

**Ein Gen für ein neues Ubiquitin-konjugierendes Enzym:
Genomische Organisation, Expression und Funktion**

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
Der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Maria Elisabeth Altmann
aus Lingen

Göttingen 2000

D7

Referent:

Prof. Dr. W. Engel

Korreferent:

Prof. Dr. U. Grossbach

Tag der mündlichen Prüfung:

22.06.2000

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	V
1	Einleitung	1
1.1	Das <i>HGCI</i> Gen des Menschen	3
1.2	Ziele der vorliegenden Arbeit	3
2	Material und Methoden	5
2.1	Chemikalien	5
2.2	Gebrauchswaren	7
2.3	Puffer und Stammlösungen	8
2.4	Sterilisation	12
2.5	Verwendete Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide	12
2.5.1	Bakterienstämme	12
2.5.2	Vektoren	13
2.5.3	Oligonukleotide	13
2.5.4	Sonden	14
2.5.5	Bibliotheken	15
2.5.6	Eukaryontische Zelllinien	15
2.6	Medien, Antibiotika und Agarplatten	16
2.6.1	Medien für Bakterien, Phagen und Zellkulturen	16
2.6.2	Antibiotika	16
2.6.3	Zellkulturmedien	17
2.7	Maustämme	18
2.8	Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren	19
2.8.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	19
2.8.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	19
2.8.3	Isolierung von DNA aus Lambda-Phagen	20
2.8.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	21
2.8.5	Isolierung von genomischer DNA aus Geweben	21
2.8.6	Isolierung von Gesamt-RNA	21
2.8.7	Isolierung von PolyA(+) RNA	22
2.9	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	22
2.10	Enzymatische Modifikation von DNA	23

Inhaltsverzeichnis	II
2.10.1 Restriktionsspaltung	23
2.10.2 Radioaktive Markierung von doppelsträngiger DNA	23
2.10.3 Auffüllreaktion	24
2.10.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	24
2.10.5 Ligation	25
2.11 Klonierung von DNA-Fragmenten	25
2.11.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	25
2.11.2 Transformation	25
2.12 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.12.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese	26
2.12.2 Vertikal-Gelelektrophorese	26
2.12.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	27
2.12.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.13 Hybridisierungsexperimente	27
2.13.1 Transfer von DNA auf Membrane	28
2.13.2 Transfer von RNA auf Membrane	28
2.13.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	29
2.14 Isolieren von Phagenklonen aus einer Bibliothek	29
2.14.1 Ausplattieren von Phagen	29
2.14.2 Transfer der Phagen-DNA auf Nylonmembranen	30
2.14.3 Isolierung und Amplifikation der positiven rekombinanten Phagen	31
2.15 Sequenzanalyse	31
2.15.1 Nicht-radioaktive DNA Sequenzierung	31
2.15.2 Elektronische Verwaltung und Analyse der Sequenzdaten	32
2.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.16.1 PCR an Plasmid-DNA	32
2.16.2 PCR an genomischer DNA	34
2.16.3 Reverse PCR (RT-PCR)	36
2.17 Konstruktion der MARATHON cDNA-Bank	36
2.17.1 Synthese der MARATHON cDNA-Bank	37
2.17.2 Screening der MARATHON cDNA-Bank	37
2.18 Chromosomale Lokalisation über Fluoreszenz- <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	38
2.19 <i>In situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila melanogaster</i> Embryonen	39
2.20 Knock out Technik bei Mäusen	40
2.20.1 Routinekultur von ES-Zellen	40
2.20.2 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	41
2.20.3 Isolierung von ES-Zellklonen und deren Kryokonservierung	42

Inhaltsverzeichnis	III
2.20.4 Isolierung von 2,5 Tage alten Mausembryonen	42
2.20.5 Aggregation von ES-Zellen und Mausembryonen	43
2.20.6 Embryo-Transfer in pseudoträchtige Mäuse	44
2.21 Identifizierung von Chimären	45
2.22 Die RNAi-Technik (injection of double-stranded RNA)	45
2.22.1 RNA-Synthese durch <i>in vitro</i> Transkription	46
2.22.2 Mikoinjektion von dsRNA in <i>Caenorhabditis elegans</i>	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Identifizierung des 3'untranslatierten Bereichs der <i>HGCI</i> cDNA über MARATHON-PCR	48
3.2 <i>HGCI</i> homologe Gene aus verschiedenen Spezies	51
3.2.1 Klonierung des <i>HGCI</i> homologen Gens der Maus (<i>Mrhgc1</i>)	51
3.2.2 Das putative <i>HGCI</i> -Gen in <i>Caenorhabditis elegans</i>	55
3.2.3 Isolierung der homologen cDNA für das <i>HGCI</i> -Gen aus <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>dmrhgc1</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> related <i>HGCI</i>)	56
3.3 Chromosomale Lokalisation von <i>Mrhgc1</i>	57
3.4 Untersuchungen zur Expression von <i>HGCI</i> bei Mensch, Maus und <i>Drosophila melanogaster</i>	58
3.4.1 Expression von <i>HGCI</i> in menschlichen Geweben	58
3.4.2 Expression von <i>Mrhgc1</i> während der pränatalen Entwicklung der Maus	60
3.4.3 'whole mount' <i>in situ</i> Hybridisierung an Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i>	61
3.5 Homologe Rekombination	63
3.5.1 Die Strategie zur Deletion genomischer Bereiche des <i>Mrhgc1</i> -Gens	63
3.5.2 Klonierung der genomischen Fragmente in den pPNT-Vektor	64
3.5.3 Elektroporation von R1-ES-Zellen	66
3.5.4 Aggregation von ES-Zellen mit 2,5 Tage alten Mausembryonen und Analyse der generierten Chimären	68
3.6 Analyse <i>Mrhgc1</i> defizienter Mäuse	69
3.6.1 Statistische Analyse der Wurfgrößen	69
3.6.2 Genotypisierung der Nachkommen	72
3.6.3 Die Kontrolle der Deletion des <i>Mrhgc</i> -Gens durch Northernblot-Analysen	74
3.7 Das <i>HGCI</i> homologe Gen in <i>Caenorhabditis elegans</i>	75
3.7.1 Inaktivierung des zu <i>HGCI</i> homologen Gens <i>cerhgc1</i> in <i>Caenorhabditis elegans</i>	75
3.7.2 Expression von <i>cerhgc1</i> in transgenen Tieren	77

Inhaltsverzeichnis	IV	
4	Diskussion	81
4.1	Isolierung der 3'untranslatierten Region der cDNA und Expressionsanalyse von <i>HGCI</i>	81
4.2	Das <i>Mrhgcl</i> Gen der Maus	83
4.3	<i>HGCI</i> ein evolutionär konserviertes Gen	84
4.4	Die UBC-Domäne	87
4.5	Die Auswirkungen der Deletion vom <i>Mrhgcl</i> durch homologe Rekombination	91
4.6	Analyse von <i>dmhgcl</i> und <i>cerhgcl</i>	93
4.6.1	Expression von <i>dmhgcl</i> in <i>Drosophila melanogaster</i>	93
4.6.2	Funktionelle Analysen und Expression von <i>cehgcl</i> in <i>Caenorhabditis elegans</i>	94
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	98
7	Anhang	110

Abkürzungen

A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
β-Gal	β-Galactosidase
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
BSA	Rinderserumalbumin
c-	centi-(1 x 10 ²)
C	Pyrimidinbase Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	'counts per minute'
CTP	Cytidin-5`-triphosphat
d-	desoxy-
dd-	didesoxy-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	et alteres
FKS	Fötales Kälberserum
G	Purinbase Guanin
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GTP	Guanidin-5`-triphosphat
h	Stunde
HS	Pferdeserum
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
λ	Lambda
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar (mol/l)
m-	milli- (1 x 10 ³)
m	Meter
min	Minute
mRNA	messenger RNA
μ-	mikro- (1 x 10 ⁶)
n-	nano- (1 x 10 ⁹)
NBT	Nitroblau-Tetrazolium-Clorid
NTP	Nukleotid-5`-triphosphat
OD	optische Dichte
p-	pico- (1 x 10 ¹²)
p.A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzsäure
p.c.	post conceptionem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert

pfu	Plaque bildende Einheit
REPEL-Silan	Dimethylchlorsilan
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
s. o.	siehe oben
SV40	Simian Virus 40
T	Pyrimidinbase Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tRNA	transfer Ribonukeinsäure
TTP	Tymidin-5`-triphosphat
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
UTP	Uracil-5`-triphosphat
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galactosid
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren:

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

1 Einleitung

In der eukaryontischen Zelle gibt es zwei Wege des proteolytischen Proteinabbaus. Zum einen können Proteine in den Lysosomen, den membranbegrenzten Organellen der Zelle, intrazellulär gespalten werden. Die Proteine gelangen durch Endocytose in die Lysosomen und werden dort durch hydrolysierende Enzyme verschiedenster Art, den sogenannten sauren Hydrolasen, zersetzt.

Sehr viel selektiver ist der Proteinabbau durch Proteosomen. Diese degradieren regulatorische Proteine des Cytosols und anormale Proteine (Ciechanover et al., 1984, Seufert und Jentsch, 1990), die durch Fehler in der Proteinsynthese entstehen. Regulatorische Proteine besitzen in der Regel eine kurze Halbwertszeit. Zu ihnen zählen Cycline, die bei der Zell-Zyklus-Regulation von Bedeutung sind (Glutzer et al., 1991, Sudakin et al., 1995, Pagano, 1997), einige Transkriptionsfaktoren (Kornitzer et al., 1994), Komponenten des NF κ -B Komplexes (Palombella et al., 1994), das Tumorsuppressor-protein p53 (Scheffner et al., 1990) und das pflanzliche Phytochrom (Shanklin et al., 1987). Damit der Abbau selektiv erfolgen kann, werden die abzubauenen Proteine mit Ubiquitinmolekülen markiert. Ubiquitin ist ein kleines, globuläres und hitzestabiles Protein bestehend aus 76 Aminosäuren, das in Eukaryonten von der Hefe bis zum Menschen stark konserviert ist (Ozkaynak et al., 1984, Jentsch et al., 1991). Wird Ubiquitin über einen Multienzymkomplex kovalent an ein Protein gebunden, so kann dieses markierte Protein durch einen zweiten aktivierten Proteosomen-Komplex (26S-Form) in seine Aminosäuren gespalten werden, wobei Ubiquitin wieder freigesetzt wird. Die Markierung und die Spaltung eines Proteins sind ATP-abhängig.

Drei Enzyme sind an der Konjugation des Ubiquitins mit Proteinen beteiligt. Zunächst wird Ubiquitin durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym ('ubiquitin activating enzyme', E1-Enzym) in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert. Dabei entsteht ein E1-Ubiquitin-Thioester. Das aktivierte Ubiquitin wird im folgenden Schritt durch Abspaltung des E1-Enzyms auf die Sulfhydrylgruppe eines Ubiquitin-konjugierenden

Enzyms (ubiquitin conjugating enzyme, E2-Enzym) übertragen. Eine Ubiquitin Ligase (E3-Enzym) katalysiert anschließend den Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym zum Zielprotein (Jentsch, 1992, Hershko und Ciechanover, 1998). An ein Protein, das abgebaut werden soll, werden in der Regel mehrere Ubiquitinmolekülen angehängt.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *HGCI*-Gens, das hier bearbeitet wurde, zeigt Homologien zu dem E2-Enzym aus dem oben beschriebenen und in Abbildung 1.1 dargestellten Multienzymkomplex des Ubiquitin abhängigen Proteinabbaus, der für die Markierung von abzubauenen Enzymen von Bedeutung ist. Im Ergebnisteil und in der Diskussion dieser Arbeit wird näher darauf eingegangen.

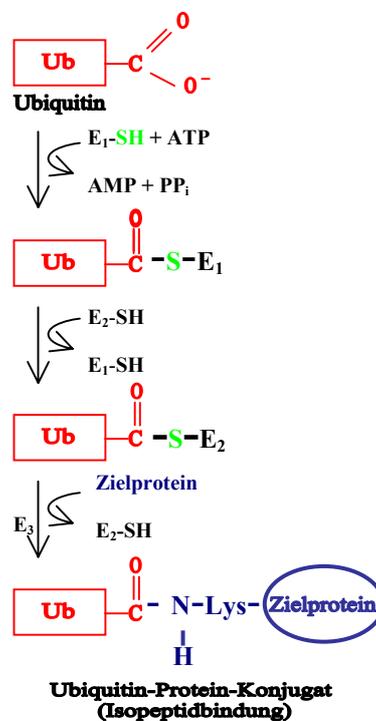


Abb. 1.1: Aktivierung und Verknüpfung des Ubiquitins mit einem Protein, das zum Abbau bestimmt ist (nach Stryer, 1988).

1.1 Das *HGCI*-Gen des Menschen

Das *HGCI*-Gen kartiert in der Chromosomenregion 1q21-23 und deckt dort etwa 12 kb des menschlichen Genoms ab. Auf genomischer Ebene erstreckt sich der sequenzierte, im 5'- und 3'-Bereich unvollständige cDNA-Bereich über 13 Exons und 12 Introns. Dies geht aus Sequenzvergleichen der cDNA mit dem genomischen Fragment eines humanen Cosmidklons hervor. Aus der cDNA-Sequenz des *HGCI*-Gens konnte ein offener Leserahmen von 423 Aminosäuren abgeleitet werden, der mit dem Stopkodon TAA endet.

Northern Blot Analysen an Gesamt-RNA aus verschiedenen menschlichen Organen ergaben, daß das *HGCI*-Gen in allen untersuchten menschlichen Geweben transkribiert wird. Das Transkript von 2,4 kb konnte auch in Gesamt-RNA verschiedener Säugetierspezies nachgewiesen werden. Bei Ratte und Maus konnte ein weiteres Transkript von etwa 4 kb ausgemacht werden, das als alternatives Spleißprodukt angesehen werden kann. Kreuzhybridisierungen genomischer DNA verschiedener Vertebraten und *Drosophila* mit einer menschlichen cDNA-Sonde gaben Hinweise, daß das *HGCI*-Gen ein evolutionär konserviertes Gen ist.

1.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Da im Rahmen der Diplomarbeit nicht die gesamte cDNA des *HGCI*-Gens isoliert werden konnte, sollte diese zunächst vervollständigt werden. Ferner sollte geklärt werden, ob ,wie bei Maus und Ratte, auch in menschlichen Geweben beide Transkripte des *HGCI*-Gens nachweisbar sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion des *HGCI*-Gens im Rahmen der embryonalen und postnatalen Entwicklung der Maus zu studieren. Zu diesem Zweck sollte das Gen durch die Methode der homologen Rekombination in embryonalen

Stammzellen der Maus inaktiviert werden. Über deren Aggregation mit isolierten Mausembryonen sollten dann Chimären erzeugt werden. Verpaarungen der Chimären sollten dazu führen, daß das homolog rekombinierte Allel in den Nachkommen heterozygot (+/-) und homozygot (-/-) vorliegt. Untersuchungen an den homozygoten Mäusen sollten Aufschluß über die Funktion des *HGCI*-Gens geben. Da das Gen ubiquitär exprimiert wird, sollten Northern Blot Analysen den Beginn der Expression des *HGCI*-Gens in der embryonalen Entwicklung festlegen.

Um die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen durchführen zu können, war es zu Beginn der Arbeit notwendig das murine *HGCI*-Gen (*Mrhgc1*) aus einer genomischen Bibliothek des Mausstammes 129/SvJ zu isolieren und zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

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

Acrylamid	Gibco/BRL, Eggenstein
Agarose	Gibco/BRL
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Ammoniumacetat	Fluka, Neu-Ulm
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Agar	Difco, Detroit, USA
Bindesilan	Fluka
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Biomol, Hamburg
Chloroform	Baker, Deventer, NL
Diethylpyrocarbonat	Sigma
Dextransulfat	Pharmacia, Freiburg
Dithiothreitol	Sigma
DNA-MarkerIII	Boehringer
1 kb DNA-Leiter	Gibco/BRL

DNaseI	Gibco/BRL
DNaseI (RNase-frei)	Boehringer
dNTPs	Boehringer
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll 400	Pharmacia
FKS	Gibco/BRL
Formaldehyd	Gibco/BRL
Formamid	Fluka
Glycerol	Gibco/BRL
Hefeextrakt	Difco
IPTG	Biomol
Kanamycin	Sigma
Klenow DNA Polymerase	Amersham, Braunschweig
Lachs-Spermium DNA	Sigma
Mineralöl	Sigma
Orange G	Sigma
Phenol	Gibco/BRL
Polyethylenglykol 6000 (PEG 6000)	Serva
Proteinase K	Pharmacia
[α - ³² P] dCTP	Amersham
Restriktionsenzyme	Biolabs, Schwalbach; Boehringer; Gibco/BRL
Reverse Transkriptase	Gibco/BRL
RNase A	Sigma

RNase Inhibitor	Boehringer; Promega, Wisconsin, USA
RNA-Längenstandard	Gibco/BRL
rNTPs	Boehringer
SDS	Serva
T ₄ DNA Ligase	Boehringer
T ₃ RNA Polymerase	Boehringer
T ₇ RNA Polymerase	Boehringer
Taq DNA Polymerase	Gibco/BRL
tRNA	Boehringer
Trypton	Difco
X-Gal	Biomol
Xylencyanol	Bio-Rad, München

2.2 Gebrauchswaren

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

Blottingpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalfilter Minisart NML	Sartorius, Göttingen
Filterpapier 0858	Schleicher & Schüll
Hybond C	Amersham, Braunschweig
Hybond N	Amersham
Nitrocellulosefilter BA 85	Schleicher & Schüll

Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme	Amersham

2.3 Puffer und Stammlösungen

Die meisten Enzym-Puffer und Puffer für gebrauchsfertige Kits wurden, wie vom Hersteller geliefert, benutzt. Ihre Zusammensetzung ist aus den entsprechenden Beipackzetteln ersichtlich und hier nicht weiter aufgeführt. Sonstige Puffer und Stammlösungen wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt. Die dazu benötigten Chemikalien wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert. Für die Arbeiten mit RNA wurden die Puffer, sofern sie kein Tris enthielten, μN mit 0,1 % DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert. Tris-Puffer wurden in RNase freien Gefäßen mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt.

Acrylamid-Lösung (38:2)	38 % Acrylamid 2 % Bisacrylamid
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardts-Lösung (50 %)	1 % Ficoll 400 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % BSA

E-Puffer (10 x)	300 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM EDTA pH 7,0
Hybridisierungslösung I	10 % Dextransulfat 5 x Denhardts-Lösung 5 x SSC 0,5 % SDS 100 µg/ml Lachsspermium DNA
Hybridisierungslösung II	50 % Formamid (deionisiert) 10 x Denhardts-Lösung 5 x SSPE 2 % SDS 100 µg/ml Lachsspermium DNA
Gewebe-Lysis-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM EDTA, pH 8,0 0,5 % SDS
Methylenblau-Lösung	0,04 % Methylenblau 0,5 M NaAc, pH 5,2
NaOH/SDS-Lösung	200 mM NaOH 1 % SDS
Neutralisierungspuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 5,5 1,5 M NaCl
PBS-Puffer (10 x)	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4

PEG-Lösung	40 % PEG 6000 16 % NaCl
Phagenpuffer	10 mM MgCl ₂ 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 20 mM NaCl
SSC (20 x)	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat pH 7,0
SSPE (20 x)	3 M NaCl 200 mM NaH ₂ PO ₄ 20 mM EDTA pH 7,0
Stopp-Mix I	0,1 % Orange G 200 mM EDTA 15 % Ficoll400
Stopp-Mix II	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol 15 % Ficoll400
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
TBE (5 x)	0,45 M Tris 0,45 M Borsäure 10 mM EDTA pH 8,2

TE/RNase-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100µg/ml RNase A
TFBI-Lösung	30 mM KAc 50 mM MgCl ₂ 100 mM KCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin
TFBII-Lösung	10 mM NaMOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % Glycerin
Tyrode's Säure	800 mg NaCl 20 mg KCl 24 mg CaCl ₂ 2 H ₂ O 10 mg MgCl ₂ 6 H ₂ O 100 mg Glucose 400 mg Polyvenylpyrrolidon mit H ₂ O ad 100 ml pH 2,5
X-Gal-Lösung	2 % X-Gal in Dimethylformamid

2.4 Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte 20 min bei 120°C und 10^5 Pascal im Dampfdruckautoklaven (Webco, Bad Schwartau) oder durch Sterilfiltration. Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder für 8-12 h bei 180°C hitzesterilisiert.

2.5 Verwendete Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide

2.5.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Phagen- und Plasmid-DNA wurden folgende Wirtsstämme eingesetzt:

<i>Escherichia coli</i> LE392	Murray et al., 1977
<i>Escherichia coli</i> HPLC600	Stratagene, La Jolla, USA
<i>Escherichia coli</i> HB101	Bolivar und Beckmann, 1979
<i>Escherichia coli</i> XL1Blue	Bullock et al., 1987
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Hanahan, 1985

2.5.2 Vektoren

pBlueskript [®] II SK(-)	Stratagene, La Jolla, USA
pBlueskript [®] II KS(-)	Stratagene
pGEM [®] 3Zf(+)	Promega, Wisconsin, USA
pGEM [®] -T	Promega
pUC18	Norander et al.,1983
Lambda gt 10	Stratagene
EMBL3	Frischauf et al.,1983
pPNT	Tybulewicz et al.,1991

2.5.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden am institutseigenen Oligonukleotidsynthesizer (Model 392) der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) hergestellt oder von der Firma NAPS (Göttingen) bezogen. Die im Institut synthetisierten Oligonukleotide wurden ÜN bei 56°C inkubiert, um die Schutzgruppen abzuspalten, und anschließend durch Zugabe von 1/10 Vol 3M NaAc (pH 5,2) und 2,5 Vol absolutem Ethanol präzipitiert. Die Firma NAPS lieferte die Oligonukleotide mit einer eingestellten Konzentration von 100 pmol/ μl .

Die Primersequenzen sind im Anhang aufgelistet.

2.5.4 Sonden

pHEF 2 (Rapp et al., 1989): Diese Sonde enthält die cDNA des humanen Elongationsfaktors 2 und wurde von der Arbeitsgruppe K. Scheit, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen, zur Verfügung gestellt. Ein 1,6 kb BamHI/BglII Fragment wurde für Kontrollhybridisierungen bei Northern Blots eingesetzt.

β -Actin (Giovanna et al., 1991; Lamballe et al., 1991): Die β -Actin cDNA wurde von der Firma Clontech, Palo Alto, USA, für Kontrollhybridisierungen von Northern Blots mitgeliefert.

25: Dieses 1,5 kb cDNA-Fragment des HGC1-Gens wurde bei der Isolierung des homologen Maus-Gens eingesetzt. Die Sequenz dieser Sonde beginnt in Exon 3. Ein internes PvuII-Fragment von 1 kb Größe (**25G**), dessen Sequenz in Exon 5 beginnt, wurde ebenfalls als Sonde eingesetzt.

Bam3: Das 0,8 kb große genomische Fragment aus dem 5'-Bereich des HGC1-Genes enthält die 400 bp bekannte Sequenz des Exon1. Mit dieser Sonde wurde die 5'-Region des murinen Gens isoliert.

2.5.5 Bibliotheken

Genomische Bibliothek der Maus:

Die genomische DNA-Bibliothek der Maus wurde aus J1-ES-Zellen isoliert, die ihrerseits aus 129/SvJ Mäusen etabliert wurden. Die DNA wurde in den Phagen EMBL3 kloniert. Die rekombinanten DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 15-18 kb lassen sich durch die Restriktionsenzyme Sall bzw. BamHI vom Vektoranteil trennen. Die genomische Bibliothek wurde freundlicherweise von Prof. Braun (Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Embryonale *Drosophila melanogaster* cDNA-Bibliothek:

Die embryonale *Drosophila* cDNA-Bibliothek wurde von der Firma Clontech (Palo Alto, USA) bezogen. Zur Herstellung dieser Bibliothek erfolgte die cDNA-Synthese sowohl mit Oligo(dT)-Primern als auch mit random-Primern an RNA von 0-18 h alten *Drosophila* Embryonen. Die doppelsträngigen cDNA-Fragmente wurden über EcoRI-Linker in den Lambda gt 10 Vektor kloniert.

2.5.6 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	isoliert aus:	Referenz
R1	Embryonalen Stammzellen	Nagy et al., 1993
EmFi	Embryonalen Fibroblasten	Adham et al., 1997

Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien der Maus.

2.6 Medien, Antibiotika und Agarplatten

2.6.1 Medien für Bakterien, Phagen und Zellkulturen

LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefe 1 % NaCl pH 7,2
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 50-100 µg/ml Ampicillin
LB ⁺⁺ -Medium	LB-Medium mit 10 mM MgSO ₄ und 0,2 % Maltose
Oja-Medium	LB-Amp-Medium mit 100 µM IPTG und 0,4 % X-Gal
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Agar
TOP-Agar	LB-Medium mit 0,75 % Agarose

Die Medien wurden mit einfach destilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

2.6.2 Antibiotika

Es wurden Stammlösungen der Antibiotika angesetzt, steril filtriert und bei -20°C gelagert. Die jeweils benötigte Lösung wurde dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C zugesetzt.

	Stammlösung	gelöst in:	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	bidest. Wasser	50-100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	bidest. Wasser	50 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml	Methanol	12,5 µg/ml

2.6.3 Zellkulturmedien

Für die Zellkultur wurden folgende Medien verwendet:

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

ES-Zellmedium	DULBECCO`s MEN (DMEN)
	0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM NaPyruvat
	10 ⁻⁶ M β -Mercaptoethanol
	2 mM L-Glutamin
	20 % FKS
	1000 U/ml LIF
EmFi-Zellmedium	DULBECCO`s MEN (DMEN)
	2 mM L-Glutamin
	10 % FKS

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

RI-ES-Zellen 30 % ES-Zellmedium mit 50 % FKS und 20 % DMSO

EmFi-Zellen 30 % EmFi-Zellmedium mit 50 % FKS und 20 % DMSO

2.7 Maustämme

2,5 Tage alten Mausembryonen wurden aus trächtigen Weibchen des Stammes CD1 isoliert. Als Ammen-Tiere dienten pseudoträchtige Weibchen des Stammes NMRI. Männchen dieses Stammes wurden durch Vasektomie sterilisiert (Hogan et al., 1994) und anschließend bei den Verpaarungen eingesetzt, um pseudoträchtige Weibchen zu erhalten. Alle Mäuse wurden entweder über die Firma Charles River (Hannover) bezogen oder stammten aus institutseigenen Beständen.

Für die Verpaarungen mit Chimären wurden Mäuse der Stämme CD1 oder 129/SvJ eingesetzt. Die 129/SvJ Mäuse wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Gruss (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

2.8 Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

(Sambrock et al., 1989)

Plasmidpräparationen im Kleinmaßstab dienen analytischen Zwecken und wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lysis durchgeführt. Die Qualität der nach dieser Methode isolierten DNA reichte für Restriktionsanalysen und Sequenzierungen aus. 1,5 ml Bakterienkultur wurde abzentrifugiert, die Bakterien in 200 µl TE/RNase-Puffer resuspendiert, mit 200 µl NaOH/SDS-Lösung lysiert und Proteine, genomische DNA und SDS anschließend mit 200 µl KAc-Puffer präzipitiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 15000 x g, 4°C) wurde der Überstand mit 1 ml absolutem Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl H₂O gelöst. 2-5 µl dieser DNA wurden in einem Testverdau überprüft.

2.8.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Größere Mengen Plasmid-DNA (100-1000 µg) wurde über DNA-Affinitätsäulen aus dem JETSTAR Plasmid Midi- oder Maxi-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) aufgereinigt. Die Bakterien wurden wie bei der Minipräp-Methode abzentrifugiert und

mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen (s. 2.8.1). Der Ansatz wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern und Salzkomplexen (30 min, 20000 x g) getrennt und über eine äquilibrierte Säule gegeben. Die an der Säulenmatrix gebundene DNA wurde zweimal mit ca. einem Säulenvolumen Waschpuffer gereinigt, eluiert und mit 0,7 Vol Isopropanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50-200 µl H₂O gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt und in einem Testverdau überprüft.

2.8.3 Isolierung von DNA aus Lambda-Phagen

Ein Phagenplaque wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und zu 5 ml LB⁺⁺-Medium (s. 2.6.1) und 50 µl Bakterien (üN-Kultur, 5fach konzentriert) gegeben. Der Ansatz wurde dann für 8-10 h bei 37°C bis zur Lyse inkubiert. Nach Zugabe von 1/100 Vol Chloroform wurde die Kultur erneut 10 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 3000 x g, 4°C). Das Mini-Lysat konnte so ca. 2 Monate bei 4°C gelagert werden.

100-200 µl des Mini-Lysats wurde mit 2 ml Bakterien (üN-Kultur) zu 25 ml LB⁺⁺-Medium gegeben und 4-6 h bei 37°C bis zur Lyse geschüttelt. Durch Zugabe von 250 µl Chloroform wurden die Bakterien aufgebrochen und die Zelltrümmer in einer nachfolgenden Zentrifugation (10 min, 5000 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde mit 10 µl RNaseA (10 mg/ml) und 10 µl DNaseI (10 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Mit 3,2 ml PEG 6000-Lösung/10 ml Lysat wurden die Phagenpartikel üN auf Eis präzipitiert, abzentrifugiert (20 min, 3000 x g, 4°C) und in 600 µl Phagenpuffer resuspendiert. Die Phagensuspension wurde nochmals mit 5 µl RNaseA (30 min, 37°C) behandelt und anschließend eine Stunde mit 10 µl SDS (10 %) und 4 µl Proteinase K (50 mg/ml) bei 37°C inkubiert. Die Phagen-DNA wurde nach einer Phenol/Chloroform Extraktion mit 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 6,0) und 1 Vol Isopropanol präzipitiert, luftgetrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.8.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Jet-sorb-Kit (Genomed, Bad Oenhausen). Die zu isolierende DNA-Bande wurde unter UV-Licht (354 nm) aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und mit entsprechender Menge an Puffer A1 und Glasmilch (300 µl Puffer A1 und 10 µl Glasmilk/100 mg Gelstück) bei 50°C gelöst. Die Glaspartikel wurden abzentrifugiert (1 min, 13000 x g), einmal mit 500 µl Puffer A1 und zweimal mit 300 µl Puffer A2 gewaschen. Die DNA wurde mit 20-50 µl H₂O bei 50°C von der Glasmilch eluiert und ein Aliquot auf einem Testgel kontrolliert.

2.8.5 Isolierung von genomischer DNA aus Geweben

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde genomische DNA aus den Schwanzspitzen bzw. den Embryonen der Mäuse isoliert (Laird et al., 1991). Dazu wurden 1-2 cm Schwanzspitze von drei Wochen alten Mäusen in 700 µl Lysis-Puffer und 35 µl Proteinase K (10 mg/ml) unter Schütteln üN bei 56°C inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die DNA mit 2 Vol absolutem Ethanol präzipitiert und anschließend mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Die genomische DNA wurde in 100-200 µl H₂O gelöst und bei 4°C gelagert.

2.8.6 Isolierung von Gesamt-RNA

(modifiziert nach Chomczynsky und Sacchi, 1987)

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden 100 mg Organmaterial bzw. 5-10 x 10⁶ Zellen

mit 1 ml RNA-Reagenz (Biomol, Hamburg) in einem Reaktionsgefäß mit einem Glas-Teflon-Homogenisator aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Suspension für 5 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (15 min, 4000 x g, 4°C). Die RNA (obere wässrige Phase) wurde mit einem Vol Isopropanol 10 min auf Eis präzipitiert und dann 10 min bei 4000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und in 20-50 µl DEPC-H₂O gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die RNA in 20 µg-Aliquots aufgeteilt und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C aufbewahrt.

2.8.7 Isolierung von PolyA(+) RNA

Zur Anreicherung von messenger RNA (mRNA) wurde der Oligotex-mRNA-Kit (Quiagen) benutzt. Gesamt-RNA wurde 1:1 mit 2x Bindungspuffer gemischt und mit 6 µl Oligotex Suspension/100 µg RNA 3 min bei 65°C und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Die Oligotex Partikel wurden abzentrifugiert (2 min, 14000 x g) und zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution der mRNA wurde mit zweimal 5 µl Elutionspuffer (vorgewärmt auf 70°C) je eingesetzten 100 µg Gesamt-RNA durchgeführt.

2.9 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Ausbeute an isolierter DNA aus Gelen wurde im Vergleich mit Proben bekannter Konzentration auf Agarosegelen abgeschätzt. Bei Plasmidpräparationen und Aufarbeitung größerer Mengen von RNA wurde die Konzentration im Spektralphotometer (Hewlett Packard, Typ 8452A) bestimmt. Es wurden die Extinktionen bei 230, 260, 280 und 320 nm gemessen und die Differenz $OD_{260} - OD_{320}$

sowie die Quotienten OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} ermittelt. Unter Zugrundlegung einer OD_{260} von 1 bei einer DNA-Lösung von 50 ng/ μ l (bzw. 40 ng/ μ l für RNA) wurden die entsprechenden Konzentrationen errechnet. Die Quotienten $OD_{260}/280$ und $OD_{260}/230$ spiegeln das Ausmaß an Protein- bzw. Salzkontaminationen wieder und sollten $> 1,8$ bzw. $> 2,0$ sein.

2.10 Enzymatische Modifikation von DNA

2.10.1 Restriktionsspaltung

Rekombinante oder genomische DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen (RE) verschiedener Hersteller gespalten und weiterverarbeitet. Die Spaltungsansätze enthielten 1/10 Vol des vorgeschriebenen Enzympuffers und maximal 1/10 Vol an Enzym. Es wurden in der Regel 2-10 U RE/ μ g DNA eingesetzt. Für den simultanten Verdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen wurde, soweit möglich, ein mit beiden Enzymen kompatibler Puffer eingesetzt, ansonsten wurde der Ansatz zwischen den beiden Reaktionen präzipitiert und so ein Pufferwechsel erreicht. Je nach weiterer Verwendung wurden die Reaktionsansätze auf Agarosegele aufgetragen oder das Enzym durch Hitze (10 min, 70°C) inaktiviert.

2.10.2 Radioaktive Markierung von doppelsträngiger DNA

(nach Feinberg und Vogelstein 1984)

Für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden wurde der Megaprime-DNA

Labeling-Kit der Fa. Amersham (Braunschweig) verwendet. 25-50 ng einer doppelsträngigen DNA wurde mit 50 pmol Oligo(dN)₉-Nukleotiden für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und auf Eis gekühlt. Anschließend wurden Reaktionspuffer, [α -³²P]-dCTP und Wasser nach den Angaben des Herstellers dazugegeben und die Reaktion durch Zugabe der Klenow-DNA-Polymerase gestartet. Nach 45-60minütiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz präzipitiert und der Einbau der radioaktiven Nukleotide in die DNA mit einem Handmonitor überprüft.

2.10.3 Auffüllreaktion

Wurden für Klonierungen DNA-Fragmente mit glatten Enden (blunt ends) benötigt, so wurden Überhänge mit Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt. 50-500 ng DNA wurden in 20 μ l Reaktionen mit 2 μ l Klenow-Puffer, 2 μ l 5 mM dNTPs und 2 U Klenow-Enzym gemischt und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert.

2.10.4 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Vektoren, die mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert worden waren, wurden mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die 5'-Phosphatgruppen zu entfernen. Dies verhindert eine Religation des Vektors ohne Fremd-DNA-Insert und erhöht die Rate von rekombinanten Klonen. Nach der Restriktionsspaltung der Vektor-DNA wurde 1 U alkalische Phosphatase direkt zum Verdauungsansatz (1-5 μ g Vektor-DNA) gegeben. Nach 30 min wurde das Enzym durch 10minütige Inkubation bei 80 °C inaktiviert und die Vektor-DNA durch Zugabe von Wasser auf eine Konzentration von 20 ng/ μ l gebracht.

2.10.5 Ligation

Für die Subklonierung von DNA wurden Vektor-DNA (s.2.10.3) und Insert-DNA in einer 10 µl Reaktion mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 1 U T₄-DNA-Ligase gemischt. Für die Ligation von Fragmenten wurden äquimolare Verhältnisse von Vektor und Insert eingesetzt und die Reaktion in bei 16°C inkubiert.

2.11 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.11.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 100 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD von 0,5 angezogen. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4°C mit 1340 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert und 10-15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 4 ml kaltem TFBII-Puffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.11.2 Transformation

(Hanahan, 1983)

Für die Transformation der Bakterien mit den Plasmiden wurden die kompetenten Zellen (2.11.1) langsam auf Eis aufgetaut. Der Ligationsansatz (2.10.5) wurde mit 100 µl kompetenten Zellen 30-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 s ein

Hitzeschock bei 42°C. Nach dem Abkühlen (2 min auf Eis) wurde der Ansatz mit 100-200 µl LB-Medium 45-60 min bei 37°C inkubiert, auf Oja-Agarplatten (s. 2.6.1) ausplattiert und üN bei 37°C bebrütet.

2.12 Agarose-Gelelektrophorese

2.12.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Gelelektrophorese wurde hauptsächlich bei Testgelen, Gelen für Restriktionskartierungen und Insertisolierungen eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,8-3%ige Gele in 0,5x TBE-Puffer benutzt. Den Gelen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch den Vergleich mit der kb-Leiter (Gibco/BRL). Die DNA-Proben wurden vor dem Lauf mit 20 % Stopp-Mix beschwert.

2.12.2 Vertikal-Gelelektrophorese

Genomische DNA-Fragmente wurden in vertikalen Agarosegelen aufgetrennt. Zunächst wurde ein 1-2 cm dickes Sockelgel aus 2 % Agarose in 1x E-Puffer von unten in die Elektrophoresekammer (Glasgerätebau P. Ochs, Lenglern) gegossen. Nach Erkalten des Sockels wurde ein 0,8 %iges Trenngel darübergeschichtet. Die Elektrophorese erfolgte üN bei einer Spannung von 25 V unter ständigem Umwälzen (Peristaltikpumpe Ismatec Sa, Zürich) des Laufpuffers, um pH- und Salzgradienten zu verhindern.

2.12.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

(nach Sambrook et al., 1989)

Für die Auftrennung von RNA wurden 1 %ige Gele verwendet. Die Gele wurden wie oben in Vertikalkammern gegossen. Zusätzlich enthielten diese Gele 7,4 % Formaldehyd, um die Rückbildung der Sekundärstrukturen der RNA während der Elektrophorese zu verhindern. Die Proben (20 µg Gesamt-RNA) wurden auf ein Vol von 14 µl gebracht, mit 4µl 10x E-Puffer, 6 µl Formaldehyd (37 %) und 16 µl Formamid (40 %) gemischt und 10 min bei 65°C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden 16 µl Stoppmix I mit 1,2 µg Ethidiumbromid zu der RNA gegeben und diese auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4°C und 65 V für 6-8 h unter Umwälzung des Puffers (s.o.) durchgeführt.

2.12.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde zur Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente (≥ 500 bp) und zur Aufreinigung von PCR-Produkten genutzt. Es wurden 4-8 %ige Gele gegossen. 1x TBE diente als Laufpuffer. Zum Start der Polymerisation wurden TEMED (0,04 % des Endvolumens) und 10 %iges APS (0,8 % des Endvolumens) zugegeben, gemischt und die Lösung zwischen die Glasplatten der vorbereiteten Apparatur gegossen.

2.13 Hybridisierungsexperimente

Es wurden Southern Blots (DNA wird an Filter gebunden, Southern, 1975) und

Northern Blots (RNA wird an Filter gebunden) durchgeführt. DNA bzw. RNA wurde in Agarosegelen aufgetrennt (s. 2.12.1-3), auf Nitrocellulose oder Nylon Membrane transferiert, fixiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert.

2.13.1 Transfer von DNA auf Membrane

(nach Southern, 1975)

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA wurden die Gele zur Dokumentation fotografiert. Sollten DNA-Fragmente ≥ 10 kb aus Gelen transferiert werden, so wurden die Gele zunächst 10 min in 0,25 M HCl depuriniert. Durch diese Behandlung werden Einzelstrangbrüche erzeugt und die resultierenden kleinen Fragmente können effektiver aus dem Gel auf eine Membran transferiert werden. Anschließend wurden die Gele 30 min mit Denaturierungslösung und 45 min mit Neutralisierungslösung behandelt. Die DNA wurde dann mittels Kapillarblot auf Nitrocellulose- oder Nylonmembrane übertragen. Nach einer Transferzeit von 10-20 h wurden die Filter kurz in 2 x SSC gewaschen und zur Fixierung der DNA 2 h bei 80°C gebacken.

2.13.2 Transfer von RNA auf Membrane

Die in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennte RNA (2.12.3) wurde nach der Elektrophorese fotografiert und ohne Vorbehandlung mittels Kapillarblot auf Nitrocellulose- oder Nylonmembrane transferiert (Northern Blot). Nach dem Transfer wurde die RNA in gleicher Weise wie die DNA durch Backen (2 h, 80°C) an die Membran gebunden. Die RNA-Längenstandard enthaltenden Spuren wurden vom Filter abgeschnitten, 15 min in 5 % Essigsäure fixiert, 10 min in Methyleneblau gefärbt, unter

fließendem Wasser entfärbt und luftgetrocknet.

2.13.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die DNA- bzw. RNA-Filter (2.13.1 bzw. 2.13.2) wurden in 2 x SSC äquilibriert, gerollt und in ein mit 2 x SSC gefülltes Hybridisierungsgefäß gegeben, wobei die mit DNA bzw. RNA beladene Seite der Filter in das Lumen zeigte. Der Filter soll luftblasenfrei an der Wandung des Inkubationsgefäßes anliegen. Zur Vorhybridisierung wurden 15 ml Hybridisierungslösung (Absättigung unspezifischer Bindungen) auf den Filter gegeben und dieser 2 h bei 55-65°C im Rollofen (Bachofer, Reutlingen) inkubiert. Die radioaktiv markierte Sonde (2.10.2) wurde im kochenden Wasserbad denaturiert, auf Eis gekühlt und anschließend zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Filter wurden 1x bei 55-65°C unter Rollen hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter bei RT in 2 x SSC und anschließend je nach Stringenz in 0,2x bis 2 x SSC mit 0,1 % SDS bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen. Die Filter wurden in Folie eingeschweißt, mit einem Röntgenfilm in eine Autoradiografiekassette mit Verstärkerfolie eingelegt und bei -70°C exponiert.

2.14 Isolieren von Phagenklonen aus einer Bibliothek

(nach Sambrook et al., 1989)

2.14.1 Ausplattieren von Phagen

Für das Screenen einer Phagenbibliothek wurde diese so ausplattiert, daß zwischen 10000 und 20000 Phagenplaques pro Platte gezählt werden konnten. Dazu wurde zunächst der aktuelle Titer der Phagensuspension bestimmt. Eine Verdünnungsreihe der

Phagen wurde ausplattiert und die Plaques auf den Platten ausgezählt. Die Menge an infektiösen Phagen (pfu = plaque forming units) pro ml konnte so unter Berücksichtigung der Verdünnung ermittelt werden. Anschließend wurden etwa 500 µl einer üN-Kultur des Wirtsbakterienstammes mit der entsprechenden Phagenzahl beimpft, 20-30 min bei 37°C inkubiert, mit 8-10 ml TOP-Agar gemischt und auf LB-Agarplatten gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden üN bei 37°C bis zur Lyse inkubiert.

2.14.2 Transfer der Phagen-DNA auf Nylonmembranen

(nach Benton und Davis, 1977)

Um aus einer Phagenbibliothek Klone isolieren zu können, ist es nötig ihre DNA auf Filter zu übertragen und durch Hybridisierung mit einer entsprechenden DNA-Sonde die gewünschten Klone zu identifizieren.

Pro Platte wurden zwei Replika-Filter (Nylonfilter, Optitran BA-S 85, Schleicher und Schüll) hergestellt. Dazu wurde der erste Filter 5 min bei RT, der zweite Filter 15 min bei 4°C luftblasenfrei auf die Agarplatte gelegt. Die Position der Filter wurde mit einer sterilen Kanüle markiert, um später eine eindeutige Identifikation der positiven Klone zu ermöglichen. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Filter dann mit einer Pinzette vorsichtig abgezogen und mit der DNA-Seite nach oben für 3 min auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt. Anschließend wurden die Filter 10 min neutralisiert und 10 min in 2 x SSC gewaschen. Die DNA auf den Membranen wurde UV-fixiert (Stratalinker, Stratagene) und 2 h bei 80°C gebacken. Die nachfolgende Hybridisierung der Filter erfolgte wie unter 2.13.3 beschrieben.

2.14.3 Isolierung und Amplifikation der positiven rekombinanten Phagen

Der Bereich um einen Klon, welcher durch die Hybridisierung als positiv identifiziert wurde, wurde im Umkreis von ca. $0,5 \text{ cm}^2$ aus der Agarplatte ausgestochen, in $500 \mu\text{l}$ Phagenpuffer mit einem Tropfen Chloroform aufgenommen und üN bei 4°C aus der Agarose gelöst. Um die eluierten Phagen zu vereinzeln, wurden solange Rescreeningschritte durchgeführt, bis ein Phagenklon eindeutig einem positiven Signal zugeordnet werden konnte. Ein einzelner Phagenklon wurde anschließend mit einem Zahnstocher von der Platte gepickt und in $100 \mu\text{l}$ Phagenpuffer mit einem Tropfen Chloroform suspendiert und angezogen (s. 2.9.3).

2.15 Sequenzanalyse

2.15.1 Nicht-radioaktive DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) durchgeführt.

Bei der nicht-radioaktiven Sequenzierung wurde mit den Dye Terminator Kits von ABI oder Perkin Elmer gearbeitet. $0,8 \mu\text{g}$ doppelsträngige Plasmid-DNA wurde mit 10 pmol Sequenzprimer und H_2O auf ein Vol von $7 \mu\text{l}$ gebracht und mit $5 \mu\text{l}$ Dye Terminator Mix gemischt. Nach Überschichten mit Mineralöl wurde eine Sequenz PCR über 25 Zyklen durchgeführt ($98^\circ\text{C}/30 \text{ s}$, $50^\circ\text{C}/15 \text{ s}$, $60^\circ\text{C}/4 \text{ min}$ pro Zyklus). Danach wurde der Ansatz auf $100 \mu\text{l}$ mit Wasser aufgefüllt. Die DNA wurde mit $10 \mu\text{l}$ 2 M NaAc (pH 4,8) und $300 \mu\text{l}$ eiskaltem Ethanol präzipitiert, mit 70% igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in $4 \mu\text{l}$ Formamid/EDTA ($0,5 \text{ M EDTA}$ (pH 8,0) 1:5 in Formamid) gelöst. Nach 5minütiger Denaturierung wurde die DNA auf ein Sequenzgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in einem 'Applied Biosystem 373' DNA Sequenzer. Es wurden 7

%ige denaturierende Polyarylamidgele unter Verwendung fertiger, speziell für Fluoreszenz-Sequenzelektrophorese hergestellter Puffer und Lösungen (Roth) gegossen. Die Elektrophoresen liefen 14 h bei 1400 V in 1 x TBE-Puffer.

Im Verlauf der Elektrophorese regt im unteren Bereich des Gels ein Argon-Laser die vier verschiedenen Farbstoffe, mit denen die Didesoxynukleotide markiert sind, zur Emission von Fluoreszenzlicht an. Die so entstehende Abfolge von Signalen wird über eine Photozelle und einen Photomultiplier erfaßt und vom Rechner in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt.

2.15.2 Elektronische Verwaltung und Analyse der Sequenzdaten

Zur Analyse der eigenen Sequenzdaten wurde das DNA-STAR Programm und das MacMollyTetra[®] Software Paket (Softgene, Berlin) für Apple MacIntosh Computer verwendet. Vergleiche mit den Sequenzdatenbanken EMBL und GenBank wurden mit Hilfe des BLAST Programms (Altschul et al., 1990) über die entsprechenden WWW Server (z.B. NCBI Blast Notebook, <http://www.ncbi.nih>) durchgeführt. Das Sequenzanalyse-Programm ClustalW zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume ist erreichbar unter <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr./pub/ClustalW>.

2.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(nach Saiki et al., 1985)

2.16.1 PCR an Plasmid-DNA

Eine PCR an Plasmid-DNA wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente zu erhalten, die

nicht über einen Restriktionsverdau isoliert werden konnten.

Dabei wurden folgende Komponenten zu einem Gesamtvolumen von 50 μ l zusammenpipettiert:

30-50 ng Plasmid-DNA

5 μ l 10x Taq-Polymerase Puffer

1 μ l Primer1 (10 pmol/ μ l)

1 μ l Primer 2 (10 pmol/ μ l)

1 μ l dNTPs (10 mM)

0,5 μ l Taq-Polymerase (5 U/ μ l)

ad 50 μ l H₂O

Der Reaktionsansatz wurde folgendem Zyklus im Thermocycler unterworfen:

30-60 s 95 °C Denaturierung

30-90 s 50-65 °C Annealing

60-120 s 72 °C Elongation

Es wurden 30-35 Zyklen durchgeführt. Vor Beginn des ersten Zyklus wurde die DNA 5 min bei 95°C denaturiert. An den letzten Zyklus schloß sich ein weiterer Elongationsschritt von 5 min bei 72°C an.

Zur Anreicherung von Insert-DNA aus Phagen-Einzelklonen wurde aus Ausgangsmaterial reine Phagen-DNA verwendet. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit 2 μ l Phagen-DNA und jeweils 20 pmol des Phagen-spezifischen forward- und reverse- Primers unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben durchgeführt. Um eine vollständige Denaturierung der Phagen-DNA zu gewährleisten, wurde dabei der vorgeschaltete Denaturierungsschritt auf 10 min verlängert.

Für die Amplifikation von genomischen Fragmenten aus Cosmid-DNA wurde das 'Expand™ Long Template PCR System' von Roche eingesetzt.

Mastermix 1:

500 ng Cosmid-DNA
 2,5 µl dNTPs (10 mM)
 1,5 µl Primer1 (10 pmol/µl)
 1,5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
 ad 25 µl H₂O

Mastermix 2:

5 µl Puffer 3
 0,75µl Enzym mix
 ad 25 µl H₂O

Die Amplifikation der DNA wurde im automatischen Thermocycler (Perkin Elmer Cetus, Vaterstetten) nach folgendem PCR-Programm durchgeführt:

10 s	94°C	Denaturierung	} 10 Zyklen
45 s	60°C	Annealing	
5 min	68°C	Elongation	

10 s	94°C	Denaturierung	} 20 Zyklen
45 s	60°C	Annealing	
4 min	68°C	Elongation	

+ 20 s/Zyklus

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde die DNA 5 min bei 94°C denaturiert, an den letzten Zyklus schloß sich ein weiterer Elongationsschritt von 7 min bei 68°C an. Nach der Amplifikation wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem 0,8 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

2.16.2 PCR an genomischer DNA

Die PCR an genomischer DNA wurde zur Genotypisierung der Nachkommen der Chimäre in der F1-, F2- und F3- Generation durchgeführt. Über eine Kombination von drei Primern wurden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge amplifiziert, so daß das

Wildtypallel von dem mutierten Allel unterschieden werden konnte. Der PCR-Reaktionsansatz von 20 μl enthielt folgende Komponenten:

0,5 μl Plasmid-DNA ($\sim 1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2 μl 10x *Taq*-Polymerase Puffer
0,1 μl Primer1 (100 pmol/ μl)
0,1 μl Primer2 (100 pmol/ μl)
0,1 μl Primer3 (100 pmol/ μl)
0,4 μl dNTPs (je 10 pmol/ μl)
0,6 μl MgCl_2 (50 mM)
0,4 μl *Taq*-Polymerase (5U/ μl)
15,8 μl H_2O

Je nach Anzahl der zu überprüfenden DNA-Proben wurde ein Mastermix aus allen Komponenten (außer DNA und *Taq*-Polymerase) zusammenpipettiert und 5 min mit UV-Licht (254 nm) behandelt. Nach der Zugabe der *Taq*-Polymerase wurde der Mix zu der genomischen DNA gegeben. Die DNA wurde im automatischen Thermocycler (Perkin Elmer Cetus, Vaterstetten) über 35 Zyklen nach folgendem PCR-Programm amplifiziert:

1 min 94°C Denaturierung
1 min 64°C Annealing
1 min 72°C Elongation

Vor Beginn des ersten Zyklus wurde die DNA 5 min bei 94°C denaturiert, an den letzten Zyklus schloß sich ein weiterer Elongationsschritt von 5 min bei 72°C an. Nach der Amplifikation wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem 1 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt.

2.16.3 Reverse PCR (RT-PCR)

(nach Kogan et al., 1987)

Die Methode der reversen PCR (RT-PCR) basiert auf der Umschreibung von mRNA in cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase. Mit Hilfe der RT-PCR können kleinste Transkriptmengen im Gewebe detektiert werden und der so erzeugte cDNA-Strang in einer anschließenden PCR amplifiziert werden. 10-20 µg Gesamt-RNA oder 1-2 µg Poly A(+)-RNA wurden 30 min bei 37°C mit 1 U DNaseI (RNase frei) behandelt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde in 10 µl DEPC-H₂O gelöst, mit 1 µl Primer (15 pmol/µl) 10 min bei 70°C denaturiert und für 5 min auf Trockeneis inkubiert. Es wurden folgende Komponenten für die Erststrang-Synthese zusammenpipettiert:

- 1 µl dNTPs (15 mM)
- 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
- 2 µl DTT (100 mM)
- 4 µl 5 x RT Puffer
- 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript, Gibco/BRL)

Anschließend wurde die Reaktion bei RT (10 min) gestartet und die Erststrangsynthese 60 min bei 42°C durchgeführt. 1/10 der so gewonnenen cDNA wurde dann in nachfolgende PCRs eingesetzt.

2.17 Konstruktion der MARATHON cDNA-Bank

Für die Konstruktion einer cDNA-Bank wurde der MARATHON RACE Kit (Clontech) verwendet. Im Gegensatz zu Phagenbanken wird bei dieser Methode der Screening-

Prozeß rein über die PCR durchgeführt. Nach einer Erst- und Zweitstrangsynthese (Gubler und Hoffmann, 1983) werden spezielle Linker an die doppelsträngige cDNA ligiert. Diese Adapter sind partiell doppelsträngig mit einem glatten Ende und partiell einzelsträngig, wobei die zurückstehende 3'OH-Gruppe durch eine Aminogruppe geblockt ist. Die Sequenz des einzelsträngigen Linker-Anteils entspricht der der Primer, die in der Screening-PCR eingesetzt werden. Diese Linker-Primer finden erst eine Bindungsstelle, wenn durch Extension von genspezifischen Primern im Zuge des ersten PCR-Zyklus diese geschaffen wird. Das Screenen der Bank wird dann mit Kombinationen von Linker-Primern und genspezifischen Primern durchgeführt. In getrennten Reaktionen werden die 5'- und 3'-Enden der gesuchten cDNA synthetisiert, aus denen dann in einer Fusions-PCR die gesamte cDNA konstruiert wird.

2.17.1 Synthese der MARATHON cDNA-Bank

Alle Reaktionen wurden nach dem Clontech MARATHON Protokoll und mit den Komponenten des Kits durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurde humane Testis Poly A(+) RNA eingesetzt.

2.17.2 Screening der MARATHON cDNA-Bank

Aliquots von 5 µl der verdünnte cDNA-Bank wurden in Screening-PCRs mit je einem genspezifischen Primer und dem Linker-Primer AP1 (Sequenz siehe Anhang) eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde für 1 min bei 94°C denaturiert und 35 Zyklen wie folgt amplifiziert:

30 s 94°C

5min 68°C

Anschließend wurde am PCR-Produkt eine Nachamplifikation mit einem zweiten intern liegenden genspezifischen Primer sowie dem AP2-Linker-Primer nach dem oben genannten PCR-Programm durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Die cDNA wurde in den Vektor pGEM[®]-T kloniert und anschließend sequenziert.

2.18 Chromosomale Lokalisation über Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH)

Die chromosomale Lokalisation des Maus-Gens erfolgte über Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) in Kooperation mit Dr. M. Koehler (Institut für Humangenetik, Würzburg). Zunächst wurden Metaphasen von kultivierten peritonealen Zellen einer männlichen NMRI Maus auf Objektträgern mit einer Essigsäure/Methanol-Lösung (1:3 v/v) nach Protokoll fixiert. Als Sonde für die anschließende Hybridisierung der Chromosomenpräparate wurde murine genomische DNA aus Phagenklonen eingesetzt, die mittels Nicktranslation mit Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert wurde. 400 ng der markierten Sonde wurde mit 10 µg Lachsspermien DNA (zur Absättigung von unspezifischen Sequenzen) und 4 µg Cot1-DNA (zur Absättigung von hochrepetitiven Sequenzen) präzipitiert. Die FISH wurde nach Protokoll (Koehler et al., 1996) durchgeführt. Nach der Denaturierung der Sonde wurde diese 15 min bei 37°C inkubiert (Preannealing) und auf die denaturierten Chromosomenpräparate gegeben. Die Hybridisierung erfolgte *in situ* bei 37°C in einer feuchten Kammer. Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte über eine Antikörper-Reaktion mit FITC-Avidin Lösung und biotinierten Anti-Avidin-Antikörper (Pinkel et al. 1986). Im Anschluß an den Immunfluoreszenz-Nachweis wurden die Chromosomenpräparate mit Propidiumjodid

(PI) und 4'-6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Die Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte mit einem Zeiss AxioPhot-Fluoreszenzmikroskop mit Filterradkombination.

2.19 *In situ* Hybridisierung an *Drosophila melanogaster* Embryonen

Die räumliche und die zeitliche Verteilung von Transkripten während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* wurde durch *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen untersucht (Tautz und Pfeifle, 1989).

Die *in situ* Hybridisierung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Vorbrüggen (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt. Auf einer Apfelsaftagarplatte abgelegte Embryonen wurden zunächst dechorioniert und fixiert. Die fixierten Embryonen wurden in PBT rehydratisiert und mit Proteinase K behandelt. Durch Zugabe von Glycin wurde der Proteinase-Verdau abgestoppt, die Embryonen in PBT gewaschen und mit 4 % Formaldehyd refixiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBT wurden die Embryonen in Hybridisierungslösung (Tautz und Pfeifle, 1989) bei 45°C vorinkubiert und mit einer Digoxigenin markierten cDNA-Sonde von *Drosophila melanogaster* üN bei 45°C hybridisiert. Anschließend wurden die Embryonen zunächst mit Hybridisierungslösung gewaschen und dann schrittweise wieder in PBT überführt. Die Signaldetektion erfolgte mit einem Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase Konjugat-(Boehringer), das durch Zugabe von NBT und X-Phosphat angeärbt wurde. Die Färbereaktion wurde mit PBT gestoppt, die Embryonen schrittweise in 70%igem bzw. 100%igem Ethanol dehydratisiert und eingebettet.

2.20 Knock out Technik bei Mäusen

2.20.1 Routinekultur von ES-Zellen

Die Isolierung und gezielte Manipulation von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ist ein entscheidender Fortschritt im Rahmen der entwicklungsbiologischen Forschung bei Säugetieren. Die ersten ES-Zellen wurden von Evans und Kaufmann (1981) und Martin (1981) aus der inneren Zellmasse von Blastocysten der 129/Sv-Maus isoliert. Bald danach wurde von Bradley et al. (1984) gezeigt, daß sich diese Zellen an der Entwicklung sämtlicher Gewebe des resultierenden Embryos, einschließlich der Keimdrüsen, beteiligen, wenn sie in die Blastocyste injiziert werden. Die erste genetische Manipulation an ES-Zellen wurde von Robertson et al. (1986) und Gossler et al. (1986) durchgeführt. Diese Gruppen konnten zeigen, daß Manipulationen im Genom von ES-Zellen von diesen durch die Keimbahn transmittiert werden. Die ersten erfolgreichen homologen Rekombinationen in ES-Zellen wurden fast gleichzeitig von Thomas und Capecchi (1987) sowie Doetschman et al. (1987) publiziert. Heute liegen etwa 400 Berichte über gezielte genetische Manipulationen am Genom der Maus mit Hilfe der ES-Zell-Technologie vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden 'knock out'-Mäuse über die Aggregation von ES-Zellen mit 2,5 Tage alten Mausembryonen generiert. R1-ES-Zellen (Nagy et al., 1993) wurden zusammen mit Mitomycin C behandelten embryonalen Feederzellen (EmFi) auf 0,2 % Gelatine beschichteten Kulturschalen ausgesät. Das Kulturmedium wurde aufgrund der starken Ansäuerung durch die ES-Zellen täglich gewechselt. Eine Passagierung wurde je nach Dichte der Zellen alle zwei bis drei Tage durchgeführt und die ES-Zellen in Trypsin/EDTA-Puffer 1:3 bis 1:8 geteilt. Vor der erneuten Plattierung wurde die Trypsinlösung durch Zentrifugation mit 270 x g für 5 min bei RT entfernt. Bei jeder Passage wurden Stocks der ES-Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert (s. 2.18.3).

2.20.2 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

(Joyner, 1993)

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode zum Gentransfer. Durch kurze elektrische Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke können biologische Membrane vorübergehend permeabilisiert werden, ohne daß die Membranstruktur zerstört wird. Während dieser Phase kann ein Stofftransport durch die Membran erfolgen. Für die Elektroporation der ES-Zellen wurden 7×10^6 bis 2×10^7 exponentiell wachsende Zellen nach der Behandlung mit Trypsin in 800 μ l Elektroporationspuffer und 40 μ g linearisierte DNA eingesetzt.

Die linearisierte Konstrukt-DNA (Targeting-Vektor) wurde zunächst mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit absolutem Ethanol präzipitiert und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde unter der Sterilbank bei RT getrocknet und in 100 μ l Elektroporationspuffer gelöst.

Die ES-Zellen wurden nach der Behandlung mit Trypsin in 9 ml Elektroporationspuffer gewaschen, in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und nach erneuter Zentrifugation in 700 μ l Elektroporationspuffer aufgenommen. DNA und ES-Zellen wurden in einer Küvette vereinigt und mit 240 V und 55 μ F bei RT elektroporiert (Gene Pulser, Biorad). Anschließend wurden die ES-Zellen 20 min auf Eis inkubiert und dann in fünf Kulturschalen auf embryonalen Feederzellen ausplattiert. Der Nachweis einer homologen Rekombination wurde über das Resistenzgen Neomycin geführt, das in den Targeting-Vektor kloniert worden war. Das Neomycingen ist gegen Geneticin (G418) resistent, so daß mit G418 eine positive Selektion der Zellen möglich ist. Die Negativ-Selektion erfolgte über das Herpes Simplex Thymidinkinase-Gen (hsv-tk) und das Substrat Gancyclovir. Die Gancyclovir-Selektion wurde nach fünf Tagen beendet, während die G418-Selektion bis zur Isolierung resistenter Klone am achten oder neunten Tag aufrechterhalten wurde. Zur Kontrolle der Elektroporationseffizienz wurden die Zellen einer Kulturschale nur mit G418 selektioniert. Die Effizienz der Elektroporation lag bei einer von 10^5 Zellen.

2.20.3 Isolierung von ES-Zellklonen und deren Kryokonservierung

Resistente Klone wurden nach einer G418-Selektion über acht bis neun Tage isoliert. Dazu wurden die Kulturen einmal in PBS-Puffer gewaschen und mit 10 ml PBS-Puffer überschichtet. Die Klone wurden mechanisch mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von den embryonalen Feederzellen getrennt und bei 37°C in 1 x Trypsin/EDTA in 96-Loch-Platten dissoziiert. Der enzymatische Verdau wurde nach 5 min durch Zugabe von 50 µl ES-Zellmedium gestoppt. Die vereinzelt Klone wurden auf 24-Loch-Platten mit Feederzellen und frischem ES-Zellmedium übertragen und bei 37°C kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen waren die Einzelklone zur Konfluenz gewachsen und wurden erneut mit Trypsin behandelt. Die eine Hälfte der Zellen wurde erneut auf Feederzellen ausgesät (master plate), während die andere Hälfte der Zellen auf einer Gelatine-behandelten Platte (duplicate plate) inkubiert wurde. Die auf Feederzellen wachsenden ES-Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit 100 µl Trypsin/EDTA bei 37°C für 5 min dissoziiert, in 1 ml Kryogefäße (Nunc) überführt und nach Zugabe von 100 µl 2 x Gefriermedium gemischt und bei -80°C eingefroren. Die für die DNA-Isolierung vorgesehenen Zellen wurden ebenfalls bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend die DNA-Extraktion (s. 2.9.4) durchgeführt.

Homolog rekombinierte ES-Zellen wurden nach dem Auftauen bei 37°C in 10 ml kaltes ES-Zellmedium gegeben, bei 270 x g für 5 min abzentrifugiert und auf Feederzellen in 24-Loch-Platten kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und in 3-4 Aliquots eingefroren. Die für die Aggregation benötigten ES-Zellen wurden vier Tage vor der Aggregation aufgetaut und kultiviert.

2.20.4 Isolierung von 2,5 Tage alten Mausembryonen

Um möglichst viele Mausembryonen des Stammes CD1 zu erhalten, wurden eine Superovulation bei Spenderweibchen dieses Stammes durch Hormongabe

(intraperitoneal) induziert. Durch diese Behandlung kommen die Weibchen in den Ovarialzyklus, und es erfolgt eine vermehrte Abgabe von Eizellen in den Eileiter. Jeweils zwei superovulierte Weibchen wurden anschließend mit einem Männchen verpaart. Eine erfolgreiche Verpaarung läßt sich durch die Anwesenheit des Vaginalpfropfes (VP) bei den Weibchen nachweisen. Der Zeitpunkt des Vaginalpfropfes wird definitionsgemäß als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung berechnet.

Für die Aggregation mit rekombinierten ES-Zellen wurden Mausembryonen vom Tag 2,5 nach der Befruchtung benötigt. VP-positive Weibchen wurden am Tag 2,5 abgetötet, die Ovidukte präpariert und diese anschließend mehrfach in warmen M2-Medium gewaschen. Danach wurden die Ovidukte in eine mit M2-Medium gefüllte Kulturschale überführt. Unter dem Stereomikroskop wurden die Embryonen durch Ausspülen mittels einer mit M2-Medium gefüllten ausgezogenen Mundpipette aus dem Ovidukt herausgeschwemmt. Um Zell- und Gewebereste zu entfernen, wurden die ausgespülten Embryonen mehrfach in frisches M2-Medium überführt. Nach einem weiteren Waschschrift in M16-Medium wurden die Embryonen in einem Tropfen M16-Medium unter Paraffinöl in eine vorbereitete Kulturschale gegeben und bis zur Aggregation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.20.5 Aggregation von ES-Zellen und Mausembryonen

Die isolierten 2,5 Tage alten Mausembryonen mußten vor der Aggregation mit den rekombinierten ES-Zellen von ihrer Zona pellucida befreit werden. Sie wurden deshalb in einem Tropfen Tyrode-Lösung unter Öl für etwa 1 min durch mehrfaches Ein- und Aussaugen mit der Mundpipette behandelt. Das Auflösen der Zona pellucida wurde durch das Stereomikroskop verfolgt. Die Zona-freien Embryonen wurden anschließend dreimal in frischem M16-Medium gewaschen und in einem Tropfen M16 Medium in die für die Aggregation vorgesehenen Kulturschalen übertragen. In diesen Schalen befanden sich 10 bis 12 Tropfen M16-Medium, welche mit Paraffinöl überschichtet

waren. In dem Boden jeder Schale innerhalb eines jeden Tropfens sind mit einem feinen Bolzen kleine Vertiefungen eingestanz, in denen die Embryonen mit den ES-Zellen aggregiert werden. Die Aggregation erfolgte nach der 'Sandwich'-Methode, d.h. zwischen zwei 2,5 Tage alten Embryonen wurden 8-12 ES-Zellen gelegt und $\bar{u}N$ kultiviert.

Die rekombinierten ES-Zellen wurden vier Tage vor der Aggregation auf Feederzellen ausgesät, zwei Tage später im subkonfluenten Zustand trypsinisiert und auf zwei Schalen auf Feederzellen verteilt. Am Tag der Aggregation wurden die ES-Zellen nur unvollständig mit 1 x Trypsin/EDTA dissoziiert (3 min bei 37°C) und in eine Schale mit M16-Medium überführt. Jeweils ein ES-Zellhaufen wurde auf einen Embryo gelegt und mit dem zweiten Embryo bedeckt. Anschließend wurden die Aggregate vorsichtig in den Inkubator gestellt und $\bar{u}N$ bei 37°C und 5 % CO₂ bis zum Retransfer kultiviert.

2.20.6 Embryo-Transfer in pseudoträchtige Mäuse

Pseudotrchtige Weibchen des Stammes NMRI erhält man durch die Kopulation mit vasktomierten NMRI-Männchen gewonnen. Nach der Kopulation besitzen diese Weibchen einen Vaginalpfropf. Der Hormonhaushalt dieser Weibchen entspricht dem eines trchtigen Tieres, obwohl sich keine befruchteten Eizellen in den Reproduktionstrakten befinden. Für den Embryonen-Retransfer wurden Weibchen vom Tag 3,5 nach der Kopulation (p.c.) verwendet. Nach Betäubung der Maus wurde auf einer Seite der Rückenhaut ein 1 cm langer Schnitt auf Höhe der Niere gesetzt. Über dem rötlich durchscheinenden Ovar wurde ein kleines Loch in die Unterhaut geschnitten und das Ovar mit einer Pinzette am anliegenden Fettgewebe herausgezogen. Mit Hilfe einer feinen Kanüle wurde in das nun freiliegende Uterushorn ein kleines Loch gebohrt.

Die $\bar{u}N$ kultivierten Aggregate wurden mit der fein ausgezogenen Mundpipette aus den Vertiefungen der Kulturschale herausgespült und mit möglichst wenig Medium in die Spitze der Pipette aufgenommen. Dabei wurden nur Aggregate berücksichtigt, die eindeutig das Blastocysten-Stadium erreicht hatten. Die Pipette wurden dann durch das

Loch in den Uterus eingeführt und vorsichtig ausgeblasen. Durchschnittlich wurden etwa 10-12 Aggregate sowie 2-3 Wildtyp-Embryonen pro Maus übertragen. Nach erfolgreichem Retransfer wurden die Wundränder aufeinander gelegt und mit einer Klammer verschlossen. Nach Desinfektion der Wunde wurde die Maus bis zum Erwachen auf eine Wärmeplatte gelegt.

2.21 Identifizierung von Chimären

Die ES-Zellen wurden aus Tieren des Mausstammes 129/SvJ isoliert, deren Fell eine braune Färbung aufweist (Agouti-Fellmarker). Die bei der Aggregation eingesetzten Blastocysten wurden aus einem anderen Mausstamm, dem CD1-Stamm, dessen Tiere Albinos sind, isoliert. Sind ES-Zellen an der Entwicklung der retransferierten Embryonen involviert, so können diese chimären Tiere anhand einer gescheckten Fellfärbung identifiziert werden. Die nichtchimären Tiere sind Albinos. Männliche Mäuse mit einem Chimerismus von mindestens 50 % wurden auf die Ausgangsstämme CD1 bzw. 129/SvJ zurückgekreuzt und die Nachkommen (F1-Generation) im Alter von drei Wochen in einer Southern-Analyse genotypisiert.

2.22 Die RNAi-Technik (injection of double-stranded RNA)

Mit Hilfe der RNAi-Technik kann die Funktion eines Gens in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* studiert werden. Wird RNA in ein Tier injiziert, so kann die Expression eines Gens manipuliert werden (Fire et al., 1991, Guo et al., 1995), indem die Transkription der entsprechenden Gens gestört wird. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Injektion von dsRNA effektiver war als die Injektion von

einzelsträngiger sense- bzw. antisense-RNA. Die Injektion von dsRNA in adulte Tiere bewirkt eine Störung der Genexpression des spezifischen Genes in den injizierten Tieren als auch in deren Nachkommenschaft (Fire et al., 1998).

2.22.1 RNA-Synthese durch *in vitro* Transkription

Durch RNA-Polymerasen können cDNA-Sequenzen unter zellfreien Bedingungen in RNA umgeschrieben werden. Dabei kann sowohl der kodierende Strang der cDNA als auch der nichtkodierende Strang der cDNA transkribiert werden.

Für die Synthese der doppelsträngigen RNA (dsRNA) wurde die MEGAscript™ (T7 und T3) Kits von Ambion verwendet. Als cDNA-Template diente ein PCR-Produkt (2.16.1), das von einer T7- und einer T3-RNA-Polymerase-Bindungsstelle flankiert wird. Da etwa 30 µg dsRNA synthetisiert werden sollte, wurde etwa 2 µg des PCR Produktes eingesetzt und mit folgenden Komponenten aus den Kits zu einem Gesamtansatz von 50 µl zusammenpipettiert:

- x µl cDNA Template
- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- 20 µl rNTP Mix (je 75 mM ATP, CTP,
UTP und GTP)
- 5 µl T7-Enzym Mix
- 5 µl T3-Enzym Mix
- x µl RNase freies H₂O.

Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C inkubiert. Da dem Ansatz sowohl die T7-Polymerase als auch die T3-Polymerase zugefügt wurden, wurden beide Stränge der cDNA gleichzeitig in RNA umgeschrieben. Komplementäre RNA-Stränge lagerten sich aneinander, so daß dsRNA gebildet wurde. Zum Abbau der cDNA wurde 2µl RNase freie DNase zu dem

Ansatz gegeben und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Die dsRNA wurde anschließend über eine Säule (Probe Quant MM G-50, Pharmacia) aufgereinigt, die Konzentration photometrisch bestimmt und die Integrität der dsRNA auf einem denaturierenden Agarosegel überprüft.

2.22.2 Mikoinjektion von dsRNA in *Caenorhabditis elegans*

Um die Funktion eines Gens in *Caenorhabditis elegans* auszuschalten, wurde dsRNA (4 µg/µl) des Zielgens in beide syciale Gonaden von L4-Larven oder junger Hermaphroditen injiziert. Die Mikoinjektion erfolgte nach dem Protokoll von Mello und Fire (1995) und wurde von Dr. E. Schulze (III. Zoologisches Institut, Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie, Universität Göttingen) durchgeführt. Die injizierten Tiere wurden alle 24 h auf frische Agarplatten gesetzt, um die F1-Generation zu analysieren. Kontrolltiere wurden mit RNase freiem Wasser injiziert.

3 Ergebnisse

Das humane Gen *HGCI* (humanes Gen lokalisiert auf Chromosom 1) wurde im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit isoliert und charakterisiert. Dabei konnten die Startpunkte für Transkription und Translation nicht bestimmt und der 3'untranslatierte Bereich nicht vollständig analysiert werden.

3.1 Identifizierung des 3'untranslatierten Bereichs der *HGCI* cDNA über MARATHON-PCR

Um den Transkriptions- und den Translationsstartpunkt zu bestimmen sowie den 3'untranslatierten Bereich der cDNA-Sequenz von *HGCI* zu erhalten, wurde mit Hilfe des MARATHON RACE Kits (Clontech) eine cDNA-Bank an Poly (A⁺)-RNA aus adultem humanem Testis konstruiert (2.18.2). Die Amplifikation des untranslatierten 3'Endes der cDNA wurde mit den genspezifischen Forward-Primern MA6A und PEIA (Abb. 3.1) sowie den Linker-Primern AP1 und AP2 (nicht abgebildet, Sequenzen s. Anhang) durchgeführt. Die Nukleotidsequenz der Primer ist in Abb. 3.1 dargestellt. Nach einer 'nested'-PCR mit der Primerkombination PEIA/AP2 konnte ein PCR-Produkt von 1207 bp amplifiziert werden, das in den pGEM[®]-T-Vektor kloniert wurde. Durch Sequenzierung dieses klonierten Fragmentes konnte der fehlende 3'untranslatierte Bereich der cDNA von *HGCI* identifiziert werden (Abb. 3.1, unterstrichener Bereich). Das Polyadenylierungssignal AATAAA befindet sich 11 bp 5'wärts vor dem Poly(A)-Schwanz und konnte auf genomischer Ebene bestätigt werden. Ferner konnte über einen Datenvergleich mit der Genbank humaner EST-Sequenzen (expressed sequences tags) ein cDNA-Klon von 1,35 kb Länge (IMAGp988G02583) identifiziert und analysiert werden. Dieser Klon enthält 150 bp bekannter cDNA-

Information und weitere Sequenzen, die mit der Nukleotidsequenz des über PCR isolierten cDNA-Fragmentes identisch sind. So konnte ein 3'untranslatierter Bereich von 1860 bp ermittelt werden.

Mit Hilfe von Northern Blot Analysen konnten für das *HGCI*-Gen zwei Transkripte von 2,4 kb und 4 kb nachgewiesen werden. Isoliert und charakterisiert wurden 3194 bp (Abb.3.1) der cDNA-Sequenz von *HGCI*. Die fehlenden 800 bp im 5'Bereich des Gens konnten über die MARATHON-PCR nicht amplifiziert werden. In der Genbank gespeicherte EST-Sequenzen ergaben ebenfalls keine neuen Informationen über die fehlende Nukleotidsequenz.

```

      G  G  A  R  S  A  G  R  R  L  P  A  R  R  P  R  S  G  A  E
1    GGC GGA GCC CGG AGC GCA GGC CGG AGG CTC CCG GCC CGC CGG CCC CGG AGC GGA GCG GAG

      R  R  M  Q  Q  P  Q  P  Q  G  Q  Q  Q  P  G  P  G  Q  Q  L
61   CGG AGG ATG CAG CAG CCG CAG CCG CAG GGG CAG CAG CAG CCG GGG CCG GGG CAG CAG CTG

      G  G  Q  G  A  A  P  G  A  G  G  G  P  G  G  G  P  G  P  G
121  GGG GGC CAG GGG GCG GCG CCG GGG GCC GGG GGC GGC CCA GGG GGG GGC CCG GGG CCG GGG

      P  C  L  R  R  E  L  K  L  L  E  S  I  F  H  R  G  H  E  R
181  CCC TGC CTG AGG CGA GAG CTG AAG CTG CTC GAG TCC ATC TTC CAC CGC GGC CAC GAG CGC

      F  R  I  A  S  A  C  L  D  E  L  S  C  E  F  L  L  A  G  A
241  TTC CGC ATT GCC AGC GCC TGC CTG GAC GAG CTG AGC TGC GAG TTC CTG CTG GCT GGG GCC

      G  G  A  G  A  G  A  A  P  G  P  H  L  P  P  R  G  S  V  P
301  GGA GGG GCC GGG GCG GGG GCC GCG CCC GGA CCG CAT CTC CCC CCA CGG GGG TCG GTG CCT

      G  D  P  V  R  I  H  C  N  I  T  E  S  Y  P  A  V  P  P  I
361  GGG GAT CCT GTC CGC ATC CAC TGC AAC ATC ACG GAG TCA TAC CCT GCT GTG CCC CCC ATC

      W  S  V  E  S  D  D  P  N  L  A  A  V  L  E  R  L  V  D  I
421  TGG TCG GTG GAG TCT GAT GAC CCT AAC TTG GCT GCT GTC TTG GAG AGG CTG GTG GAC ATA

      K  K  G  N  T  L  L  L  Q  H  L  K  R  I  I  S  D  L  C  K
481  AAG AAA GGG AAT ACT CTG CTA TTG CAG CAT CTG AAG AGG ATC ATC TCC GAC CTG TGT AAA

      L  Y  N  L  P  Q  H  P  D  V  E  M  L  D  Q  P  L  P  A  E
541  CTC TAT AAC CTC CCT CAG CAT CCA GAT GTG GAG ATG CTG GAT CAA CCC TTG CCA GCA GAG

      Q  C  T  Q  E  D  V  S  S  E  D  E  D  E  E  M  P  E  D  T
601  CAG TGC ACA CAG GAA GAC GTG TCT TCA GAA GAT GAA GAT GAG GAG ATG CCT GAG GAC ACA

      E  D  L  D  H  Y  E  M  K  E  E  E  P  A  E  G  K  K  S  E
661  GAA GAC TTA GAT CAC TAT GAA ATG AAA GAG GAA GAG CCA GCT GAG GGC AAG AAA TCT GAA

      D  D  G  I  G  K  E  N  L  A  I  L  E  K  I  K  K  N  Q  R
721  GAT GAT GGC ATT GGA AAA GAA AAC TTG GCC ATC CTA GAG AAA ATT AAA AAG AAC CAG AGG

      Q  D  Y  L  N  G  A  V  S  G  S  V  Q  A  T  D  R  L  M  K
781  CAA GAT TAC TTA AAT GGT GCA GTG TCT GGC TCG GTG CAG GCC ACT GAC CGG CTG ATG AAG

      E  L  R  D  I  Y  R  S  Q  S  F  K  G  G  N  Y  A  V  E  L
841  GAG CTC AGG GAT ATA TAC CGA TCA CAG AGT TTC AAA GGC GGA AAC TAT GCA GTC GAA CTC

```

V N D S L Y D W N V K L L K V D Q D S A
 901 GTG AAT GAC AGT CTG TAT GAT TGG AAT GTC AAA CTC CTC AAA GTT GAC CAG GAC AGC GCT
L H N D L Q I L K E K E G A D F I L L N
 961 TTG CAC AAC GAT CTC CAG ATC CTC AAA GAG AAA GAA GGA GCC GAC TTC ATT CTA CTT AAC

F S F K D N F P F D P P F V R V V S P V
 1021 TTT TCC TTT AAA GAT AAC TTT CCC TTT GAC CCA CCA TTT GTC AGG GTT GTG TCT CCA GTC

L S G G Y V L G G G A I C M E L L T K Q
 1081 CTC TCT GGA GGG TAT GTT CTG GGC GGA GGG GCC ATC TGC ATG GAA CTT CTC ACC AAA CAG

G W S S A Y S I E S V I M Q I S A T L V
 1141 GGC TGG AGC AGT GCC TAC TCC ATA GAG TCA GTG ATC ATG CAG ATC AGT GCC ACA CTG GTG

K G K A R V Q F G A N K S Q Y S L T R A
 1201 AAG GGG AAA GCA CGA GTG CAG TTT GGA GCC AAC AAA TCT CAA TAC AGT CTG ACA AGA GCA

Q Q S Y K S L V Q I H E K N G W Y T P P
 1261 CAG CAG TCC TAC AAG TCC TTG GTG CAG ATC CAC GAA AAA AAC GGC TGG TAC ACA CCC CCA

K E D G *
 1321 AAA GAA GAC GGC TAA CCCTGGAGTATCACCCCTTCTCCCTCCCCAGGCACCACCTGGACCAATTACCTTTGAATGC
 1396 TGTATTTGGATCTCACGCTGCCTCTGTGGTTCCTCCCTCATTTTTCTGGACGTGATAGCTCTGCCTATTGCAGGACAA
 1476 TGATGGCTATTCTAAACGCTAAGGAAAAAACAACACAGAAGCTGTTTCAAGTACTCAAGACTGACTTACAGACCAACC
 1556 AACACCTTGCTGGAACCTTGCTAGCAGGCATTCTTATAAAAGAACTTTCGAGCCTCCTTATATGCTGGAAACTCAG
 1636 CTGTGCTCCAGACTAGAGCCTCCTTACCTATGCTATGGATTTTTAATTTATTTTCTCTTATTTTCATGTACACTGCTTTTT
 1716 TTGGTTACAGTGTATGATGGATGTATGAAAAAATGTATCTTTGGGAAAACAATTACAGTTTGTAAATTTGAAGATGC

MA6A
 1796 TGGTCTTGACTCATCTTTATTTTTATTTCGCACATCCCACCCCATCCCCTGAACTACTTGGGAGGTGGGGAGGGG**TACGAG**
 1876 **TCCACTGTGCTTTGGTAGAGATGAGAGGCCGCATTTTGTCTGCTAAAGCAAGAGAAACTTGGAGCTGAAGCACACACCTG**

PEIA
 1956 GTCTGCCCTAGATTTCTCCTCAAGGCCCTGAGCAACCAGCACCTGCCCTTGGAAATGCAGAGCC**TGGCCTGCCAAG**
 2036 **CTACAATGGGTAGGCTGAAACGATGGTGTAAATCTTAGGACTACTTTCTAGTCACAGATGTTTTCAAATTTCTAAGA**
 2116 **AAAAGAAAATGAGGCTCAAGAGGCTGCTTCGTAGAATTCCTTTTGAATGAATTGAGTGGGGATGGGGACACAGTCTCCAA**
 2196 **GTGTGTATGTGGTCTTTTCTGATCTCAGCTGTGTGGCTGCAACTCTTCGCTGTTTCATTGGTTCCTCTCCTGGAAAGTGGC**
 2276 **TTCTAACAGCACTGGATGGTATCATTTGGTAAGCTTTGCTCACCTCCCTCTCTCTGCTTCATTTGGCTTTATCAAAA**
 2356 **GAAACAGACTAGCTCTGAATTTGTTGGCTTGGGAAATATGGATCTTTCAAGCCACTCCACAAAGGTGGGTCTCTACTA**
 2436 **GAAAGGGTTAGCATTTTAAAGGGGGTGTGTCTATACACCTGTGTCCCTTACCCAGGCTCAGGAACTGCCAGGGAGGGGAAG**
 2516 **ATGAGGTGGGGAGTCTGTACTGAGATGGAAGTGTGAGTGTGTGTGTACTTGTGTTGTGAAGTTTGGGCATGAC**
 2596 **TTTGCATCTAGCGGGTGCCTGCATCTTTTGTCTGTAAGCTTGTCTGGGACTCAGCCTCTTAGGACCTACGATGCC**
 2676 **AGCAGCTCTCATTAACAGTGAAATGACAGAGGCCAAAGATGGCCAAGTGAAGACCCAAGTCTCAGAAAACCCAGACTTGG**
 2756 **GACAAGTGCCTGGGAAGTAGGATGCTAGAGCAGTTCTGTAATGCTTTGAGACACAGCAATTTTCACATTGGCCATTCTTT**
 2836 **CCCCCTCCCTACCCCTTTCTTTTGAGGGACTTTTAATGTTTGCTGCTTTAGGTGGATGGAGAGTCCACCAGTCCCACTC**
 2916 **AATGCTGCTCTAACTCTACCCACACCCACCTAATTAGGGGTGCTAATAAAACATGCTGAGGTGAGATAAAGACGGGACA**
 2996 **TAAGGGGAAAATTCATTCATAGAGCTGAAATCTGGTTTCAAGGCCTCTGTGGCTTTCTTCTGAACTTACCACCAGCCC**
 3076 **TGGCTGGAATGTAGATTGTGTTTTAGTAATGTGACTGTGAGCTGCTCTCTGTATAATGTATTTTGTAAATGTATTTTC**
 3156 **TCATCTACCAAAGGATGAAACA**AATAAA**ATTATTTAAATAAAAAAAAAA**

Abb. 3.1: Darstellung der isolierten und sequenzierten cDNA von *HGCI* (ein Teil des 5' Bereichs der cDNA fehlt). Der offene Leserahmen dieser Sequenz umfaßt 1336 Nucleotide und wird durch das Stop-Kodon TAA(*) terminiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der cDNA-Sequenz angegeben. Der durch MARATHON PCR amplifizierte 3' untranslatierte Bereich der cDNA ist unterstrichen. Die Positionen der beiden verwendeten genspezifischen Forward-Primer MA6A und PEIA sind ebenfalls unterstrichen und ihre Nukleotidsequenzen im Anhang angegeben. Das Polyadenylierungssignal ist fett gedruckt.

3.2 *HGCI* homologe Gene aus verschiedenen Spezies

3.2.1 Klonierung des *HGCI* homologen Gens der Maus (*Mrhgc1*)

Zur Isolierung des *HGCI* homologen Gens der Maus wurde eine EMBL3-Phagen-Bibliothek des Mausstammes 129/SvJ (2.5.5) gescreent. Mit der humanen cDNA-Sonde 25 (2.5.4) konnte ein Phagenklon (GMK) isoliert werden, dessen genomisches Fragment restriktionsenzymatisch charakterisiert wurde. Der genomische Anteil in diesem Phagenklon betrug 17,5 kb und konnte mit dem Enzym BamHI bzw. durch Doppelspaltung mit den Enzymen Sall und XhoI in jeweils drei Fragmente zerlegt werden (Abb. 3.2A und D).

Die DNA-Fragmente aus den verschiedenen Restriktionsspaltungen wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit den humanen Sonden 25G und Bam3 (2.4) hybridisiert. Nach der Hybridisierung mit der Sonde Bam3 konnten das 4 kb große XhoI/Sall-Fragment (GM1) und das 5 kb große XhoI-Fragment (GM2) dem humanen Exon1 zugeordnet werden (Abb. 3.2C). Das zweite XhoI/Sall-Fragment von 8,5 kb Größe (GM3) hybridisierte mit der Sonde 25G (Abb. 3.2B). Die beiden XhoI/Sall-Fragmente, das XhoI-Fragment und die BamHI-Fragmente GMB1-3 wurden in Plasmidvektoren kloniert.

Mit Hilfe von weiteren Restriktionsspaltungen, Hybridisierungen und Sequenzierungen dieser Subklone konnte eine Restriktionskarte des genomischen Fragments aus GMK erstellt werden (Abb.3.2.D).

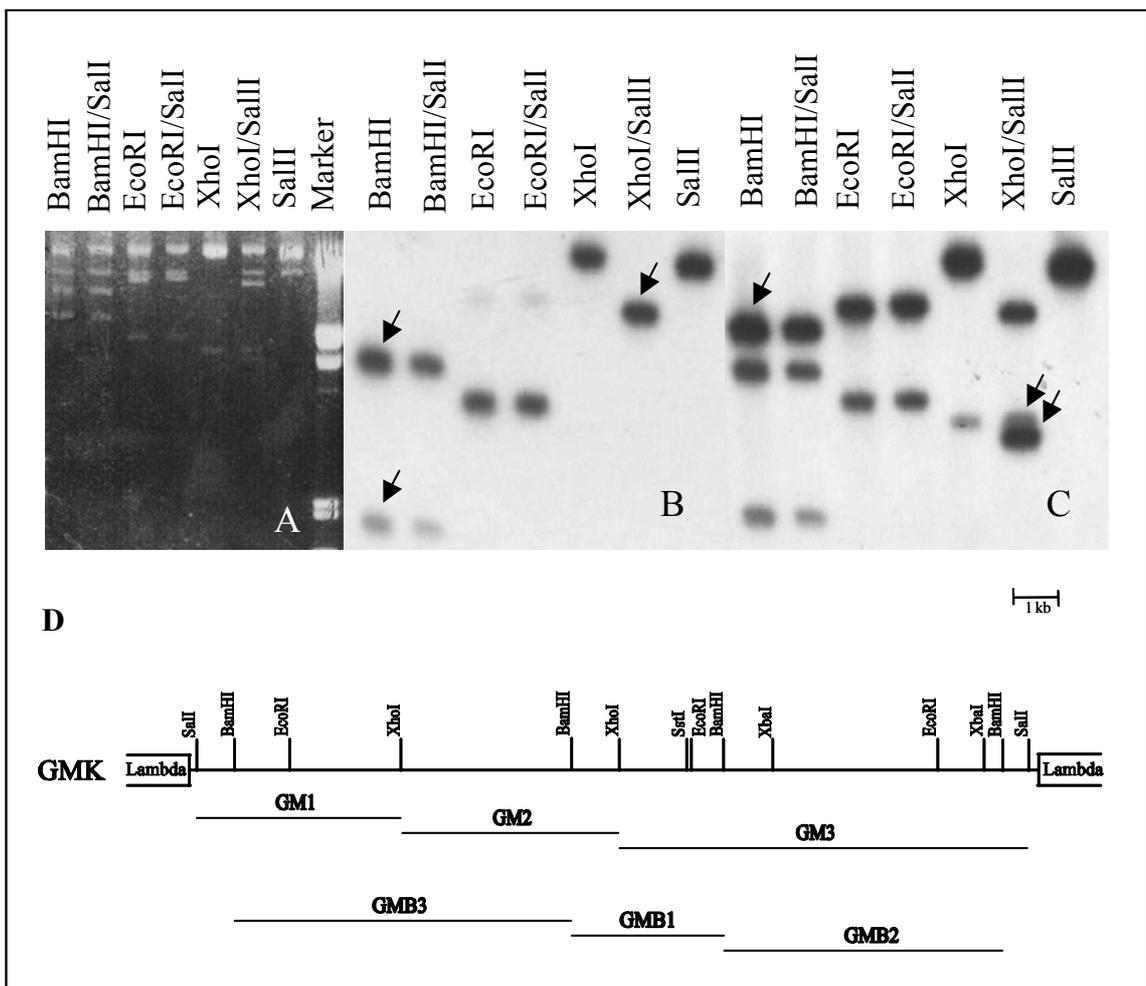


Abb. 3.2: Southern Blot Analyse und Restriktionskarte des Phagenklons GMK.

A: Restriktionsenzymatische Spaltung von GMK mit verschiedenen Enzymen.

B: Autoradiographie nach der Hybridisierung von GMK mit der Sonde 25G.

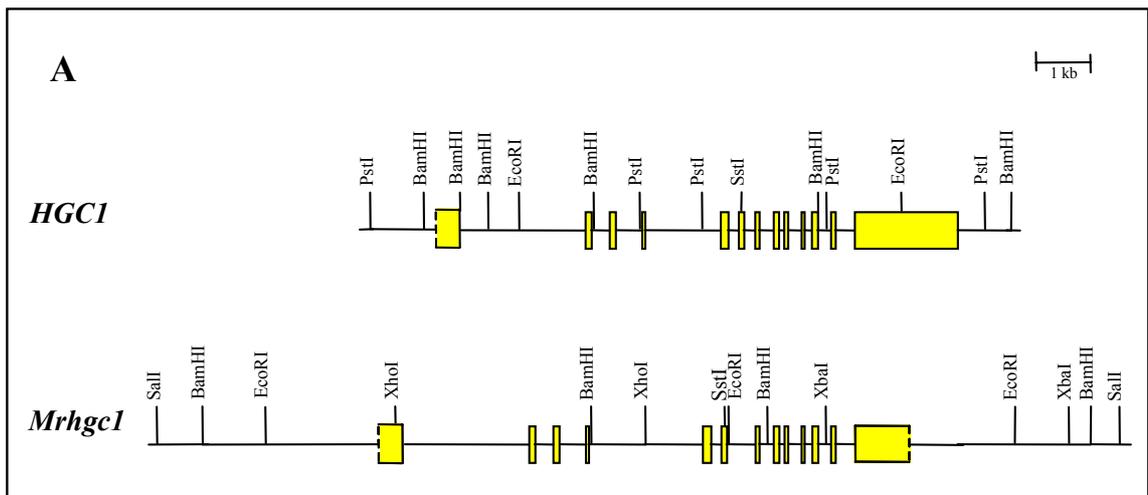
C: Autoradiographie nach der Hybridisierung von GMK mit der Sonde Bam3. Die mit der Sonde 25G hybridisierenden Banden sind auf der Autoradiographie noch zu erkennen. Die DNA-Fragmente, die kloniert wurden, sind durch Pfeile markiert.

D: Restriktionskarte des genomischen Fragmentes des Phagenklons GMK. Unterhalb der Restriktionskarte sind die klonierten Fragmente dargestellt.

Die Exon/Intron-Übergänge in der genomischen Sequenz des murinen Gens *Mrhgc1* (mouse related *HGC1*) wurden aus dem Vergleich mit der genomischen Sequenz von *HGC1* abgeleitet und konnten nach Sequenzierung eines 1,2 kb großen cDNA Klon der Maus (EST-Klon IMAGp998H101663) zum Teil bestätigt werden. Danach erstreckt sich das murine Gen mit seinen 13 Exons über ca. 11 kb des Genoms der Maus.

Die Anzahl und die Größe der Exons in *Mrhgcl* entsprechen denen in *HGCI*. Die Restriktionskarte und die genomische Organisation von *Mrhgcl* sind in Abbildung 3.3A dargestellt.

Aus Vergleichen der genomischen Sequenz von *Mrhgcl* mit der cDNA-Sequenz von *HGCI* (Abb. 3.1) und mit der Sequenz des murinen EST-Klons IMAGp998H101663 wurde die cDNA-Sequenz für *Mrhgcl* zusammengesetzt und die putative Aminosäuresequenz abgeleitet (Abb.3.3B). Diese zeigt eine 98 %ige Homologie zu der putativen Aminosäuresequenz von *HGCI*. Ob das Methionin in Position 33 der Startpunkt der Translation ist, konnte aufgrund fehlender cDNA-Sequenzinformationen im 5'Bereich des murinen Gens nicht ermittelt werden. Die Homologie auf Nukleotid-ebene zwischen der humanen und der murinen cDNA-Sequenz beträgt im kodierenden Bereich 95 % und im unvollständigen 3'untranslatierten Bereich etwa 60 %.



B

	G	G	S	G	S	A	D	R	G	G	G	G	A	R	S	G	G	R	R	F
1	GGG	GGA	TCA	GGA	AGT	GCG	GAC	CGC	GGC	GGC	GGC	GGA	GCC	CGG	AGC	GGA	GGC	CGG	AGG	TTC
	P	A	R	R	P	R	S	G	A	E	R	R	M	Q	Q	P	Q	P	Q	G
61	CCG	GCC	CGC	CGG	CCC	CGG	AGC	GGA	GCG	GAG	CGG	AGG	ATG	CAG	CAG	CCG	CAG	CCG	CAG	GGG
	Q	Q	Q	P	G	P	G	Q	Q	L	G	V	Q	G	A	A	P	G	A	G
121	CAG	CAG	CAG	CCG	GGG	CCG	GGG	CAG	CAA	CTG	GGG	GTC	CAG	GGG	GCG	GCG	CCG	GGG	GCC	GGG
	G	G	P	G	G	G	P	G	P	G	P	C	L	R	R	E	L	K	L	L
181	GGC	GGC	CCG	GGA	GGG	GGC	CCG	GGG	CCA	GGG	CCC	TGC	CTG	AGG	CGG	GAG	CTG	AAG	CTG	CTC
	E	S	I	F	H	R	G	H	E	R	F	R	I	A	S	A	C	L	D	E
241	GAG	TCC	ATC	TTC	CAC	CGC	GGC	CAC	GAG	CGC	TTC	CGC	ATT	GCC	AGC	GCC	TGC	CTG	GAC	GAG

L S C E F L L A G A G G A G A G A A P G
 301 CTG AGC TGC GAG TTC CTG CTG GCC GGA GCC GGA GGG GCC GGG GCC GGG GCT GCG CCC GGA
P H L P S R G S V P G D P V R I H C N I
 361 CCC CAT CTC CCC TCC CGG GGA TCT GTG CCG GGG GAC CCC GTC CGC ATC CAC TGC AAC ATC
T E S Y P A V P P I W S G E S D A L N L
 421 ACG GAA TCA TAC CCT GCT GTG CCC CCC ATT TGG TCG GGT GAG TCC GAT GCC CTT AAC TTG
A A V L E R L V D I R K G N T L L L Q H
 481 GCT GCT GTC TTG GAG AGG CTG GTG GAC ATA AGG AAA GGG AAT ACT TTG CTC TTG CAG CAT
L K R I I S D L C K L Y N L P Q H P D V
 541 CTG AAG AGG ATC ATC TCT GAC CTG TGT AAA CTC TAC AAC CTC CCT CAG CAT CCT GAT GTG
E M L D Q P L P A E Q C T Q E E V S S E
 601 GAA ATG CTG GAT CAG CCC TTG CCA GCA GAG CAG TGC ACG CAG GAA GAA GTG TCT TCA GAA
D E D E E M P E D T E D L D H Y E M K E
 661 GAT GAA GAT GAA GAG ATG CCT GAG GAT ACA GAA GAC CTA GAT CAC TAT GAA ATG AAA GAG
E E P A E G K K S E D D G I G K E N L A
 721 GAA GAG CCA GCC GAG GGC AAG AAG TCT GAA GAT GAT GGC ATC GGA AAA GAG AAC CTG GCC
I L E K I K K N Q R Q D Y L N G A V S G
 781 ATC CTA GAG AAA ATT AAA AAG AAC CAG AGG CAA GAT TAC TTA AAT GGT GCA GTG TCT GGC
S V Q A T D R L M K E L R D I Y R S Q S
 841 TCG GTG CAG GCC ACT GAC CGG CTG ATG AAG GAG CTC AGG GAT ATA TAC CGA TCA CAG AGT
F K G G N Y A V E L V N D S L Y D W N V
 901 TTC AAA GGC GGA AAC TAT GCA GTC GAA CTC GTG AAT GAC AGT CTC TAT GAC TGG AAT GTC
K L L K V D Q D S A L H N D L Q I L K E
 961 AAA CTC CTC AAA GTT GAC CAG GAT AGC GCT TTG CAC AAT GAT CTT CAG ATC CTG AAG GAG
K E G A D F I L L N F S F K D N F P F D
 1021 AAG GAA GGA GCA GAC TTC ATC CTA CTT AAC TTC TCC TTT AAA GAT AAC TTC CCC TTT GAC
P P F V R V V S P V L S G G Y V L G G G
 1081 CCA CCG TTC GTC AGG GTT GTG TCT CCA GTC CTC TCT GGA GGG TAT GTT CTG GGT GGA GGT
A I C M E L L T K Q G W S S A Y S I E S
 1141 GCC ATC TGC ATG GAA CTT CTC ACC AAG CAG GGC TGG AGC AGT GCC TAC TCC ATA GAG TCC
V I M Q I S A T L V K G K A R V Q F G A
 1201 GTG ATC ATG CAG ATC AGC GCC ACG CTG GTG AAG GGG AAA GCA CGG GTG CAG TTT GGA GCC
N K S Q Y S L T R A Q Q S Y K S L V Q I
 1261 AAC AAA TCT CAG TAT AGC CTG ACG AGA GCA CAG CAG TCC TAC AAG TCC TTG GTG CAG ATC
H E K N G W Y T P P K E D G *
 1321 CAT GAA AAA AAC GGC TGG TAC ACA CCC CCA AAG GAA GAT GGC TAG CCCTGGAGTCTCACCCCTCC
 1386 TCCTCCCCAGGCACCACTGGACCAATTACCTTTGAATGTGTGTTGGATCTCACGCTGCCTCTGGTTTCCCCCTCAT
 1466 TTTTCTGGACGTGATAGCTCTGCTATTGCAGGACAATGATGGCTATTCTAAACGCTAAGGAAAAACAACACCCACAAC
 1546 ACACACTGAACTGTCTCAAGTACTCAAGACTGACTACAGACCAACCACCTCGCTGGAACCCCTTGCTAGCAGGCATCTTA
 1626 TAAAGAACTCTCAAGCCTCCTTATATTGCTGGAACTCAGCTGTGCTCCAGACTAGAGCCTCCTTACCTATGCTATGGG
 1706 TTTTTAATTTATTTCTCTTATTTTCATGTACACTGCTTTTTTTGGTTTCAGTGTATGATGGATGTGTATGAAAAATGTA
 1786 TCTTTGGGAAAAACAATTACACGTTGTTAATTTGAAGATGCTGGTCTTGACTCATCTTTATTTTTATCCCATCCCT
 1866 GACTGCTGGGTGGGGGAGGGGTGCCAGGCCACCATGCTTTGGTAGCAAGGAGAAGCTGCAGAGAGGCTGCAATTCGAT
 1946 GCTAGCACAAGAGAAAGGCCAAGCGGAAGCACTGCCTGATCTGACCCTAGATTTCTCCGAAGGCCTCTGGAGCAACCA
 2026 GTACCTAAACTCTTTGGAACAGTCTGGCTTGCTGAACTACAGTGCAGAGGCCAGAAACATCCTGATTATAGTACCTCT
 2106 TTGTAATAATCTCCATTTTTGAAATTTCCAAGAAAAAGATGAGACTTGAGTAGCTGCTTCATGAACTCCTTTAAGTTGA
 2186 TGGGGGTGGTCCCTGCTCCTGGATGCATGAGGTTTCCCTCTAATCCCAAGCAACCTGCTGAGCGGCTGTAACCTCAGTGT
 2266 TCCTGCCTTCCTGCTCCTTCTCACCTCTCATCTGCTTTATAGATATCTAAGAAAAGACTGAACTTTGGATTCT
 2346 TTCTAGCCATTCCCAAGTTGTGGGTCTACTGGAAACAGTAGCTCAATGTGGTTGCATTGTAGTGGGACCTCGGCTCAG
 2426 CTCAGGAACTGCACAGCCGGGAGAAGTCTGCAGAGCCACAGTACCAGTGTGGACCTGCTGTTGTGAGACTGCACGC

```

2506   AGTACATGGAGCCTGCATCTCCCTCTTTGAGCTTGCTGTGGGACCACCTGCCTGCAGACTGGAGGAAGACTGAAGTGACA
2586   GAGGCAAGGGACAGCCAAGCCAAGTCCTGGAGCTTAGGAAACCCAGCCCTGGAACAGTTGCCTGGATGTTTGCTAATGCT
2666   TCTGAGATGGGCATTCGAGTTTGCCATCTTCCCCACTCCCCATCTCTCTAGGGATTGAATGTCTTGCTGCTTTAGG
2746   GGGATGGAGAGTTCACCAGTCCTACTTGATGCTGCTCTAATTCTGCCTACACCCACCAGGTTA...

```

Abb. 3.3A: Restriktionskarte und genomische Organisation von *Mrhgc1*. Oberhalb des murinen Gens ist das humane Gen abgebildet. Die transkribierten Bereiche der Gene sind durch gelbe Rechtecke gekennzeichnet. Intron-Bereiche sind als dünne Linien dargestellt.

B: Darstellung der isolierten und sequenzierten cDNA von *Mrhgc1* (der 5' Bereich und Teile des 3' untranslatierten Bereiches der cDNA-Sequenz fehlen). Der offene Leserahmen dieser Sequenz umfaßt 1363 Nucleotide und wird durch das Stop-Kodon TAG (*) terminiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der cDNA-Sequenz angeben.

3.2.2 Das putative HGC1-Gen in *Caenorhabditis elegans*

Ein Abgleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *Mrhgc1* und *HGC1* in der GenBank Datenbank (Blast Search) ergab eine 44 %ige Homologie zu einer Aminosäuresequenz eines bei *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) unbekanntes Proteins. Das diesem Protein zugeordnete Gen ist in der GenBank Datenbank unter der Bezeichnung 'F25H2.8' abgelegt.

Im Rahmen des 'Genomprojektes' wurde das gesamte Genom von *C. elegans* sequenziert und Gene anhand der offenen Leserahmen lokalisiert. Dabei wurden Exon/Intron Übergänge nach Wahrscheinlichkeitsberechnungen mittels Computer bestimmt. 'F25H2.8' ist eines von 13 Genen innerhalb eines Cosmids von 42,5 kb Länge, das bei *C. elegans* auf Chromosom 3 kartiert wurde (Wilkinson-Sproat et al., 1994). In der abgeleiteten Aminosäuresequenz von 'F25H2.8' wurde in der Position 241-258 ein sogenanntes UBC Motiv ([FYWLSP]-H-[PC]-[NH]-[LIV]-_{X(3-4)}-G-x-[LIV]-C-[LIV]-x-[LIV]) identifiziert, das als Bindungsdomäne eines 'ubiquitin conjugating enzyme' (E2-Enzym) bekannt ist. Dieses Motiv konnte ebenso in den abgeleiteten Aminosäuren von *Mrhgc1*- (Position 369-386) und HGC1 (Position 375-392) bestimmt werden, so daß diese Gene der Familie der 'ubiquitin conjugating enzymes' zugeordnet werden können. Das E2-Enzym ist eines von drei Enzymen, die an der Markierung von abzubauenen Proteinen mit Ubiquitin beteiligt sind.

In der Datenbank sind mehrere Phagenklone registriert, die cDNA-Sequenzen von 'F25H2.8' enthalten. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus zwei Klonen (EST yk426f12 und EST yk475c5 (von Dr. Y. Kohara, National Institute of Genetics, Mishima, Japan)) ergaben nach der Sequenzierung eine Verschiebung und eine daraus resultierende Verkürzung des offenen Leserahmens von 'F25H2.8' um 84 Aminosäuren. In dem Gen 'F25H2.8' ist ein Intron 5 angegeben, das nach einem Vergleich der cDNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz keine Intron-Sequenz ist, sondern transkribiert wird. In diesem Genabschnitt liegt das Stop-Kodon TAA. Die cDNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz von *C. elegans* sind in der Abbildung 7.1 im Anhang dargestellt. Das Gen erhielt die vorläufige Kennzeichnung *cerhgc1* (*C. elegans* related HGC1).

3.2.3 Isolierung der homologen cDNA für das *HGC1*-Gen aus *Drosophila melanogaster* (*dmrhgc1*, *Drosophila melanogaster* related *HGC1*)

Da in der GenBank Datenbank das homologe Gen zu *HGC1* in *C. elegans* gefunden wurde (Abb.7.1, Anhang), war davon auszugehen, daß auch im Genom von *Drosophila melanogaster* ein homologes Gen existiert. Diese Annahme wurde durch einen Zoo Blot bestätigt, auf dem mit der Sonde 25G in genomischer DNA von *Drosophila* ein Hybridisierungssignal detektiert werden konnte (Altmann, 1994).

Mit der entsprechenden cDNA von *Drosophila* sollte eine *in situ* Hybridisierung an *Drosophila*-Embryonen durchgeführt werden. Das Hybridisierungsmuster in den Embryonen sollte Anhaltspunkte über die Funktion des Gens in *Drosophila* geben. Daher wurde eine embryonale cDNA Bibliothek von *Drosophila* mit der Sonde 25G gescreent. Die cDNAs dreier positiver Phagenklone von 0,7, 1,0 und 1,7 kb Größe wurden in Plasmidvektoren kloniert und sequenziert. In der zusammengesetzten cDNA-Sequenz (*dmrhgc1*) für das *HGC1* homologe Gen aus *Drosophila* konnte kein Translationspunkt bestimmt werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt eine 53 %ige Homologie zu der Aminosäuresequenz von *HGC1*. In der Basenpaarposition

883 - 937 der Nukleotidsequenz befindet sich die UBC-Domäne der ‘ubiquitin conjugating enzymes’(3.2.2). Der offene Leserahmen der Sequenz umfaßt 1155 Nukleotide und wird durch das Stop-Kodon TAA terminiert. Die Nukleotidsequenz von *dmrhgc1* und die abgeleitete Aminosäuresequenz sind in Abbildung 5.2 (Anhang) dargestellt. Der 3’Bereich der cDNA ist unvollständig, da kein Polyadenylierungssignal identifiziert werden konnte. Über die Größe der fehlenden cDNA-Informationen kann keine Aussage gemacht werden, da die Transkriptgröße von *dmrhgc1* nicht bekannt ist. Ein späterer Sequenzabgleich ergab, daß das Gen für die *Dmrhgc1* cDNA in der GenBank Datenbank unter der Bezeichnung EG:25E8.2 [alt 2] (Adams et al., 2000) abgelegt ist. Es ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Der zu diesem Gen gehörige Translationsstartpunkt befindet sich 18 bp 5’wärts vor dem klonierten und sequenzierten cDNA-Fragment von *Dmrhgc1* (Abb. 7.2, Anhang).

3.3 Chromosomale Lokalisation von *Mrhgc1*

Aufgrund von Kartierungen homologer Bereiche auf Mensch- und Maus-Chromosomen können Vermutungen über die chromosomale Lokalisation homologer Gene angestellt werden. Das *HGCI* kartiert in der Chromosomenregion 1q 21-23 (Altmann, 1994). Die zum humanen Chromosom 1q 21-23 homologe Region der Maus konnte auf Mauschromosom 3 identifiziert werden. Daher wurde vermutet, daß das *Mrhgc1* auf Chromosom 3 der Maus lokalisiert ist.

Die chromosomale Lokalisation von *Mrhgc1* erfolgte durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) an Metaphasechromosomen kultivierter peritonealer Zellen einer männlichen NMRI-Maus. Die FISH wurde von Dr. Michael R. Koehler (Institut für Humangenetik, Würzburg) durchgeführt. Als Sonden für die Hybridisierung wurden die beiden genomischen Mausklone GM3 und GMB3 (Abb.3.2D) verwendet. Wie in Abbildung 3.4 a-c zu sehen ist, konnte ein Signal mit den *Mrhgc1* spezifischen Sonden auf einem der längeren akrozentrischen Maus-Chromosomen in der Nähe des

Zentromers detektiert werden. Nach Auswertung der Karyogramme konnte das Hybridisierungssignal in die Region F1 von Chromosom 3 lokalisiert werden.

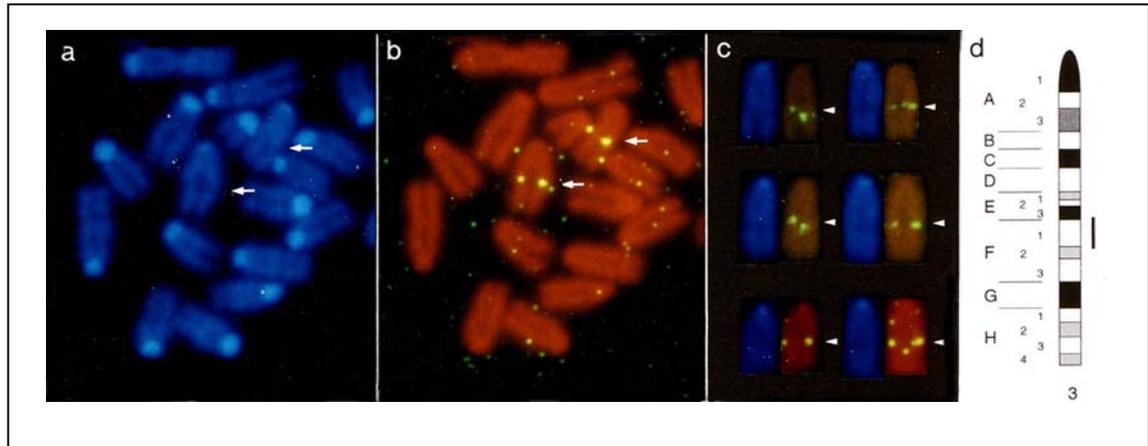


Abb. 3.4: Kartierung von *Mrhgc1* auf dem Chromosom 3. **a)** Mit DAPI gegengefärbte Metaphasenchromosomen aus kultivierten peritonealen Zellen einer männlichen NMRI-Maus, deren Propidiumiodid Gegenfärbung in **b)** zu sehen ist. Die Position der Hybridisierungssignale ist durch Pfeile markiert. In **c)** sind FITC Signale nach der FISH an Metaphasen des Chromosoms 3 dargestellt. **d)** zeigt das Diagramm des Maus-Chromosoms 3 mit der Lokalisation von *Mrhgc1* in der Region 3 F1.

3.4 Untersuchungen zur Expression von *HGCI* bei Mensch, Maus und *Drosophila melanogaster*

3.4.1 Expression von *HGCI* in menschlichen Geweben

Northern Blot Analysen mit Gesamt-RNA verschiedener adulter und embryonaler menschlicher Gewebe mit der cDNA-Sonde 25G (2.4) ergaben, daß *HGCI* ubiquitär exprimiert wird. In Organen von Maus und Ratte konnten in vorangegangenen Experimenten zwei Transkripte von 2,4 kb und 4,0 kb Größe nachgewiesen werden (Altmann, 1994), während in den humanen Geweben nur das kleinere 2,4 kb große

Transkript detektiert werden konnte (Altmann, 1994). Da der sequenzierte Bereich der cDNA von *HGCI* 3,2 kb umfaßt (3.1), konnte davon ausgegangen werden, daß auch in menschlichen Geweben ein zweites, größeres Transkript von *HGCI* analog zu Maus und Ratte vorhanden ist. Dieses Transkript ist in Northern Blot Analysen mit Gesamt-RNA aus humanen Geweben nicht nachweisbar. Nach der Hybridisierung eines Multiple Tissue Northern Blots (Clontech) mit je 2 µg Poly (A⁺)-RNA aus verschiedenen adulten humanen Geweben konnte mit der Sonde 25G jedoch ein zweites Transkripte von 4 kb Größe als schwache Bande nachgewiesen werden (Abb.3.5).

Eine Nachhybridisierung des Blots wurde mit der mitgelieferten β-Actin cDNA (2.4) durchgeführt.

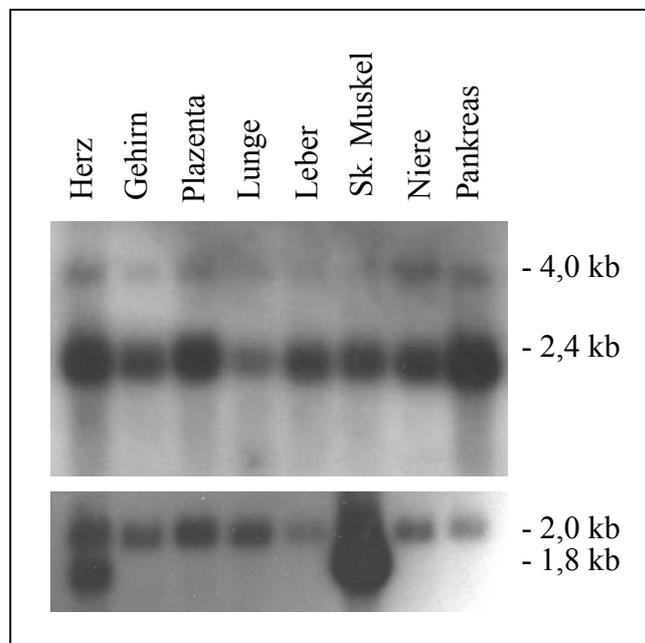


Abb. 3.5: Northern Blot Analyse mit je 2 µg Poly (A⁺)-RNA verschiedener menschlicher Gewebe. Mit der humanen 25G Sonde konnte das 2,4 kb Transkript von *HGCI* in allen Geweben nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte ein schwaches zweites 4 kb großes Transkript detektiert werden. Die Nachhybridisierung erfolgte mit der β-Aktin Sonde.

3.4.2 Expression von *Mrhgc1* während der pränatalen Entwicklung der Maus

Für die Untersuchung der Expression von *Mrhgc1* während der pränatalen Entwicklung der Maus wurden Northern Blot Hybridisierungen mit Gesamt-RNA aus dem Rumpf von 13,5, 16,5 und 18,5 Tage alten Embryonen sowie mit Gesamt-RNA aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und embryonalen Fibroblasten (EmFi) der Maus durchgeführt. Die Hybridisierung der geblotteten RNA mit der Sonde 25G ergab, daß *HGCI* pränatal nachweisbar ist. Dabei konnten beide Transkripte des Gens von 2,4 kb und 4,0 kb Größe in den genannten embryonalen Stadien sowie in ES-Zellen und Fibroblasten der Maus beobachtet werden (Abb. 3.6).

Um die Integrität und die Menge der aufgetragenen RNAs zu überprüfen, wurde die Membran mit der cDNA-Sonde für den humanen Elongationsfaktor EF2 (2.4) nachhybridisiert.

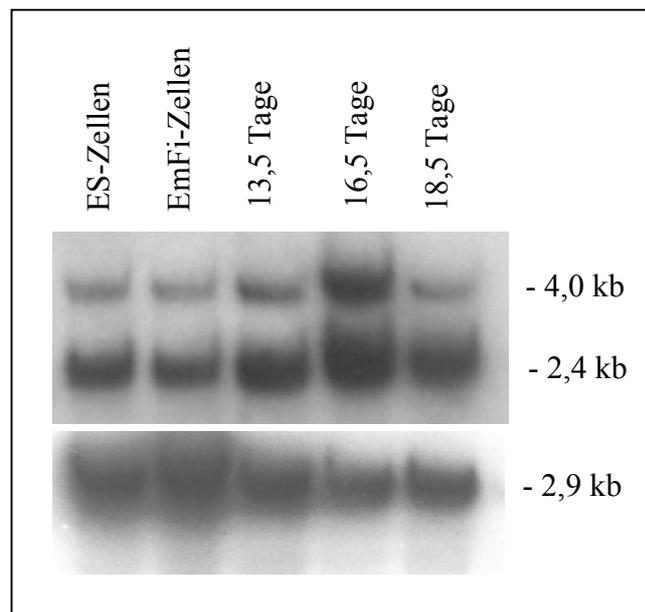


Abb. 3.6: Northern Blot Analyse pränataler Stadien der Maus mit je 20 µg Gesamt-RNA aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) und embryonalen Fibroblasten (EmFi-Zellen) der Maus sowie Testis-RNA von 13,5, 16,5 und 18,5 Tage alten Maus-Embryonen. Beide Transkripte von 2,4 kb und 4,0 kb des *Mrhgc1*-Gens sind auch in den ES-Zellen nachweisbar. Zur Kontrolle wurde mit einem cDNA-Fragment für den humanen Elongationsfaktor EF2 nachhybridisiert.

3.4.3 ‘whole mount’ *in situ* Hybridisierung an Embryonen von *Drosophila melanogaster*

Von dem 0,7 kb großen cDNA-Fragment (s. 3.2.3) des *dmrhgcl*-Gens wurden mit Digoxigenin markierte *in vitro* Transkripte hergestellt, die dann mit *Drosophila* Embryonen verschiedener Stadien hybridisiert wurden. Die *in situ* Hybridisierung wurde mit Unterstützung von Dr. G. Vorbrüggen vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, durchgeführt.

In der Abbildung 3.7 ist der Verlauf der Expression von *dmrhgcl* in der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* gezeigt. Zunächst kann das maternale Transkript für *dmrhgcl* während der frühen Embryonalentwicklung nachgewiesen werden, das im syncytialen Blastoderm über das ganze Ei verteilt ist (Abb.3.7A). Mit zunehmender Zellularisierung des Embryos nimmt der Anteil des maternalen *dmrhgcl*-Transkriptes ab. Nach der Gastrulation (Abb. 3.7B -D) kann *dmrhgcl* im sich entwickelnden Nervensystem detektiert werden. In Embryonen späterer Stadien (Abb.3.7E u. F) wird *dmrhgcl* nur im Gehirn und im Nervensystem exprimiert.

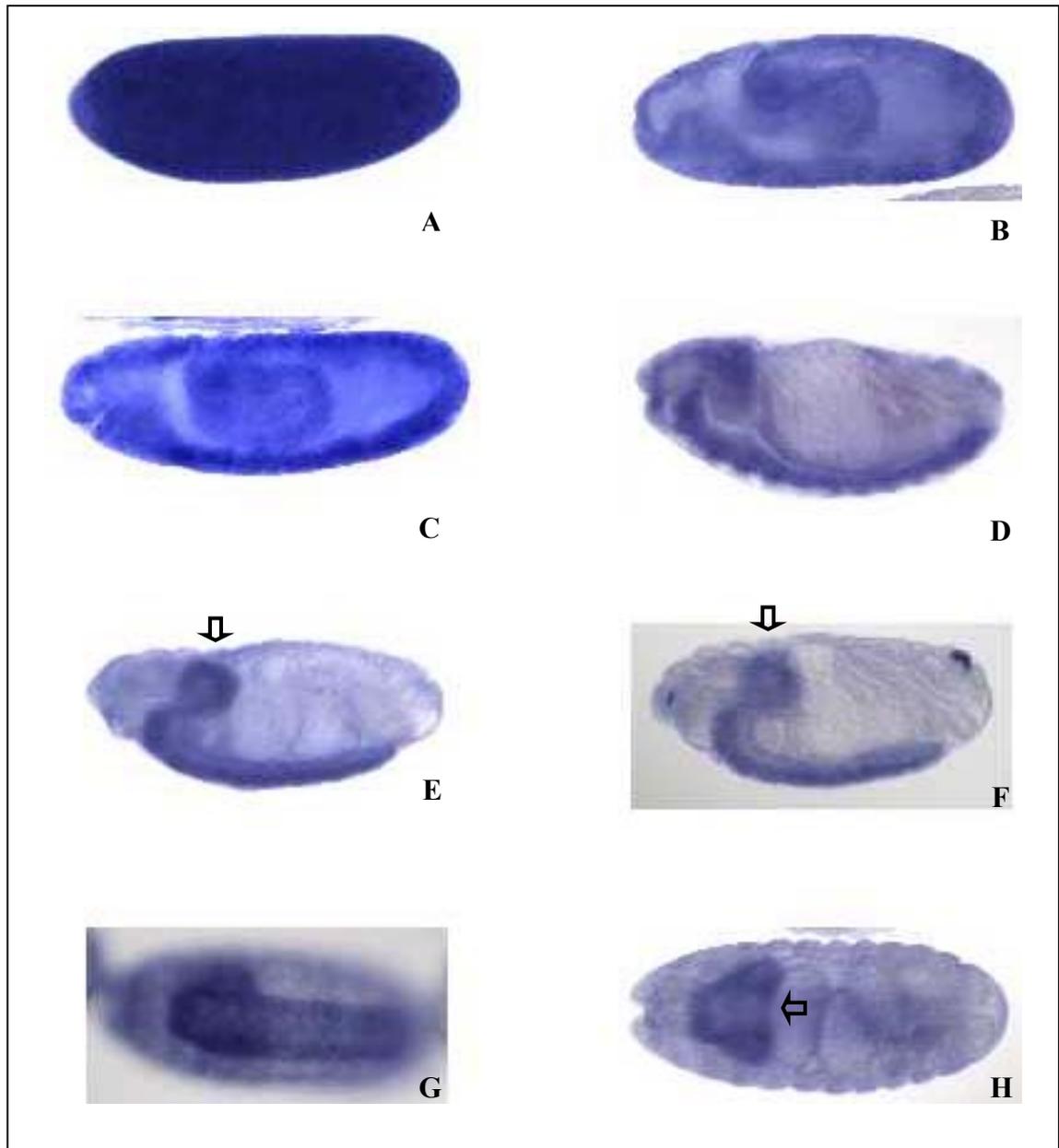


Abb. 3.7: 'whole mount' *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde für *dmrhgc1* an Embryonen von *Drosophila melanogaster*. Zunächst kann das maternale *dmrhgc1*-Transkript im ganzen Ei detektiert werden (A). Mit Beginn der Zellularisierung geht der maternale Anteil von *dmrhgc1*-RNA zurück (B-D, Stadien 8,10 und 13). In Embryonen späterer Stadien (E, Stadium 15 und F, Stadium 17) kann das *dmrhgc1*-Transkript im Gehirn (offener Pfeil) und im Nervensystem nachgewiesen werden. Die Expression von *dmrhgc1* im Gehirn in einem späten Embryo (Stadium 17) in dorsaler Ansicht zeigt Abb.G, die des Nervensystems in ventraler Ansicht, Abb. H.

3.5 Homologe Rekombination

3.5.1 Die Strategie zur Deletion genomischer Bereiche des *Mrhgcl*-Gens

Die Funktion eines Gens kann analysiert werden, indem es durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ausgeschaltet wird. Mit Hilfe eines Targeting-Vektors werden in ES-Zellen endogene Sequenzen im Allel gegen spezieisfremde DNA-Fragmente ausgetauscht, so daß das Gen durch den Verlust essentieller Exons inaktiviert wird. Bei der spezieisfremden DNA handelt es sich um die PGK-Neomycin-Kassette von 1,8 kb Größe, die sich in dem Replacementvektor pPNT befindet. Mittels der PGK-Neomycin-Kassette erfolgt während der Kultivierung der Zellen eine positive Selektionierung der ES-Zellen.

Vor und hinter die PGK-Neomycin-Kassette werden genomische Fragmente in richtiger Anordnung und Orientierung in den Vektor kloniert (Tybulewicz et al., 1991). Die flankierenden genomischen Fragmente sollten ≥ 2 kb sein und aus demselben Maustamm wie die ES-Zellen isoliert worden sein, um die Effizienz der homologen Rekombination zu steigern (Melton, 1994). Aus diesem Grund wurde das Gen *Mrhgcl* aus einer Phagen-Bibliothek des Mausstammes 129/SvJ isoliert und ES-Zellen verwendet, die aus Blastocysten von 129/SvJ gewonnen worden waren.

In Northern Blot Analysen mit Gesamt-RNA der Maus konnte mit der genomischen Sonde Bam3, die 450 bp des ersten Exons enthält, nur das größere 4 kb Transkript von *HGCI* detektiert werden, während mit der Sonde 25G beide Transkripte von *HGCI* nachgewiesen werden konnten. Um eine erfolgreiche Rekombination des *Mrhgcl*-Gens zu gewährleisten, mußte ein Teil der genomischen Sequenz so deletiert werden, daß beide Transkripte des Gens ausgeschaltet werden. Zusätzlich sollte die konservierte UBC-Domäne, die in Exon 10 lokalisiert ist (3.2.2), deletiert werden. Daher mußte ein genomischer Bereich von 3,3 kb mit dem kodierenden Bereich von den Exonen 5-11 durch die Neomycin-Kassette im nativen Allel ersetzt werden. Als flankierende Fragmente sollten für den 5'Bereich das XhoI-Fragment GM2 und für den 3'Bereich ein

4 kb großes XbaI-Fragment aus dem Klon GMB2 in die entsprechenden Klonierungsstellen des pPNT-Vektors eingefügt und die Orientierung durch anschließende Restriktionsanalysen überprüft werden. Zudem sollte eine außerhalb des Konstruktes gelegene Sonde isoliert werden, mit der die Rekombinationsereignisse in den ES-Zellen geprüft werden können. Die Strategie für die Inaktivierung von *Mrhgc1* ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

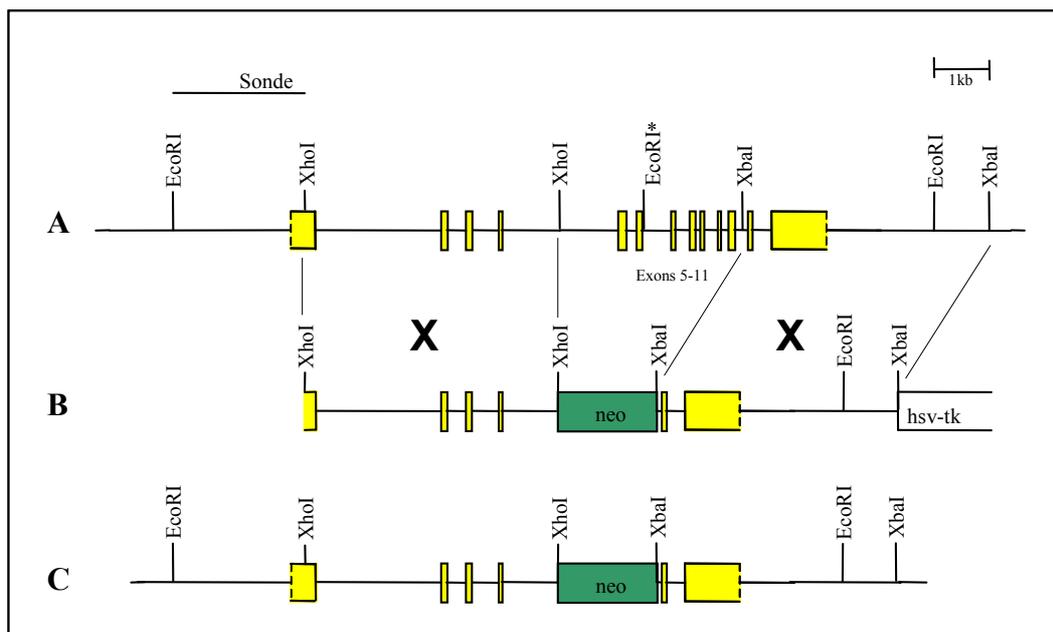


Abb. 3.8: Strategie zur Inaktivierung von *Mrhgc1*.

Das native Gen ist in **A** dargestellt. Die genomischen Fragmente XhoI (5' flankierend der Neomycin-Kassette) und XbaI (3' flankierend der Neomycin-Kassette) sollten in den pPNT-Vektor kloniert werden (**B**). Mittels homologer Rekombination sollte der kodierende Bereich von Exon 5 bis Exon 11 durch die Neomycin-Kassette im nativen Gen ersetzt werden (**C**), so daß die Gen-Funktion ausgeschaltet wird.

3.5.2 Klonierung der genomischen Fragmente in den pPNT-Vektor

Für die Klonierung des 3'flankierenden Bereichs des Targeting-Vektors pPNT wurde aus dem Subklon GMB2 (s. Abb.3.2D) das 4 kb große XbaI-Fragment isoliert und in den mit XbaI linearisierten pPNT-Vektor kloniert. Die Selektionierung der gewachsenen Klone erfolgte über eine Hybridisierung. Positive Klone wurden

angezogen, die DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Bei richtiger Orientierung des Fragments waren nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein 1 kb großes EcoRI-Fragment, bei falscher Orientierung ein 3,2 kb großes EcoRI-Fragment auf dem Gel zu erkennen (Abb. 3.9 A). Vor die Neomycin Kasette wurde das genomische Fragment GM2 (s.Abb.3.2D) in die XhoI-Schnittstelle des Klon PX2 kloniert, der das 3' flankierende Fragment in richtiger Orientierung enthielt (Abb. 3.9A). Nach der Transformation wurden positive Klone mittels Hybridisierung identifiziert und die Orientierung der Klone über einen Restriktionverdau mit XbaI ermittelt. Dabei sollten bei richtiger Orientierung vier Banden von 1 kb, 2,3 kb, 4 kb und 8,5 kb Größe im Gel zu erkennen sein. Diese Anordnung der Banden zeigte der Klon pPXX. Über den Restriktionsverdau mit XbaI konnte gleichzeitig die Vollständigkeit der genomischen Fragmente in dem Targeting-Vektor pPXX überprüft werden. Zusätzlich wurden zur Kontrolle weitere Restriktionsspaltungen mit den Enzymen EcoRI, NotI und XhoI durchgeführt (Abb. 3.9 B). Für das angestrebte Rekombinationsereignis mußte der konstruierte Targeting-Vektor linearisiert werden, welches mit dem Enzym NotI erreicht wurde.

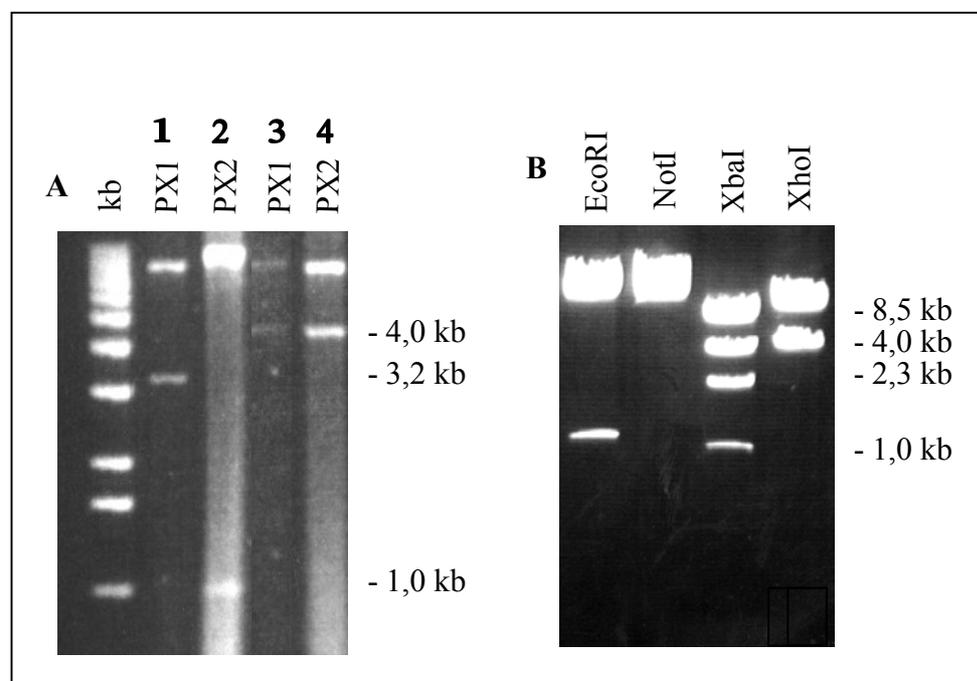


Abb. 3.9: Restriktionsenzymatische Spaltung des Targeting-Vektors nach der Klonierung des 3'flankierenden Bereichs (**A**) und des 5'flankierenden Bereichs (**B**).

A: Die Orientierung der positiven Klone PX1 und PX2 wurde nach der Klonierung des 3'Bereich (Spur 3 und 4) durch eine restriktionsenzymatische Spaltung mit dem Enzym EcoRI überprüft (Spur 1 und 2). Der Klon PX2 zeigte die richtige Orientierung.

B: Restriktionsenzymatische Spaltung des Targeting-Vektors PXX mit verschiedenen Enzymen. Die richtige Orientierung konnte durch die Spaltung mit XbaI überprüft werden, ebenso die Vollständigkeit der klonierten Fragmente in den pPNT-Vektor. Die Linearisierung des Targeting-Vektors konnte mit dem Enzym NotI erreicht werden.

Für die Analyse korrekter Rekombinationsereignisse in den ES-Zellen war die Isolierung einer außerhalb des Konstruktes gelegenen Sonde notwendig. Damit sollte eine Unterscheidung zwischen dem nativen und dem mutierten Allel ermöglicht werden. Aus dem 5'gelegenen Subklon GM1 (Abb. 3.2D) wurde ein 2,4 kb großes EcoRI/XhoI-Fragment isoliert und kloniert. Wird genomische DNA der Maus mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten und anschließend mit der EcoRI/XhoI-Sonde hybridisiert, so ist eine 8,5 kb große Bande auf der Autoradiographie nachweisbar. Sind die Exons 5-10 durch die Neomycin-Kassette ersetzt, so wird die EcoRI-Schnittstelle nach dem Exon 6 deletiert. Nach einer Hybridisierung mit der EcoRI/XhoI-Sonde wird im mutierten Allel eine 13 kb große Bande erwartet (s. Abb. 3.10).

3.5.3 Elektroporation von R1-ES-Zellen

Die R1-ES-Zellen (Nagy et al., 1993) wurden auf einem konfluenten 'Layer' von kultivierten, mit Mitomycin C behandelten primären embryonalen Fibroblasten (EmFi) ausplattiert. Exponentiell wachsende ES-Zellen wurden auf einer 90 mm Kulturschale bis zu einer Zahl von 7×10^6 Zellen kultiviert, durch Trypsinisierung geerntet und mit 40 µg des durch NotI linearisierten Targeting-Vektors pPXX elektroporiert (2.18.2). Die Zellen wurden nach dem DNA-Transfer für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend in fünf 60 mm Kulturschalen mit EmFi-Zellen ausplattiert. Die Selektion in G418 (Positiv-Selektion) und Gancyclovir (Negativ-Selektion) begann nach 12 bis 16 h. Die

Gancyclovir Selektion wurde nach fünf Tagen beendet, während die G418 Selektion bis zur Isolierung resistenter Klone am achten oder neunten Tag aufrecht erhalten wurde. Nach der Identifizierung und Isolierung positiver Klone wurde die Hälfte der Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert, während die andere Hälfte der Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und für die Genotypisierung herangezogen wurde. Die isolierte DNA aller ES-Zellklone wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit der externen 5'-Sonde sowie der internen Neomycin-Sonde hybridisiert. Hierbei sollte das native Allel von *Mrhgc1* durch eine 8,5 kb Bande charakterisiert werden, während das mutierte Allel durch die Deletion einer EcoRI-Schnittstelle im Intron 6 ein Fragment von 13 kb ergeben sollte. In Abbildung 3.10 ist die Hybridisierung der externen 5'-Sonde dargestellt. Homolog rekombinierte Linien lassen sich eindeutig durch die Anwesenheit der größeren Bande identifizieren. Mit der Neomycin-Sonde war nur in der ES-Zelllinie 54 ein Hybridisierungssignal für das mutierte Allel (13 kb) zu erkennen (nicht dargestellt).

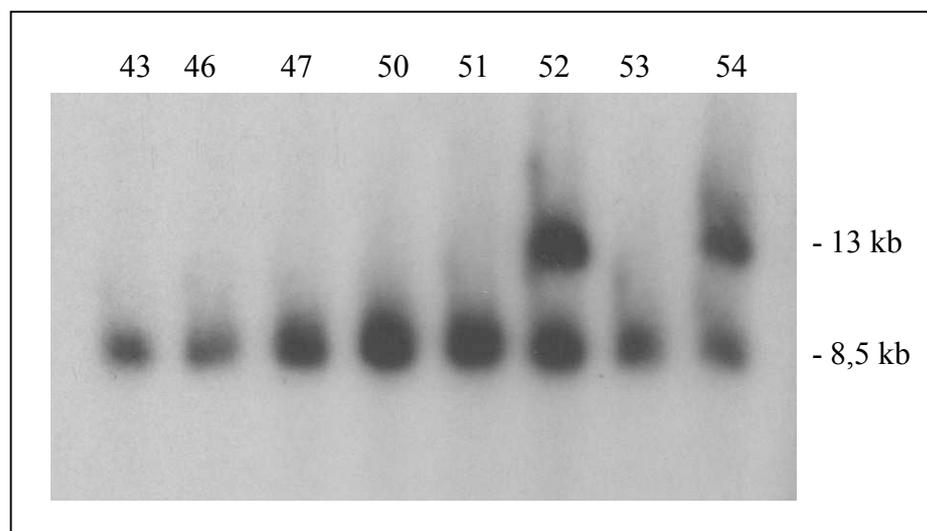


Abb. 3.10: Genotypisierung der positiven ES-Zellklone über Southern Blot Analyse. Die restriktions-enzymatische Spaltung der genomischen DNA dieser Klone erfolgte mit dem Enzym EcoRI. Nach der Hybridisierung mit der EcoRI/XhoI-Sonde konnte in heterozygoten Klonen das native und das mutierte Allel anhand der 8,5 kb und der 13 kb Banden identifiziert werden.

3.5.4 Aggregation von ES-Zellen mit 2,5 Tage alten Mausembryonen und Analyse der generierten Chimären

Für die Aggregation mit 2,5 Tage alten Mausembryonen des Mausstammes CD1 wurden die Zellen der Zelllinie 54 vier Tage vor der Aggregation aufgetaut, auf Feederzellen ausgesät und nach zwei Tagen im subkonfluenten Zustand erneut trypsiniert und auf zwei 30 mm Kulturschalen verteilt (2.18.5 und 2.18.5). Am Tag der Aggregation wurden 8-12 ES-Zellen auf einen Embryo gelegt und mit einem weiteren Embryo bedeckt ('Sandwich'-Methode). Diese Aggregate wurden in Ammentiere retransferiert, die geborenen Chimären anhand des Agouti-Fellmarkers identifiziert und durch Rückkreuzung mit Tieren der Ausgangsstämme CD1 bzw. 129/SvJ auf Keimbahn-Transmission getestet. In Tabelle 3.1 ist die Zahl der Aggregate und der generierten Chimären dargestellt.

Retransferierte Aggregate	Wurfgröße	Männliche Chimären	Weibliche Chimären	Agouti-Färbung	Keimbahn-Transmission
15	9	1	/	Ch1: 30 %	/
16	9	2	/	Ch2: 10 % Ch3: 50 %	/
18	8	1	/	Ch4: 95 %	100 %

Tab. 3.1 Ergebnisse der Aggregationen

In der Tabelle 3.1 ist zu erkennen, daß lediglich die männliche Chimäre Ch4 Keimbahn-Transmission für das mutierten *Mrhgc1*-Gens zeigte.

Die Chimäre Ch3 mit 50 % Agouti-Färbung war infertil. Nach Präparation dieser Maus konnten sowohl männliche wie auch weibliche Geschlechtsorgane gefunden werden. Daß diese Chimäre ein Zwitter war, ist damit zu erklären, daß bei den 2,5 Tage alten Mausembryonen ein anderes Geschlecht als bei den ES-Zellen vorlag, und sich sowohl

die ES-Zellen als auch die Zellen der 2,5 Tage alten Mausembryonen an der Ausbildung der Gonadenanlagen beteiligt haben.

Bei der Chimäre Ch1 mit 10 % Fell-Chimärismus beteiligten sich die ES-Zellen mit dem rekombinanten Allel nicht an der Keimbahn. Dieses männliche Tier war fertil. Nach Verpaarungen mit CD1-Weibchen wurden in 11 Würfen nur Wildtyp-Nachkommen geboren.

Die dritte Chimäre Ch1, die keine Keimbahn-Transmission zeigte, war nur bedingt fertil. Es konnte nur ein Wurf nach permanenter Verpaarung mit einem CD1-Weibchen registriert werden. Die Nachkommen waren Wildtyp-Tiere.

Die Nachkommen der transmittierenden Chimäre CH4 mit CD1-Weibchen bzw. Weibchen des Stammes 129/SvJ wurden durch Southern-Blot Analysen genotypisiert. Dabei waren etwa die Hälfte der analysierten Mäuse heterozygot für die *Mrhcg1*-Deletion. Heterozygote Mäuse zeigten keinerlei Auffälligkeiten. Männliche und weibliche heterozygote Mäuse wurden zum Zwecke der Generierung homozygoter knock out Mäuse miteinander verpaart.

3.6 Analyse *Mrhcg1* defizienter Mäuse

3.6.1 Statistische Analyse der Wurfgrößen

A: CD1/129 Hybrid Hintergrund

Durch Verpaarung der Chimäre CH4 mit Weibchen des Stammes CD1 wurden in der F1-Generation heterozygote (+/-) und Wildtyp (+/+) -Nachkommen generiert. Dabei betrug die Zahl der heterozygoten Mäuse 21 bei einer Gesamtzahl von 55 in sechs Würfen. Der Anteil homozygoter (-/-) Nachkommen nach der Verpaarung heterozygoter Tiere belief sich bei 14 Würfen mit insgesamt 120 Nachkommen auf 33 Tiere (27,5 %). Dies entspricht nach den Mendelschen Regeln etwa dem zu erwartenden statistischen Viertel. Dieses Ergebnis war ein erster Hinweis darauf, daß auf dem CD1-Hintergrund

Mrhgc1 defiziente Mäuse keine embryonalen Entwicklungsstörungen aufweisen und nach der Geburt normal lebensfähig sind. Diese Mäuse unterschieden sich auch äußerlich in keiner Weise von Heterozygoten oder Wildtyp Geschwistern. Die Nachkommen aus homozygoten Mäusen wiesen ebenfalls keine Auffälligkeiten auf.

In Tabelle 3.2 ist die Verteilung der genotypisierten Nachkommen mit CD1-Hintergrund in den einzelnen Generationen dargestellt.

	Anzahl der Würfe	Zahl der Nachkommen	Durchschnittl. Wurfgröße	Wildtyp (+/+)	Heterozygot (+/-)	Homozygot (-/-)
F1	6	55	9,2	34 (61,8 %)	21 (38,2 %)	/
F2	14	120	8,6	29 (24,2 %)	58 (48,3 %)	34 (27,5 %)
F3	27	164	6,1	/	/	164

Tab. 3.2: Verteilung von Wildtyp-,heterozygoten und homozygoten Mäusen mit CD1-Hintergrund in der F1- (+/- x +/+), F2- (+/- x +/-) und F3-Generation (-/- x -/-).

B: 129/SvJ Hintergrund

Bei Verpaarungen der Chimäre Ch4 mit weiblichen CD1-Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Chimäre das mutierte *Mrhgc1*-Gen durch die Keimbahn transmittiert (3.6.1.1), d.h. die ES-Zellen mit dem mutierten Allel beteiligten sich an der Keimbahnentwicklung. Die ES-Zellen sind aus dem Stamm 129/SvJ isoliert worden. Um eine Line auf dem Hintergrund 129/SvJ zu etablieren, wurde die Chimäre mit Weibchen des Stammes 129/SvJ verpaart. In zwei Würfen wurden 11 Nachkommen geboren, von denen vier heterozygot waren.

Bei Verpaarungen von heterozygoten Eltern wurden in 24 Würfen 109 Nachkommen gezählt, von denen 11 lebende und 4 tote Tiere den Genotyp -/-, 60 Tiere (davon 1 tot geborenes Tier) den Genotyp +/- und 33 Mäuse (davon 2 tot geborene Tiere) den Genotyp +/+ zeigten. Die homozygoten -/- Tiere zeigen keine äußeren phänotypischen

Auffälligkeiten, der Anteil der homozygoten $-/-$ Tiere an der Gesamtzahl der Nachkommen liegt mit 13,8 % unterhalb des erwarteten Viertels nach den Mendelschen Regeln. Bei 10 Würfen nach Heterozygotenverpaarungen starben alle Nachkommen. Die Genotypisierung dieser Nachkommen (32 Tiere) ergab 8 Wildtyp-, 13 heterozygote und 15 homozygote Tiere.

Wurden tragende Muttertiere am 18,5. Tag der Schwangerschaft getötet und die Embryonen präpariert und genotypisiert, dann konnte von 64 Nachkommen aus 11 Verpaarungen bei 16 Embryonen der Genotyp $-/-$ bestimmt werden. 15 Embryonen zeigten den Genotyp $+/+$ und 33 Embryonen den Genotyp $+/-$. Dies Verhältnis entspricht den Erwartungen.

Die auffällige Reduktion in der Zahl der $-/-$ Nachkommen bei Verpaarungen von heterozygoten Eltern führte der Annahme, daß $-/-$ Tiere auf irgendeiner Stufe der pränatalen Entwicklung oder bei der Geburt einen Selektionsnachteil haben. Es wurden daher Retransferversuche durchgeführt. Es wurden heterozygote Weibchen zunächst superovuliert und anschließend mit heterozygoten Männchen verpaart. Die Weibchen mit Vaginalpropf wurden am Tag 1,5 p.c. getötet und die Embryonen im Zweizellstadium in CD1-Ammentiere retransferiert. Aus drei Retransfer-Versuchen wurden 32 Tiere geboren, von denen drei Nachkommen homozygot für das mutante Allel, 20 Nachkommen heterozygot und 9 Tiere homozygot für das native Allel waren.

Die homozygoten Tiere waren fertil. Die Nachkommen aus Homozygotenverpaarungen starben jedoch kurz nach der Geburt (s. Tab.3.3).

Wurden heterozygote Männchen mit homozygoten Weibchen verpaart, so starben die Nachkommen. Diese Aussage ist jedoch nicht signifikant, da nur zwei Würfe analysiert werden konnten. Bei Verpaarungen von homozygoten Männchen mit heterozygoten Weibchen wurden nur zwei von 27 Nachkommen tot geboren.

Verpaarungen von Heterozygoten mit Wildtyp-Tieren bzw. von Wildtyp-Tieren untereinander zeigten keine Auffälligkeiten.

Verpaarungen m x w	Anzahl d. Würfe	Zahl der Nachkommen	Wildtyp (+/+) lebend/tot	Heterozygot (+/-) lebend/tot	Homozygot (-/-) lebend/tot
+/- x +/-	24	109	31 / 2	59 / 2	11 / 4
+/- x +/- a)	10	36	- / 8	- / 13	- / 15
+/- x +/- b)	11	64	- / 15	- / 33	- / 16
+/- x +/- c)	3	32	9 / -	20 / -	3 / -
+/- x -/-	2	9		- / 5	- / 4
-/- x +/-	7	27		15 / -	10 / 2
-/- x -/-	2	6			- / 6
+/+ x +/-	2	12	3 / -	9 / -	
+/- x +/+	29	161	94 / -	67 / -	
+/+ x +/+	3	13	13 /		

Tab. 3.3: Quantitative Verteilung von Wildtyp- (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen mit 129/SvJ-Hintergrund in der F1- (+/- x +/+), F2- (+/- x +/-) und F3-Generation (-/- x -/-).

a) alle Nachkommen sind nach der Geburt gestorben.

b) Muttertiere am 18,5 Tag der Schwangerschaft getötet, Embryonen präpariert und genotypisiert.

c) Retransfer von Embryonen im Zweizellstadium in Ammentiere.

3.6.2 Genotypisierung der Nachkommen

Die Genotypisierung der Nachkommen der einzelnen Generationen erfolgte entweder über eine Southern Blot Analyse oder über eine PCR.

Aus einer Schwanzbiopsie von mindestens drei Wochen alten Mäusen bzw. aus einem Teil des Embryos wurde genomische DNA extrahiert. Für eine Genotypisierung mittels Southern Blot Analyse wurde die genomische DNA zuvor mit dem Restriktionsenzym EcoRI gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde eine

Hybridisierung mit der außerhalb des Konstruktes liegenden 5'-Sonde durchgeführt (3.4.2). In Abbildung 3.11A ist die Autoradiographie einer Genotypisierung einzelner Nachkommen der F2-Generation dargestellt.

Erfolgte die Genotypisierung über PCR, so wurde diese mit drei Primern durchgeführt. Mit der Primerkombination GM7F/GM8R konnte ein genomisches Fragment von 570 bp im nativen Allels amplifiziert werden. Für die Amplifikation eines 308 bp Fragmentes wurde das Primerpaar GM7F/PGK3 verwendet (Primersequenzen s. Anhang) Der Primer PGK3 ist komplementär zu einer Sequenz aus dem PGK-Promotor der Neomycin-Kassette. Wurde eine PCR gleichzeitig mit den drei Primern durchgeführt, so konnten heterozygote Mäuse anhand der beiden amplifizierten Banden identifiziert werden. Bei Homozygoten - oder Wildtyp-Mäusen wurde nur eine Bande amplifiziert, da der dritte Primer GM8R bzw. PGK3 nicht an der genomischen DNA binden konnte. Die Primer-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt. In der Abbildung 3.11B ist eine Genotypisierung einzelner Nachkommen der F2-Generation durch PCR dargestellt.

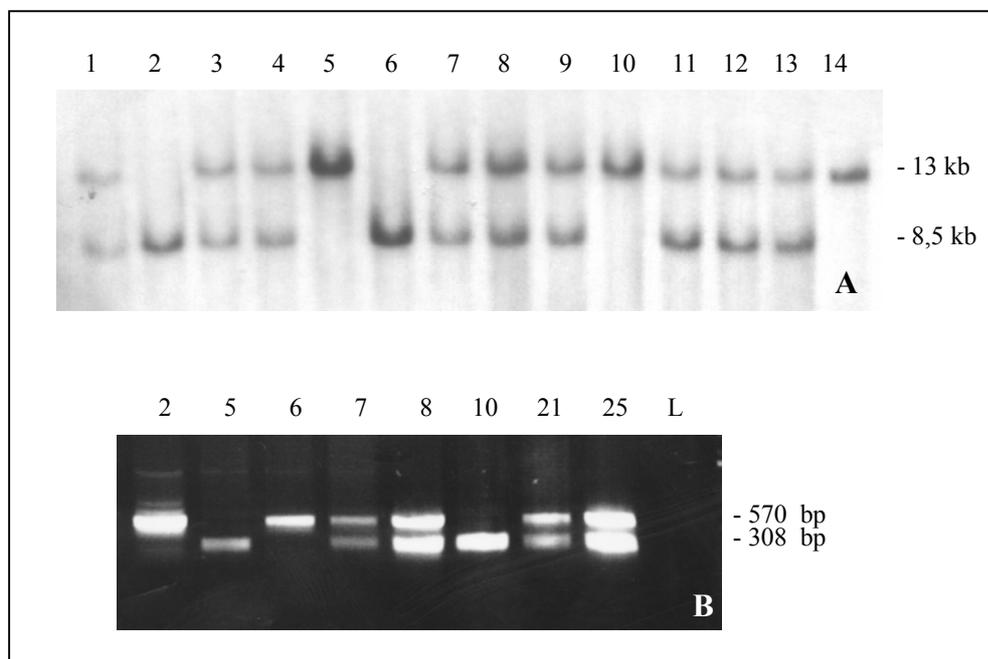


Abb. 3.11: Genotypisierung der F1-Generation mittels Southern Blot Analyse und PCR

In der Southern Blot Analyse der mit dem Enzym EcoRI restringierten genomischen DNA zeigten Wildtyp-Nachkommen nach der Hybridisierung mit der EcoRI/XhoI-Sonde eine 8,5 kb Bande, die homozygoten Nachkommen eine 13 kb Bande und die heterozygoten Nachkommen beide Banden. Bei der PCR konnte beim Wildtyp ein 570 bp-Fragment, bei Homozygoten ein 308 bp-Fragment und bei Heterozygoten beide Banden amplifiziert werden. Die Spur L zeigt die Negativkontrolle

3.6.3 Die Kontrolle der Deletion des *Mrhgc*-Gens durch Northern Blot-Analysen

Für die Kontrolle der Deletion des *Mrhgc1*-Gens wurde Gesamt-RNA aus Testis von adulten Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Mäusen (CD1-Hintergrund) isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte einmal mit einem 600 bp großen humanen cDNA-Fragment, das im ersten Exon beginnt (30 bp) und bis ins Exon 8 reicht. Mit diesem Fragment sollte überprüft werden, ob in homozygoten Mäusen ein verkürztes Transkript des *Mrhgc1*-Gens auftritt .

Aus Abbildung 3.12A geht hervor, daß im Testis von Wildtyp-Mäusen beide Transkripte nachweisbar sind, wobei das kleinere Transkript stärker exprimiert wird. Bei heterozygoten Mäusen ist die Transkriptmenge deutlich herabgesetzt, während bei *-/-* Tieren kein Transkript für *Mrhgc1* detektierbar ist. Eine zweite Hybridisierung mit einer cDNA-Sonde aus dem deletierten Bereich des Gens bestätigte, daß in mutanten Mäusen *Mrhgc1* nicht exprimiert wird (Abb. 3.12B). Diese Sonde ist ein kloniertes, murines PCR-Produkt und umfaßt die Exons 5-9. Die Integrität der RNA wurde durch Anfärben der RNA mit Ethidiumbromid überprüft (Abb. 3.12C).

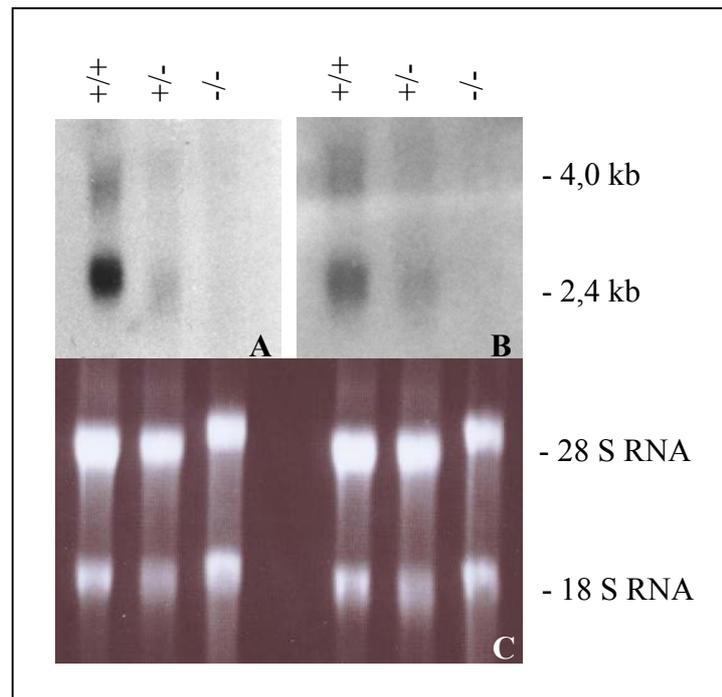


Abb. 3.12 : Northern Blot Analyse von testikulärer Gesamt-RNA.

A: Gesamt-RNA aus Testis von Wildtyp- (+/+), heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) Mäusen (CD1-Hintergrund) wurde mit der humanen cDNA Sonde B5 hybridisiert. In **B** ist die Hybridisierung mit dem murinen PCR-Produkt von Exon 5-9 dargestellt. Zur Kontrolle der RNA-Proben wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt (**C**), um die 18S- und 28S-Bande sichtbar zu machen.

3.7 Das HGC1 homologe Gen in *Caenorhabditis elegans*

3.7.1 Inaktivierung des zu *HGC1* homologen Gens *cerhgc1* in *Caenorhabditis elegans*

In *Caenorhabditis elegans* (Abb. 3.13.A) kann die Funktion eines Gens analysiert werden, indem man es mittels der RNAi-Technik (2.20) ausschaltet. Die RNAi wurde von Dr. Ekkehard Schulze (III. Zoologisches Institut, Lehrstuhl für Entwicklungs-

biologie, Universität Göttingen) durchgeführt. Der Phänotyp, der durch die Inaktivierung des Gens auftritt, kann dann in der F1-Generation analysiert werden.

Wurde dsRNA des cDNA-Klons yK475c58 (cDNA-Fragment des zu *HGCI* homologen Gens aus *C. elegans*, s. Abb. 7.1 im Anhang) in beide syncyctialen Gonaden einer L4 Larve oder in einen jungen Hermaphroditen injiziert (injizierte Tiere entsprechen der F0-Generation), so entwickelten sich die Tiere der F1-Generation zunächst zu normalen jungen Hermaphroditen heran. Kurz nach Beginn der Eiablage zeigten viele Tiere massive Lähmungserscheinungen. Als Antwort auf Berührung kam es bei den gelähmten Tieren zu peristaltischen Muskelkontraktionen, aber nicht zu Kriechbewegungen. Die meisten Tiere starben vier bis fünf Tage nach Beginn der Eiablage, bis dahin hatten die Tiere in etwa 30 Eier abgelegt (Abb. 3.13B). Von 11 injizierten Tieren der F0-Generation konnten 287 Nachkommen gezählt werden. Von diesen 287 Tieren der F1-Generation zeigten 98 diese Symptome und starben als junge Hermaphroditen. Bei zwei Tieren konnte eine Ausstülpung innerer Organe aus der Vulva-Öffnung beobachtet werden (Abb. 3.13C und D). Injizierte Tiere der F0-Generation überlebten nicht länger als fünf Tage. In der Regel leben die Hermaphroditen von *Caenorhabditis elegans* drei Wochen und legen in dieser Zeit zwischen 300 und 500 Eier ab.

In der Kontrollgruppe wurden von 12 mit Wasser injizierten Tieren 437 Nachkommen beobachtet, die keine Auffälligkeiten zeigten (ein Tier starb vorzeitig). Die Hälfte der injizierten Tiere der F0-Generation starb zwar verfrüht, aber sie lebten deutlich länger als fünf Tage. Durch die Mikroinjektion der Proben kann die Kutikula der Hermaphroditen beschädigt werden, was eine Verkürzung der Lebensdauer zur Folge haben kann.

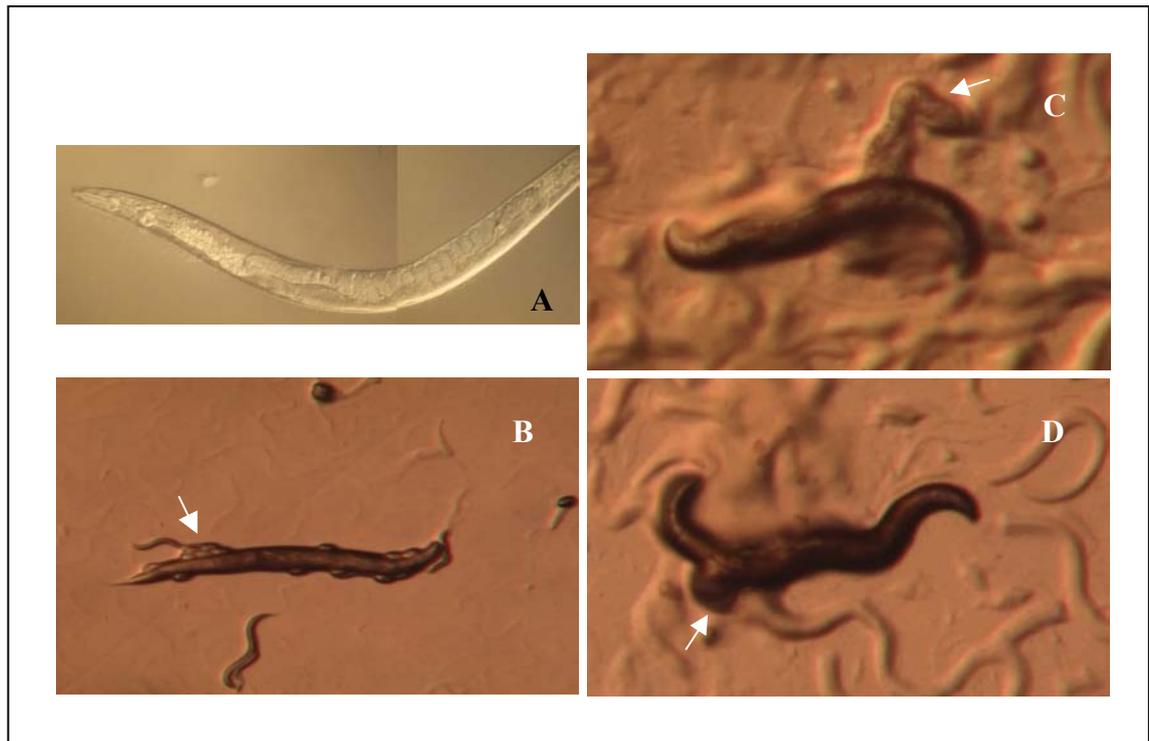


Abb. 3.13: Darstellung von Hermaphroditen der F1-Generation von *C. elegans* nach der Inaktivierung von *cerhgc1* in der F0-Generation mittels RNAi Technik. In **A** ist ein gelähmter, noch lebender Hermaphrodit abgebildet (Nomarski Mikroskopie 20 x). **B** zeigt einen toten Hermaphroditen, der mit L1-Larven der F2-Generation angefüllt ist. Die abgelegten Eier sind nicht gestreut abgelegt, sondern haufenförmig am Tier selbst zu finden (Pfeil). In den Abbildungen **C** und **D** sind noch lebende Tiere mit Lähmungserscheinungen dargestellt, bei denen innere Organe aus der Vulva-Öffnung ausgetreten sind (Pfeil). Die Abbildungen **B-D** sind mit Durchlicht von der Agarplatte aufgenommen worden.

3.7.2 Expression von *cerhgc1* in transgenen Tieren

Die RNAi-Experimente (3.6.1) zeigen, daß die Inaktivierung von *cerhgc1* zu Lähmungserscheinungen und Tod der Hermaphroditen führt. Um die Ursache dieser Symptome zu finden, wurden transgene Tiere erzeugt.

Zur Herstellung des Konstruktes für die Mikroinjektion wurde der Expressions-Vektor pEGFP-N1 (Clontech) verwendet. Dieser enthält 3'wärts der 'multiple cloning site' die

kodierende Region des ‘enhanced green fluorescent protein’ (EGFP) Gens sowie Sequenzen für das SV 40 Polyadenylierungssignal.

Zunächst wurde ein 5 kb großes genomisches DNA-Fragment, das 3,8 kb der 5’UTR-Promotorregion und die vollständige kodierende Region (ohne Stop-Kodon) von *cerhgcl* enthält, (Abb. 7.1 im Anhang) mit dem Primerpaar CE3F /CE4R (s. 2.16.1, Primersequenz s. Anhang) mittels PCR aus dem Cosmidklon F25H2 (3.2.2) amplifiziert. Dieser Cosmidklon wurde von Dr. A. Coulson, The Sanger Center, Cambridge, UK, zur Verfügung gestellt. Das amplifizierte genomische Fragment wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen XhoI und PstI geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors kloniert. Dabei entstand ein Fusionsgen, das sich aus der vollständigen kodierende Region von *cerhgcl* und EGFP zusammensetzt.

Zirkuläre Konstrukt-DNA wurde mit DNA des Plasmids pRF4, das das Markergen *rol-6*(su1006) trägt (Kramer et al., 1990), in eine der beiden syncytialen Gonaden junger Hermaphroditen - analog der Mikroinjektion von dsRNA (2.22.2) - injiziert (F0-Generation). Mit Hilfe des dominanten Markers *rol6* (su1006) können transgene Tiere identifiziert werden.

Die injizierte DNA kann in den Keimzellen sogenannte ‘extrachromosomal tandem arrays’ bilden, eine prädominante Form, in der nicht ins Genom integrierte DNA über die F1-Generation hinaus vererbt wird (Mello et al., 1991).

Eine Expression von *cerhgcl* konnte anhand der fluoreszierenden Eigenschaft des Fusionsgens in Nachkommen aus sechs verschiedenen Linien detektiert werden. In vier Linien (1-4) war eine ‘propagation’ des Gens von 20 % zu erkennen. Nachkommen der Linien 5 und 6 zeigten eine ‘propagation’ von 50-60 % (Abb3.14A-G). Tiere dieser beiden Linien wurden weiterhin vermehrt. Da in den einzelnen Tieren unterschiedliche Bereiche eine Expression –Mosaik- zeigten, kann von einer extrachromosomalen Vererbung des Fusionsgens ausgegangen werden.

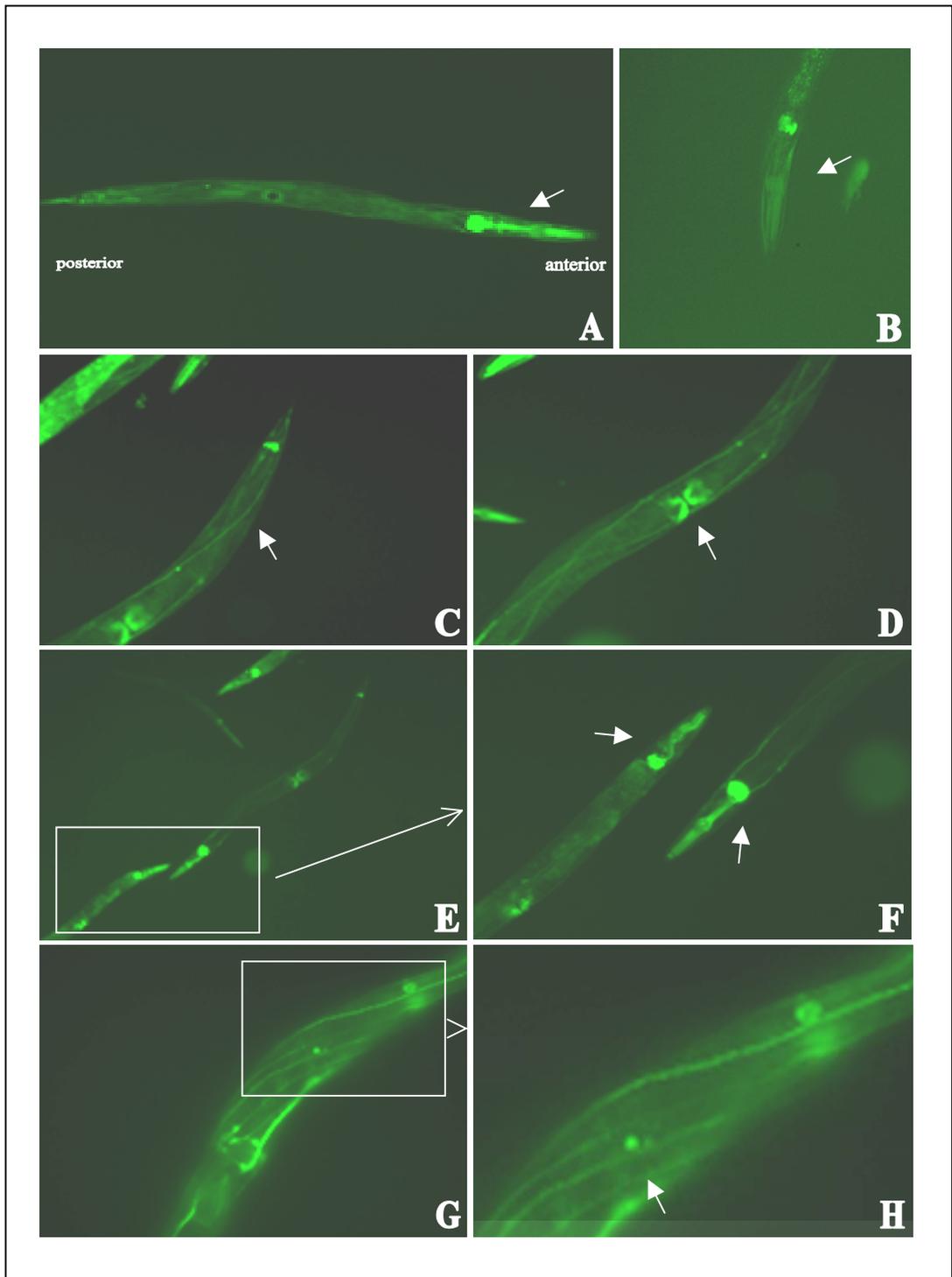
In Abbildung 3.14A ist eine Gesamtansicht eines transgenen Hermaphroditen zu sehen, dessen Länge etwa 1,3 mm beträgt. Auffällig ist die Färbung anterior, im Bereich des Pharynxmuskels und der Kopfganglien (Pfeil). Diese Anfärbung war auch in anderen Tieren zu beobachten, wie in Abbildung 3.14E und detaillierter in Abbildung 3.14.F zu

sehen ist. Zum anderen kann eine starke Fluoreszenz im Bereich des Eiablageapparates, der Vulva, beobachtet werden (Abb. 3.14C und D). In beiden Regionen findet man eine Vielzahl von Muskelzellen, die fluoreszieren, so daß man von einer Expression von *cerhgcl* in den Muskelzellen ausgehen kann. Nicht nur die genannten Muskelzellen sind markiert, sondern auch in Hautmuskelzellen (Abb.3.14.B) kann eine Expression von *cerhgcl* nachgewiesen werden. Insgesamt kann gesagt werden, daß die Expression von *cerhgcl* im Pharynxmuskel am stärksten und in der Hautmuskulatur am geringsten ist.

Neben den Muskelzellen weisen auch Nervenzellen Anfärbungen auf, die zum einen um den Pharynxmuskel herum (Abb. 3.14E und F) und zum anderen in Strängen längs des Körpers angeordnet sind (Abb.3.14G und H). Dabei ist nicht nur das Cytosol der Zellen angefärbt, sondern auch die Zellkerne (Abb. 3.14H, Pfeil). Die Anreicherung des Fusionsproteins in den Zellkernen ist spezifisch für das *cerhgcl*, wie Kontrollversuche anderer mit anderen EGFP-Fusionskonstrukten gezeigt haben (nicht dargestellt). In den Kontrollen konnte keine Anreicherung des Fusionsproteins im Zellkern festgestellt werden. Somit ist das in den Zellkernen auftretende Signal nicht auf die Größe des Fusionspartners EGFP zurückzuführen.

Abb. 3.14: Darstellung von transgenen Hermaphroditen der F1-Generation von *C. elegans*.

In **A** ist die Gesamtansicht eines transgenen Tieres abgebildet. Die starke Fluoreszenz im anterioren Bereich (Pharynx) ist durch einen Pfeil markiert. Die Anfärbung der Pharynxregion zweier weiterer Tiere ist in der Abb. **E** und dann im Detail in der Abb. **F** zu sehen. Die Expression von *cerhgcl* kann auch in Hautmuskelzellen (Pfeil, Abb. **B**) und in Muskelzellen im Bereich der Vulva-Öffnung (Pfeil, Abb. **A**) nachgewiesen werden. Neben den Muskelzellen zeigen auch Nervenzellen eine Expression von *cerhgcl* (Abb. **C** (Pfeil) und **G**). In der Abb. **H** ist eine einzelne Nervenzelle dargestellt, in der der Zellkern angefärbt ist.



4 Diskussion

Die ersten erfolgreichen homologen Rekombinationen in embryonalen Stammzellen der Maus wurden von Thomas und Capecchi sowie Doetschmann et al. (1987) durchgeführt. Durch die Inaktivierung von Genen mittels homologer Rekombination ('knock out') können Hinweise auf die Funktion dieser Gene erhalten werden. Mit Hilfe der homologen Rekombination in ES-Zellen der Maus und die Erzeugung von knock out Mäusen kann die Funktion von *Mrhgc1* bzw. des homologen *HGCI*-Gens studiert werden.

Zuvor sollte jedoch die Nukleotidsequenz von *HGCI* vervollständigt und geklärt werden, ob, wie bei Maus und Ratte, auch in menschlichen Geweben zwei Transkripte des Gens nachweisbar sind.

4.1 Isolierung der 3'untranslatierten Region der cDNA und Expressionsanalyse von *HGCI*

Die Amplifikation der 3'untranslatierten Region von *HGCI* gelang mit genspezifischen Primern aus einer humanen MARATHON cDNA Bank. Dabei konnte ein PCR-Produkt von 1207 bp amplifiziert werden. Nach der Sequenzierung dieses cDNA-Fragmentes konnte ein Poly(A)-Schwanz mit 29 (dA)-Resten und ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) 11 bp 5'wärts vor dem Poly(A)-Schwanz bestimmt werden. Das Polyadenylierungssignal entspricht der Konsensussequenz (5'-AAUAAA-3') und konnte auf genomischer Ebene sowie nach der Sequenzierung eines humanen EST-Klons bestätigt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die gesamte 3'UTR von *HGCI* isoliert worden ist. Unter Berücksichtigung aller bislang erhaltenen Sequenzdaten sollte die noch unvollständige cDNA aus 3194 bp bestehen (Abb. 3.1). Vorhergehende Northern Blot Analysen mit Gesamt RNA aus verschiedenen

menschlichen Geweben haben ein ubiquitär nachweisbares Transkript von 2,4 kb ergeben. In verschiedenen Geweben bei Maus und Ratte konnte jedoch ein weiteres Transkript von etwa 4 kb detektiert werden. Die ermittelte Nukleotidsequenz und das zweite Transkript bei Maus und Ratte ließen darauf schließen, daß auch in menschlichen Geweben ein zweites Transkript für *HGCI* zu finden ist. Über die Hybridisierung eines humanen Multiple Tissue Northern Blots mit Poly(A⁺)-RNA konnte ein zweites ubiquitär auftretendes, jedoch schwaches Transkript von 4 kb detektiert werden (Abb. 3.5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das 4 kb große Transkript in menschlichen Geweben geringer exprimiert wird als in den Geweben von Maus und Ratte.

Eine Transkriptgröße von 4 kb bedeutete auch, daß in der 5'Region der *HGCI* cDNA etwa 800 bp Sequenzinformationen fehlen. Über das Screenen verschiedener cDNA-Bibliotheken und der oben genannten MARATHON cDNA-Bank konnte die fehlende cDNA jedoch nicht isoliert werden. Die Suche nach in Genbanken gespeicherten EST-Klonen blieb ebenso erfolglos wie die RT-PCR mit verschiedenen reversen Transkriptasen.

Die RT-PCR erfolgt in der Regel bei 37°C – 50 °C. Bei diesen Temperaturen zeigen die reversen Transkriptasen ihr Syntheseoptimum. Der hohe GC-Gehalt (~ 70 %) in der 5'Region von *HGCI* (Abb. 3.1) führt jedoch zur Bildung von stabilen Sekundärstrukturen der RNA. Es wären Temperatur von > 60°C notwendig, um diese Strukturen zu lösen, die RNA zu linearisieren und eine cDNA-Synthese zu ermöglichen. Daher kann eine cDNA-Synthese bei 37°C – 50 °C nur bedingt erfolgreich sein. Daraus wird verständlich, warum die Startpunkte der Transkription und der Translation von *HGCI* bislang nicht identifiziert werden konnten.

4.2 Das *Mrhgc1* Gen der Maus

Mrhgc1, das zu *HGCI* homologe Gen der Maus, wurde aus einer genomischen Bibliothek des Mausstammes 129/SvJ isoliert und partiell sequenziert (3.2.1). Durch Vergleiche der Sequenzdaten von *Mrhgc1* mit der genomischen Sequenz von *HGCI*, dessen cDNA-Sequenz sowie der Sequenz eines murinen EST-Klons konnten 13 Exons identifiziert werden. Das Gen deckt 11 kb des Genoms der Maus ab. Die Zahl und die Größe der Exons in *Mrhgc1* entsprechen denen in *HGCI* (Abb. 3.3A). Die Exon/Intron-Übergänge entsprechen den Konsensussequenzen eukaryotischer Gene (Breathnach und Chambon, 1981).

Mit Hilfe der erhaltenen Sequenzdaten konnte auch die cDNA für *Mrhgc1* zusammengesetzt werden, die in der kodierenden Region eine 95 %ige und im 3'UTR eine 60%ige Homologie zu der cDNA von *HGCI* zeigt. Aus der Nukleotidsequenz konnte eine Proteinsequenz abgeleitet werden, die eine 99 %ige Homologie zu der putativen Aminosäuresequenz von *HGCI* aufweist (Abb. 3.3B). Aufgrund fehlender Sequenzen im 5'Bereich konnten die Startpunkte der Transkription und Translation nicht bestimmt werden (s. 4.1).

Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation von *Mrhgc1* war die Voraussetzung für die Klärung der Frage, ob bereits bekannte Entwicklungsgene bzw. Mutationen der Maus in dem ermittelten Chromosomenabschnitt beschrieben sind. Durch FISH-Hybridisierung wurde *Mrhgc1* auf dem Chromosomen 3 in der Region F1 kartiert. In der Chromosomenregion 3F1 der Maus sind keine weiteren Gene kartiert, die beim Menschen in der Chromosomenregion 1q21-23 lokalisiert sind (das Gen *HGCI* wurde in der Region 1q21-23 kartiert).

Es ist bekannt, daß für *Mrhgc1* zwei Transkripte von 2,4 kb und 4 kb in Geweben adulter Mäuse vorhanden sind (Altmann, 1994). Durch Northern Blot Analysen konnten beide Transkripte bereits in ES-Zellen und in Mausembryonen detektiert werden (Abb. 3.6). Die Expression von *Mrhgc1* in embryonalen Stammzellen läßt vermuten, daß es sich um ein bislang unbekanntes Entwicklungsgen handelt.

4.3 *HGCI*- ein evolutionär konserviertes Gen

Im Rahmen des ‘Genomprojektes’ sind bereits die Genome der Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) und *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) vollständig sequenziert.

Um Informationen über kodierende Regionen für *HGCI* ähnliche Gene innerhalb des Genoms des jeweiligen Organismus zu erhalten, wurden mit Hilfe von Computerprogrammen die Positionen möglicher Gene ermittelt. Die Proteinsequenzen unbekannter Gene wurden über Datenbank-Vergleiche (ESTs, cDNAs und Proteine anderer Spezies) ermittelt. Zusätzlich wurden Wahrscheinlichkeitsberechnungen mittels Computer durchgeführt, um mögliche Exon/Intron-Übergänge dieser Gene bestimmen zu können. Die dabei erhaltenen hypothetischen Sequenzen wurden dann in der Datenbank gespeichert.

Abgleiche der putativen Proteinsequenz von *HGCI* mit den Angaben in der Datenbank (BlastX) führten zu einem bei *C. elegans* unbekanntem Protein mit der Bezeichnung ‘F25H2.8’ (Wilkinson-Sproat und Wohldman 1994). Das für ‘F25H2.8’ kodierende Gen ist bei dem Nematoden auf Chromosom 3 lokalisiert. Die hypothetische Proteinsequenz ‘F25H2.8’ zeigt eine 44 %ige Homologie zu der putativen Aminosäuresequenz für *HGCI*. Die Sequenzierung von ‘F25H2.8’ zugeordneten EST-Klone (3.2.2, Sequenz s. Abb.5.1 im Anhang) führte zu einer Abweichung von der in der Datenbank gespeicherten Proteinsequenz für ‘F25H2.8’. Die von EST-Sequenzen abgeleitete Proteinsequenz *cerhgcl* ist um 84 AS kürzer und endet homolog zu dem C-terminalen Ende des putativen Proteins von *HGCI* (Abb.4.1).

Ein zu *HGCI* homologes Gen existiert auch im Genom von *Drosophila melanogaster*. Es konnte eine entsprechende cDNA (*dmrhgcl*) gefunden werden (3.2.3, Sequenz s. Abb.5.2 im Anhang). Die putative Proteinsequenz für *dmrhgcl* weist eine Homologie von 53 % zu der für *HGCI* auf (Abb.4.1). Nach der Sequenzierung des Genoms von *Drosophila* (Adams et al., 2000) konnte in der Datenbank eine Proteinsequenz EG:25E8.2 [alt2] ermittelt werden, die eine 100%ige Homologie zu der putativen Aminosäuresequenz für *dmrhgcl* zeigt. Das Gen zu EG:25E8.2 [alt2] ist auf dem

Chromosom X kartiert worden. Die Datenbankberechnungen haben keine Hinweise auf das Vorhandensein eines *HGCI* ähnlichen Gens bei der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) erbracht. Die Identifizierung homologer Gene zu *HGCI* im Nematoden *C. elegans* (*cerhgcl*), in der Fruchtfliege *Drosophila* (*dmrhgc1*) und in der Maus (*Mrhgcl*), aber nicht in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, deutet auf eine evolutionäre Konservierung des Gens in den vielzelligen Organismen, den Metazoa, hin.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Homologien zwischen *HGCI* und Mitgliedern der Genfamilie der ‘ubiquitin conjugating enzymes’ (E2-Enzymen) gefunden werden. Diese Genfamilie zeichnet sich durch eine ‘UBC-Domäne’ aus, die auch in *HGCI* und in dessen homologen Genen bei den oben genannten Spezies zu finden ist. Die Konsensussequenz (aktives Zentrum) der ‘UBC-Domäne’ ist in Abb. 4.1 umrandet dargestellt und das Cystein, das Ubiquitin bindet, ist blau markiert. In Abschnitt 4.4 wird näher auf diese Genfamilie eingegangen. Da *HGCI* außerhalb der UBC-Domäne keine nennenswerten Homologien zu anderen Mitgliedern der E2-Familie aufweist, kann davon ausgegangen werden, daß *HGCI* und dessen homologen Gene zu den ‘ubiquitin conjugating enzymes’ gehören, aber innerhalb der Genfamilie eine eigene neue Unterklasse darstellen.

Die signifikanten Homologien innerhalb der Proteinsequenzen von *HGCI*, *Mrhgcl*, *dmhgcl* und *cehgcl* befinden sich im Bereich der UBC-Domäne (C-terminal), dem aktiven Zentrum der Proteine (Abb. 4.1). Hier sind etwa 54 % der Aminosäuren bei allen vier Spezies konserviert.

<i>HGC1</i>	1	GGARSAGRRLLPARRPRSGAERR M QQPQPQQQQPGPGQQLGQGGAAPGAGG	
<i>Mrhgc1</i>	1	GGSGSADRGGGGARSGGRRFPARRPRSGAERR M QQPQPQQQQPGPGQQLGVQGAAPGAGG	
<i>HGC1</i>	52	GPGGGPGPGPCLRR ELK LESIFHRGHERFRIASAC LD ELSC E FLLAGAGGAGAGAAPGPHLPP	
<i>Mrhgc1</i>	62	GPGGGPGPGPCLRR ELK LESIFHRGHERFRIASAC LD ELSC E FLLAGAGGAGAGAAPGPHLPS	
<i>dmrhgc1</i>	1	MACLN T L KQ EIK T LEKIFPKNH ER FQILN SS V DE LL CR FI-----	
<i>cerhgc1</i>	1	MACLR K L K EDIQ V LE K L F PKNH NR FQIL S AS V DE L SM K FI-----NAEN	
<i>HGC1</i>	116	RGSVPGDPVRIHCN IT ESYP AV PP I W S ES DD PN LA AV- L ER L VD I KK GN T LL LQ H L K R I I SD L	
<i>Mrhgc1</i>	126	RGSVPGDPVRIHCN IT ESYP AV PP I W S ES DA LN LA AV- L ER L VD I R K GN T LL L Q H L K R I I SD L	
<i>dmrhgc1</i>	41	--D K N G K R Y D I H AN IT ET Y PS PP V W FA E SE ET SV T NA-VQ I L S NT NG R D N H V I N Q V G ILL R EL	
<i>cerhgc1</i>	45	K G I I -----V T AN I Q EN Y PR Q PP I W FS ES DD V P V IG MS L Q R L T E TE E - S T N I L H Q V H R L V SD L	
<i>HGC1</i>	179	CKLY N L-----P Q H P D V -----E M L D Q P L P A E -----Q T Q E D V S S E D E D E E	
<i>Mrhgc1</i>	189	CKLY N L-----P Q H P D V -----E M L D Q P L P A E -----Q T Q E E V S S E D E D E E	
<i>dmrhgc1</i>	102	C R L H N V -----P L P P D I -----D N L A L P L Q T P P S A S P L R C Q R P G G G A G G G	
<i>cerhgc1</i>	102	C S F Y N L Q M P C E L P Q I A P P V R D D I D E G R G S D I S D T T S E P I D D D -----M A G D E V D D D E E E	
<i>HGC1</i>	216	M P E D T E D L D-H Y E M K E E E P-----A E G K K-----S E D D G I G E N L A I L E K I K K N Q	
<i>Mrhgc1</i>	226	M P E D T E D L D-H Y E M K E E E P-----A E G K K-----S E D D G I G E N L A I L E K I K K N Q	
<i>dmrhgc1</i>	146	G P H G N E E T D-S D Q E E I E D P I G E S E Q E S E G E D E D L P L E M D D V R S T S K K D M E V E H L A T L E K L R Q S Q	
<i>cerhgc1</i>	159	D E D A D G D I E I V E M A E E D P -----T S Q H D V G V S K E G L D M L D K V S K I N	
<i>HGC1</i>	260	R Q D Y L N G A V S G S V Q A T D R L M K E L R D I Y R S Q S F K G G N Y A V E L V N-D S L Y D W N V K L L K V D Q D S A L H	
<i>Mrhgc1</i>	270	R Q D Y L N G A V S G S V Q A T D R L M K E L R D I Y R S Q S F K G G N Y A V E L V N-D S L Y D W N V K L L K V D Q D S A L H	
<i>dmrhgc1</i>	209	R Q D Y L K G S V S G S V Q A T D R L M K E L R D I Y R S D A F K K N M Y S I E L V N-E S I Y E W N I R L K S V D P D S P L H	
<i>cerhgc1</i>	201	R Q Q H L D G K V Q S G I T A T D R L M K E I R D I H R S E H F K N G I Y T F E L E K E E N L Y Q W I K L H K V E D S P L F	
<i>HGC1</i>	323	N D L Q I L K E K E G A D F I L L N F S F K D N F P D P P F V R V S P V L S G G Y V L G G G A I C M E L L T K Q G W S S A Y	
<i>Mrhgc1</i>	333	N D L Q I L K E K E G A D F I L L N F S F K D N F P D P P F V R V S P V L S G G Y V L G G G A I C M E L L T K Q G W S S A Y	
<i>dmrhgc1</i>	272	S D L Q M L K E K E G K D S I L L N I L F K E T Y P F E P P F V R V H P I I S G G Y V L I G G A I C M E L L T K Q G W S S A Y	
<i>cerhgc1</i>	265	E D M K K L K K D H N Q D H L L F S F T F N E K F P C D P P F V R V A P H I N Q G E V L G G G A I C M E L L T K Q G W S S A Y	
<i>HGC1</i>	387	S I E S V I M Q I S A T L V K G K A R V Q F G A - N K S ----Q Y S L T R A Q Q S Y K S L V Q I H E K N G W Y T P P K E D G	
<i>Mrhgc1</i>	397	S I E S V I M Q I S A T L V K G K A R V Q F G A - N K S ----Q Y S L T R A Q Q S Y K S L V Q I H E K N G W Y T P P K E D G	100 %
<i>dmrhgc1</i>	336	T V E A V I M Q I A A T L V K G K A R I Q F G A - T K A L T Q C Q Y S L A R A Q Q S F K S L V Q I H E K N G W F T P P K E D G	53 %
<i>cerhgc1</i>	329	S I E S C I L Q I A A T L V K G R A R I S F D A K H T S ----T Y S M A R A Q Q S F K S L Q Q I H A K S G W Y T P P K E D G	45 %

Abb. 4.1: Homologievergleich der Aminosäuresequenzen der Proteine von Mensch (*HGC1*), Maus (*Mrhgc1*), *Drosophila melanogaster* (*dmrhgc1*) und *Caenorhabditis elegans* (*cerhgc1*). Das aktive Zentrum der UBC-Domäne ist umrandet und Cystein, das Ubiquitin bindet, ist blau markiert. Das erste Methionin in den Aminosäuresequenzen ist fett gedruckt und die konservierten Aminosäuren sind rot dargestellt.

4.4 Die UBC-Domäne

Das *HGC1* Gen kann der Genfamilie der ‘ubiquitin conjugating enzymes’ (UBCs oder E2-Enzyme) zugeordnet werden. Die Sequenzhomologie von *HGC1* zu den Mitgliedern dieser Genfamilie beschränkt sich jedoch auf die UBC-Domäne (~ 150 AS), das aktive Zentrum der Enzyme. Das Motif des aktiven Zentrums der UBC-Domäne [FYWLSP]-H-[PC]-[NH]-[LIV]-x₍₃₋₄₎-G-x-[LIV]-C-[LIV]-x-[LIV] ist konserviert und befindet sich in *HGC1* an der Position 358-376, in *Mrhgc1* an der Position 368-386, in *dmrhgc1* an der Position 307-325 und in *cerhgc1* an der Position 300-318 (Abb. 4.1).

Das E2 Enzym ist eines von drei Enzymen (E1, E2 und E3), welches die kovalente Bindung von Ubiquitin an selektiv abzubauen Proteine (regulatorische und fehlerhafte Proteine) in eukaryotischen Zellen katalysiert. Solche mit mehreren Ubiquitinmolekülen markierten Proteine werden dann in einem Proteosomen-Komplex (26 S-Form) in ihre Aminosäuren zerlegt, wobei Ubiquitin wieder freigesetzt wird. Dieses System ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wie etwa an der Zell-Zyklus-Progression, an der Endozytose, Immunantwort, Signaltransduktion und am programmierten Zelltod (Hershko und Ciechanover, 1998).

E2-Enzyme sind evolutionär konservierte Proteine, die in der Hefe bis hin zum Menschen vorkommen. Bei *Saccharomyces cerevisiae* sind 16, bei *Caenorhabditis elegans* 18 und bei *Drosophila melanogaster* 34 E2-Enzyme identifiziert worden (Rubin et al., 2000). Die Zahl der E2s in Säugern ist nicht bekannt (Multigenfamilie).

Unter strukturellen Gesichtspunkten werden die Ubiquitin konjugierenden Enzyme in vier Klassen unterteilt. Zu der erste Klasse (Klasse I) werden relativ kleine Proteine gerechnet, die nur aus den ~150 Aminosäuren der UBC-Domäne bestehen, wie *Ubc4* der Hefe oder *UbcH5* des Menschen (Scheffner et al., 1994). In die zweite Klasse (Klasse II) werden die E2-Enzyme eingeordnet, bei denen die Proteinsequenz C-terminal nach der UBC-Domäne verlängert ist. Die Anzahl der Aminosäuren im C-terminalen Bereich ist variabel. *Ubc2/RAD6*, *Ubc3/Cd34* werden zu dieser Gruppe gezählt (Jentsch et al., 1987, Goeble et al., 1988). Die dritte Klasse (Klasse III) umfaßt die Proteine, die N-terminal eine Verlängerung der Proteinsequenz zeigen (z.B. *UbcH6*,

UbcM2; Nuber et al., 1996, Matuschewski et al., 1996). Der vierten Klasse (Klasse IV) gehören die Proteine an, die sowohl C-terminal als auch N-terminal in ihrer Sequenz verlängert sind (z.B. E2-C, UbcH2; Aristarkhov et al., 1996, Kaiser et al., 1994). Eine schematische Darstellung der vier Klassen wird in Abb. 4.2 gegeben.

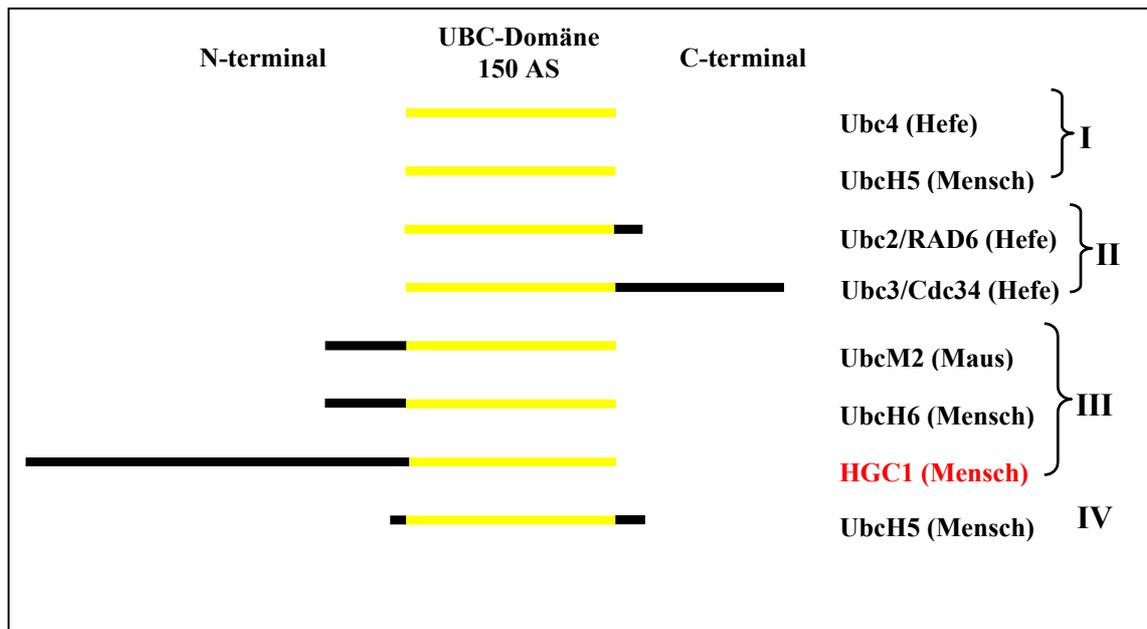


Abb.4.2: Schematische Einteilung von einigen Mitgliedern der UBC-Genfamilie und den *HGC1* nach den Klassen I-IV. Die ~ 150 AS der UBC-Domäne sind gelb dargestellt. Die N-terminalen bzw. C-terminalen Bereiche der aufgelisteten Proteine sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. HGC1 ist rot hervorgehoben.

Aufgrund der putativen Aminosäuresequenzen der von den Genen *HGC1*, *Mrhgc1*, *dmhgc1* und *cehgc1* kodierten Proteine können diese der Klasse III zugeordnet werden (Abb.4.2). Nur die UBC-Domäne im C-terminalen Bereich dieser vier Proteine weist Homologien zu anderen E2-Enzymen dieser Klasse bzw. zu allen anderen E2-Enzymen auf. Die N-terminalen Sequenzen sind nicht konserviert. Neben UbcH6 gehören noch zwei weitere humane E2-Enzyme, nämlich UBE2E2 (alias UbcH8; Kimura et al., 1997) und UBE2E3 (alias UBC9; Ito et al., 1999) dieser Klasse an.

Die Funktion des N-terminalen Bereichs der Proteine ist unbekannt, ist aber nicht für die Bindung von Ubiquitin verantwortlich (Nuber et al., 1996).

Der Verwandtschaftsgrad zwischen den einzelnen Mitglieder einer Genfamilie kann mit Hilfe von Multialignments und phylogenetischen Stammbäumen ermittelt werden (ClustalW, s. 2.15.2). Der Stammbaum einiger Mitgliedern der UBC-Genfamilie und für *HGCI*, *Mrhgcl*, *dmrhgcl* und *cerhgcl* ist in der Abbildung 4.3 dargestellt. Diese 37 E2-Enzyme weisen die höchste Homologie zu *HGCI* auf (BlastP). Ausgehend von diesem Proteinabgleich wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Der Verwandtschaftsgrad ist dabei empirisch bestimmt worden und graphisch über eine horizontale Linie dargestellt. Die Zahlen an den Verästelungen des Stammbaums geben in Prozent die Wahrscheinlichkeit der richtigen Berechnung an.

Anhand des Stammbaumes wird deutlich, daß die *HGCI* homologen Gene eine eigenständige Gruppe innerhalb der UBC-Genfamilie bildet, die sich früh von den übrigen UBC-Genen abgespalten hat.

Abb.4.3: Phylogenetischer Stammbaum für einige Mitglieder der UBC-Genfamilie und für *HGCI* homologe Gene.

Der Verwandtschaftsgrad ist graphisch durch eine horizontale Linie dargestellt. Die Wahrscheinlichkeit der richtigen Berechnung ist durch Zahlen (in Prozent) an den Verästelungen angegeben. Die Gruppe der *HGCI* homologen Gene ist rot hervorgehoben.

4.5 Die Auswirkungen der Deletion vom *Mrhgcl* durch homologe Rekombination

Mrhgcl ist ein Gen, dessen zwei Transkripte in embryonalen Stammzellen, in Geweben von Embryonen verschiedener pränataler Stadien (Abb. 3.6) und in allen Geweben von adulten Mäusen nachgewiesen werden konnten. Diese starke Präsenz von *Mrhgcl* ließ vermuten, daß die Ausschaltung des Gens durch homologe Rekombination zu eindeutigen funktionellen Störungen in den homozygoten $-/-$ Tieren führt. Die Zuordnung von *Mrhgcl* zu der Genfamilie der ‘ubiquitin conjugating enzymes’ (E2-Enzyme) bestärkte diese Vermutung. E2-Enzyme sind am Abbau regulatorische und abnormaler Proteine beteiligt und spielen somit bei der Kontrolle zahlreicher Prozesse (s. 4.4) eine Rolle.

Um *Mrhgcl* zu inaktivieren, wurde mittels homologer Rekombination die UBC-Domäne (Ubiquitin-Bindungsdomäne aller E2-Enzyme) des Gens in embryonalen Stammzellen deletiert. Die Stammzellen wurden anschließend zwecks Generierung von Chimären mit 2,5 Tage alten Mausembryonen aggregiert. Nur eine der vier erhaltenen männlichen Chimären transmittierte die Mutation durch die Keimbahn (3.4.4). Rückkreuzungen dieser Chimäre mit weiblichen Tieren des Ausgangsstammes CD1 führten zu heterozygoten Nachkommen (F1-Generation), welche durch Verpaarung untereinander homozygote $-/-$ Tiere (F2-Generation) hervorbrachten. Außer im Genotyp unterschieden sich die homozygoten $-/-$ Nachkommen nicht von den $+/-$ und $+/+$ Mäusen. Sie waren lebensfähig, zeigten keine Veränderungen in Körpergröße und –gewicht oder äußere Abnormalitäten. Auch im Paarungsverhalten sowie in der Zahl der Nachkommen wiesen $-/-$ Tiere keine Unterschiede zu Wildtyp-Tieren auf. Der Beweis, daß *Mrhgcl* auch wirklich inaktiviert war, wurde über Northern Blot Analysen an Gesamt-RNA aus testikulärem Gewebe von $+/+$, $+/-$ und $-/-$ Tieren gezeigt. Es konnten keine Transkripte von *Mrhgcl* in der RNA von homozygoten $-/-$ Tieren detektiert werden (Abb. 3.12).

Warum zeigen die homozygoten $-/-$ Tiere keinen Phänotyp? Betrachtet man den genetischen Hintergrund der Tiere, so muß berücksichtigt werden, daß es sich bei dem CD1-Ausgangsstamm um eine sogenannte ‘outcross’-Linie handelt, in der verschiedene

Mausstämme untereinander verpaart wurden. In solchen Mischlingsstämmen ist die Variabilität des genetischen Hintergrundes sehr groß. Die Funktion des inaktivierten Gens könnte durch ein anderes Gen ausgeglichen werden, die dann zu der funktionellen Wiederherstellung des inaktivierten Gens führt.

Die genetische Hintergrund ist in Inzuchtstämmen identisch. Nach etwa 20 Geschwisterverpaarungen besitzen alle Tiere des Stammes denselben genetischen Hintergrund. Bei dem Mausstamm 129/SvJ handelt es sich um eine solche Inzuchtlinie. Wurden nach Rückkreuzungen der Chimäre mit weiblichen Tieren des Ausgangsstammes 129/SvJ die heterozygoten Nachkommen der F1-Generation miteinander verpaart, so konnten in der F2-Generation homozygote $-/-$ Tiere erhalten werden. Dabei entspricht der Anteil der homozygoten $-/-$ Tiere (11 lebende und 4 tote Tiere = 13,8 %) bei einer Gesamtzahl von 109 Nachkommen nicht dem erwarteten Viertel nach den Mendelschen Regeln. Alle Tiere der F1- und der F2-Generation zeigten phänotypisch keine Auffälligkeiten (s. CD1-Hintergrund) und waren fertil. Wurden tragende Muttertiere am 18,5. Tag der Schwangerschaft getötet, die Embryonen präpariert und genotypisiert, so entsprach der Anteil der homozygoten $-/-$ Tiere den Erwartungen (s. Tab. 3.3 (b)). Es scheint, daß ein Teil der homozygoten $-/-$ Nachkommen nach der Geburt nicht so vital ist, wie die der heterozygoten $-/+$ oder Wildtyp $+/+$ -Tiere, und daher von dem Muttertier gefressen wird (Kanibalismus). Retransferversuche sollten klären, ob homozygote $-/-$ Tiere auf irgendeiner Stufe der pränatalen Entwicklung bzw. bei der Geburt einen Selektionsnachteil haben. Daher wurden Embryonen im Zweizellstadium nach Verpaarungen von heterozygoten Eltern in CD1-Ammentiere retransferiert. Drei von 32 Nachkommen waren homozygot für das mutante Allel (9,8 %). Anhand der Retransferversuche konnte die geringe Zahl der an homozygoten $-/-$ Tieren nicht geklärt werden, die außerdem keine äußeren Auffälligkeiten zeigen.

Warum zeigen die homozygoten $-/-$ Tiere sowohl auf dem CD1- Hintergrund wie auch auf dem 129/SvJ- Hintergrund keine Auffälligkeiten im Phänotyp? Unvollkommene Penetranz könnte ein Erklärung sein. In der Literatur sind mehrere Mausmodelle beschrieben, die Null-Mutationen tragen (z.B. für das IGF1- Gen (Liu et al., 1993), für TGF β 1 (Bonyadi et al., 1997) oder das Fibronectin Rezeptorgen (George et al., 1993)) und im Phänotyp unterschiedliche Penetranzen zeigen. Dabei spielt der genetische

Hintergrund eine große Rolle. Der Phänotyp einer Null-Mutante kann dabei auf dem einen Hintergrund völlig unauffällig erscheinen (0 % Penetranz) und auf dem anderen Hintergrund das Sterben der Embryonen verursachen (100 % Penetranz). Diese Situation ist etwa für das Protein p130 bekannt (LeCouter et al. 1998). Diese Penetranzunterschiede können durch modifizierende Gene hervorgerufen werden, die mit dem mutierten Gen, das auf einen anderen Locus lokalisiert ist, interagieren. Da Allele innerhalb der Mausstämme variieren, ist die Beeinflussung, die die modifizierenden Gene auf den mutierten Locus ausüben, in den verschiedenen Mauslinien unterschiedlich.

4.6 Analyse von *dmhgc1* und *cerhgc1*

4.6.1 Expression von *dmhgc1* in *Drosophila melanogaster*

Mit der Isolierung von *dmhgc1* aus einer *Drosophila* cDNA-Phagenbank konnte gezeigt werden, daß ein zu *HGCI* homologes Gene auch in *Drosophila* konserviert ist. Eine ‘whole mount’ *in situ* Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen sollte Informationen über das Expressionsmuster von *dmhgc1* in der Fruchtfliege geben. Dabei konnte zunächst das Vorhandensein maternaler RNA in frühen Embryonen nachgewiesen werden. Dieses Expressionsmuster tritt bei vielen Genen auf, z.B. *hunchback* (Tautz und Pfeifle 1989) oder *pum* (Schmucker, 1995). Nach weiteren Zellteilungen kann *dmhgc1* spezifisch im sich entwickelnden Nervensystem detektiert werden. In Embryonen späterer Stadien kann *dmhgc1* nur im Gehirn und in den Nervenzellen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man sagen, daß *dmhgc1* nur in Nervenzellen und nicht wie *HGCI* und *Mrhgc1* ubiquitär exprimiert wird. Daraus kann geschlossen werden, daß *dmhgc1* in *Drosophila* eine neuronale Funktion ausübt.

Das Gen *bendless* kodiert ebenfalls für ein E2-Enzym. Eine missense Mutation in der UBC-Domäne dieses Gens hat bei *Drosophila* Auswirkungen auf das sich entwickelnde Nervensystem. Da *bendless* zu der Genfamilie der E2-Enzyme zählt, könnte es eine Rolle bei der Regulierung von neuronalen Entwicklungsprozessen spielen (Muralidhar und Thomas, 1993, Oh et al., 1994).

4.6.2 Funktionelle Analysen und Expression von *cehgcl* in *Caenorhabditis elegans*

Mit Hilfe von RNAi Experimenten sollte die Funktion von *cehgcl*, dem zu *HGCI* homologen Gen, im Lebenszyklus von *C.elegans* analysiert werden. Die Inaktivierung des Gens führte in adulten Tieren zu phänotypischen Veränderungen. Der Wildtyp von *C. elegans* hat eine Lebensdauer von etwa drei Wochen und legt während dieser Zeit bis zu 300 Eiern. Die Tiere, in denen *cehgcl* inaktiviert wurde, zeigten Lähmungserscheinungen und starben nach drei bis vier Tagen. Die ersten Anzeichen von Paralyse wurden kurz nach dem Beginn der Eiablage beobachtet.

Um der Frage nachzugehen, in welchen Zellen *cehgcl* exprimiert wird, wurden transgene Tiere erzeugt (3.7.2). Eine Expression von *cehgcl* war schon in Embryonen während der Differenzierung (300 Zellstadium) zu erkennen. In adulten Tieren konnte *cehgcl* Expression in den Zellen der Hautmuskulatur, der Pharynxmuskulatur und der Muskulatur des Eiablageapparates sowie in wahrscheinlich allen Nervenzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.14).

Gerade die Expression von *cehgcl* in den Zellen der Muskulatur könnte eine Erklärung für den Phänotyp nach den RNAi Experimenten sein. Mit Beginn der Eiablage zeigen alle Muskelzellen des Hermaphroditen diese Lähmungserscheinungen. Durch Ausübung eines Reizes in Form von Berührung kann die Kontraktion der Muskelzellen noch weiterhin ausgelöst werden bis die Paralyse einsetzt. In der Literatur sind eine Vielzahl Mutanten von *C. elegans* beschrieben, die unkoordinierte Verhaltensmuster zeigen (*unc*-Mutanten). Einige dieser Mutanten z.B. *unc-2* (Schafer und Kenyon, 1995) oder

unc-36 zeichnen sich durch Lähmungserscheinungen aus. Durch *in situ* Hybridisierung und Mosaikanalyse konnte nachgewiesen werden, daß beide Gene Funktionen in Muskel- und Nervenzellen ausüben. Die Gene *unc-2* und *unc-36* kodieren Proteine für eine Untereinheit der Calciumkanäle. Ein Defekt bei der synaptischen Übertragung von Nerven auf Muskelzellen wird für die Lähmungserscheinungen verantwortlich gemacht.

Cerhgc1 wird ebenso in Muskel- und Nervenzellen exprimiert und weist neben der UBC-Domäne (4.4) ein Motif für eine EF-Hand, eine Calcium-bindende Domäne auf (Position 160- 172 der Proteinsequenz, s. Anhang Abb. 7.1). Da in beiden Zelltypen spannungsabhängige Calcium-Kanäle vorkommen, könnte auch *cerhgc1* für die ionenabhängige Reizleitung verantwortlich sein. Dabei kann nicht gesagt werden, ob die auftretenden Lähmungserscheinungen durch einen Defekt in der Reizleitung der Nerven, bei der synaptischen Übertragung oder in der Muskelkontraktion verursacht werden.

Die frühe Expression von *cerhgc1* während der Zelldifferenzierung und das Auftreten des Phänotyps in adulten Tieren (~ 2 Tage später) lassen vermuten, daß das Gen nicht bei der Basalentwicklung des neuromuskulären Systems gebraucht wird, sondern erst später seine Funktion ausübt. Das Tier hat, bevor die Kontraktionsstörungen der Muskel auftreten, die vier Larvenstadien durchlaufen, in denen keine Auffälligkeiten zu beobachten waren. Berücksichtigt man die Zuordnung von *cerhgc1* zu den 'ubiquitin conjugating enzymes', die bei dem ubiquitinabhängigen Abbau von Proteinen involviert sind (4.4), könnte *cerhgc1* bei der Eliminierung von nicht mehr benötigten Proteinen aus Nerven- und Muskelzellen von Bedeutung sein. Die Anreicherung von nicht abbaubaren Proteinen in den Zellen führt zu funktionellen Störungen in der Reizleitung, die einen Kontraktionsverlust aller Muskelzellen verursachen. Dies erklärt auch den erst im Hermaphroditen auftretenden Phänotyp.

Dieses Experiment weist dem tierischen Ubiquitin konjugierenden Enzym *cerhgc1* eine Funktion im Bereich der Aufrechterhaltung (Homöostase) der Funktion des neuromuskulären Apparates zu.

5 Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die 3'untranslatierte Region der cDNA des *HGCI*-Gens, das im Rahmen der Diplomarbeit teilweise isoliert und charakterisiert worden war, über MARATHON-PCR vervollständigt. Die fehlenden Sequenzen im 5'Bereich der cDNA von *HGCI* konnten wegen eines hohen GC-Gehalts in der 5'Region des Gens nicht identifiziert werden. Aus der bekannten Nukleotidsequenz von *HGCI* (3194 bp) kann ein offener Leserahmen von 445 AS abgeleitet werden und eine 3'untranslatierte Region von 1858 bp für *HGCI* bestimmt werden. Über Northern Blot Analysen mit Poly(A⁺) konnte außerdem zwei Transkripte von 2,4 kb (bekannt) und 4 kb nachgewiesen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von *HGCI* während der embryonalen und postnatalen Entwicklung der Maus zu analysieren. Dazu wurde das zu *HGCI* homologe Gen der Maus (*Mrhgc1*) aus einer genomischen Phagenbibliothek des Mausstammes 129/SvJ isoliert und charakterisiert. *Mrhgc1* erstreckt sich mit seinen 13 Exons über ca. 11 kb des Genoms der Maus. Die zusammengesetzte cDNA-Sequenz zeigt eine 95 %ige Homologie zu der Nukleotidsequenz von *HGCI*. Auf Proteinebene beträgt die Homologie 99 %. Mit Hilfe von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen konnte *Mrhgc1* auf dem Maus-Chromosom 3 in die Region F1 kartiert werden. Über Northern Blot Analysen konnte eine Expression von *Mrhgc1* schon in embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden.

Ableiche in der Datenbank ergaben, daß die abgeleitete Proteinsequenz von *Mrhgc1* und *HGCI* Homologien zu Mitgliedern der Genfamilie der 'ubiquitin conjugating enzymes' (E2-Enzyme) aufweist. Diese E2-Enzyme sind in den Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau von regulatorischen und abnormalen Proteinen involviert. Sie zeichnen sich durch eine sogenannte UBC-Domäne aus, eine konservierte Region, dessen aktives Zentrum Ubiquitin bindet. Die Homologien von *Mrhgc1* und *HGCI* zu den E2-Enzymen beschränken sich auf die UBC-Domäne.

Über Datenbankvergleiche konnte außerdem ein in *Caenorhabditis elegans* unbekanntes und zu *HGCI* homologes Gen ('F25H2.8') identifiziert werden, das 44 % Homologie zu *HGCI* zeigt. Über das Screening einer cDNA-Bibliothek von *Drosophila melanogaster*

konnte eine cDNA (*dmrhgc1*) isoliert werden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz eine 53 %ige Homologie zu der abgeleiteten Proteinsequenz von *HGCI* aufweist. Ein homologes Gen in *Saccharomyces cerevisiae* konnte nicht ermittelt werden. Daraus kann geschlossen werden, daß *HGCI* ein konserviertes Gen in vielzelligen Organismen (Metazoa) ist. Da sich die Homologie von *HGCI* zu den E2-Enzymen auf die UBC-Domäne beschränkt, kann davon ausgegangen werden, daß *HGCI* und dessen homologen Gene innerhalb der Genfamilie der 'ubiquitin conjugating enzymes' eine eigene Unterklasse bilden.

Die Inaktivierung von *Mrhgc1* mittels homologer Rekombination führte auf dem CD1-Hintergrund zu Null-Mutanten. Die homozygoten *-/-* Tiere zeigten in ihrem Phänotyp keine Auffälligkeiten in Bezug auf Körpergröße, - gewicht oder Verhalten und waren fertil. Auf dem 129/SvJ-Hintergrund war eine reduzierte Zahl an homozygoten *-/-* Tieren zu beobachten, die mit 13,8 % wesentlich unter dem zu erwarteten Viertel nach den Mendelschen Regeln liegt. Wurden tragende Muttertiere am 18,5. Tag der Schwangerschaft getötet, die Embryonen präpariert und genotypisiert, so konnte ein Anteil von 25 % an *-/-* Tieren unter den Embryonen bestimmt werden. Die homozygoten *-/-* Tiere zeigten keine Auffälligkeiten und waren fertil.

Wurde *cerhgc1* in *C. elegans* mittels RNAi inaktiviert, zeigten die *-/-* Tiere der F1-Generation bis zum Hermaphroditenstadium keine Auffälligkeiten. Mit Beginn der Eiablage kam es bei diesen Tieren zu Lähmungserscheinungen und zu frühzeitigem Tod (Paralyse). In transgenen Tiere konnte eine Expression von *cerhgc1* in den Nervenzellen und allen Muskelzellen, besonders im Pharynxmuskel, detektiert werden und zwar mit Beginn des 300 Zellstadiums der Embryonen.

Der in *C. elegans* auftretende Phänotyp (Lähmungserscheinungen) läßt sich durch eine Störung in der Reizleitung von Nervenzellen zu Muskelzellen erklären. *Unc-2*-Mutanten, die einen Defekt in einer Untereinheit von Calciumkanälen haben, zeigen ebenfalls derartige Lähmungserscheinungen.

Über 'whole mount' *in situ* Hybridisierungen an *Drosophila* Embryonen konnte eine Expression von *dmrhgc1* im sich entwickelnden Nervensystem und in Embryonen später Stadien (Stadium 17) in Gehirn und Nervensystem nachgewiesen werden.

6 Literaturverzeichnis

ADAMS, M.D., CELNIKER, S.E., HOLT, R.A., EVANS, C.A., GOCAYNE, J.D., AMANATIDES, P.G., SCHERER, S.E., LI, P.W., HOSKINS, R.A., GALLE, R.F., GEORGE, R.A., LEWIS, S.E., RICHARDS, S., ASHBURNER, M., HENDERSON, S.N., SUTTON, G.G., WORTMAN, J.R., YANDELL, M.D., ZHANG, Q., CHEN, L.X., BRANDON, R.C., ROGERS, Y.H., BLAZEJ, R.G., CHAMPE, M., PFEIFFER, B.D., WAN, K.H., DOYLE, C., BAXTER, E.G., HELT, G., NELSON, C.R., GABOR MIKLOS, G.L., ABRIL, J.F., AGBAYANI, A., AN, H.J., ANDREWS-PFANNKOCH, C., BALDWIN, D., BALLEW, R.M., BASU, A., BAXENDALE, J., BAYRAKTAROGLU, L., BEASLEY, E.M., BEESON, K.Y., BENOS, P.V., BERMAN, B.P., BHANDARI, D., BOLSHAKOV, S., BORKOVA, D., BOTCHAN, M.R., BOUCK, J., BROKSTEIN, P., BROTTIER, P., BURTIS, K. C., BUSAM, D.A., BUTLER, H., CADIEU, E., CENTER, A., CHANDRA, I., CHERRY, J.M., CAWLEY, S., DAHLKE, C., DAVENPORT, L.B., DAVIES, P., DE PABLOS, B., DELCHER, A., DENG, Z., MAYS, A.D., DEW, I., DIETZ, S.M., DODSON, K., DOUP, L.E., DOWNES, M., DUGAN-ROCHA, S., DUNKOV, B.C., DUNN, P., DURBIN, K.J., EVANGELISTA, C.C., FERRAZ, C., FERRIERA, S., FLEISCHMANN, W., FOSLER, C., GABRIELIAN, A.E., GARG, N.S., GELBART, W.M., GLASSER, K., GLODEK, A., GONG, F., GORRELL, J.H., GU, Z., GUAN, P., HARRIS, M., HARRIS, N.L., HARVEY, D., HEIMAN, T.J., HERNANDEZ, J.R., HOUCK, J., HOSTIN, D., HOUSTON, K.A., HOWLAND, T.J., WEI, M.H., IBEGWAM, C., JALALI, M., KALUSH, F., KARPEN, G.H., KE, Z., KENNISON, J.A., KETCHUM, K.A., KIMMEL, B.E., KODIRA, C.D., KRAFT, C., KRAVITZ, S., KULP, D., LAI, Z., LASKO, P., LEI, Y., LEVITSKY, A.A., LI, J., LI, Z., LIANG, Y., LIN, X., LIU, X., MATTEI, B., MCINTOSH, T.C., MCLEOD, M.P., MCPHERSON, D., MERKULOV, G., MILSHINA, N.V., MOBARRY, C., MORRIS, J., MOSHREFI, A., MOUNT, S.M., MOY, M., MURPHY, B., MURPHY, L., MUZNY, D.M., NELSON, D.L., NELSON, D.R., NELSON, K.A., NIXON, K., NUSSKERN, D.R., PACLEB, J.M., PALAZZOLO, M., PITTMAN, G.S., PAN, S., POLLARD, J., PURI, V., REESE, M.G., REINERT, K., REMINGTON, K., SAUNDERS, R.D., SCHEELER, F., SHEN, H., SHUE, B.C., SIDEN-KIAMOS, I., SIMPSON, M., SKUPSKI, M.P., SMITH, T., SPIER, E., SPRADLING, A.C., STAPLETON, M., STRONG, R., SUN, E., SVIRSKAS, R., TECTOR, C., TURNER, R., VENTER, E., WANG, A.H., WANG, X., WANG, Z.Y., WASSARMAN, D.A., WEINSTOCK, G.M., WEISSENBACH, J., WILLIAMS, S.M., WOODAGE, T., WORLEY, K.C., WU, D., YANG, S., YAO, Q.A., YE, J., YEH, R.F., ZAVERI, J.S., ZHAN, M., ZHANG, G., ZHAO, Q., ZHENG L., ZHENG, X.H., ZHONG, F.N., ZHONG, W., ZHOU, X., ZHU, S., ZHU, X., SMITH, H.O., GIBBS, R.A., MYERS, E.W., RUBIN, G.M., VENTER, J.C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.

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

ALTMANN, M. (1994). Isolierung und Charakterisierung eines Gens, welches beim Menschen in der Chromosomenregion 1q21-q23 kartiert ist. *Diplomarbeit*: Institut für Humangenetik der Universität Göttingen.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. und LIPMAN, D.S. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

ARISTARKHOV, A., EYTAN, E., MOGHE, A., ADMON, A., HERSHKO, A. und RUDERMAN, J.V. (1996). E2-C, a cyclin-selective ubiquitin carrier protein required for the destruction of mitotic cyclins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4294-4299

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

BENTON, W.D. und DAVIS, R.W. (1977). Screening gt recombinant clones by hybridisation to single plaques *in situ*. *Science* **196**: 180-182.

BIRNBOIM, F. und DOLLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1512-1523.

BOLIVAR, F. und BECKMANN, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.* **68**: 245-260.

BONYADI, M., RUSHOLME, S.A., COUSINS, F.M., SU, H.C., BIRON, C.A., FARRALL, M. und AKHURST, R.J. (1997). Mapping of a major genetic modifier of embryonic lethality in TGF beta 1 knockout mice. *Nature Genet.* **15**: 207-211.

BREATHNACH, R., und CHAMBON, P. (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**:349-383.

BRADLEY, A., EVANS, M.J., KAUFMAN, M.H. und ROBERTSON, E. (1984). Formation of germline chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**: 255-256.

BULLOCK, W.O., FERNANDEZ, J.M. und SHORT, J.M. (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechnics* **5**: 376-378.

CIECHANOVER, A., FINLEY, D. und VARSHAVSKY, A. (1994). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**: 57-66.

CIECHANOVER, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**: 13-21.

CHOMCZYNSKY, P. und SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

DOETSCHMAN, T., GREGG, R.G. MAEDA, N., HOOPER, M.L., MELTON, D.W., TOMPSON, S. und SMITHIES, O. (1987). Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**: 576-578.

EVANS, M.J. und KAUFMAN, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**: 154-156.

FEINBERG, A.P. und VOGELSTEIN, B. (1984). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments of high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.

- FIRE, A., ALBERTSON, D., HARRISON, S.W. und MOERMAN, D.G. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* **113**: 503-514.
- FIRE, A., XU, SIQUN., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E. und MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- FRISCHAUF, A.M., LEHRACH, H., POUSTKA, A. und MURRAY, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842.
- GEORGE, E.L., GEORGES-LABOUESSE, E.N., PATEL-KING, R.S., RAYBURN, H. und HYNES, R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **119**: 1079-1091.
- GIOVANNA, P., JARDINE, K. und McBURNEY, M.W. (1991). Multiple CArG boxes in the human cardiac actin gene promotor required for expression in embryonic cardiac muscle cells developing *in vitro* from embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4769-4803.
- GLOTZER, M., MURRAY, A.W. UND KIRSCHNER, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138.
- GOEBL, M.G., YOCHEM, J., JENTSCH, S., MCGRATH J.P., VARSHAVSKY, A. und BYERS, B. (1988). The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Science* **241**: 1331-1335.
- GOFFEAU, A., BARRELL, B.G., DAVIS, R.W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J.D., JACP, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E.J., MEWES, H.W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H. und OLIVER, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-567.

GOSSLER, A., DOETSCHMAN, T., KORN, R., SERFLING, E. und KEMLER, R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9065-9069.

GUBLER, U. und HOFFMAN, B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating complimentary DNA libraries. *Gene* **25**: 263-269.

GUO, S. und KEMPHUES, K.J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**: 611-620.

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

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

HERSHKO, A. und CIECHANVER, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425-479.

HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F. und LACY, E. (1994). Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

ITO, K., KATO, S., MATSUDA, Y., KIMURA, M. und OKANO, Y. (1999). cDNA cloning, characterization, and chromosome mapping of UBE2E3 (alias UbCH9), encoding an N-terminally extended human ubiquitin-conjugating enzyme. *Cytogenet. Cell Genet.* **84**: 99-104

JENTSCH, S., MCGRATH, J.P. und VARSHAVSKY, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**: 131-134.

JENTSCH, S., SEUFERT, W. und HAUSER, H.-P. (1991). Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta* **1098**: 127-139.

JENTSCH, S. (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 179-207.

KAISER, P., SEUFERT, W., HOFFERER, L., KOFLER, B., SACHSENMAIER, C., HERZOG, H., JENTSCH, S., SCHWEIGER, M. und SCHNEIDER, R. (1994). A human ubiquitin-conjugating enzyme homologous to yeast UBC8. *J. Biol. Chem.* **269**: 8797-8802

KIMURA, M., HATTORI, T., MATSUDA, Y., YOSHIOKA, T., SUMI, N., UMEDA, Y., NAKASHIMA, S. und OKANO, Y. (1997). cDNA cloning, characterization, and chromosome mapping of UBE2E2 encoding a human ubiquitin-conjugating E2 enzyme. *Cytogenet Cell Genet.* **78**: 107-111.

KOEHLER, M.R. , BOSSERHOFF, A.-K., VON BEUST, G., BAUER, A., BLESCH, A., BUETTNER, R., SCHLEGEL, J., BOGDAHN, U. und SCHMID, M. (1996). Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-33 by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genomics* **35**: 265-267.

KOGAN, S.C., DOHERTY, M. und GITSCHIER, J. (1987). An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *New England J. Med.* **317**: 985-990.

KORNITZER, D., RABOY, B., KULKA, R.G. und FINK, G.R. (1994). Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *EMBO J.* **13**: 6021-6030.

KRAMER, J.M., FRENCH, R.P., PARK, E.C. und JOHNSON, J.J. (1990). The *Caenorhabditis elegans* rol-6 gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2081-2089.

LAIRD, P.W., ZIJDERWALD, A., LINDERS, K., RUDNICKI, M.A., JAENISCH, R. und BERNS, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucl. Acids Res.* **19**: 4293.

LAMBALLE, F., KLEIN, R. und BARBACID, M. (1991). *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**: 967-979.

LECOUTER, J.E., KABLAR, B., WHYTE, P.F., YING, C. und RUDNICKI, M.A. (1998). Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene. *Development* **125**: 4669-4679

LIU, J.P., BAKER, J., PERKINS, A.S., ROBERTSON, E.J. und EFSTRATIADIS, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* **75**: 59-72

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

MATUSCHEWSKI, K., HAUSER, H.P., TREIER, M. und JENTSCH, S. (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J. Biol. Chem.* **271**: 2789-2794.

Mouse Genome Database (MGD), Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, World Wide Web (URL: <http://www.informatics.jax.org/>).

MELLO, C.C., KRAMER, J.M., STINCHCOMB, D. und AMBROS, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**: 3959-3970

- MELLO, C. und FIRE, A. (1995). DNA Transformation. In: *Caenorhabditis elegans*. Modern Biological Analysis of an Organism. EPSTEIN, H.F. und SHAKES, D.C. Ed. *Methods in Cell Biology* **48**: 451-492, Academic Press.
- MELTON, D.W. (1994). Gene targeting in the mouse. *Bioessays* **16**: 633-638.
- MURALIDHAR, M.G. und THOMAS, J.B. (1993). The Drosophila bendless gene encodes a neural protein related to ubiquitin-conjugating enzymes. *Neuron* **11**: 253-266.
- MURRAY, N.E., BRAMMER, W.J. und MURRAY, K. (1977). Lambiod phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **150**: 53-60.
- NAGY, A., ROSSANT, J., NAGY, R., ABRAMOW-NEWERLY, W. und RODER, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 8424-8428.
- NORANDER, J., KEMPE, T. und MESSING, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**: 101-106.
- NUBER, U., SCHWARZ, S., KAISER, P., SCHNEIDER, R. und SCHEFFNER, M (1996). Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5. *J. Biol. Chem.* **271**: 2795-2800.
- OH, C.E., MCMAHON, R., BENZER, S. und TANOUYE, M.A. (1994). bendless, a Drosophila gene affecting neuronal connectivity, encodes a ubiquitin-conjugating enzyme homolog. *J. Neurosci.* **14**: 3166-3179
- OZKAYNAK, E., FINLEY, D. und VARSHAVSKY, A. (1984). The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature* **312**: 663-666.

PAGANO, M. (1997). Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB J.* **13**: 1067-1075.

PALOMBELLA, V.J., RANDO, O.J., GOLDBERG, A.L. und MANIATIS, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**: 773-785.

PINKEL, D., STRAUME, T. und GRAY, J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridisation. *Proc. Acad. Sci.* **83**: 2934-2938.

RAPP, G., KLAUDINY, J., HAGENDORFF, G., LUCK, M.R. und SCHEIT, K.H. (1989). Complete sequences of the coding region of human elongation factor 2 (EF-2) by enzymatic amplification of cDNA from human ovarian granulosa cells. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**: 1071-1075.

RIDDLE, D.L., BLUMENTHAL, T., MEYER, B.J. und PRIESS, J.R. (1997). *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

ROBERTSON, E., BRADLEY, A., KUEHN, M. und EVANS, M. (1986). Germ-line transmission of gene introduced cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* **323**: 445-448.

RUBIN, G.M., YANDELL, M.D., WORTMAN, J.R., GABOR MIKLOS, G.L., NELSON, C.R., HARIHARAN, I.K., FORTINI, M.E., LI, P.W., APWEILER, R., FLEISCHMANN, W., CHERRY, J.M., HENIKOFF, S., SKUPSKI, M.P., MISRA, S., ASHBURNER, M., BIRNEY, E., BOGUSKI, M.S., BRODY, T., BROKSTEIN, P., CELNIKER, S.E., CHERVITZ, S.A., COATES, D., CRAVCHIK, A., GABRIELIAN, A., GALLE, R.F., GELBART, W.M., GEORGE, R.A., GOLDSTEIN, L.S., GONG, F., GUAN, P., HARRIS, N.L., HAY, B.A., HOSKINS, R.A., LI, J., LI, Z., HYNES, R.O., JONES, S.J., KUEHL, P.M., LEMAITRE, B., LITTLETON, J.T., MORRISON, D.K., MUNGALL, C., O'FARRELL, P.H., PICKERAL, O.K., SHUE, C., VOSSHALL, L.B.,

ZHANG, J., ZHAO, Q., ZHENG, X.H., ZHONG, F., ZHONG, W., GIBBS, R., VENTER, J.C., ADAMS, M.D. und LEWIS, S. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**: 2204-2215.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOON, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., EHRLICH, H.A. und ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. und MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2. Auflage. Cold Spring Harbor, New York.

SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSEN, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.

SCHAFFER, W.R. und KENYON, C.J. (1995). A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **375**: 73-78.

SCHEFFNER, M., WERNES, B.A., HUIBREGTSE, J.M., LEVINE, A.J. und HOWLEY, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136.

SCHEFFNER, M., HUIBREGTSE, J.M. und HOWLEY, P.M. (1994). Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8797-8801.

SCHMUCKER, D. (1995). Entwicklung des larvalen visuellen Systems von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Dissertation*: Ludwig-Maximilian-Universität, München.

SCHWEIZER, D. (1986). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58**: 307-324.

SEUFERT, W. und JENTSCH, S. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* **9**: 543-550.

SHANKLIN, J., JABBEN, M. und VIERSTRA, R. (1987). Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: identification of possible intermediates of phytochrome degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 359-363.

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

STRYER, L. (1988). Biochemistry. 3. Auflage W.H. Freeman and Company, New York.

SUDAKIN, V., GANOTH, D., DAHAN, A., HELLER, H., HERSHKO, J., LUCA, F.C., RUDERMAN, J.V. und HERSHKO, A (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **6**: 185-198.

TAUTZ, D. und PFEIFLE, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridisation method for the localisation of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* **98**: 81-85.

THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.

THOMAS, K.R. und CAPPECHI, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**: 503-512.

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.

VOSS, A.K., THOMAS, T. und GRUSS, P. (1997). Germ line chimeras from female ES Cells. *Exp. Cell Res.* **230**: 45-49.

WILKINSON-SPROAT, J. und WOHLDMAN, P. (1994). 2,2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* **368**: 32-38.

7 Anhang

Abb. 7.1

```

1          M A C L R K L K E D I Q
          GGTAGCGAAAATCAGAAGAGG ATG GCG TGT CTT CGA AAA CTA AAA GAA GAC ATT CAG

V L E K L F P K N H N R F Q I L S A S V
58  GTT CTG GAA AAA CTA TTT CCG AAA AAT CAC AAT CGC TTT CAG ATA CTG TCT GCC TCG GTT

D E L S M K F I N A E N K G I I V T A N
118  GAT GAG CTA TCG ATG AAA TTC ATT AAT GCT GAA AAC AAG GGA ATT ATT GTG ACA GCT AAC

I Q E N Y P R Q P P I W F S E S D D V P
178  ATT CAA GAG AAT TAT CCA CGT CAA CCG CCA ATC TGG TTT TCC GAA TCT GAT GAC GTT CCA

V I G M S L Q R L T E T E E S T N I L H
238  GTC ATC GGA ATG TCT CTT CAA CGG CTC ACC GAA ACT GAA GAG TCG ACG AAC ATT TTG CAC

Q V H R L V S D L C S F Y N L Q M P C E
298  CAA GTT CAT CGA TTG GTA TCC GAT CTC TGC TCT TTC TAC AAC CTC CAA ATG CCA TGT GAA

L P Q I A P P V R D D I D E G R G S D I
358  TTA CCT CAA ATT GCT CCA CCT GTC AGG GAT GAT ATC GAT GAA GGT CGT GGA AGT GAT ATT

S D T T S E P I D D D M A G D G E V D D
418  AGT GAT ACC ACA TCT GAG CCA ATC GAC GAC GAC ATG GCT GGA GAT GGA GAA GTT GAC GAT

D D E E E E D D E D A D G D I E I V E M
478  GAT GAT GAA GAG GAA GAA GAC GAT GAA GAT GCG GAC GGT GAC ATC GAA ATA GTA GAG ATG

A E E D P T S Q H D V G V S K E G L D M
538  GCT GAA GAA GAT CCA ACA TCT CAA CAC GAT GTT GGA GTT TCG AAA GAA GGT CTC GAT ATG

L D K A S K I N R Q Q H L D G K V Q G S
598  CTC GAC AAA GCT TCA AAA ATT AAT AGA CAG CAG CAT TTG GAT GGG AAA GTT CAA GGT TCA

I T A S D R L M K E I R D I H R S E H F
658  ATC ACA GCT TCA GAT CGT TTG ATG AAA GAG ATT CGC GAT ATT CAC CGA AGT GAG CAC TTT

K N G I Y T F E L E K E E N L Y Q W W I
718  AAA AAT GGA ATT TAT ACG TTT GAA CTG GAA AAG GAA GAG AAT TTA TAT CAA TGG TGG ATC

K L H K V D E D S P L F E D M K K L K K
778  AAG TTG CAC AAA GTT GAT GAG GAT TCA CCA TTG TTC GAA GAC ATG AAA AAG TTG AAG AAG

D H N Q D H L L F S F T F N E K F P C D
838  GAT CAT AAC QAG GAT CAT TTG TTG TTC AGC TTC ACG TTC AAT GAG AAG TTC CCT TGT GAT

P P F V R V V A P H I N Q G F V L G G G
898  CCA CCG TTC GTC AGA GTT GTT GCT CCA CAT ATC AAT CAA GGA TTC GTA TTG GGT GGC GGC

A I C M E L L T K Q G W S S A Y S I E S
958  GCA ATA TGC ATG GAA CTT CTA ACA AAA CAA GGA TGG TCA TCA GCT TAC TCT ATT GAG AGT

```

```

C I L Q I A A T L V K G R A R I S F D A
1018 TGC ATT CTT CAA ATT GCT GCT ACC TTG GTA AAA GGC CGT GCT CGA ATT TCG TTT GAC GCA
K H T S T Y S M A R A Q Q S F K S L Q Q
1078 AAG CAC ACA TCG ACG TAT TCA ATG GCT CGT GCT CAG CAA TCA TTC AAG TCC CTC CAG CAA

I H A K S G W Y T P P K T E G *
1138 ATT CAT GCG AAA TCT GGA TGG TAC ACA CCT CCA AAA ACA GAA GGA TAA CTCCCAATTCAAAGA
1201 TCTTCATGTCATCCAGTACTTTTTTATGTTCCACACCCCTCCTCTCACTTTTTTCGCTCTCCACTTGGTATTTTTTCTTCA
1280 CAGTGACGATTTTTTTTTCAATGGTTTTTAAAATCGGAAACGTTACCTTTTTCAAAC TTCATCCCGGGGTACATC
1359 TCTTCTCGTTTTATATTCATTTTCTAGACATTTACATCATCCATTCTTCACCCGCTTCCTCATCCCTCAACTACAAC
1438 CACCCCCATCCCCTTCCAATTAATACCTCCATTCTTAAATAGAACTAAACATGTGTAATCATCTGAAATTTTCGAGTT
1517 TCACGCGATGGAGTGTTCACAAACCAACATGTTCCAAGAAACGAACGCATTCCCTCATTTTCGTTTTTTGTATAGTT
1596 TTTAGCTTCCTTTCTCCTATACCAAAAACGTCCAGACGCTGAACTAAGACCCTCGTAATCTTTTTTTACAATGTAA
1675 ACCTCATTTTTGGTCTTCCTCAGCATGTATATTTCTGAAAATGAAGTGTCTGTTCCTATGAACATGTGTGGG

```

Abb. 7.1: Darstellung der isolierten und sequenzierten cDNA von *cerhgcl* (3'UTR und 5'UTR der cDNA-Sequenz sind unvollständig). Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der cDNA-Sequenz angegeben. Das aktive Zentrum der UBC-Domäne ist unterstrichen.

Abb. 7.2

```

L E K I F P K N H E R F Q I L N S S V D
1 ...CTA GAG AAG ATC TTC CCG AAG AAC CAC GAG CGC TTT CAG ATC CTC AAT TCC AGC GTC GAC

E L L C R F I D K N G K R Y D I H A N I
61 GAA CTG CTC TGC CGT TTT ATC GAT AAG AAT GGA AAG CGG TAC GAT ATT CAC GCC AAC ATA

T E T Y P S S P P V W F A E S E E T S V
121 ACG GAA ACG TAT CCC TCA TCG CCG CCA GTT TGG TTC GCC GAA AGC GAG GAG ACG AGC GTC

T N A V Q I L S N T N G R D N H V I N Q
181 ACA AAT GCT GTT CAA ATA CTT AGC AAT ACG AAT GGA CGT GAT AAT CAC GTG ATC AAT CAG

V G I L L R E L C R L H N V P L P P D I
241 GTG GGC ATA CTG CTG CGT GAG CTC TGC CGC CTT CAC AAC GTT CCA CTG CCA CCC GAC ATC

D N L A L P L Q T P P P S A S P L R C E
301 GAT AAT TTG GCT CTG CCG CTG CAA ACG CCG CCG CCA TCC GCT TCC CCC CTT CGC TGC GAG

Q R P G G G A G G G G P H G N E E T
361 CAG AGA CCA GGT GGT GGT GGA GCG GGG GGC GGT GGC GGA CCC CAC GGC AAC GAG GAG ACC

D S D Q E E I E D P I G E S E Q E S E G
421 GAT TCG GAT CAG GAG GAG ATC GAG GAT CCC ATC GGC GAG AGC GAA CAG GAG AGC GAG GGC

D E D L P L E M D D V R S T S K K D D M
481 GAT GAG GAC TTG CCG CTG GAA ATG GAT GAT GTA CGC AGT ACA AGC AAG AAG GAC GAC ATG

E V E H L A T L E K L R Q S Q R Q D Y L
541 GAA GTG GAA CAC CTA GCG ACT CTA GAA AAA CTG CGT CAA AGT CAG AGA CAA GAC TAT CTA

K G S V S G S V Q A T D R L M K E L R D
601 AAA GGT TCC GTT TCG GGT TCC GTG CAG GCA ACC GAT CGC TTA ATG AAG GAA TTA CGC GAC

I Y R S D A F K K N M Y S I E L V N E S
661 ATT TAT CGC TCA GAC GCC TTC AAG AAG AAC ATG TAT TCT ATT GAG CTC GTC AAT GAG TCG

```

```

721      I   Y   E   W   N   I   R   L   K   S   V   D   P   D   S   P   L   H   S   D
      ATT TAC GAA TGG AAC ATT CGC CTC AAG TCT GTC GAC CCG GAC AGT CCG CTG CAC AGT GAT

781      L   Q   M   L   K   E   K   E   G   K   D   S   I   L   L   N   I   L   F   K
      CTG CAA ATG CTC AAG GAG AAG GAG GGC AAG GAC AGC ATA CTG CTC AAC ATC CTG TTC AAG

841      E   T   Y   P   F   E   P   P   F   V   R   V   V   H   P   I   I   S   G   G
      GAG ACG TAT CCC TTC GAG CCG CCA TTT GTG CGC GTT GTC CAT CCG ATT ATC TCA GGC GGC

901      Y   V   L   I   G   G   A   I   C   M   E   L   L   T   K   Q   G   W   S   S
      TAT GTG CTC ATC GGT GGT GCC ATC TGC ATG GAA TTG CTG ACC AAA CAG GGC TGG AGC TCG

961      A   Y   T   V   E   A   V   I   M   Q   I   A   A   T   L   V   K   G   K   A
      GCA TAT ACC GTG GAA GCG GTT ATC ATG CAA ATT GCA GCC ACT CTC GTC AAG GGA AAG GCG

1021     R   I   Q   F   G   A   T   K   A   L   T   Q   G   Q   Y   S   L   A   R   A
      CGC ATC CAA TTC GGG GCT ACC AAA GCA CTG ACC CAG GGC CAA TAC AGT TTG GCT CGA GCC

1081     Q   Q   S   F   K   S   L   V   Q   I   H   E   E   N   G   W   F   T   P   P
      CAG CAG AGC TTC AAA TCT CTG GTG CAG ATT CAC GAA GAG AAT GGA TGG TTC ACC CCG CCC

1141     K   E   D   G   *
      AAG GAA GAT GGC TAA AACAAGAGAGTCCACTGATGCACATCCTTCCTAGAGTAACGCATGCCAGCCTACACCAATC
1216     AACACCCTCCTCACACCGCCAAAATTAGCCTGTCCACATCCGCCAAGCACACATCCCGCACTCACTGCCGGCTTGATCTG
1296     ATATGTCTGATGTCTGATCTGGTCAGGACCAATATGGACGAAGCGCCCATTTTTAAGAAGATGGCCACACAATTACATTG
1376     CTTGCTGCGTCGATGTATGTTAATTGCTCCGTTGCATTTCATATGTATGTAAATGCCCACTCGTCTTTTCTGTAGTGCGT
1456     AGTGGCCTGAAGCCGTGTAATCTGTACAGAGTCTTGAAACTGGAGCTGCATATATTGGTGTAAGTGTCAAAAAAAAAA
1536     AAAATGAGCAGCCGAAGAGTGTAAAATGTCTATGTCTATATCTGTTATGTATATGAGTATACTTTTAAATTTAAATTGTAAA
1616     TGTAGTGGCTTTGAACCTTGAAAAACAGCAACCACAATCCCCATACACTTTACACACACCCTAAATTGTAAATTAGTTAAG
1696     TCAAAATGTATTCTTATTTAAGTTTAAACAAATCCGTGGTAGTCTTATATTTTTCC...

```

Abb. 7.2: Darstellung der isolierten und sequenzierten cDNA von *dmrhgc1* (der 5' Bereich und Teile des 3' untranslatierten Bereiches der cDNA-Sequenz fehlen). Der offene Leserahmen dieser Sequenz umfaßt 1155 Nucleotide und wird durch das Stop-Kodon TAA (*) terminiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der cDNA-Sequenz angegeben. Das aktive Zentrum der UBC-Domäne ist unterstrichen.

Primersequenzen:

PE1A: 5'>CTG GCC TGC CAA GCT ACA ATG TGG TAG<3'

MA6A: 5'>GTA CGA GTC CAC TGT TGC TTT GGT AGA G<3'

AP1: 5'>CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC<3'

AP2: 5'>ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC<3'

GM7F 5'>TGA TAA GTG AAG ATA ACG ATA GAA G <3'

GM8R: 5'>TGG CTT GGC GGC TTG CTG AG<3'

PGK3: 5'>GGA TGT GGA ATG TGT GCG AGG<3'

CE3F: 5'>GTC GAT TTT CCT GGG CTC GAG ATC<3'

CE4R: 5'>TGC ACT GCA GTC CTT CTG TTT TTG GAG GTG TGT<3'

Publikationen

KOHLHASE, J., ALTMANN, M., ARCHANGELO, L., DIXKENS, CH. und ENGEL, W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping and expression analysis of *Msal-2*. *Mammalian Genome* **11**: 64-68.

KOHLHASE, J., HAUSMANN, S., STOJMENOVIC, G., DIXKENS, CH., BINK, K., SCHULZ-SCHÄFER, W., ALTMANN, M. und ENGEL, W. (1999). *SALL3*, a new member of the human *spalt*-like gene family, maps to 18q23. *Genomics* **62**: 216-222.

Danksagung

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. W. Engel für die Überlassung des Themas, seine intensive wissenschaftliche Betreuung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und die zügige Durchsicht dieser Arbeit, sowie seine großzügige finanzielle Unterstützung beim Besuch wissenschaftlicher Tagungen.
- Dr. Ibrahim Adham für seine Betreuung und die Hilfestellung bei der Klärung fachlicher Fragen.
- Dr. Ulrike Engel für tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung abschließender Versuche.
- Dr. Jürgen Kohlhase für seine ideelle Unterstützung und konstruktiven Anregungen.
- Dr. Ekkehard Schulze für die Zusammenarbeit und die Durchführung entscheidender Experimente in *C. elegans*, die diese Arbeit abgerundet haben.
- allen Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik für ein tolles Arbeitsklima und anregenden Diskussionen.
- meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Begleitung mit der sie direkt oder indirekt zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Maria-Elisabeth Altmann
10.06.1964 in Lingen/Ems
als Tochter von Josef und Mathilde Altmann

Ausbildung:

1970 - 1974	Grundschule in Wettrup bei Lingen
1974 - 1981	Franziskusgymnasium Lingen (Thuine)
1981 - 1985	Gymnasium Leoninum Handrup
Juli 1985 - Juni 1987	Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin an der Bernd-Blindow-Schule in Osnabrück
Oktober 1987	Beginn des Studiums der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen
Oktober 1989	Diplomvorprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
Juni 1992	Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Humangenetik und Organische Chemie
August 1992	Beginn der experimentellen Arbeiten zur Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Göttingen (Leiter: Prof. Dr. W. Engel)
Thema der Diplomarbeit:	‘Isolierung und Charakterisierung eines Gens, welches beim Menschen in der Chromosomenregion 1q21-q23 kartiert ist’
Mai 1994	Abschluß des Studiums der Biologie mit dem Diplom
Juni 1994 - Juni 1999	Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für Humangenetik der Universität Göttingen bei Prof. Dr. W. Engel
Juli 1999 - Februar 2000	Fortbildung ‘Innovative Labormethoden und Marketinggrundlagen’ an der IBA-Akademie, Institut für Bioanalytik in Göttingen