

**„Ansatz zur Etablierung von konditional/reversiblen *knock-out* Mäusen für
das zellspezifische T-Zell Onkogen SCL“**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Marko Helmut Maringer
Geboren am 04.03.1971 in Cochem/Mosel
Mainz, 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
1. Einleitung	10
1.1 Genetisch veränderte Mäuse in der biomedizinischen Forschung	10
1.2 Das Stem Cell Leukemia Gen (SCL)	16
1.3 Ansatz zur Etablierung eines konditional reversiblen SCL knock-out Modells	17
1.4 Benötigte Mauslinien zur Herstellung des SCL knock-out Mausmodells	19
1.5 Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Chemikalien	24
2.1.2 Radiochemikalien	28
2.1.3 Verbrauchsmaterial	28
2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien	29
2.1.5 Bakterienmedien	31
2.1.6 Zellkulturmedien	32
2.1.7 Kits	32
2.1.8 Geräte	33
2.1.9 Software	36
2.1.10 Enzyme	37
2.1.10.1 Restriktionsendonukleasen	37
2.1.10.2 DNA modifizierende Enzyme	37
2.1.11 Oligonukleotide (Primer)	38
2.1.11.1 Sequenzierprimer für Targetingkonstrukte und transgenes Konstrukt	38
2.1.11.2 PCR-Primer für die Genotypisierung von Tieren	39
2.1.11.3 RT-PCR Primer	39
2.1.11.4 Mutagenese Primer und PCR Primer für Klonierungen	40
2.1.11.5 Long Template PCR Primer	40
2.1.12 Vektoren	41
2.1.12.1 Klonierungsvektoren	41
2.1.12.2 Säuger-Expressionsvektoren	41
2.1.13 Molekulargewichtsmarker	41
2.1.14 Bakterienstämme	42
2.1.15 Zelllinien	42
2.1.16 Tiere	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	43
2.2.1.1 Präparation aus 3 ml Kulturen („Mini-Prep“)	43
2.2.1.2 Präparation aus 30 ml/400 ml Kulturen („Midi-Prep“/„Maxi-Prep“)	43
2.2.2 Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion	44
2.2.3 Fällern von DNA	44

2.2.4 Isolation genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien	45
2.2.5 Isolation genomischer DNA aus Zellkulturen muriner embryonaler Fibroblasten	45
2.2.6 Isolation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)	45
2.2.7 Isolation von RNA aus murinen Geweben	46
2.2.8 Isolation von RNA aus murinen embryonalen Fibroblasten und NIH3T3-Zellen	46
2.2.9 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration	47
2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	47
2.2.11 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	48
2.2.12 DNA-Sequenzierung	48
2.2.13 DNA-Agarosegelelektrophorese	49
2.2.14 Präparative Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	49
2.2.15 Restriktionsverdau von DNA	49
2.2.15.1 Analytischer Verdau	49
2.2.15.2 Präparativer Verdau	50
2.2.16 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	50
2.2.17 Entfernen von DNA 3'-Überhängen	51
2.2.18 Ligation von DNA	51
2.2.19 Herstellung kompetenter Bakterien	51
2.2.20 Transformation	52
2.2.21 TOPO TA Cloning	53
2.2.22 Site-directed Mutagenese	53
2.2.23 Hybridisierungstechniken	53
2.2.23.1 Oligonukleotid-labelling	53
2.2.23.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten und <i>Southern Blotting</i>	54
2.2.24 Zellkultur	55
2.2.24.1 Konservierung von Zellen	55
2.2.24.2 Auftauen von Zellen	55
2.2.24.3 Isolation primärer Fibroblasten aus murinen Embryonen	55
2.2.24.4 Transfektion von Plasmid-DNA in NIH 3T3-Zellen und MEFs	56
2.2.24.5 Expansion und Kultur von embryonalen Stammzellen W9.5	56
2.2.24.6 Elektroporation embryonaler Stammzellen	56
2.2.24.7 Isolation individueller ES-Kolonien nach Elektroporation	57
2.2.25 Blastozystinjektion von embryonalen Stammzellen	58
2.2.25.1 Superovulation	58
2.2.25.2 Gewinnung der Blastozysten	58
2.2.25.3 Injektion der ES-Zellen in Blastozysten	58
2.2.25.4 Generierung scheinträchtiger Mäuse mittels vasektomierter Böcke	59
2.2.25.5 Transfer der manipulierten Blastozysten und chimäre Nachkommen	59
2.2.26 Generierung transgener Mäuse	59
3 Ergebnisse	61
3.1 Verifizierung der Targetingkonstrukte und des Konstrukts zur Herstellung der transgenen Respondermäuse	61
3.1.1 Sequenzierung der <i>knock-in</i> Targetingkonstrukte	61

3.1.2 Verifizierung des transgenen Responderkonstrukts	63
3.1.3 Verifizierung der Gesamtstruktur der Targeting- und Responderkonstrukte mittels Restriktionsendonukleasenverdau	64
3.2 Generierung der Exon IV und Exon V SCL-rtTA knock-in Maus	65
3.2.1 Elektroporation und Detektion von homolog rekombinierten ES-Zellen für die Targetingkonstrukte ExIV und ExV	65
3.2.2 Verifizierung der homolog rekombinierten ES-Zellklone	70
3.2.3 Blastozystinjektion der verifizierten ES-Zellen	72
3.2.4 Verpaarung der chimären Maus zur Generierung der <i>knock-in</i> Linie	73
3.2.5 Analyse des Nachwuchses der chimären Mäuse	73
3.2.6 Etablierung der <i>knock-in</i> Mauslinie	75
3.2.7 Transkriptionsanalyse der <i>knock-in</i> Linie mittels RT-PCR	76
3.2.8 Deletion der Neomycinresistenzkassette mit Hilfe des SycP-Cre Deleterstammes	77
3.2.9 Erfolgreiche Excision der Neomycin-Resistenzkassette	78
3.2.10 Etablierung der Neo- SCI-ExIV <i>knock-in</i> Linie	81
3.3 Generierung von zehn transgenen SCL/EGFP-Responderlinien	81
3.3.1 Analyse der putativ transgenen Foundertiere	82
3.3.2 Etablierung von zehn transgenen Respondermauslinien	83
3.3.3 Analyse der transgenen Linien mittels MEF (murine embryonale Fibroblasten)-Transfektionsassay	84
3.4 Verpaarung der etablierten Linien	87
3.4.1 Generierung der Neo-/Tg-5 Tiere	87
3.4.2 Rückkreuzung der Neo-/Tg-5 Tiere zur Generierung der SCL-/Neo-/Tg-5 Maus	88
3.5 Herstellung von Targetingkonstrukten mit tTA2S	89
3.5.1 Umklonierung des Targetingkonstrukts Exon IV (ExIV)	90
3.5.2 Umklonierung des Targetingkonstrukts Exon V (ExV)	92
3.5.3 Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone für das ExIVtTA2S Targetingkonstrukt	96
4. Diskussion	97
4.1 Die Konstrukte zur Generierung der individuellen Mauslinien	97
4.2 Das Targetingkonstrukt ExIV und die Etablierung der knock-in Mauslinie	98
4.3 Das Targetingkonstrukt ExV	103
4.4 Die transgenen SCL/EGFP-Responderlinien	105
4.5 Verpaarung der etablierten Mauslinien	108
4.6 Klonierung der verbesserten Targetingkonstrukte ExIVtTA2S und ExVtTA2S	112
5 Zusammenfassung	114
6 Literaturverzeichnis	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Strategie zur Generierung transgener Mäuse	10
Abbildung 1.2: Pronukleusinjektion	11
Abbildung 1.3: Generierung von knock-out Mäusen	11
Abbildung 1.4: Blastozystinjektion von ES-Zellen	12
Abbildung 1.5: Cre/Flp-induzierte Rekombination	13
Abbildung 1.6: Das Tet-System	15
Abbildung 1.7: Strategie zur Etablierung eines konditional/reversiblen SCL knock-out Modells	18
Abbildung 1.8 Strategie zur Generierung der SCL/rtTA- <i>knock-in</i> Mauslinien	20
Abbildung 1.9: Transgenes Responderkonstrukt	21
Abbildung 1.10: Kreuzungsschema zur Generierung der konditionalen SCL <i>knock-out</i> Maus	22
Abbildung 3.1: Lage der Sequenzieroligonukleotide im Targetingkonstrukt ExIV	62
Abbildung 3.2: Lage der Sequenzieroligonukleotide im Targetingkonstrukt ExV	62
Abbildung 3.3: Chromatogramm der mit Sequenzieroligonukleotiden durchgeführten Basensequenzanalyse exemplarisch für ExIV-NS2	63
Abbildung 3.4: Lage der Sequenzieroligonukleotide im SCL/EGFP- Responderkonstrukt	64
Abbildung 3.5: Restriktionsverdau der verwendeten Konstrukte	65
Abbildung 3.6: Agarosegelelektrophorese des linearisierten Targetingkonstrukts ExIV	66
Abbildung 3.7: Elektrophoretische Auftrennung von mit HindIII restringierter ES-Zell-DNA einzelner Knadidatenklone	67
Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des genomischen SCL-Lokus, der Targetingkonstrukte ExIV und ExV sowie des jeweils resultierenden homolog rekombinierten Lokus	68
Abbildung 3.9: <i>Southern Blot</i> Analyse der restringierten ES-Zell-DNA mit einer SCL-Lokus-spezifischen 5' outside Sonde exemplarisch für das Targetingkonstrukt ExIV	69
Abbildung 3.10: <i>Southern Blot</i> Analyse rekombinierter ES-Zellklone für das Targetingkonstrukt ExIV	69
Abbildung 3.11: <i>Southern Blot</i> Analyse rekombinierter ES-Zellklone für das Targetingkonstrukt ExV	70
Abbildung 3.12: <i>Southern Blot</i> Analyse der im initialen Blot positiven ES-Zellklone für die Targetingkonstrukte ExIV und ExV	71

Abbildung 3.13: Weitere Verifizierung des ES-Zellklons ES4 Targetingkonstrukt ExIV mittels 5' outside (linker Blot) und interner rtTA Sonde (rechter Blot)	71
Abbildung 3.14: 5' Verifizierung und Detektion der IRES Sequenz mittels <i>Southern Blot</i> für das Targetingkonstrukts ExV in ES-Zellkandidatenklonen	72
Abbildung 3.15: Aufnahme einer im Labor durchgeführten Blastozystinjektion und fotografische Dokumentation einer mit Hilfe von ExIV spezifischen ES3 Es-Zellen generierten hochchimären Maus	73
Abbildung 3.16: Keimbahntransmission des rtTA <i>knock-in</i>	74
Abbildung 3.17: 3' Verifizierung der SCL/ExIV <i>knock-in</i> Mauslinie mittels Expand PCR	75
Abbildung 3.18: Restriktionsanalyse des generierten 3' Expand PCR-Amplifikats	75
Abbildung 3.19: RT-PCR Analyse der rtTA Expression in hämatopoetischen Geweben der SCL-ExIV <i>knock-in</i> Maus	76
Abbildung 3.20: RT-PCR hämatopoetischer Gewebe der SCL-ExIV <i>knock-in</i> Maus zeigte multiple Amplifikate	77
Abbildung 3.21: Für rtTA- <i>knock-in</i> und Cre-Rekombinase bi-transgene Nachkommen	78
Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der Neomycin-Excision	79
Abbildung 3.23: Excision der Neomycinkassette in der SCL/rtTA <i>knock-in</i> Maus	80
Abbildung 3.24: Excision der TK-Neo Resistenzkassette	80
Abbildung 3.25: Transmission des geflochtenen rtTA- <i>knock-in</i> Locus auf einen Black6/C57J Hintergrund	81
Abbildung 3.26: Transgenes Responderkonstrukt	82
Abbildung 3.27: EGFP-spezifische PCR-Analyse von transgenen Responderfoundertieren	82
Abbildung 3.28: SCL und EGFP können in verschiedenen Foundertieren simultan mittels PCR nachgewiesen werden	83
Abbildung 3.29: <i>Southern Blot</i> Analyse der zehn etablierten transgenen Responderlinien	84
Abbildung 3.30: <i>Southern Blot</i> Analyse der transgenen MEFs	85
Abbildung 3.31: Transgene Mauslinie TG-5 ist exogen und stringent induzierbar	86
Tabelle 3.1: Tabellarische Auflistung des MEF Assay zur Regulierbarkeit des SCL-Transgens	86
Abbildung 3.32: Verpaarung der Neo- und TG-5 Mauslinien	87
Abbildung 3.33: Bi-transgene Nachkommen der Neo-/TG-5 Verpaarung	88
Abbildung 3.34: <i>Southern Blot</i> Analyse der Nachkommen der Neo-/TG-5 Rückkreuzung	89
Abbildung 3.35: Klonierungsschema zur Generierung des tTA2S Targetingkonstrukts ExIV91	91
Abbildung 3.36: Restriktionsendonukleasenverdau des Targetingkonstrukts ExIVtTA2S	92

Abbildung 3.37: Generierung des Targetingkonstrukts ExVtTA2S	93
Abbildung 3.38: Lage der Oligonukleotide zum Targetingkonstrukt ExV	94
Abbildung 3.39: PCR-Amplifikation der 0,5 kb StuI-AvrII und der 1,2 kb AvrII-NheI Sequenz	94
Abbildung 3.40: Restriktionsanalyse des Targetingkonstrukts ExVtTA2S	95
Abbildung 3.41: Rekombinierte ES-Zellklone für das Targetingkonstrukt ExIVtTA2S	96
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Targetingkonstrukts ExIV	99
Abbildung 4.2: Mögliche Splicevarianten des rtTA-knock-in	102
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Targetingkonstrukts ExV	104
Abbildung 4.4: Transgenes Responderkonstrukt	106
Abbildung 4.5: Notwendigkeit der DOX Gabe bei Rückkreuzung der rtTA/SCL-EGFP-Mäuse	109

Abkürzungen

A	Adenin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
G	Guanin
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
min	Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
T	Thymin
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Genetisch veränderte Mäuse in der biomedizinischen Forschung

Die Verwendung von Mausmodellen spielt seit der Entdeckung der embryonalen Stammzellen, deren Manipulation und die dadurch mögliche genetische Veränderung der Keimbahn der Tiere auf der einen Seite, der Generierung von transgenen Mäusen durch Injektion von transgener DNA in die befruchteten Eizellen von Mäusen auf der anderen Seite

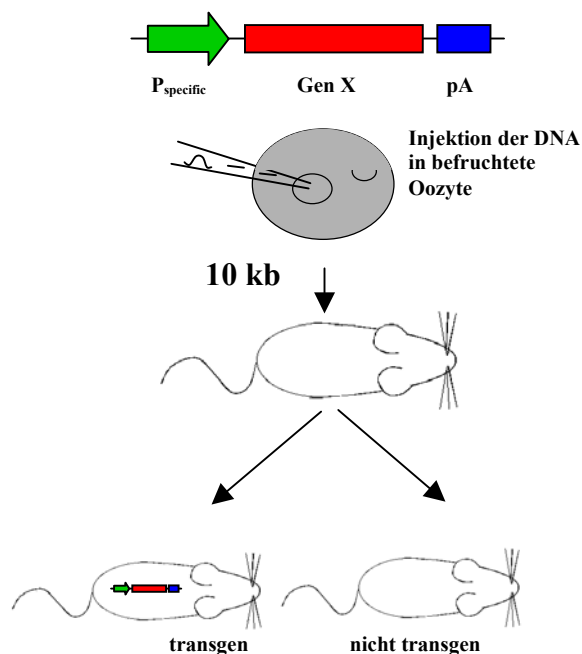


Abbildung 1.1: Strategie zur Generierung transgener Mäuse

Ein DNA Konstrukt wird mittels Mikroinjektion in den Pronukleus von Eizellen eingebracht. Nach Transfer in Leihmütter werden transgene Nachkommen geboren. Nach Bockamp et al. 2002. P_{specific} , spezifischer Promoter; pA, Polyadenylierungssignal.

eine immer stärkere Rolle in der biomedizinischen Forschung.

Nachdem immer mehr die Funktion von Genprodukten in den Vordergrund vor die in vielen Fällen schon abgeschlossene Sequenzanalyse von genetischen Informationen tritt, werden in Zukunft sowohl die Generierung und Analyse von transgenen als auch von *knock-out* Tieren an Stellenwert zunehmen. In den letzten Jahren hat sich die genetisch veränderte Maus als Modellorganismus für die biomedizinische Forschung als eminent wichtiges Werkzeug für die Überprüfung von *in vivo* Genfunktionen entwickelt. Nicht nur die partielle Deletion oder vollständige Ablationen von Genen kann in der genetisch manipulierten Maus untersucht werden, auch *gain of function*

Mausmodelle als auch die spezifische Expression von Genen haben zum allgemeinen Verständnis der vielfältigen Funktionen eukaryotischer Gene beigetragen.

Zur Untersuchung von Genfunktionen haben sich in der Maustechnologie zwei wichtige Modelle etabliert: Durch Injektion von transgenen Konstrukten kann die Expression rekombinanter Genprodukte in ausgewählten Zielorganen und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung erfolgen (Transgenese). Die Biotechnik der Generierung von transgenen Mäusen bedient sich dabei der Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus der

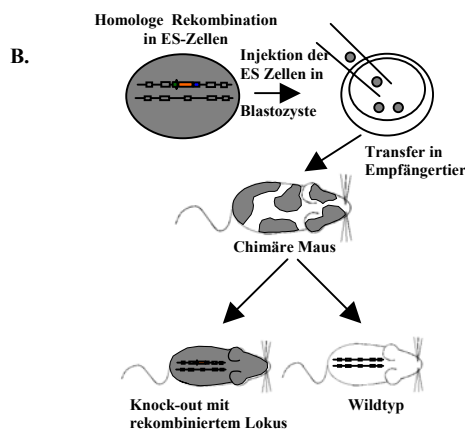
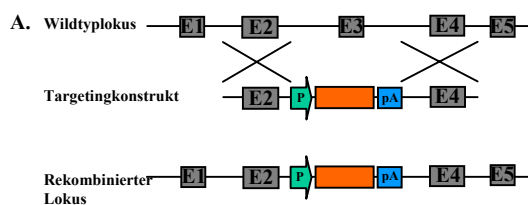


Abbildung 1.3 Generierung von knock-out Mäusen

A. Durch homologe Rekombination in ES-Zellen wird die gewünschte Veränderung eingeführt.
 B. Die veränderten ES-Zellen werden in Blastozysten injiziert und dann in Leihmütter transferiert.
 Nach Bockamp et al. 2002 .E1-E5, Exone; P, Promoter; pA, Polyadenylierungssignal

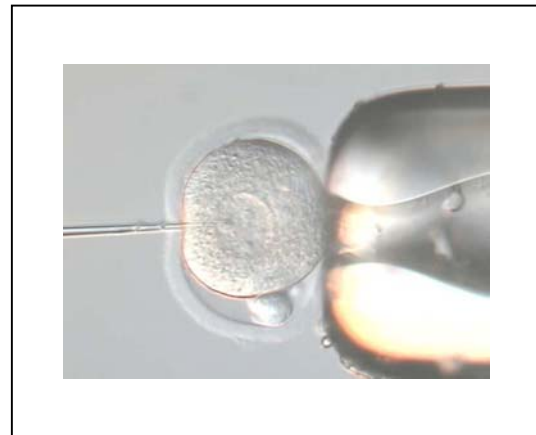


Abbildung 1.2: Pronukleusinjektion

Ein transgenes DNA-Konstrukt wird mittels Injektionskapillare in eine Oozyte injiziert.

befruchteten Eizelle. Diese werden aus begatteten Donortieren gewonnen und nach der Mikroinjektion in scheinchwangere weibliche Tiere in das Infundibulum transferiert (zu einer schematischen Übersicht für die Herstellung von transgenen Mäusen siehe Abbildung 1.1, Abbildung 1.2 zeigt eine Mikroinjektion von DNA in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle). Seit der ersten Veröffentlichung zur Injektion von DNA in den Pronukleus von Oozyten

der Maus (Gordon et al. 1980) und der folgenden Generierung transgener Mäuse (Palmiter and Brinster 1985) stellt diese Technik die fundamentale Basis zur Analyse von rekombinanten Genprodukten im Mausmodell dar. Durch geeignete transgene Konstrukte können im Mausmodell Fragestellungen beantwortet werden, die ein komplexes Zusammenspiel physiologischer Komponenten verlangen. So ist es z.B. möglich, mit Hilfe von Reportergenen wie lacZ oder EGFP ganze regulatorische Elemente *in vivo* zu analysieren, sowie zelltypspezifische Visualisierung von Zellen zu erhalten.

Eine weitere Forschungsrichtung ist die *in vivo* Analyse von rekombinanten Genprodukten mit Hilfe transgener Maustechnologie. Durch die Verwendung von spezifischen Promotoren, zum Teil im Verbund mit Enhancerelementen, können ausgewählte Genprodukte spatio-temporär im Tiermodell exprimiert werden. Dies erlaubt nicht nur die Expression von endogenen Produkten, sondern jegliche Art von rekombinanten Expressionskassetten können zeit- oder zelltypspezifisch exprimiert werden. Detaillierte technische Anleitung für die Generierung transgener Mäuse ist in Hogan et al. 1994 zu finden. Außerdem bietet ein Übersichtsartikel aus unserer Arbeitsgruppe zusammen mit bereits neuerlich erschienenen Publikationen einen tiefen Einblick in die technologischen Möglichkeiten und die Verwendung von genetisch veränderten Mäusen (Bockamp et al. 2002, Festenstein and Kioussis 2000, Sanchez et al. 2001, Cvetkovic et al. 2000, Seuntjens et al. 1999). Die Injektion der DNA zur Herstellung von transgenen Mäusen resultiert in der stochastischen Integration in das Erbgut der Maus. Daraus ergibt sich eine wesentliche Limitierung dieser Technik. Durch den Locus der Integration kann die Expression des Transgens maßgeblich beeinflusst werden (Wilson et al. 1990). Liegen in der Nachbarschaft der zu exprimierenden Sequenz Silencer oder auch Enhancermodule, so können diese Elemente das Expressionsmuster stark verändern oder sogar ganz unterdrücken. Genauso führt eine Integration in generell abgeschaltete chromosomale Bereiche zu einer Ablation jeglicher Expression des Transgens. Solche Variegationseffekte aufgrund von Integration der transgenen DNA können die gewünschte Expression maßgeblich alterieren (siehe auch Wilson et al. 1990 zu positionalen Effekten auf die Expression von Transgenen). Ein weiteres Problem bei der Generierung transgener Mäuse besteht in der Tatsache, dass die transgene DNA oftmals nicht als einzelne Sequenz, sondern in



Abbildung 1.4: Blastozystinjektion von ES-Zellen

Manipulierte ES-Zellen werden in Blastozysten injiziert und diese dann in den Uterus von Leihmüttern transferiert.

Repeats oder auch in invertierten Wiederholungen mehrfach in das Erbgut integriert. Die transgene Maus hat als Modellorganismus zur Erforschung von Genfunktionen die oben angeführten Limitationen. Mit der Etablierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen, Martin 1981, Evans and Kaufman 1981) und der Möglichkeit zur *ex vivo* Manipulation von ES-Zellen durch homologe Rekombination (Doetschman et al. 1987) wurde die gerichtete

Veränderung des murinen Erbguts erstmals möglich. Durch gezielte Einbringung einer genetischen Veränderung in einen bestimmten Locus innerhalb des Mausgenoms (für eine allgemeine Übersicht der homologen Rekombination, siehe Abbildung 1.3) können nicht nur Sequenzen eingebracht werden, sondern vor allem Gene durch Deletion von essentiellen Teilen ihrer Sequenz *ab initio* zerstört werden. Diese Zerstörung von Genen in ES-Zellen und die Generierung von *knock-out* Mäusen aus diesen genetisch veränderten ES-Zellen brachte nun erstmals die Möglichkeit, nicht nur die Funktion von neu eingeführten Sequenzen in den transgenen Mäusen, sondern auch Gene hinsichtlich ihrer Ablation und dem daraus resultierenden Phänotyp zu untersuchen. Abbildung 1.4 zeigt die experimentelle Injektion von genetisch veränderten ES-Zellen in Blastozysten. Die Zerstörung eines Zielgenlokus und die daraus resultierende *ab initio* Ablation des betreffenden Gens kann eine fundamentale Limitation sein, die sich aus diesem experimentellen Ansatz ergibt. Spielt das Gen eine essentielle Rolle in z.B. der Entwicklung des Embryos, so kann es durch Deletion dieses Gen zu irreparablen Störungen bereits im Hemizygot (*dosage effect*) oder im Heterozygot kommen. Im für das Projekt schlechtesten Falle wird sich ein früher embryonal letaler Phänotyp zeigen, welcher oft sehr limitierte Aussagen über eine Funktion des ablatierten Genes treffen lässt. Dies war zum Beispiel auch im Falle des in der vorliegenden Arbeit betrachteten SCL-Gens (für *Stem Cell Leukemia*), dessen Ablation in der Maus zu einer frühen Letalität der homozygoten *knock-out* Tiere führte (Robb et al. 1995, Shivdasani et al. 1995).

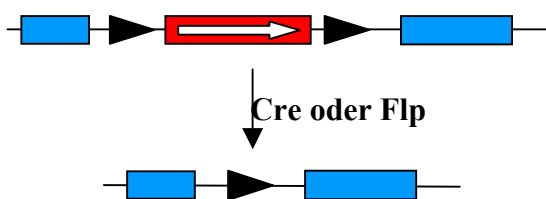


Abbildung 1.5: Cre/Flp-induzierte Rekombination

Eine von loxP oder *frt*-Erkennungssequenzen flankierte Sequenz wird mittels Cre oder Flp-Rekombinase excisiert. Nach Bockamp et al. 2002. Blaue Boxen, Exone; Rote Box, zu eliminierende Sequenz; Dreiecke, loxP- bzw. *frt*-Sequenzen.

Um frühe embryonale Letalität zu umgehen, wurden konditionale Systeme zur induzierten Veränderung von Genloci und der daraus folgenden Eliminierung von Zielsequenzen entwickelt. Das erste dieser Systeme bestand in der Verwendung der Bakteriophagen P1 Cre-Rekombinase, welche in der Lage ist, spezifische, die Zielsequenz flankierende Sequenzen (*loxP sites*) zu erkennen und danach diese Zielsequenz zu excisieren (Hamilton and Abremski 1984, Hoess et al. 1982, siehe auch Abbildung 1.5 für die Cre-vermittelte Excision von DNA-Sequenzen). Die Verwendung des Cre-lox-Systems in der transgenen Maus erwies sich als

ausgesprochen nützlich (z.B. Lakso et al. 1992, Orban et al. 1992) und ermöglichte bald die routinemäßige *in vivo* Mutation des Mausgenoms.

Die logische Weiterführung dieses System war es nun, gerichtete Rekombination in einem Genlokus mit der durch Cre- (oder der ebenfalls in der Maus aktiven Flp-Rekombinase) induzierten Rekombination und einer eingeführten Excision zu kombinieren. Arbeiten, welche diese zwei Techniken verbanden, zeigten schnell das große Potential, welches in dieser konditionalen *knock-out* Technik lag (Gu et al. 1993). Dadurch, dass das Cre-lox-System, oder auch das in seiner Wirkungsweise vergleichbare Flp-frt-System (siehe Kilby et al. 1993) nur in eine Richtung arbeitet, nämlich in der Regel Zielsequenzen eliminiert, sind Rekombinasen-vermittelte *in vivo* Manipulationen zwar konditional aber nicht reversibel. Ein erster Schritt zu einem reversibel schaltbaren Modellsystem kam mit der Einführung des Tet-Systems durch die Arbeitsgruppe von Prof. Bujard am ZMBH in Heidelberg (Gossen and Bujard 1992). Die Einführung von neuen Komponenten wie reverse Transaktivatoren (Baron et al. 1997), modifizierte Transaktivatoren in Hinsicht auf Splicing und Toxizität (Urlinger et al. 2000) oder von tet-abhängigen Silencermolekülen (Freundlieb et al. 1999) hat inzwischen zur ständigen Verbesserung des ursprünglichen Tet-Systems wesentlich beigetragen. Das klassische Tet-System besteht aus zwei Komponenten, erstens dem Tetracyclin(tet)-abhängigen Transaktivator (tTA), einem Fusionsmolekül aus dem DNA-Ligand- und Zielsequenz-bindenden Teil des Tet-Repressors aus *Escherichia coli* und der aktivierenden Domäne des Virionproteins 16 aus *Herpes simplex*. Der tTA ist in der Lage als Homodimer eine cognate tet-O Bindungssequenz (*Tet Responsive Element*, TRE) zu erkennen und spezifisch zu binden. Damit kann die aktivierende VP16-Domäne in die Reichweite eines benachbarten Promoters gebracht werden und diesen transkriptionell aktivieren. Nach Zugabe und Bindung des Liganden Tetracyclin (TET) oder eines Analogons (z.B. Doxycyclin, DOX) an den tTA kann dieser nicht mehr an seine entsprechende tet-O Bindungssequenz binden und den benachbarten Promoter (in vielen Fällen der Minimalpromoter des humanen Zytomegalievirus) aktivieren. Nach Depletion des Liganden wird die Bindung des tTA und damit die Aktivierung des Promoters wieder ermöglicht (zu einer schematischen Darstellung des tTA-vermittelten Tet-Systems siehe Abbildung 1.6, linker Teil).

Da der tTA durch Bindung des Liganden von der DNA entfernt wird, nennt man dieses System auch Tet-off, im Gegenzug dazu bindet der später entwickelte modifizierte reverse tTA (rtTA, Baron et al. 1997) nur in Gegenwart des Liganden. Der Zielpromoter wird also nur nach Zugabe von TET oder DOX aktiviert (Tet-on). Das rtTA-vermittelte Tet-on System ist ebenfalls in Abbildung 1.6 auf der rechten Seite dargestellt.

Der Nutzen dieses induzierbaren Systems ist durch seine äußerst breite Anwendungsmöglichkeit immens. So können z.B. transgene Tiere hergestellt werden, die in der Lage sind durch exogene Kontrolle (und dem entsprechenden spezifischen Promoter zur Expression des tTA oder rtTA) beliebige Genprodukte spezifisch zu exprimieren oder deren Expression gegebenenfalls nach Maßgabe von DOX wieder abzuschalten (zu Informationen zum Tet-System siehe auch Zhu et al. 2002, sowie Bockamp et al. 2002). In der Literatur erschienen bisher eine große Zahl exzellenter Publikation, die den Gebrauch des Tet-Systems in transgenen Mausmodellen illustrieren (Baron and Bujard 2000 und <http://www.zmg.uni-mainz.de/tetmouse>).

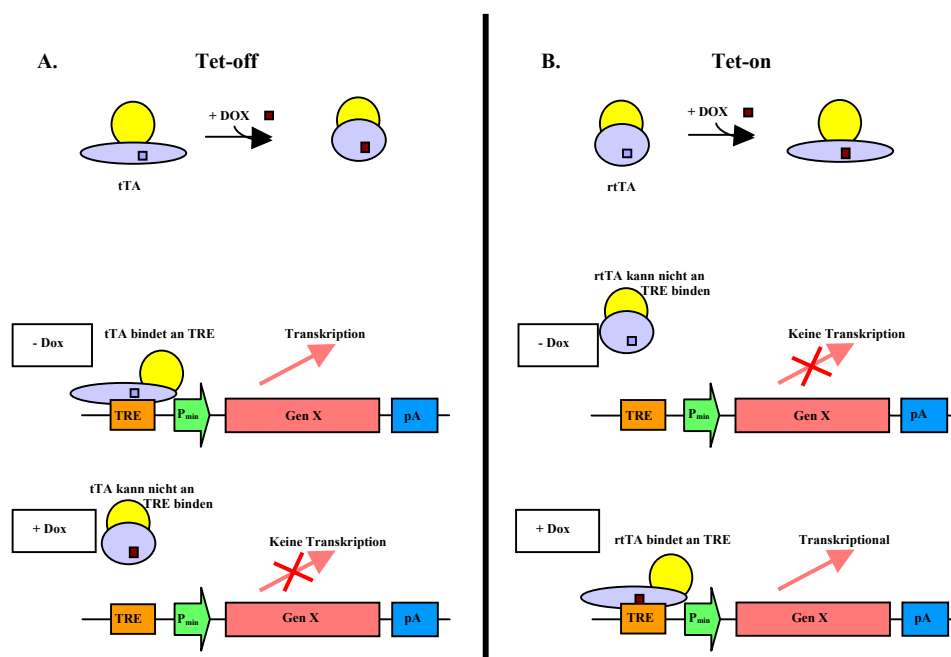


Abbildung 1.6: Das Tet-System

A. Tet-off, nur in Abwesenheit des Liganden DOX kann der tTA an die TRE binden und den Minimalpromoter aktivieren.

B. Tet-on, nur in Anwesenheit des Liganden DOX kann der rtTA an die TRE binden und so die Expression des Zielgens X starten.

Nach Bockamp et al. 2002. Dox, Doxycyclin; TRE, *Tet Responsive Element*; P_{min}, Minimalpromoter; pA, Polyadenylierungssignal.

Natürlich lassen sich die vorgenannten verschiedenen Systeme beinahe beliebig kombinieren, um so die jeweils gewünschte Fragestellung anzugehen. So wurde das Tet-System mit dem Cre-System gekoppelt, um in transgenen Mäusen die Cre-Rekombinase exogen kontrollierbar exprimieren zu können (Schwenk et al. 1995). Die logische Weiterführung dieses Systems ist es nun, durch gezielte Rekombination in ES-Zellen, das Tet-System zur Generierung von konditionalen und vor allem reversiblen *knock-out* Mäusen einzusetzen. Eine solche konditional/reversible Geninaktivierung, welche mit Hilfe des Tet-Systems und einer exogenen Regulation durch DOX reaktiviert werden kann, zeigt die Manipulation des

Endothelin Rezeptor B (*Ednrb*, Shin et al. 1999). Hier wurde durch geschickte Platzierung des tTA auf einem Allel des endogenen *Ednrb*-Lokus und des korrespondierenden TRE-Pmin-*Ednrb*-cDNA-Konstrukts auf dem anderen erstmals ein konditional/reversibler *knock-out* Phänotyp mit Hilfe des Tet-Systems etabliert. Das endogene *Ednrb*-Gen wird durch den *knock-in* des Effektors (rtTA) und des Responders (TRE-*Ednrb*-cDNA) zerstört, und zusätzlich der tTA unter die transkriptionelle Kontrolle des *Ednrb*-Lokus gebracht (*knock-in*). Durch Bindung des tTA an die TRE und die dadurch induzierte Expression der *Ednrb*-cDNA kann der *Ednrb*^{-/-} *knock-out* Phänotyp exogen reguliert werden. Diese Technik erlaubt sozusagen eine konditionale/reversible Expression des *Ednrb* in einem *Ednrb*-*knock-out* Hintergrund.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Tet-on System analog zum *Ednrb* *knock-out* zur Etablierung eines konditional/reversiblen *knock-out* Mausmodells für das zelltypspezifische T-Zell-Onkogen SCL angewendet werden. Um die Intention, ein solches Modell zu etablieren, näher zu erläutern, soll zunächst auf die Funktion und die Geschichte des SCL-Gens eingegangen werden.

1.2 Das *Stem Cell Leukemia* Gen (SCL)

Die ersten Publikationen, die mit der Entdeckung des SCL-Gens in Verbindung stehen, wurden schon 1985 veröffentlicht. Dort berichteten Kurtzberg und Kollegen (Kurtzberg et al. 1985) von einem Patienten mit akuter T-lymphoblastischer Leukämie (T-ALL). Eine von diesem Patienten derivierte Zelllinie DU.528 wurde weiter untersucht und dort eine chromosomale Rekombination zwischen den Chromosomen 1 und 14 identifiziert (t(1;14)(p32;q11), Finger et al. 1989, Begley et al. 1989). Nähere Untersuchung der Rekombination zeigten, dass der T-Zellrezeptor δ -Lokus auf Chromosom 14 und ein neu entdecktes Gen namens TCL5 (für *T-Cell Leukemia/Lymphoma* 5) auf Chromosom 1 involviert sind (Finger et al. 1989). Arbeiten von Begley und Kollegen identifizierten den hämatopoietischen Transkriptionsfaktor SCL (für *Stem Cell Leukemia*, Begley et al. 1989) als das involvierte Gen. Durch die beobachtete Translokation kam es zu einer ektopischen Expression von SCL in T-Zellen, welche dann vermutlich zur Ausbildung der T-ALL führen kann. In der Tat konnten nach Entdeckung des SCL-Lokus in einer Vielzahl von klinischen Studien Abberationen, die SCL betreffen als häufigste molekulare Läsion bei infantiler T-Zell akuter lymphoblastischer Leukämie identifiziert werden (Bash et al. 1995). Die genaue mechanistische Funktionsweise, die SCL bei der Entstehung von T-ALL hat, konnte

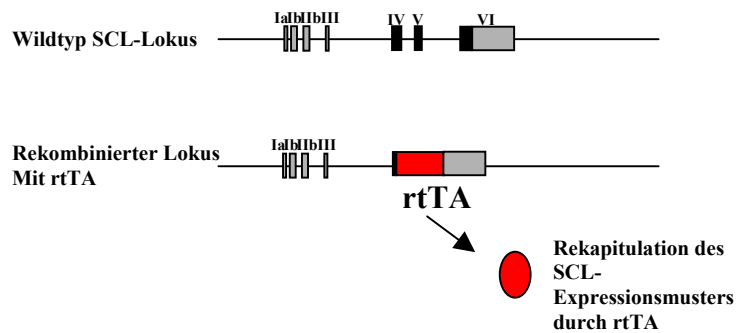
allerdings bisher nicht zufriedenstellend aufgeklärt werden. Die Klonierung der murinen SCL-cDNA (Begley et al. 1991 und des murinen SCL-Genlokus auf dem Chromosom 4 der Maus (Begley et al. 1994) zeigten eine hohe Sequenzidentität zum humanen Protein. Das SCL-Protein gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsanalysen zeigten, dass es hauptsächlich in Zellen des hämatopoietischen Systems, nämlich in den hämatopoietischen Stammzellen (HSC), erythroiden Progenitorzellen, sowie in Erythrozyten, Mastzellen und Megakaryozyten exprimiert wird (Green et al. 1992, Mouthon et al. 1993, Cross et al. 1994, Kallianpur et al. 1994, Silver and Palis 1997, Akashi et al. 2000, Drake and Fleming 2000). Zudem wurde SCL in endothelialen Zellen und in Bereichen des Gehirns gefunden (zu einem Übersichtsartikel siehe Begley and Green 1999). Die Analyse des murinen SCL-Lokus zeigte drei alternative Promotoren, die zusammen mit fünf distinkten Enhancerelementen, sowie diversen DNaseI hypersensitiven Stellen die komplexe Expression des SCL-Gens mit Hilfe verschiedener Transkriptionsfaktoren steuern (Begley et al. 1994, Bockamp et al. 1995, Bockamp et al. 1997, Bockamp et al. 1998, Gottgens et al. 1997). Gezielte Ablation des SCL-Gens in *knock-out* Mäusen, zeigte einen letalen Phänotyp, die homozygoten SCL^{-/-} Tiere starben noch *in utero* um den Tag 9.5 Gestationstag mit vollständigem Fehlen von hämatopoietischen Zellen im Dottersack der Embryonen (Robb et al. 1995, Shivdasani et al. 1995). Die Organogenese der homozygoten SCL^{-/-} Tiere schien bis auf ausgeprägte vaskuläre Defekte (Visvader et al. 1998) unauffällig. Diese Resultate legten den Schluss nahe, das SCL für die Regulation der frühen Hämatopoiese eine essentielle Rolle spielt.

1.3 Ansatz zur Etablierung eines konditional reversiblen SCL *knock-out* Modells

Da die konventionelle Ablation des SCL Gens in der Maus einen letalen Phänotyp des SCL^{-/-} Genotyps zeigte (Robb et al. 1995, Shivdasani et al. 1995), sich aber durch letale Phänotypen sehr beschränkte Aussagen über die *in vivo* Funktion von SCL treffen lassen, sollte in der vorliegenden Arbeit ein innovativeres Modell zur Generierung eines SCL *knock-out* Phänotyps generiert werden. Dazu sollte das schon erwähnte Tet-System verwendet werden. Ähnlich wie bei dem konditionalen Targeting des *Ednrb*-Lokus (Shin et al. 1999), sollte der tet-abhängige Transaktivator rtTA durch *knock-in* in den endogenen SCL-Lokus eingebracht werden und auf diese Weise das SCL-spezifische Expressionsmuster durch rtTA-Expression rekapituliert werden. Der in dieser Weise regulierte rtTA soll dann in einem zweiten Schritt die SCL cDNA, welche unter der transkriptionellen Regulation eines tet-O-CMV-

Minimalpromotorelements steht, transkriptionell regulieren. Die grundlegende Technik ist in Abbildung 1.7. dargestellt.

Effektor



Responder

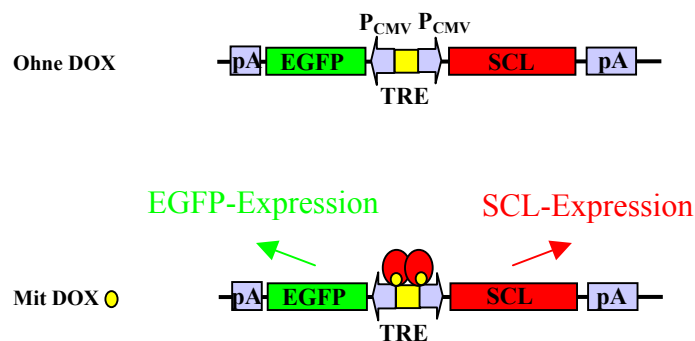


Abbildung 1.7 Strategie zur Etablierung eines konditional/reversiblen SCL knock-out Modells

Durch homologe Rekombination wird rtTA unter die transkriptionelle Regulation des SCL-Lokus gebracht (Effektor). Mittels eines zweiten Konstruktes (Responder) kann durch exogenen Kontrolle (DOX-vermittelt) die SCL-cDNA und das Reportergen EGFP gleichzeitig aktiviert werden.

Graue Boxen, Exone; schwarze Boxen, codierende Exone; pA, Polyadenylierungssignal; P_{CMV}, CMV Minimalpromoter; TRE Tet Responsive Element.

Da durch ausführliche Analyse des murinen SCL-Lokus bekannt war, dass mehrere Promotoren, sowie Enhancerelemente für die spatio-temporäre SCL-Expression verantwortlich sind, sollten diese regulatorischen Elemente so weit als möglich auch für die Expression des rtTA genutzt werden. Deshalb wurde der Weg einer *knock-out/knock-in* Strategie gewählt, in der durch homologe Rekombination in ES-Zellen nicht nur die kodierenden Bereiche des SCL-Gen deletiert werden sollten, sondern gleichzeitig auch die rtTA codierende Sequenz unter die Kontrolle des gesamten Locus gestellt wird. Dies birgt immense Vorteile im Vergleich zu einem transgenen Konstrukt, in dem rtTA nur durch einen singulären SCL-Promoter reguliert wäre. Entsprechende Publikationen mit transgenen Mäusen zeigten z.B. nur einen partiellen Rescue des SCL-Nullphänotyps (Sinclair et al. 1999, Sanchez et al. 1999), bewiesen aber, dass durch Einbringen eines YAC-(*Yeast Artificial Chromosome*)Transgens, welches den gesamten humanen SCL-Lokus in einen SCL-Nullhintergrund brachte, ein vollständiger Rescue beobachtet werden konnte (Sinclair et al. 2002). Der rtTA, welcher nun exakt das spatio/temporale Expressionsmuster von SCL

rekapitulieren sollte, sollte dann in einem zweiten Schritt das unter der TRE- P_{CMV} -Kontrolle stehende SCL (hier die rekombinante cDNA) unter der exogenen Kontrolle von DOX regulieren. Damit wäre konzeptionell ein exogen regulierbarer SCL *knock-out* Phänotyp durch die Gabe von DOX zum Trinkwasser der konditionalen Tiere möglich.

1.4 Benötigte Mauslinien zur Herstellung des SCL *knock-out* Mausmodells

Zur Generierung einer konditionalen und reversiblen *knock-out* Maus für das SCL-Gen werden prinzipiell zwei unabhängige Mauslinien benötigt. Zum Einen die Effektorlinie, welche rtTA trägt, der durch homologe Rekombination in ES-Zellen und deren Injektion in Blastozysten generiert werden kann, und zum Anderen die Responderlinie, die SCL- und EGFP-cDNA rtTA-induzierbar und DOX-abhängig als Transgen integriert hat.

Da der *knock-in* die rtTA codierende cDNA unter die Kontrolle des endogenen SCL-Lokus bringt, die codierende Sequenz des SCL-Gens in Exon IV beginnt und darüber hinaus zwischen Exon IV und V eine DNaseI hypersensitive Stelle liegt (Bockamp et al. 1995), sollten zwei unterschiedliche Targetingkonstrukte zur Generierung des rtTA-*knock-in* verwendet werden. Zum einen das Targetingkonstrukt ExIV, welches die codierende Sequenz des rtTA direkt in das Exon IV einbringt und somit die komplette codierende SCL-Sequenz ersetzt. Zum anderen das Targetingkonstrukt ExV, welches die rtTA codierende Sequenz und eine vorgeschaltete IRES-(*internal ribosome entry site*) Sequenz in das Exon V des SCL-Lokus bringt. Dadurch wird die Sequenz zwischen den beiden Exonen IV und V beibehalten und die für die Expression möglicherweise wichtige DNaseI hypersensitive Stelle bleibt erhalten. Zusätzlich und um eine Translation des rtTA am Ribosom zu garantieren, sollte eine IRES-Sequenz in das Targetingkonstrukt ExV integriert werden. Zum besseren Verständnis beider Targetingkonstrukte, sowie der beabsichtigten homologen Rekombination im endogenen SCL-Lokus sind die zwei *knock-in* Strategien nochmals in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt.

Durch Einbringen des rtTA in den genomischen SCL-Lokus sollte dieser das spatio-temporäre Expressionsmuster von SCL rekapitulieren, das bedeutet das durch den *knock-in* nicht nur die codierende SCL-Sequenz deletiert werden sollte, sondern das gleichzeitig die Expression von rtTA das spatio-temporäre Expressionsmuster von SCL rekapituliert. Dadurch sollte das rtTA-Genprodukt in SCL exprimierenden Geweben zu finden sein. Da zur Generierung der *knock-in* Linien die homologe Rekombination in ES-Zellen und dadurch die Selektion von ES-Zellen durch ein geeignetes Selektionsmedium erforderlich ist, sollte jedes

der zwei Targetingkonstrukte eine von loxP-Sequenzen flankierte Neomycinresistenzkassette (Neo) enthalten. Die flankierenden loxP-Sequenzen waren notwendig, da nach erfolgreicher Rekombination, sowie anschließender Etablierung der *knock-in* Maus, die von einem Thymidinkinasepromoter (TK) regulierte Neo-Kassette durch Expression einer Cre-Rekombinase entfernt werden können soll.

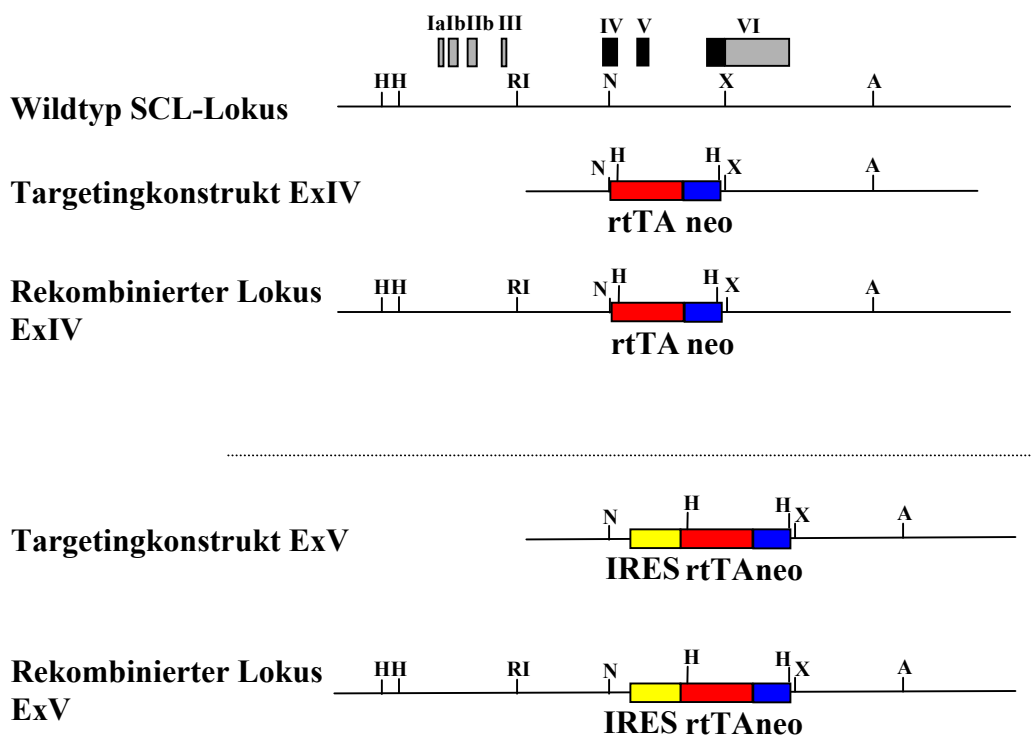


Abbildung 1.8 Strategie zur Generierung der SCL/*rtTA*-*knock-in* Mauslinien

Die beiden Targetingkonstrukte ExIV und ExV platzieren die *rtTA* codierende Sequenz jeweils differentiell im genomischen SCL-Lokus. Während das Targetingkonstrukt ExIV nach homologer Rekombination den *rtTA* im Exon IV platziert, wird im Falle des Targetingkonstrukts ExV der *rtTA* und die IRES-Sequenz in das Exon V eingebracht. Dadurch bleibt eine DNaseI hypersensitive Stelle im Intron IV/V erhalten.

Graue Boxen, nicht codierende Exone; schwarze Boxen, codierende Exone; neo, Neomycinresistenzkassette; H, HinDIII; RI, EcoRI; N, NdeI; X, XhoI, A, ApaI.

Dies ist deshalb ratsam, da der TK-Promoter mit transkriptionell aktiven SCL-Elementen wie z.B. dem bereits publizierten 3' Enhancer des SCL-Gens (Sanchez et al. 1999) interagieren könnte, und dadurch die korrekte Expression des *rtTA* wesentlich gestört werden könnte. Da dies zu einem verzerrten Expressionsmuster des *rtTA* in der *knock-in* Maus führen könnte, und somit die Funktionsweise dieser stören oder sogar ganz hemmen könnte, war die Excision des sehr starken TK-Promoters und der ohnehin nicht mehr benötigten Neo-Kassette im Ganzen durch die Cre-Rekombinase wichtig.

Die zweite, bzw. in diesem Falle dritte Mauslinie (es sollen ja zwei SCL/*rtTA*-*knock-in* Mauslinien generiert werden), die zu einer erfolgreichen Etablierung der

konditional/reversiblen SCL *knock-out* Mauslinie nötig ist, trägt als transgenes Konstrukt die SCL-cDNA, und als Reportergen zur leichteren Identifizierung positiver Zellen, die EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) cDNA, unter der regulatorischen Kontrolle eines bidirektionalen TRE-CMV-Minimalpromoterkonstrukts (SCL cDNA in pBI-EGFP, siehe Abbildung 1.9 und Baron et al. 1995)

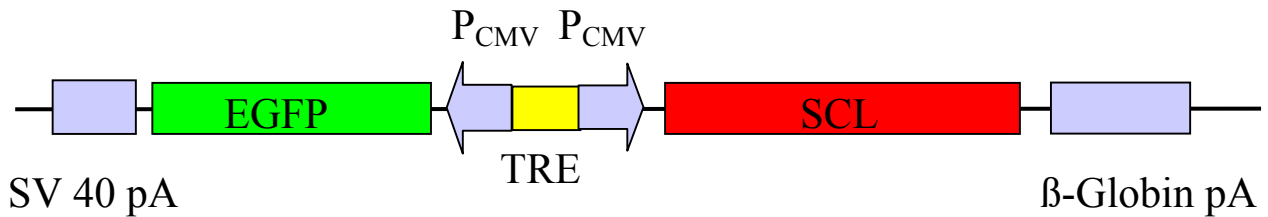


Abbildung 1.9: Transgenes Responderkonstrukt

Das Konstrukt zur Generierung der transgenen SCL-EGFP-Respondertiere enthält die SCL-cDNA, sowie die EGFP codierende Sequenz unter der transkriptionellen Kontrolle der tet regulierten CMV Minimalpromotoren.

Nach Generierung der zu verwendenden Effektor- (*rtTA-knock-in*) und Responderlinien (SCL-EGFP) sollen diese dann adäquat gekreuzt werden, um in einem ersten Schritt eine heterozygote *knock-in*/SCL-EGFP Maus zu generieren, welche dann zurückgekreuzt wird, und so die homozygote SCL^{-/-}/*rtTA-knock-in*/SCL-EGFP Maus generiert werden sollte. Da Tiere ohne funktionstüchtiges SCL nicht lebensfähig wären (Shivdasani et al. 1995), sollte durch permanente Gabe von Doxycyclin im Trinkwasser der doppelt positiven Mäuse die Expression von rekombinanten SCL über Induktion durch den *rtTA* ermöglicht werden. Die Verpaarung der benötigten Linien bis zur konditionalen SCL *knock-out* Maus ist schematisch in Abbildung 1.10 wiedergegeben.

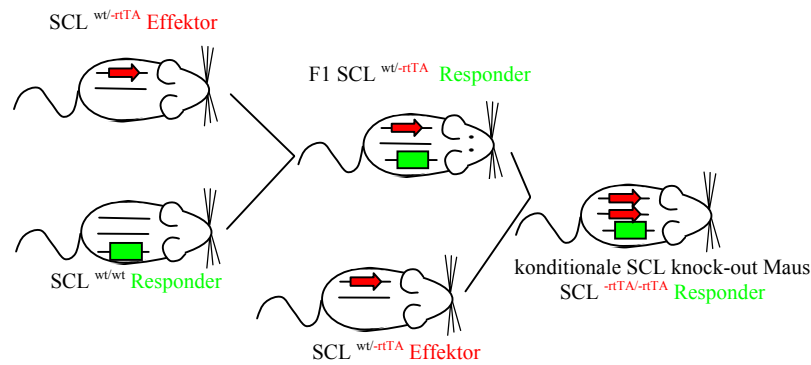


Abbildung 1.10: Kreuzungsschema zur Generierung der konditionalen SCL *knock-out* Maus

Rote Pfeile zeigen den rtTA *knock-in* und grüne Boxen stellen das transgene Responderkonstrukt dar.

Wir spekulieren, dass durch die adäquate und oben beschriebene Verpaarungsstrategie zusammen mit einem exogen *post coitum* implementierten DOX-Regime der rtTA *knock-in* mit Hilfe des TRE-SCL-Responderkonstrukt in der Lage sein sollte, den letalen SCL^{-/-} Genotyp nicht nur zu kompensieren, sondern auch die Expression von rekombinanten SCL einzig und allein durch die exogene Kontrolle durch die Gabe/Depletion von DOX in den generierten Mäusen steuern könnte. Dies wäre nicht nur eine Kompensierung des SCL-*knock-out*, sondern würde auch einer echten konditional/reversiblen *knock-out* Situation entsprechen. Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die rtTA *knock-in* Mauslinien als auch adäquate transgene Responderlinien zu generieren und auf ihr Potential zur Etablierung eines tet-regulierbaren konditionalen *knock-out* Phänotyps für das SCL Leukämogen zu testen.

1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte in einem ersten Schritt die Generierung verschiedener genetisch veränderter Mauslinien sein, welche dann durch adäquate Verpaarung zu einer konditional/reversiblen *knock-out* Maus für das T-Zell spezifische Onkogen SCL (*Stem Cell Leukemia*) führen sollten. Das vorgestellte Modell sollte dabei Gebrauch von dem etablierten Tet-System machen. Durch homologe Rekombination in ES-Zellen soll der rtTA (reverser tet-abhängiger Transaktivator) unter die regulatorische Kontrolle des endogenen SCL-Lokus gebracht werden (rtTA *knock-in*, Effektor). In einer zweiten, transgenen Maus sollte die rekombinante SCL cDNA unter die regulatorische Kontrolle eines tet-induzierbaren Minimalpromoters gebracht werden (Responder). Dadurch das in der Effektormaus die Expression des rtTA das spatio-temporäre Expressionsmuster von SCL rekapituliert und der so exprimierte rtTA durch Gabe von Tet, oder seines Analogons DOX, die Expression der rekombinanten SCL cDNA reguliert, sollte dieser Ansatz in der Herstellung eines exogen kontrollierbaren SCL *knock-out* Phänotyps resultieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Im Einzelnen wurden folgende Chemikalien von den angegebenen Quellen bezogen:

Acrylamidstammlösung 30%	Roth (Karlsruhe, D)
Agar	Difco (Detroit, USA)
Agarose	Sigma (Deisenhofen, D)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (Deisenhofen, D)
Bactopepton	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Bactotrypton	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
β -Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen, D)
Borsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen, D)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (Deisenhofen, D)

Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs)	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma (Deisenhofen, D)
DNaseI (RNase frei)	Qiagen (Hilden, D)
Doxycyclin (DOX)	Sigma (Deisenhofen, D)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromid Stammlösung (10mg/ml)	Roth (Karlsruhe, D)
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Deisenhofen, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Greiner (Frickenhausen, D)
Fetales Kälberserum (Tetracyclin frei)	BD Clontech (Heidelberg, D)
G-418 (Neomycin)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Gelatine	Sigma (Deisenhofen, D)
L-Glutamin 100x	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen, D)
Harnstoff	Roth (Karlsruhe, D)
Human Chorionic Gonadotropin (HCG)	Intervet (Unterschleißheim, D)
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma (Deisenhofen, D)

Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe, D)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Leukemia Inhibitory Factor (Lif ESGRO™)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Mineralöl	Sigma (Deisenhofen, D)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumcitrat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdihydrogenphosphat	Riedel de Haen (Seelze, D)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma (Deisenhofen, D)
Natriumpyruvat	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Penicillin-Streptomycin (10000 Units/ml)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Phenol	Roth (Karlsruhe, D)
Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)

Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG)	Intervet (Unterschleißheim, D)
Proteinase K	Sigma (Deisenhofen, D)
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.,)
Ribonuklease A (Typ I-AS)	Sigma (Deisenhofen, D)
RNase Inhibitor	Sigma (Deisenhofen, D)
Sarcosyl	Sigma (Deisenhofen, D)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Sucrose	Roth (Karlsruhe, D)
N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen, D)
Tris-Base	Roth (Karlsruhe, D)
Tris-HCL	Roth (Karlsruhe, D)
Trizol-Reagenz	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, D)
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D -Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma (Deisenhofen, D)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen, D)
Yeast Extract	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Alle in dieser Liste nicht aufgeführten Chemikalien (Reinheitsgrad p.a. oder reinst) wurden von folgenden Firmen bezogen:

Merck (Darmstadt, D)

Roth (Karlsruhe, D)

Sigma (Deisenhofen, D)

2.1.2 Radiochemikalien

^{32}P -alpha-dCTP

Amersham (Braunschweig, D)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden im einzelnen von den angegebenen Quellen bezogen:

Biomax MS Röntgenfilme

Kodak (Rochester, USA)

Corex II Röhren

DuPont (Bad Homburg, D)

Elektroporationsküvetten (2 mm und 4 mm)

Peqlab (Erlangen, D)

Eppendorfreaktionsgefäße
(1,5 und 2 ml Safe-Lock)

Eppendorf (Hamburg, D)

Eppendorfreaktionsgefäße Biopur (1,5 ml)

Eppendorf (Hamburg, D)

Glaswolle

Merck (Darmstadt, D)

Nick Column Sephadex G 50 Säulen

Amersham (Braunschweig, D)

Nylonmembran, Hybond N ⁺ ™	Amersham (Braunschweig, D)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe, D)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml Safe-Lock)	Eppendorf (Hamburg, D)
Petrischalen (steril, 82 mm)	Greiner (Frickenhausen, D)
Polypropylenröhrchen (steril, 15 ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
QIAshredder Zentrifugensäulen	Qiagen (Hilden, D)
Snap Cap PP-Röhrchen (10 ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
S&S-Rotrand-1x-Sterilfilter (0,22 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel, D)
Sterile Spritzen	Henke Sass Wolf GmbH (Tuttlingen, D)
Szintillationsröhrchen	Roth (Karlsruhe, D)
Whatman 3MM Chr-Papier	Bender und Hobein (München, D)
Zellkulturbedarf (96- und 24-well Platten, 3,5, 6 und 9 cm Kulturschalen, Pipetten, und Spitzen)	Greiner (Frickenhausen, D)

2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

Ampicillinlösung	500 mg Ampicillin (Natriumsalz) in 10 ml <i>Aqua desilata</i> gelöst, filtriert, aliquotiert, bei -20° C lagerstabil
Church-Hybridisierungspuffer	0,5 M Na ₂ HPO ₄ , 1 mM EDTA (pH 7,3), 7% SDS, mit Orthophosphorsäure auf pH 7,2 eingestellt

Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Doxycyclinlösung	2 mg in 10 ml <i>Aqua destilata</i> gelöst, filtriert, aliquotiert, bei -20°C lagerstabil
Doxycyclin/Sucroselösung	10 mg/ml Doxycyclin, 1% Sucrose in autoklaviertem Trinkwasser
EDTA 0,5 M	14,6 g EDTA, ad 100 ml <i>Aqua destilata</i> , mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt. (Autoklaviert).
ES-Lysis-Puffer	10 mM Tris-HCL (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM NaCL, 0,5 % Sarcosyl, 1 mg/ml Proteinase K
G-418-Lösung	1 g in 10 ml <i>Aqua destilata</i> gelöst, filtriert, aliquotiert, bei -20°C lagerstabil
Natriumacetat 3M	24,61 g Nartiumacetat, ad 100ml <i>Aqua destilata</i> , mit Essigsäure auf pH 4,8 eingestellt
Neutralisationspuffer (DNA)	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM EDTA (pH 7,4), mit HCL auf pH 7,5 eingestellt
PBS 1x (Phosphate Buffered Saline)	8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1.44 g Natriumhydrogenphosphat, 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat, ad 11 <i>Aqua destilata</i> mit pH 7,4. (Autoklaviert).
Probenpuffer (Blaumarker)	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol , 15% Glycerol, ad 10 ml <i>Aqua destilata</i>
RNase A-Lösung	100 mg RNase in 10 ml 0,01 M Nariumacetat pH 5,2 gelöst, 15 Minuten auf 100°C erhitzen, langsam abkühlen lassen, 1 ml 1 M Tris-HCL pH 7.4 zugeben, aliquotiert, bei -20°C lagerstabil

Tail-Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 100 mM EDTA (pH 7,4), 1% SDS, 1 mg/ml Proteinase K
TBE-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0. Autoklaviert.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0. (Autoklaviert).
Tris-Base (1M)	121,1 g Tris-Base in 1000 ml <i>Aqua destilata</i> , pH 7,4. autoklaviert
Trypsin/EDTA	0,2 mM EDTA in PBS (autoklaviert), 0.025% Trypsin
Restriktionsmix (ES)	je nach Enzym 1x Restriktionspuffer, 1 mg/ml BSA, 2000 U/ml Restriktionsendonuklease
STET-Puffer	8% Saccharose, 5% Tween, 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA
SSC 20x	3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7-8
Waschpuffer 1	2x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer 2	1x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer 3	0,1x SSC, 0,1% SDS

2.1.5 Bakterienmedien

Die verwendeten Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und anschließend 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die angegebenen Mengen gelten jeweils für einen Liter Medium.

LB (Luria Bertani)-Medium	10 g Bactotrypton 5 g Yeast Extract 10 g Natriumchlorid pH 7,0 eingestellt mit HCl
2 x YT Medium	16 g Bactotrypton 10 g Yeast Extract 5 g Natriumchlorid pH 7,0 eingestellt mit HCl
Agar Platten	Zugabe von 15 g Agar zu einem Liter Medium, autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen. Dann Zugabe der entsprechenden Menge Ampicillin (100 µg/ml)

2.1.6 Zellkulturmedien

Dulbecco's *modified* Eagle Medium (DMEM) mit Natriumpyrovat und 4500 mg/l Glucose wurde von Invitrogen (Karlsruhe, D) als Fertigprodukt bezogen und mit 10% FCS, 1000 U/ml Penicillin-Streptomycin und 5,8 mg/ml L-Glutamin angereichert. Wurden Versuche mit DOX durchgeführt, so wurde dieses in Konzentrationen von jeweils 1 µg DOX per ml Medium eingesetzt. Zur Selektion elektroporierter embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) wurden 300 ng/ml G418 zugegeben.

2.1.7 Kits

Es wurden folgende kommerziell erhältliche Kits verwendet:

Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, D)
Expand Long Template PCR System	Roche (Mannheim, D)

One-Step-RT-PCR	Qiagen (Hilden, D)
Plasmid Midi und Maxi Kit	Qiagen (Hilden, D)
Prime It II Labelling Kit	Stratagene (Amsterdam, NL)
PRISM Ready Reaction Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt, D)
Pro Fection Mammalian Transfection System – Calcium Phosphate	Promega (Mannheim, D)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
QiaEx II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam, NL)

2.1.8 Geräte

Autoklav	KSG Sterilisatoren GmbH (Olching, D)
Bakterienbrutschrank	Heraeus (Hanau, D)
Bakterienschüttler	Certomat BS-T, B. Braun Biotech (Melsungen, D)
Computer	Power Macintosh G3 Gericom Laptop IBM PC Medion IBM PC

¹³⁷ Caesium-Quelle	Molsgaard Medical (DK)
DNA-Sequenziergerät ABI Prism TM 377	Applied Biosystems (Weiterstadt, D)
Elektrophoresekammern	Werkstatt des Instituts für Toxikologie, Mainz Hybaid AGS (Heidelberg, D)
Elektroporator	Gene Pulser II Bio Rad (München, D)
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr (Bieberach, D)
Hybridisierungsöfen	WTB Binder (Tuttlingen, D)
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr Deutschland Privileg Deluxe (Quelle, D)
Laborschüttler	UNIMAX 2010 Heidolph (Kehlheim, D)
Multichannelpipette	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikromanipulationsanlage	Leica (Wetzlar, D)
Mikropipetten (p20, p200, p1000)	Gilson (Bad Camberg, D)
Millipore H ₂ O-Anlage	Milli-Q plus Millipore GmbH (Eschborn, D)
Netzgerät	Consort E844 Braun (Melsungen, D)

pH-Meter	Multical Typ 538 Wiss. Tech. Werkstätten (Weilheim, D)
Photometer	Spectrophotometer Spectronic Genesys 5 (Spectronic Instruments Inc., USA)
Pipetman	Pipetus-akku Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Röntgenfilmkassetten (mit Verstärkerfolie)	Dr. Goos-Suprema (Heidelberg, D)
Sicherheitswerkbank	Klasse 2 Modell 5 Nunc (Wiesbaden, D)
Stereomikroskop	Olympus (Hamburg, D)
Szintillationsmessgerät	Tri-Carb 2100 TR Canberra-Packard (Dreieich, D)
Sterilisationsofen	Heraeus (Hanau, D)
Stickstofftank	Air Liquide Kryotechnik GmbH (Düsseldorf, D)
Thermoblock	Dri-Block DB-3A Techne (Cambridge, GB)
Thermocycler	Mastercycler Gradient Eppendorf (Hamburg, D) Mastercycler Eppendorf (Hamburg, D) UNO 96 Biometra (Göttingen, D)
Transjector	Eppendorf (Hamburg, D)

Ultra-Thurax	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Ultratiefgefrierer (-80°C)	Snijders (Tilburg, NL)
Ultrazentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B DuPond (Bad Homburg, D)
UV-Transluminator und Videosystem	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
UV-Stratalinker	Stratagene (Amsterdam, NL)
Vortex	Heidolph (Kehlheim, D)
Wasserbad	Grant Science Services (München, D)
Zellkultur Inkubator	Nunc (Wiesbaden, D)
Zentrifugen	Laborzentrifuge 400 R Heraeus (Hanau, D)
Tischzentrifuge	Eppendorf 5417 C Eppendorf (Hamburg, D) Biofuge pico Heraeus (Hanau, D)

2.1.9 Software

Folgende Software wurde zumeist zur Editierung und Verwaltung von DNA-Sequenzen verwendet:

DNA-Strider 1.2	CEA (Gif-sur-Yvette, F)
Mac-Plasmap 2.1	CGC Scientific Ltd. (St. Louis, USA)
Sequencher Demo Version	Gene Codes Corporation (Ann Harbor, USA)
EditView 1.0.1	Perkin Elmer (USA)
Textverarbeitung, Graphikprogramme Microsoft Office	Microsoft (USA)

2.1.10 Enzyme

2.1.10.1 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen stammten von der Firma New England Biolabs (NEB) (Frankfurt a. M., D).

Es wurden jeweils die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen verwendet.

2.1.10.2 DNA modifizierende Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP) (1U/μl)	Roche (Mannheim, D)
DNA Polymerase Large Fragment (Klenow) (5 U/μl)	Biolabs (Frankfurt a. M., D)
DNA Polymerase Large Fragment (Klenow) (5 U/μl)	Boehringer Mannheim (Mannheim, D)
AmpliTaq-DNA-Polymerase (5U/μl)	Perkin-Elmer (Ueberlingen, D)

T4 DNA Ligase (400U/μl) Biolabs (Frankfurt a. M., D)

T4 DNA Polymerase (3U/μl) Biolabs (Frankfurt a. M., D)

Vent DNA Polymerase (2U/μl) Biolabs (Frankfurt a. M., D)

2.1.11 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D), von der Firma Metabion (München, D) oder der Firma Roth (Karlsruhe, D) bezogen.

2.1.11.1 Sequenzierprimer für Targetingkonstrukte und transgenes Konstrukt

CS-1 5' GAC ACC CCC ACA TTG CTC CAG 3'

CS-2 5' CCG CCC CCT ACG GCG CTC TG 3'

CS-3 5' GTA TTG GGC GCT CTT CCG 3'

CS-4 5' GGC GGC GAA TGG GCT GAC CGC 3'

CS-5 5' TCG CTT CTG TGA ATG CAT GC 3'

CS-6 5' CGG CAC AAC CCC AGT GCC ACG 3'

CS-7 5' GCG CCG CTG CGC GCT CCT AGC 3'

CS-8 5' CGA CGG CCC CGT GCT GCT GCC 3'

NS-1 5' CAG TGT AGG CTG CTC TAC ACC 3'

NS-2 5' CAG TGT AGG CTG CTC TAC ACC 3'

NS-3	5' CAC GCG TCA CCT TAA TAT GC 3'
NS-4	5' CAT GGA CCT GGG TGA AGA TGG 3'
NS-5	5' GGT ACC CGG GTC GAG TAG GCG 3'
NS-6	5' GGG TCA AGG AAG GCA CGG GGG 3'

2.1.11.2 PCR-Primer für die Genotypisierung von Tieren

CRE-5'	5' ATG TCC AAT TTA CTG ACC GTA CAC C 3'
CRE-3'	5' TAC GCG TTA ATG GCT AAT CGC C 3'
EGFP-C	5' CCA CCT ACG GCA AGC TGA C 3'
EGFP-NC	5' GGC GGA TCT TGA AGT TCA CC 3'
rtTA-5'	5' GTG ATT AAC AGC GCA TTA GAG C 3'
rtTA-3'	5' CTT GAT CTT CCA ATA CGC AAC C 3'
SCL-C	5' CTT CAC TCT GTT TGC CTC TTC 3'
SCL-NC	5' CTT CTA CAG GAC GTG CTT TCC 3'

2.1.11.3 RT-PCR Primer

mGAPDH-1	5' CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA 3'
mGAPDH-2	5' CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT 3'

rtTA/SCL-5'	5' GAC TAG TAG CCG AGT AGG TCT CTC TAA ATA TGC 3'
rtTA/SCL-3'	5' AGA GGA GAC AAT GGT TGT CAA CAG AG 3'
SCL-RT-1	5' GGA GAT TTC TGA TGG TCC TCA CAC C 3'
SCL-RT-2	5' AGA GGA GAC AAT GGT TGT CAA CAG AG 3'

2.1.11.4 Mutagenese Primer und PCR Primer für Klonierungen

1268MutNheI-C	5' CTT ACC CTG TTA CAG GCT AGC GGA GCG GCC GGC 3'
1268MutNheI-NC	5' GCC GGC CGC TCC GCT AGC CTG TAA CAG GGT AAG 3'
1062-5'-AvrII	5' ATC CTA GGT GCA GCT GAG CCC GCC CGC G 3'
1062-3'-AvrII	5' TAC CTA GGC GGC CGT CTC CAG GCA GCT C 3'
1062-3'-NheI	5' TAC GCT AGC GGT TCC CCA AAG AAC CCA CTA TG 3'
1062-5'-StuI	5' CTC CAG CTC CAG GCC TGT GG 3'
M13forward	5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'
M13revers	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

2.1.11.5 Long Template PCR Primer

k-i-3'revers2	5' ACA AAG TGA CAA GCT CAC TGG TGT G 3'
k-i-neoforward1	5' TGA CTG GGC ACA ACA GAC AAT CGG C 3'

2.1.12 Vektoren

2.1.12.1 Klonierungsvektoren

pBlueskript II SK (+)	Statagene (Heidelberg, D)
pGEM 11 ZF+	Promega (Mannheim, D)
pGL2basic	Promega (Mannheim, D)

2.1.12.2 Säuger-Expressionsvektoren

pBi EGFP	BD Clontech (Heidelberg, D)
pcDNA 3.1 hygro	Invitrogen GmhB (Karlsruhe, D)
pUHD-17-1	Prof. Bujard, ZMBH (Heidelberg, D)
pUHD-20-1	Prof. Bujard, ZMBH (Heidelberg, D)
pUHT-61-1	Prof. Bujard, ZMBH (Heidelberg, D)

2.1.13 Molekulargewichtsmarker

Um die Größe elektrophoretisch aufgetrennter DNA/RNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden neben den zu untersuchenden Proben auch DNA/RNA Ladder als Vergleichsstandard aufgetragen. Hierzu wurden jeweils 0,5 µg des 1 kb DNA Ladder (2µg RNA Ladder) New England Biolabs (Frankfurt a. M., D) bzw. 0,5 µg des 1 kb DNA Ladder der Firma Gibco (Karlsruhe, D) verwendet.

2.1.14 Bakterienstämme

Für die Transformation von Plasmid DNA und Ligationsansätzen wurden ausschließlich *Escherichia coli* K 12 Derivatstämme verwendet:

DH5 α : supE44 deltalacU169 (ϕ 80lacZdeltaM15)hsdR17recA1 endA1
gyrA96 thi-1 relA1

TOP 10: deoR+, endA1-, recA1-, lacZdelta M15+, hsdRMS+,
delta (mrv-mcr BC)

2.1.15 Zelllinien

NIH 3T3: Maus Embryofibroblasten von ATCC (Nummer: CRL-1658)

ES-Zelllinie W9.5 (Genotyp 129/Sv.Ce-⁺c⁺p inbred strain,
Szabo and Mann 1994)

2.1.16 Tiere

Die verwendeten Mäuse stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden von der Firma Charles River (Sulzberg, D) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes in Filtertopkäfigen bzw. *individually ventiated cages* (IVC) Käfigen.

Für die Generierung der transgenen und *knock-in* Linien wurden folgende Mausinzuchtstämme verwendet:

zur Mikroinjektion: Black6/DBA2 F1

zur Blastozystinjektion: FVB

scheinschwangere Ammenmütter: NMRI

als Blastozystendonoren: Black6/DBA2 F1

Ferner wurde folgende Mauslinie verwendet:

Sycp-CRE Generaldeleter Vidal et al. 1998 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. M. Busslinger (IMP Wien) zur Verfügung gestellt.

Die generierten Linien wurden jeweils auf einen Black6/C57J Stamm zurückgekreuzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

2.2.1.1 Präparation aus 3 ml Kulturen („Mini-Prep“)

Zunächst wurden drei ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (150 U/min). Am folgenden Tag wurden jeweils 1,5 ml der Kulturen bei 14000 U/min zwei Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in 250 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach gründlichem Vortexen des Pellets wurden die Proben 55 Sekunden im Wasserbad aufgeköcht und dann zehn Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert.

Der pelletierte Zelldebris wurde nun mittels eines autoklavierten Zahnstochers entfernt und die Plasmid DNA durch Zugabe von 220 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation (zehn Minuten, 14000 U/min) gefällt.

Der Überstand wurde verworfen und das getrocknete DNA-Präzipitat in 30 µl *Aqua destilata* gelöst, welchem RNase A in einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben wurde.

2.2.1.2 Präparation aus 30 ml/400 ml Kulturen („Midi-Prep“/„Maxi-Prep“)

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Purification Protokolls. Hierfür wurden zunächst 30/400 ml LB/ Amp-Medium mit einer Einzelkolonie

angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (150 U/min). Die Bakterienkultur wurde am nächsten Tag bei 4500 U/min 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in vier/zehn ml Puffer 1 (4°C) resuspendiert und mit vier/zehn ml Puffer 2 für fünf Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Danach folgte die Zugabe von vier/zehn ml Puffer 3 (4°C) und vorsichtiges Invertieren des Lysats. Der „Midi-Prep“ wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur, der „Maxi-Prep“ 20 Minuten bei 4°C stehen gelassen. Das Lysat wurde dann durch eine mit Glaswolle gestopfte Einwegspritze gedrückt und in die bereits mit 4/10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Quiagen-Tip-100/500-Säule einlaufen gelassen, wodurch die Zelltrümmer und die anheftende bakterielle DNA vom Plasmid getrennt wurden. Anschließend wurde die Säule mit zwei Mal 10/30 ml QC-Puffer gewaschen und mit 5/15 ml vorgewärmten (60°C) QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in einem Correxröhrchen aufgefangen, 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben, gut gemischt und bei 10000 (U/min) (4°C) eine Stunde zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde die DNA in 400 µl *Aqua destilata* aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in einem entsprechenden Volumen *Aqua destilata* (50/500 µl) über Nacht bei 4°C gelöst.

2.2.2 Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Reinigung von DNA erfolgte durch Extraktion mit Phenol-Chloroform. Es wurde dazu ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 25:24:1) zum Ansatz zugegeben, kurz gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur und 14000 U/min zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erneut extrahiert und die DNA mit Natriumacetat und Isopropanol gefällt.

2.2.3 Fällern von DNA

Die Fällung von DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol absolut oder Isopropanol. Nach mindestens 30 minütiger Lagerung bei -20°C wurde die DNA sedimentiert (30 Minuten, 14000 U/min), mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in *Aqua destilata* gelöst.

2.2.4 Isolation genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien

Es wurden jeweils 0,5-1 cm lange Schwanzbiopsien von etwa drei bis vier Wochen alten Tieren mittels einer in Ethanol sterilisierten Schere entnommen. Diese Schwanzbiopsien wurden über Nacht in 500 µl Tail-Lysis-Buffer bei 55°C auf dem Laborschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 30 min bei 14000 U/min zentrifugiert, der wässrige Überstand abgenommen und die genomische DNA wie in 0 beschrieben mit Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Isopropanolfällung und zweimaligem Waschen mit 75% Ethanol wurde die DNA nach Trocknen in 100 µl 0,25x TE aufgenommen und bei 4°C gelöst und gelagert.

2.2.5 Isolation genomischer DNA aus Zellkulturen muriner embryonaler Fibroblasten

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus adhärenenten Zellen (meist konfluent gewachsene P100 Kulturschale) wurden diese nach Absaugen des Kulturmediums zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst. Anschließend wurden die abgelösten Zellen fünf Minuten bei 1000 U/min abzentrifugiert und in 500 µl Tail-Lysis-Buffer aufgenommen. Nach Inkubation bei 55°C über Nacht wurde die DNA mittels Phenol/Chloroform (siehe 0) aufgereinigt und gefällt. Die DNA wurde dann in 100 µl *Aqua bidestillata* aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.2.6 Isolation genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Die Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen erfolgte nach der modifizierten Methode von Hogan et al. 1994. Die ES-Zellen wurden hierfür in mit Gelatine beschichteten 96-*well*-Kulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert, dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 55°C in der feuchten Kammer mit jeweils 50 µl ES-Lysis Buffer inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei -20°C tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 100 µl eiskaltem absolutem Ethanol pro *Well*. Die Platten wurden dann erschütterungsfrei bei Raumtemperatur für mindestens 60 min stehen gelassen. Hierbei sedimentiert die genomische DNA und setzt sich am Boden des

Wells ab. Durch sehr vorsichtiges Invertieren der Platte wurde der alkoholisch/wässrige Überstand verworfen und langsam eiskalter 75% Ethanol zum Waschen der DNA zugegeben. Das Waschen wurde zweimal wiederholt und die DNA nach Trocknen in 50 µl Restriktionsmix pro *Well* gelöst und in der feuchten Kammer bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.7 Isolation von RNA aus murinen Geweben

Die Isolation von RNA aus murinen Geweben erfolgte nach der modifizierten Methode von Chomczynski and Sacchi 1987. Hierzu wurde Trizol-Reagenz verwendet. Die RNA wurde nach Vorschrift des Herstellers aus jeweils 100-200 mg Gewebe isoliert. Hierzu wurden die Gewebe sofort nach Töten des Tieres entnommen und sogleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Proben wurden dann in fünf ml Trizol-Reagenz aufgenommen und mit einem UltraThurrax homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils ein Milliliter Chloroform zugegeben, gut gemischt und drei Minuten inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4500 U/min wurden die beiden Phasen getrennt und die wässrige Phase vorsichtig abgenommen. Durch Zugabe von 2,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 14000 U/min wurde die RNA gefällt, dann mit 75% Ethanol gewaschen, in jeweils 30-100 µl RNase-freiem Wasser gelöst, dem 1 µl RNase-Inhibitor zugesetzt wurde, und bei -70°C gelagert.

2.2.8 Isolation von RNA aus murinen embryonalen Fibroblasten und NIH3T3-Zellen

Die Isolation von RNA aus adhärennten Zellen in Kultur (meist konfluent gewachsene P100 Kulturschale) erfolgte mit dem kommerziellen RNeasy Mini Kit. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen in 350 µl Puffer RLT gelöst und mittels QiaShredder Zentrifugationssäulchen homogenisiert. Das Eluat wurde mit 350 µl 70% Ethanol versetzt und gemischt. Anschließend wurde die RNA-haltige Lösung auf die im Kit mitgelieferten RNeasy Mini Zentrifugationssäulen gegeben und bei 14000 U/min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit RW1 und ebenfalls zweimaligem Waschen mit Puffer RPE wurde die RNA in 50µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -70°C gelagert.

Sollte die RNA in einer RT-PCR Reaktion eingesetzt werden, wurde ein zusätzlicher DNase Verdau, zur Eliminierung residueller DNA, nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

2.2.9 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration

Die Bestimmung erfolgte nach dem von Sambrook et al. beschriebenen photometrischen Verfahren (Sambrook et al. 1989). Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung wurde der Gehalt mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05$$

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,04$$

2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erfolgte nach der Methode von Saiki et al. 1988 und wurde in einem Volumen von 50 μl durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus: 1/10 Volumen 10x DNA Polymerase Puffer je 20 pmol der jeweiligen Primer, 100 μM aller vier dNTPs, sowie 1 μl Vent DNA Polymerase. Als Template wurde entweder gereinigte Plasmid-DNA (50-100 ng) oder genomische Maus-DNA (0,5-1 μg) eingesetzt. Typischerweise wurde folgendes Standard PCR-Protokoll verwendet:

Einer initialen Denaturierung bei 94°C (4 min) folgten 30-35 Zyklen mit jeweils einer Minute Denaturierung bei 94 °C, einer Minute Primerannealing bei 55-60°C (je nach eingesetzten Primern) und einer Minute Elongation bei 72°C, gefolgt von einem finalen Elongationsschritt (72°C, 8 min). Alle PCR Reaktionen wurde auf einem Eppendorf Mastercycler oder Mastercycler Gradient ausgeführt.

Zur Überprüfung wurden je 10 μl der jeweiligen PCR-Reaktion auf einem 1% Agarosegel mittels Gelelektrophorese analysiert.

2.2.11 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Zur sequenzspezifischen Amplifikation von mRNA-Fragmenten wurde auf die Methode der RT-PCR zurückgegriffen. Diese wurde mit Hilfe des kommerziellen One-Step RT-PCR Kits durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz beinhaltete in 50 µl jeweils 10 µl 5x Reaktionspuffer, 40 pmol der jeweiligen sequenzspezifischen Oligonukleotide zusammen mit je 0,4 pmol mGAPDH-spezifischer Kontrolloligonukleotide, 1-4 µg RNA, 2 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM), 1 µl RNase Inhibitor und 2 µl Enzymmix (Omniscript™ Reverse Transkriptase, Sensiscript™ Reverse Transkriptase und HotStarTaq™ DNA-Polymerase). In der Erststrangsynthese wurde die RNA bei 50°C mittels der zwei zugegebenen Reversen Transkriptasen und der zugegebenen Oligonukleotide in sequenzspezifische cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde durch Erhitzen auf 95°C für 15 min die Reverse Transkriptase inaktiviert, sowie die Hot Start DNA-Polymerase aktiviert. Diese sorgte dann im anschließenden PCR-Cycling für die Amplifikation der spezifisch synthetisierten cDNA. 15 µl einer solchen RT-PCR-Reaktion wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und dokumentiert.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung beruht auf der von Sanger et al. (Sanger et al. 1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode, die von Lee et al. (Lee et al. 1992) durch Verwendung fluoreszierender Didesoxynukleotide modifiziert wurde. Die Sequenzierung erfolgte mit dem *PRISM Ready Reaction Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* in einer linearen PCR-Reaktion. Es wurden standardmäßig je 0,5 – 1 µg zu sequenzierende Plasmid-DNA und 10 pmol Sequenzierprimer eingesetzt. Zum Ansatz wurden 4 µl Premix zugegeben und dann das Volumen durch Zugabe von *Aqua destilata* auf 10 µl aufgefüllt. Das Cycle-Sequencing Programm wurde auf einem Eppendorf Mastercycler Gradient ausgeführt. Zunächst wurde die DNA für zwei Minuten bei 96°C denaturiert. Danach folgten 35 Zyklen mit jeweils 18 Sekunden Denaturierung bei 96°C und vier Minuten Kettenverlängerung bei 59°C. Die Fällung der Sequenzierprodukte erfolgte durch Erhöhung des Volumens auf 200 µl mit *Aqua destilata*, Zugabe von 20 µl 3 M NaAc (pH4,8) und 400 µl absolutem Ethanol. Das getrocknete Pellet wurde in 2-3 ml deionisiertem Formamid/50 mM EDTA gelöst und vor dem Auftragen zwei Minuten denaturiert. Die Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese und

nachfolgende Auswertung erfolgte mit Hilfe einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur und der korrespondierenden Edit View 1.0.1 Software .

2.2.13 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen gemäß ihrer Molekülgröße (Fisher and Dingman 1971). Sowohl zur Analyse als auch zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden horizontale, native Agarosegele verwendet, wobei sich die gewählte Agarosegelkonzentration aus der Größe der aufzutrennenden Fragmente ergibt. In der Regel wurden 1%ige Gele verwendet.

Der entsprechende Anteil an Agarose wurde in 1x TBE Puffer aufgekocht, mit 4 µl/100 ml Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) versetzt und in die Gelkammer gegossen, wobei mittels eines Kunststoffkammes die Probestaschen ausgespart blieben. Nach Erstarren des Gels und der Entnahme des Kammes wurden die Proben mit 1/10 Volumen Laufpuffer gemischt, aufgetragen und das Gel in der Agarosegelelektrophoresekammer (gefüllt mit 1x TBE-Puffer) mit maximal 80 Volt Spannung laufen gelassen. Anschließend wurden die Gele mittels UV-Transluminator dokumentiert und ausgewertet.

2.2.14 Präparative Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAEX II DNA Gel Extraction Kits gemäß den Herstellervorschriften aus dem Gelblock extrahiert.

2.2.15 Restriktionsverdau von DNA

2.2.15.1 Analytischer Verdau

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in einem Endreaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt.

2.2.15.2 Präparativer Verdau

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in einem Endreaktionsvolumen von 50 µl eingesetzt. Wurde mit zwei oder mehr Enzymen geschnitten, so wurde entweder ein Reaktionspuffer gewählt, in dem alle Enzyme effizient schnitten oder die Reaktion sequenziell durchgeführt. Zu diesem sequentiellen Verdau wurde die DNA nach dem ersten Verdau gefällt und danach mit dem nächsten Enzym verdaut.

Sowohl beim analytischen wie auch beim präparativen Verdau von DNA wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen unter Einsatz der jeweiligen Puffer eingehalten.

2.2.16 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um bei einer Ligation mit einer Insert-DNA einer Religation der beiden Vektorenden der linearisierten Plasmid-DNA vorzubeugen, wurden die terminalen 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA durch Inkubation mit alkaliner Phosphatase entfernt. Auf diese Weise konnte die Religation des Plasmids ohne Integration der Insert-DNA vermindert werden.

Die Dephosphorylierung erfolgte in unmittelbarem Anschluss an den Restriktionsverdau. Nach der gewünschten Inkubationsdauer des Restriktionsansatzes, wurde diesem lediglich eine Einheit alkaline Phosphatase zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (20 Minuten bei 75°C) gestoppt und mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Auffüllen von DNA 5'-Überhängen

Um auch die Ligation von zunächst nicht kompatiblen Überhängen zu ermöglichen wurde die 5'-3'-Polymeraseaktivität des großen Fragments der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) genutzt. Diese modifizierte DNA-Polymerase I ist in der Lage einzelsträngige 5'-Überhänge von DNA-Fragmenten aufzufüllen und glatte Enden (*blunt ends*) zu generieren. Das Auffüllen erfolgte in unmittelbarem Anschluss an den Restriktionsverdau des Plasmids. Nach der gewünschten Inkubationsdauer des Restriktionsansatzes, wurde diesem lediglich fünf Einheiten DNA-Polymerase (Klenow) und 3 µl dNTPs (jedes 10 mM) zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (20 Minuten bei 75°C) gestoppt und entweder mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese aufgereinigt oder mit Restriktionsendonukleasen weiter verdaut.

2.2.17 Entfernen von DNA 3'-Überhängen

Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase ist in der Lage, einzelsträngige 3'-Überhänge von DNA-Fragmenten abzutrennen und glatte Enden (*blunt ends*) zu generieren. Auf diese Weise ist die Ligation von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Überhängen möglich. Das Abtrennen von 3'-Überhängen erfolgte in unmittelbarem Anschluss an den Restriktionsverdau der DNA. Nach der gewünschten Inkubationsdauer des Restriktionsansatzes, wurde diesem lediglich drei Einheiten T4 DNA-Polymerase und 3 µl dNTPs (jedes 10mM) zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (zehn Minuten bei 75°C) gestoppt und entweder mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese aufgereinigt oder mit Restriktionsendonukleasen weiter verdaut.

2.2.18 Ligation von DNA

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe von zwei miteinander kompatiblen DNA-Enden. In dieser Arbeit wurde T4-DNA-Ligase verwendet, um DNA-Fragmente in entsprechend linearisierte Plasmid-DNA zu integrieren. Hierzu wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 10 µl unter Verwendung des mitgelieferten Reaktionspuffers mit 400 Einheiten T4 DNA-Ligase inkubiert. Dabei wurde Insert- und Vektor-DNA meist in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt, wobei insgesamt 10-100 ng DNA eingesetzt wurden. Der Reaktionsansatz wurde in der Regel über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.19 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Plasmid-DNA oder frische Ligationsansätze aufnehmen zu können (Transformation), müssen Bakterienzellen zuerst für die Aufnahme dieser DNA vorbereitet werden. Zu diesem Zweck wurden wenige Mikroliter einer Bakterienglycerinkultur in 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 U/min im Schüttelinkubator hochgewachsen. Die 50 ml Bakterienkultur wurde dann zu einem Liter LB-Medium gegeben und weitere zwei Stunden bei 37°C und 200 U/min geschüttelt bis eine OD₅₅₀ von 0,5-0,6 erreicht war. Dann

wurde die Kultur auf jeweils auf 4°C vorgekühlte, autoklavierte 250 ml Zentrifugenflaschen verteilt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension (15 Minuten bei 3000 U/min und 4°C) in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets in jeweils 250 ml eiskaltem, sterilem *Aqua destilata* resuspendiert und dann wiederum 15 Minuten bei 3000 U/min (4°C) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden dann jeweils nur noch 125 ml eiskaltes, steriles *Aqua destilata* auf die Pellets gegeben, resuspendiert und dann jeweils der Inhalt zweier Flaschen zusammengegeben. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (15 Minuten bei 3000 U/min und 4°C) und dem Verwerfen des Überstands wurden die zwei Bakterienpellets in je 20 ml 10% Glycerol (ebenfalls eiskalt) resuspendiert, in 2 sterile, eisgekühlte Correxröhrchen überführt und 15 Minuten bei 5700 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 1 ml 10% Glycerol gelöst. Die kompetenten Bakterien wurden nun à 50 µl in autoklavierte, vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.20 Transformation

Um Plasmid DNA in kompetente Bakterien einzuschleusen, wurde die Methode der Elektroporation angewendet. Hierzu wurden kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und dann in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand) gegeben, in die zuvor bereits 1,5 µl eines Ligationsansatzes oder in Wasser gelöste Plasmid-DNA pipetiert wurde. Nach der gleich im Anschluss folgenden Elektroporation (200 Ohm, 25µF und 2.5 kV) wurden sofort 150µl 2xYT-Medium in die Küvette gegeben und diese dann 15-30 Minuten bei 150 U/min und 37°C im Bakterienschüttler zur Induktion der Expression des β-Lactamase-Resistenzgens inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert, wobei je nach erwarteter Ligations- bzw. Transformationseffizienz 20-200µl Suspension pro Platte verwendet wurde. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert und die gewachsenen Einzelkolonien am folgenden Tag in LB-Medium überimpft.

2.2.21 TOPO TA Cloning

Um PCR-Amplifikate schnell und effizient zu klonieren, wurde der kommerzielle TOPO TA Cloning Kit verwendet. Die Klonierung erfolgte dabei stets nach Herstellervorschrift. Sollte ein mittels Vent-Polymerase amplifiziertes DNA-Fragment inkloniert werden (dessen 3' Ende keinen A-Überhang beinhaltet, da Vent-Polymerase zu 99% *blunt ends* generiert) musste zuerst mit einer Taq-Polymerase ein 3' A-Überhang generiert werden. Dazu wurde das PCR-Amplifikat gefällt und in 50 µl 1x Polymerasepuffer, 0,2 mM dATP, 5 U AmpliTaq gelöst und bei 68°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf einem Agarosegel (siehe 0) elektrophoretisch aufgetrennt und aus der Agarose eluiert. Die eluierte DNA wurde dann zum TOPO TA Cloning eingesetzt.

2.2.22 Site-directed Mutagenese

Für die gerichtete Mutagenese wurde der kommerzielle QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Die Vorgehensweise und Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellervorgaben.

2.2.23 Hybridisierungstechniken

2.2.23.1 Oligonukleotid-labelling

DNA-Fragmente wurden nach der von Feinberg and Vogelstein 1983 beschriebenen Methode des *random primed oligolabelling* radioaktiv markiert. Hierzu kam der kommerzielle Kit Prime It II zur Anwendung. Dabei wurden 10-50 ng der zu markierenden DNA-Sonde und 10 µl 9mer Oligonukleotide hitzedenaturiert (zehn Minuten, 100°C), anschließend 10 µl dCTP 5x Reaktionspuffer zugegeben und in einem 50 µl Ansatz mit 25 µCi [α -³²P]dCTP und 1 ml Klenow DNA-Polymerase für 10-20 min bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte mittels Sephadex G50 *Nick Columns* nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Einbaueffizienz wurde 1 µl des Eluats im Szintillationszähler analysiert.

2.2.23.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten und *Southern Blotting*

DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden mit der von Southern beschriebenen Methode auf Nylonmembranen transferiert (Southern 1975), wobei ein unidirektionaler Aufbau verwendet wurde (Sambrook et al. 1989). Als Transferpuffer diente 10x SSC. Dabei wurden ca. 15 µg der zu untersuchenden genomischen DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut und über ein 1%iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarosegel mit der elektrophoretisch aufgetrennten DNA wurde anschließend mittels Videodokumentationssystem dokumentiert.

Um den Transfer von großen DNA-Fragmenten zu erleichtern, wurde das Gel für 20 min in 0,25 M HCL inkubiert und anschließend fünf Minuten in *Aqua destilata* gewaschen. Danach wurde das Gel zunächst für 30 min in Denaturierungspuffer und anschließend für 30 min in DNA-Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer der DNA-Fragmente erfolgte für 16-48 h mit 20x SSC als Transferpuffer durch Kapillarkraft. Nach Abschluss des Transfers wurde die Nylonmembran vom Gel getrennt, die Position der Geltaschen mit Kugelschreiber auf dem Filter festgehalten und der Filter bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fixierung der DNA auf dem Filter erfolgte durch Bestrahlung des Filters mit UV-Licht (1200 kJ) in einem *UV Stratalinker 1800*. Die Prähybridisierung von DNA-Filtern erfolgte in Church-Hybridisierungspuffer für 30-60 min bei 65°C. Zur Hybridisierung einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (vgl. Kap. 0) wurde diese hitzedenaturiert (fünf Minuten, 100°C) und zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Im Anschluss daran wurde die Sonde mit frischem, vorgewärmtem (65°C) Church-Hybridisierungspuffer gemischt (Endkonzentration der Sonde: 1-2x 10⁶ cpm/ml) und zusammen mit dem DNA-Filter über Nacht unter ständiger Rotation bei 65°C inkubiert. Das Waschen der Filter wurde mit Waschpuffer1 (15 min bei Raumtemperatur), Waschpuffer2 (2x 20 min bei 65°C) und Waschpuffer 3 (30 min bei 65°C) durchgeführt. Zur Signaldetektion wurde die noch feuchte Membran in Haushaltsfolie gewickelt, und in einer mit Verstärkerfolie ausgekleideten Kassette für 10-14 Tage bei -80° C mit einem Röntgenfilm autoradiografiert.

2.2.24 Zellkultur

Um Kontaminationen zu verhindern wurden alle Arbeitsschritte unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Zellinkubator bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre, 5% CO₂-Gehalt und 37°C kultiviert.

2.2.24.1 Konservierung von Zellen

Nach Trypsinisieren der Zellen wurden diese in 5 ml Medium (5% FCS) aufgenommen, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und dann bei 800 U/min 8 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 2-3 ml FCS/10% DMSO gelöst und 1 ml der Suspension in je ein Kryoröhrchen aliquotiert. Daraufhin wurden die Kryoröhrchen zunächst in Styroporbehälter verpackt im -80°C Gefrierschrank eingefroren (drei Monate haltbar) und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.24.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden so schnell wie möglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Kryoröhrchen dem -80°C Gefrierschrank oder dem flüssigen Stickstoff entnommen wurden. Der Inhalt der Kryoröhrchen wurde dann in 3 ml Medium (5% FCS) aufgenommen, in ein 15 ml Falcon überführt und bei 800 U/min 8 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 10 ml 10%FCS-Medium resuspendiert und auf eine P 100 Kulturschale gegeben.

2.2.24.3 Isolation primärer Fibroblasten aus murinen Embryonen

Zur Gewinnung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) wurden männliche adulte Mäuse der jeweils zu untersuchenden transgenen Linien mit Wildtyp BL6/C57J Weibchen verpaart. Nach positivem Nachweis eines Vaginalpropfes wurde dieser Plaquetag als d0.5 definiert. Die weiblichen Tiere wurden dann an Tag d12.5-d14.5 getötet und die Embryonen entfernt. Nach Entfernen der Extremitäten, des Kopfes sowie der inneren Organe, wurden die Embryonen mit einer Schere fein zerteilt und in Trypsin/EDTA für zehn Minuten

bei 37°C geschüttelt. Die hierbei vereinzelt Zellen wurden in DMEM (10% FCS) aufgenommen, bei 1000 U/min abzentrifugiert und in zehn ml Kulturmedium auf P 100 Kulturschalen ausgesät. Die Platten wurden bei Konfluenz der Zellen 1:5 gesplittet und mindestens sieben Tage in Kultur gehalten, um die Fibroblastenkultur anzureichern.

2.2.24.4 Transfektion von Plasmid-DNA in NIH 3T3-Zellen und MEFs

Zwei Tage vor der Transfektion wurde eine in 5% FCS-Medium gehaltene konfluent gewachsene P 100 Kulturschale trypsinisiert und im Verhältnis 1:5 auf P 100 Schalen mit 10% FCS-Medium ausgesät. Nach zwei Tagen wurden diese Schalen dann im Verhältnis 1:5 im Falle der NIH 3T3 Zellen und 1:10 im Falle der MEFs auf P 100 Schalen mit 10% FCS-Medium ausplattiert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion unter der Verwendung des Promega Pro Fection Mammalian Transfection Systems gemäß der Herstellervorschrift, wobei die zu transfizierende DNA in zirkulärer Form vorlag. Es wurden pro Ansatz jeweils 10 µg Plasmid DNA eingesetzt. Die NIH 3T3-Zellen wurde als Kontrolle mittransfiziert.

2.2.24.5 Expansion und Kultur von embryonalen Stammzellen W9.5

Die embryonalen Stammzellen der Linie W9.5 wurden in DMEM (10% FCS) mit 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren, 5 ml β-Mercaptoethanol und 10⁷ Einheiten Lif ESGRO auf STO-Feederzellen kultiviert und expandiert. Die STO-Feederzellen wurden jeweils vor dem Zufügen der ES-Zellen mittels γ-Strahlung (5000 rad) in der Cäsiumquelle irradiert. Um die spontane Differenzierung der ES-Zellen zu vermeiden, wurde das Medium täglich gewechselt.

2.2.24.6 Elektroporation embryonaler Stammzellen

Um die homologe Rekombination des elektroporierten Targetingkonstruktes so effektiv wie möglich zu gestalten wurden die amplifizierten ES-Zellen wie folgt behandelt.

Das Medium der zu elektroporierenden ES-Zellen (vier P 100 Kulturplatten) wurde jeweils drei Stunden vor der geplanten Elektroporation gewechselt. Die Zellen wurden dann trypsinisiert, abzentrifugiert (1000 U/min, 10 min), mit PBS gewaschen und in einem

entsprechenden Volumen PBS zu einer Endkonzentration von etwa 1×10^7 Zellen resuspendiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen vereinzelt wurden. Die Zellsuspension wurde nun zusammen mit 40 μg linearisiertem Targetingkonstrukt in 4 mm Elektroporationsküvetten gegeben und bei Raumtemperatur fünf Minuten inkubiert. Danach wurde die DNA des Targetingkonstruktes in die ES-Zellen elektroporiert. Die Konditionen hierbei waren jeweils 240 Volt, 500 μF und 200 Ohm als Einstellung des Gene Pulsers. Nach der Elektroporation blieben die ES-Zellen in der Küvette fünf Minuten bei Raumtemperatur. Währendessen wurde das Medium der Feederzellen gewechselt. Die ES-Zellen wurden dann auf jeweils vier mit Feederzellen beschichteten P100 Kulturschalen pro elektroporierter Küvette ausgesät. Nach 24 h wurde Selektionsmedium mit einer G418-Konzentration von 300 ng/ml zugegeben. Eine der vier Platten blieb dabei als Negativkontrolle ohne Selektionsmedium. Das Kulturmedium wurde nun jeden Tag gewechselt, bis individuelle Kolonien sichtbar wurden.

2.2.24.7 Isolation individueller ES-Kolonien nach Elektroporation

Die Vereinzelung der individuellen ES-Kolonien erfolgte jeweils auf fünf Replikplatten im 96-well-Format. Jeweils drei dieser 96-well-Platten wurden vor dem Transfer der ES-Zellkolonien mit Feederzellen eingesät, zwei der Platten wurden nur mit Gelatine zum besseren Anheften der Kolonien beschichtet. Nachdem Einzelkolonien auf den P 100 Kulturschalen gewachsen waren und distinkte Einzelkolonien gut zu erkennen waren, wurden die Platten mit PBS gewaschen und dann etwa 1 ml PBS auf die Platte gegeben. Unter dem Stereomikroskop wurden nun Einzelkolonien in eine 96-well-Platte transferiert, welche 10 μl PBS pro Well enthält. Wenn alle 96 wells der Platte Einzelkolonien enthielten, wurden diese mit 10 μl Trypsin inkubiert, vereinzelt und durch Zugabe von 80 μl Kulturmedium die Wirkung des Trypsins inaktiviert. Die Zellklone wurden nun sieben Tage, unter täglichem Mediumwechsel hochgewachsen. Anschließend wurden die vereinzelt Klone auf die vorher beschriebenen fünf Replikplatten verteilt und dort jeweils unter täglichem Mediumwechsel propagiert. Bei adäquater Zellkonfluenz wurden jeweils zwei ES/Feederkokulturplatten mit PBS gewaschen, dazu 10% DMSO in FCS-Einfriermedium zugegeben, mit Mineralöl überschichtet und bei -80°C weggefroren. Die Platten, in denen die ES-Zellen nur auf Gelatine propagiert worden waren, wurden für die DNA-Gewinnung ebenfalls mit PBS gewaschen und dann, wie in 0 beschrieben, prozessiert.

2.2.25 Blastozystinjektion von embryonalen Stammzellen

Die Vorbereitung von Mäusen und Gewinnung von Blastozysten sowie die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten von Donortieren wurde im Labor für Molekulare Mausgenetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz freundlicherweise von Herrn Dr. Leonid Eshkind durchgeführt. Im Folgenden werden die verwendeten Biotechniken zur Generierung von *knock-out/knock-in* Mäusen dargestellt.

2.2.25.1 Superovulation

Um die Ausbeute an Blastozysten zu erhöhen, wurden die weiblichen Tiere vor der Verpaarung durch Hormongabe in einen induzierten Sexualzyklus gebracht. Hierzu wurden am ersten Tag PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) und dann 48 h später HCG (Human Chorionic Gonadotropin) jeweils intraperitoneal injiziert. Anschließend erfolgte die Verpaarung der so behandelten Weibchen.

2.2.25.2 Gewinnung der Blastozysten

Drei Tage nach der Verpaarung der superovulierten Mäuse wurden diese getötet, die Uteri entfernt und in ein Schälchen mit Medium überführt. Die Uteri wurden dann mit Hilfe einer Kapillare und Spritze durchstochen und ausgespült. Dabei wurden die Embryonen, die sich in der Präimplantationsphase befanden, ebenfalls mit herausgespült. Die gewonnenen Blastozysten wurden dann gesammelt und zur weiteren Manipulation vorbereitet.

2.2.25.3 Injektion der ES-Zellen in Blastozysten

Die Injektion der homolog rekombinierten ES-Zellen erfolgte mittels einer Mikromanipulationsanlage. Diese bestand aus einem Stereomikroskop, zwei Mikromanipulatoren, die jeweils die Halte- und Injektionskapillare trugen und der Objektkammer, in der sich die Blastozysten, sowie die vorbereiteten ES-Zellen befanden. Zur Injektion wurde eine Blastozyste mit der Haltekapillare angesaugt, dann wurden mit der Injektionskapillare 10-15 ES-Zellen angesaugt, die Injektionskapillare in die Blastozyste

gestochen und die ES-Zellen in die Blastozyste injiziert. Die mit ES-Zellen injizierten Blastozysten wurden dann in scheinchwangere Mäuse transferiert.

2.2.25.4 Generierung scheinträchtiger Mäuse mittels vasektomierter Böcke

Um den Transfer von Blastozysten zu ermöglichen, wurden scheinchwangere Weibchen benötigt. Diese wurden durch Verpaarung mit vasektomierten Böcken generiert. Nachdem den Männchen beide *Vasa deferentia* durchtrennt wurden, wurden diese, nach ausreichender postoperativer Schonzeit, zur Verpaarung mit den Weibchen zusammengesetzt. Die Weibchen wurden dann in den kommenden Tagen jeweils morgens auf einen Vaginalpfropf, der auf die vollzogene Verpaarung hinweist, untersucht.

2.2.25.5 Transfer der manipulierten Blastozysten und chimäre Nachkommen

Die in 0 beschriebenen und mit ES-Zellen injizierten Blastozysten wurden in die scheinchwangeren Weibchen mittels Uterustransfer übertragen. Dafür wurde das scheinträchtige Tier betäubt, die Bauchhöhle mit einem kurzen Schnitt geöffnet und Uterus und Ovarien vorsichtig herausgezogen. Mit einer Transferkapillare wurden 10-15 Blastozysten in den Uterus transferiert, dieser dann in die Maus zurückgeschoben und die Wunde verklammert. Nach etwa 16 Tagen Tragzeit wurden die Jungen geboren. Da die verwendeten ES-Zellen für die Fellfarbe agouti codieren, die Blastozysten aber aus schwarzen Black6/DBA2 F1 Donortieren stammten, konnte man nach etwa zwei bis drei Wochen anhand des gescheckten Fellmusters der entstandenen Chimäre den Erfolg der Injektion untersuchen (Chimärismus). Wurde ein hoher Chimärismus beobachtet, war die Chance, die genetische Veränderung, welche in die ES-Zellen eingebracht wurde, stabil in die Tochtergenerationen zu vererben entsprechend höher (erfolgreiche Keimbahntransmission).

2.2.26 Generierung transgener Mäuse

Eine weitere essentielle Technik zur genetischen Keimbahnveränderung von Labormäusen besteht in der Mikroinjektion von transgener DNA in die Oozyten von Labormäusen. Im vorliegenden Fall wurden die transgenen Tiere von Dr. Kurt Reifenberg (Tierhaltung der

Universität Ulm) generiert. Der generelle Unterschied zu der Blastozysteninjektion von ES-Zellen besteht darin, dass ein transgenes Konstrukt (2,5 ng/ μ l DNA) in den Vorkern einer befruchteten Eizelle (d0,5) mikroinjiziert wird und diese dann in das Infundibulum eingebracht wird. Die Technik der Generierung von transgenen Mäusen gleicht sonst generell der in 0, 0 und 0 beschriebenen Biotechniken.

Transgene Foundertiere wurden mittels Schwanzbiopsien und nachgeschaltetem *Southern Blotting* identifiziert. Die transgenen Foundertiere wurden dann in einen Black6/C57J Hintergrund verpaart und als Linie im Tierhaus etabliert.

3 Ergebnisse

3.1 Verifizierung der Targetingkonstrukte und des Konstrukts zur Herstellung der transgenen Respondermäuse

Die schon vor Beginn dieser Arbeit vorliegenden Targetingkonstrukte ExIV und ExV, sowie das Responderkonstrukt zur Generierung der transgenen SCL-EGFP-Mäuse wurden von Dr. Ernesto Bockamp, zu jener Zeit tätig im Department of Hematology, Cambridge University, England, kloniert und dann in der vorliegenden Arbeit zur Generierung der jeweiligen Mauslinien verwendet.

3.1.1 Sequenzierung der *knock-in* Targetingkonstrukte

Da die Generierung der *knock-in* Mauslinien ein sehr langfristiges Forschungsprojekt darstellte, war es vor Beginn der Arbeiten essentiell, alle wichtigen Strukturelemente innerhalb der verwendeten Targetingkonstrukte hinsichtlich der Basenabfolge zu verifizieren. Dazu wurden die einzelnen Konstrukte mittels Cyclesequencing und einer automatischen Sequenzierereinheit sequenziert. Da wegen der Größe der Plasmide nicht die kompletten Konstrukte sequenziert werden sollten, wurden nur wichtige Elemente, wie z.B. die loxP-Sequenzen (Erkennungsstellen der Cre-Rekombinase zur Excision der Neomycinresistenzkassette innerhalb der Targetingkonstrukte), die Neomycinresistenzkassette selbst und den transkriptionellen Startpunkt der rtTA-cDNA analysiert. Zur Sequenzierung wurden Oligonukleotide benutzt, welche Sequenzhomologien zu den zu verifizierenden Stellen flankierenden Sequenzen aufwiesen (siehe Abbildung 3.1 und 3.2 zur Lage der Oligonukleotide CS1-CS8 und NS1-NS6 bezüglich der Konstrukte). Die Auswertung der Chromatogramme (siehe z.B. Abbildung 3.3) und der mittels Software editierten Teilsequenzen ergab, dass die zur Generierung der *knock-in* Linien vorgesehenen Targetingkonstrukte innerhalb der analysierten Bereiche keine Abweichung von der erwarteten Basenabfolge aufwiesen. Es konnte nun davon ausgegangen werden, dass sich innerhalb der untersuchten Bereiche keine Sequenzirrtümer befanden.

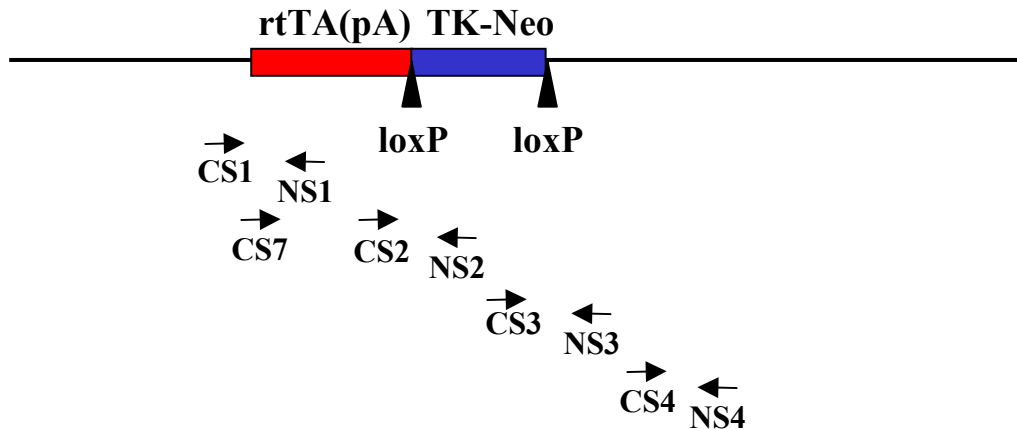


Abbildung 3.1: Lage der Sequenzieroligonukleotide im Targetingkonstrukt ExIV

Die zur Sequenzierung des Targetingkonstrukts ExIV verwendeten Oligonukleotide sind in ihrer relativen Lage zum Konstrukt schematisch als Pfeile dargestellt.

rtTA(pA), reverser tet-abhängiger Transaktivator mit β -Globin Polyadenylierungssignal; TK-Neo, Neomycinresistenzkassette; loxP, Cre-Erkennungssequenzen; CS, *coding sequence* Oligonukleotid; NS, *noncoding sequence* Oligonukleotid.

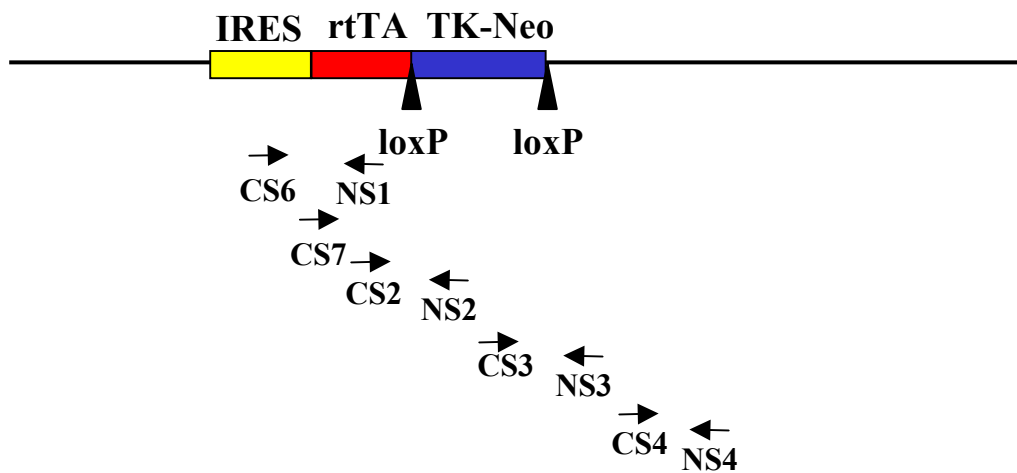


Abbildung 3.2: Lage der Sequenzieroligonukleotide im Targetingkonstrukt ExV

Die zur Sequenzierung des Targetingkonstrukts ExV benutzten Oligonukleotide sind in ihrer relativen Lage zum Konstrukt schematisch als Pfeile dargestellt.

IRES, internal ribosome entry site; rtTA(pA), reverser tet-abhängiger Transaktivator mit β -Globin Polyadenylierungssignal; TK-Neo, Neomycinresistenzkassette; loxP, Cre-Erkennungssequenzen; CS, *coding sequence* Oligonukleotid; NS, *noncoding sequence* Oligonukleotid.

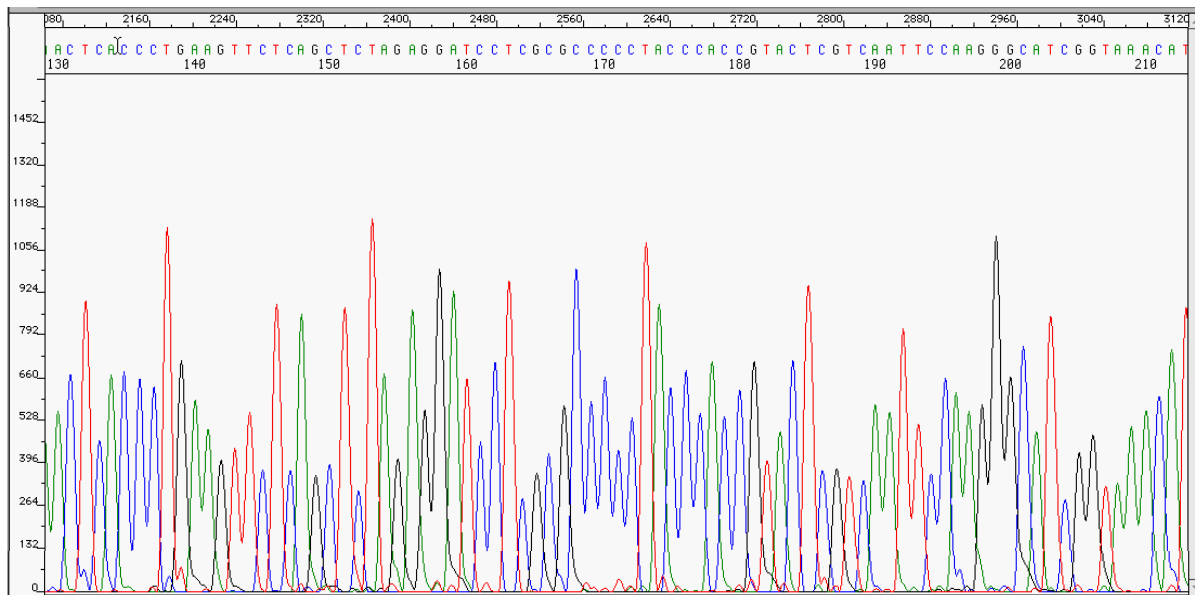


Abbildung 3.3: Chromatogramm der mit Sequenzieroligonukleotiden durchgeführten Basensequenzanalyse exemplarisch für ExIV-NS2

Exemplarisch ist ein Teil der Basensequenzanalyse des Targetingkonstrukts ExIV mit NS2, wie sie von der automatischen Sequenzierapparatur ausgegeben wird, abgebildet.

3.1.2 Verifizierung des transgenen Responderkonstrukts

Ebenso wie die *knock-in* Konstrukte ExIV und ExV wurde auch das Konstrukt zur Generierung der transgenen SCL/EGFP-Respondermaus mittels Cyclesequencing und automatischer Sequenzierapparatur untersucht. Bei dieser Analyse wurde keine Abweichung von der erwarteten Basenabfolge innerhalb der sequenzierten Bereiche festgestellt. Ebenso wie die Effektorstrukturen wurden hier Oligonukleotide zur Sequenzierung des Konstrukts benutzt, die flankierend zu wichtigen Strukturelementen des Konstrukts lagen (zu deren Lokalisation auf dem Konstrukt siehe Abbildung 3.4). Bei dieser Analyse wurden alle Klonierungsübergangsstellen zwischen dem pBI-EGFP-Vektor und der inklonierten, rekombinanten SCL-cDNA-Sequenz untersucht. Die restlichen Sequenzen wurden nicht verifiziert, da sie Teil des kommerziellen pBI-EGFP-Plasmids waren.

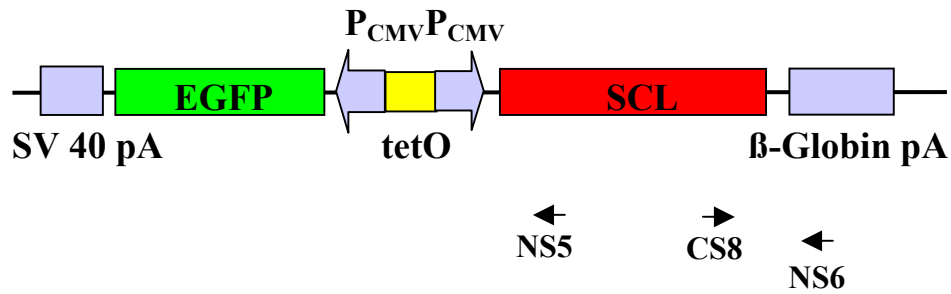


Abbildung 3.4: Lage der Sequenzieroligonukleotide im SCL/EGFP-Responderkonstrukt

Die zur Sequenzierung des Responderkonstrukts benutzten Oligonukleotide sind in ihrer relativen Lage schematisch als Pfeile dargestellt.

SV40pA, *late* Polyadenylierungssignal des SV40 Virus; EGFP, *Enhanced Green Fluorescence Protein*; Pcmv, CMV-Minimalpromoter; tetO, rtTA Bindungssequenz; SCL, rekombinante SCL cDNA; β-Globin pA, Polyadenylierungssignal des β-Globin Gens.

3.1.3 Verifizierung der Gesamtstruktur der Targeting- und Responderkonstrukte mittels Restriktionsendonukleasenverdau

Nachdem die einzelnen Sequenzen der Konstrukte verifiziert worden waren wurden diese darüber hinaus durch Restriktionsendonukleasenverdau auf ein korrektes Restriktionsfragmentmuster hin untersucht. Dazu wurden alle drei Konstrukte mittels Endonukleasen restringiert, die Fragmente auf einem nativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels einer Videodokumentationsanlage dokumentiert. Hierdurch wurden die einzelnen Konstrukte in Hinsicht auf ihre Gesamtstruktur bestätigt. Da die Basenabfolge aller drei Konstrukte bekannt war, wurden mit Hilfe des DNA-Strider Programms verschiedene Restriktionsenzyme und deren spezifische Fragmentmuster hinsichtlich eines Verdaus der Konstrukte spezifisch ausgewählt. Die Analyse der Restriktionsfragmente der eingesetzten Endonukleasen ergab keine Abweichung der vorhergesagten Fragmentmuster. Somit war es möglich, alle drei Konstrukte hinreichend für die im folgenden beschriebene Generierung der Mauslinien zu verifizieren. Exemplarisch für die verwendeten Restriktionsendonukleasen und deren spezifisches Restriktionsmuster innerhalb der verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 3.5 die Fragmentmuster für die Restriktionsendonukleasen *HinDIII*, *XbaI* und *BamHI* für die Konstrukte ExIV, ExV und TR (transgenes Responderkonstrukt SCL/EGFP) dargestellt.

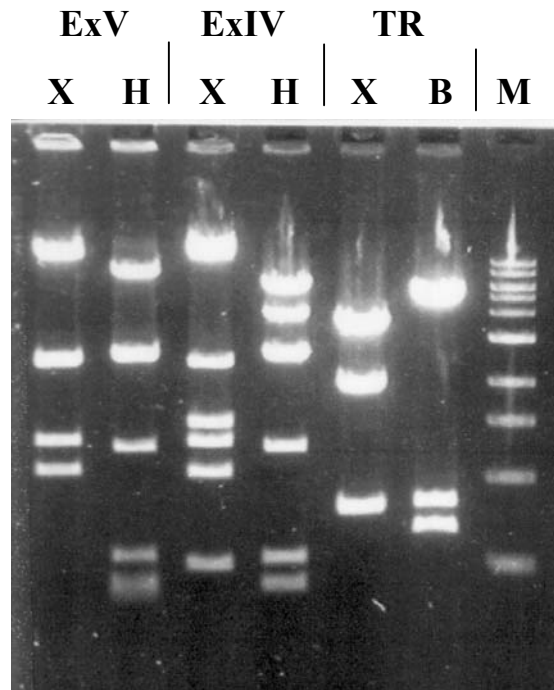


Abbildung 3.5: Restriktionsverdau der verwendeten Konstrukte

Der analytische Verdau der drei Konstrukte mit Restriktionsendonukleasen zeigte ein korrektes Restriktionsfragmentmuster für alle untersuchten Verdau. Exemplarisch sind hier die Fragmentmuster für jeweils zwei Endonukleasen je Konstrukt gezeigt.

ExV, Targetingkonstrukt Exon V; ExIV, Targetingkonstrukt Exon IV; TR, Transgenes Responderkonstrukt; X, XbaI; H, HindIII; B, BamHI; M, Marker (1kb Ladder).

3.2 Generierung der Exon IV und Exon V SCL-rtTA *knock-in* Maus

3.2.1 Elektroporation und Detektion von homolog rekombinierten ES-Zellen für die Targetingkonstrukte ExIV und ExV

Die Herstellung der *knock-in* Mauslinien mittels homologer Rekombination in ES-Zellen und Injektion in Blastozysten sind die Voraussetzung zur Herstellung der konditionalen/reversiblen SCL *knock-out* Mauslinie. Die Generierung teilt sich in die Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellen und deren Verwendung zur Blastozystinjektion auf.

Abbildung 3.6 zeigt die elektrophoretische Auftrennung des mit der Restriktionsendonuklease SfiI linearisierten Targetingkonstrukts (Slots 1-4). Der erfolgreiche Verdau wurde durch direkten Vergleich mit nicht linearisierter, ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennter DNA

bestätigt (Slot 5). Die linearisierte DNA wurde mittels GenePulserII-System in die vorbereiteten ES-Zellen elektroporiert, diese wurden dann klonal selektiert und amplifiziert. Die Elektroporation der Targetingkonstrukte resultierte typischerweise in etwa 2500 individuellen Kolonien, welche, selektiert mit G418, im 96-well-Format amplifiziert wurden.

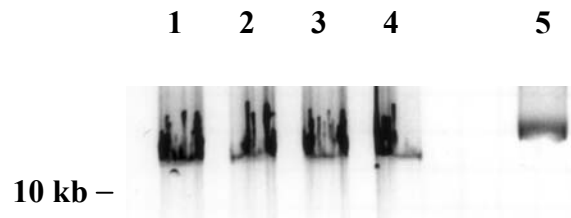


Abbildung 3.6: Agarosegelelektrophorese des linearisierten Targetingkonstrukts ExIV

Die gelelektrophoretische Auftrennung des Targetingkonstrukts ExIV nach Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease SfiI ist in Slot 1-4 dargestellt. Slot 5 zeigt nicht linearisiertes zirkuläres Plasmid (zu beachten ist die unterschiedliche Mobilität im Agarosegel).

Zur Detektion von homolog rekombinierten ES-Zellen wurden die selektierten Kolonien auf mit Gelatine beschichteten 96-well-Replikaplaten amplifiziert. Die amplifizierten ES-Zellen wurden dann lysiert, die genomische DNA gefällt und mit der Restriktionsendonuklease HindIII restringiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung, anschließender Dokumentation der genomischen ES-Zell-DNA (siehe Abbildung 3.7), wurde diese auf Nylonmembranen transferiert und mit einer SCL Lokus-spezifischen 5' Outside Sonde hybridisiert. Dazu wurde das Plasmid -2000-1ab-pGL2 (interne Plasmidbanknummer 843) mittels des Restriktionsenzym HindIII restringiert, um ein 500 bp Fragment zu generieren, welches als geeignete Sonde zur Identifizierung des SCL-Lokus in Vorarbeiten identifiziert werden konnte. Nach Verdau der genomischen ES-Zell-DNA mit HindIII sollten homolog rekombinierte ES-Zellklone neben der für den genomischen SCL Lokus-spezifischen 13 kb Bande auch eine zusätzliche Bande enthalten (siehe Abbildung 3.8 für Position der outside Sonde und den zusätzlich bei homologer Rekombination entstandenen HindIII Banden; ExIV, 7,5 kb HindIII Fragment; ExV, 8,8 kb HindIII Fragment). Ein repräsentatives Beispieldiagramm der gewählten Screeningstrategie zur Diskriminierung des homolog rekombinierten Locus ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

Mittels *Southern Blotting* und der Hybridisierung mit einer SCL Lokus-spezifischen 5' outside Sonde konnten aus circa 2500 getesteten ES-Zellklonen, fünf rekombinierte Klone für das Konstrukt ExIV (Abbildung 3.10), sowie vier Klone für das Konstrukt ExV (Abbildung 3.11) identifiziert werden. Die im ersten Screening positiv identifizierten Klone wurden

jeweils von der entsprechenden Replikplatte aufgetaut, auf Feederzellen ausgesät und zur weiteren Verifizierung amplifiziert.

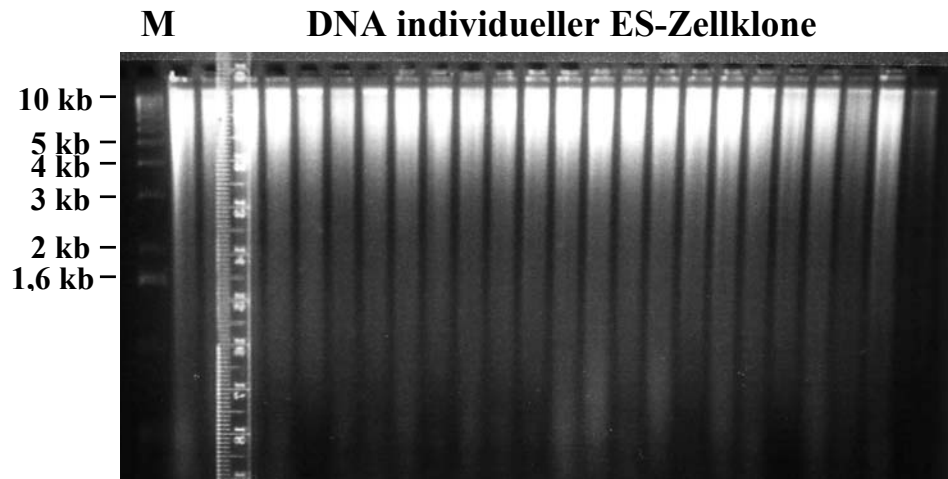


Abbildung 3.7: Elektrophoretische Auftrennung von mit *HinDIII* restringierter ES-Zell-DNA einzelner Kandidatenklone

Die aufgereinigte genomische DNA der individuellen ES-Zellklone wurde elektrophoretisch aufgetrennt und dokumentiert. Das abgebildete Lineal diente der Größenbestimmung der später detektierten Signale.

M, Marker (1 kb Ladder).

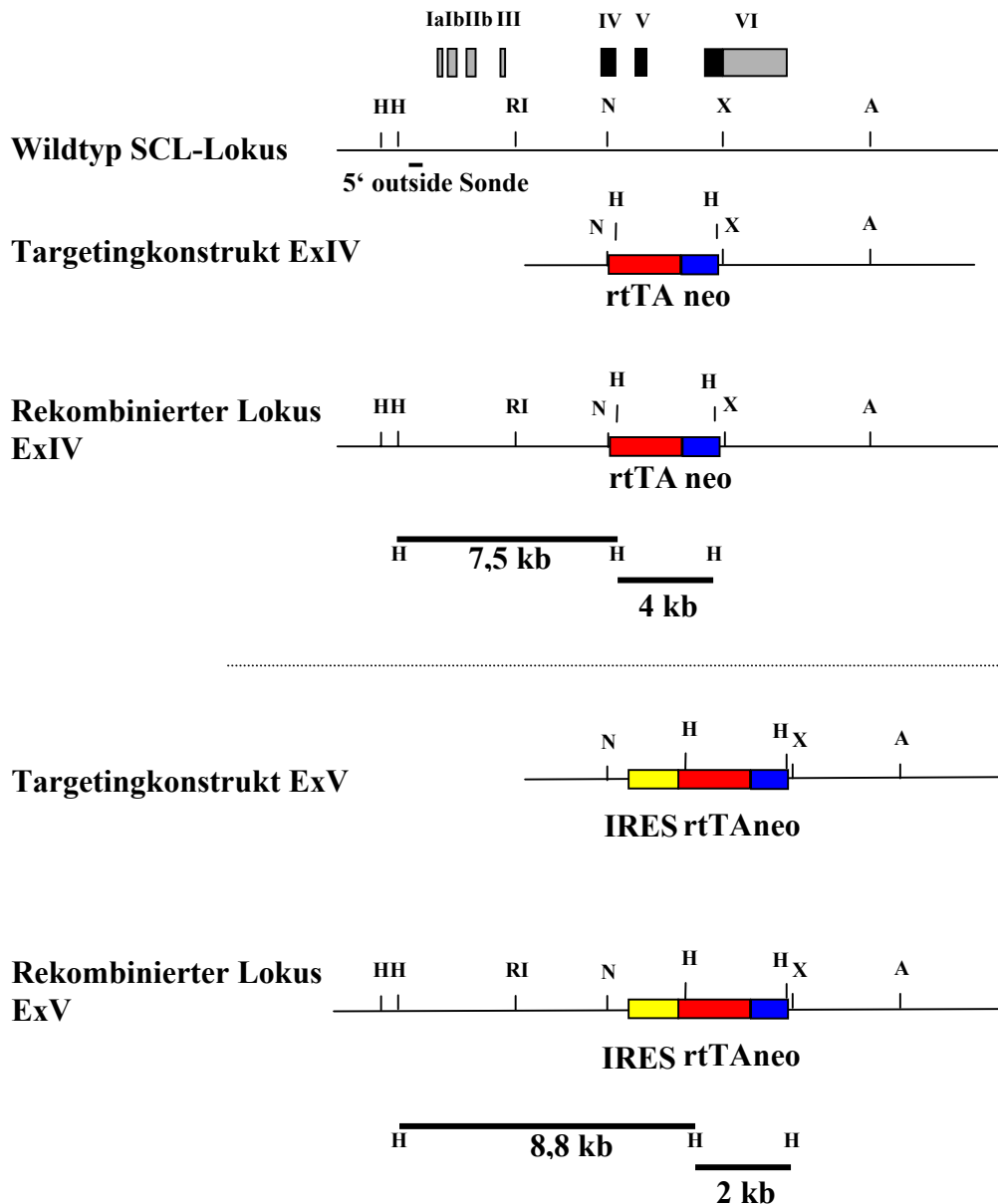


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des genomischen SCL-Lokus, der Targetingkonstrukte ExIV und ExV sowie des jeweils resultierenden homolog rekombinierten Lokus

Die Abbildung dient zur Verdeutlichung der Vorgänge auf DNA-Ebene. Die jeweiligen Targetingkonstrukte rekombinieren mit dem endogenen Locus. Dadurch wird jeweils die zur Genotypisierung wichtige *HinDIII* Schnittstelle eingeführt. Durch Restriktion mit *HinDIII* und Hybridisierung mit der 5' outside Sonde können so ES-Zellen mit homolog rekombiniertem Locus von nicht homolog rekombinierten ES-Zellklonen unterschieden werden.

H, *HinDIII*; RI, *EcoRI*; N, *NdeI*; X, *XhoI*, A, *ApaI*; graue Boxen, nicht codierende Exone; schwarze Boxen, codierende Exone; rote Box, rtTA (rtTA codierende cDNA); blaue Box, neo (Neomycin-Resistenzkassette von loxP-Sequenzen flankiert); gelbe Box, IRES (*internal ribosome entry site*).

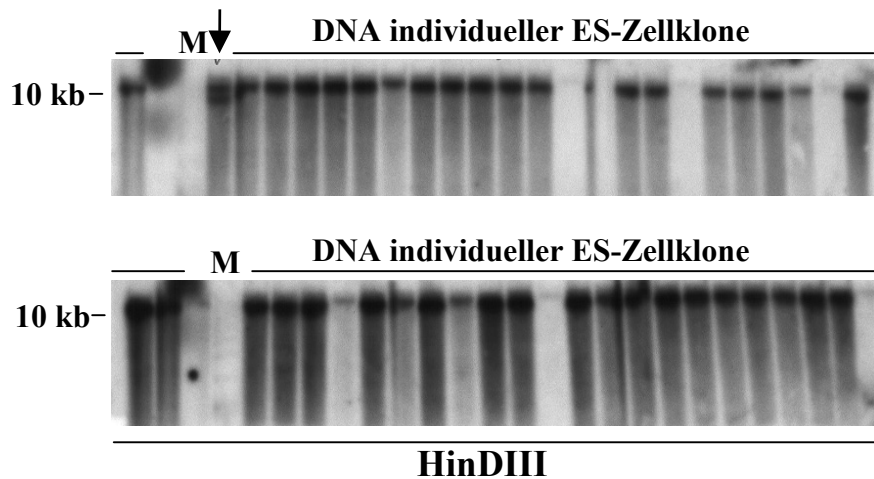


Abbildung 3.9: Southern Blot Analyse der restringierten ES-Zell-DNA mit einer SCL-Lokus-spezifischen 5' outside Sonde exemplarisch für das Targetingkonstrukt ExIV

Die geblottete genomische DNA wurde mittels der SCL-spezifischen 5' outside Sonde untersucht. Exemplarisch sind hier zwei Autoradiogramme dargestellt. Die mit einem Pfeil gekennzeichnete Spur zeigte das für den *knock-in* spezifische Bandenmuster (13 kb zusammen mit 7,5 kb Bande), während die anderen gezeigten Spuren lediglich das Signal für den endogenen Wildtyp SCL-Lokus (13 kb Bande) aufwiesen. M, Marker (1kb Ladder).

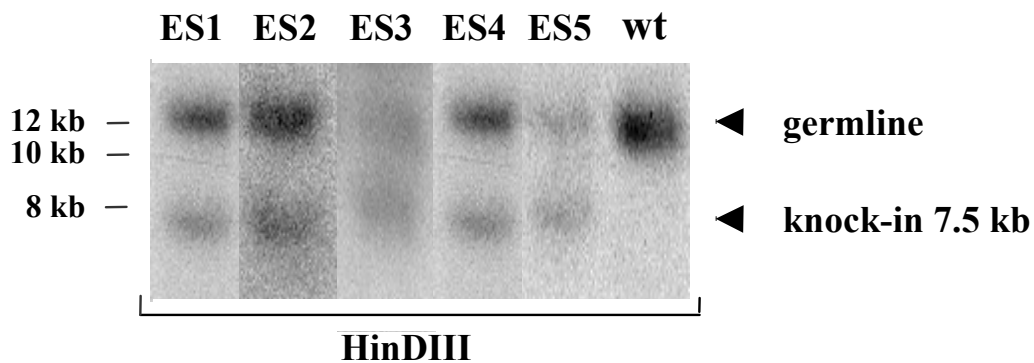


Abbildung 3.10: Southern Blot Analyse rekombinierter ES-Zellklone für das Targetingkonstrukt ExIV

In einem initialen *Southern Blot* identifizierte ES-Zellklone wurden mit der SCL Lokus-spezifischen 5' outside Sonde nachbestätigt, wobei fünf ES-Zellklone das für den *knock-in* erwartete Signal zeigten. ES1-ES5, individuelle ES-Zellklone Targetingkonstrukt ExIV; wt, Wildtyp ES-Zellen (zu beachten ist hier die fehlende 7,5 kb Bande).

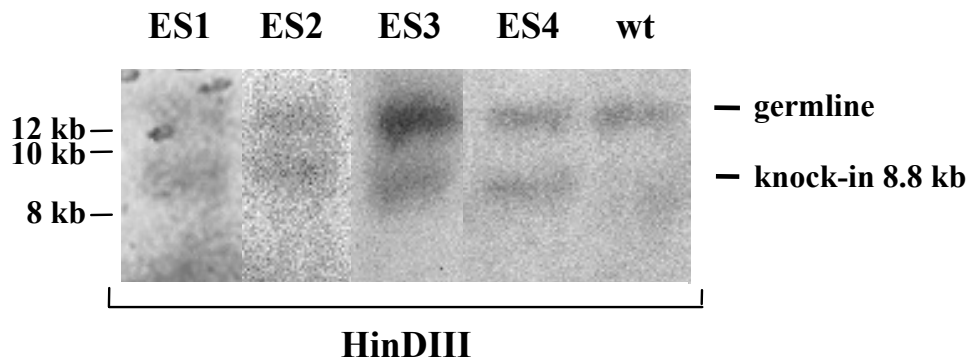


Abbildung 3.11: Southern Blot Analyse rekombinierter ES-Zellklone für das Targetingkonstrukt ExV

Im initialen *Southern Blot* identifizierte ES-Zellklone wurden mit der SCL Lokus-spezifischen 5' outside Sonde bestätigt. Vier ES-Zellklone zeigten das für den *knock-in* erwartete zusätzliche 8,8 kb Fragment. ES1-ES4, individuelle ES-Zellklone Targetingkonstrukt ExV; wt, Wildtyp ES-Zellen (zu beachten ist hier das Fehlen des 8,8 kb Fragments).

3.2.2 Verifizierung der homolog rekombinierten ES-Zellklone

Die in 0 identifizierten ES-Klone wurden zur nochmaligen Bestätigung sowohl mit der bereits beschriebenen 5' outside-Sonde, als auch darüber hinaus mit einer internen rtTA-spezifischen Sonde mittels *Southern Blot* verifiziert. Bei der Revitalisierung der individuellen Klone zeigte es sich, dass von den ursprünglich fünf identifizierten Klonen für das Targetingkonstrukt ExIV nur vier der Klone revitalisiert werden konnten. Die amplifizierte ES-Zellen der jeweiligen Klone wurden lysiert, die genomische DNA aufgereinigt und mit HindIII restringiert. Anschließend wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt, transferiert und mit der jeweiligen Sonde hybridisiert.

Die Hybridisierung der ES-Zell-DNA mit der 5' outside-Sonde bestätigte nochmals die 5' homologe Rekombination der Klone ES2-ES5. Diese wurden dann mit der internen rtTA Probe analysiert. Diese Analyse ergab, dass nur Klone ES3 und ES4 des Targetingkonstrukts ExIV und Klon ES4 des Targetingkonstrukts ExV mit der internen rtTA Sonde das richtige Hybridisierungsfragment von 4kb (spezifisch für das Targetingkonstrukt ExIV) und 2 kb (spezifisch für Targetingkonstrukt ExV) aufwiesen. Die Lage der Sonden und der zu erwartenden 4 kb und 2 kb HindIII Hybridisierungsbanden sind in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt.

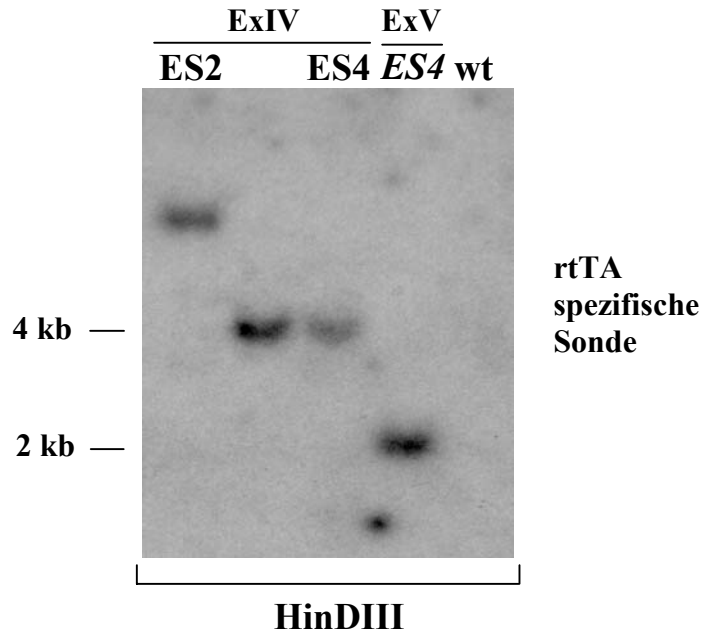


Abbildung 3.12: Southern Blot Analyse der im initialen Blot positiven ES-Zellklone für die Targetingkonstrukte ExIV und ExV

Die schon mittels 5' outside Sonde konfirmierten ES-Zellklone wurden mittels der rtTA-spezifischen Sonde analysiert.

ES2-ES4 (linke Seite), individuelle ES-Zellklone ExIV; ES4 (rechte Seite), individueller ES-Zellklon ExV; wt, Wildtyp ES-Zellen.

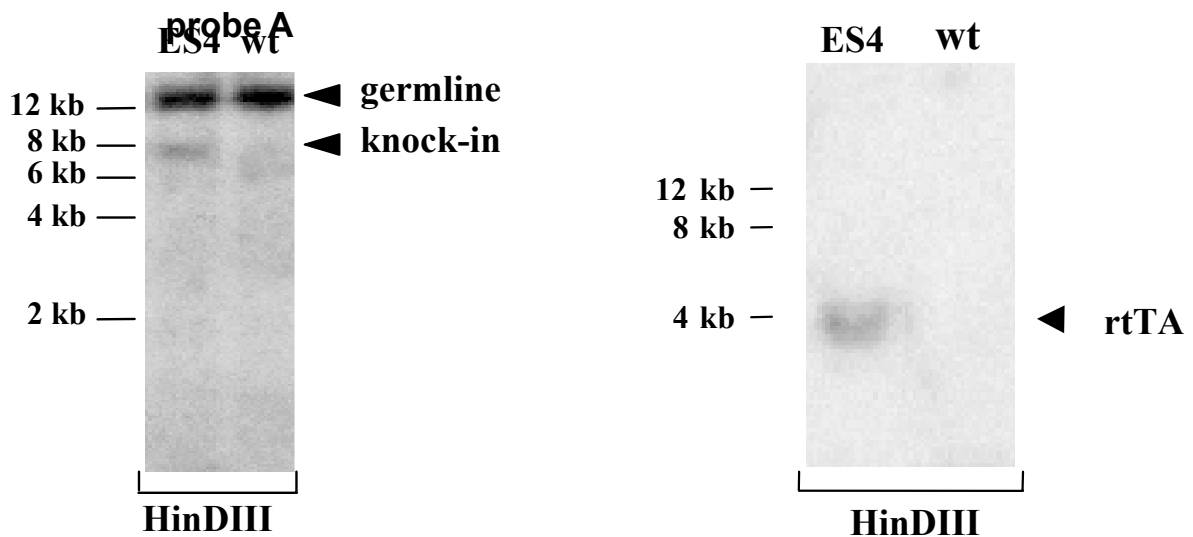


Abbildung 3.13: Weitere Verifizierung des ES-Zellklons ES4 Targetingkonstrukt ExIV mittels 5' outside (linker Blot) und interner rtTA Sonde (rechter Blot)

Southern Blot Analyse des ES4 Klones zeigte korrekte Fragmentgröße bei beiden Sonden.

ES4, ES-Zellklon 4; wt, Wildtyp ES-Zellen.

Der schon mittels rtTA-spezifischer Sonde und SCL 5' outside Sonde untersuchte ES-Zellklon ES4 des Targetingkonstrukts ExV wurde zur weiteren Verifizierung nochmals mit einer für die IRES-Sequenz spezifischen Sonde untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein 8,8 kb großes, IRES-spezifisches *HinDIII* Fragment detektiert werden konnte, welches auf der Autoradiographie als korrekte 8,8 kb Bande zu erkennen war (Abbildung 3.14, rechter Blot). Im Gegensatz dazu zeigten ES-Zellklone ES1-ES3 und die als Kontrolle verwendete Wildtyp-ES-Zell-DNA kein IRES-spezifisches Signal. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden jeweils die Klone ES4 beider Targetingkonstrukte zur Blastozystinjektion verwendet.

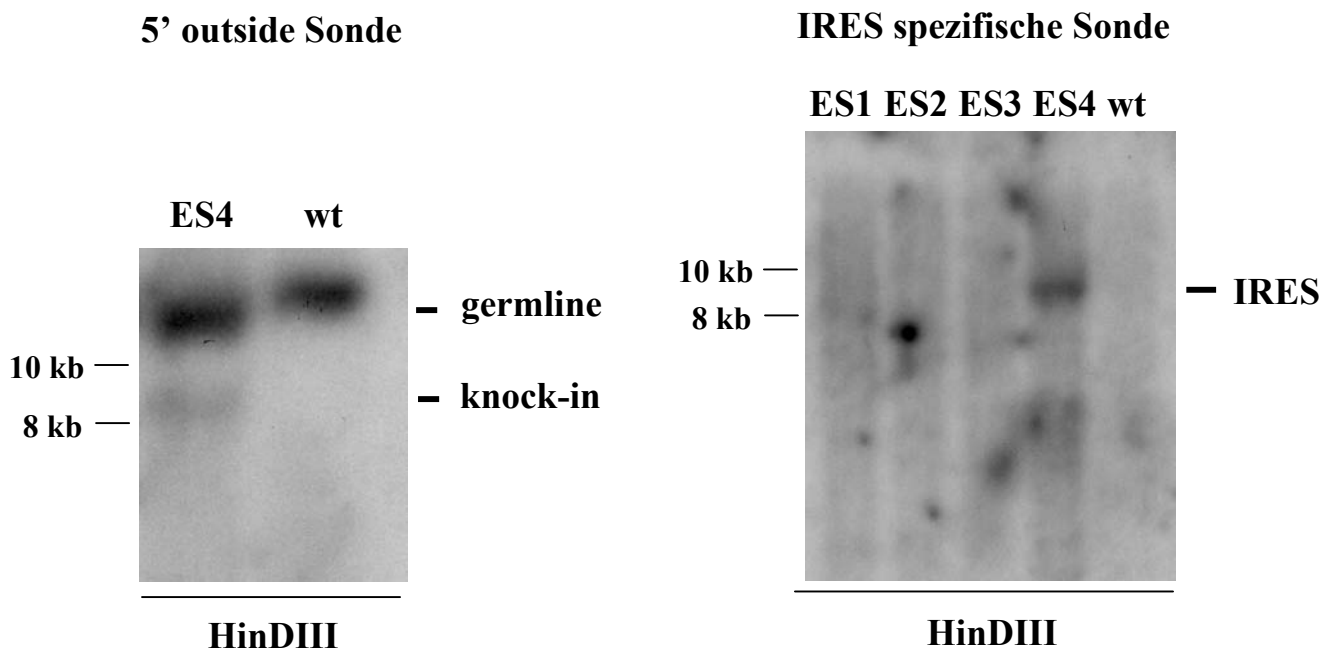


Abbildung 3.14: 5' Verifizierung und Detektion der IRES Sequenz mittels *Southern Blot* für das Targetingkonstrukts ExV in ES-Zellkandidatenklonen

Die Hybridisierung der vier ES-Klone, welche mit der initialen 5' outside Sonde als positiv identifiziert wurden, zeigte nur in Klon ES4 die spezifische IRES Bande. Zusätzlich dargestellt ist im linken Teil der Abbildung die 5' outside Verifizierung für den IRES-positiven Klon ES4.

ES1-ES4, individuelle ES-Zellklone für das Targetingkonstrukt ExV.

3.2.3 Blastozystinjektion der verifizierten ES-Zellen

Die in 3.2.2 bestätigten ES-Zellklone ES4 für das Targetingkonstrukt ExIV und ebenfalls ES4 für das Targetingkonstrukt ExV wurden in Blastozysten von Donortieren injiziert. Nach

Transfer der jeweiligen Blastozysten und der Geburt der resultierenden Embryonen wurde nach etwa 20 Tagen ein hoher Chimärismus von Tieren beobachtet, welche aus der Injektion des Targetingkonstrukts ExIV spezifischen Klons ES4 stammten.



Abbildung 3.15: Aufnahme einer im Labor durchgeführten Blastozystinjektion und fotografische Dokumentation einer mit Hilfe von ExIV spezifischen ES3 Es-Zellen generierten hochchimären Maus

Durch Blastozystinjektion konnten aus dem rekombinierten ES-Zellklon ES4 hochchimäre Tiere generiert werden. Die Blastozystinjektion der ES-Zellklone ES3 des Targetingkonstrukts ExIV sowie ES4 des Targetingkonstrukts ExV resultierte in keinem Fall in der Geburt von chimären Mäusen.

3.2.4 Verpaarung der chimären Maus zur Generierung der *knock-in* Linie

Die hochchimären Tiere aus der Injektion des ES4-Klons des Targetingkonstrukts ExIV (ab hier ES4 benannt) wurden zur Analyse der Keimbahntransmission und zur Etablierung einer möglichen *knock-in* Mauslinie jeweils mit weiblichen Black6/C57J Wildtyptieren verpaart.

3.2.5 Analyse des Nachwuchses der chimären Mäuse

Die Nachkommen der Verpaarung hochchimärer ES4 derivierter Chimären mit Wildtyppartnern wurden mittels PCR-Analyse mit den Oligonukleotiden rtTA5' und rtTA3' auf Integration der rtTA-cDNA untersucht. Hierbei konnte eine erfolgreiche Segregation des *knock-in* Genotyps beobachtet werden (siehe Abbildung 3.16 für keimbahntransmittierte rtTA-positive Nachkommen). Um außerdem 3' die Integrität der homologen Rekombination nun auch in der Maus zu bestätigen, wurde mittels Long Template Expand PCR der 3' Bereich des homolog rekombinierten SCL/rtTA-Lokus analysiert. Hierbei wurden die

Oligonukleotide für die PCR so gelegt, dass das erste Oligonukleotide innerhalb des Targetingkonstrukts in der Neomycinresistenzkassette (k-i-neoforward1) lag, während das zweite Oligonukleotid 3' flankierend des Targetingkonstrukts, also nicht im homolog rekombinierten genomischen SCL-Lokus gewählt wurde (k-i-3'revers2). Die 3' PCR-Analyse der Tiere, die zuerst mittels PCR positiv auf die rtTA-Sequenz getestet worden waren, mit der Expand PCR zeigte ein spezifisches Amplifikat, welches eine Bande im Bereich der vorhergesagten Amplifikatgröße von zu erwartenden 7892 bp aufzeigte (Abbildung 3.17). Um das PCR-Amplifikat noch genauer zu charakterisieren, wurde dieses zusätzlich noch mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, HincII und SacI verdaut, und die erhaltenen Fragmente wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse dieser Fragmente zeigte, dass es sich in allen Fällen um das richtige Fragmentmuster handelte, und somit die 3' homologe Rekombination nochmals bestätigt werden konnte. Der Restriktionsverdau des 7892 bp 3' PCR-Amplifikats in Abbildung 3.18 dargestellt.

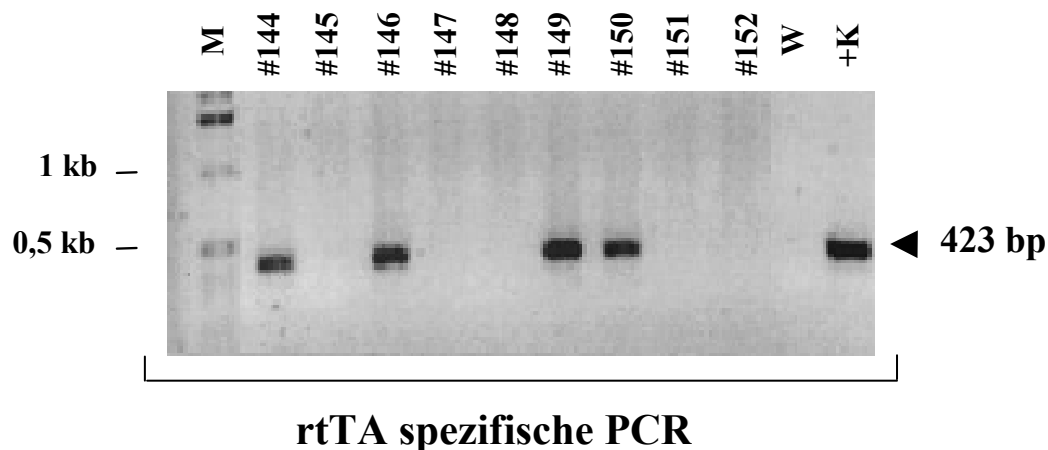


Abbildung 3.16: Keimbahntransmission des rtTA *knock-in*

In von chimären Tieren derivierten Mäusen konnte mittels rtTA-spezifischer PCR eine Keimbahntransmission der rtTA-*knock-in* Rekombination für das Targetingkonstrukt ExIV bestätigt werden.

M, Marker (1kb Ladder); #144-#152, ES4 Nachwuchs; W, Wasserkontrolle; +K, Positivkontrolle (ES-Zell-DNA ES4).



Abbildung 3.17: 3' Verifizierung der SCL/ExIV *knock-in* Mauslinie mittels Expand PCR

Die 3' Verifizierung wurde mittels Expand® Long Template PCR mit einem neo-spezifischen und einem 3' SCL Lokus-spezifischen Primer durchgeführt.

#107, #149, #226, #246, ES 4 derivierte F1 Nachkommen; wt, Wildtyp; ES4, parentale ES4-Zelle als Positivkontrolle.

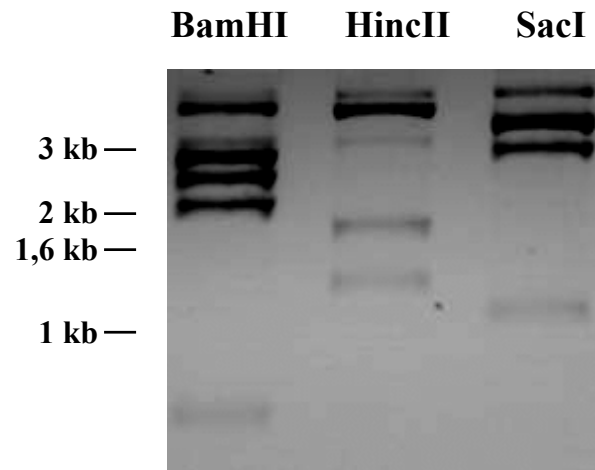


Abbildung 3.18: Restriktionsanalyse des generierten 3' Expand PCR-Amplifikats

Mittels Restriktionsendonukleasen wurde das spezifische Expand PCR Amplifikat verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und das Fragmentmuster analysiert. Das erhaltene Restriktionsmuster entsprach dabei dem vorhergesagten Muster für die richtig homolog rekombinierte DNA aufgrund der erwarteten Nukleotidsequenz.

Jeweilige Restriktionsendonukleasen oberhalb des Gels, DNA-Größenmarker links.

3.2.6 Etablierung der *knock-in* Mauslinie

Die sowohl 5', intern als auch 3' verifizierte SCL/rtTA *knock-in* Mauslinie wurde weiter auf einen Black6/C57J Hintergrund verpaart. Die Analyse der Nachkommen zeigte eine erfolgreiche Segregation des rtTA-*knock-in* in die jeweilige Filialgeneration.

3.2.7 Transkriptionsanalyse der *knock-in* Linie mittels RT-PCR

Da für die Generierung der SCL *knock-out* Maus die Expression des rtTA in SCL-positiven Geweben für den *knock-out Rescue* essentiell war, wurde die SCL-ExIV-*knock-in* Mauslinie mittels RT-PCR-Analyse auf das Vorhandensein von rtTA-mRNA innerhalb zwei typischer hämatopoietischer, also SCL-positiver Gewebsbiopsien untersucht. Dazu wurde jeweils aus der Milz und den peripheren Blutzellen dieser Maus RNA gewonnen und diese in einer RT-PCR mit rtTA-spezifischen Oligos (rtTA/SCL-5' und rtTA/SCL-3') untersucht. Hierbei wurde in beiden Geweben die zu erwartende rtTA-RNA nachgewiesen (Abbildung 3.19). Im Gegensatz dazu wurde bei der Wasserkontrolle kein Signal entdeckt.



Abbildung 3.19: RT-PCR Analyse der rtTA Expression in hämatopoetischen Geweben der SCL-ExIV *knock-in* Maus

Die Expressionsanalyse der rtTA *knock-in* Maus zeigte rtTA-spezifische mRNA-Expression in Milz und Blut der ES4 rtTA SCL *knock-in* Maus. Das Fehlen einer rtTA-spezifischen Bande in der Wasserkontrolle bewies, dass keine rtTA-DNA Kontamination in den verwendeten PCR-Reagenzien vorlag.

W, Wasserkontrolle.

Die genaue Analyse der generierten RT-PCR-Amplifikate zeigte, dass außer dem spezifischen und zu erwartenden etwa 1,5 kb großen Amplifikat, noch zusätzliche weitere Nebenamplifikate zu detektieren waren (Abbildung 3.20). Diese zusätzlichen Amplifikate waren sowohl in der untersuchten RNA der Milz, als auch im Blut zu detektieren. Während in der Milz neben dem gewünschten etwa 1,5 kb großen Amplifikat nur ein weiteres, kleineres Amplifikat zu detektieren war, wurden im Ansatz mit RNA aus peripheren Blutzellen vier zusätzliche Amplifikate gefunden.

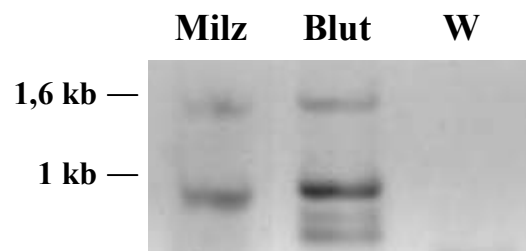


Abbildung 3.20: RT-PCR hämatopoietischer Gewebe der SCL-ExIV *knock-in* Maus zeigte multiple Amplifikate

Die Analyse der *knock-in* spezifischen RT-PCR resultierte in mehreren zusätzliche Amplifikatspezies, welche sowohl in der Milz, als auch in aus Blut gewonnener RNA detektiert wurden.

W, Wasserkontrolle.

3.2.8 Deletion der Neomycinresistenzkassette mit Hilfe des SycP-Cre Deleterstammes

Um die Neomycinkassette, welche von loxP Sequenzen flankiert war, in der SCL-ExIV *knock-in* Maus zu entfernen, wurde auf einen Deleterstamm zurückgegriffen, welche in der frühen Spermatogenese Cre-Rekombinase exprimiert (Vidal et al. 1998) . Die Excision der Neomycinkassette war insofern wichtig, als eventuelle störende Einflüsse des Thymidinkinasepromoters, welcher die Expression des Neomycinresistenzgens steuert, auf die Expression des rtTA ausgeschlossen werden konnten. Zudem wäre ohne die Entfernung der Resistenzkassette eine Interferenz des TK-Promoters mit dem beschriebenen 3' Enhancer (Sanchez et al. 1999) des SCL-Lokus nicht auszuschließen, welche dann mit der gewünschten zelltypspezifischen Expression des rtTA Polypeptids interferieren könnte. Die zur Verpaarung angesetzten Tiere wurden mittels PCR und *Southern Blot* auf sowohl die Integration des rtTA im SCL-Lokus (*knock-in* Maus), oder das Vorhandensein der transgenen Cre-Expressionssequenzen (Deletermaus) überprüft. Als transgen identifizierte Tiere wurden dann verpaart und der männliche Nachwuchs auf das Vorhandensein von rtTA- und Cre-spezifischen Sequenzen untersucht. Da die Cre-Expression in primären Spermatozyten erfolgt, war es essentiell, männliche bi-transgene Tiere zu erhalten, welche dann in einer weiteren Verpaarung durch Expression der Cre-Rekombinase die Neomycinkassette im rekombinierten Locus entfernen können.

Die Überprüfung der Nachkommen der Verpaarung von Neomycin-positiven SCL-ExIV *knock-in* Tieren mit der SycP-Cre-Deleterlinie führte zu drei bi-transgenen männlichen Nachkommen, welche in der nächsten Kreuzung mit weiblichen Wildtyp Black6/C57J Tieren verpaart wurden (Abbildung 3.21, Linie 1, 2 und 4 sind die männlichen bi-transgenen Nachkommen).

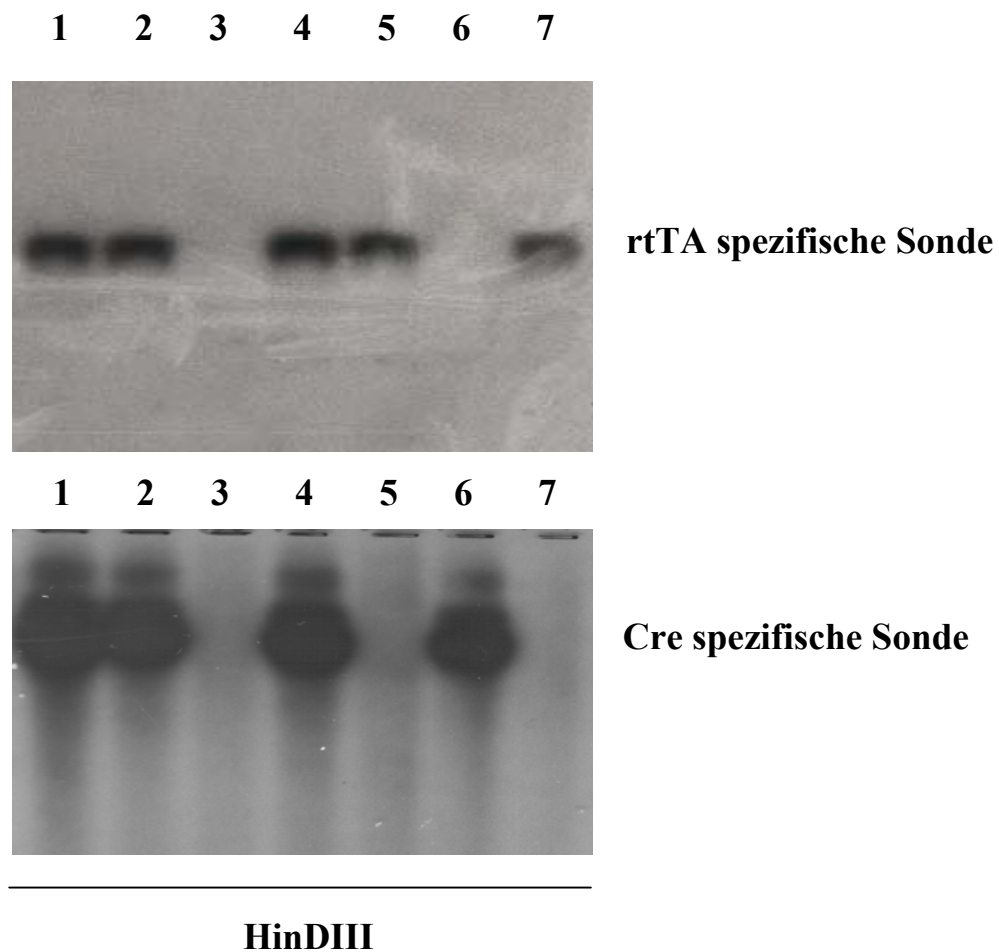


Abbildung 3.21: Für rtTA-*knock-in* und Cre-Rekombinase bi-transgene Nachkommen

Es wurden mehrere männliche Tiere auf den rtTA *knock-in* und das gleichzeitige Vorhandensein der Cre-Rekombinase analysiert. Bi-transgene Tiere (1,2 und 4) wurden dann zur weiteren Verpaarung eingesetzt.

3.2.9 Erfolgreiche Excision der Neomycin-Resistenzkassette

Die zu erwartende Excision der mit loxP Erkennungssequenzen flankierten Neomycinresistenzkassette wurde in Nachkommen der männlichen bi-transgenen Tiere analysiert. Zur Untersuchung der Excision in diesen Tieren wurde die DNA der Nachkommen der bi-transgenen männlichen Linien E1, E2 und E4 nach HindIII-Verdau mit einer rtTA spezifischen Sonde im *Southern Blot* untersucht. Die Excision der Neomycinresistenzkassette sollte dabei in einem Shift der rtTA-spezifischen Bande von 4 kb nach 3 kb resultieren. Diese spezifische Bande konnte in mehreren Nachkommen der bi-transgenen paternalen Tiere detektiert werden (Abbildung 3.23, Linien 1, 4, 5, 6 und 8 zeigten eine erfolgreiche Deletion

der Neomycin-Resistenzkassette). Nachkommen von Cre negativen männlichen SCL-ExIV *knock-in* Tieren zeigten keine Excision der TK-Neo-Kassette (Abbildung 3.23, Linien 13-16 und 18). Zum besseren Verständnis der Cre-Excisionstrategie und der resultierenden Restriktionsfragmente ist in Abbildung 3.22 der SCL-ExIV *knock-in* Lokus nochmals vor und nach der Excision der Neo-Kassette schematisch dargestellt. Die „gefloxten“, also mit Hilfe der Cre-Rekombinase modifizierten Tiere als auch die daraus im späteren hervorgegangenen Nachkommen wurden wegen der erfolgreichen Excision der Neomycinkassette als Neo- (für Neomycin negativ) bezeichnet.

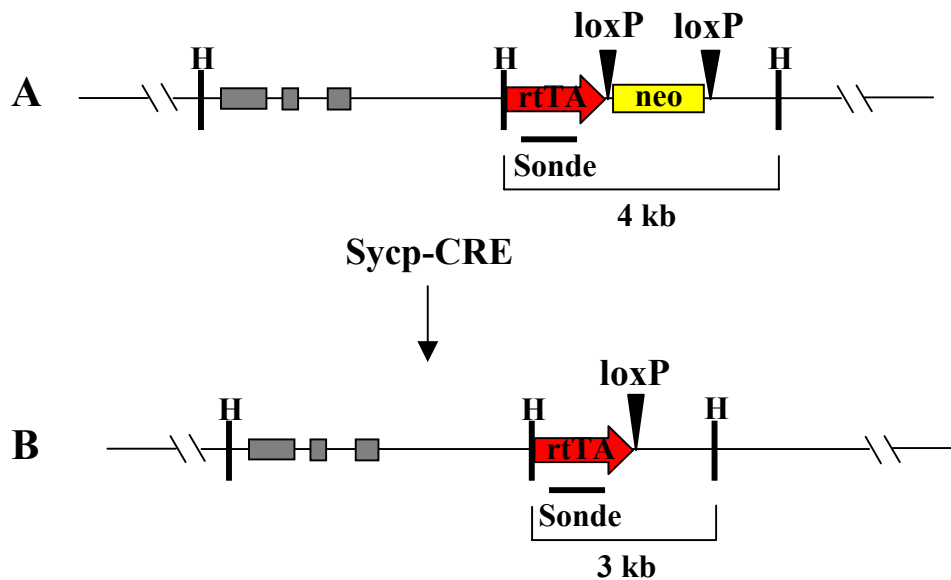


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der Neomycin-Excision

Zu beachten sind die jeweiligen HinDIII Fragmente vor (4 kb) und nach (3 kb) Cre-Rekombinase vermittelter Excision der Neomycinkassette.

A, rekombinierter SCL Lokus vor der Excision.

B, rekombinierter SCL Lokus nach Excision der Neomycinkassette durch die Cre-Rekombinase.

H, HinDIII; rote Box, rtTA (rtTA codierende cDNA); gelbe Box, neo (Neomycin-Resistenzkassette); schwarze Pfeile, loxP Sequenzen.

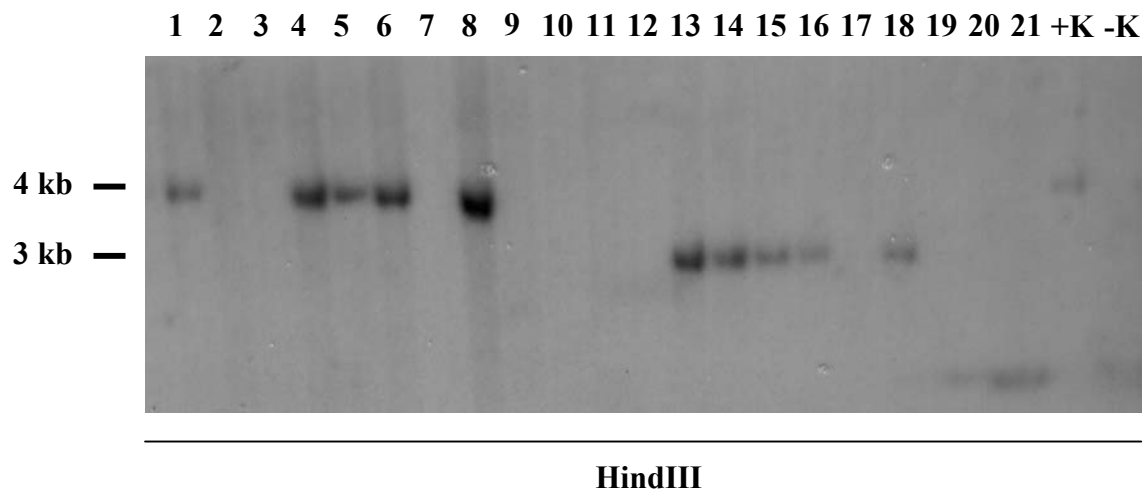


Abbildung 3.23: Excision der Neomycinkassette in der SCL/rtTA *knock-in* Maus

Mittels *Southern Blot* und einer rtTA-spezifischen Sonde konnte in Geschwistertieren von Cre positiven und rtTA positiven bi-transgenen Vätern eine Excision der Neo-Kassette detektiert werden (Linien 1, 4-6 und 8). Tiere, deren Väter keine Cre-Rekombinase in ihrem Erbgut trugen, zeigten keine Excision (Linien 13-17 und 18).

1-21, untersuchte DNA Proben aus Schwanzbiopsien; +K, rtTA positive Kontrolle (DNA einer SCL-ExIV Maus); -K, rtTA negative Kontrolle (DNA einer Wildtypmaus).

Zur exakteren Unterscheidung der Mobilität der deletierten rtTA-spezifischen Restriktionsfragmente ist in Abbildung 3.24 nochmals eine vergrößerte Darstellung des Vergleichs eines Neomycin positiven mit einem Neomycin negativen SCL-ExIV *knock-in* Tier dargestellt.

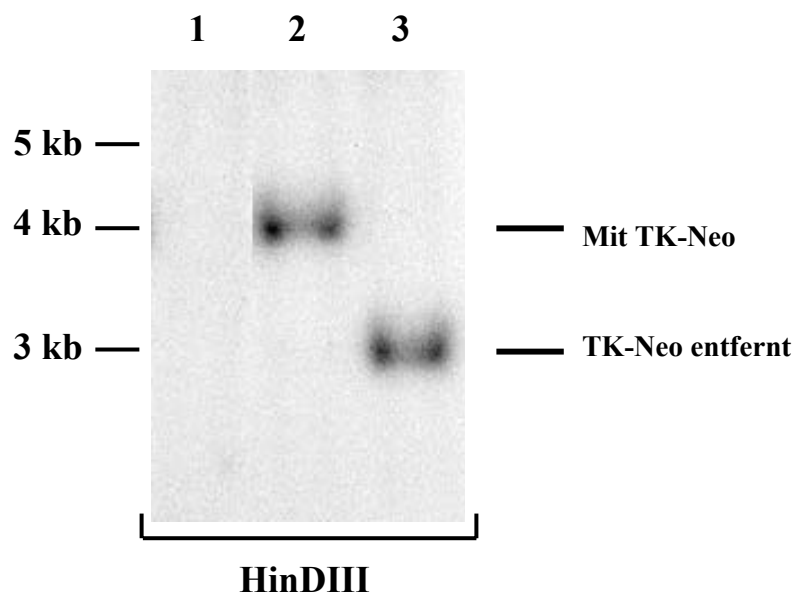


Abbildung 3.24: Excision der TK-Neo Resistenzkassette

Nach Verpaarung der SCL-ExIV *knock-in* Mauslinie mit der SycP-Cre Generaldeleter Linie wurde der Nachwuchs der doppelt positiven männlichen Tiere mittels rtTA-spezifischem *Southern Blot* auf erfolgreiche Excision der Neo-Kassette untersucht.

1, Wildtyptier ohne *knock-in*; 2, rtTA *knock-in* mit Neo-Kassette; 3, rtTA *knock-in* ohne Neo-Kassette.

3.2.10 Etablierung der Neo- SCL-ExIV *knock-in* Linie

Durch Verpaarung von Neo- SCL-ExIV *knock-in* Mäusen mit Black6/C57J Inzuchttieren wurde die Neo- SCL-ExIV *knock-in* Linie stabil auf einem Black6/C57J Hintergrund etabliert werden. Die Analyse der Nachkommen zeigte die Transmission des „geflochten“ Locus in der Keimbahn (Abbildung 3.25).

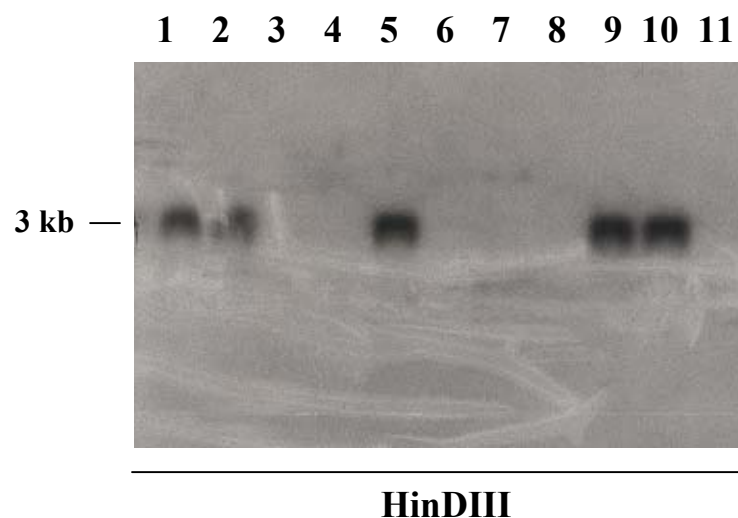


Abbildung 3.25: Transmission des geflochtenen rtTA-*knock-in* Locus auf einen Black6/C57J Hintergrund

Mittels *Southern Blot* Analyse wurde in den Nachkommen der Tiere mit Excision der Neomycinkassette eine Transmission des geflochtenen Locus nachgewiesen.

1-11, Geschwistertiere als Nachkommen eines Tieres mit Excision der Neomycinkassette.

3.3 Generierung von zehn transgenen SCL/EGFP-Responderlinien

Zur Generierung des konditionalen/reversiblen SCL *knock-outs* war es notwendig, transgene SCL-tetO-CMV-EGFP Responderlinien herzustellen. Diese Responderlinie wurden mit Hilfe des SCL-tetO-EGFP Responderkonstrukt (Abbildung 3.26 zeigt eine schematische Ansicht dieses Responderkonstrukts) durch Pronukleusinjektion in Donoroozyten generiert. Die Injektion der DNA und der Transfer der injizierten Oozyten, sowie die Entnahme der Schwanzbiopsien der Foundertiere wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Dr. Kurt Reifenberg, Universität Ulm, durchgeführt. Die DNA aus Schwanzbiopsien putativ transgener Nachkommen wurde auf Integration des Transgens geprüft.

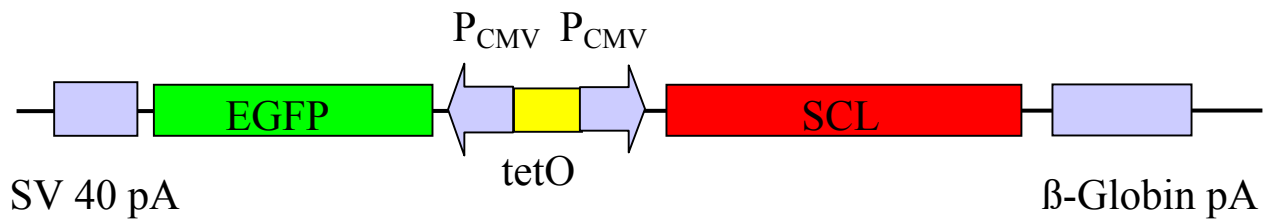


Abbildung 3.26: Transgenes Responderkonstrukt

Das Konstrukt zur Generierung der transgenen SCL-EGFP-Respondertiere enthält die SCL-cDNA (rote Box), sowie die EGFP codierende Sequenz (grüne Box) unter der transkriptionellen Kontrolle der tet regulierbaren CMV Minimalpromotoren.

SV40 pA, Polyadenylierungssignal des *Simean Virus 40*; β-Globin pA, Polyadenylierungssignal des Kaninchen β-Globingens.

3.3.1 Analyse der putativ transgenen Foundertiere

Durch Pronukleusinjektion wurden von Dr. Reifenberg 126 putative Foundertiere generiert. Diese wurden mit EGFP-spezifischem PCR-Screening auf die Integration der EGFP-cDNA untersucht. In diesem ersten Test wurden bei 18 Tieren sowohl die transgene SCL-cDNA (hierfür wurden die Oligonukleotide SCL-C und SCL-NC verwendet), als auch die transgene EGFP-DNA-Sequenz (EGFP-C und EGFP-NC als korrespondierende Oligonukleotide) nachgewiesen. Exemplarisch ist in Abbildung 3.27 das Ergebnis für 19 Proben der EGFP-spezifischen PCR dargestellt.

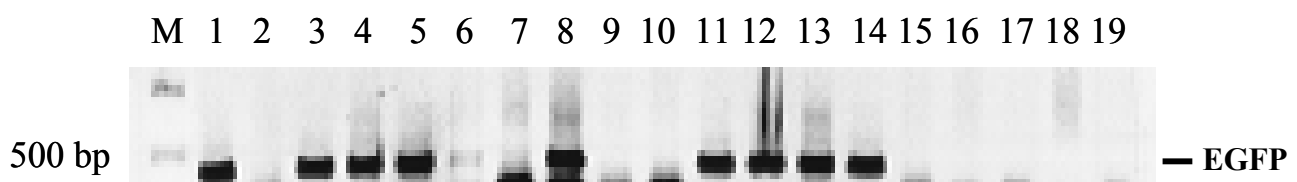


Abbildung 3.27: EGFP-spezifische PCR-Analyse von transgenen Responder-foundertieren

Die durch Pronukleusinjektion generierten Foundertiere wurden mittels einer EGFP-spezifischen PCR auf die Integration des Transgens untersucht

M, Marker (1 kb Ladder); 1-19, EGFP-spezifische PCR-Analyse der putativen Foundertiere 1-19.

Zur weiteren Verifizierung wurden die im ersten Test positiven Tiere nochmals mit einer EGFP-spezifischen, als auch nochmals mit einer SCL-spezifischen PCR analysiert. Dabei ergab sich, dass bei den EGFP positiven Proben auch jeweils die für das transgene SCL spezifische Sequenz nachgewiesen werden konnte. Diese Nachbestätigung ist für sechs Tiere exemplarisch in Abbildung 3.28 dargestellt.

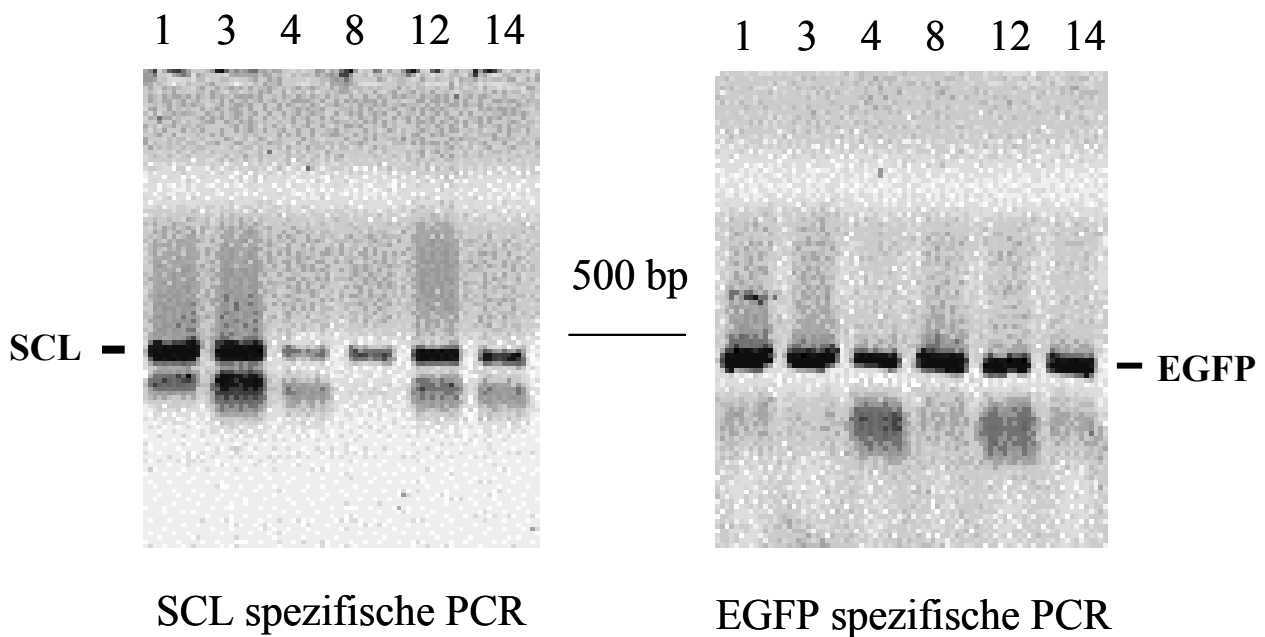


Abbildung 3.28: SCL und EGFP können in verschiedenen Foundertieren simultan mittels PCR nachgewiesen werden

In Foundertieren 1,3,4,8,12 und 14 konnte durch PCR-Analyse sowohl die rekombinante SCL, als auch EGFP-Sequenz detektiert werden. Wildtypkontrolle nicht abgebildet.

1, 3, 4, 8, 12 und 14, individuelle Foundertiere.

Die putativen Foundertiere wurden nun zur Vereinfachung der Zucht jeweils als TG-1 (TG=Transgen) bis TG-18 bezeichnet.

3.3.2 Etablierung von zehn transgenen Respondermauslinien

Die im ersten Test als positiv identifizierten transgenen Foundertiere wurden jeweils mit Black6/C57J Wildtyptieren verpaart. Analyse des resultierenden Nachwuchts mittels einer für das β -Globin Polyadenylierungssignal spezifischen Sonde im *Southern Blot* zeigte jedoch, dass von den 18 ursprünglich identifizierten Foundertieren nur zehn das Transgen in die Filialgeneration segregierten. Eines der weiblichen transgen positiv getesteten Foundertiere zeigte im Zuchtkäfig ein abnormales Verhalten und auch nach mehrmaligem Wechsel des

männlichen Zuchtpartners wurde keine Schwangerschaft bei diesem weiblichen Foundertier festgestellt. Die Foundertiere TG-1, TG-2, TG-3, TG-4, TG-5, TG-6, TG-7, TG-8, TG-14 und TG-16 vererbten das Transgen in die Filialgenerationen. Die aus der Verpaarung der Foundertiere resultierende Nachwuchs wurde dann auch mit der Nomenklatur der Foundertiere bezeichnet. Aus den Verpaarungsansätzen wurden letztendlich zehn transgene Linien etabliert. Diese Linien wurden zur weiteren Zucht und Analyse der Linien auf einen Black6/C57J Hintergrund weiter verpaart. Abbildung 3.29 zeigt einen *Southern Blot* von Respondertieren, welche das Transgen erfolgreich weitervererbten.

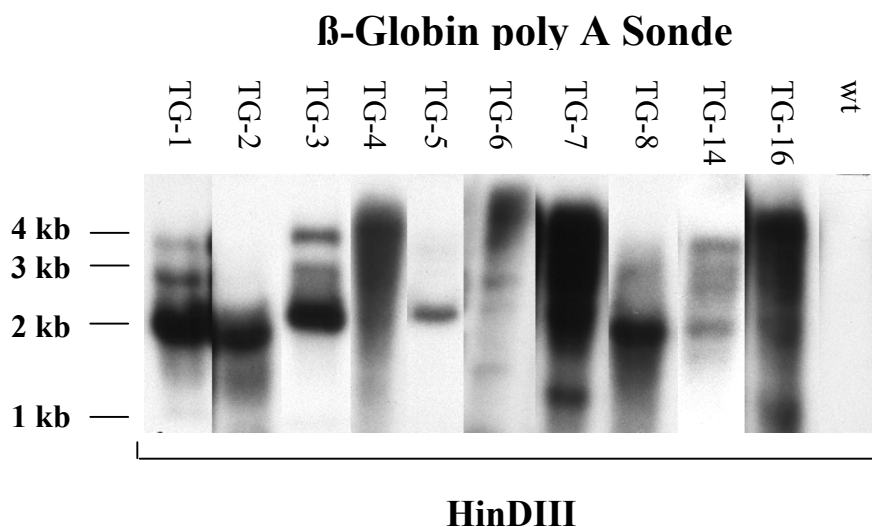


Abbildung 3.29: *Southern Blot* Analyse der zehn etablierten transgenen Responderlinien

DNA von zehn etablierten Linien wurden mit einer β -Globin Polyadenylierungssignal spezifischen Sonde untersucht.

TG-1 – TG-16, transgene Linien; wt, Wildtypmaus.

3.3.3 Analyse der transgenen Linien mittels MEF (murine embryonale Fibroblasten)-Transfektionsassay

Nach der Etablierung von zehn transgenen Responderlinien war es essentiell, diese Linien auch auf ihre gewünschte Funktion zu analysieren. Das bedeutet, dass in einem geeigneten Versuch die Induzierbarkeit der transgenen Responderkonstrukte innerhalb der jeweiligen transgenen Linien untersucht werden sollte. Dies erfolgte mit Hilfe eines MEF-Transfektionsassays. Hierzu wurden transgene männliche Tiere der jeweiligen Responderlinien mit nicht transgenen Wildtyp Black6/C57J Weibchen verpaart und aus den resultierenden Embryonen MEF-Kulturen angelegt.

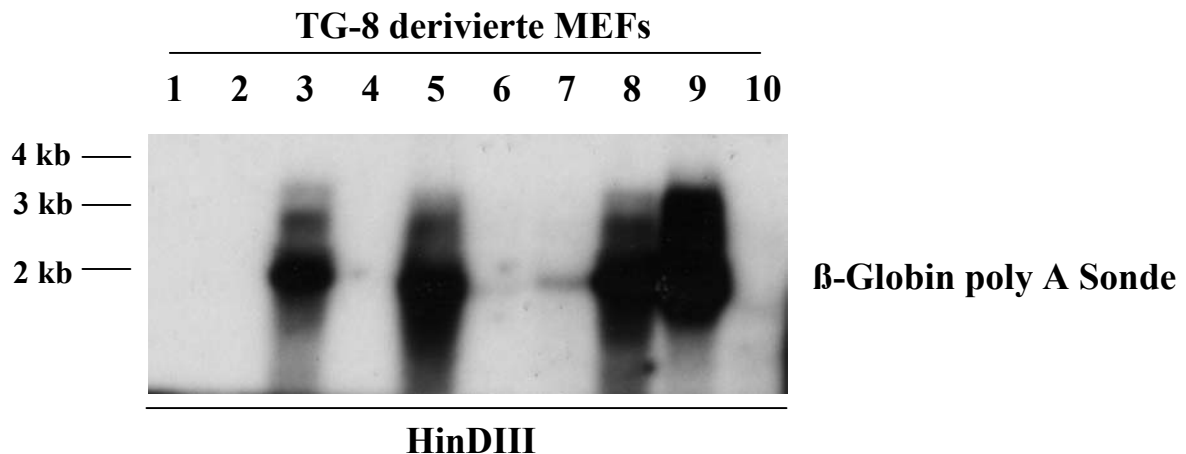


Abbildung 3.30: Southern Blot Analyse der transgenen MEFs

Fibroblastenkulturen aus verschiedenen Embryonen deriviert von transgenen Vätern wurden auf die Integration des Transgens untersucht. Nur die als positiv identifizierten Fibroblastenkulturen der jeweiligen Linien wurden im MEF-Assay eingesetzt (Hier für die transgene Linie TG-8 dargestellt).

Die aus den gewonnenen Embryonen etablierten Fibroblastenkulturen wurden zunächst auf das Vorhandensein des transgenen Responderkonstrukts untersucht (eine solche Analyse ist in Abbildung 3.30 dargestellt). Transgen-positive Fibroblastenkulturen wurden dann transient mit dem CMV-tTA-Expressionskonstrukt (pUHG17-1) transfiziert. Induktion der SCL-Responder mRNA mit Hilfe von DOX (Doxycyclin) wurde durch nachgeschaltete RT-PCR analysiert.

RT-PCR-Analyse der zehn transgenen Linien ergab, dass in vier Responderlinien (TG-1, TG-2, TG-6 und TG-14) rekombinantes SCL-Transkript unabhängig der DOX-Gabe zu detektieren war. Diese Linien sind als *leaky* in Abbildung 3.31 bezeichnet. In fünf der getesteten Linien (TG-3, TG-4, TG-7, TG-8 und TG-16) wurde in keinem Falle rekombinantes SCL detektiert (als *silent* bezeichnet). In der getesteten Responderlinie TG-5 war die Expression des SCL-Transkripts exogen induzierbar (als *stringent* bezeichnet). Das Ergebnis dieses RT-PCR Experiments ist sowohl in Abbildung 3.31 dargestellt, als auch in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

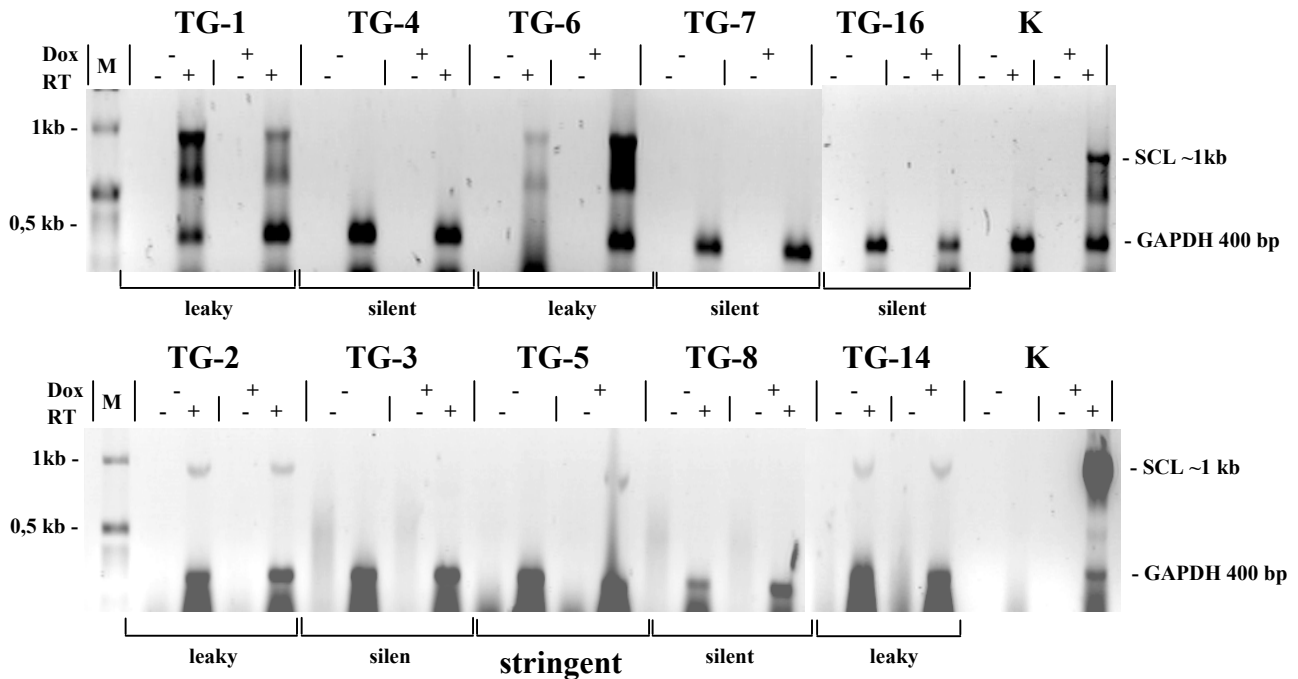


Abbildung 3.31: Transgene Mauslinie TG-5 ist exogen und stringent induzierbar

Transgene SCL-Expression in MEFs wurde im Beisein von Dox (+) und ohne Dox (-) nach Transfektion mit pUHG 17-1 mit Hilfe eines RT-PCR Assays detektiert. Um die Integrität der jeweils extrahierten RNA nachzuweisen, wurde gleichzeitig GAPDH (Glutaraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) mRNA koamplifiziert. Dox, Doxycyclin; TG, Transgene Mauslinie; RT, Reverse Transkription; W, Wasserkontrolle; K, Positivkontrolle; M, Marker (1 kb Ladder).

Transgene Linie	Ergebnis des MEF Assays
TG-1	konstitutiv
TG-2	konstitutiv
TG-3	nicht induzierbar
TG-4	nicht induzierbar
TG-5	stringent induzierbar
TG-6	konstitutiv
TG-7	nicht induzierbar
TG-8	nicht induzierbar
TG-14	konstitutiv
TG-16	nicht induzierbar

Tabelle 3.1: Tabellarische Auflistung des MEF Assay zur Regulierbarkeit des SCL-Transgens

3.4 Verpaarung der etablierten Linien

Die bereits beschriebenen Mauslinien Neo- SCL-ExIV *knock-in* und TG-5 wurden zur Generierung der konditionalen SCL *knock-out* Linie miteinander verpaart. Dazu wurden jeweils Tiere der beiden Linien ausgewählt und ein männliches mit jeweils zwei weiblichen Tieren verpaart.

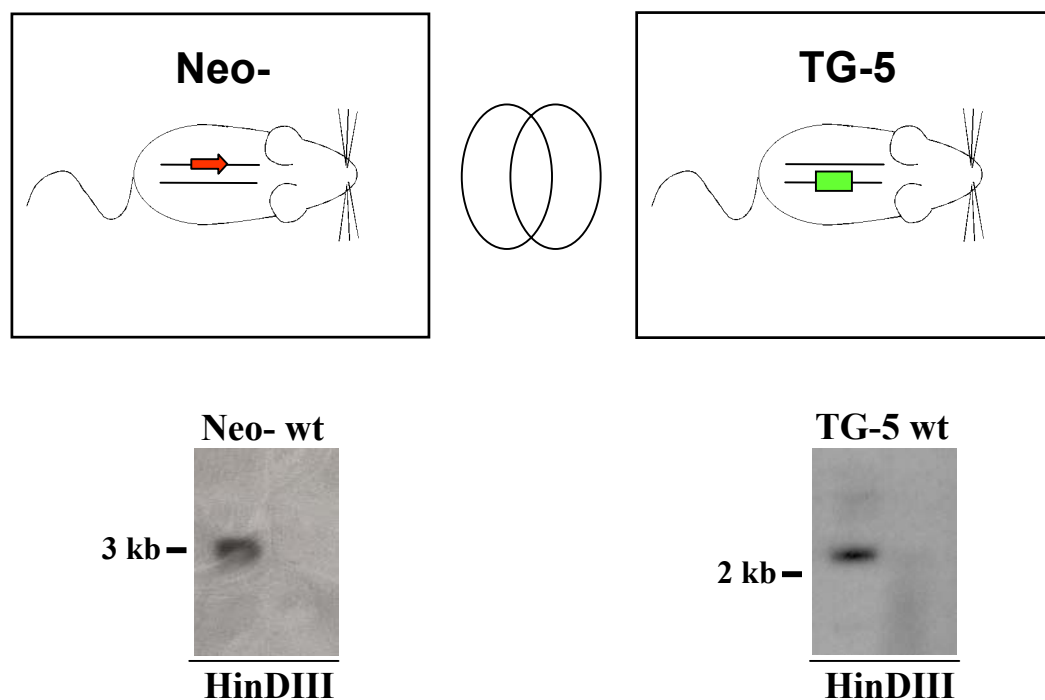


Abbildung 3.32: Verpaarung der Neo- und TG-5 Mauslinien

Als erster notwendiger Schritt zur Generierung der konditionalen SCL *knock-out* Maus wurden die generierten Linien Neo- und TG-5 miteinander verpaart. Im unteren Teil der Abbildung sind die Verifizierungen der im oberen Schema dargestellten Tiere mittels *Southern Blot* Analyse abgebildet.

Wt, Wildtypmaus.

3.4.1 Generierung der Neo-/Tg-5 Tiere

Es wurden jeweils positive Tiere der Mauslinien Neo- und Tg-5 zur Generierung von doppelt transgenen/*knock-in* Tieren verpaart. Der Nachwuchs der verpaarten Tiere wurde mit Hilfe von *Southern Blotting* auf den rTA-*knock-in*, bzw. das Vorhandensein des SCL-Responderkonstrukts untersucht. Es konnten in etwa der Hälfte der Nachkommen ein rTA-spezifisches Signal (*knock-in*) als auch das für das Respondertransgen spezifische β -Globin Signal identifiziert werden. Dementsprechend trugen etwa 25% der untersuchten Tiere beide genetischen Veränderungen (Abbildung. 3.33).

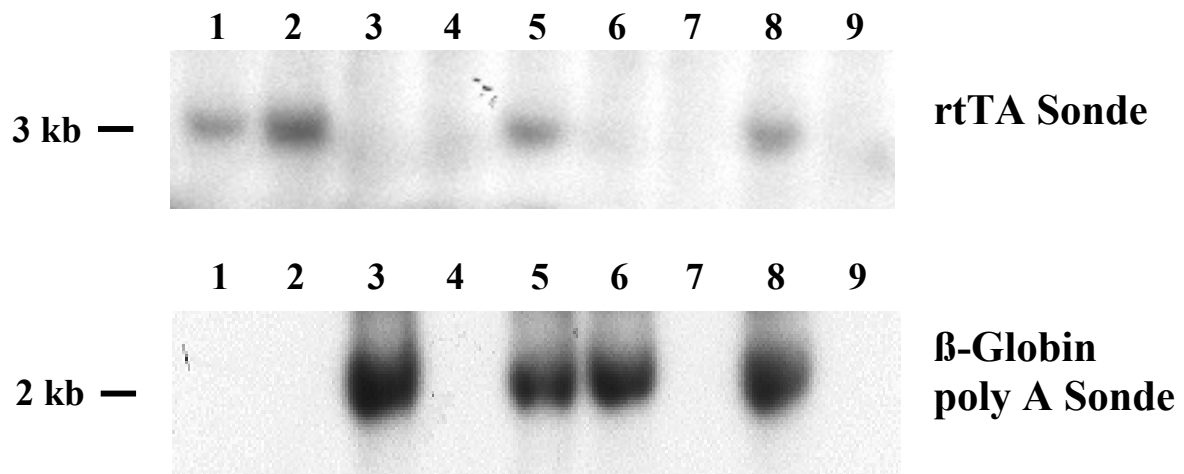


Abbildung 3.33: Bi-transgene Nachkommen der Neo-/TG-5 Verpaarung

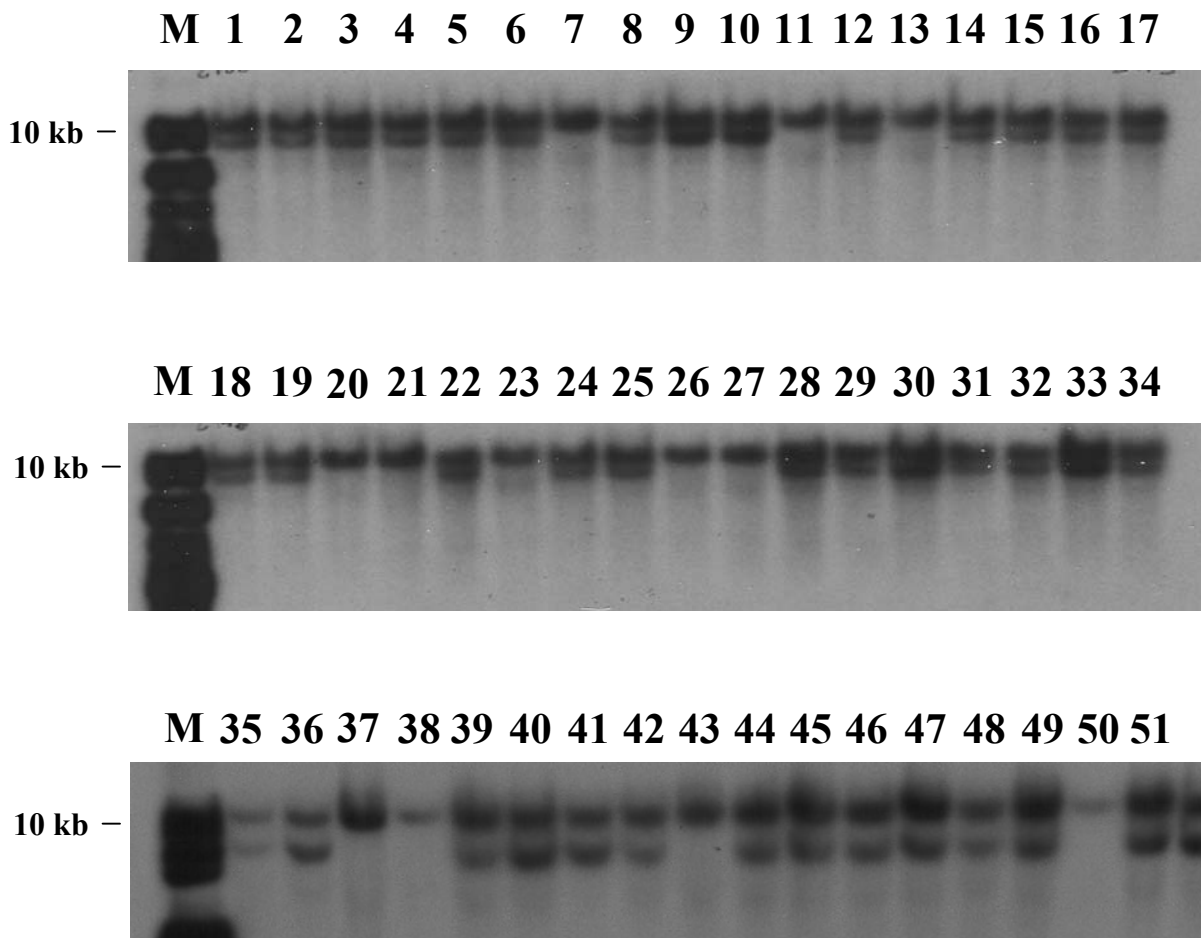
In einem *Southern Blot* Experiment wurde bei Nachkommen der Neo-/Tg-5 Verpaarung jeweils die rtTA- und β -Globin poly A-Sequenz detektiert.

1-9, Nachkommen der Neo-/TG-5 Verpaarung.

3.4.2 Rückkreuzung der Neo-/Tg-5 Tiere zur Generierung der SCL-/Neo-/Tg-5 Maus

Zur Generierung der potentiell konditionalen SCL-*knock-out* Linie, wurden die unter 0 identifizierten doppelt positiven Neo-/TG-5 Tiere verpaart, um so eine homozygote SCL/rtTA-*knock-in* Situation zu etablieren, in welcher der letale *knock-out* Phänotyp durch den SCL/EGFP-Responder-Genotyp (Expression von rekombinantem SCL durch permanente Gabe von DOX) möglicherweise gerettet werden könnte. Die dann nachgeschaltete Analyse der Nachkommen mit einer SCL-spezifischen 5' outside Sonde sollte im Falle eines *Rescues* im *Southern Blot* ein Fehlen der für den Wildtyplokus spezifischen 13 kb Bande zeigen. Nach Analyse der genomischen DNA von 51 F1-Tieren der Neo-/TG-5 Rückkreuzung konnte allerdings in keinem Falle ein Wegfallen der für den Wildtyplokus spezifischen 13 kb Bande beobachtet werden. Es wurden in den analysierten Tieren entweder nur die Wildtypbande (13 kb) oder eine Kombination von Wildtypbande und rtTA-*knock-in*-spezifischer Bande nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass keine Nachkommen unter den analysierten Tieren geboren wurden, welche den letalen SCL *knock-out/knock-in* Phänotyp retten konnten.

SCL spezifische 5' outside Sonde



HindIII

Abbildung 3.34: Southern Blot Analyse der Nachkommen der Neo-/TG-5 Rückkreuzung

Nachkommen, resultierend aus der Rückkreuzung der Neo-/TG-5 bi-transgenen Tiere, wurden mittels der SCL Locus-spezifischen 5' outside Sonde untersucht. Die meisten untersuchten Tiere zeigten das für den heterozygoten *knock-in* Genotyp typische Doppelbandenmuster (13 kb Wildtypbande und 7,5 kb Bande für den homolog rekombinierten Locus). Einige der Tiere zeigten nur die für den Wildtyploкус spezifische 13 kb Bande. Keines der analysierten Tiere zeigte den Verlust der Wildtypbande, welcher bei einem erfolgreichen *Rescue* des SCL *knock-out* Phänotyp zu erwarten gewesen wäre.

M, Marker (1kb Ladder); 1-51, Nachkommen der Rückkreuzung Neo-/TG-5.

3.5 Herstellung von Targetingkonstrukten mit tTA2S

Da die durch homologe Rekombination in ES-Zellen generierte *knock-in* Linie für das Targetingkonstrukt ExIV im RT-PCR Versuch nicht nur das erwartete Amplifikat, sondern auch weitere rtTA-spezifische Amplifikate zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass inkorrektes Splicing in Exon IV des SCL *knock-in* Locus für diese zusätzlichen Amplifikate

verantwortlich war. Aus diesem Grund wurden neue Targetingkonstrukte durch Umklonierung der ursprünglichen Konstrukte hergestellt. Anstatt des ursprünglichen rtTA cDNA wurde in diese die tTA2S codierende Sequenz eingefügt. Der tTA2S Transaktivator ist eine neue und verbesserte Version des ursprünglich in den Targetingkonstrukten verwendeten rtTA Transaktivators (Hasan et al. 2001). Der tTA2S Transaktivator wurde molekular so verändert, dass kryptische Spliceakzeptoren eliminiert wurden, sowie die prokaryotischen Codone „eukaryotisiert“ wurden. Zudem besitzt der tTA2S nur noch einen dreifachen Repeat der aktivierenden Teildomäne des VP16 Proteins. Diese Veränderung des tTA2S reduziert die von anderen Arbeitsgruppen berichtete Toxizität der *full-length* VP16 Aktivationsdomäne (Berger et al. 1992). Um den tTA2S auch in das Exon V des SCL-Lokus einfügen zu können und da für das Targetingkonstrukt ExV keine rtTA Linie etabliert werden konnte, wurde in diesem Konstrukt auch die rtTA codierende Sequenz durch die tTA2S Sequenz ersetzt.

3.5.1 Umklonierung des Targetingkonstrukts Exon IV (ExIV)

Um die codierende Sequenz des rtTA durch die tTA2S-Sequenz zu ersetzen, wurde mittels gerichteter Mutagenese eine NheI Restriktionsschnittstelle vor dem transkriptionellen Startpunkt des rtTA in das Plasmid eingefügt. Diese Veränderung wurde mit dem Quick Change Site Directed Mutagenesis Kits und den beiden Oligonukleotiden 1268MutNheI-C und 1268MutNheI-NC durchgeführt. Nachdem das so gewonnene Plasmid (ExIVNheI) mittels Restriktionsverdau verifiziert worden war, wurde die tTA2S codierende Sequenz über eine gerichtete NheI/NotI Klonierung eingefügt. Da im von Prof. Bujard (ZMBH, Heidelberg) freundlicherweise zur Verfügung gestellten pUHT61-1 Plasmid (dies enthält die tTA2S codierende Sequenz) keine NheI Restriktionsschnittstelle vorhanden war, musste der tTA2S zuerst umkloniert werden. Dafür wurde die tTA2S Sequenz mittels der Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII (beide mittels Klenow Fragment *blunt* gemacht) aus dem pUHT61-1 Vektor geschnitten und in den mit AflII (*blunt* gemacht) und EcoRV geöffneten pcDNA3.1+hygro Vektor kloniert. Die codierende Sequenz des tTA2S wurde danach in das mutierte ExIVNheI Konstrukt gerichtet (NheI/NotI) einkloniert.

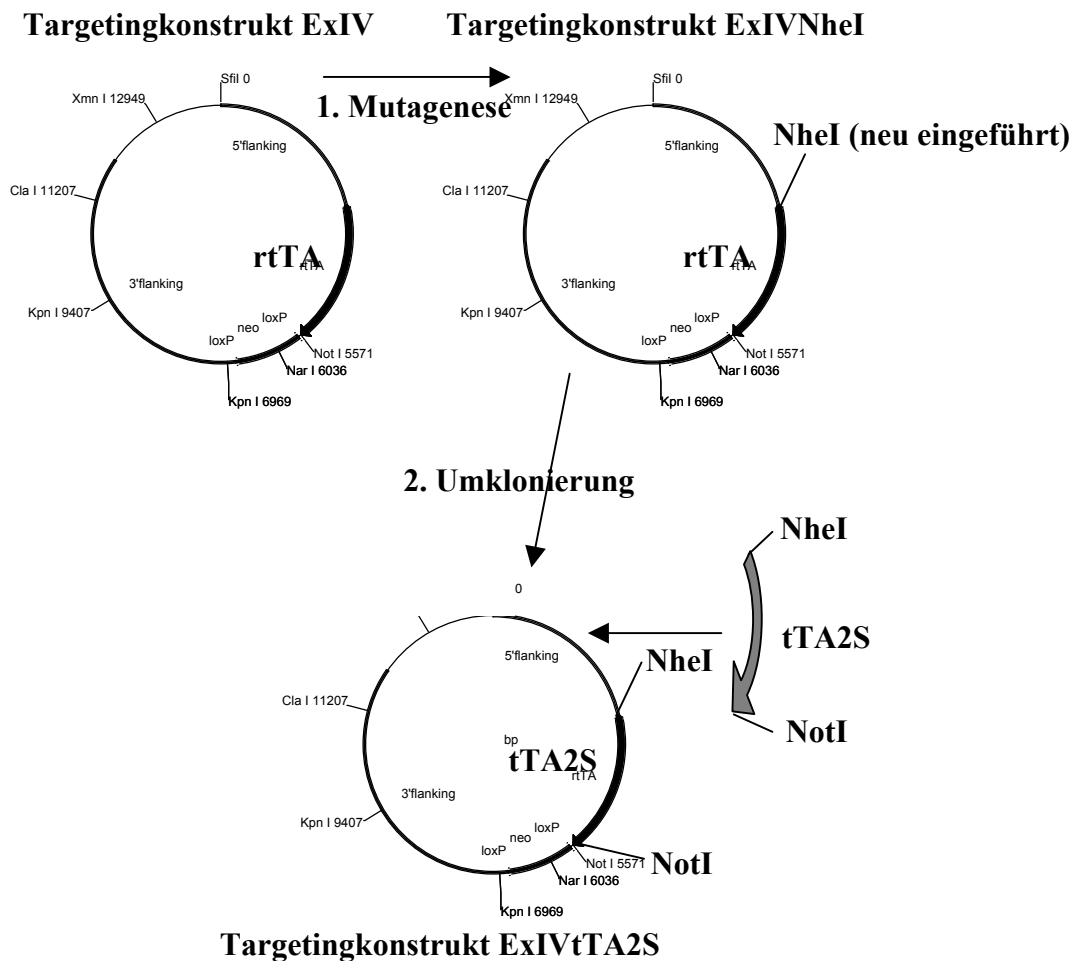


Abbildung 3.35: Klonierungsschema zur Generierung des tTA2S Targetingkonstrukts ExIV

Durch Mutagenese wurde vor dem rtTA eine NheI Schnittstelle eingeföhrt, in die dann mit Hilfe der vor der Neomycinkassette liegenden NotI Schnittstelle die tTA2S codierende Sequenz einkloniert wurde.

Nach Verifizierung der durch Mutagenese eingeföhrt NheI Schnittstelle und Insertion der für den tTA2S codierenden Sequenz wurde das resultierende Konstrukt mittels Restriktionsendonukleasenverdaus verifiziert. Die Analyse der Restriktion zeigte das erwartete Fragmentmuster, womit bewiesen war, dass dieses die gewünschte Sequenz enthielt (Abbildung 3.36).

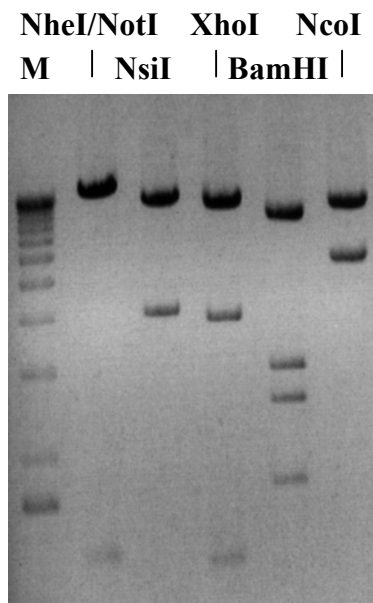


Abbildung 3.36: Restriktionsendonukleasenverdau des Targetingkonstrukts ExIVtTA2S

Das umklonierte Targetingkonstrukt wurde mittels Enonukleasenverdau mit den Enzymen NheI, NotI, NsiI, XhoI, BamHI und NcoI verdaut. Das Fragmentmuster entsprach dem vorhergesagten Muster. Damit war das neue Konstrukt ExIVtTA2S verifiziert. Dieses neu hergestellte Targetingkonstrukt konnte deshalb zur Insertion des tTA2S in das SCL Exon IV und damit zur Herstellung der zum *Rescue* des letalen SCL *knock-out* Phänotyps wichtigen *knock-in* Linie verwendet werden.

M, Marker (1 kb Ladder).

3.5.2 Umklonierung des Targetingkonstrukts Exon V (ExV)

Die Einführung der tTA2S codierenden Sequenz gestaltete sich im Falle des Targetingkonstrukts ExV etwas umfassender als im Falle des Targetingkonstrukts ExIV. Initiale Versuche zur Einführung einer neuen Restriktionsschnittstelle durch Mutagenese schlugen wiederholt fehl. Deshalb wurde eine alternative Strategie zur Umklonierung des Konstrukts angewendet.

Da die IRES Sequenz im umklonierten Konstrukt nicht mehr enthalten bleiben sollte, musste diese entfernt werden. Gleichzeitig gab es im Exon IV des SCL-Lokus ein zusätzliches ATG-Codon, welches eliminiert werden musste. Ferner musste im 5' Bereich der IRES-Sequenz eine zusätzliche NheI Schnittstelle eingeführt werden.

In der hier gewählten Strategie wurden mehrere PCR-Amplifikate mit mutierten Oligonukleotiden verwendet, um diese dann mit Teilen des ursprünglichen Konstrukts zusammenzufügen. Die Strategie zur Klonierung des neuen Konstrukts ist bildlich in Abbildung 3.37 dargestellt.

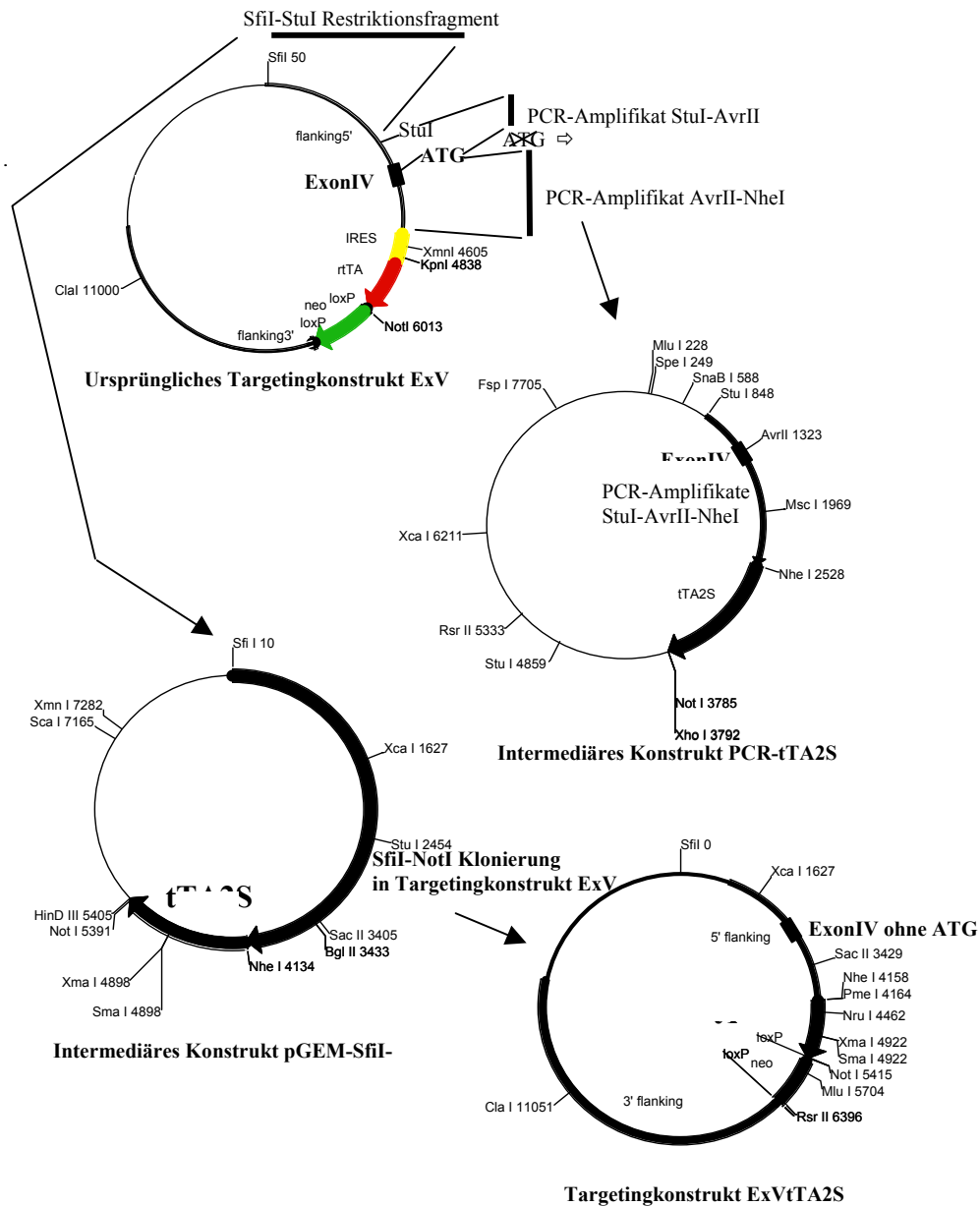


Abbildung 3.37: Generierung des Targetingkonstrukts ExVtTA2S

Das ursprüngliche Konstrukt wurde so abgeändert, dass die tTA2S codierende Sequenz an Stelle der IRES/rtTA Sequenzen eingefügt wurde. Die schrittweise Herstellung des Targetingkonstrukts ExVtTA2S ist unter 3.5.2 im Text ausführlich beschrieben.

Um die gewünschten Änderungen in das ExV Konstrukt einzufügen, wurden vier Oligonukleotide gewählt, die in einer PCR-Reaktion Teilsequenzen des Konstrukts amplifizierten. Die verwendeten Oligonukleotide wurden so gelegt, dass kurze Fragmente mit im amplifizierten Bereich des Targetingkonstrukts nur einmal vorkommenden Restriktionsschnittstellen entstanden (siehe Abbildung 3.38 zur Lage und Bezeichnung der verwendeten Oligonukleotide).

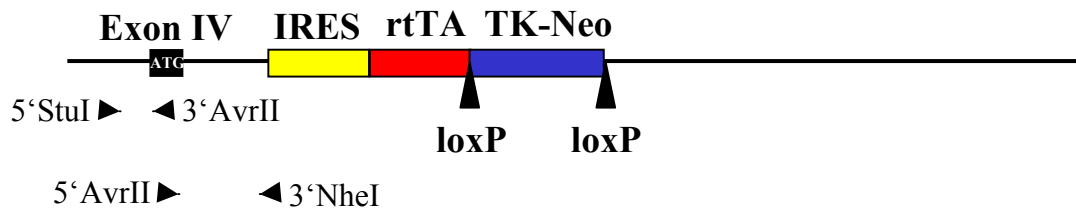


Abbildung 3.38: Lage der Oligonukleotide zum Targetingkonstrukt ExV

Die verwendeten Oligonukleotide beinhalten jeweils die angegebene Restriktionsschnittstelle. IRES, *internal ribosome entry site*; rtTA, rtTA codierende Sequenz; TK-Neo, Neomycinresistenzkassette.

Die Oligonukleotide 3'AvrII und 5' AvrII wurden dabei so gewählt, dass das interne ATG-Codon im Exon IV bei der PCR und der anschließenden Ligation der beiden resultierenden PCR-Fragmente StuI-AvrII und AvrII-NheI eliminiert wurde. Analog wurde das 3'NheI Oligonukleotid so gewählt, dass am 5' Ende der IRES-Sequenz eine NheI Schnittstelle eingefügt wurde.

Nach Amplifikation der beiden benötigten PCR-Fragmente StuI-AvrII von 0,5 kb Größe und AvrII-NheI von 1,2 kb Größe (Siehe Abbildung 3.39) wurden diese mittels TOPO TA Klonierung in den pCR2.1 Vektor kloniert. Da die Fragmente mit Hilfe von PCR amplifiziert wurden, war es wichtig, diese vollständig auf ihre Nukleotidsequenz zu überprüfen. Die DNA-Sequenzanalyse ergab, dass beide Fragmente in ihrer Basensequenz korrekt waren und zur Herstellung des Targetingkonstrukts geeignet waren. Im pCR2.1 Vektor wurden die beiden PCR-Fragmente nun zusammengefügt, was in der Generierung eines 1,7 kb StuI-NheI Fragments resultierte. Dieses Fragment wurde in einem nächsten Klonierungsschritt mit dem schon in 3.5.1 verwendeten tTA2S NheI-NotI Fragment komplettiert.



Abbildung 3.39: PCR-Amplifikation der 0,5 kb StuI-AvrII und der 1,2 kb AvrII-NheI Sequenz

Die mittels PCR amplifizierten Fragmente wurden zur Größenbestimmung vor der Klonierung elektrophoretisch aufgetrennt.

Das so entstandene StuI-NotI Fragment, welches neben der SCL-Lokussequenz auch die codierende tTA2S Sequenz enthielt, wurde nun mit dem 5' liegenden Bereich des SCL-Lokus

komplettiert. Dazu wurde ein SfiI-StuI Fragment aus dem Targetingkonstrukt ExV geschnitten und in den Klonierungsvektor pGEM11ZF+ (ebenfalls mit SfiI und NotI restringiert) kloniert. Das so entstandene Intermediat wurde mittels StuI-NotI restringiert und das oben beschriebene StuI-NotI Fragment, welches den tTA2S beinhaltet, in den mit StuI/NotI geöffneten pGEM Vektor, der das SfiI/NotI-Fragment des Targetingkonstrukts ExV enthielt, einkloniert. Durch Rückklonierung des entstandenen Fragments SfiI-NotI (aber mit tTA2S und eliminiertem ATG im Exon IV) in das mit SfiI und NotI geöffneten Targetingkonstrukt ExV konnte im letzten Klonierungsschritt das ExVtTA2S Targetingkonstrukt generiert werden. Zur Verifizierung dieses Konstrukts wurde dieses mit den Restriktionsendonukleasen NotI, NheI, XhoI, HinDIII, XbaI, BamHI und SfiI verdaut und das Fragmentmuster analysiert (Abbildung 3.40).

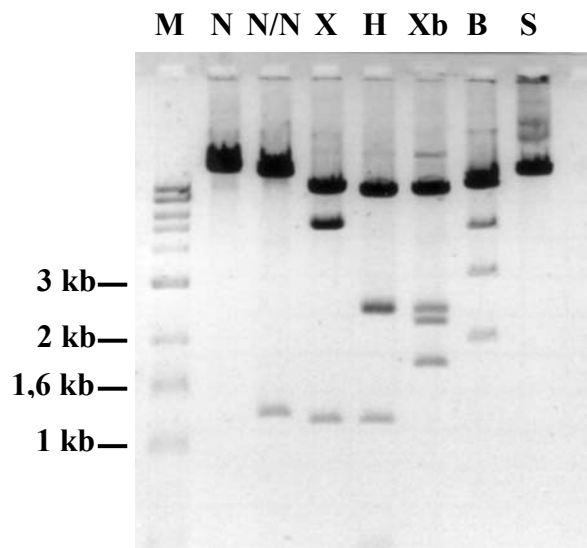


Abbildung 3.40: Restriktionsanalyse des Targetingkonstrukts ExVtTA2S

Der analytische Restriktionsverdau des Targetingkonstrukts zeigte das erwartete Fragmentmuster.

M, Marker (1kb Ladder); N, NotI; N/N, NotI/NheI Doppelverdau; X, XhoI; H, HinDIII; Xb, XbaI; B, BamHI; S, SfiI.

Die Analyse des Fragmentmusters für das Targetingkonstrukt ExVtTA2S ergab die zu erwartenden Muster. Das neu generierte Targetingkonstrukt ExVtTA2S kann deshalb zur Generierung von ExVtTA2S *knock-in* Mäusen eingesetzt werden.

3.5.3 Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone für das ExIVtTA2S Targetingkonstrukt

Nachdem das Targetingkonstrukt ExIVtTA2S kloniert und verifiziert worden war, wurde es analog zu den schon beschriebenen Targetingkonstrukten ExIV und ExV mittels Elektroporation in ES-Zellen eingebracht. Nach der Elektroporation wurden individuelle ES-Zellklone gepickt, amplifiziert und in einem *Southern Blot* Experiment auf die homologe Rekombination im 5' Bereich des SCL-Lokus untersucht. Die verwendete 5' outside Sonde war dabei identisch mit der in 0 verwendeten Sonde. Analog zu dem vorherigen Versuch wurden hier ebenfalls der genomische SCL-Lokus und der 5' rekombinierte *knock-in* Locus durch den Größenunterschied nach HindIII Verdau und *Southern Blotting* diskriminiert (siehe Abbildung 3.8 zur Lage der Sonde und dem Restriktionsverdau mit HindIII).

Die erste Analyse der untersuchten ES-Zellklone zeigte, dass von etwa 500 untersuchten Klonen vier Klone das für den ExIV *knock-in* spezifische Doppelbandenmuster auswiesen.

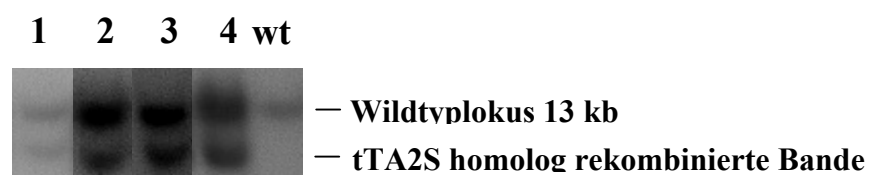


Abbildung 3.41: Rekombinierte ES-Zellklone für das Targetingkonstrukt ExIVtTA2S

Die Analyse der vier rekombinierten ES-Zellklone mit der SCL Locus-spezifischen 5' outside Sonde zeigt die homologe Rekombination.

1-4, ES-Zellklone; wt, Wildtyp ES-Zell-DNA.

Die im ersten *Southern Blotting* Experiment positiven vier Klone wurden revitalisiert, amplifiziert und analog zu den bereits beschriebenen ES-Zellklonen für die ursprünglichen Targetingkonstrukte in Blastozysten injiziert. Nach der Geburt von fünf chimären Tieren, davon 3 hochchimären männlichen Tieren und zwei weiblichen Tieren, wurden diese Chimären mit Black6/C57J Wildtyp-Tieren verpaart. Es konnte bisher nach mehreren Würfen keine Keimbahntransmission des agouti-Lokus und gekoppelt damit eine mögliche Keimbahntransmission des *knock-in* Locus beobachtet werden.

Für das Targetingkonstrukt ExVtTA2S standen bis zum Abschluss dieser Arbeit noch keine homolog rekombinierten ES-Zellklone zur Verfügung.

4. Diskussion

Die Generierung von innovativen Mausmodellen zur Erforschung biomedizinischer Fragestellungen hat in den letzten zehn Jahren immer mehr an Stellenwert zugenommen. Nach dem erfolgreichem Einsatz des Tet-Systems Gossen and Bujard 1992 und dessen Einsatz zur Herstellung von transgenen Mäusen (zu einer Übersicht siehe auch Zhu et al. 2002) konnte dieses System erfolgreich zur konditionalen Expression von Genen in der Labormaus etabliert werden. Der Einsatz des Tet-Systems zur Etablierung von konditional/reversibler Expression des Endothelin-Rezeptor-B-(*Ednrb*)Gens in einem *Ednrb* Nullhintergrund zeigte erstmals, dass diese Technik zur Untersuchung von Genablationen und deren Rettung möglich ist (Shin et al. 1999). Da sich dieses System besonders zur Untersuchung von Genen, welche einen letalen Phänotyp des homozygoten Nullallels zeigten eignet, wurde es in der vorliegenden Arbeit zur Einführung eines Modells zur exogenen Regulation des SCL-Gens (zu einem Übersichtsartikel zu SCL siehe Begley and Green 1999) herangezogen. Dazu waren zwei individuelle Mauslinien nötig, auf der einen Seite eine rtTA-exprimierende Effektorlinie, die den rtTA in einer Weise exprimiert, die dem Expressionsmuster des SCL-Gens entsprach, und auf der anderen Seite eine Responderlinie, die in der Lage war, die rekombinante SCL-cDNA unter der transkriptionellen Kontrolle des Tet-Systems zu exprimieren. Da beide Linien im Projekt individuell generiert worden, sollen diese auch erst unabhängig voneinander diskutiert werden, um dann auf die Verpaarung beider Linien eingehen zu können. Die initiale Verifizierung der Konstrukte soll vorab gemeinsam für alle verwendeten Konstrukte (Targetingkonstrukt ExIV und ExV, sowie das transgen SCL/EGFP-Responderkonstrukt) diskutiert werden.

4.1 Die Konstrukte zur Generierung der individuellen Mauslinien

Da die Konstrukte zur Generierung der individuellen Mauslinien bereits zu Beginn der vorliegenden Arbeit von Dr. Ernesto Bockamp fertiggestellt wurden, mussten diese lediglich verifiziert werden, um dann in den folgenden Experimenten eingesetzt zu werden. Die Sequenzierung der beiden Targetingkonstrukte ExIV und ExV zeigte, dass beide Plasmide die erwartete Basenabfolge im analysierten Bereich enthielten. Die Verifizierung der Sequenzen war vor allem für funktionstragende Strukturelemente notwendig. Zu diesen Strukturen zählte die mit loxP Sequenzen flankierte Neomycin-Resistenzkassette, da diese nur bei eindeutig

verifizierter Basenfolge der loxP Sequenzen mit Hilfe der später geplanten Cre-Expression zu excisieren war. Außerdem sollte der transkriptionelle Startpunkt des rtTA in Hinsicht auf seine Basenabfolge untersucht und verifiziert werden. Diese Analysen zeigten, dass die Sequenz der Konstrukte in allen Fällen die gewünschte Basenfolge enthielt. Der anschließende Verdau der Targetingkonstrukte mit Hilfe von ausgewählten Restriktionsendonukleasen zeigte darüber hinaus das erwartete Fragmentmuster, welches wiederum die Richtigkeit der einzelnen Konstrukte bestätigte. Durch die Analyse waren beide Targetingkonstrukte hinreichend überprüft und konnten zum langfristigen Projekt der Generierung der SCL *knock-in* Mauslinien eingesetzt werden. Die Überprüfung der beiden Konstrukte war wie schon erwähnt, eine grundlegende Voraussetzung zur erfolgreichen Etablierung der geplanten Mauslinien.

Analog zu den Targetingkonstrukten ExIV und ExV konnte ebenfalls das transgene SCL/EGFP-Responderkonstrukt mittels Sequenzierung und parallelem Restriktionsverdau verifiziert werden. Da hier auf den kommerziellen pBI-EGFP-Vektor und eine im Vorfeld verifizierte murine SCL cDNA zurückgegriffen worden war, mussten nur die Klonierungsschnittstellen zwischen Vektor und rekombinantem SCL in Hinsicht auf ihre Basenabfolge überprüft werden. Der Restriktionsverdau des Responderkonstrukt zeigte ebenfalls das erwartete Fragmentmuster, somit konnte auch das transgene SCL/EGFP-Responderkonstrukt als verifiziert angesehen werden und für die geplante Mikroinjektion eingesetzt werden.

4.2 Das Targetingkonstrukt ExIV und die Etablierung der *knock-in* Mauslinie

Nachdem das Targetingkonstrukt ExIV im ersten Schritt verifiziert worden war, wurde es anschließend zur homologen Rekombination in die W9.5 ES-Zellen elektroporiert. Nach Selektion der ES-Zellen mittels G418, der klonalen Vereinzelung der ES-Zellen und der Propagierung dieser, konnten circa 1500 individuelle ES-Zellklone etabliert werden. Die große Anzahl von Klonen erforderte eine recht aufwendige Logistik der Kultur der Zellen und der ersten Untersuchung dieser auf eine mögliche homologe Rekombination. Da die Zellen zudem in jeweils fünf Replikapplatten kultiviert wurden, deutet dies schon den immensen Arbeitsaufwand an. Nachdem die ES-Zellklone, welche aus der Elektroporation mit dem Targetingkonstrukt ExIV und der späteren klonalen Selektion hervorgingen, kultiviert worden waren, wurde jeweils eine der Replikapplatten weiterverarbeitet, um genomische DNA zu gewinnen. Nach der ersten Analyse der DNA in einem *Southern Blot* Experiment konnten

fünf der analysierten Klone als 5' homolog rekombiniert identifiziert werden. Die geringe Zahl von homolog rekombinierten Klonen im Vergleich zu der absoluten Anzahl getesteter Klone zeigt, dass die homologe Rekombination des Targetingkonstrukts ExIV in den genomischen SCL-Lokus ein seltenes Ereignis darstellte. Da in dem vorliegenden Fall keine zusätzliche Gegenselektion verwendet werden konnte, wie diese z.B. durch die Verwendung der *Herpes simplex* Typ 1 Thymidinkinase (HSV-TK) oder des Diphtheriatoxin A Fragments (DTA) schon erfolgreich beschrieben wurde (Borrelli et al. 1988, Chen and Bradley 2000, Yanagawa et al. 1999), ist die geringe Zahl von erhaltenen Klone nicht unüblich. Durch die Verwendung der genannten Gegenselektion wäre es eventuell möglich gewesen, die Rekombinationsfrequenz um einen Faktor 3-10 zu erhöhen. Nur ein Klon in 300 analysierten ES-Zellklonen, welche mit dem Targetingkonstrukt ExIV elektroporiert worden waren, zeigte das erwartete Bandenmuster für den genomischen, nicht alterierten Locus mit einer 13 kb großen Bande und im zweiten Allel den rekombinierten Locus mit einer 7,5 kb Bande bei der Hybridisierung der mit *HinDIII* restringierten DNA mit einer SCL 5' outside Sonde im *Southern Blot*. (Zum besseren Verständnis sind die Vorgänge und die resultierenden Restriktionsfragmente bei Rekombination des Targetingkonstrukts ExIV in den SCL-Lokus in Abbildung 4.1 nochmals schematisch dargestellt.

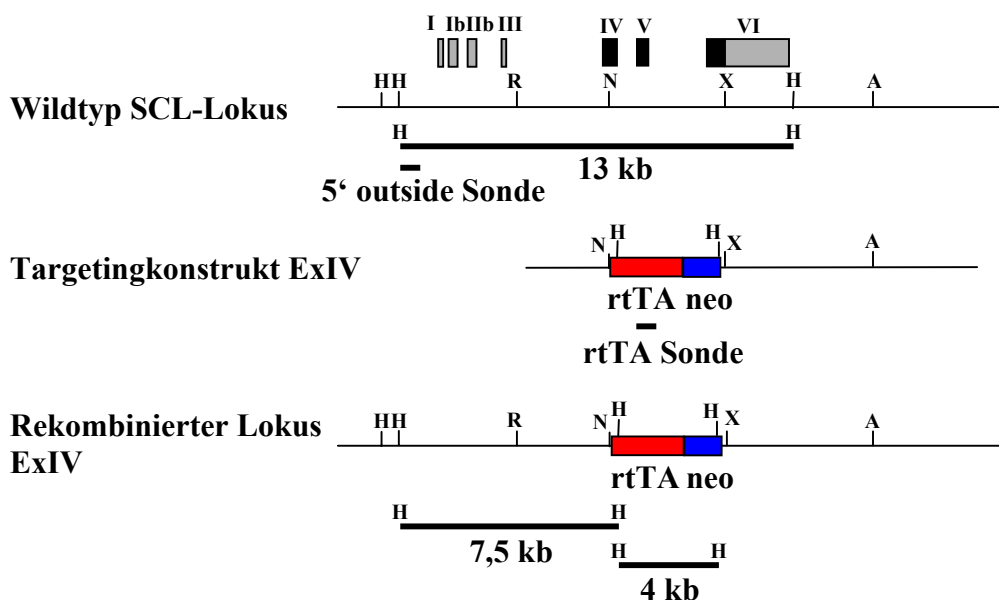


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Targetingkonstrukts ExIV

Durch die homologe Rekombination des Targetingkonstrukts ExIV wird der die rtTA codierende Sequenz unter die regulierende Kontrolle des SCL-Lokus gebracht. Durch die neu eingeführten *HinDIII* Restriktionsschnittstellen (H) innerhalb des Targetingkonstrukts ExIV kann durch Hybridisierung mit der 5' outside Sonde der rekombinierte Locus vom Wildtypallel diskriminiert werden.

Graue Boxen, nicht codierende Exone; schwarze Boxen, codierende Exone; H, *HinDIII*; R, *EcoRI*; N, *NdeI*; X, *XhoI*; rtTA, reverser tet-abhängiger Transaktivator; neo, Neomycinresistenzkassette.

Die Revitalisierung der im ersten Schritt als 5' homolog rekombiniert identifizierten fünf Klone zeigte, dass nur vier dieser Klone erfolgreich revitalisiert werden konnten. Dies ist vermutlich auf eine herabgesetzte Effizienz beim Einfrieren oder Auftauen des nicht mehr zu revitalisierenden Klons zurückzuführen. Eine weitere Untersuchung der verbleibenden vier Klone zeigte, dass zwar alle vier auch die rtTA-Sequenz trugen, aber nur bei zwei Klonen das korrekte Bandenmuster, sprich im *Southern Blot* Experiment die erwartete 4 kb Bande bei einer Hybridisierung mit einer rtTA-spezifischen Sonde detektiert werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass ausschließlich die Klone ES3 und ES4, nicht nur im 5' Bereich des Locus korrekt rekombiniert hatten, sondern zumindest auch über die rtTA-Sequenz hinaus das Konstrukt intakt war. Anders bei den verbleibenden ES-Klonen. Zwar war bei diesen Klonen die Rekombination 5' korrekt, allerdings müssen sich bei der Rekombination des Targetingkonstrukts ExIV in den SCL-Lokus weiter 3' liegenden Bereiche des Konstrukts unvollständig oder fehlerhaft integriert haben. Diese Annahme würde das bereits angesprochene inkorrekte Hybridisierungsmuster von mehr als 4 kb erklären können. Da die Klone ES3 und ES4 eine korrekte 4 kb Bande im analytischen *Southern Blot* zeigten, wurden die restlichen, nicht korrekten Klone verworfen und nicht zur Blastozystinjektion verwendet. Die Injektion beider korrekter Klone ES3 und ES4 in Blastozysten zeigte, dass nur von mit Klon ES4 injizierten Blastozysten chimäre Tiere geboren wurden. Die Tatsache, dass ES3 keine chimären Tiere generierte, legt die Vermutung nahe, dass der Klon ES3 möglicherweise einen nicht mehr korrekten Karyotyp aufwies, der aber die Kultivierung der ES-Zellen selbst nicht beeinträchtigte. Möglicherweise hatte auch durch die *ex vivo* Passagierung dieses Klons eine ungewollte Differenzierung der ES-Zellen stattgefunden, die einen Beitrag der ES-Zellen zum Embryo verhinderte. Die Injektion des Klones ES4 und die Geburt von chimären Tieren aus dieser Injektion, zeigt, dass die eingesetzten ES-Zellen generell in der Lage waren, zur Bildung des Embryos beizutragen und somit den beobachteten Chimarismus zu verursachen. Ein solcher Chimarismus entsteht dadurch, dass die eingesetzten ES-Zellen von einer Mauslinie stammen, welche die Fellfarbe agouti (also leicht hell braun) besitzen, während die Blastozysten, in welche die ES-Zellen injiziert werden, von Black6 Tieren stammen, welche ein schwarzes Fell besitzen. Trägt nun eine oder mehrere der injizierten ES-Zellen zur Embryogenese und damit zum ganzen Tier bei, und war dieser Anteil der ES-Zellen im geborenen Tier groß genug, so sollten auch die Haut und damit das Fell der geborenen Mäuse von den injizierten ES-Zellen deriviert sein und somit für die agouti-Farbe codieren. Der Rest des Fells, dessen Ursprung aus der Blastozysten (und damit Black6) kam, ist in diesem Fall natürlich schwarz. Je größer der Anteil von hellem Fell in der chimären Maus ist, desto größer

war der Anteil der ES-Zellen an ihrer Embryo- und Organogenese und desto mehr Zellen und somit auch Keimzellen sollten die in die ES-Zellen eingebrachte genetische Veränderung tragen. Aus der Verpaarung der aus der Injektion von ES4 hervorgegangenen männlichen Chimäre mit weiblichen Black6/C57J Tieren folgte die Geburt von mehreren gesunden Nachkommen, in denen durch *Southern Blot* Analyse die rtTA-Sequenz erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Die Segregation des rekombinierten SCL Locus der chimären Maus zeigte eindeutig die Keimbahntransmission des *knock-in* Locus.

Um die etablierte ExIV-Linie eindeutig auf korrekte Rekombination zu charakterisieren, war es darüber hinaus notwendig, zusätzlich zur Bestätigung der 5' Rekombination und der internen rtTA Sonde die korrekte Rekombination im 3' Bereich zu analysieren. Da zu diesem Zweck keine geeigneten Restriktionsschnittstellen in der bekannten SCL-Lokus-Sequenz (freundlicherweise von Dr. Bertold Göttgens, Department of Hematology, University of Cambridge zur Verfügung gestellt) vorhanden waren, wurde die Methode der Long Template PCR gewählt. Die beiden für die PCR notwendigen Oligonukleotide wurden dabei so gewählt, dass eines dieser Oligonukleotide im SCL-Lokus außerhalb des Targetingkonstruktes lag, während das andere Oligonukleotid innerhalb des Targetingkonstrukt in der Neomycinresistenzkassette lokalisiert war. Bei korrekter Rekombination sollte ein PCR-Amplifikat von 7892 bp zu detektieren sein. Wäre der Locus im 3' Bereich nicht korrekt rekombiniert, sollte kein oder ein differentielles PCR-Amplifikat zu detektieren sein. Die Analyse der PCR zeigte eindeutig das erwartete 7892 bp Amplifikat. Es konnten auch keine weiteren Nebenamplifikate detektiert werden. Zur genaueren Verifizierung wurde das PCR-Amplifikat außerdem mittels ausgewählter Restriktionsendonukleasen verdaut und das entstandene Fragmentmuster mit dem bei richtiger Rekombination erwarteten Bandenmuster verglichen. Diese zusätzlich ausgeführte Analyse bestätigte, dass das erhaltene PCR-Amplifikat spezifisch für den korrekt 3' rekombinierten rtTA/SCL-Lokus war. Somit konnte der *knock-in* des Targetingkonstrukts ExIV in den SCL-Lokus als verifiziert und korrekt angesehen werden. Weitere Analysen von Nachkommen der rtTA positiven Tiere auf das Vorhandensein der rtTA-Sequenz im *Southern Blot* Experiment zeigte, dass die ExIV-Linie stabil in der Zucht etabliert wurde.

Da für die Analyse der rtTA-*knock-in*-Linie nicht allein die reine genetische Verifizierung der homologen Rekombination ausreichend war, sollte die keimbahntransmittierende ExIV *knock-in* Linie auch auf transkriptioneller Ebene in Hinsicht auf SCL-exprimierende Gewebe hin untersucht werden (zur Übersicht über SCL Expression siehe Begley and Green 1999). Aus der bereits für den murinen SCL Locus durchgeführten Analyse war seine komplette

Nukleotidsequenz als auch die des Targetingkonstruktes bekannt. Aus diesem Grund konnte zur Analyse der zelltypspezifischen mRNA Expression des rtTA *knock-in* Transkripts die Methode der RT-PCR gewählt werden. Da SCL vor allem in hämatopoietischen Geweben exprimiert wird (siehe auch Begley and Green 1999), wurden zwei ausgewählte hämatopoietische Gewebe auf Expression des rtTA hin untersucht. Durch die Untersuchung der mRNA aus Milz und peripheren Blutzellen aus einer rtTA positiven Maus mittels RT-PCR resultierte in dem für den rtTA-*knock-in* zu erwartenden spezifischen Amplifikat von 1527 bp. Kontamination der extrahierten mRNA mit genomischer DNA sollte dagegen ein Amplifikat von 4969 bp aufweisen. Dieses genomische DNA spezifische Amplifikat konnte jedoch in keinem Ansatz detektiert werden, was auf eine DNA negative RNA Präparationstechnik hinwies. Neben dem erwarteten 1,5 kb Amplifikat wurden aber noch zusätzlich kleinere Nebenamplifikatspezies detektiert. Diese könnten auf ein differentielles Splicing hindeuten. In diesem Falle würden kryptische Splicestellen innerhalb des rtTA benutzt werden, und auf diese Weise zusätzliche kürzere mRNA-Spezies generiert werden (für internes Splicing siehe Übersicht in Abbildung 4.2)

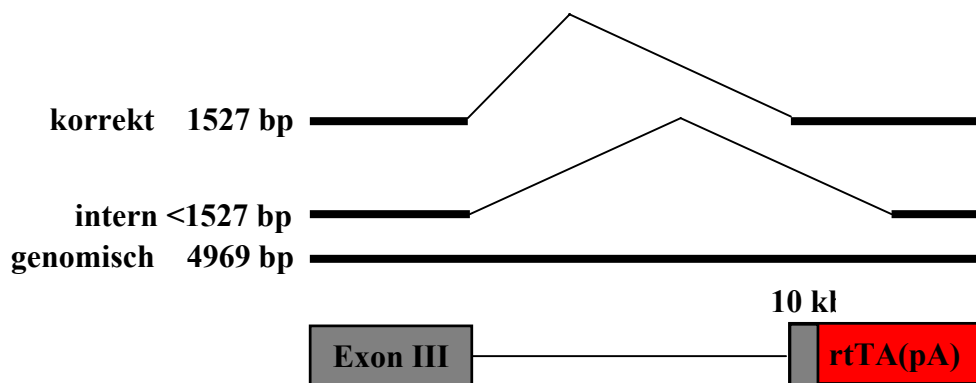


Abbildung 4.2: Mögliche Splicevarianten des rtTA-*knock-in*

RT-PCR Analyse der rtTA *knock-in* Transkripte resultierte in der korrekt gespligten 1527 bp Spezies, resultierte aber auch in Nebenamplifikaten kürzerer Länge. Das für Amplifikation genomischer DNA zu erwartende 4696 bp Fragment ist ebenfalls gezeigt.

E IV, partielles Exon IV.

Da durch die im Vorfeld durchgeführte transkriptionelle Analyse des SCL-Lokus mehrere Regulationselemente, welche die spatio-temporäre Expression des SCL-Gens determinieren, bereits bekannt waren (Begley et al. 1994, Lecointe et al. 1994, Bockamp et al. 1995, Bockamp et al. 1997, Bockamp et al. 1998), und zusätzlich verschiedene Enhancerelemente innerhalb des SCL-Lokus, die jeweils für eine spezifische Expression von SCL verantwortlich sind beschrieben waren (Sanchez et al. 1999, Sinclair et al. 1999, Sanchez et al. 2001), war es

in der generierten *rtTA-knock-in* Maus unserer Meinung nach essentiell, den eingebrachten Thymidinkinasepromoter (TK), welcher die Expression der für die Selektion der ES-Zellen wichtigen Neomycinresistenz reguliert, zu entfernen. Da die Neomycinresistenz selbst, nach erfolgreicher Rekombination des Targetingkonstrukts ExIV, nicht mehr in der Maus benötigt wurde, war es möglich diese komplett zu entfernen. Möglicherweise könnte der TK-Promoter bei einem Verbleiben im Locus vor allem mit dem für die Expression in frühen hämatopoietischen Progenitorzellen wichtigen 3' Enhancer (Sanchez et al. 2001) interferieren, und dadurch die Expression des *rtTA* in diesem Kompartiment stören oder sogar ganz unterdrücken. Da die TK-Neo-Kassette im Targetingkonstrukt von loxP Cre-Rekombinase Erkennungsstellen flankiert war (zur Funktionsweise der Cre-vermittelten Excision siehe z.B. Bockamp et al. 2002), konnte diese durch die gezielte Expression der Cre-Rekombinase excisiert werden (floxen). Zur Excision der Neo-Kassette wurde die bereits beschriebene Sycp-Cre-Mauslinie (Vidal et al. 1998) eingesetzt, welche eine Cre-Expression in primären Spermatozyten ermöglicht. Diese Mauslinie wurde freundlicherweise von Prof. Meinrad Busslinger, IMP Wien zur Verfügung gestellt. Nach persönlicher Mitteilung von Prof. Busslinger sollten Sycp-Cre positive weibliche Tiere mit männlichen Tieren der zu floxenden Linie verpaart werden. Doppelt positive männliche Tiere (Sycp-Cre transgen und ExIV *knock-in*) sollten dann in der Keimbahn, genauer in den primären Spermatozyten, die von loxP Sequenzen flankierte Neo-Kassette excisieren. Da diese Excision in der Keimbahn geschieht, sollten resultierende Nachkommen in allen Körperzellen diese Excision aufweisen. Dadurch konnte in einem Zeitraum von zwei Generationen die Neomycinkassette aus dem Genom der ExIV-Linie entfernt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kreuzungsversuche zeigten, dass die resultierende Mauslinie keine Neo-Kassette mehr trug (erfolgreiche Cre-vermittelte Excision). Die als Neo- (für Neo minus, Neo negativ) bezeichnete gefloxt Effektorlinie konnte nun zur weiteren Verpaarung und somit zur Generierung der angestrebten *SCL-knock-out* Maus eingesetzt werden.

4.3 Das Targetingkonstrukt ExV

Da innerhalb der ausführlichen Regulationsanalysen des SCL-Lokus mehrere DNaseI hypersensitive Stellen identifiziert wurden (Gottgens et al. 1997) und zudem eine dieser Stellen innerhalb des von den Exonen IV und V flankierten Introns beschrieben worden war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese DNaseI hypersensitive Stelle eine wichtige Rolle für die Expression des SCL-Genprodukts und damit auch für die durch *knock-in* unter

die SCL-regulatorische Kontrolle gebrachte rtTA cDNA spielt. Da im Targetingkonstrukt ExIV der rtTA in das Exon IV eingebracht wird, und somit durch die homologe Rekombination die Exone IV und V sowie das von ihnen umschlossene Intron entfernt wurde, wurde die oben beschriebene DNaseI hypersensitive Stelle ebenfalls deletiert. Um in einem zweiten Ansatz die rtTA cDNA unter Verbleib dieser DNase I hypersensitiven Stelle in den SCL-Lokus einbringen zu können, wurde ein alternatives Targetingkonstrukt ExV verwendet, welches den rtTA, unter Verbleib des kompletten Exon IV und des sich anschließenden Introns, in das Exon V platziert. Da in diesem Falle noch codierende SCL-Sequenzen innerhalb des Exon IV verbleiben, wurde dem rtTA eine IRES (*internal ribosome entry site*)-Sequenz vorgeschaltet. Diese IRES-Sequenz ermöglicht bicistronische Transkription und sollte somit trotz der verbleibenden SCL codierenden Sequenzen die korrekte Expression des rtTA ermöglichen. Zur Übersicht der gewählten Strategie siehe Abbildung 4.3.

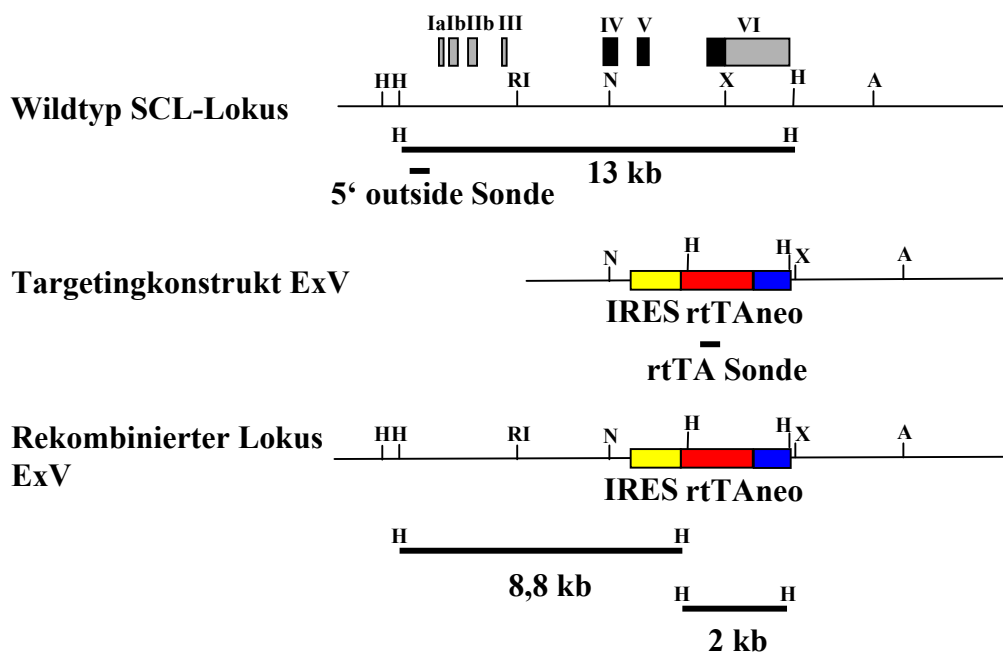


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Targetingkonstrukts ExV

Durch homologe Rekombination des Targetingkonstrukts ExV wird die rtTA codierende Sequenz unter die regulierende Kontrolle des SCL-Lokus gebracht. Die neu eingeführten HinDIII Restriktionsschnittstellen (H) innerhalb des Targetingkonstrukts ExIV können durch Hybridisierung mit einer 5' outside Sonde diskriminiert werden.

Graue Boxen, nicht codierende Exone; schwarze Boxen, codierende Exone; H, HinDIII; R, EcoRI; N, NdeI; X, XhoI; rtTA, reverser tet-abhängiger Transaktivator; neo, Neomycinresistenzkassette.

Wie in Abbildung 4.3 erkennbar, wurde im Targetingkonstrukt ExV kein zusätzliches Polyadenylierungssignal eingefügt da das endogene SCL Polyadenylierungssignal des Exon VI UTR (*untranslated region*) benützt werden sollte. Da somit die Sequenz im

Targetingkonstrukt zwischen den beiden wichtigen neu eingeführten HindIII Restriktionsschnittstellen wegen das Wegfalls der PolyA-Sequenz kürzer ist, wird bei einer Hybridisierung mit einer rtTA spezifischen Sonde ein 2 kb Fragment (im Gegensatz zum Targetingkonstrukt ExIV 4 kb) detektiert. Eine erste Elektroporation des Targetingkonstrukts ExV in W9.5 ES-Zellen und die analog wie für das Targetingkonstrukt ExIV durchgeführte Progagierung der Zellen, deren Selektion und klonale Vereinzelung der ES-Zellen ergab eine Anzahl von etwa 1000 ES-Zellklonen, die nach Elektroporation mit dem Targetingkonstrukt ExV untersucht werden konnten. Von diesen ES-Zellklonen zeigten vier Klone das erwartete 8,8 kb Fragment, welches im initialen *Southern Blot* Experiment detektiert werden konnte. Die Rekombinationsfrequenz entspricht damit in etwa der des Targetingkonstrukts ExIV. Dies ist nicht verwunderlich, da die Rekombinationsfrequenz der homologen Rekombination jeweils stark vom zu rekombinierenden Locus abhängt. Weitere Analysen nach Revitalisierung der entsprechenden Klone und Untersuchung der DNA im *Southern Blot* Experiment zeigten, dass von den im initialen Experiment vier positiven Klonen nur der ES-Zellklon ES4 des Targetingkonstrukts ExV sowohl die erwartete 2 kb Bande bei Hybridisierung mit einer rtTA Sonde, als auch die IRES-Sequenz beinhaltete. Alle anderen Klone zeigten entweder keine oder unkorrekte Banden bei der Hybridisierung mit den jeweiligen Sonden. Der nun dreifach (5', 3' und interne Sonde) verifizierte ES-Zellklon ES4 des Targetingkonstrukts ExV wurde nun in Blastozysten injiziert. Es konnten allerdings auch nach mehrmaliger Injektion keine Geburt von chimären Tiere beobachtet werden. Die Vermutung liegt nahe, dass der Klon ES4, wie schon für den Klon ES3 des Targetingkonstrukts ExIV beschrieben, eine Änderung oder Abberation des genetischen Materials durch die notwendige *ex vivo* Manipulation erfahren hat, welche den Beitrag der ES-Zellen zur Embryogenese verhinderten. Diese Veränderungen waren allerdings weder durch das Wachstum noch die Morphologie der ES-Zellen in der Zellkultur evident. Da im Rahmen der Umklonierung der Targetingkonstrukte auch das Targetingkonstrukt ExV geändert werden sollte, wurde kein weiterer Versuch unternommen, neue ES-Zellklone mit dem rekombinierten Targetingkonstrukt ExV/SCL-Lokus zu generieren.

4.4 Die transgenen SCL/EGFP-Responderlinien

Da außer der verwendeten und bereits beschriebenen rtTA-Effektor Mauslinie Neo- auch eine geeignete transgene SCL/EGFP-Responderlinie wichtig für die geplante Etablierung der konditional/reversiblen SCL-*knock-out* Mauslinie war, wurde diese durch Mikroinjektion des

transgenen Konstrukts in Oozyten generiert. Die Mikroinjektion des transgenen Responderkonstrukts (Abbildung 4.4) resultierte in der Geburt von 126 putativen Foundertieren.

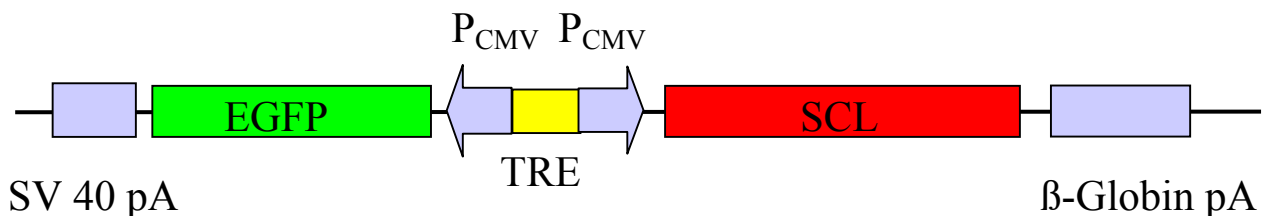


Abbildung 4.4: Transgenes Responderkonstrukt

Das Konstrukt zur Generierung der transgenen SCL-EGFP-Respondertiere enthält die SCL-cDNA, sowie die EGFP codierende Sequenz unter der transkriptionellen Kontrolle der tet regulierten CMV Minimalpromotoren. SV40 pA, Polyadenylierungssignal des *Simean Virus* 40; EGFP, *Enhanced Green Fluorescence Protein*; Pcmv, Minimalpromoter des humanen Zytomegalievirus, TRE, *Tet-responsive element*; SCL, SCL cDNA; β-Globin pA, Polyadenylierungssignal des Kaninchen β-Globin Gens.

Von diesen ursprünglichen 126 Tieren konnten durch PCR-Analysen mit EGFP-spezifischen Oligonukleotiden und solchen Oligonukleotiden, die für das rekombinante SCL spezifisch waren, 18 Tieren identifiziert werden, welche beide Sequenzen in ihrem Genom trugen. Diese 18 Foundertiere (TG-1 bis TG-18 benannt) wurden mit Black6/C57J Wildtypieren verpaart und der resultierende Nachwuchs auf die gewünschten transgenen Sequenzen hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass von den 18 Tieren nur zehn das Transgen stabil in die erste Filialgeneration segregiert hatten. Von einem der weiblichen Foundertiere konnten keine Nachkommen erhalten werden, sieben weitere Tiere ergaben nach Untersuchung nur Wildtypnachkommen. Möglicherweise hatte das Transgen in den infertilen Weibchen in einen für die Ausbildung der Keimzellen oder spätere Schwangerschaft wichtigen Locus integriert und diesen dadurch zerstört oder auf eine sonstige Art und Weise so gestört, dass eine spätere Schwangerschaft unmöglich war. Die Tatsache, dass sieben Tiere, keine Segregation des Transgens in die Nachkommen zeigten, lässt auf eventuelle falsch positive Ergebnisse im initialen PCR-Versuch, oder eine nur „transiente“ Transgenität der Foundertiere, welche nicht in der Keimbahn segregiert werden konnte, schließen. Die erfolgreich verifizierten zehn Ausgangslinien konnten stabil im Tierhaus etabliert werden. Sie zeigten auch nach mehreren Generationen keinen Verlust des Transgens. Somit konnten zehn individuelle transgen Linien für das SCL/EGFP-Responderkonstrukt etabliert werden. Nach persönlicher Mitteilung von Mitarbeitern des Laboratoriums von Prof. Bujard (ZMBH, Heidelberg) sollte diese Zahl von zehn Linien genügend sein, um wenigstens eine komplett reversibel regulierbare

Responderlinie zu identifizieren. Eines der Probleme bei der Generierung von transgenen Mäusen besteht nicht nur in der erfolgreichen Etablierung von Foundertieren und daraus resultierenden transgenen Linien, sondern besonders in der durch die grundlegenden Technik der transgenen Mäuse resultierenden zufälligen Integration des transgenen Konstrukts (Übersichtartikel Wilson et al. 1990). Durch die Variegation der Integration werden die eingebrachten Sequenzen annähernd statistisch im Genom verteilt (Rijkers et al. 1994). Kommt nun eine solche Sequenz z.B. unter die reprimierende Kontrolle eines Silencers, so wird sich das eingebrachte Konstrukt nicht in der Weise kontrollieren lassen, wie dies gerne gewünscht wäre. Da in dem vorliegenden Fall die stringente Kontrolle der SCL-Expression, also die Induktion des Transgens durch den rtTA, sowie deren exakte Schaltbarkeit im Vordergrund des Interesses stand, war es wichtig, alle transgenen Mauslinien auf diese Schaltbarkeit zu charakterisieren. Im Idealfall sollte sich die transgene Linien folgendermaßen verhalten: Sie sollte keine detektierbare basale Expression von SCL ausweisen, da diese in einem späteren SCL-Nullhintergrund störend wirken würde und z.B. den SCL-Nullphänotyp permanent retten würde. Weiterhin sollte diese Linie durch den rtTA und die Gabe von DOX stringent regulierbar sein, so dass die Expression nur nach vorheriger Gabe von DOX und exprimiertem rtTA detektierbar wäre. Eine konstitutiv exprimierende transgene Linie wäre also genauso wie eine nicht induzierbare Linie nicht die geeignete Wahl zur Verpaarung mit der generierten Effektorlinie Neo-. Um dies in einem relativ einfachen und schnellen Test zu überprüfen, wurden von den zehn etablierten transgenen Linien jeweils MEFs (murine embryonale Fibroblasten) in Kultur genommen, diese auf die Integration des Responderkonstrukts überprüft und dann durch transiente Expression eines Transaktivators und Zugabe von DOX zum Medium induziert. Gleichzeitig wurden die selben MEFs auch ohne DOX (aber mit Transaktivator) als Kontrolle transformiert. Nach Isolation der RNA aus den jeweiligen MEF-Kulturen wurde diese auf Expression der rekombinanten SCL-Sequenz untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur eine einzige (TG-5) der untersuchten zehn Linien in diesem Assay stringent regulierbar war. Alle anderen untersuchten Proben der korrespondierenden transgenen Linien waren entweder nicht induzierbar (*silent*), oder zeigten eine konstitutive Expression, die auch bei Abwesenheit von DOX im Medium nachzuweisen war (*leaky*). Die Methode der Induktion von tet-responsiven Konstrukten in MEFs stellt nach persönlicher Mitteilung aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bujard ein geeignetes Mittel zur Untersuchungen der Induzierbarkeit der ganzen Linie dar, da sich die im MEF-Assay gefundenen Daten fast immer auf die Situation in der transgenen Respondermauslinie übertragen lassen. Nach dieser MEF-basierten Untersuchung stellte sich nur eine der zehn

untersuchten Linien als geeignet zur Verpaarung mit der Effektorlinien heraus. Es handelte sich dabei um die als TG-5 bezeichnete transgene SCL-EGFP-Responderlinie. Diese transgene Mausvariante wurde amplifiziert und mit der bereits generierten und charakterisierten rtTA-SCL-*knock-in* Linie Neo- verpaart.

4.5 Verpaarung der etablierten Mauslinien

Um aus den zwei generierten Mauslinien Neo- (Effektor) und TG-5 (Responder) die konditional SCL-*knock-out* Linie generieren zu können, mussten diese Mauslinien zuerst zu einer doppelt positiven Neo-/TG-5-Linie verkreuzt werden. Dazu wurden jeweils positive Männchen der beiden Linien mit positiven Weibchen der entsprechend anderen Linie verpaart. Die daraus resultierenden doppelt positiven Nachkommen (rtTA-*knock-in* und transgene Responderkonstruktlinie) wurden dann untereinander zurück gekreuzt und sollten auf diese Weise in Tieren resultieren, welche als doppelt positive rtTA-*knock-in*/SCL-*knock-out*/SCL-EGFP-Responder-Linie bezeichnet werden kann (konditionaler SCL *knock-out*). Da bei dieser Rückkreuzung der endogenen SCL-Wildtyplokus, der in der Neo- noch heterozygot vorhanden war und dadurch für die zum Überleben der Tiere essentielle SCL-Expression sorgte, durch den rtTA-*knock-in* ersetzt werden würde, war es unbedingt notwendig die verpaarten Tiere und deren Nachkommen durch Gabe von DOX im Trinkwasser die Induktion des rekombinanten SCL im Responderkonstrukt mittels des rtTA zu ermöglichen (eine schematische Übersicht der Verpaarungen und der DOX-Gabe ist in Abbildung 4.4 dargestellt).

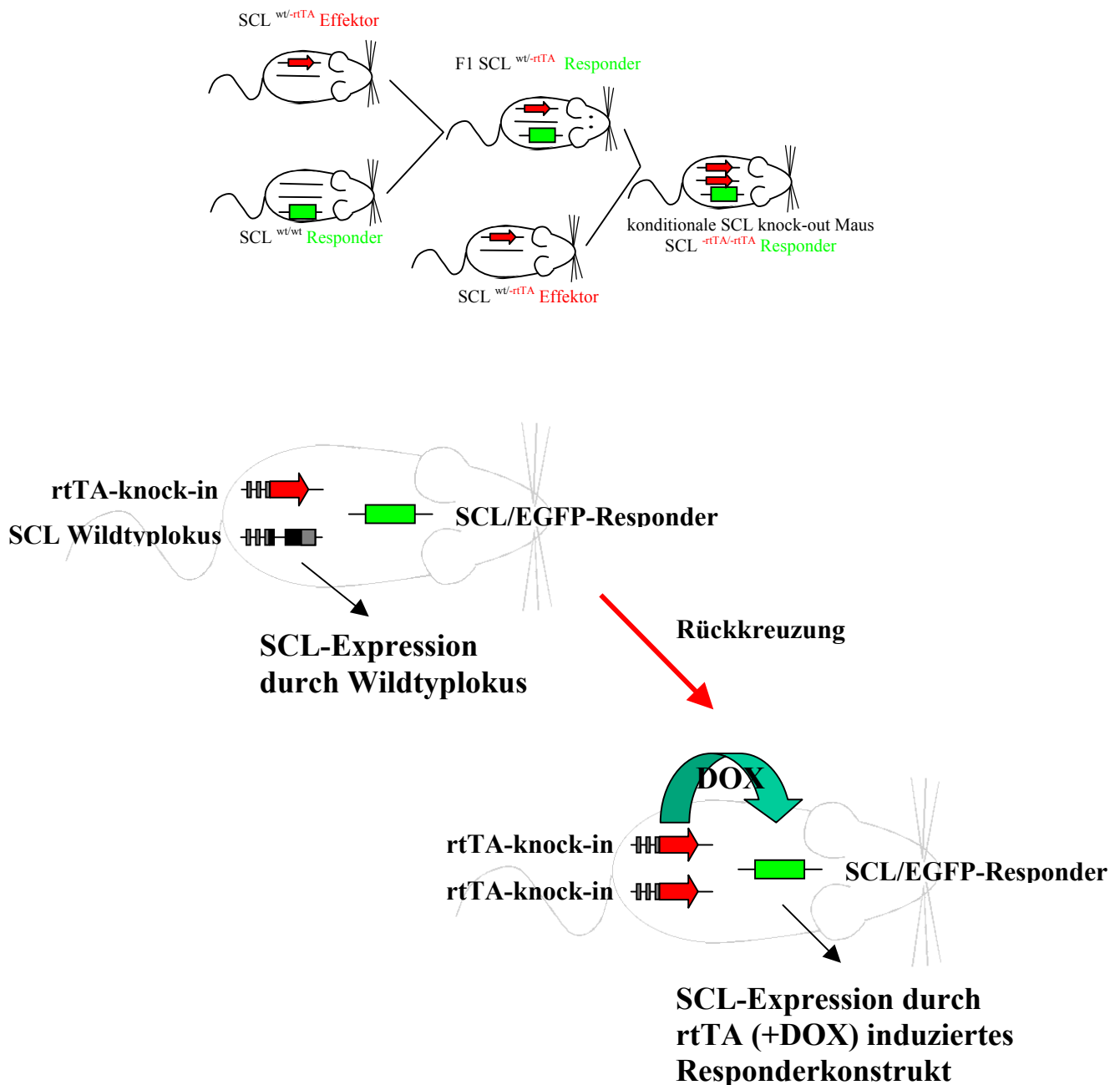


Abbildung 4.5: Notwendigkeit der DOX Gabe bei Rückkreuzung der rtTA/SCL-EGFP-Mäuse

Im oberen Teil abgebildet die notwendigen Kreuzungen zur Generierung der konditional/reversible SCL-*knock-out* Maus. Im unteren Teil die schematische Darstellung der letzten Rückkreuzung, die doppelt positiven rtTA-SCL/EGFP-Mäuse exprimieren SCL vom endogenen Wildtyplokus. Bei der Rückkreuzung und dadurch bedingtem Verlust des SCL-Wildtyplokus muss zum Überleben der Tiere SCL via Induktion durch den rtTA (bei DOX Anwesenheit) vom Responderkonstrukt exprimiert werden.

Rote Pfeile, rtTA *knock-in*, grüne Boxen, SCL/EGFP-Responderkonstrukt.

Die so verpaarten Tiere sollten im Idealfall zwei rtTA-SCL-*knock-in* Loci und das transgene Responderkonstrukt tragen. Nur solche Tiere, die neben dem Verlust des SCL-Wildtyplokus (SCL^{-/-}) auch das transgene Responderkonstrukt beinhalten, haben bei Administration von DOX die Möglichkeit, den SCL^{-/-}-Genotyp durch die mit Hilfe von rtTA induzierte Expression der rekombinanten SCL cDNA den letalen SCL Nullphänotyp zu kompensieren.

Ein Verlust der für den SCL-Wildtyp-spezifischen im *Southern Blot* Experiment bei Hybridisierung mit der SCL-spezifischen 5' outside Sonde sollte auf eine erfolgreiche Etablierung der konditionalen SCL *knock-out* Maus hindeuten. Diese Tiere müssen dann ebenfalls das transgene Responderkonstrukt tragen. Nach Analyse von mehr als 50 Nachkommen der doppelt positiven Tiere, die während der Verpaarung, der Laktation genauso wie die geborenen Nachkommen mit DOX behandelt wurden, zeigte in keinem Fall den Wegfall der für den SCL-Wildtyp-spezifischen 13 kb Bande im *Southern Blot* Experiment. Statistisch sollten etwa eines von vier geborenen Tieren beide genetischen Veränderungen tragen, da beide Elternteile, sowohl das transgene Responderkonstrukt, als auch den rtTA *knock-in* jeweils heterozygot tragen. Da von den über 50 untersuchten Nachkommen dieser Verpaarung keines der untersuchten Tiere einen Rescue zeigte, muss davon ausgegangen werden, dass das System in sich ein Problem beinhaltet. Dies könnte in der rtTA-Effektorlinie liegen, die möglicherweise nicht in der Lage ist, einen funktionsfähigen reversen Transaktivator in den für SCL-Expression spezifischen Zielzellen zu exprimieren. Möglicherweise ist die Deletion der zwischen Exon IV und Exon V gefundenen DNaseI hypersensitiven Stelle, welche in der eingesetzten *knock-in* Maus fehlt, ein Grund dafür, dass die Expression des rtTA nicht in hämatopoietischen Progenitorzellen bzw. hämatopoietischen Stammzellen (HSC) korrekt etabliert werden kann. Dies würde nach der Rückkreuzung der doppelt positiven Mäuse dazu führen, dass der SCL^{-/-} Genotyp nicht durch die DOX gerichtete Induktion gerettet bzw. kompensiert werden kann. Genauere Analysen der Neo- Linie müssten angeschlossen werden, um die Expression des rtTA in verschiedenen Zelltypen genauer zu charakterisieren. Dazu wurden bereits Verpaarungen der Neo- Linie mit einer tet-induzierbaren LacZ/EGFP-Reporterlinie (Krestel et al. 2001) bei Ende der vorliegenden Arbeit angesetzt, um die dann resultierenden doppelt positiven Tiere mittels *Flow Cytometry* (FACS-Analyse) und der Expression des EGFP-Reporters näher zu charakterisieren. Möglicherweise ist auch die Verfügbarkeit von Doxycyclin in den angesetzten Verpaarung unzureichend, um in den mit dem konventionellen rtTA generierten Mäusen eine ausreichende Induktion der Expression des rekombinanten SCL zu erhalten. Nach persönlicher Mitteilung aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bujard sollte das DOX in einer Konzentration von 10 mg/ml im Trinkwasser der Tiere jeweils zweimal pro Woche frisch den Mäusen gegeben werden. Möglicherweise ist die DOX-Konzentration jedoch nach kurzer Zeit durch Ausfallen des Antibiotikums im mit Sucrose gesüßten Wasser nicht mehr hoch genug, um auch in solchen, für das DOX schlechter zu erreichenden Geweben wie z.B. dem Gehirn der Tiere, in dem in bestimmten Arealen eine SCL-Expression nachgewiesen worden war, (zu

einer Übersicht siehe Begley and Green 1999) für eine ausreichende Induktion der rtTA-DNA-Bindung und somit für eine Expression von SCL zu sorgen. Da bekannt war, dass vor allem die Blut/Hirn-Schranke für DOX schwer zu überschreiten ist (persönliche Mitteilung von Prof. Bujard), könnte dies zu einer Ablation der SCL-Expression in diesen Geweben und damit eventuell zum möglichen Abort der heterozygoten rtTA-*knock-in*/SCL/EGFP-Responder-Embryonen führen. Eine dritte Möglichkeit, weshalb kein erfolgreicher *Rescue* in den verpaarten Mäusen beobachtet werden konnte wäre, dass die Responderlinie TG-5 zwar im MEF-Assay die gewünschte Regulierbarkeit zeigte, in der Maus, oder speziell in den erforderlichen Geweben (die SCL-positiven Zellen) keine ausreichende Induktion von SCL erlaubt. Um diese Möglichkeit zu umgehen, sollen in zukünftigen Versuchen im MEF-Assay konstitutiv exprimierende (*leaky*) transgene SCL-EGFP-Responderlinien mit der Neo- Linie verpaart werden, da diese eventuell eine bessere Induzierbarkeit und höhere Expressionsraten des rekombinanten SCL Genprodukts zeigen könnten. Da diese *leaky* exprimierenden Mäuse keinen auffälligen Phänotyp zeigten, und die Expression des rekombinanten SCL mit der äußerst sensitiven RT-PCR-Methode nachgewiesen wurde, könnte die basale Expression gering genug sein, um einem faktischem Nulllevel zu entsprechen, welches keine physiologischen Auswirkungen hätte. Dieses Level könnte durch die rtTA-Induktion in tripple positiven Mäusen dann genügend angehoben werden, um den SCL^{-/-} Genotyp zu kompensieren, bzw. zu dem gewünschten *Rescue* zu führen. Das erhaltene Ergebnis deutet also auf ein zu optimierendes Konzept hin, welches durch die Klonierung der im folgenden diskutierten neuen Targetingkonstrukte und die dann anschließende Generierung der korrespondierenden Mauslinien (Effektorlinien) und der Verpaarung der bestehenden Linien mit Reporterlinien (wie z.B. der tet-induzierbaren LacZ/EGFP-Reporterlinie Krestel et al. 2001) oder einer tTA exprimierenden Linie zur Überprüfung der SCL-EGFP-Respondermaus (z.B. CMV-tTA-Linie (Kistner et al. 1996), zu einer Übersicht über verfügbare rtTA/tTA-Mauslinien und entsprechende Responder-/Reporterermäuse zum Tet-System siehe auch <http://www.zmg.uni-mainz.de/tetmouse>) zu besserer Charakterisierung der bestehenden Linien weiterentwickelt werden soll. Durch die Verpaarung der bestehenden Linien (diese waren zum Zeitpunkt der Beendigung der vorliegenden Arbeit bereits zum Teil in Gange) können bessere Aussagen über die Optimierung des Systems getroffen werden. Ein Punkt, nämlich die relativ langsame und schlechte Induktion des rtTA durch DOX, kann durch Generierung der neuen tTA2S-*knock-in*-Linien umgangen werden. Die Klonierung dieser wichtigen Targetingkonstrukte wird im Anschluss diskutiert.

4.6 Klonierung der verbesserten Targetingkonstrukte ExIVtTA2S und ExVtTA2S

Da durch die Verpaarung und Genotypisierung der bereit diskutierten Mauslinien kein *Rescue* in der zu erwartenden tripple positiven Maus zu beobachten war, sollte mit Hilfe des geänderten tet-abhängigen Transaktivators tTA2S (Urlinger et al. 2000), der keine DOX-Applikation zur Induktion des TRE-kontrollierten Responderkonstruktes benötigt, die zwei bereits bestehenden Targetingkonstrukte ExIV und ExV umklont werden. Die bereits im Ergebnisteil ausführlich beschriebene Klonierungsstrategie, einschließlich einer gerichteten Mutagenese und PCR-Amplifikation, zeigte bei der späteren Analyse der gewonnenen Konstrukte, dass beide neuen Targetingkonstrukte erfolgreich hergestellt werden konnten. Die Elektroporation des neuen Targetingkonstruktes ExIVtTA2S zeigte zudem, dass erfolgreich vier 5' homolog rekombinierte ES-Zellklone für dieses Targetingkonstrukt identifiziert werden konnten. Zum Zeitpunkt der Beendigung der vorliegenden Arbeit lagen für das ebenfalls hergestellte Targetingkonstrukt ExVtTA2S keine elektroporierten, und somit noch keine rekombinierten ES-Zellen zu Verfügung. Es ist jedoch geplant, die Elektroporation dieses Targetingkonstruktes zu Beginn des Jahres 2003 durchzuführen und dann eine Effektorlinie ExVtTA2S zu etablieren. Die neuen geplanten Linien zeigen im Gegensatz zur eingeführten Effektorlinie Neo- mehrere Vorteile: Erstens würde durch die Verwendung des tTA2S die Applikation von DOX zur Aufrechterhaltung der erwünschten SCL-Expression wegfallen, somit würde auch die eventuelle Unterversorgung verschiedener Gewebe mit DOX, wie dies im Falle der diskutierten Effektorlinie Neo- der Fall sein könnte, keine Auswirkung auf den geplanten *Rescue* haben. Außerdem zeigt der tTA2S eine bessere Kinetik bei DOX-induzierter Abschaltung des Zielgens und somit auch eine deutlich bessere Kontrollierbarkeit der geplanten konditionalen *SCL knock-out* Linien. Als dritten Vorteil sollte der tTA2S durch die Verwendung einer gekürzten VP16 aktivierenden Domäne (3F, Urlinger et al. 2000) eine herabgesetzte Toxizität in den exprimierenden Zellen zeigen. Ein zusätzlicher immenser Vorteil des tTA2S im Gegensatz zu dem in den Targetingkonstrukten verwendeten klassischen rtTA ist aber die komplette Eliminierung aller kryptischer Spliceakzeptorsequenzen im neuen Transaktivator. Wie in der ExIV-Linie observiert, zeigt der rtTA-*knock-in* in den SCL-Lokus bei genauer Analyse der rtTA-Transkription mit RT-PCR nicht nur die erwartete, sondern zusätzliche Amplifikatspezies, welche eindeutig unterschiedliches internes Splicing des rtTA bewiesen. Dieses Splicing könnte so der Grund für ungenügende Induktion der SCL-Expression in der Respondermaus nach DOX-Gabe sein, da eventuell die korrekte Splicevariante nur zu einem minderen Anteil hergestellt wird.

Falsche Splicevarianten sollten nicht in der Lage sein, DOX als Ligand zu binden, die TRE-Sequenz spezifisch zu erkennen und damit die Induktion des Responders zu leisten, oder könnten, was noch fataler wäre zu einer kompetitiven Inhibition des rtTA führen. Dies würde in jedem Falle die Funktion der Effektormaus stören, oder sogar vollständig unterbinden. Zu diesem Zweck sollen die neuen Effektorstrukturen zur Generierung der alternativen Linien eingesetzt werden. Da die zur Etablierung der geplanten tTA2S Linien benötigten Konstrukte bereits fertig vorliegen, und in nächster Zukunft die Elektroporation in ES-Zellen geplant ist, ist die Generierung der besprochenen neuen und wesentlich verbesserten Effektorlinien möglich. Diese würden im Zusammenspiel mit einer regulierbaren (TG-5) oder einer *leaky* (z.B. TG-1) SCL/EGFP-Responderlinie zur Etablierung der konditional/reversiblen SCL-*knock-out* Maus führen können.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Generierung einer mittels Tet-System kontrollierbaren konditionalen/reversiblen *knock-out* Mauslinie mit den bereits generierten genetisch veränderten Mauslinien noch nicht möglich ist und die einzelnen Komponenten einer gezielten Optimierung bedürfen. Es wird in Zukunft äußerst interessant sein, zu evaluieren, ob durch die eingeführten Veränderungen der Effektorstrukturen, sowie die Nutzung der bereits generierten verschiedenen Responderlinien (*leaky* und stringent regulierbare SCL/EGFP-Responderlinien) eine exogen regulierbare und vollkommen reversible SCL *knock-out* Maus letztendlich generiert werden kann.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein innovatives System zur Herstellung einer konditional/reversiblen SCL *knock-out* Maus zu etablieren. Dies war deshalb sinnvoll, da publizierte Arbeiten zeigten, dass konventionelle Ablation der SCL Funktion in einem embryonal letalen Phänotyp resultierte. Es wurde deshalb ein neuer *knock-in/knock-out* Ansatz mit Hilfe des Tet-Systems gewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich die für die Herstellung der konditionalen SCL *knock-out* Maus essentiellen Effektor- und Respondermauslinien zu generieren und genauer zu charakterisieren. Durch *knock-in* der rtTA cDNA in den SCL Locus und folgende genaue genetische Charakterisierung dieser *knock-in* Effektorlinie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine erste essentielle Mauslinie zur Herstellung des konditionalen SCL *knock-outs* etabliert. Diese wurde zudem durch Transkriptionsanalyse in zwei hämatopoietischen Geweben auf adäquate rtTA Expression bestätigt. In beiden Geweben konnte mittels RT-PCR das korrekte Amplifikat, sowie weitere kleinere Amplifikatspezies detektiert werden. Um regulatorische Interferenzen mit dem SCL Locus zu vermeiden, wurde darüber hinaus die für die Selektion in ES-Zellen notwendige TK-Neomycinresistenzkassette mit Hilfe einer Cre exprimierenden Mauslinie erfolgreich aus der Keimbahn der Effektorlinie entfernt.

Die zur Generierung der SCL *knock-out* Maus erforderlichen transgenen Responderlinien konnten ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt und erfolgreich gezüchtet werden. In einem in embryonalen Fibroblasten etablierten Funktionsassay wurden alle generierten Linien auf ihre Tet-abhängige Regulierbarkeit in Hinsicht auf rekombinante SCL-Expression untersucht. Dabei konnte eine Respondermauslinie identifiziert werden, die auf rekombinanter SCL Transkriptebene vollkommen stringent regulierbar war. In allen anderen Linien konnte rekombinantes SCL entweder nicht induziert werden oder wurde konstitutiv exprimiert.

Sowohl die Effektor- als auch die Responderlinie konnten erfolgreich etabliert und durch adäquate Kreuzung heterozygote F1-Effektor/Responderlinien generiert werden. Die Rückkreuzung dieser Linien bei gleichzeitiger Gabe von DOX sollte in der konditionalen/reversiblen SCL *knock-out* Maus resultieren. Bei Ende dieser Arbeit konnte allerdings in keinem Falle ein *Rescue* des letalen SCL Nullhintergrunds durch die rtTA vermittelte rekombinante SCL Expression beobachtet werden.

Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit zu erwarten, dass die Verwendung der während dieser Arbeit neu generierten und verbesserten Effektorstrukture zusammen mit den bereits generierten konstitutiven oder der stringent regulierbaren Responderlinie zur erfolgreichen Etablierung eines exogen regulierbaren konditional/reversiblen SCL *knock-out* führen.

6 Literaturverzeichnis

- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-7.
- Baron, U. and H. Bujard (2000). "Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances." Methods Enzymol **327**: 401-21.
- Baron, U., S. Freundlieb, M. Gossen and H. Bujard (1995). "Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter." Nucleic Acids Res **23**(17): 3605-6.
- Baron, U., M. Gossen and H. Bujard (1997). "Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential." Nucleic Acids Res **25**(14): 2723-9.
- Bash, R. O., S. Hall, C. F. Timmons, W. M. Crist, M. Amylon, R. G. Smith and R. Baer (1995). "Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study." Blood **86**(2): 666-76.
- Begley, C. G., P. D. Aplan, M. P. Davey, K. Nakahara, K. Tchorz, J. Kurtzberg, M. S. Hershfeld, B. F. Haynes, D. I. Cohen, T. A. Waldmann and I. R. Kirsch (1989). "Chromosomal translocation in a human leukemic stem cell line disrupts the T-cell antigen receptor δ -chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript." Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2031-2035.
- Begley, C. G., P. D. Aplan, B. Haynes, T. A. Waldmann and I. R. Kirsch (1989). "A new gene, SCL, is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif." Proc Natl Acad Sci USA **86**: 10128-10132.
- Begley, C. G. and A. R. Green (1999). "The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator." Blood **93**(9): 2760-70.
- Begley, C. G., L. Robb, S. Rockman, J. Visvader, E. O. Bockamp, Y. S. Chan and A. R. Green (1994). "Structure of the gene encoding the murine SCL protein." Gene **138**(1-2): 93-9.
- Begley, C. G., L. Robb, S. Rockman, J. Visvader, E.-O. Bockamp, Y. S. Chan and A. R. Green (1994). "Structure of the gene encoding the murine SCL protein." Gene **138**: 93-99.
- Begley, C. G., J. Visvader, A. R. Green, P. D. Aplan, D. Metcalf, I. R. Kirsch and N. M. Gough (1991). "Molecular cloning and chromosomal localisation of the murine homolog of the human "helix-loop-helix" gene SCL." Proc Natl Acad Sci USA **88**: 869-873.
- Berger, S. L., B. Pina, N. Silverman, G. A. Marcus, J. Agapite, J. L. Regier, S. J. Triezenberg and L. Guarente (1992). "Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains." Cell **70**(2): 251-65.
- Bockamp, E., M. Maringer, C. Spangenberg, S. Fraser, L. Eshkind, F. Oesch and B. Zabel (2002). "Of mice and models: Improved animal models for biomedical research." Physiological Genomics, in press.

- Bockamp, E. O., J. L. Fordham, B. Gottgens, A. M. Murrell, M. J. Sanchez and A. R. Green (1998). "Transcriptional regulation of the stem cell leukemia gene by PU.1 and Elf-1." J Biol Chem **273**(44): 29032-42.
- Bockamp, E. O., F. McLaughlin, B. Gottgens, A. M. Murrell, A. G. Elefanty and A. R. Green (1997). "Distinct mechanisms direct SCL/tal-1 expression in erythroid cells and CD34 positive primitive myeloid cells." J Biol Chem **272**(13): 8781-90.
- Bockamp, E. O., F. McLaughlin, A. M. Murrell, B. Gottgens, L. Robb, C. G. Begley and A. R. Green (1995). "Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter." Blood **86**(4): 1502-14.
- Bockamp, E.-O., F. McLaughlin, A. M. Murrell, B. Göttgens, L. Robb, C. G. Begley and A. R. Green (1995). "Lineage-restricted regulation of the murine SCL/TAL-1 promoter." Blood **86**: 1502-1514.
- Borrelli, E., R. Heyman, M. Hsi and R. M. Evans (1988). "Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(20): 7572-6.
- Chen, Y. T. and A. Bradley (2000). "A new positive/negative selectable marker, puDeltatk, for use in embryonic stem cells." Genesis **28**(1): 31-5.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-Step Method of RNA Isolation by Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction." Analyt Biochem **162**: 156-159.
- Cross, M. A., C. M. Heyworth, A. M. Murrell, E.-O. Bockamp, U. T. Cobley, T. M. Dexter and A. R. Green (1994). "Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line." Oncogene **9**: 3013-3016.
- Cvetkovic, B., B. Yang, R. A. Williamson and C. D. Sigmund (2000). "Appropriate tissue- and cell-specific expression of a single copy human angiotensinogen transgene specifically targeted upstream of the HPRT locus by homologous recombination." J Biol Chem **275**(2): 1073-8.
- Doetschman, T., R. G. Gregg, N. Maeda, M. L. Hooper, D. W. Melton, S. Thompson and O. Smithies (1987). "Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells." Nature **330**(6148): 576-8.
- Drake, C. J. and P. A. Fleming (2000). "Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo." Blood **95**(5): 1671-9.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-6.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Analyt Biochem **132**: 6-13.
- Festenstein, R. and D. Kioussis (2000). "Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers." Curr Opin Genet Dev **10**(2): 199-203.

- Finger, L. R., J. Kagan, G. Christopher, J. Kurtzberg, M. S. Hershfield, P. C. Nowell and C. Croce (1989). "Involvement of the TCL5 gene on chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma." Proc Natl Acad Sci USA **86**: 5039-5043.
- Fisher, M. P. and C. W. Dingman (1971). "Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agarose-acrylamid composite gels." Biochemistry **10**: 1895-1899.
- Freundlieb, S., C. Schirra-Muller and H. Bujard (1999). "A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells." J Gene Med **1**(1): 4-12.
- Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa and F. H. Ruddle (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7380-4.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Gottgens, B., F. McLaughlin, E. O. Bockamp, J. L. Fordham, C. G. Begley, K. Kosmopoulos, A. G. Elefanty and A. R. Green (1997). "Transcription of the SCL gene in erythroid and CD34 positive primitive myeloid cells is controlled by a complex network of lineage-restricted chromatin-dependent and chromatin-independent regulatory elements." Oncogene **15**(20): 2419-28.
- Green, A. R., J. Visvader, T. Lints, R. Harvey and C. G. Begley (1992). "SCL is co-expressed with GATA-1 in haemopoietic cells but is also expressed in developing brain." Oncogene **7**: 653-660.
- Gu, H., Y. R. Zou and K. Rajewsky (1993). "Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting." Cell **73**(6): 1155-64.
- Hamilton, D. L. and K. Abremski (1984). "Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre- mediated synapsis of two lox sites." J Mol Biol **178**(2): 481-6.
- Hasan, M. T., K. Schonig, S. Berger, W. Graewe and H. Bujard (2001). "Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice." Genesis **29**(3): 116-22.
- Hoess, R. H., M. Ziese and N. Sternberg (1982). "P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(11): 3398-402.
- Hogan, B., R. Beddington, F. Constantini and E. Lacy (1994). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kallianpur, A. R., J. E. Jordan and S. J. Brandt (1994). "The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis." Blood **83**(5): 1200-1208.
- Kilby, N. J., M. R. Snaith and J. A. Murray (1993). "Site-specific recombinases: tools for genome engineering." Trends Genet **9**(12): 413-21.

- Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmer, H. Lubbert and H. Bujard (1996). "Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10933-8.
- Krestel, H. E., M. Mayford, P. H. Seeburg and R. Sprengel (2001). "A GFP-equipped bidirectional expression module well suited for monitoring tetracycline-regulated gene expression in mouse." Nucleic Acids Res **29**(7): E39.
- Kurtzberg, J., S. H. Bigner and M. S. Hershfield (1985). "Establishment of the DU.528 human lymphohemopoietic stem cell line." J Exp Med **162**: 1561.
- Lakso, M., B. Sauer, B. Mosinger, Jr., E. J. Lee, R. W. Manning, S. H. Yu, K. L. Mulder and H. Westphal (1992). "Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6232-6.
- Lecointe, N., O. Bernard, K. Naert, V. Joulin, C. J. Larsen, P. H. Romeo and D. Mathieu-Mahul (1994). "GATA- and SP1-binding sites are required for the full activity of the tissue-specific promoter of the tal-1 gene." Oncogene **9**: 2623-2632.
- Lee, L. G., C. R. Connell, S. L. Woo, R. D. Cheng, B. F. McArdle, C. W. Fuller, N. D. Halloran and R. K. Wilson (1992). "DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7-polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments." NAR **20**: 2471-2483.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-8.
- Mouthon, M.-A., O. Bernard, M.-T. Mitjavila, P.-H. Romeo, W. Vainchenker and D. Mathieu-Mahul (1993). "Expression of Tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis." Blood **81**: 647-655.
- Orban, P. C., D. Chui and J. D. Marth (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6861-5.
- Palmiter, R. D. and R. L. Brinster (1985). "Transgenic mice." Cell **41**(2): 343-5.
- Rijkers, T., A. Peetz and U. Ruther (1994). "Insertional mutagenesis in transgenic mice." Transgenic Res **3**(4): 203-15.
- Robb, L., I. Lyons, R. Li, L. Hartley, F. Kontgen, R. P. Harvey, D. Metcalf and C. G. Begley (1995). "Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene." Proc Natl Acad Sci USA **92**: 7075-7079.
- Robb, L., I. Lyons, R. Li, L. Hartley, F. Köntgen, R. P. Harvey, D. Metcalf and C. G. Begley (1995). "Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene." PNAS **92**: 7075-7079.

- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**: 487-491.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanchez, M., B. Gottgens, A. M. Sinclair, M. Stanley, C. G. Begley, S. Hunter and A. R. Green (1999). "An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors." Development **126**(17): 3891-904.
- Sanchez, M. J., E. O. Bockamp, J. Miller, L. Gambardella and A. R. Green (2001). "Selective rescue of early haematopoietic progenitors in Scl(-/-) mice by expressing Scl under the control of a stem cell enhancer." Development **128**(23): 4815-27.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." PNAS **74**: 5463-5467.
- Schwenk, F., U. Baron and K. Rajewski (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells." NAR **23**(24): 5080-5081.
- Seuntjens, E., H. Vankelecom, A. Quaegebeur, V. Vande Vijver and C. Denef (1999). "Targeted ablation of gonadotrophs in transgenic mice affects embryonic development of lactotrophs." Mol Cell Endocrinol **150**(1-2): 129-39.
- Shin, M. K., J. M. LeVorse, R. S. Ingram and S. M. Tilghman (1999). "The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development." Nature **402**(6761): 496-501.
- Shivdasani, R. A., E. L. Mayer and S. H. Orkin (1995). "Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukemia oncoprotein tal-1/SCL." Nature **373**: 432-434.
- Silver, L. and J. Palis (1997). "Initiation of murine embryonic erythropoiesis: A spatial analysis." Blood **89**: 1154-1164.
- Sinclair, A. M., A. J. Bench, A. J. Bloor, J. Li, B. Gottgens, M. L. Stanley, J. Miller, S. Piltz, S. Hunter, E. P. Nacheva, M. J. Sanchez and A. R. Green (2002). "Rescue of the lethal scl(-/-) phenotype by the human SCL locus." Blood **99**(11): 3931-8.
- Sinclair, A. M., B. Gottgens, L. M. Barton, M. L. Stanley, L. Pardanaud, M. Klaine, M. Gering, S. Bahn, M. Sanchez, A. J. Bench, J. L. Fordham, E. Bockamp and A. R. Green (1999). "Distinct 5' SCL enhancers direct transcription to developing brain, spinal cord, and endothelium: neural expression is mediated by GATA factor binding sites." Dev Biol **209**(1): 128-42.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**: 503-517.

- Szabo, P. and J. R. Mann (1994). "Expression and methylation of imprinted genes during differentiation of mouse pathenogenic and androgenetic embryonic stem cell lines." Development **120**: 1651-1660.
- Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard and W. Hillen (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7963-8.
- Vidal, F., J. Sage, F. Cuzin and M. Rassoulzadegan (1998). "Cre Expression in Primary Spermatocytes: A Tool for Genetic Engineering of Germ Line." Molecular Reproduction and Development **51**: 274-280.
- Visvader, J. E., Y. Fujiwara and S. H. Orkin (1998). "Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development." Genes Dev **12**(4): 473-9.
- Wilson, C., H. J. Bellen and W. J. Gehring (1990). "Position effects on eukaryotic gene expression." Annu Rev Cell Biol **6**: 679-714.
- Yanagawa, Y., T. Kobayashi, M. Ohnishi, S. Tamura, T. Tsuzuki, M. Sanbo, T. Yagi, F. Tashiro and J. Miyazaki (1999). "Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker." Transgenic Res **8**(3): 215-21.
- Zhu, Z., T. Zheng, C. G. Lee, R. J. Homer and J. A. Elias (2002). "Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic modeling." Cell Develop Biology **13**: 121-128.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Marko Maringer