

Identifizierung und Charakterisierung
cis regulatorischer Elemente des
humanen Gens für Keratin 20 *in vitro*
und im transgenen Mausmodell

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Arnd Wilhelmi
geboren am 29.03.1969
in Wiesbaden

Mainz, 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Cytoskelett.....	1
1.2 Intermediärfilamente	4
1.3 Keratine	6
1.4 Keratinexpression im Darm.....	7
1.5 Expression des Keratin 20.....	7
1.6 Genomische Organisation des Gens für Keratin 20	8
1.7 Regulation der Keratinexpression.....	9
1.8 Der Darm.....	11
1.9 TGF- β	14
1.10 TGF- β im Darm	15
1.11 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Materialien	18
2.1.1 Versuchstiere	18
2.1.2 Zelllinien	18
2.1.3 Bakterienstämme	18
2.1.4 Klonierungsvektoren	18
2.1.5 Expressionsvektoren.....	18
2.1.6 Chemikalien, Enzyme und Proteine	19
2.1.7 Zellkulturmedien	19
2.1.8 Radioaktive Nukleotide.....	19
2.1.9 Oligonukleotide	19
2.1.10 Geräte	23
2.1.11 Sonstige Materialien	24
2.1.12 Benutzte Puffer und Medien	25

2.2 Methoden	27
2.2.1 Plasmid-DNA Präparation	27
2.2.1.1 Plasmid Minipräparation.....	27
2.2.1.2 Plasmid Midi - und Maxipräparationen.....	27
2.2.1.3 Endotoxinfreie Plasmid Maxipräparation	27
2.2.1.4 Endotoxinfreie Maxipräparation sehr großer Plasmide	27
2.2.2 DNA-Restriktion und Gelelektrophorese.....	27
2.2.3 Subklonierung von DNA-Fragmenten	28
2.2.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	28
2.2.5 DNA Isolierung aus Geweben	28
2.2.6 Southern-Blot Analyse.....	29
2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.2.7.1 Bestimmung der Transgenität.....	30
2.2.7.2 Herstellung von Northern-Blot Sonden	30
2.2.8 RNA Isolierung aus Geweben	30
2.2.9 Northern-Blot Analyse.....	31
2.2.10 <i>Screening</i> einer genomischen λ -Phagenbank	31
2.2.11 Western-Blot Analyse.....	31
2.2.12 Kultivierung humaner Zelllinien.....	32
2.2.13 Transfektion humaner Zelllinien	33
2.2.14 Fluoreszenzmessung	34
2.2.15 Generierung transgener Mäuse.....	34
2.2.15.1 Präparation der Expressionsvektoren zur Oocyten-Injektion.....	34
2.2.15.2 Mikroinjektion	34
2.2.15.3 Zucht und Selektion transgener Tiere	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Genomische Organisation des Gens für K20	36
3.2 K20 Konstrukte.....	37
3.3 K20 Expressionsvektoren.....	41
3.4 Zelllinien für Transfektionsexperimente	42
3.5 Stabile Transfektion humaner Zelllinien.....	43

3.6 Charakterisierung der 5' <i>upstream</i> Sequenzen des K20	46
3.7 Spleißen des Hybrid-Introns	48
3.8 Transiente Transfektionen humaner Zelllinien.....	50
3.9 Generierung transgener Mäuse.....	52
3.10 Gewebespezifische Expression der Trans gene	53
3.10.1 RT-PCR Analyse.....	53
3.10.2 Northern-Blot Analyse.....	54
3.11 Transgenspezifische EGFP Expression	56
4. Diskussion.....	57
4.1 Generierung gewebespezifischer Expressionsvektoren.....	57
4.2 Charakterisierung der 5' <i>upstream</i> Sequenzen des K20	59
4.3 Identifizierung regulatorischer Elemente.....	62
4.4 Zelltypspezifische EGFP Expression	63
4.5 Generierung transgener Mauslinien.....	64
4.6 Gewebespezifische Expression der Transgene	65
4.7 Kontrollelemente der K20 Transkription	66
4.8 Ausblick	70
5. Zusammenfassung	71
6. Literatur	72
7. Anhang	87
7.1 Abkürzungen.....	87
7.2 Vektorkarten.....	89

1. Einleitung

1.1 Cytoskelett

Eukaryotische Zellen durchspannt ein dreidimensionales Netzwerk aus Filamenten (Fasern). Diese komplexe Struktur im Cytoplasma der Zellen wird als Cytoskelett bezeichnet. Es ermöglicht die unterschiedliche Morphologie, Funktion und Bewegung eines jeden Zelltyps des Organismus. Beispielsweise ist die Bildung von charakteristischen Zellstrukturen wie langgestreckte Axone der Nervenzellen oder die fingerförmigen Villi der Darmepithelzellen eine wesentliche Funktion des Cytoskeletts. Weitere wichtige Aufgaben wie Muskelkontraktion, der Transport von cytoplasmatischen Vesikeln, oder die Separation der Chromosomen bzw. die Einschnürung der Zelle während der Mitose/Meiose werden auch durch Strukturproteine des Cytoskeletts ermöglicht.

Unterschieden werden anhand ihres Baus und ihrer Dicke drei unterschiedliche Fasertypen:

Die ca. 6 nm dicken Mikrofilamente, die ca. 10 nm dicken Intermediärfilamente (IF) und die 23 nm messenden Mikrotubuli (Fuchs und Cleveland, 1998).

Mikrofilamente und Mikrotubuli sind hauptverantwortlich für Transportvorgänge in der Zelle und die Zellbewegung. Sie werden unter ATP bzw. GTP Verbrauch aus Monomeren bzw. Heterodimeren polymerisiert und, wenn nötig, wieder depolymerisiert. Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen, die aus α -Tubulin-Dimeren polymerisiert werden, sie sind an Transportvorgängen von Vesikeln, dem axonalen Transport und auch der Ausbildung des Spindelapparats vor der Zellteilung beteiligt (Downing und Nogales, 1998; McIntosh und Hering, 1991).

Das Mikrofilament Actin ist ein elementarer Bestandteil aller Zellen und wird dementsprechend stark exprimiert. Es macht ca. 1-5% aller intrazellulärer Proteine aus, in Muskelzellen wird es als integraler Bestandteil der Muskelfibrillen mit 10% noch stärker exprimiert (Lodish et al., 2000).

Intermediärfilamente wie beispielsweise die Keratine durchspannen das Cytoplasma und sind an Desmosomen bzw. Hemidesmosomen der Zellmembranen verankert (Abb. 1.1). Desmosomen stellen Zell-Zell, Hemidesmosomen Zell-Matrix Kontakte her (Abb. 1.2), diese halten als integrale Membrankomplexe die Epithelien der Haut oder anderer Organe zusammen (Jones et al., 1986).

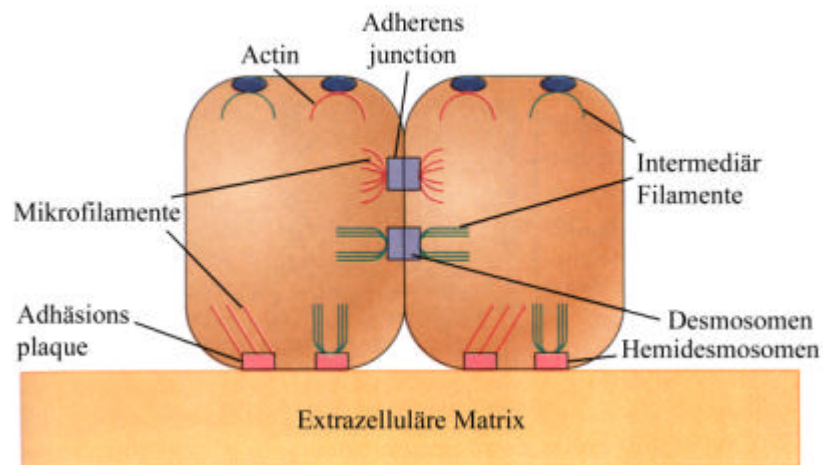


Abb. 1.1: Desmosomen und Hemidesmosomen

Desmosomen stellen Zell-Zell Kontakte her, während die Zellen an der extrazellulären Matrix mittels Hemidesmosomen fixiert sind. An beiden Strukturen greifen die Mikro- und Intermediär-Filamente an, die das Cytoplasma durchspannen (verändert nach Fuchs und Cleveland, 1998).

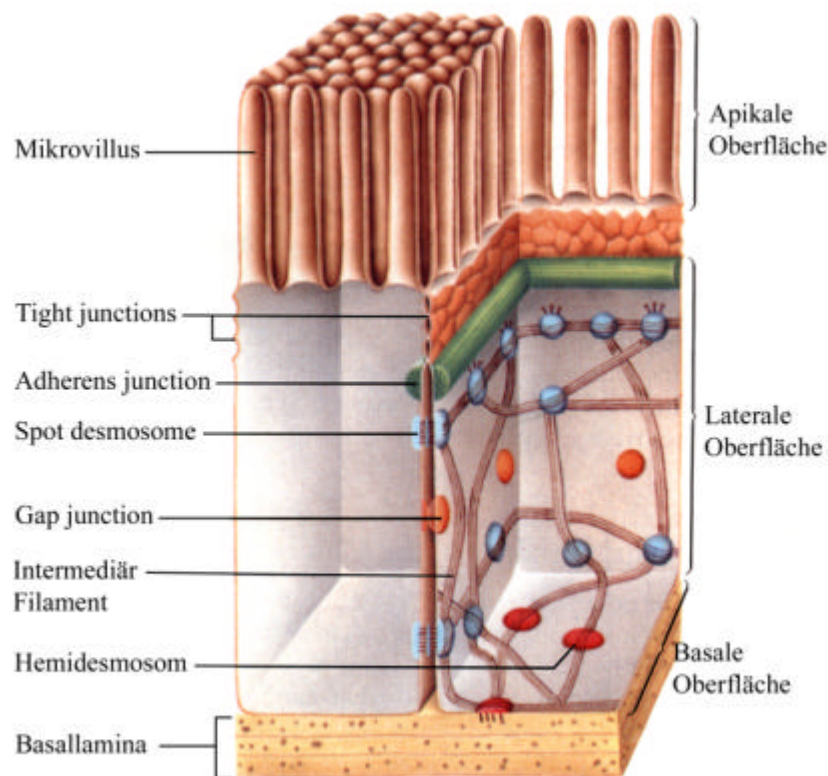


Abb. 1.2: Intestinale Epithelzelle

Das einschichtige intestinale Epithel wird durch Enterocyten gebildet, die durch Desmosomen fest untereinander verbunden sind. Hemidesmosomen fixieren die Zellen auf der Basallamina. An den Desmosomen und Hemidesmosomen greifen die Intermediärfilamente an, die das Cytoplasma durchspannen und die Zelle stabilisieren. *Tight junctions* an der luminalen Seite der Zellen sorgen für einen festen Verschluss der Zellzwischenräume gegenüber dem Darmlumen (verändert nach Lodish, 2000).

Die Intermediärfilamente können aber auch an anderen integralen Proteinen verschiedenster Organellen angreifen, so halten sie z.B. den Zellkern und das Endoplasmatische Retikulum in Position und Form, indem sie die Organellen zur Zellmembran quervernetzen (Carmo-Fonseca und David-Ferreira, 1990).

Die Intermediärfilamente bestimmen die Form der Zelle und geben dementsprechend erst die Möglichkeit komplexe Gewebe zu bilden. Sie vermitteln also ausschließlich die strukturelle Stabilität der Zellen und sind an Transportvorgängen nicht direkt beteiligt (Abb. 1.3). Die Expression der Intermediärfilamente als Strukturelement macht ca. 1% des zellulären Proteins aus. In ausdifferenzierten Zellen wie Keratinocyten oder Neuronen kann der IF Gehalt bis zu 85% betragen (Fuchs und Cleveland, 1998).

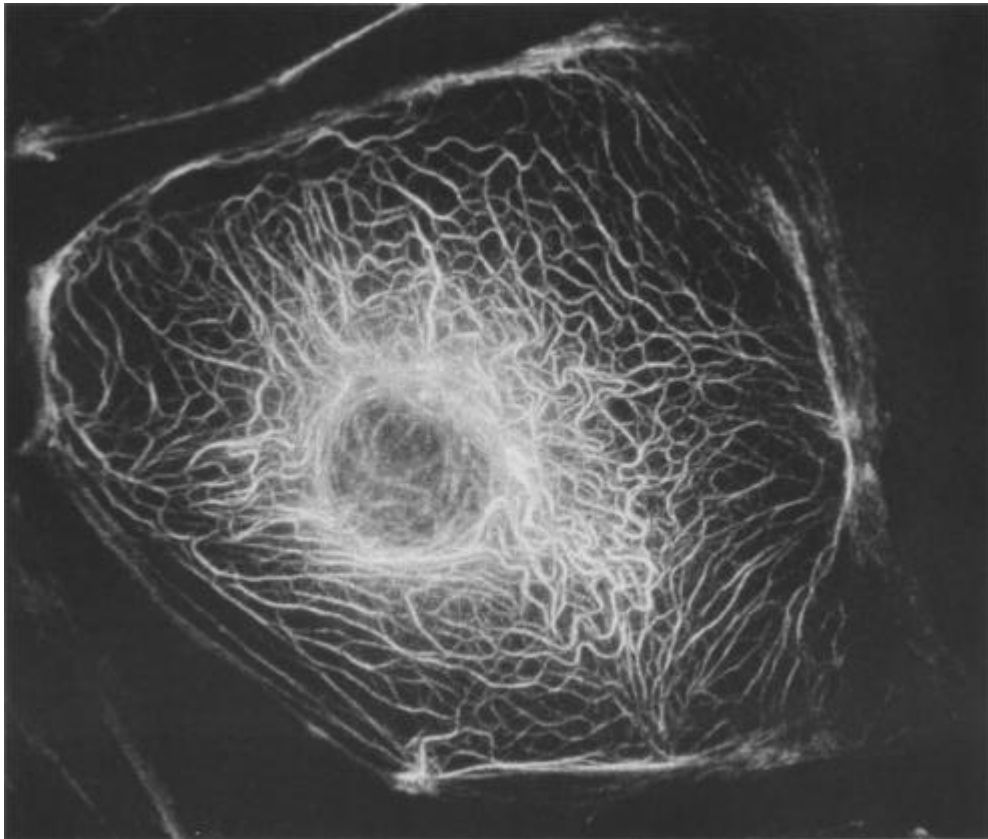


Abb.1.3: Intrazelluläres Keratinnetzwerk

Keratinfilamente durchspannen das Cytoplasma und verbinden die Zellmembran mit anderen Organellen. Deutlich wird die Kondensation des Keratin-Netzwerks um den Nukleus. Die Keratinfilamente einer PtK2 Zelle wurden mit einem anti-Keratin Antikörper sichtbar gemacht (Basehoar und Berns, 1973; Webster et al., 1978; Klymkowsky, 1982).

1.2 Intermediärfilamente

Die Gene der Intermediärfilamente gehören zu einer Multigenfamilie, die für Proteine ähnlicher Struktur codieren. Sie werden gewebespezifisch in den unterschiedlichen Geweben exprimiert. Bislang sind 65 Gene bekannt, so daß die Intermediärfilamente zu den 100 größten Genfamilien des Menschen gehören (Hesse et al., 2001).

Die Intermediärfilamente der Vertebraten wurden anhand ihrer Sequenzhomologien, Strukturhomologien und ihres Expressionsmusters in 5 Genfamilien eingeteilt (Fuchs und Weber, 1994; Herrmann und Aebi, 2000):

Typ I

Die Intermediärfilamente der ersten homologen Gruppe umfassen 16 Vertreter der Typ I Keratine und neun der verwandten Typ I Haar-Keratine, die auch als Hart-Keratine bezeichnet werden, weil sie Hauptbestandteil der Haare und Nägel sind (Langbein et al., 1999). Die Keratine sind charakteristisch für Epithelzellen aller Körperorgane, wobei jedes Epithel verschiedene charakteristische Kombinationen an Keratinen exprimiert.

Typ II

Ebenso wie bei den Typ I Proteinen gibt es unterschiedliche Typ II Intermediärfilamente. Vertreter dieser Gruppe sind 11 Keratine und sechs Haar-Keratine (Langbein et al., 1999; Rogers et al., 2000). Sie stellen die Partner für die spätere Filamentbildung mit den Typ I Keratinen dar.

Typ III

Desmin, Vimentin, *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und Peripherin sind Typ III Proteine (Granger und Lazarides, 1979; Gard und Lazarides, 1980; Bovolenta et al., 1984). Desmin wird in der quergestreiften Muskulatur produziert und ist dort für die Bündelung der Myofibrillen verantwortlich (Lazarides et al., 1982). Vimentin ist typischerweise in Endothelzellen der Blutgefäße, in wenigen Epithelzellen und in mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten zu finden (Blöse und Meltzer, 1981). In Fettzellen umschließt Vimentin wie ein „Käfig“ Lipidtropfen, um eine Fusion mit anderen Tropfen oder der Zellmembran zu verhindern. Häufig ist das Protein auch mit Mikrotubuli assoziiert (Franke et al., 1987).

Typ IV

á-Internexin, Syncoilin (Newey et al., 2001), Nestin, Synemin und die Neurofilamente NF-L, NF-M und NF-H bilden die Gruppe der Typ IV Intermediärfilamente.

Die Neurofilamente sind für die radiale Ausdehnung d.h. den Durchmesser des Axons verantwortlich, welcher direkt für die Geschwindigkeit der Signalweiterleitung verantwortlich ist (Kriz et al., 2000).

Typ V

Die Lamine A/C, B1 und B2 bilden die fünfte Gruppe. Diese Proteine finden sich exklusiv im Nukleus. Sie formen die nukleäre Lamina, die an der Innenseite den Kern auskleidet und diesen in Form hält (Aebi et al., 1986).

Bis auf wenige Ausnahmen werden die Intermediärfilamente von *single copy* Genen codiert, deren Divergenz nicht durch alternatives *splicing* erhöht wird (Fuchs und Weber, 1994).

Alle Typ I Keratin- und Haar-Keratin-Gene bis auf K18 (Waseem et al., 1990) liegen in einem *cluster* des Chromosom 17q12-q21. In dem DNA Abschnitt von fast 1 Mb liegen mindestens 25 funktionale Gene und zwei Pseudogene (Hesse et al., 2001).

Alle Typ II Gene sind auf Chromosom 12q13 lokalisiert. Der *cluster* enthält 24 funktionale Gene und 5 Pseudogene über einen Bereich von 1,2 bis 1,3 Mb. Die Gendichte der beiden *cluster* ist so mit 35 kb pro Gen deutlich höher als im Gesamtgenom (Hesse et al., 2001). Alle anderen Intermediärfilament-Gene sind nicht in *clustern* organisiert (Lander et al., 2001).

Die homologen Typ I Keratingene der Maus sind auf Chromosom 11 ebenfalls in einem *cluster* lokalisiert. Geordnet nach der chromosomalen Organisation sind in diesem Abschnitt die Gene für K10, K12, K13, K15, K19, K14 und K17 enthalten (Sato et al., 1999). Die Gene für K20 und K23 wurden für die Maus noch nicht beschrieben.

Aufgebaut sind die Intermediärfilament-Proteine aus einer aminoterminalen globulären Enddomäne, einer stabförmigen Grundstruktur, die als Kerndomäne bezeichnet wird und einer carboxyterminalen globulären Enddomäne. Die Kerndomäne besteht aus vier, selten drei Subdomänen, die durch nichthelikale *spacer* unterbrochen sind. Die Kerndomänen sind sowohl in ihrer Größe, ihrer Sekundärstruktur und ihrer Sequenz bemerkenswert hoch konserviert. Die *spacer* und nichthelikalen Enden der Keratine sind hingegen sehr variabel in Sequenz und Größe (Steinert und Roop, 1988).

Alle Filamente werden aus Untereinheiten polymerisiert. Bei Vimentin, Desmin und Gliafilamenten handelt es sich um Homopolymere, sie sind Mitglieder der Typ III Intermediärfilamente (Steinert et al., 1981; Hong und Davison, 1982).

Die Untersuchung der IF-Expressionsmuster von Zellen kann genutzt werden um die Herkunft von Tumoren zu bestimmen und diese dann richtig zu therapieren. Tumorzellen haben oft eine veränderte Morphologie und können nicht mehr eindeutig dem epithelialen,

mesenchymalen oder neuronalen Typ zugeordnet werden. Fast alle Karzinome der Brust bzw. des Gastrointestinaltrakts exprimieren Keratine aber kein Vimentin. Bei den mesenchymalen Stromazellen ist es genau umgekehrt (Moorthi et al., 1993).

1.3 Keratine

Die Keratine bestehen aus einer komplexen Familie verschiedener Proteine, die mittlerweile über 20 Mitglieder zählt. Die Molekulargewichte der Keratine bewegen sich von 40 kD bis 68 kD. Anhand ihres Molekulargewichts und ihres isoelektrischen Punkts lassen sie sich zweidimensional im Gel auftrennen und so in die sauren Typ I und die basischen Typ II Keratine einteilen (Moll et al., 1982). Zu den Typ II Vertretern gehören die Keratine K1 bis K8 (Hesse et al., 2001), zu den Typ I Proteinen werden K9 bis K20 (Hesse et al., 2001) und K23 (Zhang et al., 2001) gezählt. Die Filamente werden im Verhältnis 1:1 aus sauren und basischen Keratinkomponenten polymerisiert. Eine Keratinkomponente allein kann keine Filamente formen.

Exprimiert werden Keratine überwiegend in Epithelzellen, je nach Epitheltyp werden spezifische Keratinkomponenten gebildet. Die Kerndomänen der Heterodimere formen eine s.g. α -helikale Superhelix (*coiled-coil*). Im stratifizierten Epithel der Epidermis werden vornehmlich die sauren Typ I Keratine K10 und K14, bzw. die basischen Typ II Proteine K1, K2 und K5 exprimiert (Moll et al., 1982). Davon formen hauptsächlich K5 und K14 in den Keratinocyten der Basalschicht Heterodimere. In den terminal differenzierenden suprabasalen Schichten wird die K5/K14 Expression weitgehend eingestellt dafür kommt es zur Induktion der Keratine K1 und K10 (Fuchs, 1993; Fuchs, 1995). In den einfachen Epithelien der Brustdrüse, der Leber und des Darms sind vor allem Heterodimere aus K8/K18 und variierende Proteinmengen von K8/K19 und K8/K20 zu detektieren (Franke et al., 1981; Moll et al., 1982; Cooper et al., 1985; Quinlan et al., 1985).

Ein Epithel bzw. eine Zelllinie kann durch das spezifische Expressionsmuster seiner Keratinkomponenten charakterisiert werden. Die Keratine K5 und K6 beispielsweise sind typische Proteine stratifizierter (mehrschichtiger) Epithelien wie der Epidermis (Moll et al., 1982).

1.4 Keratinexpression im Darm

In den Epithelien des Intestinaltrakts werden die sauren Typ I Keratine K18, K19 und K20 bzw. das basische K8 exprimiert. Die drei sauren Vertreter bilden mit ihrem Partner K8 Heterodimere, die dann Heterotetramere, Protofilamente und letztendlich Intermediärfilamente bilden (Moll et al., 1990). Die Keratinexpression ist nicht nur auf die einschichtigen Mucosen des Dünndarms (Ileum) bzw. des Dickdarms (Colon) beschränkt. Mit Ausnahme von K20 werden die Keratine in allen Zellen der Mucosa gleichmäßig stark exprimiert. Dies gilt für die Enterocyten, die schleimsekretierenden Becherzellen und die Zellen an der Kryptenbasis. K8, K18 und K19 werden außerdem in einer Vielzahl anderer einschichtiger Epithelien exprimiert. Nachgewiesen wurden sie beispielsweise in der Leber, im Brustdrüsenepithel und Tumoren, welche von diesen Epithelien abstammen (Moll et al., 1982).

1.5 Expression des Keratin 20

Die Keratin 20 Expression ist im Vergleich zu K8, K18 und K19 wesentlich stringenter reguliert. Während K20, wie die anderen Keratine im kompletten Intestinaltrakt exprimiert wird, ist es in anderen Organen wie z.B. der Leber und Niere nicht zu finden (Moll et al., 1992; Moll et al., 1993). Starke Expression findet sich in den foveolaren Epithelien des Magens, in den Mucosen des Duodenum (Zwölffingerdarm), des Jejunum und Ileum (Dünndarm), im Blinddarm und im Colon (Grimmdarmepithel) (Moll et al., 1992). Außerhalb des Intestinaltrakts wird K20 nur noch in den Merkelzellen der Haut (Moll et al., 1990) und sehr schwach im Urothel exprimiert (Moll et al., 1992; Moll et al., 1990). Erwartungsgemäß wird K20 in Tumorzellen, deren Ursprung Mucosazellen des Magen-Darmtrakts sind, sehr stark exprimiert. Gleiches gilt für Zelllinien, die aus Tumoren z.B. des Colon generiert wurden. Beispiele hierfür sind die humanen Colon Adenokarzinomzelllinien HT-29, DLD-1 oder CaCo-2 (Moll et al., 1992).

Bemerkenswert ist auch, daß K20 nicht wie K8, K18 und K19 homogen in allen Enterocyten der Mucosa exprimiert wird. Die kaum differenzierten Paneth Körnerzellen an der Kryptenbasis der *Villi intestinales* sind K20 negativ. Beginnend mit der Differenzierung der Enterocyten während der Migration entlang der Villi in Richtung Villusspitze ist die K20 Expression kontinuierlich stark vorhanden. Nach dem Erreichen der Villusspitze werden die Zellen in das Darmlumen abgeschilfert (Moll et al., 1993; Potten, 1997).

1.6 Genomische Organisation des Gens für Keratin 20

Die Sequenz des humanen Gens für K20 wurde 1993 von Moll et al. veröffentlicht. Der beschriebene Klon umfasst ca. 18 kb und codiert für ein Gen bestehend aus 8 Exons und 7 Introns. Die klonierte Sequenz gliedert sich in 4,8 kb 5' flankierende Region, einen 9,3 kb Exon/Intron Bereich und 3,9 kb 3' flankierenden Bereich. Die ersten beiden Introns sind mit 2,15 kb und 1,8 kb im Vergleich zu anderen Keratingenen auffallend groß. Untersuchungen mittels Southern-Blot ergaben, daß es sich um ein *single copy* Gen handelt.

Die mRNA des K20 hat eine Länge von 1,75 kb, codiert für ein Protein mit 424 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 48553 Da. Das initiale Methionin fehlt im reifen Protein. Aufgrund seiner Struktur und des isoelektrischen Punkts von pH 5,66 wurde K20 als saures Typ I Keratin klassifiziert (Moll et al., 1993). Auf Aminosäureebene ist K20 mit dem humanen K14 und K15 eng verwandt (Moll et al., 1993).

Im *cluster* der Typ I Keratine ist das Gen für K20 zwischen den Genen für K23 und K12 lokalisiert. Alle drei Gene enthalten 8 Exons, 7 Introns und haben die gleiche chromosomale Orientierung. Die Größe der Exon/Intron Bereiche ist allerdings variabel. Die Untersuchung eines 137022 bp langen PAC Klons (Accession Nr. AC004231) aus einem Bereich des Chromosoms 17q12 ergab die genaue Position der drei Keratingene zueinander (Abb. 1.4).

Die Exon/Intron Sequenzen von K23 erstreckt sich über 14,8 kb, bei K20 sind es 9,3 kb und bei K12 nur 5,9 kb. Der Abstand von K23 zu K20 beträgt 37,8 kb, zwischen K20 und K12 liegen 8,7 kb (Moll et al., 1993; Zhang et al., 2001; Nishida et al., 1997).

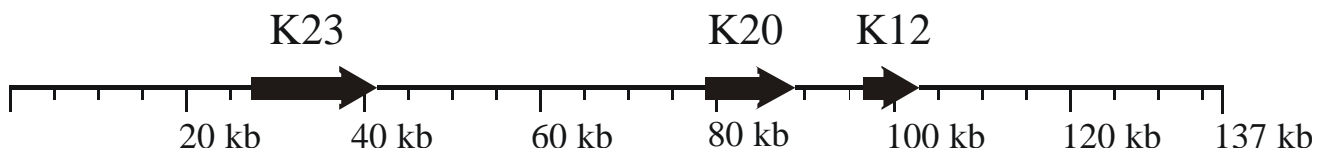


Abb. 1.4: Genomische Organisation des Gens für Keratin 20

Der 137022 bp lange PAC Klon (Accession Nr. AC004231) trägt einen Abschnitt des Typ I Keratinclusters, lokalisiert auf dem humanen Chromosom 17q12. Enthalten sind die Keratingene K23, K20 und K12, die als Pfeile dargestellt sind. Die Exon/Intron Sequenzen nehmen beim K23 14,8 kb, beim K20 9,3 kb und beim K12 5,9 kb ein. Zwischen K23 und K20 liegen ca. 37,8 kb, zwischen K20 und K12 ca. 8,7 kb.

1.7 Regulation der Keratinexpression

Die effiziente Initiation der Transkription von eukaryotischen Promotoren der RNA-Polymerase II wird durch den Transkriptions-Initiations-Komplex vermittelt. Dieser enthält die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, B, D, E, F, H und die RNA Polymerase II, was für eine basale Expression von eukaryotischen Promotoren der Klasse II ausreicht. Verstärkt werden kann die Expression durch DNA bindende Proteine (Transaktivatoren). Diese Faktoren binden sequenzspezifisch DNA Bereiche im Promotor bzw. auch an *up-* oder *downstream* Sequenzen und interagieren mit dem Transkriptions-Initiations-Komplex. Diese Transaktivatoren können zelltypspezifisch exprimiert sein, andere sind ubiquitär zu finden und für die konstitutive oder verstärkte Expression einer Reihe von Genen verantwortlich (Briggs et al., 1986; Dynan et al., 1986).

Die Expression der Keratingene wird hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert, obwohl auch posttranskriptionelle Modifikationen beschrieben wurden (Eichner et al., 1984; Fuchs und Green, 1980; Roop et al., 1988). Die Genexpression wird üblicherweise durch proximale Promotoren in Verbindung mit einer TATA Box und der Initiatorsequenz am Transkriptionsstart gesteuert. Allerdings kann die TATA Box (TATAA) wie im Fall des K5 bzw. des K20 degeneriert sein (GATAA; Casatorres et al., 1994, bzw. CATAA; Moll et al., 1993). Hinzu kommen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Transaktivatoren), die meist proximal des Promotors liegen (Blessing et al., 1989). Selten sind diese aber auch in Introns oder Exons lokalisiert wie z.B. im humanen Gen für K18 (Pankov et al., 1994a; Pankov et al., 1994b; Neznanov und Oshima, 1993). Enhancereigenschaften der 3' *downstream* Regionen wurden bisher für die Keratingene K1 und K19 beschrieben. In beiden Fällen sind AP-1 Bindungsstellen 3' des polyA-Signals für die Regulation entscheidend (Huff et al., 1993; Hu und Gudas, 1994).

Am häufigsten wurden bisher für die Regulation epithelialer Promotoren die Transkriptionsfaktoren *selective promoter factor 1* (Sp1), *activator protein 1* (AP-1), *activator protein 2* (AP-2) und Ets beschrieben. Vermutlich steuern AP-1 und AP-2 die zelltypspezifische Expression der Keratingene in den Epithelzellen. Sp1, ein ubiquitär vorkommender Faktor, ist eher an der Modulation der Expressionsstärke beteiligt. Allerdings bedingt nicht ein einzelner Transkriptionsfaktor die zelltypspezifische Expression eines Gens, sondern dies wird meist durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren ermöglicht (Wasylyk et al., 1990; Leask et al., 1991; Wanner et al., 1997; Sinha et al., 2000; Leprince et al., 1983).

Eine Vielzahl von Keratingenen wurde *in vitro* und *in vivo* auf Kontrollelemente untersucht, die an der Regulation der zelltyp- bzw. gewebespezifischen Expression beteiligt sind.

Hierzu wurden meist genomische Fragmente verwendet, welche die untersuchten Keratingene inklusive unterschiedlich langer *up-* und *downstream* Sequenzen enthielten. Bei allen untersuchten Genen waren weniger als 10 kb 5' *upstream* Sequenz für eine starke gewebespezifische Expression in transgenen Mäusen ausreichend.

Mit Konstrukten bestehend aus dem humanen Gen für K5 inklusive 5 kb der 5' *upstream* Sequenz ist es möglich transgene Expression in basalen Keratinocyten und Follikelzellen der Epidermis zu erreichen (Byrne und Fuchs, 1993). Sechs kb der 5' *upstream* Region des bovinen K5 sind ausreichend für eine starke gewebespezifische Expression in der Haut transgener Mäuse (Ramirez et al., 1994). Ähnliche Verhältnisse bestehen beim K10 Promotor, auch hier reichen 5 kb proximaler Sequenz aus, um transgene Expression gewebespezifisch in die suprabasalen Schichten der Epidermis zu dirigieren (Bailleul et al., 1990). Lediglich die induzierbare Expression eines K6 Transgens in interfollikulären Keratinocyten nach Verwundung oder chemischer Promotion benötigt mindestens 10 kb der 5' *upstream* Region. Allerdings reichen 605 bp proximaler 5' Sequenz für eine starke Expression eines Reporterkonstrukts *in vitro* (Blessing et al., 1989; Blessing et al., 1993; Blessing et al., 1995; Ramirez et al., 1995; Ramirez et al., 1998).

Die Situation für Keratingene der einfachen (einschichtigen) Epithelien ist ähnlich. Die K18 Expression wird von 2,5 kb 5' Region im Zusammenspiel mit Bindungsstellen für ets, AP-1 im Intron 1 und AP-1 im Exon 6 des Gens reguliert. Auch in diesem Fall sind genannte Kontrollelemente für eine gewebespezifische Expression des Transgens ausreichend (Abe und Oshima, 1990; Neznanov und Oshima, 1993; Pankov et al., 1994a; Pankov et al., 1994b; Umezawa et al., 1997; Rhodes und Oshima, 1998).

Beim humanen K19 sind alle notwendigen cis-regulatorischen Elemente für transgene Expression im Bereich zwischen -8,6 kb vor dem Transkriptionsstart bis 0,7 kb nach dem polyA-Signal lokalisiert (Bader und Franke, 1990). *In vitro* wurde in der 3' Sequenz ein *enhancer* identifiziert, der eine AP-1 Bindungsstelle enthält und für die Transkription essentiell ist (Hu und Gudas, 1994). Bis jetzt wurden für die beiden Keratin-*cluster* keine Lokus-Kontrollelemente (LCR-*locus control region*) beschrieben, die eine koordinierte Expression mehrerer Keratingene steuern, wie das beispielsweise beim *human growth hormone* (hGH) oder den humanen Globingenen der Fall ist. Beim Globinlokus sind Kontrollelemente bis zu 50 kb 5' *upstream* bzw. 20 kb 3' *downstream* vom Transkriptionsstart lokalisiert (Jones et al., 1995; Grosveld et al., 1987).

1.8 Der Darm

Dünn- und Dickdarm sind muskulöse Hohlgane, die durch die Ileozökalklappe voneinander getrennt sind. Diese Organe bewältigen die Stoff-, Wasser- und Elektrolytaufnahme und haben beim Erwachsenen eine mittlere Länge von 280 cm beim Dünndarm und 110 cm beim Dickdarm. Der Dünndarm gliedert sich in den bogenförmigen Zwölffingerdarm (Duodenum), den Gekrösedarm (Intestinum mesenteriale), der sich wiederum in Leerdarm (Jejunum) und den Krummdarm (Ileum) aufteilt. Die gesamte Dünndarmschleimhaut weist eine große Zahl von Schleimhauterhebungen (Darmzotten, Villi intestinales, Abb. 1.5) auf, die der Stoff- und Wasseraufnahme (Resorption) dienen.

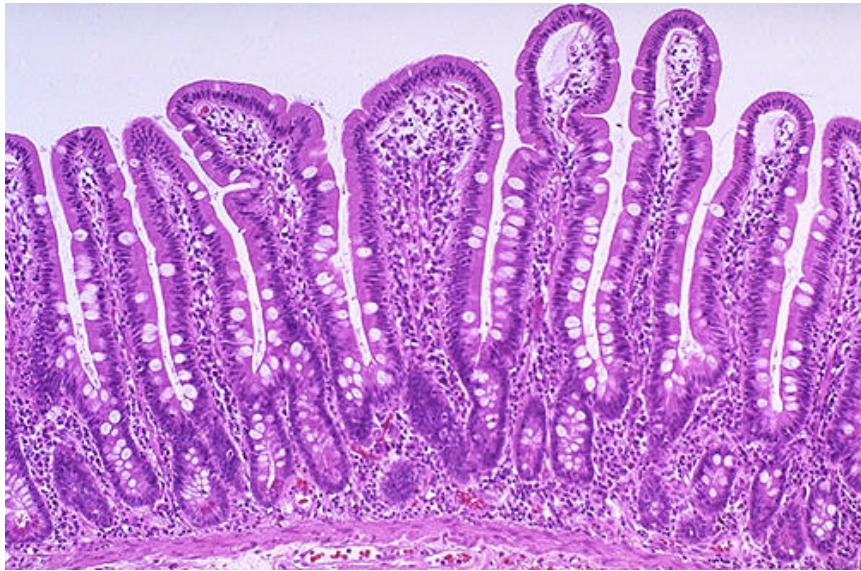


Abb. 1.5 Villi intestinales

Hämatoxylin/Eosin gefärbter Dünndarmschnitt. Die Oberfläche des Zwölffingerdarms und Dünndarms wird durch eine Vielzahl fingerförmiger Darmzotten (Villi intestinales) vergrößert. Das einschichtige Epithel der Mucosa wird hauptsächlich durch Enterocyten und schleimsekretierende Becherzellen gebildet. Die Schleimvakuolen sind deutlich als helle Ovale in der Epithelschicht zu erkennen. 10fache Vergrößerung.

Der Dickdarm (Intestinum crassum) gliedert sich in drei Abschnitte. Unterhalb der Einmündungsstelle des Dünndarms gelegen befindet sich der 6-8 cm lange Blinddarm (Caecum) mit dem 5-8 cm langen Wurmfortsatz (Appendix vermiformis). Daran schließt sich der Grimmdarm (Colon), mit den Unterteilen Colon ascendens, transversum, descendens und sigmoideum an. Das Ende des Intestinaltrakts bildet der ca. 20 cm lange Mastdarm (Rektum).

Die Drüsen des Dün- und Dickdarms sind von tubulärem Bau (Glandulae intestinales Lieberkuehni), daneben finden sich schleimsekretierende Becherzellen und solitäre Lymphfollikel (Folliculi lymphatici solitarii).

Um die Resorptionsoberfläche zu vergrößern bilden die Zellen des Dünndarms fingerförmige intestinale Zotten (Villi) aus (Abb. 1.5). Das einschichtige Epithel aus Enterocyten ist auf der Lumenseite noch zusätzlich mit einem Bürstensaum, den Mikrovilli versehen, wobei es sich um fingerförmige Membranfortsätze handelt (Abb. 1.1 und 1.6). Gestützt werden die Mikrovilli durch intrazelluläre Actinbündel, die an der Basis durch Spectrin quervernetzt und zusätzlich mit dem Keratingerüst der Enterocyte verbunden sind (Abb. 1.6).

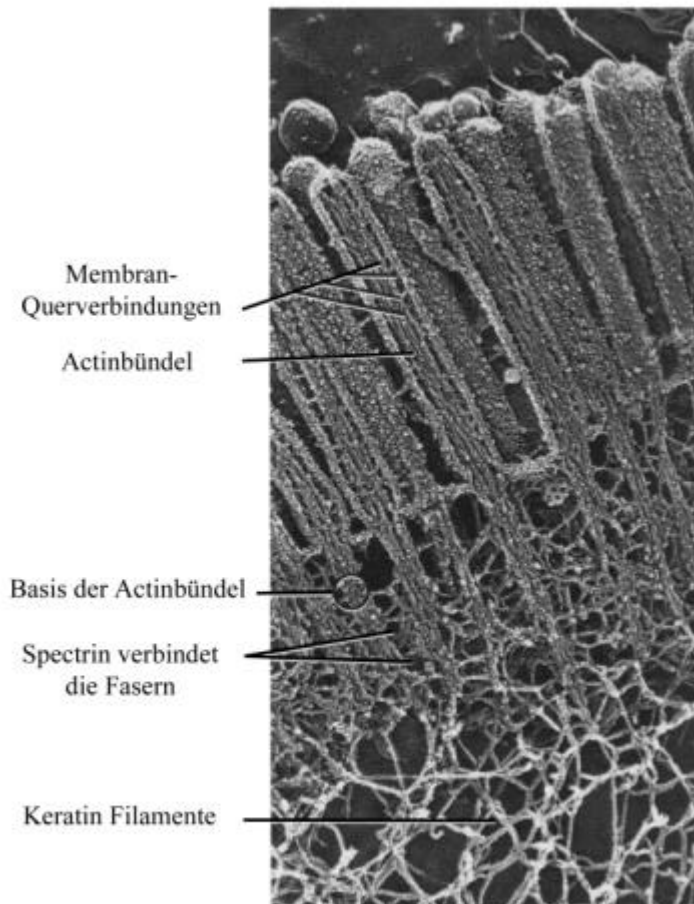


Abb. 1.6 Mikrovilli

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Mikrovillistützstruktur. Parallele Actinbündel fixieren die Membranausstülpungen der Enterocyte mittels Querverbindungen. Die Basis der Actinbündel ist mit dem Keratinnetzwerk über Spectrin verknüpft. Die Mikrovilli sind ca. 2µm lang. Der Basalbereich wo sich das Actin mit den Keratinen quervernetzt ist ca. 0,5 µm. 20000fache Vergrößerung (Hirokawa und Heuser, 1981).

Auf der extrazellulären Seite tragen die Mikrovilli ein Netzwerk aus Glykoproteinen (Glykokalyx, Abb. 1.7), welche die Verdauungsenzyme beherbergen (Hirokawa und Heuser, 1981).

Insgesamt ergibt sich durch diese Morphologie eine Resorptionsoberfläche von 200-300 m². Im Dickdarm sind keine Zotten sondern eher gröbere Falten zu beobachten, ebenso fehlen Mikrovilli und Glykokalyx (Abb. 1.8).

Das Darmepithel unterliegt massiven chemischen und mechanischen Beanspruchungen durch die Verdauungsprozesse und die Peristaltik, deshalb ist eine ständige Zellerneuerung

notwendig. Diese Regeneration geht von der Basis der Villi, den Krypten aus. Nahe den s.g. Lieberkühn Krypten sind pluripotente Stammzellen lokalisiert, die permanent für Zellnachschub an transient amplifizierenden Zellen sorgen. Von der Krypte aus wandern die Enterocyten entlang der Villusachse in Richtung Zottenspitze, sie stellen die Teilung ein und differenzieren. Nach Erreichen der Villusspitze werden sie ins Darmlumen abgeschilfert.

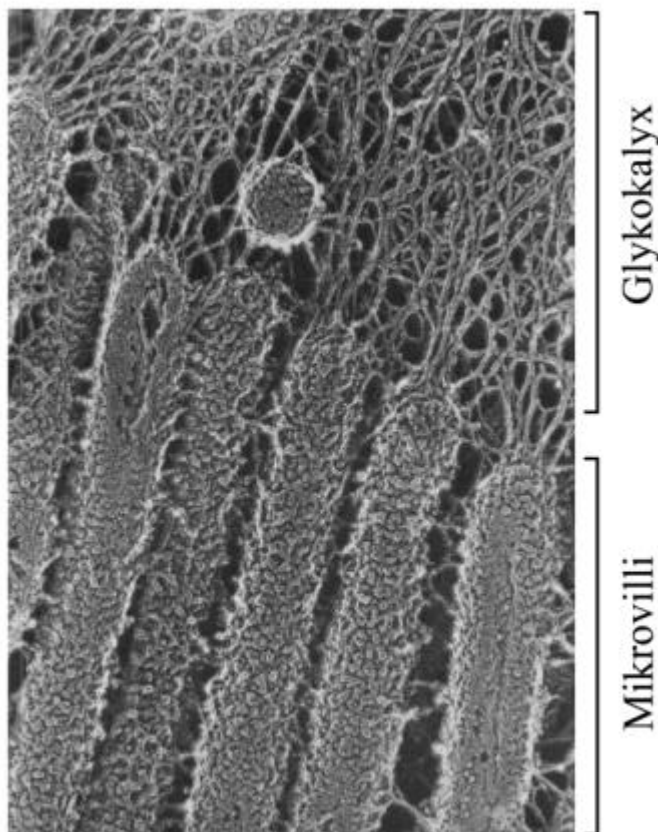


Abb. 1.7 Glykokalyx

Die Mikrovilli tragen an den Spitzen ein Netzwerk aus extrazellulärer Matrix, welches als Glykokalyx bezeichnet wird. Das Geflecht aus Glykoproteinen trägt eine Reihe von Verdauungsenzymen, wie z.B. der Sucrase-Isomaltase. 50000fache Vergrößerung (Hirokawa und Heuser, 1981).

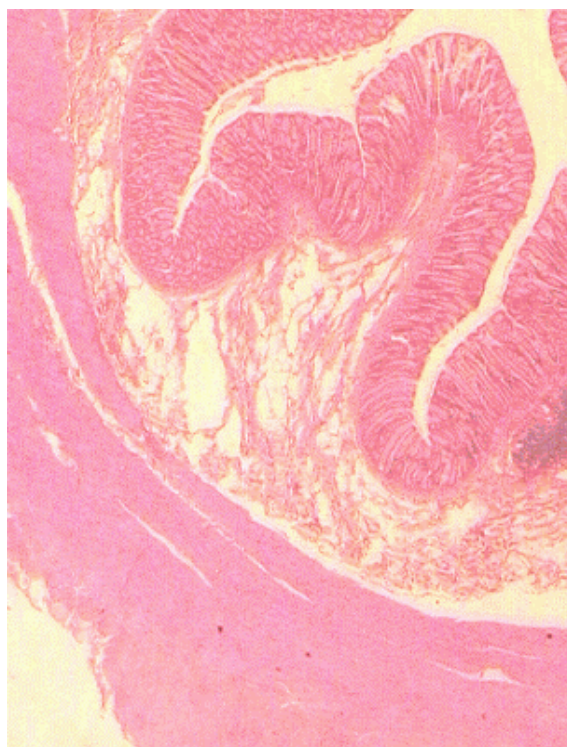


Abb. 1.8 Colon

Hämatoxilin/Eosin Färbung eines Dickdarmschnitts. Erkennbar sind die ausgeprägten Falten der Mucosa statt der Villi wie im Dünndarm. 10fache Vergrößerung.

1.9 TGF- β

Die Entwicklung, Homöostase und Reparatur von Geweben wird durch ein kompliziertes Netzwerk sekretierter Proteine, der extrazellulären Matrix reguliert. Ein Teil dieses Systems sind die Cytokine, sie wirken auf spezifische Zelloberflächenrezeptoren der Zielzellen. Einer der wichtigsten regulatorischen Faktoren für Proliferation und Differenzierung ist *transforming growth factor β* (TGF- β), ein Mitglied dimerer Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie. Hierzu gehören TGF- β_{1-3} , die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und die Activine. Prinzipiell produziert jede Körperzelle TGF- β und hat die notwendigen Rezeptoren für den Liganden (Lyons und Moses, 1990; Kingsley, 1994).

Die TGF- β Signalkaskade beginnt mit der Bindung des dimeren Cytokins an den Typ II Rezeptor, der den Typ I Rezeptor in den Komplex rekrutiert (Attisano et al., 1994; Ebner et al., 1993). Die intrazelluläre Serin/Threonin-Kinasedomäne des Typ II Rezeptors transphosphoryliert die GS Domäne des Typ I Rezeptors. Die Phosphorylierung von Smad2 oder Smad3 durch den Typ I Rezeptor ermöglicht die Bindung von Smad4 zu dimeren Komplexen. Die Translokation der Dimere in den Zellkern führt letztendlich zur Transkription von TGF- β regulierten Zielgenen (Wrana et al., 1994; Nakao et al., 1997; Heldin et al., 1997).

TGF- β reguliert die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen, die embryonale Entwicklung, Wundheilung und Angiogenese (Glick et al., 1993; Motyl et al., 1998; Guo und Kyprianou, 1999). Allerdings reguliert TGF- β die Proliferation abhängig vom Zelltyp, d.h. die Proliferation der meisten Epithel-, Endothel- und hämatopoetischen Zellen wird durch TGF- β inhibiert, da der Zellzyklus in der G1 Phase durch die Expression spezifischer Inhibitoren fixiert wird (Ravitz und Wenner, 1997). Die essentielle Rolle von TGF- β in diesen Prozessen zeigt sich bei gezielter Deletion von Genen der Signalkaskade. TGF- β Über- bzw. Unterproduktion wird mit zahllosen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht, beispielsweise Arteriosklerose bzw. Fibrosen von Leber, Niere und Lunge (Border und Noble, 1994; Bedossa et al., 1995). Mutationen der Gene von TGF- β , dessen Rezeptoren oder intrazellulärer Signalmoleküle sind aber auch außerordentlich wichtig bei der Krebsentstehung. Krebszellen mit Mutationen im TGF- β Signalweg können resistent gegen die antiproliferativen Wirkungen von TGF- β werden (Knaus et al., 1996).

TGF- β defiziente Mäuse zeigen massive Entzündungen der Lunge, des Herzen und des Intestinalsystems, was die verstärkte Aktivierung und Proliferation inflammatorischer Zellen verdeutlicht (Shull et al., 1992; Kulkarni et al., 1993; Geiser et al., 1993).

Normalerweise fungiert TGF- β als Tumorsuppressor indem es die zelluläre Proliferation inhibiert oder die Zelldifferenzierung oder Apoptose unterstützt. Bei der Krebsentstehung verliert die Zelle die TGF- β vermittelte Wachstumskontrolle durch Mutation ein oder mehrerer Gene der Signalkaskade. Bei colorektalen Karzinomen werden ca. 80% der Fälle durch mindestens eine fehlerhafte Komponente des TGF- β Signalwegs verursacht (Markowitz et al., 1995; Myeroff et al., 1995; Grady et al., 1998).

1.10 TGF- β im Darm

TGF- β ist ein starker Inhibitor epithelialer Proliferation im Darm. Auf Fibroblasten, die bei der Wundheilung eine Rolle spielen, wirkt TGF- β chemotaktisch. Es stimuliert die Produktion extrazellulärer Matrixproteine und inhibiert proteolytische Enzyme, die das neugebildete Bindegewebe wieder zerstören würden (Potten et al., 1997; Booth et al., 2000).

Das intestinale Immunsystem wird durch eine Reihe proinflammatorischer und anti-inflammatorischer Zellen und Moleküle reguliert. Stimulatorische Moleküle wie Bakterienantigene können Makrophagen und T-Zellen zur Sekretion chemotaktischer und proinflammatorischer Signale stimulieren. Normalerweise werden diese destruktiven immunologischen und inflammatorischen Ereignisse durch suppressive Zytokine wie Interleukin 10 (IL-10), TGF- β , IL-4 und IL-1 Rezeptor Antagonist gedämpft. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen scheinen diese anti-inflammatorischen Effekte nicht oder nur zum Teil zu funktionieren (Sartor, 1994; Kuhn et al., 1993).

Je nach dem, ob eine T_{H1} oder T_{H2} Immunantwort induziert wird, kommt es entweder zur Ausbildung eines Morbus Crohn oder einer ulcerativen Colitis. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führt die Antigenpräsentation vorwiegend zur Stimulation von CD4⁺ T-Helferzellen, was zu einer verstärkten mucosalen Immunantwort und einer chronischen Entzündung führt (Fiocchi, 1997b; Fiocchi, 1997a). Der TGF- β Signalverlust führt in intestinalen Geweben zu einer erhöhten Suszeptibilität für Colitis ulcerosa durch erhöhte MHC II Expression, erhöhte Aktivität der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und verstärkte Produktion von Auto-Antikörpern. Diese Faktoren führen gemeinsam zu einer mucosalen Destruktion (Hahm et al., 2000).

In Bezug auf das Immunsystem, stimuliert TGF- β die Proliferation von naiven T-Zellen, induziert die Expression von Cytokinen und die Expansion von Effektorzellen (Cerwenka et al., 1994; Cerwenka et al., 1996; Zhang et al., 1995). Allerdings wird TGF- β auch starke immunsuppressive Wirkung zugeschrieben (Kehrl et al., 1986; Ahuja et al., 1993; Espevik et

al., 1987; Espevik et al., 1990; Fargeas et al., 1992; Mule et al., 1988; Smyth et al., 1991). Die Dysregulation der TGF- β Expression kommt für die Pathogenese und potentielle Therapie inflammatorischer Erkrankungen in Betracht (Letterio und Roberts, 1998).

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die chronisch entzündliche Dickdarmerkrankung Morbus Crohn. Vermutlich werden *antigen presenting cells* (APCs) im Darm durch ein unbekanntes Antigen zur Sekretion von IL-12 stimuliert, welches die Sekretion von IFN- γ durch CD4⁺ T-Zellen des T_{H1} Typs stimuliert. IFN- γ stimuliert Makrophagen, diese sezernieren die proinflammatorischen Cytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β , welche die Entzündung hervorrufen. Eine positive Rückkopplung vermittelt durch TNF- α und IFN- γ stimuliert APCs zur Sekretion von IL-12, was die induzierte T_{H1} Entzündungsreaktion weiter propagiert. Die Suppression der Entzündung wird durch APCs in den Peyerschen Plaques vermittelt. Diese APCs stimulieren T-Zellen IL-2 zu produzieren, das die Sekretion von TGF- β durch T-Zellen hervorruft. TGF- β inhibiert dann die IFN- γ Produktion durch T_{H1} Zellen, dies führt zu einer Suppression der destruktiven T_{H1} Antwort. Tiermodelle bestätigen diesen Regulationsmechanismus. Transgene Mäuse, die STAT-4 überexprimieren, das intrazelluläre Signalmolekül für IL-12 in T-Zellen, entwickeln eine Colitis verursacht durch T_{H1} Zellen (Wirtz et al., 1999). IL-2 defiziente Mäuse entwickeln ebenfalls eine T_{H1} vermittelte Colitis (Sadlack et al., 1993). Neutralisierende Antikörper gegen IL-12 verhindern in diesen Tieren die Krankheitsentstehung, dies verdeutlicht die zentrale Rolle des Cytokins in der Pathogenese (Ehrhardt et al., 1997). Die Applikation von anti-CD3 Antikörpern, ein potenter Stimulus für T-Zellen, supprimiert ebenso die Colitisentstehung in IL-2 defizienten Mäusen. Die anti-CD3 Behandlung führt in diesem System zur TGF- β Sekretion durch T-Zellen, das effektiv die T_{H1} Antwort supprimiert (Ludviksson et al., 1997). Dies führt zu der Hypothese, daß die überschießende T_{H1} Antwort bei einer Colitis gar nicht oder nur schwach durch TGF- β moduliert wird. Das Konzept der immunsuppressiven und regulatorischen Rolle von TGF- β wird unterstützt durch den Befund, daß TGF- β ebenfalls die orale Toleranz, sekretiert durch T_{H3} Zellen, vermittelt (Miller et al., 1992; Khoury et al., 1992).

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Das Gen für humanes Keratin 20 soll für die Generierung eines Expressionsvektors zur Expression von Transgenen in der Mucosa intestinaler muriner Gewebe verwendet werden. Im Hinblick auf diese Anwendung muß der K20 Lokus auf regulatorische Elemente näher untersucht werden. Der 18 kb lange λ -Klon CK20-IT19 (Moll et al., 1993) trägt den Exon/Intronbereich des K20 inklusive 4,8 kb 5' *upstream* und 3,9 kb 3' *downstream*

Sequenzen. In 5' Richtung soll dieser Klon ergänzt werden, um weitere Kontrollelemente für die K20 Expression zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierfür soll eine genomische Phagenbank durchsucht und der benötigte 5' Bereich kloniert werden.

Die Keratingene werden unter anderem durch spezifische Transkriptionsfaktoren (TF) wie AP-1, AP-2 und Sp1 reguliert, diese sind meist 5' *upstream* des Promotors oder im Gen selbst lokalisiert. Die Existenz regulatorischer Elemente soll mittels verschiedener K20 Konstrukte *in vitro* untersucht werden, wobei die cDNA für das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) als Reporter Verwendung findet. Das EGFP eignet sich besonders gut als Reporter gen, da es *in vitro* einfach detektiert werden kann, ohne die Kulturzellen abtöten zu müssen und die Expression lässt sich quantitativ im Fluorometer messen (Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996)

K20 Sequenzbereiche, die *enhancer*-Eigenschaften besitzen, sollen dann detaillierter untersucht werden. Die subklonierten Bereiche können wiederum für Transfektionsexperimente eingesetzt werden um die TF Bindungsstellen einzugrenzen. Diese Experimente müssen parallel mit K20 positiven Kulturzellen (HT-29) und einer Kontrolllinie (HeLa) durchgeführt werden, damit die Zelltypspezifität der Vektoren untersucht werden kann.

Außerdem sollen transgene Tiere generiert werden, die gewebespezifisch die cDNAs für TGF- β (Brunner et al., 1989; Hemsley et al., 1989) bzw. den dominant negativen TGF- β Typ II Rezeptor (dn RII; Brand et al., 1993) oder EGFP in Enterocyten der Maus exprimieren.

Wichtig bei deren Charakterisierung ist die Gewebespezifität und die Expressionsstärke des Transgens im Epithel. Des weiteren sollen die Auswirkungen transgener Expression auf die Homöostase der Darmmucosa und auf submucosale immunologische Zellen in unterschiedlichen Darmabschnitten untersucht werden.

Besonders interessant sind die Auswirkungen einer Überexpression von TGF- β bzw. des dn RII in Bezug auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. Diese beiden schwerwiegenden Erkrankungen des Colon können im Tiermodell chemisch induziert werden, sie unterscheiden sich aber in der Expression spezifischer Cytokinmuster. Da TGF- β eine zentrale Rolle bei den o.g. Erkrankungen einnimmt, könnten die Untersuchungen an transgenen Tiermodellen neue Erkenntnisse bezüglich Krankheitsentstehung und Progression erbringen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Die verwendeten Mausstämme und F1-Kreuzungen (FVB/NHSD und C57BL/6J x C3H-F1) entstammten der Zucht des Tierstalls der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung) des Hochhauses am Augustusplatz, Mainz (Nishioka, 1995; Taketo et al., 1991).

2.1.2 Zelllinien

Für Transfektionsexperimente wurden folgende humane Zelllinien von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen:

HeLa: Humanes Cervixkarzinom, DSMZ Nr. ACC 57 (Scherer, 1953).

DLD-1: Humanes Colon Adenokarzinom, DSMZ Nr. ACC 278 (Dexter et al., 1979).

HT-29: Humanes Colon Adenokarzinom, DSMZ Nr. ACC 299 (Fogh und Trempe, 1975).

2.1.3 Bakterienstämme

Zur Amplifikation, der in Plasmidvektoren klonierten DNA-Fragmente, dienten die *E. coli* Stämme top10, HB101 und JM105 (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

2.1.4 Klonierungsvektoren

Als Klonierungsvektoren wurden Derivate von pBR322 (Aat II/Nde I Fragment von pBR322 mit Polylinker; Blessing et al., 1993), pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und pSL1190 (GenBank Accession Nr. U13866; Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt.

2.1.5 Expressionsvektoren

Die Vektoren pEGFP-N1 (Accession Nr. U55762) und pDsRed1-N1 (noch keine Accession Nr. bekannt) wurden von Clontech (Palo Alto, CA, USA) bezogen. Die cDNAs aus pEGFP-N1, des simian TGF- β und des dominant negativen TGF- β Typ II Rezeptors wurden in die humanen Keratin 20-Expressionsvektoren inkloniert.

pDsRed1-N1 diente als Transfektionskontrolle.

2.1.6 Chemikalien, Enzyme und Proteine

Wenn nicht anders vermerkt wurden Enzyme der Firma New England Biolabs GmbH (Schwalbach), AGS (Heidelberg), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und Roche (Mannheim) verwendet. Chemikalien und Feinchemikalien wurden von den Firmen Riedel-de Haen (Selze), Sigma (Deisenhofen), Difco (Detroit, USA), DAKO (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Biomol (Hamburg) bezogen.

2.1.7 Zellkulturmedien

Die Medien für Zellkultur, PBS, Antibiotika und Selektionsmedien wurden von Life Technologies (Eggenstein), fötales Rinderserum von Vitromex (Selters) und Accutase/Accumax zum Ablösen der adhärennten Zellen von PAA Laboratories (Cölbe) bezogen.

2.1.8 Radioaktive Nukleotide

α -32P-dATP (3000 Ci/mMol)	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
α -32P-dCTP (3000 Ci/mMol)	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig

2.1.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für PCR-Analysen, Klonierungen und zur Generierung von Northern-Blot Sonden wurden von Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert. Die verwendeten Primerkombinationen wurden nach dem Vorkommen im Ergebnisteil alphabetisch sortiert.

A. Bestimmung der Insertlänge isolierter I -Klone

Erwartete PCR Produktgröße 803 bp.

-12,8 kb Primer 1: 5'-TCT CCC TGA GCT TGA GGC TA-3'; Position 65579 bis 65598.

-12,8 kb Primer 2: 5'-TGG CTG GTC ACA ATC TCG TA-3'; Position 66381 bis 66362.

Erwartete PCR Produktgröße 797 bp.

-17,8 kb Primer 1: 5'-ATG TGG CTC GAT TGC TTC TTC-3'; Position 60633 bis 60653.

-17,8 kb Primer 2: 5'-TGC CTG CAG CTC AGA GTT TAG-3'; Position 61429 bis 61409.

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die GenBank Accession Nr. AC004231.

B. Modifikation des K20 Exon 1

Erwartete PCR Produktgröße 351 bp.

Pac I Primer: 5'-GAA AAA AAC CTG CCA AGG CAG G-3'; Position 4543 bis 4564

Nru I Primer: 5'-CCA TTC GCG ATT CCA GGA GGG AG-3'; Position 4894 bis 4872

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die GenBank Accession Nr. X73501

C. Kontrolle der Fragmentorientierungen bei der K20 Charakterisierung

5' Fragment 5: 5'-TTG CTA GAA TGA AGC CTT GTC A-3'; Position 60057 bis 60078.

5' Fragment 4: 5'-GTG GAG CTT GAG TTA TCC ATC C-3'; Position 63496 bis 63517.

5' Fragment 3: 5'-GAG TCC TGC TGT AGG GAA GAA A-3'; Position 66673 bis 66694.

5' Fragment 2: 5'-GAG ACT GAC CAA CAT GGT GAA A-3'; Position 70242 bis 70263.

5' Fragment 1: 5'-CAT GTG AAA GGC AAA ACC ATA A-3'; Position 73761 bis 73782.

Keratin 20 Promotor Primer: 5'-CTA AAT TGC GGG ACT GTT TAG G-3';

Position 74104 bis 74083.

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die GenBank Accession Nr. AC004231.

D. RNA Expressionsanalyse transfizierter HT-29 Zellen (RT-PCR)

Erwartete PCR Produktgröße 720 bp.

EGFP Primer: 5'-AGC TGA CCC TGA AGT TCA TCT G-3';

Position 803 bis 824; GenBank Accession Nr. U55762

Keratin 20 Exon 8 Primer: 5'-GAC CTT GCC ATC CAC TAC TTC T-3';

Position 13684 bis 13663; GenBank Accession Nr. X73501.

E. Analyse transgener Nachkommen der Linie Tg-C1-TGF-β

Erwartete PCR Produktgröße 709 bp.

Keratin 20 Primer: 5'-TTC TTG CCT GTG GAC TTC ATA A-3';

Position 4788 bis 4809; GenBank Accession Nr. X73501

simian TGF-β Primer: 5'-CAC ATG CTG CTC CAC TTT TAA C-3';

Position 765 bis 744; GenBank Accession Nr. M16658.

F. Analyse transgener Nachkommen der Linien Tg-C1-dn RII

Erwartete PCR Produktgröße 583 bp.

Keratin 20 Primer: 5'-TTC TTG CCT GTG GAC TTC ATA A-3';

Position 4788 bis 4809; GenBank Accession Nr. X73501

dn hTGF-β RII Primer: 5'-GGA ACA CAT GAA GAA AGT CTC ACC-3';

Position 774 bis 753 ; GenBank Accession Nr. M85079.

G. Analyse transgener Nachkommen der Linien Tg-C3-EGFP und Tg-C4-EGFP

Erwartete PCR Produktgröße 566 bp.

Keratin 20 Primer: 5'-TTC TTG CCT GTG GAC TTC ATA A-3';

Position 4788 bis 4809; GenBank Accession Nr. X73501

EGFP Primer: 5'-ACG TTG TGG CTG TTG TAG TTG T-3';

Position 1130 bis 1109; GenBank Accession Nr. U55762

H. RNA Expressionsanalyse transgener C1-dn RII Tiere (RT-PCR)

Erwartete PCR Produktgröße 680 bp.

hTGF- β dn RII Primer: 5'-GGA AGA TGC TGC TTC TCC AAA -3';

Position 674 bis 694; GenBank Accession Nr. M85079.

Keratin 20 Exon 2 Primer: 5'-CTG AAG TCC TCA GCA GCC AGT -3';

Position 7505 bis 7485; GenBank Accession Nr. X73501

I. Murine BMP6 Northern-Blot Sonde und PCR-Kontrolle

Erwartete PCR Produktgröße 270 bp.

mBMP6-1: 5'-ATG AAT GCC ACC AAC CAC G-3'; Position 110 bis 127.

mBMP6-2: 5'-GTT CGT GGT TTA AGG CAG-3'; Position 468 bis 451.

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die GenBank Accession Nr. U73520.

J. Murine BMP6 Northern-Blot Sonde und PCR-Kontrolle

Erwartete PCR Produktgröße 599 bp.

mBMP6-P1: 5'-CAG CAT TTA CCA AGT CTT GCA G-3'; Position 260 bis 281;

GenBank Accession Nr. U73516.

mBMP6-P2: 5'-GGA CGT ACT CGG GAT TCA TAA G-3'; Position 264 bis 243;

GenBank Accession Nr. U73520

K. Humane K20 Exon 3-8 Northern-Blot Sonde

Erwartete PCR Produktgröße 721 bp.

Keratin 20 Exon 3 Primer: 5'-ATC TCC AAG GCC TGA ATA AGG T-3';

Position 260 bis 281.

Keratin 20 Exon 8 Primer: 5'-GAC CTT GCC ATC CAC TAC TTC T-3';

Position 981 bis 960.

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die GenBank Accession Nr. X73502.

L. Murine GAPDH Northern-Blot Sonde und PCR-Kontrolle

Erwartete PCR Produktgröße 180 bp.

mGAPDH-P1: 5'-CAA CTA CAT GGT CTA CAT GTT C-3'; Position 159 bis 180.

mGAPDH-P2: 5'-ACC AGT AGA CTC CAC GAC-3'; Position 340 bis 323.

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die GenBank Accession Nr. M32599.

M. Humane K20 Exon 8 Northern-Blot Sonde

Erwartete PCR Produktgröße 370 bp.

Keratin 20 Exon 8 Primer: 5'-GCA GAG TCA TGT GCC TGA ATT A -3';

Position 13578 bis 13599.

Keratin 20 UTR Primer: 5'-TGC TCA CTG GAT TTC ATT TTT G -3';

Position 13947 bis 13926.

Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die GenBank Accession Nr. X73501.

2.1.10 Geräte

Bakterienschüttler Certomat	B. Braun, Melsungen
Brutschrank Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank, Trockenofen WTC	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Digitales Kamerasystem Cybertech CSI it	Hitachi, Japan
Durchlichtmikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
Elektrophoreseapparaturen (Agarosegele)	OWL Scientific über Labotec, Wiesbaden
Elektrophoreseapparaturen (Proteingele)	Biometra, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop AX70	Olympus, Hamburg
Hybridisierungsöfen OV-1	Biometra, Göttingen
Invers-Fluoreszenzmikroskop IX70 S8F2	Olympus, Hamburg
Invers-Mikroskop Diaphot 200	Nikon GmbH, Düsseldorf
Invers-Mikroskop	Leica, Bensheim
Kryostat CM1900	Leica, Bensheim
<i>Micropipette-Puller</i>	Sutter Instruments Co, Novato, CA, USA
Mikromanipulator	Leica, Bensheim
Mini Protean II Elektrophoresekammer	BioRad, München
Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, München
Monitor VM920E	Hitachi, Japan
Netzgerät, Power Pack P25	Biometra, Göttingen
<i>Phospho-Imager Storm 860</i>	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
<i>Photoprinter, XLS 8600PS</i>	Kodak, Rochester, USA
<i>Sonifier</i>	Branson, Danbury, USA
Sonorex RK 510S	Bandelin, Berlin
Spektralfluorometer flx	SAFAS, Monaco
Spektralphotometer Helios γ	Spectronic Unicam, England
Stereomikroskop SZ 40	Olympus, Hamburg
Sterilbank Microflow	Nunc, Wiesbaden
Thermodrucker P67E	Mitsubishi, Japan
<i>Thermocycler Techne Genius</i>	thermo-Dux, Wertheim
<i>Thermocycler DNA engine PTC-200</i>	MJ Reseaerch, Watertown, Mass., USA
<i>Thermocycler RoboCycler Gradient 96</i>	Stratagene, Heidelberg
Transilluminator (312 nm)	Renner, Dannstadt
Ultra Thurrax T8	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
Ultra Thurrax T25	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
<i>UV-Stratalinker 2400</i>	Stratagene, Heidelberg
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus, Hanau
	Sorvall Du Pont, Bad Homburg

2.1.11 Sonstige Materialien

cDNA Synthese Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>DNA Ligation Kit</i>	TaKaRa Biomedicals, Japan
DNA Marker	
λ -DNA Mix Marker (48,5-8,2 kb)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
λ -DNA Eco 47III / Bst EII (21-0.7 kb)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
λ -DNA Eco RI / Hind III (21,2-0.5 kb)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
λ -DNA Sty I (19,3-0.4 kb)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Φ X174 DNA Hae III (1353-118 bp)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Eindeckmedium (Aqua Poly / Mount)	Polysciences Inc, Warrington, USA
Einfriermedium Jung	Leica, Bensheim
Entellan	Merck, Darmstadt
<i>GeneClean Spin Kit</i>	bio101, CA, USA
Haltekapillaren	Leica, Bensheim
<i>Human Placenta Lambda Genomic Library</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Hybond N- und N+-Membran	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore, USA
Injektionskapillaren	World Precision Instruments, Fa. Fein, Berlin
Kunststoffware	Eppendorf, Hamburg
	Nunc, Wiesbaden
	Greiner, Frickenhausen
	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
M2 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
M16 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nick Columns Sephadex G50	Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Nucleospin-Extract-Kit</i>	Macherey & Nagel, Düren
Plasmid Midi- und Maxipräparationskits	Qiagen, Hilden
Plasmid Minipräparationskit	Macherey-Nagel, Düren
Polyvinyliden-difluorid-Membran (PVDF)	Gelman Sciences, Ann Arbor, MI USA
Protein Molekulargewichtsmarker	AP Biotech, Freiburg
Röntgenfilm Kodak BioMax MR-1	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Tranfektionsreagenz <i>CLONfectin</i>	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Tranfektionsreagenz <i>FuGENE 6</i>	Roche, Mannheim
Transfer-Kapillaren	Promochem, Wesel

2.1.12 Benutzte Puffer und Medien

LB-Medium:	10 g/l NaCl 10 g/l Casein 5 g/l Hefeextrakt auf pH 7,5 einstellen
LB-Agar:	LB-Medium plus 15 g/l Agar
DNA-Auftragspuffer:	60 % Glycerol (v/v) 100 mM EDTA 100 mM Tris-HCl pH 7,5 0,1 % Bromphenolblau (w/v)
DNA/RNA-Hybridisierungspuffer: (Church und Gilbert, 1984)	500 mM NaP _i pH 7,2 7 % SDS 1 % BSA 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
50 × TAE Elektrophorese-Puffer:	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA auf pH 8,0 einstellen
2 × RNA-Probenpuffer:	56 % Formamid (v/v), deionisiert 12 % 10 x MOPS-Puffer (v/v) 16 % Formaldehyd (v/v) 8 % dH ₂ O (v/v) 8 % Glycerin (v/v) 0,01 % Bromphenolblau (w/v) 1 % Ethidiumbromid (v/v)
10 × MOPS-Puffer:	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren

20 × SSC:		3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat auf pH 7,0 einstellen
2 × SDS Gel-Ladepuffer:		100 mM Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM β-Mercaptoethanol 4 % SDS (Elektrophoresegrad) 0,02 % Bromphenolblau (w/v) 20 % Glycerol (v/v)
Transferpuffer (Western-Blot):		39 mM Glycin 48 mM Tris-Base 0,037 % SDS (Elektrophoresegrad) 20 % Methanol
Blocklösung (Western-Blot):		5 % Milchpulver gelöst in 1 × PBS
10 × PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>):		1,5 M NaCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,2 mit NaOH einstellen
Chemilumineszenz-Substrat:	20 ml 100 µl 100 µl 6,2 µl	100 mM Tris/HCl pH 8,5 250 mM 3-Aminophthalhydrazid in DMSO 40 mM p-Cumarsäure in DMSO 30 % H ₂ O ₂
Injektionspuffer:		5 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,02 mM EDTA, pH 8,0
Proteinase K-Puffer:		100 mM Tris-HCl pH 8,4 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1 % SDS
<i>Sonification buffer</i> (Haupts et al., 1998):		10 mM Zitronensäure 100 mM K ₂ HPO ₄ auf pH 8,5 mit KOH einstellen

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmid-DNA Präparation

2.2.1.1 Plasmid Minipräparation

Kleine Mengen Plasmid-DNA wurde aus entsprechenden *E. coli*- Kulturen mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie gewonnen. Bakterien einer 2 ml Übernachtskultur wurden pelletiert und mit dem „*Nucleospin Plasmid Kit*“ von Macherey & Nagel (Düren) aufgearbeitet.

2.2.1.2 Plasmid Midi- und Maxipräparationen

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden aus Bakterienkulturen mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie gewonnen. Die Präparation erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers für diese Säulen (Qiagen, Hilden).

2.2.1.3 Endotoxinfreie Plasmid Maxipräparation

Für Zelltransfektionsexperimente und die Präparation von DNA (>20 kb) für die Pronukleusinjektion wurde das *Endofree Plasmid Maxi-Kit* von Qiagen verwendet.

2.2.1.4 Endotoxinfreie Maxipräparation sehr großer Plasmide

Herkömmliche Präparationen sehr großer Plasmid DNAs weisen starke Verunreinigungen mit gescherter und genomischer DNA auf, deshalb wurden Plasmide größer 20 kb mit dem *Large Construct Kit* von Qiagen präpariert. Zusätzlich wurden mit dem *endotoxin removal buffer* aus dem *Endofree Plasmid Kit* die Endotoxine entfernt.

2.2.2 DNA-Restriktion und Gelelektrophorese

Die Restriktion von DNA wurde mit Hilfe von 5-10 U Endonukleasen pro µg DNA im entsprechenden Restriktionspuffer für 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur durchgeführt.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8 bis 2%igen horizontalen Agarosegelen, die mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Vor der Elektrophorese wurde die aufzutrennende DNA mit 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x TAE.

Als Molekulargewichtsmarker wurden verschieden restringierte λ -DNAs bzw. Φ X174 DNA benutzt.

Die Dokumentation erfolgte auf einem UV-Transilluminator mittels digitaler Kamera und Thermodrucker.

2.2.3 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Der jeweilige Vektor (2-10 μ g) und das entsprechende DNA-Fragment wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die DNA-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (1% Agarose) und die Banden von Interesse mit einem Skalpell ausgeschnitten. Aus den Agarosestücken wurde die DNA mit dem „Nucleospin-Extract-Kit“ nach Angaben des Herstellers wiedergewonnen. Für die Ligationsreaktion von Vektor- und Insert-DNA wurden 400 U T4-DNA-Ligase benutzt (Sambrook et al., 1989). Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach der im Labor etablierten Methode (Hanahan, 1983).

2.2.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Für die Markierung von DNA-Fragmenten nach der „random primed oligo labeling“-Methode wurde das Markierungssystem *Prime-IT-II-Kit* verwendet. Für die radioaktive Markierung wurden 50 μ Ci α -³²P-dATP oder α -³²P-dCTP eingesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Gelfiltrationssäule (Nick Columns Sephadex G50) abgetrennt. Die markierte Probe wurde mit 50 μ l TE-Puffer versetzt, auf die Säule aufgetragen und nach Einlaufen mit weiteren 400 μ l TE-Puffer versetzt. Das Säulentotvolumen wurde verworfen, und die radioaktiv markierte Sonde mit 500 μ l TE-Puffer eluiert. Das Eluat wurde thermisch denaturiert und zur Hybridisierung eingesetzt.

2.2.5 DNA Isolierung aus Geweben

Für die Isolierung genomischer DNA wurden Schwanz- oder Ohrbiopsien von Mäusen mit Proteinase K über Nacht bei 55°C verdaut. Die Proteinase K Stocklösung. (20 mg/ml in Proteinase K-Puffer) wurde dazu 1:40 mit Proteinase K Puffer verdünnt. 25 μ l dieser Lösung wurden für eine Ohrbiopsie, 50 μ l für eine Schwanzbiopsie eingesetzt. Für eine PCR wurde etwa 0,2 bis 0,5 % der verdauten Biopsie verwendet. Für Southern-Blot Analysen wurde die DNA aus Schwanzbiopsien 2 x mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, mit 2-Propanol gefällt und anschließend mit 70% EtOH gewaschen.

2.2.6 Southern-Blot Analyse

Nach erfolgreichem Verdau der genomischen DNA mit einem entsprechendem Restriktionsenzym wurde die fragmentierte DNA auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt (Southern, 1979).

Transfer der DNA auf eine Membran

Die DNA-Fragmente wurden mit der Methode des Kapillartransfers (Sambrook et al., 1989) unidirektional auf Nylonmembran (Hybond N oder N+) übertragen. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran für 2 Stunden bei 55°C getrocknet und anschließend durch UV-Strahlung mit 3 kJ/m² fixiert.

Hybridisierung filtergebundener DNA

Die Filter wurden mindestens eine Stunde in Hybridisierungspuffer (Church und Gilbert, 1984) bei 65°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert, um freie Flächen auf der Membran abzusättigen. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungspuffer unter Zusatz der denaturierten radioaktiven Probe bei 65°C über Nacht. Das 'Waschen' erfolgte 2 bis 3 mal bei niedrigen Salzkonzentrationen (0,1 x SSC, 0,1% SDS). Der Filter konnte dann in eine Folie eingeschweißt und mit einer Verstärkerfolie für eine ausreichende Zeit autographiert werden.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR (Saiki et al., 1985) mit genomischer DNA wurden die 25 µl der Proteinase K verdauten Ohrbiopsie (2.2.4.1) 1:20 verdünnt. 2µl der Verdünnung wurden in Polymerase-Puffer mit 0,66 bis 1 pM Primern, 200 µM dNTPs und 1U Taq-Polymerase amplifiziert.

Für die Amplifikation von Plasmidfragmenten wurde 1-5 ng DNA verwendet.

Für die Generierung von Northern-Blot Sonden wurde ca. 200 ng aus Gesamt-RNA generierter cDNA als *Template* eingesetzt.

Proteinase K wurde durch 5 minütige Denaturierung (95°C) inaktiviert. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2.2.7.1 Bestimmung der Transgenität

Entsprechend der Linie wurden die Primerkombinationen E (Linien Tg-C1-TGF- β), F (Linien C1-dn RII) und G (Linien Tg-C3-EGFP, Tg-C4-EGFP) verwendet.

Aufgrund nahezu identischer T_m-Werte aller verwendeten Primer und PCR-Produktgrößen von 600-750 bp, konnten für alle Linien identische PCR-Bedingungen gewählt werden.

Je 35 Zyklen:	Denaturierung:	35 s bei 94°C
	„annealing“:	35 s bei 57°C
	Polymerisation:	40 s bei 72°C

2.2.7.2 Herstellung von Northern-Blot Sonden

Hierbei diente cDNA aus Leber oder Darm von wt Mäusen als Template für die PCR. Beispielsweise wurden bei der Herstellung der GAPDH Northern-Blot Sonde, folgende Bedingungen für 35 Zyklen gewählt:

Denaturierung:	30 s bei 95°C
„annealing“:	30 s bei 51°
Polymerisation:	30 s bei 72°C

2.2.8 RNA Isolierung aus Geweben

Alle zur Isolierung verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch mit 0,1% DEPC versetzt und anschließend autoklaviert. Porzellan- und Metall-Geräte wurden bei 180°C für 4 Stunden hitzesterilisiert.

Die Präparation von Gesamt-RNA aus verschiedenen Maus-Geweben oder Kulturzellen erfolgte mittels Tri-Reagent. Hierzu wurden 100 mg unter flüssigem Stickstoff pulverisiertes Gewebe oder das Zellpellet in 1 ml Tri-Reagent suspendiert, und mit 200 μ l Chloroform versetzt. Nach Durchmischung der Probe wurde diese bei 12000 g (15°C) für 10 min zentrifugiert und die Gesamt-RNA des wäßrigen Überstandes mittels Isopropanol gefällt. Die Nukleinsäure kann durch Zentrifugation bei 15000 g (4°C) für mind. 15 min pelletiert werden. Mit 70%igem EtOH wurde die RNA gewaschen, anschließend getrocknet und kurz bei 65°C in entsprechender Menge DEPC-Wasser gelöst.

2.2.9 Northern-Blot Analyse

Für Northern-Blot Hybridisierungen (Goldberg und Timberlake, 1980) wurden zwischen 20 und 25 µg Gesamt-RNA in einem 1%igen Agarosegel mit 6,2% Formaldehyd aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde $1 \times$ MOPS verwendet, welcher sich ebenfalls im $2 \times$ RNA-Probenpuffer befand. Nach erfolgter Elektrophorese und Dokumentation wurde das Gel 3×10 min in Wasser gewaschen und für 20 min in $10 \times$ SSC inkubiert. Die Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+) erfolgte mittels einer Transferbrücke durch Kapillartransfer über Nacht mit $10 \times$ SSC (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde durch einstündige Inkubation bei 55°C und zweifache UV-Bestrahlung in einem *UV-Crosslinker* (3 kJ/m^2) auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung mit radioaktiv-markierter DNA und die Detektion der Signale wurde wie beim Southern-Blot beschrieben durchgeführt.

2.2.10 Screening einer genomischen λ -Phagenbank

Zur Verlängerung des K20 Promotors in 5'-Richtung wurden verschiedene λ -Klone aus einer „*Lambda FIX II Library*“ (Stratagene, Heidelberg) isoliert. Diese humane genomische Lambda-Phagenbank wurde aus der Placenta eines weiblichen Fötus erstellt.

Als Wirtsbakterien für die Phagen dienten die E. coli Stämme XL-1 Blue MRA und XL-1 Blue MRA(P2).

Die Identifizierung der entsprechenden λ -Klone erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Als Sonde wurde das 1,7 kb lange Xho I Fragment vom 5' Ende des K20 (λ -Klon CK20-IT19, Accession Number X73501) verwendet. Die Herstellung größerer Mengen λ -DNA für Restriktionsanalysen und Subklonierungen wurde nach dem Protokoll von Helms durchgeführt (Helms et al., 1987). Die Inserts der sechs längsten λ -Klone (15-19 kb) wurden in pSL1190 subkloniert.

2.2.11 Western-Blot Analyse

Die humanen Colon Adenokarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 wurden wie murine Gewebe mittels Western Blot auf K20 Expression überprüft. Als Kontrolle diente die Cervixkarzinom Zelllinie HeLa.

Die Zellen wurden zwei mal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend auf Eis mit einem Schaber von den Zellkulturplatten abgelöst, bei 1500 U/min pelletiert und mit $2 \times$ Laemmli Puffer aufgekocht. Mausegewebe wurden unter Stickstoff gemörsert und in $2 \times$ Laemmli Puffer aufgekocht.

Die Proteinkonzentrationen wurden mittels „*Bio Rad Proteinassays*“ festgestellt. Die Auftrennung der Proteine wurde mit einer 10%igen SDS-PAGE durchgeführt, der Transfer

auf PVDF Membran geschah mittels Elektrobloetter. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden durch 1 h Inkubation bei RT in 5% Magermilchpulver/PBS geblockt. Der Primärantikörper Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 20 (Dako, Hamburg) wurde in der Verdünnung 1:1000 2-4 h bei RT in Blocklösung inkubiert. Überschüssiger Ak wurde durch 4× 5 min Waschen mit PBS entfernt. Der Sekundärantikörper Schaf anti-Maus IgG Fab POD (Roche, Mannheim) wurde in der Verdünnung 1:2000 in Blocklösung 1 h bei RT inkubiert. Vor der Signaldetektion wurde überschüssiger Ak durch 3× Waschen mit PBS entfernt. Die Signaldetektion erfolgte mit Chemilumineszenz-Substrat in der Dunkelkammer und Kodak Bio Max Film.

2.2.12 Kultivierung humaner Zelllinien

Für die Transfektionsexperimente der verschiedenen K20 Konstrukte wurden die Zelllinien DLD-1, HeLa und HT-29 kultiviert. Die Kulturbedingungen 37°C, 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre waren für alle Zelllinien bis auf die unten aufgeführten Kulturmedien identisch.

DLD-1 Kulturmedium:

	Endkonzentration
450 ml RPMI 1640 Medium mit Glutamax	
50 ml FBS	10 %
2 ml Glukose (1,25 g/ml)	4,5 g/l
5 ml HEPES (pH 7,2)	10 mM
500 µl Gentamicin (10 mg/ml)	100 µg/ml

HeLa Kulturmedium:

450 ml RPMI 1640 Medium mit Glutamax	
50 ml FBS	10 %
500 µl Gentamicin (10 mg/ml)	100 µg/ml

HT-29 Kulturmedium:

450 ml Mc Coy's 5A Medium mit Glutamax	
50 ml FBS	10 %
500 µl Gentamicin (10 mg/ml)	100 µg/ml

Aliquots der Zellen wurden in Kulturmedium + 20 % FBS und + 10 % DMSO bei -70°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.13 Transfektion humaner Zelllinien

Für stabile Transfektionen von HeLa Zellen wurden am Vortag 8×10^5 , von HT-29 6×10^6 Zellen auf einer 94 mm Zellkulturschale ausplattiert. Zur Transfektion der Zellen wurde das Reagenz *FuGENE 6* (Roche, Mannheim) bzw. *Clonfectin* (Clontech, Palo Alto, CA, USA) eingesetzt. Die Plasmid-DNAs wurden endotoxinfrei präpariert um höhere Transfektionseffizienzen zu erreichen. Je Konstrukt wurden zwei Transfektionen durchgeführt, hierzu wurden unabhängige DNA Präparationen verwendet. Das molare Verhältnis Vektor DNA zu Resistenzplasmid betrug 5:1. Das Verhältnis Transfektionsreagenz zu DNA betrug 3,5:1 bei *FuGENE 6*, bei *Clonfectin* 1,5:1. Die Transfektionen wurden nach dem Schema in Tab. 2.1 und der Anleitung des Herstellers des Transfektionsreagenz durchgeführt.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf zwei 145 mm Kulturschalen verteilt und die klonale Selektion begonnen. Selektiert wurde mit 0,5 mg *Geneticin* (G418) / ml Medium über einen Zeitraum von ~20 Tagen. Alle zwei Tage wurde das Selektionsmedium gewechselt, um abgetötete Zellen zu entfernen.

Nach der Selektion konnten stabile Klone von der Platte gepickt und expandiert werden.

Konstrukt Bezeichnung	Konstrukt Größe (kb)	DNA Menge (μ g)	Resistenzplasmid 6,8 kb (μ g)	FuGENE 6 (μ l)
C0-EGFP	8,5	5	0,8	18
C2-EGFP	13,2	7,8	0,8	28
C1-EGFP	20,4	12	0,8	42
F1-C2-EGFP	16,3	9,6	0,8	34
F2-C2-EGFP	17	10	0,8	35
F3-C2-EGFP	16,5	10	0,8	35
F4-C2-EGFP	16,7	10	0,8	35
F5-C2-EGFP	16,4	10	0,8	35
C4-EGFP	29,1	17,1	0,8	60
C3-EGFP	37,1	21,8	0,8	80

Tab. 2.1: Transfektionsschema für stabile Transfektionen

Nach dem gezeigten Transfektionsschema wurden HT-29 und HeLa Zellen stabil transfiziert. Berücksichtigt sind die molaren Verhältnisse Vektor-DNA zu Resistenzplasmid von 5:1 und Transfektionsreagenz zu DNA von 3,5:1.

2.2.14 Fluoreszenzmessung

Die Stärke der EGFP Expression transfizierter Zellen wurde mittels Spektral-Fluorometer bestimmt.

Die Zellen wurden mit Accutase von den Kulturplatten gelöst, bei 800 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde 5 min mit AccuMax/PBS behandelt, um eine klumpenfreie Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zellen wurden gezählt, bei 1800 U/min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bis zur Fluoreszenzmessung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Messung wurden je 2×10^7 Zellen 400 μl *sonification buffer* zugesetzt und 20 Pulse (0,5 s/Puls) eisgekühlt mit Ultraschall lysiert. Abschließend wurden die Zelltrümmer bei 14000 U/min 20 min abzentrifugiert und der klare Überstand für die Messung im Fluorometer eingesetzt.

Das EGFP Absorptionsmaximum liegt bei 488nm, deshalb wurde die Anregungswellenlänge mit $488 \pm 3\text{nm}$ festgelegt. Das Emissionsmaximum rekombinanten EGFPs liegt bei 507 nm. Die Emissionsmessung von 500 bis $525 \pm 1\text{nm}$ zeigte, daß in HT-29 Zellen exprimiertes EGFP das Maximum bei 511,5 nm hat. Für Berechnung der relativen Fluoreszenz wurden die Messwerte bei 511,5 nm herangezogen.

2.2.15 Generierung transgener Mäuse

2.2.15.1 Präparation der Expressionsvektoren zur Oocyten-Injektion

Für alle Lösungen wurde doppeldestilliertes Wasser (*aqua ad injectabilia*) sowie endotoxinfreie Einweg-Kunststoff-Materialien verwendet. Die aus dem Plasmid restringierte Expressionskassette wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und die DNA mittels *GeneClean* Gelextraktionskit isoliert und mit Injektionspuffer eluiert. Die DNA-Konzentration wurde auf einem Agarosegel mittels Vergleichsbanden abgeschätzt und auf etwa 25 bis 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ eingestellt. DNA-Aliquots wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Injektion wurde die DNA in Injektionspuffer oder Wasser auf 0,5 bis 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ verdünnt und 5 min bei 15.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die oberen zwei Drittel der DNA Lösung in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und zur Mikroinjektion eingesetzt.

2.2.15.2 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde im wesentlichen, wie von Hogan *et al.* beschrieben, durchgeführt (Hogan *et al.*, 1986). Es wurden befruchtete Eizellen von FVB/N-Weibchen verwendet (Taketo *et al.*, 1991), bei denen eine Superovulation induziert wurde, um die Anzahl von

injizierbaren Eizellen zu erhöhen. Dafür wurden FVB/N-Weibchen im Alter von 4 bis 6 Wochen 3 Tage vor Eizellentnahme mit 7,5 U *Pregnant Mare Serum* (PMS) *i.p.* injiziert. PMS übernimmt die Funktion des follikelstimulierenden Hormons (FSH). 47 Stunden danach wurden 7,5 U humanes Chorion Gonadotropin (hCG) *i.p.* injiziert, welches das luteinisierende Hormon (LH) ersetzt. Die Weibchen wurden am gleichen Tag mit fertilen Männchen (FVB/N) verpaart. Am nächsten Tag konnten die Eizellen entnommen und durch Behandlung mit Hyaluronidase (10 mg/ml) von den Kumuluszellen befreit werden. Außerhalb des Brutschranks werden Eizellen in M2-Medium und innerhalb des Brutschranks (37°C, 5% CO₂) in M16-Medium gelagert. Nach Mikroinjektion der Vektor-DNA in den männlichen Pronukleus der befruchteten Eizellen wurden diese in das linke Ovidukt von scheinträchtigen Leihmüttern (C57BL/6xC3H-F1-Weibchen) transferiert. Die Reproduktionsorgane der Leihmütter wurden am Tag vor der Mikroinjektion durch Verpaarung mit Männchen (C57/Bl6), die durch Vasektomie sterilisiert wurden, auf die transferierten Eizellen vorbereitet.

2.2.15.3 Zucht und Selektion transgener Tiere

Die Zucht transgener Tiere wurde generell nur heterozygot fortgeführt, das heißt transgene Tiere wurden immer mit Wildtyptieren verpaart. Für alle Experimente wurden nur heterozygote Tiere mit nichttransgenen Geschwistern als Kontrollen verwendet. Die Nachkommen wurden routinemäßig mittels Southern-Blot oder PCR überprüft und der Genotyp des einzelnen Tieres bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Genomische Organisation des Gens für K20

Das humane Gen für Keratin 20 wird auf Chromosom 17q12 von den Genen für Keratin 23 und Keratin 12 flankiert. Der λ -Klon CK20-IT19 trägt ein 18 kb langes genomisches Fragment, codierend für das humane K20 (Moll et al, 1993). Der Klon gliedert sich in einen 9,3 kb Exon/Intron Bereich mit einer 4,8 kb langen 5' *upstream* Sequenz und einem 3,9 kb 3' *downstream* Bereich (Abb. 3.1). Kloniert wurde der λ -Klon in das Plasmid pBR322-polylinker/Bluescript, ein 2 kb großes Nde I/Aat II Fragment aus pBR322, das nur ori und Ampicillinresistenz enthält, kombiniert mit dem Polylinker aus pBluescript (Blessing et al., 1993). Wurde das genomische Fragment direkt in andere Plasmide wie pBluescript kloniert, kam es zu häufigen Rekombinationsereignissen, so daß die präparierte DNA nicht zu verwenden war. Die Ausbeute an Plasmid-DNA mit dem verwendeten Vektor ist zwar geringer, stellte aber den besten Kompromiß bezüglich der DNA Qualität dar.

Da der 5' *upstream* Bereich von CK20-IT19 lediglich 4,8 kb umfasst, wurde eine genomische λ -Phagenbank nach entsprechenden Klonen durchsucht. Die verwendete kommerzielle Phagenbank wurde mittels DNA isoliert aus männlicher humaner Plazenta generiert. Als Sonde wurde das 1,7 kb lange Xho I Fragment (Positionen -4810 bis -3112; Abb. 3.2) vom 5' Ende des K20 (CK20-IT19) verwendet. Isoliert wurden 10 λ -Klone mit unterschiedlich großen Inserts zwischen 15 kb und 20 kb. Der in der GenBank veröffentlichte PAC Klon AC004231 ist 137 kb lang und enthält auch die K20 Sequenz inklusive der *up*- und *downstream* Bereiche. Ca. 80 kb der 5' Sequenz des K20 waren somit bekannt und konnten zur Auswahl spezifischer Primerkombinationen genutzt werden. Die Primerpaare wurden so gewählt (siehe 2.1.9 Primerkombinationen A), daß die ungefähre Länge der isolierten λ -Klone in 5'-Richtung bestimmt werden konnte. Es wurde eine -12,8 kb spezifische und eine -17,8 kb spezifische Primerkombination verwendet (Abb. 3.1). Sechs der zehn λ -Klone zeigten zwei PCR-Signale, waren also in 5' Richtung länger als 13 kb. Die Inserts dieser sechs λ -Klone wurden in pSL1190 subkloniert und von beiden Vektorenden ansequenziert. Der Sequenzvergleich mit dem PAC Klon AC004231 gab Aufschluß über die genaue Lage und Länge der Inserts.

Der Klon λ 6k (18,4 kb) war für die Klonierung der 5' Sequenzen des K20 optimal, da eine 1,7 kb Überschneidung zu CK20-IT19 vorlag (Sondenbindungsbereich Position -4810 bis -3112) und so die vorhandene Xho I Restriktionsschnittstelle (Position -3112) für die

Klonierung verwendet werden konnte. Abzüglich der Sequenzüberschneidung wurden 16,7 kb als neue 5' *upstream* Sequenz für K20 hinzugewonnen. Nach der Klonierung betrug die zur Verfügung stehende 5' *upstream* Sequenz 21,5 kb (Abb. 3.1).

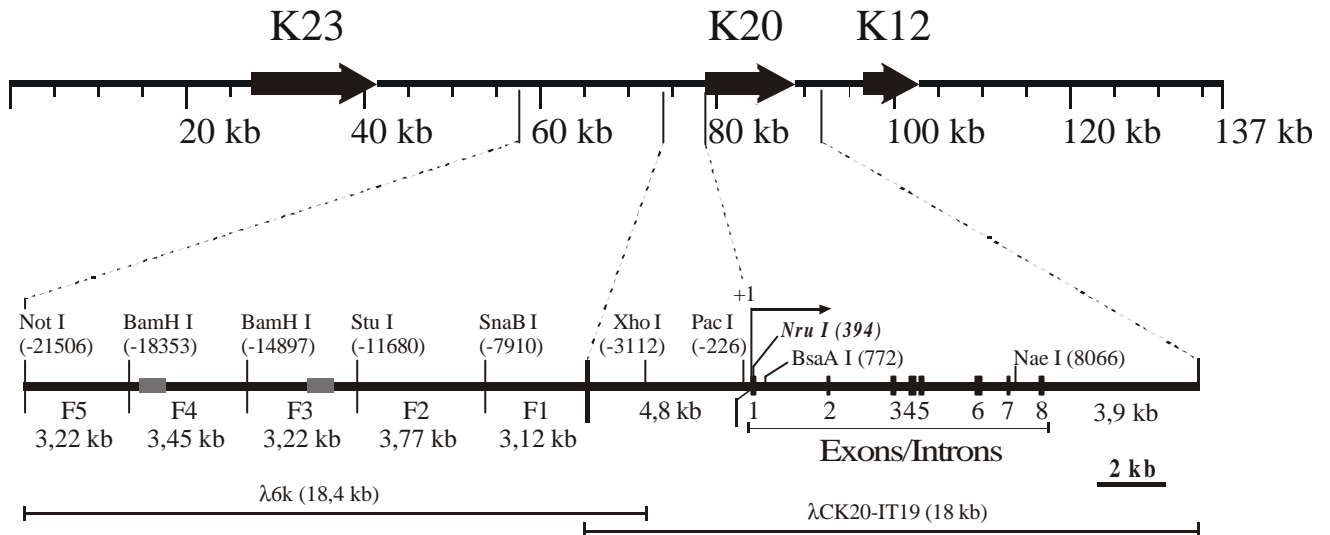


Abb. 3.1: Genomische Organisation des Gens für Keratin 20

Dargestellt ist der 137 kb lange PAC Klon AC004231, der ein Fragment des humanen Chromosoms 17q12 trägt. Die Sequenz enthält die Keratingene K23, K20 und K12, welche in gleicher Orientierung auf den Chromosom lokalisiert sind. Die Gene sind als Pfeile dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die K20 Genstruktur. λ-Klon CK20-IT19 gliedert sich in eine 4,8 kb 5' Sequenz, 8 Exons verteilt über 9,3 kb und einen 3,9 kb 3' Bereich. λ-Klon 6k enthält weitere 5' *upstream* Sequenzen, die zur Charakterisierung mit den angegebenen Restriktionsenzymen in die Fragmente F1-F5 unterteilt wurden. Die Balken markieren die Grenzen der verwendeten λ-Klone 6k und CK20-IT19. Die grauen Balken in den Fragmenten F4 und F5 entsprechen den PCR Produkten, welche mit den Primerpaaren -12,8 kb bzw. -17,8 kb (siehe 2.1.9 Primerkombinationen A) erhalten wurden. Mit den beiden Primerkombinationen wurde die Länge isolierter λ-Klone abgeschätzt.

3.2 K20 Konstrukte

Die K20 Expressionsvektoren sollen zur Charakterisierung der regulatorischen Elemente des Gens und zur Generierung von transgenen Mäusen genutzt werden. Da K20 in der Darmmucosa stark exprimiert wird, könnte ein K20 Expressionsvektor für eine gewebespezifische Expression von Transgenen in den Enterocyten genutzt werden.

Vor der Verwendung als Expressionskassette mußte der K20 Vektor noch modifiziert werden. Die ersten 347 bp des Exon 1 wurden inklusive aller ATG Startcodons deletiert. Hierfür wurde mit spezifischen Primern (siehe 2.1.9 Primerkombination B) und CK20-IT19 als Template ein PCR Produkt amplifiziert, welches den Bereich von Position -226 (Pac I) bis Position 56 im Exon 1 einschloß. Der 5' Primer (P1) bindet vor der Pac I Erkennungssequenz

an die K20 DNA (Abb. 3.2). Die Sequenz des 3' Primers (P2) enthielt zwei Basenaustausche gegenüber dem Template, so daß eine Nru I Schnittstelle am Ende des PCR Produkts entstand. In der P2 Primersequenz 3'-GAGGGAGGACCTT *AGCGCT* TACC-5' sind die ausgetauschten Basen unterstrichen und die Nru I Erkennungssequenz kursiv dargestellt. Das PCR-Fragment wurde Pac I/Nru I geschnitten und in die Pac I/Nru I (Positionen -226 und 394; Abb. 3.2) geschnittene pBR/CK20-IT19 DNA ligiert. Der Bereich vom ursprünglichen Translationsstart bis zur Nru I Schnittstelle an Ende des Exon 1 wurden dadurch deletiert. Erhalten blieben vom Exon 1 des K20 nur die wiederhergestellte Nru I Restriktionschnittstelle zur Insertion von cDNAs an Position 48 und die restlichen 56 bp bis zum ersten Intron.

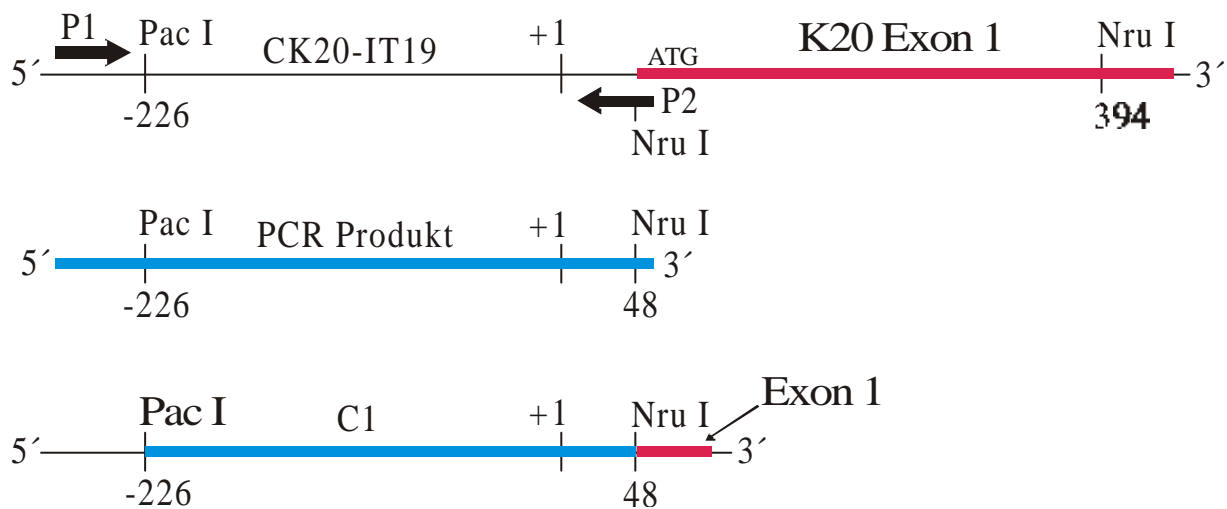


Abb. 3.2: Modifizierung des Exon 1

Mit den spezifischen Primern P1 und P2 (siehe 2.1.9 Primerkombination B) wurde mit CK20-IT19 als Template ein PCR Fragment amplifiziert, welches den Bereich von Position -226 bis 48 einschloß. P2 enthielt zwei Basenaustausche gegenüber dem Template, so daß am 3' Ende des PCR Produkts eine Nru I Schnittstelle entstand. Der Vektor pBR/CK20-IT19 und das PCR Fragment wurden Pac I und Nru I restringiert und ligiert. Hierdurch wurden die ersten 347 bp des Exon 1 im Konstrukt C1 deletiert. Die wiederhergestellte Nru I Schnittstelle diente der Klonierung von cDNAs.

Nach der Modifizierung des Exon 1 wurde der K20 Expressionsvektor als C1 bezeichnet (Abb. 3.3). Diese Arbeiten wurden noch von Prof. Dr. Manfred Blessing vor dem Beginn meiner Arbeit durchgeführt. Der C1 Vektor diente als Basis für die Generierung aller weiteren K20 Expressionsvektoren.

Die Restriktion von C1 mit BsaA I und Nae I (Positionen 426 und 7720; Abb. 3.3) und die anschließende Religation führten zur Deletion der Exons 2 bis 7 in einem 7,3 kb großen

Fragment. Dieses Konstrukt wurde als C2 bezeichnet, es enthält das entstandene Hybrid-Intron 1/7 (Abb. 3.3). Das korrekte *splicing* des Vektors wird *in vitro* bei Punkt 3.6 untersucht.

Die Vektoren C1 und C2 wurden am 5' Ende mit Hilfe des isolierten Klons λ 6k verlängert. Hierfür wurde das 16,7 kb lange Age I/Xho I Fragment (Positionen -21570 und -3112) des Klons λ 6k am 5' Ende der Age I/Xho I verdauten Konstrukte C1 bzw. C2 eingefügt (Positionen -4832 und -3112). Die erhaltenen Vektoren tragen nun einen 21,5 kb langen 5' *upstream* Bereich und wurden als C3 bzw. C4 bezeichnet (Abb. 3.3). C4 enthält analog zu C2 das Hybrid-Intron 1/7.

Des Weiteren wurden die 16,7 kb der λ 6k Sequenz in fünf etwa gleich große Fragmente von 3,1 kb bis 3,7 kb restringiert. Die Auswahl der Enzyme war abhängig von vorhandenen nutzbaren Schnittstellen. Die einzelnen Fragmente wurden in gleicher 5'-3' Orientierung am 5' Ende des Konstrukts C2 eingefügt. Daraus ergaben sich die Vektoren (F1-F5)-C2 (Abb. 3.3). Die korrekte Orientierung der Fragmente in den Vektoren wurde mit spezifischen Primern überprüft (siehe 2.1.9 Primerkombinationen C).

Der Vektor C0 wurde erzeugt, indem mit Pac I (Position -226) die 5' *upstream* Sequenzen von C1 entfernt wurden. C0 enthält nur 226 bp des K20 Promotorbereichs ohne weitere 5' *upstream* Sequenzen.

Alle Expressionskassetten lassen sich aus dem bakteriellen pBR322 mittels Aat II ausschneiden (Abb. 3.3).

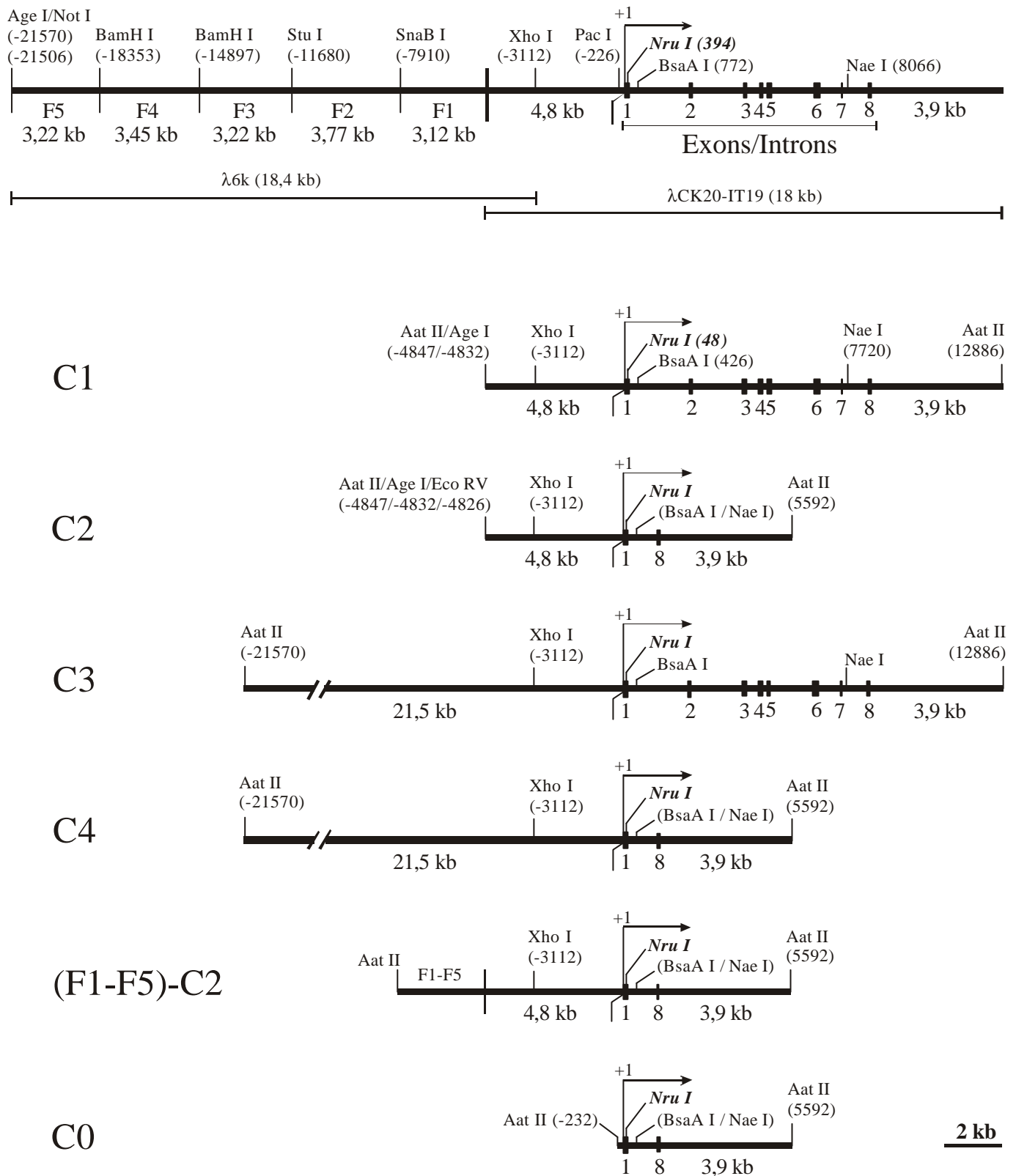


Abb. 3.3: K20 Konstrukte

Die K20 Konstrukte basieren auf den λ -Klonen 6k und CK20-IT19. Die ersten 347 bp von Exon 1 wurden inklusive aller Start-Codons deletiert. Für die Klonierung von cDNAs steht bei Position 48 eine *Nru I* Schnittstelle zur Verfügung. Dieses Konstrukt wurde C1 benannt, davon leiten sich alle anderen Konstrukte ab. Die Deletion der Exons 27 bei C1 mittels BsaA I/Nae I Restriktion führt zu Konstrukt C2. Die Verlängerung des 5' Bereichs von C1 bis -21,5 kb ergibt Konstrukt C3. C4 wurde aus C3 analog wie C2 aus C1 kloniert. Die einzelnen Fragmente F1-F5 wurden in eine Eco RV Schnittstelle vor der 4,8 kb 5' upstream Sequenz von C2 eingefügt. Die resultierenden Vektoren wurden (F1-F5)-C2 genannt. C0 enthält nur 226 bp 5' upstream Sequenz. Mit Aat II lassen sich alle Expressionskassetten aus dem bakteriellen pBR322 ausschneiden.

3.3 K20 Expressionsvektoren

Für die Klonierung der K20 Expressionsvektoren mußten die verwendeten cDNAs *blunt end* geschnitten vorliegen, da die Nru I Schnittstelle in den K20 Konstrukten ebenfalls glatte Enden erzeugt. Für die Ligationen der TGF- β cDNA des Affen (1472 bp) in den C1 Vektor wurde pUC8/TGF- β mit Hinc II verdaut, die Fragmente aufgereinigt und ligiert. Die Vektorbezeichnung lautet C1-TGF- β .

Der humane dominant negative TGF- β Typ II Rezeptor (dn RII) wurde aus pBluescript/dn RII mit Sma I ausgeschnitten (926 bp) und analog zu TGF- β in C1 ligiert. Das Konstrukt wurde als C1-dn RII bezeichnet.

Die cDNA des Reportergens EGFP (*enhanced green fluorescent protein*, 746 bp) wurde mit Sma I aus dem Vektor pEGFP-N1 geschnitten und in die Vektoren C1, C2, C3 und C4 kloniert. Die Vektoren wurden entsprechend ihres Inserts als C1-, C2-, C3- und C4-EGFP bezeichnet. Nach Transformation und Präparation der Vektor DNAs wurde jeweils die richtige Orientierung der Inserts im Expressionsvektor mittels Restriktionen überprüft. Zusätzlich wurde eine PCR mit spezifischen Primern für den K20 Promotor und das klonierte Insert durchgeführt (siehe 2.1.9 Primerkombinationen E, F, G).

Analog zu den vorangegangenen Klonierungen wurden die Vektoren (F1-F5)-C2-EGFP generiert. Hierfür wurden die Fragmente F1-F5 aus λ 6k vor C2-EGFP kloniert und dann als Konstrukte F1-C2-EGFP bis F5-C2-EGFP bezeichnet. Fragment F5 liegt am weitesten 5' *upstream*, das Fragment F1 schließt sich unmittelbar am 5' Ende des λ -Klon CK20-IT19 an (Abb. 3.3). Das Konstrukt F1-C2-EGFP konnte direkt aus Fragment F1 (λ 6k SnaB I/Xho I geschnitten) und C2-EGFP (Eco RV/Xho I geschnitten) kloniert werden. F2-C2-EGFP wurde ebenfalls direkt aus Fragment F2 (λ 6k SnaB I/Stu I geschnitten) und C2-EGFP (EcoR V geschnitten) kloniert. Für die Klonierung der Fragmente F3, F4 und F5 in C2-EGFP mußten diese zuerst in pSL1190 subkloniert werden, um sie *blunt end* ausschneiden zu können. Aus λ 6k wurde Fragment F3 mit BamH I/Stu I, Fragment F4 BamH I und Fragment F5 Not I/BamH I ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen von pSL1190 ligiert. Für die Klonierung vor C2-EGFP wurde Fragment F3 Sma I/SnaB I, Fragment F4 Sma I/EcoR V und Fragment F5 Sma I/Nru I aus pSL1190 *blunt end* ausgeschnitten und in die EcoR V Schnittstelle von Konstrukt C2-EGFP ligiert.

Nach Abschluß der Klonierungsarbeiten wurden alle fünf Konstrukte mittels PCR auf ihre korrekte 5'-3' Fragment-Orientierung untersucht. Verwendet wurden dazu spezifische Primer

für die entsprechenden Fragmente und ein Primer für den 5' Bereich des C2-EGFP Vektors (siehe 2.1.9 Primerkombination C).

3.4 Zelllinien für Transfektionsexperimente

Für die geplanten Transfektionsexperimente mit den K20-EGFP Vektoren wurde eine K20 positive Zelllinie benötigt. Ausgewählt wurden die humanen Colon Adenokarzinom Zelllinien DLD-1 und HT-29, da sie beide mucosalen Ursprungs sind und bereits als K20 positiv publiziert waren. Als Kontrolle diente die humane Zelllinie HeLa, die sich von einem Cervixkarzinom ableitet und keine K20 Expression aufweist.

Die K20 Expression wurde an Zellysaten der drei o.g. Linien mittels Western-Blot überprüft. Verwendet wurde der murine monoklonale Antikörper IT-K₂₀.8 gerichtet gegen humanes K20. Wie erwartet war bei den Kontrollzellen HeLa kein Signal detektierbar, während bei HT-29 nach sehr kurzer Expositionszeit des Films ein starkes Signal die K20 Expression anzeigte. Die DLD-1 Zellen exprimierten auch K20, allerdings wesentlich schwächer als die Linie HT-29 (Abb. 3.4). Die DLD-1 Zellen weisen in der Kultur eine wechselnd starke K20 Expression auf, während die HT-29 Zellen kontinuierlich stark in allen Subpopulationen der Linie K20 exprimieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die HT-29 Zellen als K20 positive Zelllinie für die folgenden Transfektionsexperimente ausgewählt.

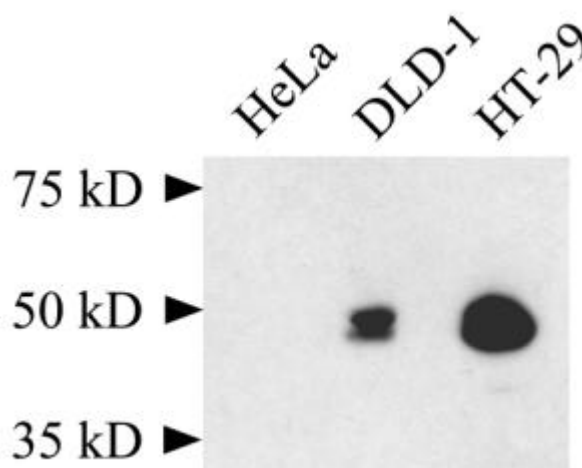


Abb. 3.4: K20 Western-Blot der Zelllinien HeLa, DLD-1 und HT-29

Je Zelllinie wurden 30µg Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mittels murinem anti human K20 Antikörper (IT-K₂₀.8) detektiert. Zwischen HeLa, DLD-1 und HT-29 befindet sich jeweils eine freie Gelspur. Bei den HeLa Zellen ließ sich keine K20 Expression nachweisen. DLD-1 Zellen produzieren wenig, die Zellen der Linie HT-29 viel Keratin 20. Die ermittelte Größe von 48,5 kD des K20 korreliert mit den publizierten Ergebnissen.

3.5 Stabile Transfektion humaner Zelllinien

Die K20-EGFP Konstrukte C1-, C2-, C3- und C4-EGFP wurden parallel für stabile Transfektionen von HT-29 und HeLa Zellen verwendet. Stabile Klone sollten genügend EGFP für die quantitative Fluoreszenzmessung exprimieren. Da die K20 Konstrukte eine Ampicillin- aber keine Neomycin-Resistenz besitzen, wurde mit einem neo-Resistenzplasmid kotransfiziert. Für die einzelnen Transfektionen wurden jeweils äquimolare Mengen Vektor-DNA eingesetzt. Das molare Verhältnis Vektor-DNA zu Resistenzplasmid betrug 5:1, das Verhältnis Transfektionsreagenz zu DNA 3,5:1. Je K20-EGFP Konstrukt wurde mit zwei unabhängigen DNA Präparationen transfiziert, um später eine bessere statistische Auswertung vornehmen zu können.

Nach der Transfektion von jeweils 6×10^6 HT-29 bzw. 8×10^5 HeLa Zellen schloß sich eine etwa 20tägige Selektion mit Genetecin (G418) an. Nach der Selektionsphase wurden stabil transfizierte Klone auf den Kulturschalen sichtbar. Die Gesamtklonzahl je Schale wurde bestimmt und die fluoreszierenden Klone mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert und markiert. Die verwendeten Konstrukte und die erhaltene Klonausbeute der Transfektionen mit HT-29 Zellen ist in Tab. 3.1 dargestellt. Die markierten EGFP exprimierenden Klone jeder Transfektion wurden gepickt und einzeln expandiert.

Die vier K20-EGFP Konstrukte zeigten deutliche Unterschiede in der Stärke der EGFP Expression. Mit C1-EGFP und C2-EGFP transfizierte Zellen zeigten nur schwache bis kaum wahrnehmbare Fluoreszenz. C3-EGFP und C4-EGFP Vektoren erzeugten massive EGFP Expression bei den meisten der fluoreszierenden Klone. Solch ein stark exprimierender Klon ist in Abb. 3.5 dargestellt, die Zellen wurden mit C4-EGFP transfiziert. Das EGFP wird in allen Zellen des Klons homogen exprimiert.

Die geringe Anzahl fluoreszierender Klone bei den Transfektionen mit den Konstrukten C1-EGFP und C2-EGFP ist die Folge extrem schwacher EGFP Expression. Für die Expansion konnten nur Klone ausgewählt werden, die visuell wahrnehmbare Fluoreszenz zeigten und als solche markiert wurden.

Konstrukt	Größe	fluoreszierende Klone	Gesamtklone
C1-EGFP	20,5 kb	14	165
C2-EGFP	13,2 kb	14	140
C3-EGFP	37,2 kb	34	147
C4-EGFP	29,9 kb	45	144

Tab. 3.1: Verwendete Konstrukte für die Transfektion von HT-29 Zellen

Für die stabile Transfektion wurden vier K20-EGFP Konstrukte verwendet. Transfiziert wurde die DNA nach ihrem molaren Verhältnis, so daß für alle Transfektionsansätze nahezu gleiche Kopienzahl verwendet wurde. Das Verhältnis K20-EGFP DNA zu Resistenzplasmid betrug 5:1. Nach ca. 20 Tagen Selektion mit G418 wurden alle Klone gezählt. Anschließend wurden die fluoreszierenden Klone markiert, gepickt und bis zur Fluoreszenzmessung expandiert. Die maximale Abweichung von 10 % der Gesamtklonzahl vom Mittelwert deutet auf gleichmäßige Transfektionsbedingungen der einzelnen Ansätze hin.

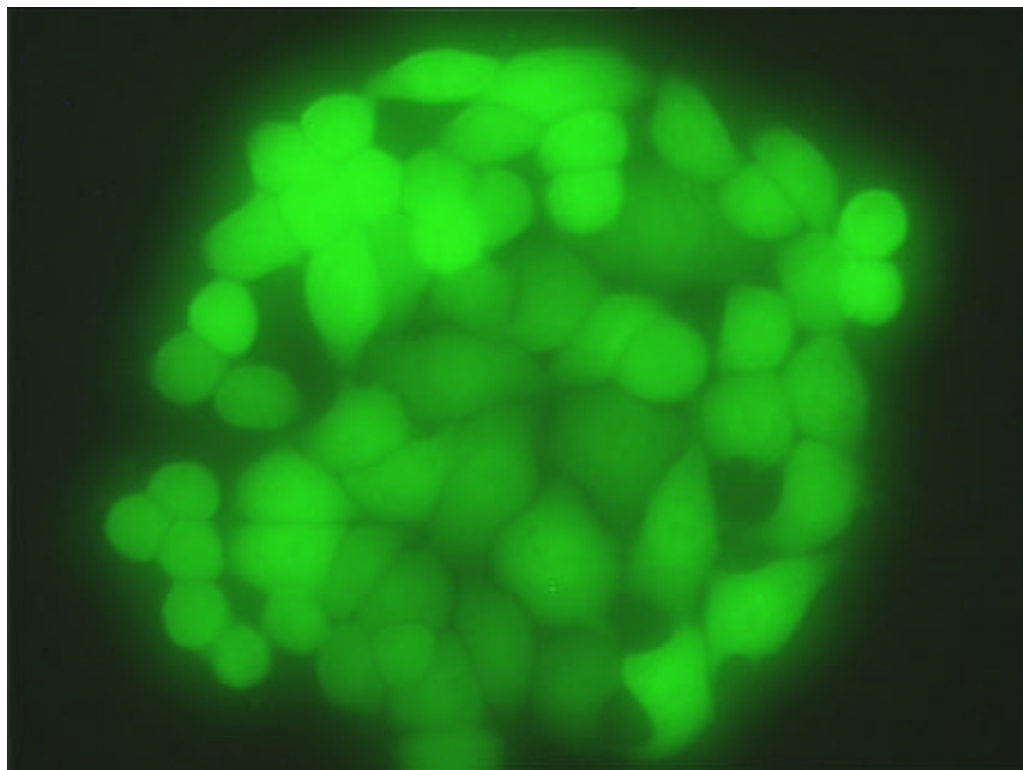


Abb. 3.5: EGFP Expression eines stabil transfizierten HT-29 Klons

Exemplarisch gezeigt ist hier ein EGFP exprimierender HT-29 Zellklon, welcher aus der Transfektion mit Konstrukt C4-EGFP hervorging. Alle Zellen zeigen homogene Fluoreszenz. Nach den Transfektionen mit dem Vektor C4-EGFP konnten die am stärksten fluoreszierenden Zellen beobachtet werden. Klone mit visuell wahrnehmbarer Fluoreszenz wurden von der Kulturplatte gepickt und bis zur Messung einzeln expandiert.

Nach der Expansion der fluoreszierenden Klone (Tab 3.1) auf ca. 2×10^7 Zellen wurde anschließend die genaue Zellzahl bestimmt. Abhängig von der Zellzahl wurde die entsprechende Menge Puffer zugegeben. Die Zellen wurden mit Ultraschall lysiert und das EGFP freigesetzt. Vor der Messung wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und abschließend die EGFP Fluoreszenz des Überstands quantitativ im Spektralfluorometer bestimmt.

Es zeigte sich, daß die Zellen transfiziert mit C1-EGFP und C2-EGFP nur schwache EGFP Expression erreichten, was den visuellen Eindruck bei der Auswahl unter dem Fluoreszenzmikroskop bestätigt. Für beide Konstrukte wurden Expressionsraten kleiner 2 % gemessen (Abb. 3.6). Die maximale Expression wurde mit C4-EGFP erreicht, deshalb wurde dieser Maximalwert als 100% Fluoreszenz definiert. Die gemessene Aktivität des Konstrukts C4-EGFP ist im Vergleich zu Konstrukt C1-EGFP bzw. C2-EGFP ca. $50 \times$ bzw. $80 \times$ stärker. Der Extremfall war bei einem C4-EGFP Klon die 400fache Expressionsstärke im Vergleich zum errechneten Mittelwert aller C2-EGFP Konstrukte. Vergleicht man C3-EGFP mit C1-EGFP bzw. mit C2-EGFP schrumpft der Unterschied auf einen Faktor 7 bzw. 12 zusammen (Abb. 3.6). Obwohl C3-EGFP alle Sequenzbereiche inklusive der nativen Exon/Intronstruktur im Gegensatz zu C4-EGFP enthält, wurden nie so hohe EGFP Fluoreszenzwerte gemessen. Möglicherweise ist die ins Genom integrierte Kopienzahl bei Klonen transfiziert mit C3-EGFP wesentlich niedriger, was mit der Größe des Vektors von 37,2 kb zusammenhängt. Die Effizienz der Transfektion ist abhängig von der Konstruktgröße, je größer das Konstrukt, je weniger fluoreszierende Klone waren auf der Kulturschale nach der Selektion detektierbar. Die Gesamtzahl resistenter Klone der vier Transfektionen blieb annähernd gleich (Tab. 3.1).

Die Signifikanz der vier Gruppen wurde mit dem Programm SigmaStat (Protokoll *One Way ANOVA* Version 2.0) überprüft. Die Werte der Transfektionen mit C1-EGFP und C2-EGFP unterscheiden sich nicht signifikant. Allerdings unterscheiden sich die übrigen Gruppen deutlich. Vergleicht man C1-EGFP mit C3-EGFP oder C4-EGFP bzw. C2-EGFP mit C3-EGFP oder C4-EGFP errechnen sich signifikante Unterschiede von $P < 0,001$. Der in den Vektoren C3-EGFP und C4-EGFP enthaltene längere 5' *upstream* Bereich ist verantwortlich für eine moderate bis starke Expressionssteigerung unter Kontrolle des K20 Promotors.

Die als Kontrolle für das Transfektionsexperiment verwendeten HeLa Zellen wurden parallel mit dem gleichen Mix aus DNA/Transfektionsreagenz transfiziert wie die HT-29 Zellen. Die erhaltenen stabilen Klone zeigten aber mit keinem der vier K20-EGFP Vektoren sichtbare Fluoreszenz. Die Vektoren werden gewebespezifisch nur in K20 positiven HT-29 Zellen exprimiert.

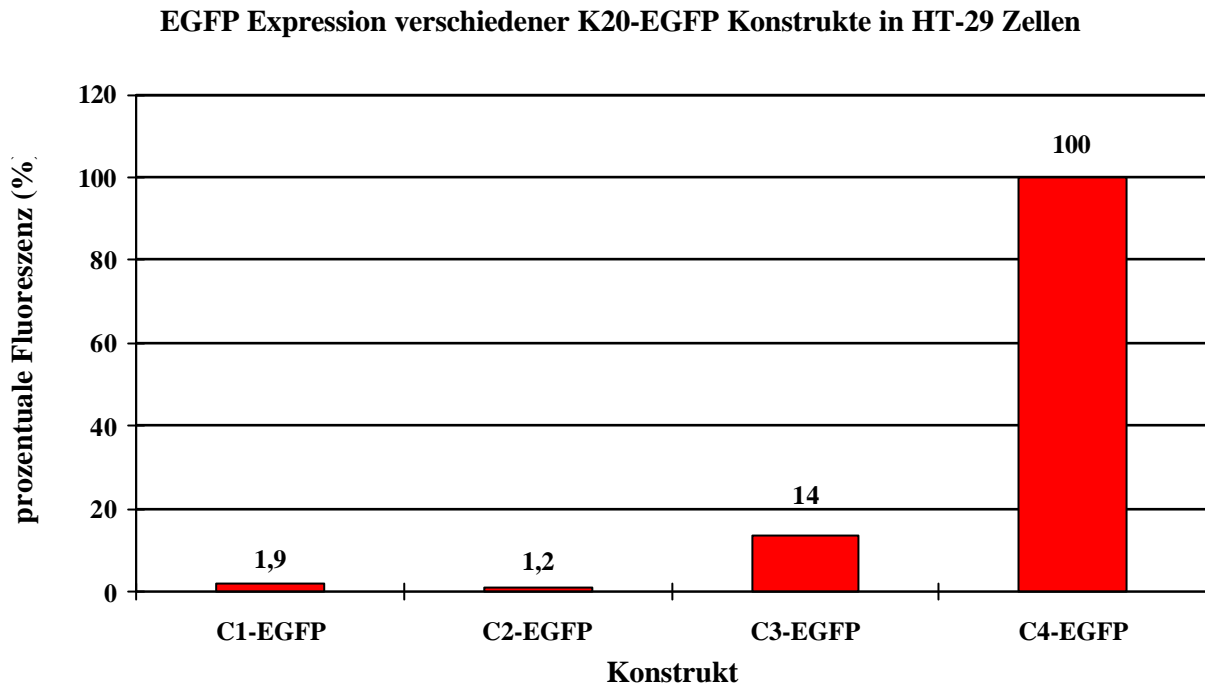


Abb. 3.6: Prozentuale EGFP Expression der K20-EGFP Konstrukte in HT-29 Zellen

Die Transfektion von HT-29 und HeLa Zellen mit den vier K20-EGFP Konstrukten wurde parallel durchgeführt. Stabile Einzelklone wurden je Zelllinie separat expandiert und deren EGFP Emission im Spektralfluorometer gemessen. Die Konstrukte C1-EGFP und C2-EGFP zeigten in HT-29 Zellen kaum messbare Fluoreszenz. Hingegen wurde mit Konstrukt C4-EGFP maximale EGFP Expression erreicht. Konstrukt C3-EGFP erreichte nur 712fach stärkere Expression im Vergleich zu C1-EGFP und C2-EGFP. Die Unterschiede der Konstrukte C1-EGFP zu C3-EGFP und C4-EGFP bzw. C2-EGFP zu C3-EGFP und C4-EGFP sind signifikant ($P < 0,001$). Konstrukt C1-EGFP und C2-EGFP zeigen keine signifikanten Unterschiede. Stabil transfizierte HeLa Klone zeigten mit keinem der K20-EGFP Konstrukte visuell wahrnehmbare Fluoreszenz.

3.6 Charakterisierung der 5' *upstream* Sequenzen des K20

Die stabilen Transfektionen mit den Konstrukten C3-EGFP und C4-EGFP hatten Klone mit wesentlich stärkerer EGFP Expression hervorgebracht als die mit C1-EGFP oder C2-EGFP generierten. Es müssen regulatorische Elemente in den 5' *upstream* Sequenzen der Vektoren C3 und C4 enthalten sein, die in diesen Konstrukten eine Expressionssteigerung hervorrufen. Die Charakterisierung der K20 *upstream* Sequenzen wurde mit den Vektoren (F1-F5)-C2-EGFP durchgeführt, die jeweils nur ein Fragment der 5' *upstream* Sequenz tragen (vergleiche Abb. 3.3). Die Konstrukte C1-EGFP bzw. C2-EGFP erreichten beim Transfektionsexperiment (3.5) nur maximal 1,9% der Expressionsstärke von C4-EGFP. Obwohl die Aktivität der beiden Vektoren sehr niedrig war wurde zusätzlich das Konstrukt C0 als Negativkontrolle für die Promotorcharakterisierung kloniert, welches nur noch einen Minimalpromotor mit 226 bp enthält.

Die bei 3.3 klonierten Konstrukte wurden wie bei 3.5 für die Transfektion von HT-29 Zellen eingesetzt, mit dem Unterschied, daß keine stabilen Einzelklone gepickt wurden.

Je Konstrukt (Tab 3.2) wurden zwei unabhängige endotoxinfreie DNA Präparationen zur Transfektion der Zellen je einer 94 mm Kulturschale verwendet. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen dann abgelöst und zur Selektion auf je zwei 145 mm Kulturschalen verteilt. Pro Konstrukt wurden also vier 145 mm Kulturschalen verwendet. Nach erfolgter Selektion wurden alle entstandenen Klone einer Kulturschale als Polyklon weiterverarbeitet. Die Klone wurden gemeinsam von der Schale gelöst und so lange mit Accumax behandelt, bis eine Einzelzellsuspension vorlag. Das Zellgemisch wurde auf eine neue 145 mm Schale überführt und bis zu Fluoreszenzmessung expandiert.

Die vier Polyklone je Konstrukt wurden separat gemessen, um die Standardabweichung so klein wie möglich zu halten.

Konstrukt	Beschreibung
C0-EGFP	Kontrolle mit 226 bp Minimalpromotor
C1-EGFP	4,8 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz, native Exon-Intronstruktur
C2-EGFP	4,8 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz, Exon 2-7 deletiert
F1-C2-EGFP	Fragment 1 plus 4,8 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz des C2
F2-C2-EGFP	Fragment 2 plus 4,8 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz des C2
F3-C2-EGFP	Fragment 3 plus 4,8 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz des C2
F4-C2-EGFP	Fragment 4 plus 4,8 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz des C2
F5-C2-EGFP	Fragment 5 plus 4,8 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz des C2
C3-EGFP	21,5 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz, native Exon-Intronstruktur
C4-EGFP	21,5 kb 5' <i>upstream</i> Sequenz, Exon 2-7 deletiert

Tab. 3.2: Verwendete Konstrukte zur Charakterisierung der 5' *upstream* Sequenzen des K20

Die zehn gelisteten Konstrukte wurden zur Transfektion von HT-29 Zellen verwendet. Nach der Selektionsphase wurden alle Klone einer Kulturschale als Polyklon weiterverarbeitet und deren EGFP Expression abschließend im Spektralfluorometer gemessen.

Wie bei Experiment 3.5 wurde auch bei diesem Versuch mit Konstrukt C4-EGFP das stärkste Signal gemessen und gleich 100% gesetzt (Abb. 3.7).

Die Kontrolle C0 mit nur 226 bp 5' *upstream* Sequenz erreichte im Vergleich zu C4-EGFP lediglich schwache Expression. Die ebenfalls schon in Experiment 3.5 verwendeten Konstrukte C1-EGFP und C2-EGFP zeigten keine stärkere Expression als die Kontrolle C0-EGFP. Die drei Konstrukte C0-EGFP, C1-EGFP und C2-EGFP unterscheiden sich kaum in ihrer Expressionsstärke. Starke EGFP Expression zeigten hingegen die Konstrukte F5-C2-EGFP (85%) und F4-C2-EGFP (74%), die offenbar positive Kontrollelemente für die K20

Expression enthalten. Die Fragmente F5 und F4 liegen am weitesten 5' des Transkriptionsstarts, die dazwischen liegenden Fragmente F3, F2 und F1 dagegen tragen zur Verstärkung der Expression nicht signifikant bei.

Charakterisierung der 5' upstream Sequenzen des K20

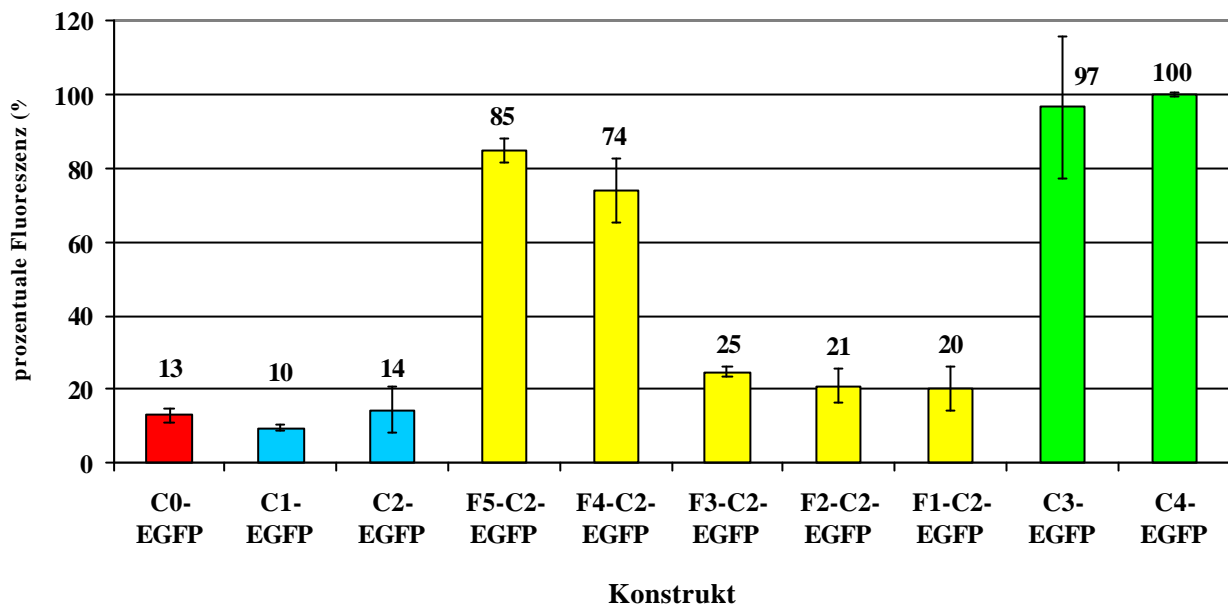


Abb. 3.7: Prozentuale Expression der K20-EGFP Konstrukte in HT-29 Zellen

Mit dem Konstrukt C4-EGFP wurde maximale EGFP Expression gemessen, dieser Wert wurde als 100% definiert. C0-EGFP diente als Kontrolle mit Minimalpromotor. C1-EGFP und C2-EGFP erreichten im Vergleich zu C0-EGFP keine Expressionssteigerung, sie hatten in Experiment 3.5 (Abb. 3.6) schon nahezu keine Expression gezeigt. Das Konstrukt C3-EGFP erreicht mit 97% Expression fast den Wert von C4-EGFP, beide enthalten die komplette 21,5 kb 5' upstream Sequenz. F1-C2-EGFP, F2-C2-EGFP oder F3-C2-EGFP erhöhen die Expression im Vergleich zu C0-EGFP nicht signifikant. Im Gegensatz dazu erreichen die Konstrukte F5-C2-EGFP und F4-C2-EGFP eine deutliche Steigerung der Expressionsrate.

3.7 Spleißen des Hybrid-Introns

Das Hybrid-Intron 1/7 der Konstrukte C2 und C4 besteht aus den ersten 330 bp des Intron 1 und den letzten 720 bp des Intron 7 von K20 (Abb. 3.8). Das korrekte Spleißen des Introns wurde mittels stabil transfizierter HT-29 Klone untersucht. Aus stabil transfizierten Klonen generiert mit C2-EGFP bzw. C4-EGFP wurde RNA gewonnen und eine RT-PCR durchgeführt. Je Konstrukt wurde ein fluoreszierender Zellklon untersucht. Mit spezifischen Primern für EGFP und das Exon 8 des K20 (siehe 2.1.9 Primerkombination D) wurde das Spleißen des 1050 bp langen Hybrid-Introns 1/7 nachgewiesen (Abb. 3.8 und 3.9). Bei der PCR entsteht mit der verwendeten cDNA ein diagnostisches Fragment von 720 bp wenn das

Intron korrekt gespleißt wird. Bei beiden untersuchten Klonen, generiert mit C2-EGFP (Klon 1, Abb. 3.9) bzw. C4-EGFP (Klon 2, Abb. 3.9) wurde das Intron korrekt gespleißt. Als Kontrolle diente zelluläre DNA, gewonnen aus transfizierten HT-29 Zellen (Klon 1). Das erwartete Fragment von 1775 bp bei Verwendung von zellulärer DNA wurde nicht amplifiziert, weil die PCR Bedingungen auf das kleinere cDNA Signal abgestimmt waren.

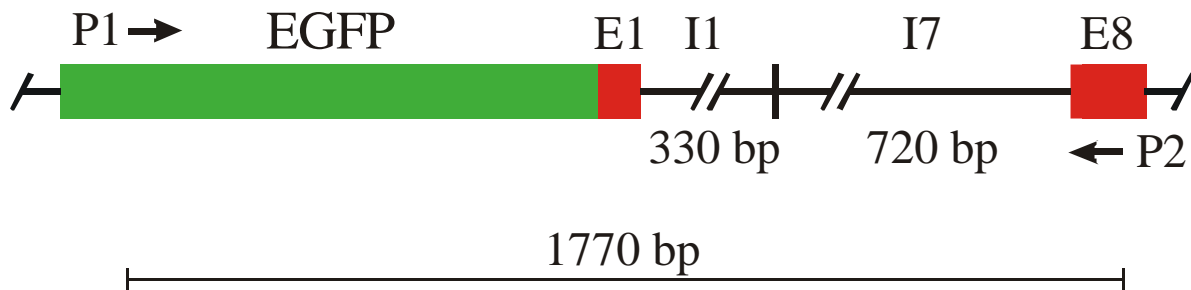


Abb. 3.8: Spleißen des Hybrid-Intron 1/7

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Konstrukte C2-EGFP und C4-EGFP. Zwischen der cDNA für EGFP/Exon1 (EGFP/E1) und Exon 8 (E8) des K20 befindet sich das 1050 bp lange Hybrid-Intron 1/7. Die ersten 330 bp stammen vom Intron 1 (I1), die letzten 720 bp vom Intron 7 (I7) des K20. Die spezifischen Primer (P1, P2) für EGFP und Exon 8 erzeugen in der PCR ein diagnostisches Fragment von 1775 bp bei Verwendung von zellulärer DNA bzw. 725 bp mit cDNA als Template.



Abb. 3.9: Spleißen des Hybrid-Introns 1/7 in stabil transfizierten Zellklonen

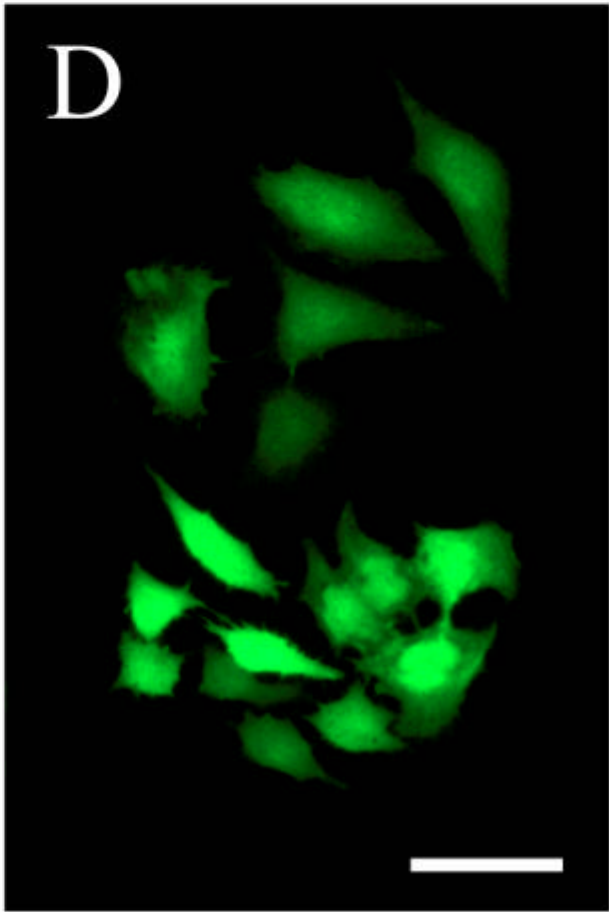
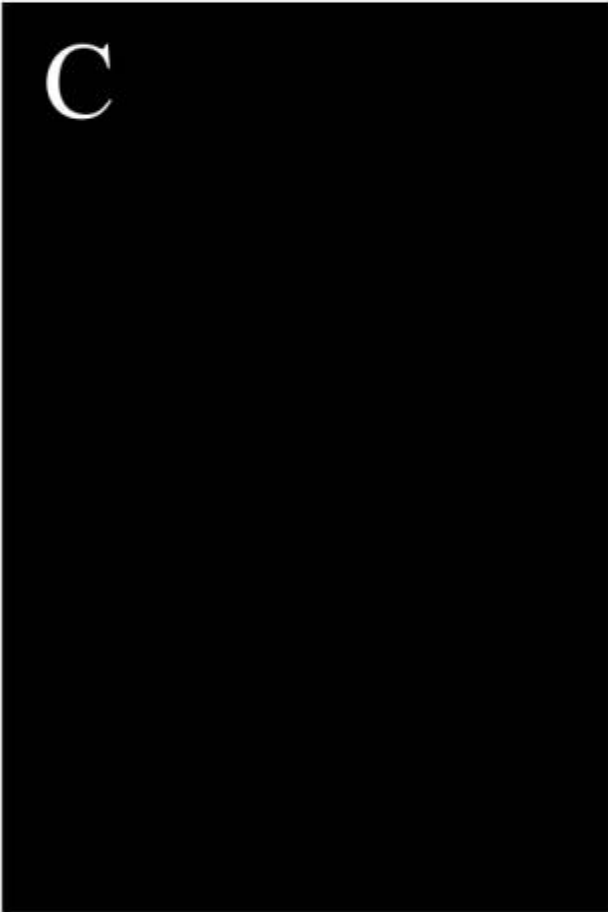
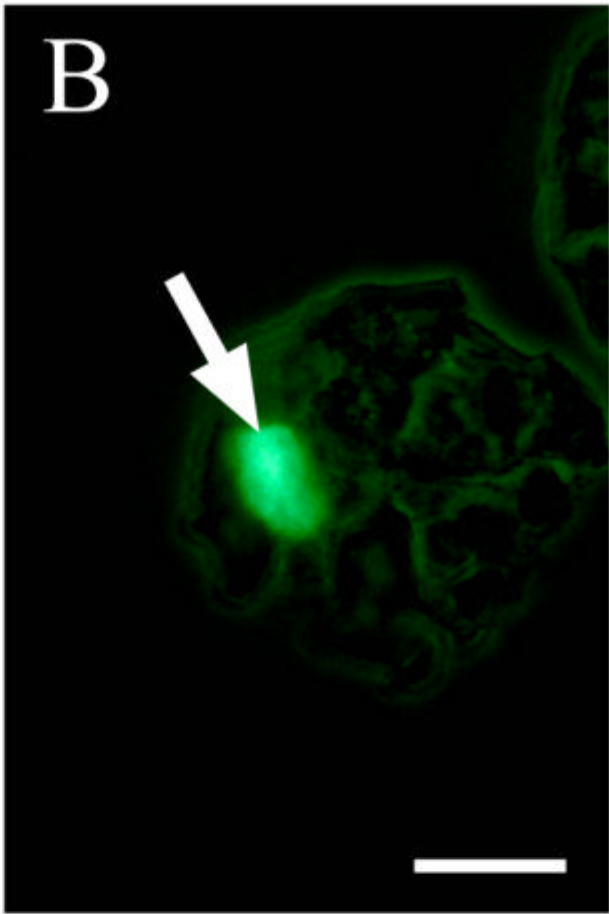
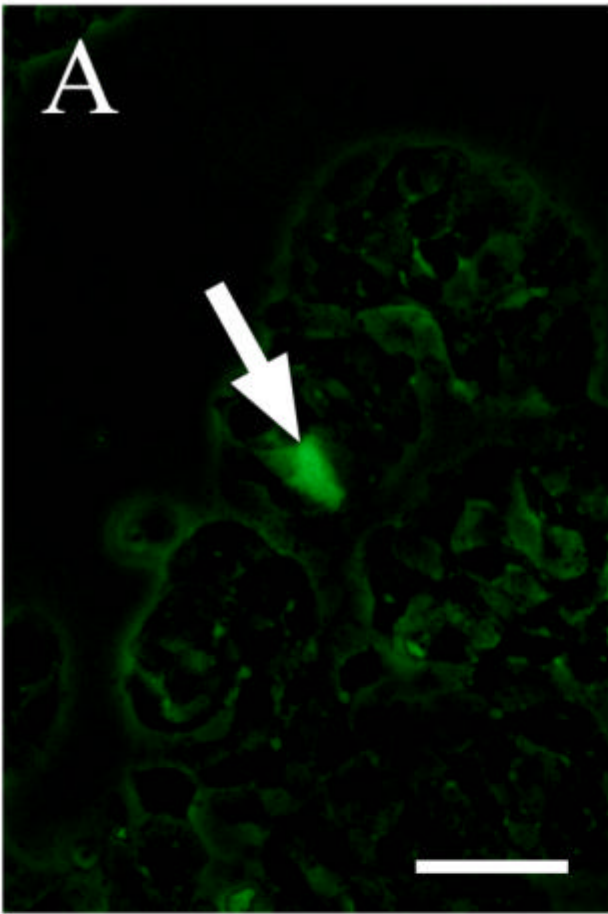
Das korrekte Spleißen des Hybrid-Intron 1/7 wurde mittels RT-PCR untersucht. Enthalten ist das Hybrid-Intron in den Konstrukten C2 und C4. Zur Kontrolle wurden HT-29 Zellen mit den Vektoren C2-EGFP bzw. C4-EGFP stabil transfiziert und aus einzelnen fluoreszierenden Klonen RNA für die RT-PCR gewonnen. Untersucht wurde je Konstrukt ein Zellklon. Beide Klone zeigten bei der RT-PCR mit spezifischen Primern für EGFP und Exon 8 des K20 die erwartete Bande bei 725 bp. Das 1050 bp Intron wurde also in beiden Fällen korrekt gespleißt. Zelluläre DNA aus transfizierten HT-29 Zellen (Klon 1) erzeugte bei den gewählten PCR-Bedingungen kein Signal.

3.8 Transiente Transfektionen humaner Zelllinien

Die zelltypspezifische Expression der K20 Vektoren, wie sie bei den stabilen Transfektionen bei 3.5 gezeigt wurde, sollte auch bei transienten Experimenten bestätigt werden, da diese für die geplante Generierung transgener Mäuse entscheidend ist. Überprüft wurde diese Spezifität mittels transienter Transfektionen von HT-29 und HeLa Zellen mit verschiedenen K20-EGFP Vektoren. Verwendet wurden die Konstrukte C1-, C2-, C3- und C4-EGFP jeweils für beide Zelllinien. Insgesamt zeigten sich bei den Transfektionen mit HT-29 Zellen nur wenige fluoreszierende Zellen, was mit der geringen Transfektionseffizienz dieser Linie zusammenhängt. Deutlich wurde aber, daß bei Verwendung der C1-EGFP und C2-EGFP Vektoren schwach fluoreszierende Zellen entstanden (Abb. 3.10A). Hingegen exprimierten die Zellen wesentlich mehr EGFP bei Verwendung der Konstrukte C3-EGFP und C4-EGFP (Abb. 3.10B). Transfizierte HeLa Zellen zeigten mit keinem der vier K20-EGFP Konstrukte sichtbare Fluoreszenz (Abb. 3.10C). Die von einem Colon Adenokarzinom abgeleitete Zelllinie HT-29 konnte den K20 Promotor der K20-EGFP Konstrukte aktivieren, wohingegen die Kontrolllinie HeLa dazu nicht in der Lage war. Werden diese Vektoren zur Generierung transgener Tiere eingesetzt, kann daher mit einer gewebespezifischen Expression des Transgens im Darmepithel gerechnet werden.

Abb. 3.10 Transiente Transfektion humaner Zelllinien (Seite 51)

Die humanen Zelllinien HT-29 und HeLa wurden transient mit den K20-EGFP Expressionsvektoren C1-, C2-, C3- und C4-EGFP transfiziert, im Fluoreszenzmikroskop mit blauem Licht (460-490 nm) angeregt und fotografiert. (A) Der Pfeil markiert eine HT-29 Zelle, transfiziert mit C1-EGFP. Sichtbar ist eine schwache EGFP Expression. (B) Starke EGFP Expression wird bei Verwendung des C3-EGFP oder C4-EGFP Vektors sichtbar, hier exemplarisch für das Konstrukt C3-EGFP gezeigt. (C) Als K20 negative Kontrolle diente die Cervixkarzinomlinie HeLa, diese zeigte nach Transfektion mit keinem der K20-EGFP Expressionsvektoren sichtbare Fluoreszenz. (D) Als Transfektionskontrolle für die HeLa Zellen wurde der Vektor pEGFP-N1 verwendet, der die EGFP cDNA unter Kontrolle des CMV_{IE} Promotor enthält und das Protein stark exprimiert. Die Balken in den Bildern A, B und D entsprechen 50 µm.



3.9 Generierung transgener Mäuse

Mit Hilfe der Mikroinjektion in den männlichen Pronukleus befruchteter FVB/NHSD Mausooocyten wurden transgene Mäuse mit verschiedenen K20-Vektoren generiert (Tab 3.3). Für die Mikroinjektion wurde die Plasmid-DNA endotoxinfrei präpariert und der bakterielle Teil des Vektors (pBR322) anschließend mit Aat II von der Expressionskassette entfernt (Abb. 3.3).

Generiert wurden jeweils drei *founder* mit den Konstrukten C1-TGF- β und C1-dn RII. Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels PCR aus Proteinase K verdauten Ohrbiopsien. Verwendet wurden je nach Linie entsprechende Primerpaare spezifisch für das jeweilige Konstrukt. Bei der PCR entstanden diagnostische DNA-Fragmente mit einer Länge von 709 bp für C1-TGF- β (siehe 2.1.9 Primerkombination E) bzw. 583 bp für C1-dn RII (siehe 2.1.9 Primerkombination F).

Mit den generierten sechs Foundertieren konnte aber nur eine Linie für C1-TGF- β (Tg-C1-TGF- β_1) bzw. zwei Linien für C1-dn RII (Tg-C1-dn RII_{1,2}) etabliert werden. Die übrigen Tiere erwiesen sich als steril oder es fand keine Keimbahntransmission statt. Nach Kreuzung heterozygoter transgener Tiere mit Wildtyptieren trugen, wie erwartet, ca. 50% der Nachkommen das jeweilige Transgen. Der transgene Nachwuchs der drei *founder* zeigte keinen offensichtlichen Phänotyp, weder in der F1 Generation noch in späteren Generationen.

Nachdem die Transfektionsexperimente bei 3.5 gezeigt hatten, daß die in den Vektoren C3 und C4 enthaltenen 5' *upstream* Bereiche die Expression *in vitro* steigern können, wurden die Konstrukte C3-EGFP und C4-EGFP ebenfalls zur Pronukleusinjektion eingesetzt. Aus den Injektionen mit C4-EGFP gingen fünf *founder* hervor mit denen auch fünf transgene Linien etabliert werden konnten (Tg-C4-EGFP₁₋₅).

Die Mikroinjektion des Konstrukts C3-EGFP wurde von Dr. Reifenberg in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Uniklinik Mainz durchgeführt. Es wurden 14 *founder* generiert. Bis jetzt konnten 8 Linien etabliert werden (Tg-C3-EGFP₁₋₈).

Die Genotypisierung transgener Tiere der Linien Tg-C3-EGFP und Tg-C4-EGFP erfolgte mittels PCR aus Ohrbiopsien, das diagnostische Fragment hatte eine erwartete Größe von 566 bp (siehe 2.1.9 Primerkombination G).

	Tg-C1-TGF β	Tg-C1-dn RII	Tg-C3-EGFP	Tg-C4-EGFP
Generierte <i>founder</i>	3	3	14	5
erhaltene Linien	1	2	bisher 8	5

Tab: 3.3: Übersicht der generierten transgenen Linien

3.10 Gewebespezifische Expression der Transgene

3.10.1 RT-PCR Analyse

Die transgenspezifische RNA Expression wurde bei den Linien Tg-C1-TGF- β_1 und Tg-C1-dn RII_{1,2} mittels RT-PCR untersucht. Vor der RNA Präparation wurde das Intestinalsystem der Maus in sieben Abschnitte gegliedert: Magen, vier etwa gleich lange Dünndarmabschnitte (D1-D4), Blinddarm (Appendix) und Grimmdarm (Colon).

Als Kontrollgewebe wurden Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge und Rückenhaut verwendet, die alle als K20 negativ charakterisiert worden waren. Verwendet wurden spezifische Primerkombinationen für das jeweilige Insert und das Exon 2 des K20. Die Primerpaare flankierten das Intron 1 des K20, so daß PCR Produkte verursacht durch Verunreinigungen mit genomischer DNA von cDNA Signalen unterschieden werden konnten. Die erwartete PCR-Produktgröße lag bei 680 bp für Gewebe der Linien Tg-C1-dn RII (siehe 2.1.9 Primerkombination H). Als interne Kontrolle für die RT-PCR wurde das ubiquitär exprimierte BMP-6 verwendet. Erwartet wurde eine PCR-Produktgröße von 599 bp, die BMP-6 Primer flankieren ebenfalls Introns (siehe 2.1.9 Primerkombination J).

Nachgewiesen werden konnte die transgenspezifische RNA Expression in allen intestinalen Geweben. Im Magen ließen sich nur geringe Mengen transgenspezifischer RNA detektieren, das RT-PCR Signal war vergleichsweise schwach. Mit RNAs isoliert aus allen Teilen des Dünndarms (D1-D4), Appendix und Colon wurden starke RT-PCR Signale nachgewiesen. Die verwendeten Kontrollgewebe Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge und Haut aus den gleichen Tieren lieferten keine Signale in der RT-PCR (Abb. 3.11).

Die RT-PCR Ergebnisse waren für alle drei untersuchten transgenen Linien Tg-C1-TGF- β_1 , Tg-C1-dn RII₁ und Tg-C1dn RII₂ identisch. Es zeigten sich keine Unterschiede im Expressionsmuster. Die transgenspezifische Expression beschränkte sich auf die intestinalen Gewebe und war in keinem der Kontrollgewebe nachweisbar. Exemplarisch für die drei

verwendeten transgenen Linien ist in Abb. 3.11 die RT-PCR Analyse der Linie Tg-C1-dn RII₂ gezeigt.

Die RT-PCR wurde zur Kontrolle parallel mit RNAs isoliert aus den gleichen Geweben von Wildtyptieren (wt) durchgeführt. Hier ließ sich weder in intestinalen Geweben noch in Kontrollgeweben ein RT-PCR Signal nachweisen (Abb. 3.11).

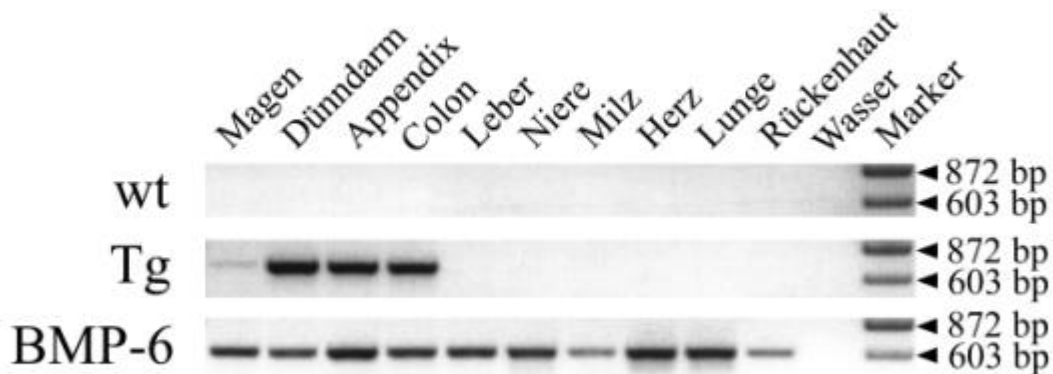


Abb. 3.11: RT-PCR mit transgenspezifischen Primern

Der Nachweis transgenspezifischer RNA Expression ist hier am Beispiel der Linie Tg-C1-dn RII₂ gezeigt. Für die RT-PCR wurde Gesamt-RNA der entsprechenden Gewebe verwendet. Die anschließende RT-PCR wurde mit Primern spezifisch für den dn RII und das Exon 2 des K20 durchgeführt. Die PCR Primer flankieren das Intron 1 des K20, damit Verunreinigungen der cDNA mit genomischer DNA nicht ein gleichgroßes Artefakt erzeugen können.

Die Spuren Magen, Dünndarm, Appendix und Colon zeigen transgenspezifische Expression, hingegen ist in den Kontrollgeweben Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge und Rückenhaut keine transgenspezifische Expression nachweisbar. Erwartete PCR-Produktgröße 688 bp.

Das gleiche Expressionsmuster zeigte die RT-PCR bei den Linien Tg-C1-dn RII₁ und Tg-C1-TGF- β_1 .

Die Wildtypkontrolle (wt), die mit der gleichen Primerkombination wie für transgene Gewebe durchgeführt wurde, zeigt in keinem Gewebe Expression. Als PCR Kontrolle für alle Gewebe diente das ubiquitär exprimierte BMP-6. Erwartete PCR-Produktgröße 599 bp. Gezeigt ist hier die BMP-6 Kontrolle für die Gewebe der Linie Tg-C1-dn RII₂.

3.10.2 Northern-Blot Analyse

Die transgenspezifische RNA Expression wurde ebenfalls mittels Northern-Blot Analyse an den Linien Tg-C1-TGF- β_1 , Tg-C1-dn RII₂ und Tg-C4-EGFP₁₋₅ untersucht. Es wurden RNA Präparation aus den gleichen Geweben wie bei der RT-PCR Analyse beschrieben verwendet: Magen, Dünndarm, Appendix und Colon. Als Kontrollgewebe dienten Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge und Rückenhaut.

Die Untersuchung transgenspezifischer RNA Expression wurde mit spezifischen Sonden gegen TGF- β bzw. den dominant negativen Rezeptor durchgeführt. Damit ließ sich aber keine transgenspezifisch exprimierte RNA bei den Linien Tg-C1-TGF- β_1 und Tg-C1-dn RII_{1,2}

nachweisen. Hingegen wurde mit einer Sonde, welche die K20 mRNA Sequenz der Exons 3 bis 8 erkennt (siehe 2.1.9 Primerkombination K), eine sehr starke endogene K20 mRNA-Expression in den murinen intestinalen Organen festgestellt. Die Kontrollgewebe zeigten diese endogene K20 Expression nicht. Die 1,7 kb Bande in Abb. 3.12 repräsentiert die endogene K20 Expression. Die transgenspezifischen mRNAs wurden bei Tieren der Linie Tg-C1-TGF- β bei 2,8 kb, bei Tieren der Linie Tg-C1-dn RII bei 2,3 kb erwartet. Bei keiner der durchgeführten Northern-Blot Analysen konnte transgenspezifische mRNA detektiert werden. Exemplarisch dargestellt ist in Abb. 3.12 die Northern-Blot Analyse, durchgeführt mit RNAs isoliert aus Tieren der Linie Tg-C1-TGF- β_1 . Als Ladekontrolle diente eine Sonde gerichtet gegen das ubiquitär exprimierte GAPDH (siehe 2.1.9 Primerkombination L)

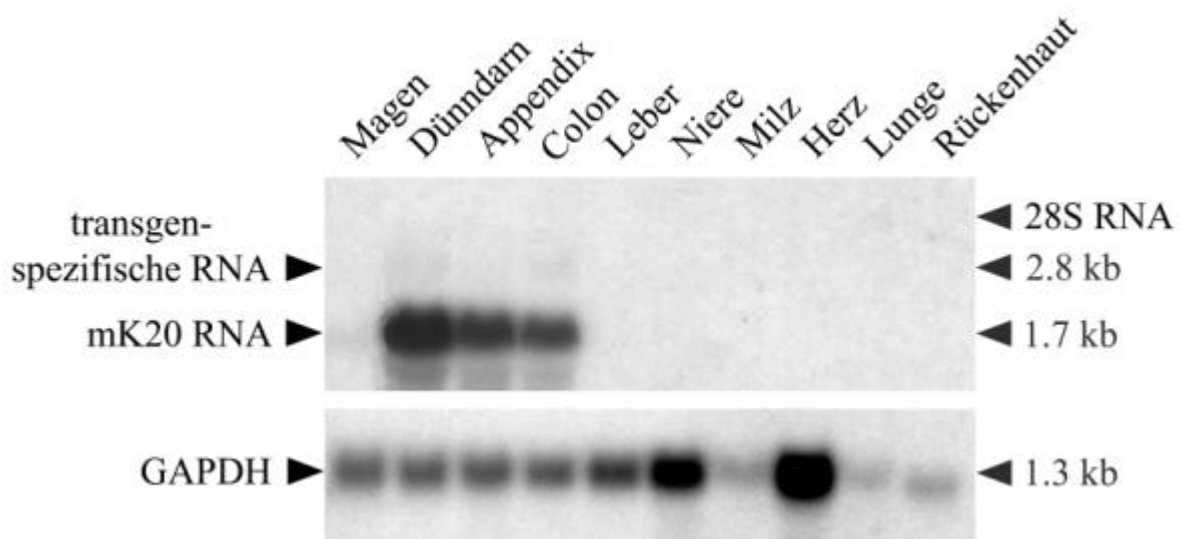


Abb. 3.12: Northern-Blot Analyse muriner intestinaler Gewebe

Gewebe der Linie Tg-C1-TGF- β_1 wurden auf transgenspezifische mRNA Expression untersucht. Die RNAs wurden aus Magen, Dünndarm, Appendix, Colon, Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge und Haut isoliert. Von den Geweben wurden je 25 μ g Gesamt-RNA nach Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer spezifischen Sonde gerichtet gegen Exon 3-8 des K20 hybridisiert. Transgenspezifische mRNA ließ sich bei 2,8 kb nicht nachweisen. Hingegen konnten in den intestinalen Geweben starke endogene K20 Expression bei 1,7 kb detektiert werden. Die Kontrollgewebe exprimieren kein K20 und blieben somit signalfrei. Als Ladekontrolle diente für alle Gewebe das *house-keeping gene* GAPDH.

Mit Geweben der Linien Tg-C4-EGFP₁₋₅ wurden ebenfalls Northern-Blot Analysen durchgeführt. Isoliert wurden die RNAs aus Geweben der F1 Generationen. Mit der verwendeten Sonde gerichtet gegen die cDNA des EGFP ließ sich in keinem F1 Tier der fünf Linien ein transgenspezifisches RNA Signal nachweisen. Auch mit einer spezifischen Sonde gerichtet gegen Exon 8 des K20 wurde kein Signal detektiert (siehe 2.1.9 Primerkombination

M). Die RNA Expression transgener Tiere zeigte keinen Unterschied zu den Wildtypkontrollen (Daten nicht gezeigt).

3.11 Transgenspezifische EGFP Expression

Untersucht wurde die transgenspezifische Proteinexpression des EGFP bei den Linien Tg-C3-EGFP₁₋₈ und Tg-C4-EGFP₁₋₈. Von kleinen Stücken des Dünndarms und Colon wurde die Epithelschicht abgeschabt und direkt im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. EGFP Fluoreszenz ließ sich bei keinem transgenen Tier nachweisen. Als Kontrolltiere dienten die nichttransgenen Geschwister. Zusätzlich wurden die Gewebe mittels Kryoschnitten untersucht. Hierfür wurden von Dünndarm und Colon wenige mm große Stücke in flüssigem Stickstoff eingefroren und 5-50 µm dicke Schnitte angefertigt. Bei keinem der Schnitte ließ sich EGFP Fluoreszenz im Darmepithel beobachten.

Darmstücke transgener Tiere wurden auch nach der Entnahme in Formalin oder Paraformaldehyd fixiert und mittels Paraffinschnitten untersucht. Allerdings ergab sich das gleiche Resultat wie bei den Kryoschnitten.

Die starke EGFP Expression in der Zellkultur, welche unter Kontrolle des K20 Promotors mit den Konstrukten C3-EGFP und C4-EGFP erreicht wurde, ist auf das transgene Mausmodell nicht übertragbar. Sowohl der Vektor C3-EGFP mit nativer Exon/Intronsequenz als auch C4-EGFP mit Hybrid-Intron 1/7 zeigten keine spezifische Expression im transgenen Tier. Demnach sind für die Expression *in vivo* keine regulatorischen Elemente in Intron- oder Exonsequenzen des K20 enthalten, welche die Funktion eines *enhancers* übernehmen. Für die Expression *in vivo* sind offenbar weitere Kontrollelemente nötig, die weiter *up-* oder *downstream* des klonierten Bereichs liegen.

4. Diskussion

4.1 Generierung gewebespezifischer Expressionsvektoren

Auf Basis des humanen Gens für Keratin 20 (K20) wurden Expressionsvektoren kloniert, die zur Charakterisierung der zelltypspezifischen Expression *in vitro* genutzt wurden. Des Weiteren konnten mit diesen Vektoren transgene Tiere generiert werden, um die gewebespezifische Expression der Transgene in Enterocyten des Darmepithels von Mäusen zu untersuchen. K20 wird hauptsächlich in gastrointestinalen Epithelien, Merkelzellen der Haut und Tumoren, welche von diesen Geweben abstammen, exprimiert (Moll et al., 1990; Moll et al., 1992; Moll et al., 1993). Bisher wurden noch keine Expressionsvektoren beschrieben, die Teile des Gens für K20 enthalten. Charakterisiert wurden bislang die Gene für K8, K18 und K19, welche ähnlich wie K20 in einschichtigen Epithelien exprimiert werden (Kulesh und Oshima, 1988; Abe und Oshima, 1990; Neznanov und Oshima, 1993; Hesse et al., 2000; Casanova et al., 1995).

Für die Klonierung verwendet wurde der λ -Klon CK20-IT19, ein 18 kb großes genomisches Fragment des humanen Chromosom 17q12. Dieses Fragment enthält die komplette Exon/Intronstruktur des K20 inklusive 4,8 kb 5' *upstream* und 3,9 kb 3' *downstream* Bereich (Moll et al., 1993). Ein ähnliches Fragment wurde zur Generierung transgener Mäuse für humanes K18 verwendet. Das 10 kb große Konstrukt enthielt neben der Exon/Intronstruktur 2,5 kb 5' und 3,5 kb 3' flankierende Sequenz. Mit diesem K18 Vektor konnte gewebespezifische Expression, vergleichbar mit der des endogen exprimierten Gens erreicht werden (Neznanov und Oshima, 1993).

Für die Konstruktion der K20 Expressionsvektoren wurde das Exon 1 modifiziert. Die ersten 342 bp wurden inklusive aller ATG-Startcodons deletiert, so daß lediglich eine Nru I Restriktionsschnittstelle für Klonierung von cDNAs und die 56 bp des Exon 1 bis zum Intron 1 verblieben. Die Verwendung der eigenen Exon/Intronstruktur mit polyA-Signal soll zu einer effizienten Transkription der klonierten cDNAs beitragen. Konstrukte, die natürliche Introns bzw. Hybrid-Introns enthalten, erreichen wesentlich stärkere transgene Expression im Gegensatz zu Vektoren ohne Intron (Whitelaw et al., 1991; Choi et al., 1991). Auf Basis dieses als C1 bezeichneten Konstrukts wurden alle weiteren Expressionsvektoren kloniert. Die Generierung des als C2 bezeichneten Vektors diente der Untersuchung der Exon/Intronsequenzen auf regulatorische Elemente. Da der Bereich zwischen Intron 1 und Intron 7 deletiert wurde, lassen sich möglicherweise Unterschiede in der Promotoraktivität der Deletionsvariante feststellen. Bei der Regulation des Gens codierend für K18 spielen

beispielsweise *enhancer* und *silencer* Elemente im Intron 1 bzw. Exon 6 eine wichtige Rolle (Pankov et al., 1994b; Neznanov et al., 1997; Umezawa et al., 1997). Bei den Keratingenen, die in der Haut aktiv sind und zur Generierung transgener Mäuse verwendet wurden, spielt die interne Exon/Intronstruktur keine Rolle. Meist wurden nur die Keratinpromotoren inklusive 5' flankierender Sequenzen in Kombination mit heterologen Introns und polyA-Signalen zur Konstruktion der Vektoren verwendet. Beispielsweise fanden das β -Globin Intron und das polyA-Signal des human growth hormone (hGH) schon Verwendung in einem K10 Expressionsvektor (Werner et al., 1993).

Die Charakterisierung der K20 5' *upstream* Region verlangte nach der Klonierung eines möglichst langen 5' flankierenden Bereichs. Hierfür wurde der Klon λ 6k aus einer genomischen λ -Phagenbank isoliert und zur Ergänzung der K20 Sequenzen (CK20-IT19) verwendet. Die Klonierung dieser Sequenzen vor das 5' Ende der Vektoren C1 und C2 führte zu den Konstrukten C3 bzw. C4. Im Vergleich zu C1 und C2 mit 4,8 kb 5' *upstream* Sequenz enthalten die Vektoren C3 und C4 insgesamt 21,5 kb 5' flankierende Sequenz. Die längste bisher verwendete proximale Sequenz von 11 kb wurde beim bovinen K6 Expressionsvektor eingesetzt, mit dem beispielsweise BMP-4 in der Epidermis transgener Mäuse exprimiert wurde (Blessing et al., 1993; Blessing et al., 1995; Ramirez et al., 1995).

Die Vektoren C1 bis C4 stellen die Basis zur Charakterisierung der K20 Kontrollelemente *in vitro* dar. Die Klonierung des Reporters EGFP in diese Vektoren ermöglicht eine einfache Untersuchung der K20 Genexpression in der Zellkultur, histologischen Schnitten sowie *in vivo*. Außerdem läßt sich die EGFP Expression quantitativ mit einem Fluorometer bestimmen (Krempen et al., 1999).

Zur Identifizierung und Lokalisation regulatorischer Elemente in der 21,5 kb 5' *upstream* Region der Vektoren C3 und C4 wurde die Sequenz in fünf Fragmente unterteilt und subkloniert. Die Fragmente wurden jeweils bei -4,8 kb am 5' Ende des Vektors C2-EGFP eingefügt und dann als (F1-F5)-C2-EGFP bezeichnet. Als Kontrolle mit minimaler 5' Sequenz wurde der Vektor C0-EGFP generiert, dieser enthält nur einen Minimalpromotor mit 226 bp.

5' und 3' flankierende Bereiche wurden schon bei einigen Keratingenen mittels Deletionsanalysen untersucht. Allerdings wurden die Fragmente meist in Vektoren kloniert, welche die Reportergene für β -Galctosidase oder Chloramphenicol Acetyltransferase enthielten (Blessing et al., 1989; Casatorres et al., 1994; Pankov et al., 1994b; Wanner et al., 1997).

Zur Generierung transgener Mäuse wurden die Vektoren C1-TGF- β und C1-dn RII eingesetzt, aber auch die Konstrukte C3-EGFP und C4-EGFP. Die cDNAs codierend für TGF- β des

Affen (Brunner et al., 1989; Hemsley et al., 1989) und den humanen dominant negativen TGF- β Typ II Rezeptor (Brand et al., 1993) wurden schon unter der Kontrolle verschiedener Promotoren zur Generierung transgener Mäuse erfolgreich eingesetzt. Das Konstrukt CRP/TGF- β beispielsweise diente der Untersuchung der Fibrogenese in der Leber. Unter Kontrolle des humanen CRP Promotors (*C reactive protein*) kommt es zur gewebespezifischen TGF- β Expression in Hepatocyten transgener Mäuse (Kanzler et al., 1999).

Die Verwendung des bovinen K5 Expressionsvektors in Verbindung mit der cDNA des dominant negativen TGF- β Typ II Rezeptors (dn RII) führte zu einer starken RNA und Proteinexpression in basalen Keratinocyten. Untersucht wurde an diesem Tiermodell die Proliferation und Differenzierung der Epidermis bzw. die Karzinomentwicklung nach Tumorpromotion (Amendt et al., 1998). Des weiteren wurde der dn RII unter Kontrolle des humanen CRP Promotors in Hepatocyten transgener Mäuse gewebespezifisch exprimiert. Die Unterbrechung der TGF- β Signalkaskade in der Leber zeigte, daß TGF- β als Tumorsuppressor bei der chemisch induzierten Hepatokarzinogenese wirkt (Kanzler et al., 2001).

Die EGFP Expression *in vitro* und *in vivo* wurde mehrfach erfolgreich demonstriert (Chalfie et al., 1994; Ikawa et al., 1995). Unter Kontrolle des TK Promotors kommt es beispielsweise zur EGFP Expression in allen Geweben von *knock-in* Reporterstäusen (Constien et al., 2001).

4.2 Charakterisierung der 5' *upstream* Sequenzen des K20

Die quantitative EGFP Expression unter Kontrolle der K20 Vektoren sollte ursprünglich mit transient transfizierten HT-29 Zellen ermittelt werden. Allerdings waren die Transfektionseffizienzen dieser Zelllinie so niedrig, daß eine Messung im Fluorometer unmöglich war. Deshalb mußten für die quantitative Messung stabile Klone generiert werden, die einzeln expandiert und gemessen wurden. Die Klone erzeugt mit den Vektoren C1-EGFP und C2-EGFP, die 4,8 kb 5' *upstream* Sequenz enthalten, waren in ihrer Fluoreszenz sehr schwach. Meist war kein Unterschied zur Autofluoreszenz nicht transfizierter Kontrollzellen feststellbar. Auch der Vergleich der beiden Konstrukte untereinander zeigte keine bedeutenden Unterschiede auf. Mit immunhistologischen Färbungen wurde bei HT-29 Zellen starke K20 Expression nachgewiesen (Moll et al., 1992). Dies wurde auch durch die Western-Blot Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigt. Die Zelllinie zeigte eine starke K20 Expression, sollte also auch in der Lage sein den Promotor der K20 Konstrukte zu aktivieren. Diese fehlende Aktivierung der Reporterstrukture ist ungewöhnlich, da mit allen untersuchten, auf

Keratinpromotoren basierenden Vektoren, Expression in entsprechenden Zelllinien gezeigt werden konnte. Meist führte schon der Promotor in Verbindung mit ca. 1 kb 5' *upstream* Sequenz zu starker zelltypspezifischer Expression des Reporterkonstrukts *in vitro*. Dies wurde gezeigt für den bovinen K5 Promotor, beim bovinen K6 sind sogar nur 605 bp 5' flankierender Region mit den darin enthaltenen Elementen notwendig (Casatorres et al., 1994; Blessing et al., 1989).

Erst mit der Verwendung der Vektoren C3-EGFP und C4-EGFP inklusive 21,5 kb 5' *upstream* Sequenz konnten stark fluoreszierende Zellklone beobachtet werden. Mit C4-EGFP stabil transfizierte Klone erreichten die höchsten Fluoreszenz Messwerte des Versuchs. C3-EGFP erreichte nur 14% Expression des C4-EGFP Durchschnitts. Insgesamt betrachtet erreicht der C4-EGFP Vektor ca. die 50-80fache Expressionsstärke von C1-EGFP bzw. C2-EGFP. C3-EGFP zeigt nur eine Steigerung um das 7-12fache im Vergleich zu den gleichen Konstrukten. Bei den Experimenten mit Polyklonen zeigten C3-EGFP und C4-EGFP vergleichbare Expressionsstärke. Die klonierten Sequenzen aus λ 6k in den Vektoren C3 und C4 müssen regulatorische Elemente enthalten, welche die Transkriptionsstärke *in vitro* deutlich erhöhen.

Bei den meisten Keratingenen sind die regulatorischen Elemente in den proximalen Regionen der Promotoren zu finden. Bisher wurden bei Promotorstudien von Keratinen *in vitro* nur 5' *upstream* Sequenzen bis 5 kb Länge untersucht, weil sich bereits mit den dort lokalisierten Kontrollelementen die Expression in einem Reporterkonstrukt um ein Vielfaches steigern ließ. Prominente Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die in vielen 5' Regionen von Keratingenen identifiziert und charakterisiert wurden, sind AP-1, AP-2 und Sp1. Diese drei Transkriptionsfaktoren wurden bezüglich der Regulation von Keratingenen bisher am häufigsten beschrieben (Bailleul et al., 1990; Blessing et al., 1989; Jiang et al., 1991; Jonas et al., 1989; McNab et al., 1990; Snape et al., 1990).

Allerdings spielen diese drei Faktoren auch bei der Regulation vieler anderer Gene eine Rolle. Beim humanen Gen für pro- α 1(I) Collagen wurden die Interaktionen dieser Transkriptionsfaktoren untersucht. Bei der Transmissions-Elektronenmikroskopie zeigten sich DNA Schleifen, die durch Protein-Protein Interaktionen hervorgerufen wurden. Die Faktoren Sp1 und AP-2 bringen den Promotor mit dem *enhancer* im Intron 1 über eine Schleife in Kontakt (Vergeer et al., 2000; Bornstein et al., 1988). Transaktivierung durch Sp1 und AP-1 wurde beispielsweise für die Promotoren des humanen GM-CSF, das murine Ferritin und den *porcine tissue factor* beschrieben (Ye et al., 1996b; Tsuji et al., 1998; Moll et al., 1995).

AP-1, ein ubiquitär vorkommender nukleärer Faktor, ist an der Zellproliferation vermittelt durch Wachstumsfaktoren beteiligt. Das DNA-Bindeprotein besitzt ein *leucine-zipper* Motiv

und setzt sich aus Jun/Jun Homo- oder Jun/Fos Heterodimeren zusammen (Abel und Maniatis, 1989; Angel und Karin, 1991). Die Bindung des Transkriptionsfaktors an die *consensus* Sequenz reguliert die transkriptionelle Aktivität AP-1 abhängiger Gene (Ryder et al., 1988; Ryseck et al., 1988). Beispielsweise werden Cytokingene, die AP-1 Elemente in ihren Promotoren enthalten durch diesen TF reguliert (Gottschalk et al., 1993; Rao, 1994).

AP-2 ist ein Transkriptionsfaktor epidermaler und neuronaler Zellen (Mitchell et al., 1991). Die genaue Rolle von AP-2 in epidermalen Genexpression ist noch nicht geklärt (Byrne et al., 1994). Funktionelle Bindungsstellen existieren in den 5' *upstream* Regionen vieler epidermal exprimierter Gene (Leask et al., 1990).

Sp1 wird konstitutiv in vielen Zelltypen exprimiert. Es ist als *zinc-finger* Protein an der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt (Kadonaga et al., 1987) (Courey und Tjian, 1988). Sp1 wirkt als proximaler Promotorfaktor, der die Transkription über spezifische Bindungsstellen aktiviert (Dyanan und Tjian, 1985; Dyanan et al., 1986; Ye et al., 1996a).

5,2 kb 5' *upstream* Sequenz des bovinen K5 führten zu einer 40fachen Expressionssteigerung im Reporterkonstrukt. Identifiziert wurde eine AP-1 Bindungsstelle bei ca. -1 kb, welche für die Transkriptionsstärke *in vitro* bedeutend ist. Allerdings stimulierte die AP-1 Bindungsstelle, enthalten in einem kleinen Fragment, die Expression nur um das 12fache. Erst das Zusammenspiel der AP-1 Bindungsstelle mit anderen Faktoren aus dem kompletten Fragment von 5,2 kb führt zur maximalen Expression des Vektors (Casatorres et al., 1994). Auch der bovine K6 Promotor wird durch Kontrollelemente im Bereich von -180 bp bis -605 bp reguliert, die eine zelltypspezifische Expression *in vitro* ermöglichen. Die weiter 5' *upstream* liegenden Sequenzen tragen in diesem Fall zu einer weiteren Expressionssteigerung nicht mehr bei (Blessing et al., 1989). Allerdings sind weiter 5' *upstream* liegende Sequenzen zwischen -4 und -9 kb für die gewebespezifische Expression im transgenen Tier essentiell (Ramirez et al., 1995). Beteiligt an der Kontrolle dieses Gens sind die Transkriptionsfaktoren AP-2 und AP-1 bzw. Retinsäure (*retinoic acid*-RA) über ein RARE Motiv (*retinoic acid-responsive element*), möglicherweise in Verbindung mit weiteren Faktoren. (Navarro et al., 1995). Retinsäure kann die transkriptionelle Aktivität AP-1 abhängiger Gene wie der Collagenase reprimieren. Der RA Rezeptor α formt mit c-Jun Komplexe und verhindert die Bindung an die Ziel-Sequenz (Schule et al., 1991).

4.3 Identifizierung regulatorischer Elemente

Die Charakterisierung der Vektoren C1-EGFP bis C4-EGFP hatte gezeigt, daß die längeren 5' *upstream* Sequenzen der Konstrukte C3 und C4 tatsächlich *enhancer* Elemente enthalten müssen, welche die Expression eines K20 Expressionsvektors *in vitro* verstärken können. Die Lokalisation dieser Elemente wurde mit den Vektoren (F1-F5)-C2-EGFP durchgeführt, die jeweils Teile des 21,5 kb 5' *upstream* Bereichs enthalten. Diese Sequenzen wurden ebenfalls *in vitro* charakterisiert. C0-EGFP mit 226 bp Minimalpromotor diente als Kontrolle, auf die sich die Expressionsstärken der anderen Vektoren beziehen. Die Konstrukte (F1-F5)-C2-EGFP erreichten bei den durchgeführten stabilen Transfektionen sehr unterschiedliche EGFP Expressionsstärken. Lediglich die am weitesten 5' *upstream* liegenden Fragmente F5 (-21,5 kb bis -18,4 kb) und F4 (-18,4 kb bis -14,9 kb) konnten die Expression um das 7fache bzw. das 6fache gegenüber C0-EGFP signifikant steigern. Die Fragmente F3-F1 (-14,9 kb bis -4,8 kb) erreichten lediglich eine 1,5 bis 1,9fache Expressionssteigerung.

Die expressionssteigernden Effekte der Fragmente F5 und F4 korrelieren mit dem Auftreten von Transkriptionsfaktorbindungsstellen in diesen beiden Abschnitten. Mit dem Programm *Proscan* (<http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan>, Version 1.7, Prestridge, 1995) wurde die komplette Sequenz des 137 kb langen PAC Klon AC004231 nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren durchsucht. Auf den Transkriptionsstart des K20 bezogen wurde der Bereich von -78,7 kb bis 58,3 kb berücksichtigt. Identifiziert wurde in Fragment F4 ein *cluster* mit vier Sp1 Bindungsstellen bei -16,4 kb. Im Fragment F5 sind eine AP-2 und Sp1 Erkennungssequenz bei -20,6 kb lokalisiert. Die Bindungsstellen der Fragmente F4 und F5 tragen zur Steigerung der Expression bei, da mit C3-EGFP und C4-EGFP die Expressionsstärke gesteigert wurde, welche beide Elemente enthalten. Das längste Konstrukt C3-EGFP enthält zwar auch beide Fragmente, erreicht aber nicht ganz die Expressionsstärke des Vektors C4-EGFP. Dies zeigte sich auch schon bei der Untersuchung der stabil transfizierten Einzelklone. Hier wurde schon die Integration des Vektors in Abhängigkeit von der Vektorlänge angesprochen. Möglicherweise ist aber das in C4-EGFP enthaltene Hybrid-Intron 1/7 ein Grund für die stärkere Expression. Hybrid-Introns in Vektoren können im Vergleich zu Konstrukten ohne Intron die Transkription und/oder Prozessierung um das 5-300fache steigern. Außerdem unterstützen Hybrid-Introns manchmal die Transkription und Prozessierung effektiver als natürlich vorkommende Introns (Choi et al., 1991).

4.4 Zelltypspezifische EGFP Expression

Die Zelllinie HT-29 leitet sich von einem humanen Colon Adenokarzinom ab, die endogen K20 exprimiert (Moll et al., 1992; Moll et al., 1993). Die starke K20 Expression der Linie wurde auch im Western-Blot bestätigt. Die transiente Transfektion der HT-29 Zellen ergab eine sehr schlechte Transfektionseffizienz mit allen getesteten Transfektionsmethoden. Da die HT-29 Zellen sich nur sehr schwer transfizieren lassen, lagen die Effizienzen selbst mit einem kommerziellen Transfektionsreagenz unter 0,1 %, obwohl dieses die besten Ergebnisse lieferte. Untersucht wurde die zelltypspezifische Expression der Vektoren C1-, C2-, C3- und C4-EGFP in HT-29 und HeLa Zellen. Fluoreszierende Zellen ließen sich mit den vier Konstrukten lediglich in den HT-29 Zellen beobachten, nicht aber in den Kontrolltransfektionen mit HeLa Zellen. Alle Vektoren zeigen also eine vom Zelltyp abhängige Expression. Unterschiede ergaben sich lediglich in der Stärke der EGFP Expression. Transfektionen mit C1-EGFP und C2-EGFP ergaben kaum wahrnehmbare Signale. Die Konstrukte C3-EGFP und C4-EGFP lieferten teilweise sehr starke Fluoreszenzen, wo die EGFP Expression in den Zellen um ein vielfaches höher liegen musste als im Vergleich zu C1-EGFP und C2-EGFP. Diese Ergebnisse bestätigen die quantitativen Messwerte stabiler Transfektion.

Die zelltypspezifische Expression unter Kontrolle des K20 Promotors ist demnach mit allen vier Konstrukten gegeben. Die Kontrollelemente für die Gewebespezifität müssen entweder proximal des Promotors bis -4,8 kb liegen, oder im 3' *downstream* Bereich bis 12,9 kb lokalisiert sein. Diese Sequenzen sind in allen K20-Vektoren enthalten. Für die Regulation kommen z.B. Elemente in Frage, die im Bereich bis -1,2 kb vor dem Transkriptionsstartsignal des K20 liegen. Bei den meisten Keratingenen sind hier Bindungsstellen für AP-1, AP-2 und Sp1 zu finden, die an der Regulation der Gene beteiligt sind. Beim K20 sind proximal des Promotors von -100 bp bis -275 bp zwei AP-2 und eine Sp1 Bindungsstelle lokalisiert. In einem zweiten Abschnitt von -978 bp bis -1147 bp sind zwei weitere Bindungsstellen für AP-2, zwei für Sp1 und eine für AP-1 lokalisiert. Beim Gen für bovines K5 wurde ein epithelspezifisches AP-1 Element bei -960 bp beschrieben, welches die Expression *in vitro* um das 10fache steigert, aber auch für die Zelltypspezifität verantwortlich ist. Ebenso sind im proximalen Promotorbereich zwischen -35 bp und -105 bp zwei Sp1 und eine AP-2 Bindungsstelle zu finden (Casatorres et al., 1994).

Das humane Gen für K4 enthält bei -315 bp eine AP-2 Bindungsstelle, die für die Expression *in vitro* entscheidend ist. Wird die Sequenz deletiert, ist keine Expression des Reporterkonstrukts mehr nachweisbar. Allerdings sind noch weitere Transkriptionsfaktoren

an der Regulation der Expression beteiligt. Diese Elemente liegen noch weiter 5' *upstream* und steigern die Expression um das dreifache (Wanner et al., 1997).

Auch beim bovinen Gen für K6 sind regulatorische Elemente zur gewebespezifischen Expression in unmittelbarer Nähe zum Promotor lokalisiert. Die Sequenz bis -605 bp vor der *cap-site* ist für maximale Expression eines Reporterkonstrukts *in vitro* ausreichend. Die zelltypspezifische Expression ist gewährleistet (Blessing et al., 1989). Allerdings ist für eine starke Expression *in vivo* ein wesentlich längerer 5' *upstream* Bereich notwendig. Zufriedenstellende gewebespezifische Expression in transgenen Mäusen wurde erst mit einem Vektor erreicht, der eine 11 kb lange 5' *upstream* Sequenz beinhaltet. Der Vektor mit 605 bp *upstream* Bereich war in transgenen Tieren völlig inaktiv (Blessing et al., 1995; Ramirez et al., 1995; Casatorres et al., 1994). Die Kooperation der Bereiche -9 kb bis -4 kb und -830 bp bis -180 bp ist für eine spezifische Expression in transgenen Tieren ausschlaggebend (Ramirez et al., 1998). Der *enhancer* für die Expression *in vitro* ist zwischen -180 bp und -605 bp lokalisiert und enthält zwei AP-1 Bindungsstellen und ein RARE Element. Die beiden AP-1 Bindungsstellen sind vermutlich für die suprabasale Induktion des K6 verantwortlich. Welche Rolle ein ebenfalls vorhandenes AP-2 Element einnimmt ist noch unklar. Über das RARE Motiv ist eine Induktion des Promotors mit Retinsäure möglich. Wird die Sequenz deletiert, entfällt die Induzierbarkeit des Gens (Navarro et al., 1995).

4.5 Generierung transgener Mauslinien

Der K20 Expressionsvektor ist im Vergleich zu einer Vielzahl auf Keratingenen basierender Vektoren noch nie zur Generierung transgener Tiere eingesetzt worden. Mit einem K20 Konstrukt soll die gewebespezifische Expression eines Transgens in mucosalen Schichten des Darmepithels ermöglicht werden. Besonderes Interesse gilt dem Cytokin TGF- β , welches für die Homöostase des Epithels eine wichtige Rolle spielt (Planchon et al., 1999). Eine Überexpression von TGF- β bzw. die Expression eines dominant negativen TGF- β Rezeptors im Darmepithel könnte Aufschluß über die Entstehung und Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen geben. Es gibt einige Hinweise, daß TGF- β bei der ulcerativen Colitis und Morbus Crohn eine wesentliche Rolle einnimmt (Neurath et al., 1996; Powrie et al., 1996; Autenrieth et al., 1997). Mit den Expressionsvektoren C1-TGF- β und C1-dn RII wurden transgene Mäuse durch Mikroinjektion in den männlichen Pronukleus generiert (Hogan et al., 1986). Aus den Mikroinjektionen mit C1-dn RII gingen drei *founder* hervor mit denen zwei transgene Linien (Tg-C1-dn RII_{1,2}) etabliert werden konnten. Ebenfalls

drei *founder* wurden mit dem Vektor C1-TGF- β generiert, allerdings ließ sich nur eine transgene Linie (TgC1-TGF- β_1) etablieren.

Mit dem Konstrukt C4-EGFP wurden fünf transgene *founder* generiert, die alle das Transgen transmitierten und als Mauslinien etabliert werden konnten (Tg-C4-EGFP₁₋₅). Der C4-EGFP Vektor wurde zuerst verwendet, weil dieser in den Transfektionsexperimenten die stärkste EGFP Expression gezeigt hatte. Das Konstrukt C3-EGFP wurde zuletzt zur Mikroinjektion eingesetzt, woraus 14 *founder* hervorgingen. Bisher konnten acht transgene Linien etabliert werden (Tg-C3-EGFP₁₋₈). Alle transgenen *founder* und F1 Nachkommen zeigten im Vergleich zu den nichttransgenen Geschwistern keine Auffälligkeiten.

Alle durchgeführten Untersuchungen wurden an heterozygoten Tieren dieser transgenen Linien durchgeführt. Als Kontrollen dienten die nichttransgenen Geschwistertiere.

4.6 Gewebespezifische Expression der Transgene

Die gewebespezifische Expression der Transgene in den Linien Tg-C1-TGF- β_1 , TgC1-dn RII₁ und Tg-C1-dn RII₂ wurden mittels RT-PCR Analyse der Organe Magen, Dünndarm, Blinddarm, Dickdarm, Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge und Rückenhaut nachgewiesen. Unter Verwendung spezifischer Primerkombination gerichtet gegen die klonierte cDNA (TGF- β , dn RII) und das Exon 2 des K20 Gens, konnte transgenspezifische Expression nachgewiesen werden. Die RT-PCR wurde über das Intron 1 des K20 durchgeführt, somit ist gesichert, daß es sich bei dem PCR Produkt um ein cDNA-Signal und nicht um ein genomisches Artefakt handelt. Da das Intron 1 des K20 2,15 kb groß ist, lassen sich Signale von Verunreinigungen mit genomischer DNA in der RNA deutlich vom erwarteten kleineren cDNA Signal unterscheiden (Blessing et al., 1996; Breuhahn et al., 2000). Lediglich in den intestinalen Geweben Magen, Dünndarm, Appendix und Colon transgener Tiere wurden RT-PCR Signale detektiert. Kontrolltiere wiesen diese Banden nicht auf. Dieses gewebespezifische Expressionsmuster zeigte sich bei allen drei untersuchten Linien.

Northern-Blot Analysen der transgenen Linien Tg-C1-TGF- β_1 , TgC1-dn RII₁ und Tg-C1-dn RII₂, durchgeführt mit RNAs isoliert aus den gleichen Geweben wie bei der RT-PCR, ergaben keine transgenspezifischen Signale. Unter Nutzung einer Sonde gerichtet gegen die Exons 3-8 des K20, welche sowohl die endogene K20 mRNA als auch das Transkript des TGF- β bzw. des dn RII erkennt, konnte transgenspezifische Expression in keinem der verwendeten Gewebe nachgewiesen werden. Erwartet wurde die transgenspezifische mRNA Bande bei ca. 2,8 kb für TGF- β bzw. 2,3 kb für dn RII. Da sich in allen drei transgenen Linien keine spezifische RNA nachweisen ließ, kann die Möglichkeit von Positionseffekten bei der

Integration ins Genom größtenteils ausgeschlossen werden. Lediglich das murine endogen exprimierte K20 intestinaler Gewebe erzeugte starke gewebespezifische Signale bei 1,7 kb. Dies korreliert mit der für K20 beschriebenen mRNA Größe (Moll et al., 1993). Der Magen zeigte nur schwache endogene K20 Expression, hingegen zeigte sich besonders im Dünndarm, aber auch im Blinddarm und Dickdarm massive Expression. Die Kontrollgewebe Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge und Rückenhaut blieben signalfrei.

Diese Ergebnisse zeigen, daß endogenes K20 gewebespezifisch exprimiert wird und die transgenspezifische Expression schwach ist. Die K20 Expressionskassette ist für eine gewebespezifische Expression der Transgene in intestinaler Mucosa geeignet, allerdings ist die Expressionsstärke schwach, da nur mittels RT-PCR nachweisbar.

Die Untersuchung der EGFP Expression der Linien Tg-C3-EGFP₁₋₈ und Tg-C4-EGFP₁₋₅ wurde an Schnitten des Intestinaltrakts durchgeführt. In keinem der transgenen Tiere aller Linien konnte EGFP Fluoreszenz in Zellen des Mucosaepithels nachgewiesen werden. Die Vermutung, daß EGFP durch die cytoplasmatischen Bedingungen in Enterocyten nicht aktiv ist, konnte durch die ubiquitäre Expression in einer knock-in Maus widerlegt werden. Das EGFP wird in allen Zellen der Maus inklusive der Darmmucosa exprimiert (Constien et al., 2001).

4.7 Kontrollelemente der K20 Transkription

Offensichtlich reicht für eine starke gewebespezifische Expression von Transgenen unter Kontrolle des K20 Promotors ein Bereich von -21,5 kb bis 12,9 kb immer noch nicht aus. Die gewebespezifische Expression der Konstrukte ist zwar gegeben, dies wurde *in vitro* mit den Transfektionen der HT-29 Zellen, aber auch *in vivo* mit den transgenen C1-dn RII Tieren gezeigt. Es fehlen aber noch weitere Faktoren, um mit dem K20 Expressionsvektor eine der endogenen K20 Expression vergleichbarer Stärke zu erreichen.

Die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und Sp1 spielen bei den Keratingenen eine entscheidende Rolle (Magnaldo et al., 1993; Ohtsuki et al., 1993). Beim Keratin 5 sind zwei Sp1 und eine AP-2 Bindungsstelle im Bereich bis -100 bp des Promotors lokalisiert. Die Expressionsstärke wird durch einen *enhancer* reguliert, der zwischen -762 bp und -1009 bp *upstream* des Transkriptionsstarts liegt. Das enthaltene AP-1 Element verstärkt die Expression um den Faktor 6 bis 10, abhängig vom verwendeten Reporterkonstrukt. Es handelt sich um einen gewebespezifischen *enhancer*, denn wird die AP-1 Sequenz mutiert, geht auch die Gewebespezifität verloren (Casatorres et al., 1994).

Auch beim Keratin 6 dirigiert ein zelltypspezifischer *enhancer* die Expression in das entsprechende Epithel. Der Bereich bis -605 bp vor der *cap-site* kann in einem Reporter-Assay die Expression um ca. das 100fache steigern (Blessing et al., 1989).

Im Fall des K20 ist die Verteilung der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen ähnlich wie bei den anderen Keratingenen. Im Bereich bis -120 bp vor der *cap-site* sind eine AP-2 und eine Sp1 Bindungsstelle lokalisiert. Weiter *upstream* zwischen -1150 bp bis -970 bp liegen zwei weitere AP-2, eine Ap-1 und zwei Sp1 Bindungsstellen in einem *cluster*. Diese Faktoren sind zwar für die gewebespezifische Expression des K20 *in vitro* und *in vivo* ausreichend, allerdings ist die Expressionsstärke sehr gering. Erst im Zusammenspiel mit dem *enhancer* aus dem Fragment F4 kommt es zur Expressionssteigerung. Verantwortlich dafür sind vermutlich die vier Sp1 Bindungsstellen bei -16,4 kb. Für K3 und K16 wurden Sp1 Elemente beschrieben, welche die Promotoren *in vitro* aktivierten (Chen et al., 1997; Magnaldo et al., 1993). Der *enhancer* in F5 stimuliert das Reporterkonstrukt in ähnlicher Weise wie F4. Enthalten sind je eine Ap-2 und Sp1 Bindungsstelle bei -20,6 kb. Die Funktion des AP-2 kann je nach Keratingen variieren. Aktivierender Einfluß zeigte sich auf die Expression des K4, K14 und K16 (Wanner et al., 1997; Leask et al., 1991; Sinha et al., 2000; Magnaldo et al., 1993). Hingegen wirkt AP-2 als Repressor auf die K3 Expression, indem es die Sp1 Aktivität supprimiert (Chen et al., 1997). Beim K10 Gen konnte *in vivo* gezeigt werden, daß C/EBP den Promotor aktiviert und AP-2 dies unterdrückt. (Maytin et al., 1999). Bisher wurden für kein Keratingen Transkriptionsfaktoren beschrieben, die so weit 5' *upstream* der Initiationssequenz binden und für eine adäquate Proteinexpression *in vivo* noch *in vitro* notwendig wären.

Möglicherweise spielt ein *cluster* mit vier Sp1 Bindungsstellen bei -26 kb eine essentielle Rolle bei der K20 Regulation *in vivo*. Weitere relevante Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren noch weiter 5' *upstream* wurden mit dem Programm *Proscan* nicht identifiziert, da sich dann bereits das Gen für Keratin 23 anschließt.

Die Exon/Intronsequenzen spielen beim K20 keine Rolle, da die Vektoren C3-EGFP und C4-EGFP *in vivo* keine Unterschiede in der Expression zeigten. Bezüglich der Promotoraktivität macht es demnach keinen Unterschied ob das Konstrukt die Exons 2-7 enthält oder nicht. Regulatorische Elemente in Exons oder Introns wie beim K18 können für die Expression *in vivo* ausgeschlossen werden (Oshima et al., 1990; Neznanov et al., 1997). Offensichtlich muß zwischen Keratingenen einfacher und stratifizierter Epithelien bezüglich der Regulation unterschieden werden. Die in einfachen Epithelien exprimierten Gene für K8, K18 und K19 sind anders strukturiert, dies zeigte sich bei der Generierung transgener Tiere und den resultierenden Expressionsmustern analysierter Gewebe. K8 bildet mit den Partnern K18, K19

und K20 spezifische Heterodimere, charakteristisch für das jeweilige Epithel (Moll et al., 1982; Eichner et al., 1984).

In transgenen Mäusen, generiert mit dem humanen Gen für K8, läßt sich transgene Expression in Trachea, Lunge, Magen, Darm, Leber, Niere, Thymus und verschiedenen Drüsen nachweisen, die weitgehend dem endogenen Muster entspricht. Das verwendete K8 Konstrukt hatte eine Länge von 12 kb inklusive 1,1 kb 5' *upstream* Sequenz und 3,2 kb 3' flankierender Sequenz. Bei allen Linien ließ sich gewebespezifische Expression abhängig von der Kopienzahl und unabhängig vom Integrationsort nachweisen. Lediglich bei einer Linie, bei der das Transgen extrem stark exprimiert wurde, kam es beispielsweise zur untypischen Expression in der Basalschicht der Epidermis. Wurden die Exon/Intronsequenzen des Konstrukts durch das bakterielle *lacZ* Gen ersetzt, war keine transgenspezifische Expression mehr nachweisbar. Die Autoren vermuten deshalb Bindungsstellen für regulatorische Elemente in den intragenischen Sequenzen des K8 (Casanova et al., 1995).

Solche Bindungsstellen wurden für das K18 bereits beschrieben. Mit einem 10 kb Vektor inklusive 2,5 kb 5' und 3,5 kb 3' flankierender Sequenz konnte gewebespezifische Expression in Leber, Lunge, Darm, Niere und Gehirn transgener Mäuse gezeigt werden. Alle dafür notwendigen regulatorischen Elemente sind offenbar in dem Konstrukt enthalten (Abe und Oshima, 1990). Allerdings fehlte die Expression in Milz, Herz und Skelettmuskel. An der K18 Regulation beteiligt sind AP-1 und ETS Bindungsstellen sowie drei *silencer* im Intron 1, sowie AP-1 im Exon 6 und proximal des Promotors lokalisierte Faktoren (Pankov et al., 1994b; Umezawa et al., 1997; Neznanov et al., 1997).

K19 wiederum wird durch einen 3' *enhancer* mit AP-1 Element reguliert, der mit dem proximalen Promotor interagiert (Hu und Gudas, 1994).

Die bisher für die Charakterisierung des K20 verwendeten Sequenzen haben noch keine absolute Klarheit über die Regulation des Gens erbracht. Vermutlich sind die Elemente bis -1,2 kb oder auch die 3' Sequenz an der zelltyp- und gewebespezifischen Expression beteiligt, da alle vier verwendeten Vektoren Zelltypspezifität *in vitro* zeigten. Die Veränderung des Exon/Intronbereichs hatte keinen Effekt auf das Expressionsmuster, dies zeigte sich bei der Charakterisierung der K20 Sequenzen. Für eine starke Expression *in vitro* sind die Fragmente F4 und F5 sicherlich ausreichend, allerdings trifft dies für die transgenen Tiermodelle nicht zu. Möglicherweise ist der in den Vektoren enthaltene 3' Bereich nicht ausreichend und notwendige regulatorische Elemente befinden sich weiter *downstream* der verwendeten Sequenz.

Die Keratogene K23 und K12 flankieren K20 im *cluster* der Typ I Keratine. Bis auf deren Sequenz und ihre Funktion ist nichts über die Regulation bekannt. Sie wurden auch noch

nicht zur Generierung transgener Tiere eingesetzt (Nishida et al., 1997; Zhang et al., 2001). Die Möglichkeit, daß diese Keratingene von einer *lucus control region* (LCR) kontrolliert werden kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Für Keratingene, die auch in zwei clustern organisiert sind, wurden LCRs noch nie beschrieben. Beispiele für LCR Funktionen sind für den humanen Globinlokus oder den *cluster* humaner Wachstumsfaktoren beschrieben worden (Grosveld et al., 1987; Jones et al., 1995). Für den Globinlokus wurden LCRs identifiziert, die bis zu 50 kb 5' *upstream* bzw. 20 kb 3' *downstream* von den einzelnen Genen entfernt sind. Ein Konstrukt aus LCRs und β -Globingen erreichte positionsunabhängige Expression in transgenen Mäusen, vergleichbar der endogenen Expressionsstärke (Grosveld et al., 1987). Ohne die Kontrollelemente variiert die Expression des β -Globins in Abhängigkeit vom Integrationsort des Konstrukts in jeder transgenen Linie (Magram et al., 1985; Chada et al., 1985).

Im *cluster* der humanen Wachstumshormone sind fünf Gene in einem Bereich von 48 kb lokalisiert. Die Gene zeigen inklusive der Promotoren ca. 90% Sequenzidentität, werden aber in unterschiedlichen Geweben wie Hypophyse oder Plazenta exprimiert (Barsh et al., 1983; Chen et al., 1989). Das hGH-N, welches am weitesten 5' im *cluster* liegt, wird ausschließlich in der Hypophyse exprimiert. In transgenen Mäusen reichte für eine transgenspezifische Expression des hGH-N ein 4,6 kb 5' *upstream* und 26 kb 3' *downstream* Bereich nicht aus. Erst die Verwendung eines Vektors mit 40 kb *upstream* Sequenz gewährleistete adäquate gewebespezifische Genexpression. Die enthaltenen zwei Kontrollregionen bei -15 kb und -30 kb dirigieren transgenspezifisch die Expression des hGH in die Hypophyse. Sie können auch separat die Expression unabhängig vom Integrationsort verstärken, allerdings geht dabei die Gewebespezifität und physiologische Kontrolle verloren. Die identifizierten Elemente sind Teil einer LCR, die für die kontrollierte Expression der Gene des hGH clusters verantwortlich ist (Jones et al., 1995).

4.8 Ausblick

Die Charakterisierung der Linien Tg-C3-EGFP₁₋₈ und Tg-C4-EGFP₁₋₅ hatte keine EGFP Proteinexpression in transgenen Tieren gezeigt. Die Regulation *in vivo* ist komplexer als dies die *in vitro* Ergebnisse vermuten ließen. Die Exon/Intronsequenzen des K20 spielen bei der Aktivierung der verwendeten Konstrukte keine Rolle. Regulatorische Elemente müssen weiter 5' oder 3' des untersuchten Sequenzbereichs von -21,5 kb bis 12,9 kb liegen. Deshalb wird der Sequenzbereich bei -26 kb für weitere Untersuchungen *in vitro* kloniert. Die mit *Proscan* dort identifizierten Sp1 Motive sind möglicherweise an der Regulation des K20 *in vivo* mit beteiligt. Näher untersucht werden muß auch der 3' *downstream* Bereich des K20, da sich dort noch Kontrollelemente für die Transkription wie bei K19 befinden könnten. Sollte sich bei den Zellkulturexperimenten zeigen, daß die untersuchten Sequenzen *enhancer*-Eigenschaften besitzen, werden diese in Verbindung mit den Fragmenten F4 und F5 zur Generierung neuer K20 Expressionsvektoren genutzt. Die Funktionalität der Konstrukte wird zuerst mit der cDNA für EGFP in transgenen Mäusen überprüft, um damit die gewebespezifische Expression in Enterocyten zu zeigen. Wenn die klonierten Abschnitte die erwartete Funktion nicht übernehmen, wird der komplette PAC Klon AC004231 nach Kontrollelementen durchsucht.

Sind die notwendigen Faktoren für eine starke gewebespezifische Expression in intestinaler Mucosa gefunden, steht die Untersuchung der TGF- β Funktion bei entzündlichen Erkrankungen des Intestinalsystems wieder im Vordergrund. Hierfür werden die cDNAs für TGF- β und den dn RII in den Vektor kloniert und diese zur Pronukleusinjektion eingesetzt.

5. Zusammenfassung

Keratin 20 ist ein Intermediärfilament, das als Strukturelement in den Epithelien des Intestinaltrakts und den Merkelzellen der Haut exprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene K20 Expressionsvektoren generiert, mit denen die gewebespezifische Expression *in vitro* und *in vivo* analysiert wurde. Die Vektoren basieren auf den Klonen CK20-IT19 und $\lambda 6k$. Charakterisiert wurde mit diesen beiden Klonen ein Bereich von -21,5 kb bis 12,9 kb vom Transkriptionsstart des K20. Insgesamt wurden zehn K20-EGFP Vektoren kloniert und für stabile Transfektionen von K20 exprimierenden HT-29 Zellen eingesetzt. Die Vektoren, welche die Sequenz von -21,5 kb bis 12,9 kb umfassten, konnten die Expression bis zum 80fachen gegenüber den Konstrukten mit 4,8 kb 5' *upstream* Bereich steigern. Zur Identifizierung regulatorischer Elemente in der 5' *upstream* Sequenz wurde diese in die Fragmente F1-F5 unterteilt und ebenfalls *in vitro* mittels EGFP Assays auf *enhancer* Eigenschaften untersucht. Die zwei am weitesten 5' liegenden Fragmente F5 (-21,5 bis -18,4 kb) und F4 (-18,4 bis -14,9 kb) verstärkten die Expression der Reporterkonstrukte signifikant. Bei der Datenbankrecherche fanden sich im Fragment F5 mehrere Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren (TF) Sp1 und AP-1 bei -20,6 kb bzw. sind im Fragment F4 vier Sp1 Erkennungssequenzen bei -16,4 kb lokalisiert. Diese TF spielen bei der Regulation von Keratingenen eine wichtige Rolle und werden auch im Fall des K20 für die Steigerung der Expression verantwortlich gemacht. Die übrigen Fragmente F1-F3 konnten die Expressionsstärke der Reporterkonstrukte nicht signifikant steigern. Die strikte Zelltypspezifität der verwendeten K20 Vektoren wurde mit stabilen und transienten Transfektionen von HT-29 und HeLa Zellen verifiziert.

Zur Generierung transgener Mäuse wurden verschiedene K20 Expressionskassetten verwendet. Die cDNAs für TGF- β und den dominant negativen TGF- β Typ II Rezeptor wurden in einen K20 Vektor mit 4,8 kb 5' *upstream* Sequenz eingefügt. Mit diesen Konstrukten wurden, mittels Pronukleusinjektion, transgene Tiere generiert und die gewebespezifische mRNA Expression der Transgene untersucht. In intestinalen Geweben konnte mittels RT-PCR transgenspezifische RNA nachgewiesen werden. Mit Northern-Blot Analysen wurde in keinem Gewebe transgenspezifische Expression detektiert. Die K20-EGFP Vektoren mit 21,5 kb 5' *upstream* Sequenz wurden ebenfalls zur Generierung transgener Tiere eingesetzt. Allerdings konnte in diesen Tieren keine EGFP Fluoreszenz in Enterocyten oder anderen Geweben nachgewiesen werden. Für die gewebespezifische Expression des K20 Vektors reicht die 4,8 kb 5' *upstream* Sequenz aus, der Bereich bis -21,5 kb verstärkt die Expression *in vitro*, allerdings fehlen für die starke gewebespezifische Expression von Transgenen *in vivo* noch weitere Kontrollelemente.

6. Literatur

- Abe, M. and Oshima, R. G.** (1990). A single human keratin 18 gene is expressed in diverse epithelial cells of transgenic mice. *J Cell Biol* **111**, 1197-206.
- Abel, T. and Maniatis, T.** (1989). Gene regulation. Action of leucine zippers. *Nature* **341**, 24-5.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. and Gerace, L.** (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560-4.
- Ahuja, S. S., Paliogianni, F., Yamada, H., Balow, J. E. and Boumpas, D. T.** (1993). Effect of transforming growth factor-beta on early and late activation events in human T cells. *J Immunol* **150**, 3109-18.
- Amendt, C., Schirmacher, P., Weber, H. and Blessing, M.** (1998). Expression of a dominant negative type II TGF-beta receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene* **17**, 25-34.
- Angel, P. and Karin, M.** (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 129-57.
- Attisano, L., Wrana, J. L., Lopez-Casillas, F. and Massague, J.** (1994). TGF-beta receptors and actions. *Biochim Biophys Acta* **1222**, 71-80.
- Autenrieth, I. B., Bucheler, N., Bohn, E., Heinze, G. and Horak, I.** (1997). Cytokine mRNA expression in intestinal tissue of interleukin-2 deficient mice with bowel inflammation. *Gut* **41**, 793-800.
- Bader, B. L. and Franke, W. W.** (1990). Cell type-specific and efficient synthesis of human cytokeratin 19 in transgenic mice. *Differentiation* **45**, 109-18.
- Bailleul, B., Surani, M. A., White, S., Barton, S. C., Brown, K., Blessing, M., Jorcano, J. and Balmain, A.** (1990). Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* **62**, 697-708.
- Barsh, G. S., Seeburg, P. H. and Gelinas, R. E.** (1983). The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acids Res* **11**, 3939-58.
- Basehoar, G. and Berns, M. W.** (1973). Cloning of rat kangaroo (PTK2) cells following laser microirradiation of selected mitotic chromosomes. *Science* **179**, 1333-4.
- Bedossa, P., Peltier, E., Terris, B., Franco, D. and Poynard, T.** (1995). Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* **21**, 760-6.
- Blessing, M., Jorcano, J. L. and Franke, W. W.** (1989). Enhancer elements directing cell-type-specific expression of cytokeratin genes and changes of the epithelial cytoskeleton by transfections of hybrid cytokeratin genes. *Embo J* **8**, 117-26.

Blessing, M., Nanney, L. B., King, L. E. and Hogan, B. L. (1995). Chemical skin carcinogenesis is prevented in mice by the induced expression of a TGF-beta related transgene. *Teratog Carcinog Mutagen* **15**, 11-21.

Blessing, M., Nanney, L. B., King, L. E., Jones, C. M. and Hogan, B. L. (1993). Transgenic mice as a model to study the role of TGF-beta-related molecules in hair follicles. *Genes Dev* **7**, 204-15.

Blessing, M., Schirmacher, P. and Kaiser, S. (1996). Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions. *J Cell Biol* **135**, 227-39.

Blose, S. H. and Meltzer, D. I. (1981). Visualization of the 10-NM filament vimentin rings in vascular endothelial cells in situ: close resemblance to vimentin cytoskeletons found in monolayers in vitro. *Exp Cell Res* **135**, 299-309.

Booth, D., Haley, J. D., Bruskin, A. M. and Potten, C. S. (2000). Transforming growth factor-B3 protects murine small intestinal crypt stem cells and animal survival after irradiation, possibly by reducing stem-cell cycling. *Int J Cancer* **86**, 53-9.

Border, W. A. and Noble, N. A. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**, 1286-92.

Bornstein, P., McKay, J., Liska, D. J., Apone, S. and Devarayalu, S. (1988). Interactions between the promoter and first intron are involved in transcriptional control of alpha 1(I) collagen gene expression. *Mol Cell Biol* **8**, 4851-7.

Bovolenta, P., Liem, R. K. and Mason, C. A. (1984). Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev Biol* **102**, 248-59.

Brand, T., MacLellan, W. R. and Schneider, M. D. (1993). A dominant-negative receptor for type beta transforming growth factors created by deletion of the kinase domain. *J Biol Chem* **268**, 11500-3.

Breuhahn, K., Mann, A., Müller, K., Wilhelmi, A., Schirmacher, P., Enk, A. and Blessing, M. (2000). Overexpression of GM-CSF in the epidermis of transgenic mice induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. *Cell Growth & Differentiation* **11**, 111-121.

Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P. and Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**, 47-52.

Brunner, A. M., Marquardt, H., Malacko, A. R., Lioubin, M. N. and Purchio, A. F. (1989). Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J Biol Chem* **264**, 13660-4.

Byrne, C. and Fuchs, E. (1993). Probing keratinocyte and differentiation specificity of the human K5 promoter in vitro and in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **13**, 3176-90.

- Byrne, C., Tainsky, M. and Fuchs, E.** (1994). Programming gene expression in developing epidermis. *Development* **120**, 2369-83.
- Carmo-Fonseca, M. and David-Ferreira, J. F.** (1990). Interactions of intermediate filaments with cell structures. *Electron Microsc Rev* **3**, 115-41.
- Casanova, L., Bravo, A., Were, F., Ramirez, A., Jorcano, J. J. and Vidal, M.** (1995). Tissue-specific and efficient expression of the human simple epithelial keratin 8 gene in transgenic mice. *J Cell Sci* **108**, 811-20.
- Casatorres, J., Navarro, J. M., Blessing, M. and Jorcano, J. L.** (1994). Analysis of the control of expression and tissue specificity of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes. Fundamental role of an AP-1 element. *J Biol Chem* **269**, 20489-96.
- Cerwenka, A., Bevec, D., Majdic, O., Knapp, W. and Holter, W.** (1994). TGF-beta 1 is a potent inducer of human effector T cells. *J Immunol* **153**, 4367-77.
- Cerwenka, A., Kovar, H., Majdic, O. and Holter, W.** (1996). Fas- and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in the presence of TGF-beta 1. *J Immunol* **156**, 459-64.
- Chada, K., Magram, J., Raphael, K., Radice, G., Lacy, E. and Costantini, F.** (1985). Specific expression of a foreign beta-globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature* **314**, 377-80.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-5.
- Chen, E. Y., Liao, Y. C., Smith, D. H., Barrera-Saldana, H. A., Gelinas, R. E. and Seeburg, P. H.** (1989). The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* **4**, 479-97.
- Chen, T. T., Wu, R. L., Castro-Munozledo, F. and Sun, T. T.** (1997). Regulation of K3 keratin gene transcription by Sp1 and AP-2 in differentiating rabbit corneal epithelial cells. *Mol Cell Biol* **17**, 3056-64.
- Choi, T., Huang, M., Gorman, C. and Jaenisch, R.** (1991). A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **11**, 3070-4.
- Church, G. M. and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-5.
- Constien, R., Forde, A., Liliensiek, B., Grone, H. J., Nawroth, P., Hammerling, G. and Arnold, B.** (2001). Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis* **30**, 36-44.
- Cooper, D., Schermer, A. and Sun, T. T.** (1985). Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest* **52**, 243-56.

- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S.** (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-8.
- Courey, A. J. and Tjian, R.** (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**, 887-98.
- Dexter, D. L., Barbosa, J. A. and Calabresi, P.** (1979). N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* **39**, 1020-5.
- Downing, K. H. and Nogales, E.** (1998). Tubulin and microtubule structure. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 16-22.
- Dynan, W. S., Sazer, S., Tjian, R. and Schimke, R. T.** (1986). Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter. *Nature* **319**, 246-8.
- Dynan, W. S. and Tjian, R.** (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* **316**, 774-8.
- Ebner, R., Chen, R. H., Lawler, S., Zioncheck, T. and Derynck, R.** (1993). Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF-beta or activin. *Science* **262**, 900-2.
- Ehrhardt, R. O., Ludviksson, B. R., Gray, B., Neurath, M. and Strober, W.** (1997). Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* **158**, 566-73.
- Eichner, R., Bonitz, P. and Sun, T. T.** (1984). Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J Cell Biol* **98**, 1388-96.
- Espevik, T., Figari, I. S., Shalaby, M. R., Lackides, G. A., Lewis, G. D., Shepard, H. M. and Palladino, M. A., Jr.** (1987). Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J Exp Med* **166**, 571-6.
- Espevik, T., Waage, A., Faxvaag, A. and Shalaby, M. R.** (1990). Regulation of interleukin-2 and interleukin-6 production from T-cells: involvement of interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta. *Cell Immunol* **126**, 47-56.
- Fargeas, C., Wu, C. Y., Nakajima, T., Cox, D., Nutman, T. and Delespesse, G.** (1992). Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **22**, 2173-6.
- Fiocchi, C.** (1997a). The immune system in inflammatory bowel disease. *Acta Gastroenterol Belg* **60**, 156-62.
- Fiocchi, C.** (1997b). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* **273**, G769-75.
- Fogh and Trempe.** (1975). *Human Tumor Cells in Vitro*, Plenum Press, New York, 115-159.

- Franke, W. W., Hergt, M. and Grund, C.** (1987). Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* **49**, 131-41.
- Franke, W. W., Schiller, D. L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Krepler, R. and Platzer, B.** (1981). Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J Mol Biol* **153**, 933-59.
- Fuchs, E.** (1993). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* **17**, 197-208.
- Fuchs, E.** (1995). Keratins and the skin. *Ann Rev Cell Dev Biol* **11**, 123-53.
- Fuchs, E. and Cleveland, D. W.** (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-9.
- Fuchs, E. and Green, H.** (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033-42.
- Fuchs, E. and Weber, K.** (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**, 345-82.
- Gard, D. L. and Lazarides, E.** (1980). The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell* **19**, 263-75.
- Geiser, A. G., Letterio, J. J., Kulkarni, A. B., Karlsson, S., Roberts, A. B. and Sporn, M. B.** (1993). Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) controls expression of major histocompatibility genes in the postnatal mouse: aberrant histocompatibility antigen expression in the pathogenesis of the TGF- beta 1 null mouse phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9944-8.
- Glick, A. B., Kulkarni, A. B., Tennenbaum, T., Hennings, H., Flanders, K. C., O'Reilly, M., Sporn, M. B., Karlsson, S. and Yuspa, S. H.** (1993). Loss of expression of transforming growth factor beta in skin and skin tumors is associated with hyperproliferation and a high risk for malignant conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6076-80.
- Goldberg, R. B. and Timberlake, W. E.** (1980). Hybridization of scDNA does not lead to overestimates of mRNA complexity. *Nature* **283**, 601-3.
- Gottschalk, L. R., Giannola, D. M. and Emerson, S. G.** (1993). Molecular regulation of the human IL-3 gene: inducible T cell-restricted expression requires intact AP-1 and Elf-1 nuclear protein binding sites. *J Exp Med* **178**, 1681-92.
- Grady, W. M., Rajput, A., Myeroff, L., Liu, D. F., Kwon, K., Willis, J. and Markowitz, S.** (1998). Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* **58**, 3101-4.
- Granger, B. L. and Lazarides, E.** (1979). Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell* **18**, 1053-63.

- Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R. and Kollias, G.** (1987). Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* **51**, 975-85.
- Guo, Y. and Kyprianou, N.** (1999). Restoration of transforming growth factor beta signaling pathway in human prostate cancer cells suppresses tumorigenicity via induction of caspase-1-mediated apoptosis. *Cancer Res* **59**, 1366-71.
- Hahm, K. B., Im, Y. H., Lee, C., Parks, W. T., Bang, Y. J., Green, J. E. and Kim, S. J.** (2000). Loss of TGF-beta signaling contributes to autoimmune pancreatitis. *J Clin Invest* **105**, 1057-65.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P. and Webb, W. W.** (1998). Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13573-8.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P.** (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-71.
- Helms, C., Dutchik, J. E. and Olson, M. V.** (1987). A lambda DNA protocol based on purification of phage on DEAE-cellulose. *Methods Enzymol* **153**, 69-82.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G. and Galas, D. J.** (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* **17**, 6545-51.
- Herrmann, H. and Aebi, U.** (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 79-90.
- Hesse, M., Franz, T., Tamai, Y., Taketo, M. M. and Magin, T. M.** (2000). Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *Embo J* **19**, 5060-70.
- Hesse, M., Magin, T. M. and Weber, K.** (2001). Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* **114**, 2569-75.
- Hirokawa, N. and Heuser, J. E.** (1981). Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* **91**, 399-409.
- Hogan, B. L. M., Costantini, F. and Lacy, E.** (1986). *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hong, B. S. and Davison, P. F.** (1982). Biochemical and immunochemical evidence for the formation of a dimer of glial fibrillary acidic protein. *Biochim Biophys Acta* **700**, 16-23.

- Hu, L. and Gudas, L. J.** (1994). Activation of keratin 19 gene expression by a 3' enhancer containing an AP1 site. *J Biol Chem* **269**, 183-91.
- Huff, C. A., Yuspa, S. H. and Rosenthal, D.** (1993). Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression. *J Biol Chem* **268**, 377-84.
- Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y. and Okabe, M.** (1995). A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett* **375**, 125-8.
- Jiang, C. K., Epstein, H. S., Tomic, M., Freedberg, I. M. and Blumenberg, M.** (1991). Functional comparison of the upstream regulatory DNA sequences of four human epidermal keratin genes. *J Invest Dermatol* **96**, 162-7.
- Jonas, E. A., Snape, A. M. and Sargent, T. D.** (1989). Transcriptional regulation of a *Xenopus* embryonic epidermal keratin gene. *Development* **106**, 399-405.
- Jones, B. K., Monks, B. R., Liebhaber, S. A. and Cooke, N. E.** (1995). The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region. *Mol Cell Biol* **15**, 7010-21.
- Jones, J. C., Yokoo, K. M. and Goldman, R. D.** (1986). Is the hemidesmosome a half desmosome? An immunological comparison of mammalian desmosomes and hemidesmosomes. *Cell Motil Cytoskeleton* **6**, 560-9.
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. and Tjian, R.** (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**, 1079-90.
- Kanzler, S., Lohse, A. W., Keil, A., Henninger, J., Dienes, H. P., Schirmacher, P., Rose-John, S., Meyer zum Büschenfelde, K. H. and Blessing, M.** (1999). TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* **276**, G1059-68.
- Kanzler, S., Meyer, E., Lohse, A. W., Schirmacher, P., Henninger, J., Galle, P. R. and Blessing, M.** (2001). Hepatocellular expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor accelerates chemically induced hepatocarcinogenesis. *Oncogene* **20**, 5015-24.
- Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B. and Fauci, A. S.** (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* **163**, 1037-50.
- Khoury, S. J., Hancock, W. W. and Weiner, H. L.** (1992). Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* **176**, 1355-64.

- Kingsley, D. M.** (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8**, 133-46.
- Klymkowsky, M. W.** (1982). Vimentin and keratin intermediate filament systems in cultured PtK2 epithelial cells are interrelated. *Embo J* **1**, 161-5.
- Knaus, P. I., Lindemann, D., DeCoteau, J. F., Perlman, R., Yankelev, H., Hille, M., Kadin, M. E. and Lodish, H. F.** (1996). A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma. *Mol Cell Biol* **16**, 3480-9.
- Krempen, K., Grotkopp, D., Hall, K., Bache, A., Gillan, A., Rippe, R. A., Brenner, D. A. and Breindl, M.** (1999). Far upstream regulatory elements enhance position-independent and uterus-specific expression of the murine alpha(I) collagen promoter in transgenic mice. *Gene Expr* **8**, 151-63.
- Kriz, J., Zhu, Q., Julien, J. P. and Padjen, A. L.** (2000). Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Res* **885**, 32-44.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. and Muller, W.** (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263-74.
- Kulesh, D. A. and Oshima, R. G.** (1988). Cloning of the human keratin 18 gene and its expression in nonepithelial mouse cells. *Mol Cell Biol* **8**, 1540-50.
- Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M. and Karlsson, S.** (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 770-4.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Langbein, L., Rogers, M. A., Winter, H., Praetzel, S., Beckhaus, U., Rackwitz, H. R. and Schweizer, J.** (1999). The catalog of human hair keratins. I. Expression of the nine type I members in the hair follicle. *J Biol Chem* **274**, 19874-84.
- Lazarides, E., Granger, B. L., Gard, D. L., O'Connor, C. M., Breckler, J., Price, M. and Danto, S. I.** (1982). Desmin- and vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **46**, 351-78.
- Leask, A., Byrne, C. and Fuchs, E.** (1991). Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7948-52.
- Leask, A., Rosenberg, M., Vassar, R. and Fuchs, E.** (1990). Regulation of a human epidermal keratin gene: sequences and nuclear factors involved in keratinocyte-specific transcription. *Genes Dev* **4**, 1985-98.

Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C. and Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306**, 395-7.

Letterio, J. J. and Roberts, A. B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* **16**, 137-61.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. E. (2000). *Molecular Cell Biology*.

Ludviksson, B. R., Ehrhardt, R. O. and Strober, W. (1997). TGF-beta production regulates the development of the 2,4,6- trinitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin-induced colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* **159**, 3622-8.

Lyons, R. M. and Moses, H. L. (1990). Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur J Biochem* **187**, 467-73

Magnaldo, T., Bernerd, F., Freedberg, I. M., Ohtsuki, M. and Blumenberg, M. (1993). Transcriptional regulators of expression of K#16, the disease- associated keratin. *DNA Cell Biol* **12**, 911-23.

Magram, J., Chada, K. and Costantini, F. (1985). Developmental regulation of a cloned adult beta-globin gene in transgenic mice. *Nature* **315**, 338-40.

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. et al. (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability [see comments]. *Science* **268**, 1336-8.

Maytin, E. V., Lin, J. C., Krishnamurthy, R., Batchvarova, N., Ron, D., Mitchell, P. J. and Habener, J. F. (1999). Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2. *Dev Biol* **216**, 164-81.

McIntosh, J. R. and Hering, G. E. (1991). Spindle fiber action and chromosome movement. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 403-26.

McNab, A. R., Andrus, P., Wagner, T. E., Buhl, A. E., Waldon, D. J., Kawabe, T. T., Rea, T. J., Groppi, V. and Vogeli, G. (1990). Hair-specific expression of chloramphenicol acetyltransferase in transgenic mice under the control of an ultra-high-sulfur keratin promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6848-52.

Miller, A., Lider, O., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Weiner, H. L. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 421-5.

Mitchell, P. J., Timmons, P. M., Hebert, J. M., Rigby, P. W. and Tjian, R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* **5**, 105-19.

- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. and Krepler, R.** (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11-24.
- Moll, R., Lowe, A., Laufer, J. and Franke, W. W.** (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* **140**, 427-47.
- Moll, R., Schiller, D. L. and Franke, W. W.** (1990). Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* **111**, 567-80.
- Moll, R., Zimbelmann, R., Goldschmidt, M. D., Keith, M., Laufer, J., Kasper, M., Koch, P. J. and Franke, W. W.** (1993). The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* **53**, 75-93.
- Moll, T., Czyz, M., Holzmüller, H., Hofer-Warbinek, R., Wagner, E., Winkler, H., Bach, F. H. and Hofer, E.** (1995). Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells. Binding of NF kappa B-, AP-1-, and Sp1-like transcription factors. *J Biol Chem* **270**, 3849-57.
- Moorthi, C., Willers, I., Ressler, B. and Goedde, H. W.** (1993). Characterisation of human tumour cell lines using antibodies to intermediate filaments. *Pathobiology* **61**, 197-9.
- Motyl, T., Grzelkowska, K., Zimowska, W., Skierski, J., Wareski, P., Ploszaj, T. and Trzeciak, L.** (1998). Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Eur J Cell Biol* **75**, 367-74.
- Mule, J. J., Schwarz, S. L., Roberts, A. B., Sporn, M. B. and Rosenberg, S. A.** (1988). Transforming growth factor-beta inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. *Cancer Immunol Immunother* **26**, 95-100.
- Myeroff, L. L., Parsons, R., Kim, S. J., Hedrick, L., Cho, K. R., Orth, K., Mathis, M., Kinzler, K. W., Lutterbaugh, J., Park, K. et al.** (1995). A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* **55**, 5545-7.
- Nakao, A., Roijer, E., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Stenman, G., Heldin, C. H. and ten Dijke, P.** (1997). Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway. *J Neurosci* **17**, 1168-78.
- Navarro, J. M., Casatorres, J. and Jorcano, J. L.** (1995). Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. *J Biol Chem* **270**, 21362-7.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Presky, D. H., Waegell, W. and Strober, W.** (1996). Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med* **183**, 2605-16.

- Newey, S. E., Howman, E. V., Ponting, C. P., Benson, M. A., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Davies, K. E. and Blake, D. J.** (2001). Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. *J Biol Chem* **276**, 6645-55.
- Neznanov, N., Umezawa, A. and Oshima, R. G.** (1997). A regulatory element within a coding exon modulates keratin 18 gene expression in transgenic mice. *J Biol Chem* **272**, 27549-57.
- Neznanov, N. S. and Oshima, R. G.** (1993). cis regulation of the keratin 18 gene in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **13**, 1815-23.
- Nishida, K., Honma, Y., Dota, A., Kawasaki, S., Adachi, W., Nakamura, T., Quantock, A. J., Hosotani, H., Yamamoto, S., Okada, M. et al.** (1997). Isolation and chromosomal localization of a cornea-specific human keratin 12 gene and detection of four mutations in Meesmann corneal epithelial dystrophy. *Am J Hum Genet* **61**, 1268-75.
- Nishioka, Y.** (1995). The origin of common laboratory mice. *Genome* **38**, 1-7.
- Ohtsuki, M., Flanagan, S., Freedberg, I. M. and Blumenberg, M.** (1993). A cluster of five nuclear proteins regulates keratin gene transcription. *Gene Expr* **3**, 201-13.
- Oshima, R. G., Abrams, L. and Kulesh, D.** (1990). Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Dev* **4**, 835-48.
- Pankov, R., Neznanov, N., Umezawa, A. and Oshima, R. G.** (1994a). AP-1, ETS, and transcriptional silencers regulate retinoic acid-dependent induction of keratin 18 in embryonic cells. *Mol Cell Biol* **14**, 7744-57.
- Pankov, R., Umezawa, A., Maki, R., Der, C. J., Hauser, C. A. and Oshima, R. G.** (1994b). Oncogene activation of human keratin 18 transcription via the Ras signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 873-7.
- Planchon, S., Fiocchi, C., Takafuji, V. and Roche, J. K.** (1999). Transforming growth factor-beta1 preserves epithelial barrier function: identification of receptors, biochemical intermediates, and cytokine antagonists. *J Cell Physiol* **181**, 55-66.
- Potten, C. S.** (1997). Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* **273**, G253-7.
- Potten, C. S., Booth, D. and Haley, J. D.** (1997). Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage in vivo. *Br J Cancer* **75**, 1460-6.
- Powrie, F., Carlino, J., Leach, M. W., Mauze, S. and Coffman, R. L.** (1996). A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *Immunology* **88**, 207-13.
- Prestridge, D. S.** (1995). Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J Mol Biol* **249**, 923-32.

- Quinlan, R. A., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., Achtstatter, T., Moll, R., Jorcano, J. L., Magin, T. M. and Franke, W. W.** (1985). Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci* **455**, 282-306.
- Ramirez, A., Bravo, A., Jorcano, J. L. and Vidal, M.** (1994). Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type- specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation* **58**, 53-64.
- Ramirez, A., Vidal, M., Bravo, A. and Jorcano, J. L.** (1998). Analysis of sequences controlling tissue-specific and hyperproliferation-related keratin 6 gene expression in transgenic mice. *DNA Cell Biol* **17**, 177-85.
- Ramirez, A., Vidal, M., Bravo, A., Larcher, F. and Jorcano, J. L.** (1995). A 5'-upstream region of a bovine keratin 6 gene confers tissue-specific expression and hyperproliferation-related induction in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4783-7.
- Rao, A.** (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* **15**, 274-81.
- Ravitz, M. J. and Wenner, C. E.** (1997). Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Ophthalmic Res* **29**, 31-6.
- Rhodes, K. and Oshima, R. G.** (1998). A regulatory element of the human keratin 18 gene with AP-1-dependent promoter activity. *J Biol Chem* **273**, 26534-42.
- Rogers, M. A., Winter, H., Langbein, L., Wolf, C. and Schweizer, J.** (2000). Characterization of a 300 kbp region of human DNA containing the type II hair keratin gene domain. *J Invest Dermatol* **114**, 464-72.
- Roop, D. R., Krieg, T. M., Mehrel, T., Cheng, C. K. and Yuspa, S. H.** (1988). Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **48**, 3245-52.
- Ryder, K., Lau, L. F. and Nathans, D.** (1988). A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1487-91.
- Ryseck, R. P., Hirai, S. I., Yaniv, M. and Bravo, R.** (1988). Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* **334**, 535-7.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. and Horak, I.** (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* **75**, 253-61.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*.

- Sartor, R. B.** (1994). Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* **106**, 533-9.
- Sato, H., Koide, T., Sagai, T., Ishiguro, S. I., Tamai, M., Saitou, N. and Shiroishi, T.** (1999). The genomic organization of type I keratin genes in mice. *Genomics* **56**, 303-9.
- Scherer.** (1953). *J. Exp. Med.* **97**, 695.
- Schule, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. M. and Evans, R. M.** (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6092-6.
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D. et al.** (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693-9.
- Sinha, S., Degenstein, L., Copenhaver, C. and Fuchs, E.** (2000). Defining the regulatory factors required for epidermal gene expression. *Mol Cell Biol* **20**, 2543-55.
- Smyth, M. J., Strobl, S. L., Young, H. A., Ortaldo, J. R. and Ochoa, A. C.** (1991). Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *J Immunol* **146**, 3289-97.
- Snape, A. M., Jonas, E. A. and Sargent, T. D.** (1990). KTF-1, a transcriptional activator of *Xenopus* embryonic keratin expression. *Development* **109**, 157-65.
- Southern, E. M.** (1979). Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem* **100**, 319-23.
- Steinert, P. M., Idler, W. W., Cabral, F., Gottesman, M. M. and Goldman, R. D.** (1981). In vitro assembly of homopolymer and copolymer filaments from intermediate filament subunits of muscle and fibroblastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3692-6.
- Steinert, P. M. and Roop, D. R.** (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* **57**, 593-625.
- Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T. et al.** (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2065-9.
- Tsuji, Y., Torti, S. V. and Torti, F. M.** (1998). Activation of the ferritin H enhancer, FER-1, by the cooperative action of members of the AP1 and Sp1 transcription factor families. *J Biol Chem* **273**, 2984-92.
- Umezawa, A., Yamamoto, H., Rhodes, K., Klemsz, M. J., Maki, R. A. and Oshima, R. G.** (1997). Methylation of an ETS site in the intron enhancer of the keratin 18 gene participates in tissue-specific repression. *Mol Cell Biol* **17**, 4885-94.

Vergeer, W. P., Sogo, J. M., Pretorius, P. J. and de Vries, W. N. (2000). Interaction of Ap1, Ap2, and Sp1 with the regulatory regions of the human pro-alpha1(I) collagen gene. *Arch Biochem Biophys* **377**, 69-79.

Wanner, R., Zhang, J., Dorbic, T., Mischke, D., Henz, B. M., Wittig, B. and Rosenbach, T. (1997). The promoter of the HaCaT keratinocyte differentiation-related gene keratin 4 contains a functional AP-2 binding site. *Arch Dermatol Res* **289**, 705-8.

Waseem, A., Alexander, C. M., Steel, J. B. and Lane, E. B. (1990). Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *New Biol* **2**, 464-78.

Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. and Stehelin, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* **346**, 191-3.

Webster, R. E., Osborn, M. and Weber, K. (1978). Visualization of the same PtK2 cytoskeletons by both immunofluorescence and low power electron microscopy. *Exp Cell Res* **117**, 47-61.

Werner, S., Weinberg, W., Liao, X., Peters, K. G., Blessing, M., Yuspa, S. H., Weiner, R. L. and Williams, L. T. (1993). Targeted expression of a dominant-negative FGF receptor mutant in the epidermis of transgenic mice reveals a role of FGF in keratinocyte organization and differentiation. *Embo J* **12**, 2635-43.

Whitelaw, C. B., Archibald, A. L., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J. P. and Clark, A. J. (1991). Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res* **1**, 3-13.

Wirtz, S., Finotto, S., Kanzler, S., Lohse, A. W., Blessing, M., Lehr, H. A., Galle, P. R. and Neurath, M. F. (1999). Cutting Edge: Chronic Intestinal Inflammation in STAT-4 Transgenic Mice: Characterization of Disease and Adoptive Transfer by TNF- Plus IFN-gamma-Producing CD4+ T Cells That Respond to Bacterial Antigens. *J Immunol* **162**, 1884-1888.

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* **370**, 341-7.

Yang, T. T., Cheng, L. and Kain, S. R. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* **24**, 4592-3.

Ye, J., Xu, R. H., Taylor-Papadimitriou, J. and Pitha, P. M. (1996a). Sp1 binding plays a critical role in Erb-B2- and v-ras-mediated downregulation of alpha2-integrin expression in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **16**, 6178-89.

Ye, J., Zhang, X. and Dong, Z. (1996b). Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene promoter: an AP1 complex and an Sp1-related complex transactivate the promoter activity that is suppressed by a YY1 complex. *Mol Cell Biol* **16**, 157-67.

Zhang, J. S., Wang, L., Huang, H., Nelson, M. and Smith, D. I. (2001). Keratin 23 (K23), a novel acidic keratin, is highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of pancreatic cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 123-35.

Zhang, X., Giangreco, L., Broome, H. E., Dargan, C. M. and Swain, S. L. (1995). Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *J Exp Med* **182**, 699-709.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
Ak	Antikörper
AP-1, AP-2	<i>activator protein 1, activator protein 2</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bps	<i>basepairs</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> - Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
d	Tag
dATP	Desoxyadenosyl-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EtOH	Ethanol
Ets	<i>E-twenty-six specific</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> - Fötales Rinderserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
°C	Grad Celsius
h	Stunde, human
hCG	humanes Chorion Gonadotropin
I	Intron
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
K1, K20	Keratin 1, Keratin 20 usw.
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
λ	Lambda, Wellenlänge
l	Liter

LB-Medium	Luria Bertani Medium
LMP	<i>low melting point</i>
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	murin
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mMol	Millimol
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
μ Ci	Mikrocurie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	pH-Wert
PKC	Proteinkinase-C
PMS	<i>pregnant mare serum</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
polyA-Signal	Polyadenylierungssignal
PVDF	Polyvinylidindifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase,
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp1	<i>selective promoter factor</i>
SSC	Sandard-Saline-Citrat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tg	transgene Linie
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheiten (Units)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent

7.2 Vektorkarten

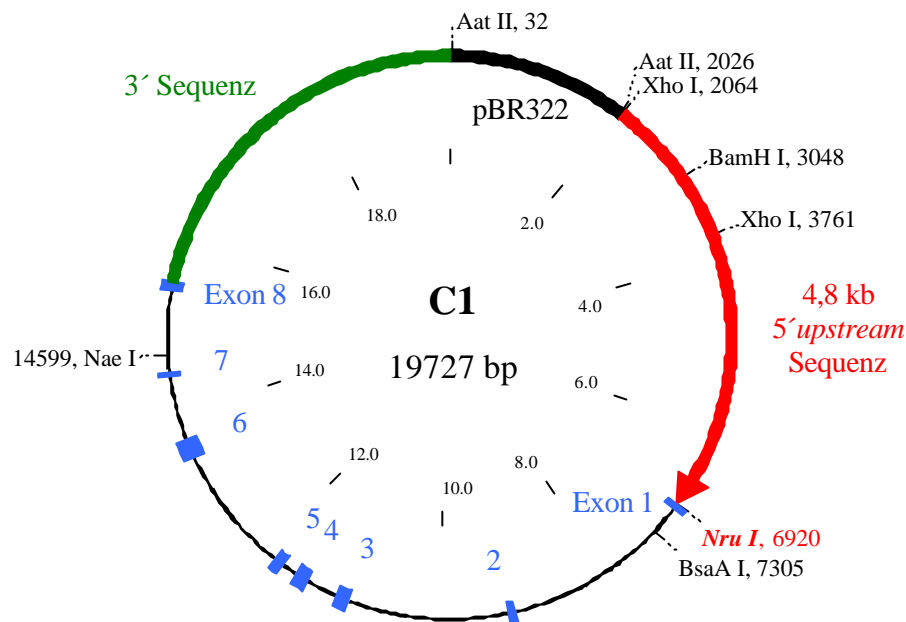


Abb. 7.1: Expressionsvektor C1

Der C1 Expressionsvektor enthält die 18 kb des λ -Klons CK20-IT19, welcher für das humane Keratin 20 codiert (Moll et al., 1993). Die Sequenz gliedert sich in einen 4,8 kb 5' *upstream* Bereich, 8 Exons verteilt über 9,3 kb und 3,9 kb 3' Sequenz. Das Exon 1 wurde größtenteils deletiert, es verblieben nur 56 bp bis zum Intron 1. Für die Klonierung von cDNAs steht bei 6920 bp eine *Nru I* Schnittstelle im Exon 1 zur Verfügung. Der bakterielle Teil des Vektors ist ein 2 kb pBR322 Derivat, das eine modifizierte *multiple cloning site* und fast ausschließlich ori und Ampicillinresistenz enthält (Blessing et al., 1993).

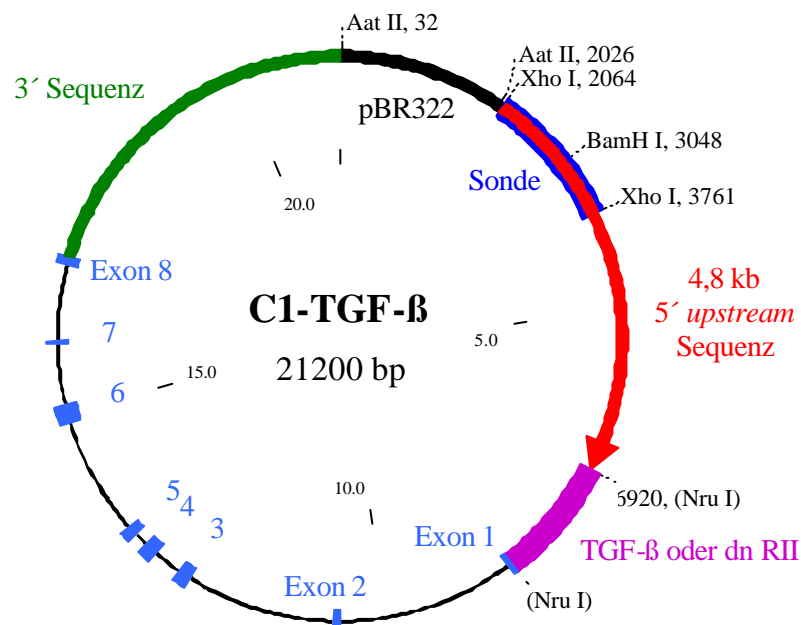


Abb. 7.2: Expressionsvektor C1-TGF- β bzw. C1-dn RII

In die *Nru I* Schnittstelle des Vektors C1 wurden die 1472 bp des simian TGF- β (pUC8/simian TGF- β Hinc II geschnitten) bzw. die 926 bp des humanen dominant negativen TGF- β Typ II Rezeptors (pBluescript/dn RII *Sma I* geschnitten) kloniert. Diese Vektoren wurden für die Generierung der transgenen Tiere bei 3.9 verwendet. Als Sonde, zum Durchsuchen einer genomischen Phagenbank, wurde das 1,7 kb *Xho I* Fragment verwendet (Position 2064 bis 3761).

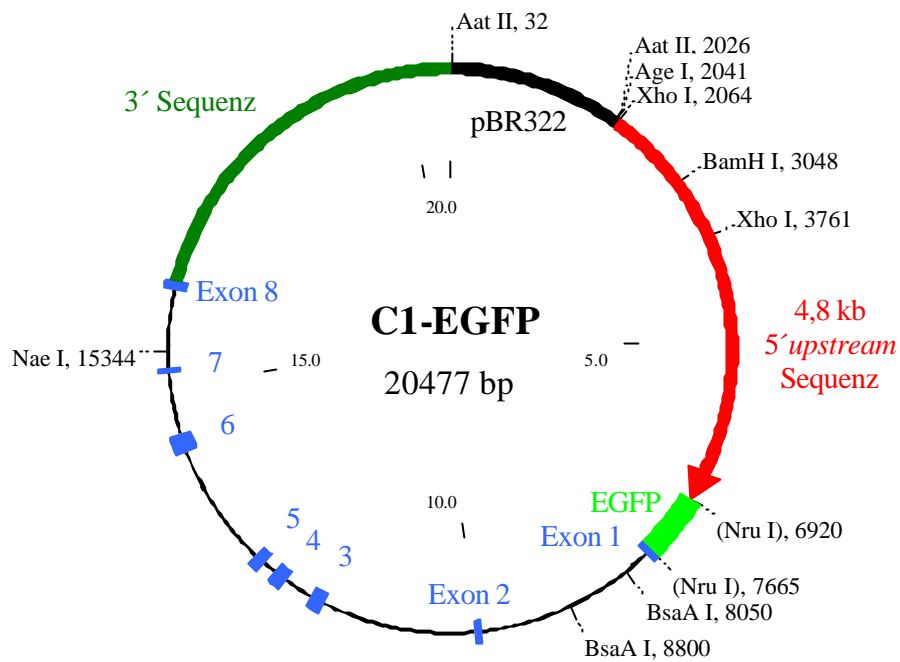


Abb. 7.3: Expressionsvektor C1-EGFP mit 4,8 kb 5' upstream Sequenz

Konstrukt C1-EGFP besteht aus C1 mit der cDNA für EGFP im Exon 1. Der Vektor enthält die native Exon/Intronstruktur des K20.

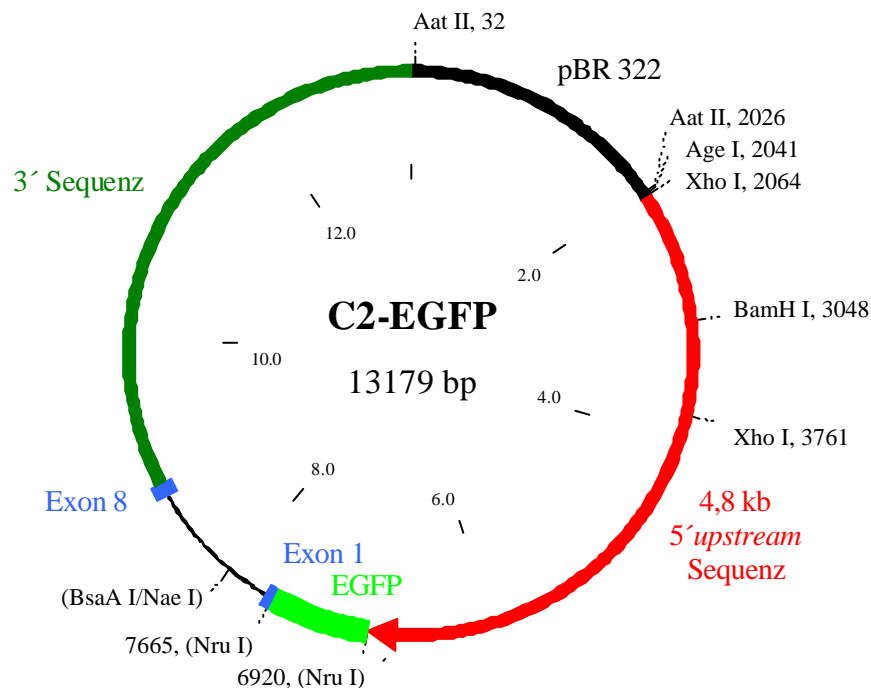


Abb. 7.4: Expressionsvektor C2-EGFP mit 4,8 kb 5' upstream Sequenz und deletierten Exons 2-7

Das Konstrukt C2-EGFP wurde kloniert aus Konstrukt C1-EGFP indem mit BsaA I (Position 8050) im Intron 1 und Nae I (Position 15344) im Intron 7 geschnitten und religiert wurde. Die Exons 2 bis 7 wurden so mit einem 7,3 kb Fragment deletiert.

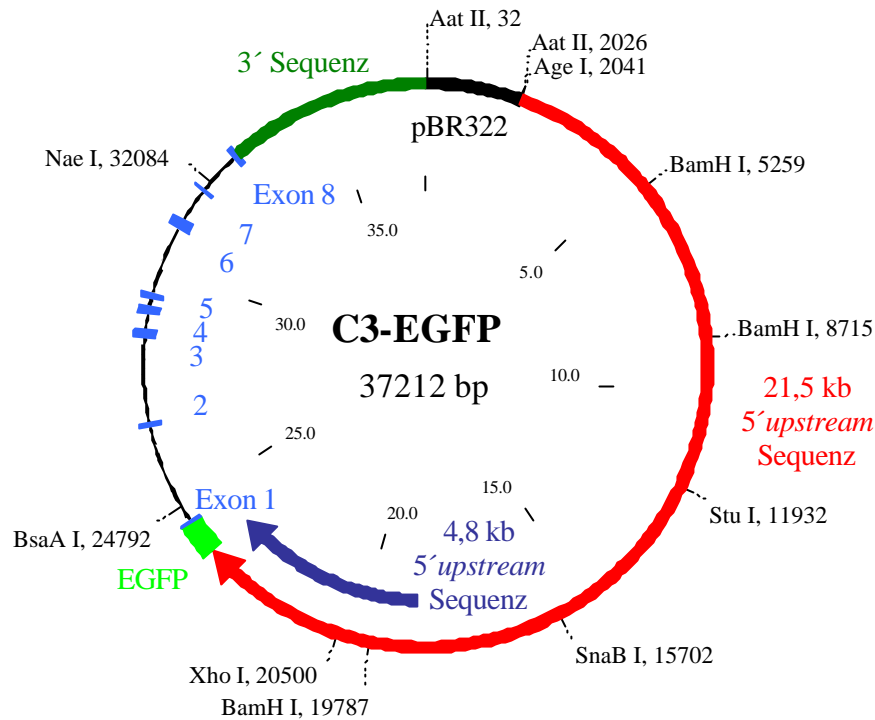


Abb. 7.5: Expressionsvektor C3-EGFP mit 21,5 kb 5' upstream Sequenz

Konstrukt C3-EGFP wurde aus Konstrukt C1-EGFP kloniert, indem das 18,4 kb Age I / Xho I Fragment aus pSL- λ 6k (Abb. 7.7) eingefügt wurde. Der Vektor hat nun 21,5 kb 5' upstream Sequenz, die Gesamtlänge beträgt 37,2 kb.

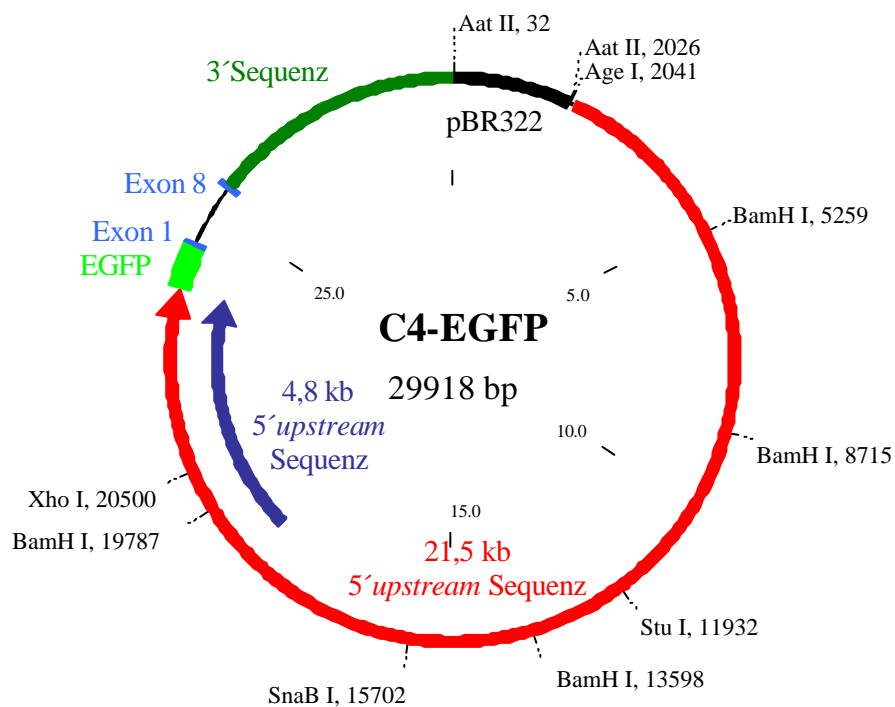


Abb. 7.6: Expressionsvektor C4-EGFP mit 21,5 kb 5' upstream Sequenz und deletierten Exons 2-7

Konstrukt C4-EGFP wurde aus Konstrukt C2-EGFP kloniert, indem das 18,4 kb Age I / Xho I Fragment aus pSL- λ 6k (Abb. 7.7) eingefügt wurde. Der Vektor hat nun 21,5 kb 5' upstream Sequenz, die Gesamtlänge beträgt 29,9 kb.

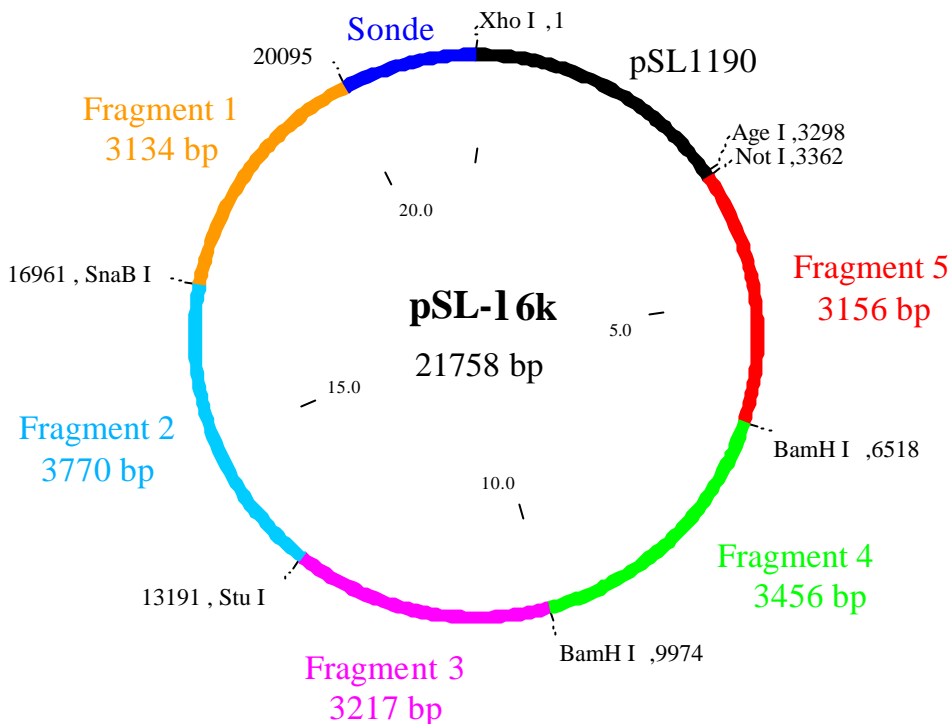


Abb. 7.7: pSL-16k

pSL- λ 6k enthält 18,4 kb K20 5' *upstream* Sequenz, die für deren Charakterisierung in fünf Fragmente unterteilt wurde. Die Teile sind zwischen 3,1 kb und 3,7 kb groß und wurden anhand nutzbarer Schnittstellen für die Klonierung bzw. Subklonierung ausgewählt. Die verwendeten Schnittstellen sind in der Vektorkarte zwischen den farbigen Fragmenten eingezeichnet. Als Sonde bezeichnet wurde die 1,7 kb Überschneidung mit CK20-IT19 mit der λ 6k aus der genomischen Phagenbank isoliert wurde.

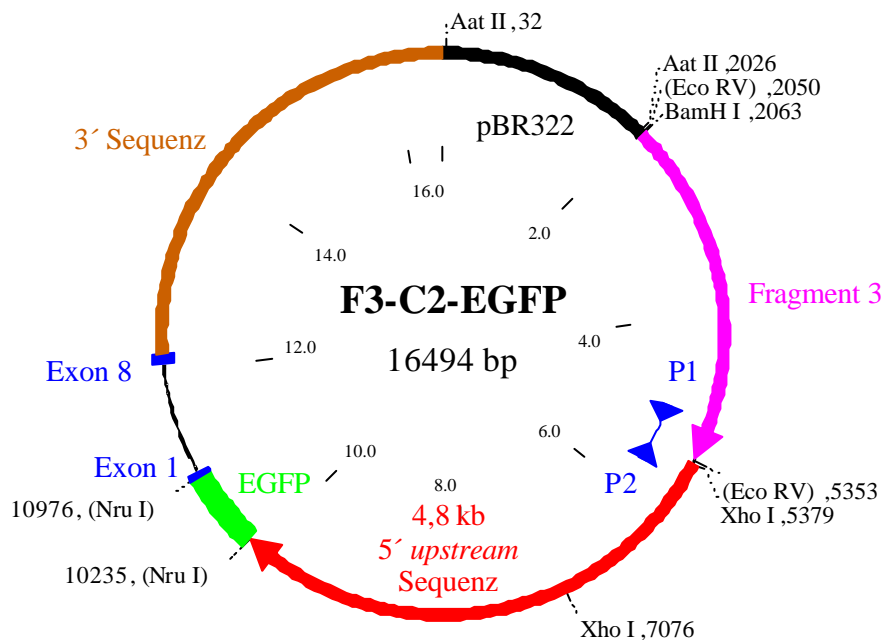


Abb. 7.8: Expressionsvektor F3-C2-EGFP

Das Konstrukt enthält das Fragment F3 aus pSL- λ 6k vor der 4,8 kb 5' *upstream* Sequenz des Vektors C2-EGFP. Mit den spezifischen Primern 1 und 2 wurde mittels PCR die korrekte Orientierung geprüft (siehe 2.1.9 Primerkombinationen C). Dieses Konstrukt steht exemplarisch für die Konstrukte (F1-F5)-C2-EGFP.