzt. Nach Transfektion von ES-Zellen konnten drei rekombinante Klone identifiziert werden, die für die Blastozysteninjektion verwendet werden können.

6 LITERATUR

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

Ahlgren, R., Suske, G., Waterman, M. R. und Lund, J. (1999). Role of Sp1 in cAMP-dependent transcriptional regulation of the bovine CYP11A gene. *J Biol Chem* **274**: 19422-19428.

Aitola, M., Carlsson, P., Mahlapuu, M., Enerbäck, S. und Peltö-Huikko, M. (2000). Forkhead transcription factor FoxF2 is expressed in mesodermal tissues involved in epithelio-mesenchymal interactions. *Dev Dyn* **218**: 136-149.

Ammanamanchi, S. und Brattain, M. G. (2001). Sp3 is a transcriptional repressor of transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* **276**: 3348-3352.

Ang, S. L. und Rossant, J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**: 561-574.

Apt, D., Watts, R. M., Suske, G. und Bernard, H. U. (1996). High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology* **224**: 281-291.

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

Avraham, K. B., Fletcher, C., Overdier, D. G., Clevidence, D. E., Lai, E., Costa, R. H., Jenkins, N. A. und Copeland, N. G. (1995). Murine chromosomal location of eight members of the hepatocyte nuclear factor 3/fork head winged helix family of transcription factors. *Genomics* **25**: 388-393.

Bell, R., Brice, G., Child, A. H., Murday, V. A., Mansour, S., Sandy, C. J., Collin, J. R., Brady, A. F., Callen, D. F., Burnand, K., Mortimer, P. und Jeffery, S. (2001). Analysis of lymphoedema-distichiasis families for FOXC2 mutations reveals small insertions and deletions throughout the gene. *Hum Genet* **108**: 546-551.

Bieller, A., Pasche, B., Frank, S., Gläser, B., Kunz, J., Witt, K. und Zoll, B. (2001). Isolation and characterization of the human forkhead gene, FOXQ1. *DNA Cell Biol* **20**: 555-561.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Blixt, A., Mahlapuu, M., Bjursell, C., Darnfors, C., Johannesson, T., Enerbäck, S. und Carlsson, P. (1998). The two-exon gene of the human forkhead transcription factor FREAC-2 (FKHL6) is located at 6p25.3. *Genomics* **53**: 387-390.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brennan, R. G. (1993). The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell* **74**: 773-776.

Cederberg, A., Hulander, M., Carlsson, P. und Enerback, S. (1999). The kidney-expressed winged helix transcription factor FREAC-4 is regulated by Ets-1. A possible role in kidney development. *J Biol Chem* **274**: 165-169.

Chung, C. T., Niemela, S. L. und Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2172-2175.

Clark, K. L., Halay, E. D., Lai, E. und Burley, S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**: 412-420.

Clevidence, D. E., Overdier, D. G., Tao, W., Qian, X., Pani, L., Lai, E. und Costa, R. H. (1993). Identification of nine tissue-specific transcription factors of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead DNA-binding-domain family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3948-3952.

Clevidence, D. E., Zhou, H., Lau, L. F. und Costa, R. H. (1998). The -4 kilobase promoter region of the winged helix transcription factor HNF-3 α gene elicits transgene expression in mouse embryonic hepatic and intestinal diverticula. *Int J Dev Biol* **42**: 741-746.

Cockerill, P. N. (2000). Identification of DNaseI hypersensitive sites within nuclei. *Methods Mol Biol* **130**: 29-46.

Cohen, H. T., Bossone, S. A., Zhu, G., McDonald, G. A. und Sukhatme, V. P. (1997). Sp1 is a critical regulator of the Wilms' tumor-1 gene. *J Biol Chem* **272**: 2901-2913.

Corbo, J. C., Erives, A., Di Gregorio, A., Chang, A. und Levine, M. (1997). Dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube is conserved in a protochordate. *Development* **124**: 2335-2344.

Costa, R. H., Grayson, D. R. und Darnell, J. E., Jr. (1989). Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* **9**: 1415-1425.

Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M. S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A. und Pilia, G. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* **27**: 159-166.

Danilition, S. L., Frederickson, R. M., Taylor, C. Y. und Miyamoto, N. G. (1991). Transcription factor binding and spacing constraints in the human beta-actin proximal promoter. *Nucleic Acids Res* **19**: 6913-6922.

de Wet, J. R., Wood, K. V., Helinski, D. R. und DeLuca, M. (1986). Cloning firefly luciferase. *Methods Enzymol* **133**: 3-14.

Dennig, J., Beato, M. und Suske, G. (1996). An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *Embo J* **15**: 5659-5667.

Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. und Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**: 1475-1489.

Dirksen, M. L. und Jamrich, M. (1992). A novel, activin-inducible, blastopore lip-specific gene of *Xenopus laevis* contains a fork head DNA-binding domain. *Genes Dev* **6**: 599-608.

Duncan, S. A., Navas, M. A., Dufort, D., Rossant, J. und Stoffel, M. (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* **281**: 692-695.

Dynan, W. S. und Tjian, R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**: 79-87.

Ernstsson, S., Pierrou, S., Hulander, M., Cederberg, A., Hellqvist, M., Carlsson, P. und Enerback, S. (1996). Characterization of the human forkhead gene FREAC-4. Evidence for regulation by Wilms' tumor suppressor gene (WT-1) and p53. *J Biol Chem* **271**: 21094-21099.

Fang, J., Dagenais, S. L., Erickson, R. P., Arit, M. F., Glynn, M. W., Gorski, J. L., Seaver, L. H. und Glover, T. W. (2000). Mutations in FOXC2 (MFH-1), a Forkhead Family Transcription Factor, Are Responsible for the Hereditary Lymphedema-Distichiasis Syndrome. *Am J Hum Genet* **67**: 1382-1388.

Finegold, D. N., Kimak, M. A., Lawrence, E. C., Levinson, K. L., Cherniske, E. M., Pober, B. R., Dunlap, J. W. und Ferrell, R. E. (2001). Truncating mutations in FOXC2 cause multiple lymphedema syndromes. *Hum Mol Genet* **10**: 1185-1189.

Frank, S. und Zoll, B. (1998). Mouse HNF-3/fork head homolog-1-like gene: structure, chromosomal location, and expression in adult and embryonic kidney. *DNA Cell Biol* **17**: 679-688.

Friedle, H., Rastegar, S., Paul, H., Kaufmann, E. und Knöchel, W. (1998). Xvent-1 mediates BMP-4-induced suppression of the dorsal-lip-specific early response gene XFD-1' in *Xenopus* embryos. *Embo J* **17**: 2298-2307.

Galili, N., Davis, R. J., Fredericks, W. J., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F. J. d., Emanuel, B. S., Rovera, G. und Barr, F. G. (1993). Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* **5**: 230-235.

Garner, M. M. und Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9**: 3047-3060.

Ghayor, C., Chadjichristos, C., Herrouin, J. F., Ala-Kokko, L., Suske, G., Pujol, J. P. und Galera, P. (2001). Sp3 represses the Sp1-mediated transactivation of the human COL2A1 gene in primary and de-differentiated chondrocytes. *J Biol Chem* **276**: 36881-36895.

Häcker, U., Kaufmann, E., Hartmann, C., Jürgens, G., Knöchel, W. und Jäckle, H. (1995). The *Drosophila* fork head domain protein crocodile is required for the establishment of head structures. *Embo J* **14**: 5306-5317.

Hagen, G., Müller, S., Beato, M. und Suske, G. (1992). Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* **20**: 5519-5525.

Hagen, G., Müller, S., Beato, M. und Suske, G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* **13**: 3843-3851.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

Hata, Y., Duh, E., Zhang, K., Robinson, G. S. und Aiello, L. P. (1998). Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem* **273**: 19294-19303.

Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C. und Lai, E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* **10**: 1467-1478.

Hellqvist, M., Mahlapuu, M., Blixt, A., Enerback, S. und Carlsson, P. (1998). The human forkhead protein FREAC-2 contains two functionally redundant activation domains and interacts with TBP and TFIIIB. *J Biol Chem* **273**: 23335-23343.

Hellqvist, M., Mahlapuu, M., Samuelsson, L., Enerback, S. und Carlsson, P. (1996). Differential activation of lung-specific genes by two forkhead proteins, FREAC-1 and FREAC-2. *J Biol Chem* **271**: 4482-4490.

Hiemisch, H., Schütz, G. und Kaestner, K. H. (1998). The mouse Fkh1/Mf1 gene: cDNA sequence, chromosomal localization and expression in adult tissues. *Gene* **220**: 77-82.

Hoffman, C. S. und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.

Hoggatt, A. M., Kriegel, A. M., Smith, A. F. und Herring, B. P. (2000). Hepatocyte nuclear factor-3 homologue 1 (HFH-1) represses transcription of smooth muscle-specific genes. *J Biol Chem* **275**: 31162-31170.

Hong, H. K., Lass, J. H. und Chakravarti, A. (1999). Pleiotropic skeletal and ocular phenotypes of the mouse mutation congenital hydrocephalus (ch/Mf1) arise from a winged helix/forkhead transcriptionfactor gene. *Hum Mol Genet* **8**: 625-637.

Hong, H. K., Noveroske, J. K., Headon, D. J., Liu, T., Sy, M. S., Justice, M. J. und Chakravarti, A. (2001). The winged helix/forkhead transcription factor Foxq1 regulates differentiation of hair in satin mice. *Genesis* **29**: 163-171.

Hooft van Huijsduijnen, R. A., Bollekens, J., Dorn, A., Benoist, C. und Mathis, D. (1987). Properties of a CCAAT box-binding protein. *Nucleic Acids Res* **15**: 7265-7282.

Hromas, R., Ye, H., Spinella, M., Dmitrovsky, E., Xu, D. und Costa, R. H. (1999). Genesis, a Winged Helix transcriptional repressor, has embryonic expression limited to the neural crest, and stimulates proliferation in vitro in a neural development model. *Cell Tissue Res* **297**: 371-382.

Hulander, M., Wurst, W., Carlsson, P. und Enerback, S. (1998). The winged helix transcription factor Fkh10 is required for normal development of the inner ear. *Nat Genet* **20**: 374-376.

Ihn, H. und Trojanowska, M. (1997). Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res* **25**: 3712-3717.

Iida, K., Koseki, H., Kakinuma, H., Kato, N., Mizutani-Koseki, Y., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Noji, S., Kawamura, K., Kataoka, Y., Ueno, F., Taniguchi, M., Yoshida, N., Sugiyama, T. und Miura, N. (1997). Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis. *Development* **124**: 4627-4638.

Janssen, A. (2001). Klonierung und Charakterisierung magenexprimierter forkhead Gene. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen

Kaestner, K. H., Bleckmann, S. C., Monaghan, A. P., Schlöndorff, J., Mincheva, A., Lichter, P. und Schütz, G. (1996a). Clustered arrangement of winged helix genes fkh-6 and MFH-1: possible implications for mesoderm development. *Development* **122**: 1751-1758.

Kaestner, K. H., Hiemisch, H., Luckow, B. und Schütz, G. (1994). The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics* **20**: 377-385.

Kaestner, K. H., Hiemisch, H. und Schütz, G. (1998). Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol* **18**: 4245-4251.

Kaestner, K. H., Katz, J., Liu, Y., Drucker, D. J. und Schütz, G. (1999). Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev* **13**: 495-504.

Kaestner, K. H., Knöchel, W. und Martinez, D. E. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14**: 142-146.

Kaestner, K. H., Lee, K. H., Schlöndorff, J., Hiemisch, H., Monaghan, A. P. und Schütz, G. (1993). Six members of the mouse forkhead gene family are developmentally regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7628-7631.

Kaestner, K. H., Schütz, G. und Monaghan, A. P. (1996b). Expression of the winged helix genes fkh-4 and fkh-5 defines domains in the central nervous system. *Mech Dev* **55**: 221-230.

Kaestner, K. H., Silberg, D. G., Traber, P. G. und Schütz, G. (1997). The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* **11**: 1583-1595.

Kaiser, P. und Auer, B. (1993). Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to *E. coli*. *Biotechniques* **14**: 552.

Karam, S. M. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* **4**: D286-298.

Karam, S. M. und Leblond, C. P. (1993a). Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. *Anat Rec* **236**: 259-279.

Karam, S. M. und Leblond, C. P. (1993b). Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat Rec* **236**: 297-313.

Karam, S. M. und Leblond, C. P. (1993c). Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. *Anat Rec* **236**: 333-340.

Karam, S. M. und Leblond, C. P. (1992). Identifying and counting epithelial cell types in the "corpus" of the mouse stomach. *Anat Rec* **232**: 231-246.

Kastury, K., Li, J., Druck, T., Su, H., Vogt, P. K., Croce, C. M. und Huebner, K. (1994). The human homologue of the retroviral oncogene qin maps to chromosome 14q13. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3616-3618.

Kaufmann, E. und Knöchel, W. (1996). Five years on the wings of fork head. *Mech Dev* **57**: 3-20.

Kennett, S. B., Udvardia, A. J. und Horowitz, J. M. (1997). Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* **25**: 3110-3117.

Knöchel, S., Lef, J., Clement, J., Klocke, B., Hille, S., Koster, M. und Knöchel, W. (1992). Activin A induced expression of a fork head related gene in posterior chordamesoderm (notochord) of *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev* **38**: 157-165.

Korver, W., Roose, J. und Clevers, H. (1997). The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res* **25**: 1715-1719.

Kume, T., Deng, K. und Hogan, B. L. (2000a). Minimal phenotype of mice homozygous for a null mutation in the Forkhead/Winged helix gene, Mf2. *Mol Cell Biol* **20**: 1419-1425.

Kume, T., Deng, K. und Hogan, B. L. (2000b). Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* **127**: 1387-1395.

Kume, T., Deng, K. Y., Winfrey, V., Gould, D. B., Walter, M. A. und Hogan, B. L. (1998). The forkhead/winged helix gene *Mf1* is disrupted in the pleiotropic mouse mutation congenital hydrocephalus. *Cell* **93**: 985-996.

Lai, C. S., Fisher, S. E., Hurst, J. A., Vargha-Khadem, F. und Monaco, A. P. (2001). A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* **413**: 519-523.

Lai, E., Prezioso, V. R., Smith, E., Litvin, O., Costa, R. H. und Darnell, J. E., Jr. (1990). HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev* **4**: 1427-1436.

Lai, E., Prezioso, V. R., Tao, W. F., Chen, W. S. und Darnell, J. E., Jr. (1991). Hepatocyte nuclear factor 3 alpha belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head. *Genes Dev* **5**: 416-427.

Lamon-Fava, S., Sastry, R., Ferrari, S., Rajavashisth, T. B., Lusic, A. J. und Karathanasis, S. K. (1992). Evolutionary distinct mechanisms regulate apolipoprotein A-I gene expression: differences between avian and mammalian apoA-I gene transcription control regions. *J Lipid Res* **33**: 831-842.

Lee, E. R. und Leblond, C. P. (1985). Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: IV. Ultrastructure and renewal of gland cells. *Am J Anat* **172**: 241-259.

Lewin, B. (1990). *Genes IV*. Cell Press, Cambridge, Mass.

Li, C., Lai, C. F., Sigman, D. S. und Gaynor, R. B. (1991). Cloning of a cellular factor, interleukin binding factor, that binds to NFAT-like motifs in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7739-7743.

Li, C., Lysis, A. J., Sparkes, R., Nirula, A. und Gaynor, R. (1992). Characterization and chromosomal mapping of the gene encoding the cellular DNA binding protein ILF. *Genomics* **13**: 665-671.

Li, J. J. und Herskowitz, I. (1993). Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* **262**: 1870-1874.

Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M. und Cormier, M. J. (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 4438-4442.

Mahlapuu, M., Ormestad, M., Enerbäck, S. und Carlsson, P. (2001). The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development* **128**: 155-166.

Mahlapuu, M., Peltö-Huikko, M., Aitola, M., Enerback, S. und Carlsson, P. (1998). FREAC-1 contains a cell-type-specific transcriptional activation domain and is expressed in epithelial-mesenchymal interfaces. *Dev Biol* **202**: 183-195.

Major, M. H. (1955). *Satin, sa*. *Mouse News Letter* **12**: 47.

Mantovani, R., Pessara, U., Tronche, F., Li, X. Y., Knapp, A. M., Pasquali, J. L., Benoist, C. und Mathis, D. (1992). Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription. *Embo J* **11**: 3315-3322.

Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. und Philipsen, S. (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89**: 619-628.

Mears, A. J., Jordan, T., Mirzayans, F., Dubois, S., Kume, T., Parlee, M., Ritch, R., Koop, B., Kuo, W. L., Collins, C., Marshall, J., Gould, D. B., Pearce, W., Carlsson, P., Enerback, S., Morissette, J., Bhattacharya, S., Hogan, B., Raymond, V. und Walter, M. A. (1998). Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patients with Axenfeld-Rieger anomaly. *Am J Hum Genet* **63**: 1316-1328.

Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L. und Burgering, B. M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**: 782-787.

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

Miura, N., Kakinuma, H., Sato, M., Aiba, N., Terada, K. und Sugiyama, T. (1998). Mouse forkhead (winged helix) gene LUN encodes a transactivator that acts in the lung. *Genomics* **50**: 346-356.

Monaghan, A. P., Kaestner, K. H., Grau, E. und Schütz, G. (1993). Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development* **119**: 567-578.

Morris, J. F., Hromas, R. und Rauscher, F. J., 3rd (1994). Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol Cell Biol* **14**: 1786-1795.

Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H. und Boehm, T. (1994). New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* **372**: 103-107.

Nishimura, D. Y., Swiderski, R. E., Alward, W. L., Searby, C. C., Patil, S. R., Bennet, S. R., Kanis, A. B., Gastier, J. M., Stone, E. M. und Sheffield, V. C. (1998). The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. *Nat Genet* **19**: 140-147.

Nishizaki, Y., Shimazu, K., Kondoh, H. und Sasaki, H. (2001). Identification of essential sequence motifs in the node/notochord enhancer of Foxa2 (Hnf3beta) gene that are conserved across vertebrate species. *Mech Dev* **102**: 57-66.

Overdier, D. G., Porcella, A. und Costa, R. H. (1994). The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol Cell Biol* **14**: 2755-2766.

Pani, L., Overdier, D. G., Porcella, A., Qian, X., Lai, E. und Costa, R. H. (1992). Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the Drosophila fork head protein. *Mol Cell Biol* **12**: 3723-3732.

Parry, P., Wei, Y. und Evans, G. (1994). Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer* **11**: 79-84.

Perrotti, D., Melotti, P., Skorski, T., Casella, I., Peschle, C. und Calabretta, B. (1995). Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myb promoter activity. *Mol Cell Biol* **15**: 6075-6087.

Peterson, R. S., Clevidence, D. E., Ye, H. und Costa, R. H. (1997). Hepatocyte nuclear factor-3 alpha promoter regulation involves recognition by cell-specific factors, thyroid transcription factor-1, and autoactivation. *Cell Growth Differ* **8**: 69-82.

Philipsen, S. und Suske, G. (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* **27**: 2991-3000.

Pugh, B. F. und Tjian, R. (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* **61**: 1187-1197.

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

Roder, K., Wolf, S. S., Larkin, K. J. und Schweizer, M. (1999). Interaction between the two ubiquitously expressed transcription factors NF-Y and Sp1. *Gene* **234**: 61-69.

Samadani, U., Porcella, A., Pani, L., Johnson, P. F., Burch, J. B., Pine, R. und Costa, R. H. (1995). Cytokine regulation of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor-3 beta is mediated by the C/EBP family and interferon regulatory factor 1. *Cell Growth Differ* **6**: 879-890.

Sambrook, J., Fritsch, I. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

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

Sasaki, H. und Hogan, B. L. (1996). Enhancer analysis of the mouse HNF-3 beta gene: regulatory elements for node/notochord and floor plate are independent and consist of multiple sub-elements. *Genes Cells* **1**: 59-72.

Saunders, S. E., Rawls, J. M., Wardle, C. J. und Burke, J. F. (1989). High efficiency expression of transfected genes in a *Drosophila melanogaster* haploid (1182) cell line. *Nucleic Acids Res* **17**: 6205-6216.

Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27**: 353-365.

Schubert, L. A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F. und Ziegler, S. F. (2001). Scurfin (foxp3) acts as a repressor of transcription and regulates t cell activation. *J Biol Chem* **276**: 37672-37679.

Shapiro, D. N., Sublett, J. E., Li, B., Downing, J. R. und Naeve, C. W. (1993). Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* **53**: 5108-5112.

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

Steffen, M. L., Harrison, W. R., Elder, F. F., Cook, G. A. und Park, E. A. (1999). Expression of the rat liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT- Ialpha) gene is regulated by Sp1 and nuclear factor Y: chromosomal localization and promoter characterization. *Biochem J* **340**: 425-432.

Sugiura, N. und Takishima, K. (2000). Regulation of the gene promoter for extracellular signal-regulated protein kinase 2 by transcription factors NF-Y and Sp3. *Biochem J* **347 Pt 1**: 155-161.

Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**: 291-300.

Suske, G. (2000). Transient transfection of Schneider cells in the study of transcription factors. *Methods Mol Biol* **130**: 175-187.

Thompson, T. A., Gould, M. N., Burkholder, J. K. und Yang, N. S. (1993). Transient promoter activity in primary rat mammary epithelial cells evaluated using particle bombardment gene transfer. *In Vitro Cell Dev Biol* **29A**: 165-170.

Tone, M., Powell, M. J., Tone, Y., Thompson, S. A. und Waldmann, H. (2000). IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* **165**: 286-291.

Tourtellotte, W. W., Verity, A. N., Schmid, P., Martinez, S. und Shapshak, P. (1987). Covalent binding of formalin fixed paraffin embedded brain tissue sections to glass slides suitable for in situ hybridization. *J Virol Methods* **15**: 87-99.

Treier, M., Gleiberman, A. S., O'Connell, S. M., Szeto, D. P., McMahon, J. A., McMahon, A. P. und Rosenfeld, M. G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* **12**: 1691-1704.

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

Udvardi, A. J., Templeton, D. J. und Horowitz, J. M. (1995). Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp- family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3953-3957.

Wei, Z., Angerer, R. C. und Angerer, L. M. (1999). Identification of a new sea urchin ets protein, SpEts4, by yeast one- hybrid screening with the hatching enzyme promoter. *Mol Cell Biol* **19**: 1271-1278.

Weigel, D., Jürgens, G., Kuttner, F., Seifert, E. und Jäckle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell* **57**: 645-658.

Wiese, S., Murphy, D. B., Schlung, A., Burfeind, P., Schmundt, D., Schnulle, V., Mattei, M. G. und Thies, U. (1995). The genes for human brain factor 1 and 2, members of the fork head gene family, are clustered on chromosome 14q. *Biochim Biophys Acta* **1262**: 105-112.

Wilken, E. (1998). Charakterisierung und Klonierung von MFK 2, einem neuen fork head-homologen Gen der Maus. Cuvillier Verlag, Göttingen

Winnier, G. E., Hargett, L. und Hogan, B. L. (1997). The winged helix transcription factor MFH1 is required for proliferation and patterning of paraxial mesoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* **11**: 926-940.

Winnier, G. E., Kume, T., Deng, K., Rogers, R., Bundy, J., Raines, C., Walter, M. A., Hogan, B. L. und Conway, S. J. (1999). Roles for the winged helix transcription factors MF1 and MFH1 in cardiovascular development revealed by nonallelic noncomplementation of null alleles. *Dev Biol* **213**: 418-431.

Wu, S. C., Grindley, J., Winnier, G. E., Hargett, L. und Hogan, B. L. (1998). Mouse Mesenchyme forkhead 2 (Mf2): expression, DNA binding and induction by sonic hedgehog during somitogenesis. *Mech Dev* **70**: 3-13.

Yajima, S., Lee, S. H., Minowa, T. und Mouradian, M. M. (1998). Sp family transcription factors regulate expression of rat D2 dopamine receptor gene. *DNA Cell Biol* **17**: 471-479.

Yang, Q., Kong, Y., Rothermel, B., Garry, D. J., Bassel-Duby, R. und Williams, R. S. (2000). The winged-helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta (MNF- beta) forms a co-repressor complex with mammalian Sin3B. *Biochem J* **345**: 335-343.

Yusa, N., Watanabe, K., Yoshida, S., Shirafuji, N., Shimomura, S., Tani, K., Asano, S. und Sato, N. (2000). Transcription factor Sp3 activates the liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase promoter in hematopoietic cells. *J Leukoc Biol* **68**: 772-777.

Zhu, G., Spellman, P. T., Volpe, T., Brown, P. O., Botstein, D., Davis, T. N. und Futcher, B. (2000). Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* **406**: 90-94.

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. W. Engel danke ich für die Überlassung des Themas, für seine hilfreichen Anregungen und für seine stetige Bereitschaft zur Diskussion. Ich danke ihm auch für die großzügige finanzielle Unterstützung beim Besuch wissenschaftlicher Tagungen.

Mein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. B. Zoll für ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für ihren fachlichen Rat und ihre anregenden Diskussionen, auch über fachliche Fragestellungen hinaus. Mein Dank gilt dabei insbesondere Dr. Annette Bieller, die mich in der Anfangszeit meiner Promotion intensiv betreut und vom „Botaniker“ zum „Molekularbiologen“ umgeschult hat.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Ohne ihre Liebe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dabei gilt mein Dank zuerst meinen Eltern, die mir mein Biologiestudium ermöglichten und die mich in jeder Phase meines Studiums und meiner Promotion unterstützt haben. Mein Dank gilt ganz besonders Christiane, meiner Frau, die es in den letzten Wochen und Monaten nicht ganz einfach mit mir hatte. Danke für Deine Liebe und Geduld. Und mein Dank geht an meine Söhne Elias und Gideon, die mich immer wieder ins „richtige Leben“ zurückgeholt haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Bastian Pasche
geboren am 04.12.1967 in Kassel
verheiratet, 2 Söhne

Schulbildung:

1974-1978 Karl-Anton-Henschel-Schule,
Grundschule in Kassel
1978-1987 Goetheschule, Gymnasium in Kassel
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

August 1987 – März 1989 Ableistung des Zivildienstes bei der
Ev. Kirchengemeinde Jungfernkopf, Kassel

Studium:

Oktober 1989 – Mai 1997 Studium der Biologie an der Georg-August-
Universität, Göttingen
Juli 1991 Vordiplom mit den Prüfungsfächern Botanik,
Mikrobiologie, Anorganische Chemie und
Physikalische Chemie
November 1995 mündliche Diplomprüfung in den Fächern Botanik
(Hauptfach), Entwicklungsbiologie und
Bodenkunde (Nebenfächer)
Januar 1996 – April 1997 Anfertigung der Diplomarbeit im Systematisch-
Geobotanischen Institut bei Prof. Dr. M. Runge
27. Mai 1997 Verleihung des Hochschulgrades „Diplom-Biologe“
November 1997 –
Februar 1999 Stipendiat des Graduiertenkollegs 242
„Molekulare Genetik der Entwicklung“
Experimentelle Arbeiten zur Dissertation im Institut
für Humangenetik der Universität Göttingen
seit Februar 1999 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für
Humangenetik der Universität Göttingen, weitere
experimentelle Arbeiten zur vorliegenden
Dissertation