

Erzeugung von genetisch veränderten Mäusen.
Versuche zur transgenen Rettung der *wobbler*
Mutation der Maus

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (rer. nat.)

Fakultät für Biologie
Universität Bielefeld

vorgelegt von
Volker Christopher Schmidt

Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Grundlagen der Genomforschung	2
2.1.1 genetische Kartierung des Mausgenoms.....	2
2.1.2 genomische Kartierung mittels Bestrahlungshybrid-Zellen.....	3
2.1.3 Entwicklung von genomischen Klonen und sequence ready BAC-Contigs	3
2.1.4 Die draft-Sequenz des humanen Genoms.....	4
2.1.5 funktionelle Genomanalyse (functional genetics).....	5
2.2 Die Signalproteine des Neuregulin1 Gens	6
2.2.1 Knock-out verschiedener <i>Nrg1</i> -Isoformen.....	8
2.2.2 Die SMDF-Isoform des <i>Nrg1</i> -Gens	8
2.3 Die pleiotrope Mutation <i>wobbler</i> der Maus	9
2.3.1 Das Krankheitsbild der Wobbler-Individuen	9
2.3.2 Chromosomale Lokalisation des <i>wr</i> -Gens	10
2.3.3 genetische Einflüsse auf den Phänotyp der Mutanten	11
2.3.4 Positionsklonierung am Beispiel des <i>wr</i> -Gens.....	12
2.4 Ziele dieser Arbeit	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Material	15
3.1.1 Verwendete Mausstämme	15
3.1.1.1 <i>Mus musculus castaneus</i>	15
3.1.1.2 <i>Mus musculus C57BL/6J-wr</i>	15
3.1.1.3 Der Mausstamm <i>CD129^{Clc2-}</i>	15
3.1.1.4 Der Mausstamm <i>C57BL/6J-gfp</i>	15
3.1.1.5 weitere verwendete Mausstämme	16
3.1.1.6 Intraspezies Kreuzung <i>CAST/B6-wr</i>	16
3.1.2 Materialien für die Kultur von Praeimplantationsembryonen	16
3.1.2.1 Verwendete Hormone.....	16
3.1.2.2 Kulturmedien für Praeimplantationsembryonen.....	16
3.1.2.3 Weitere verwendete Lösungen	16
3.1.3 Zellkulturmaterialien	17
3.1.3.1 Herkunft der verwendeten embryonalen Stammzellen	17
3.1.3.2 Feeder- und ES-Zellkulturmedien.....	17
3.1.3.3 Weitere verwendete Medien und Lösungen in der ES-Zellkultur	18

3.1.4. molekularbiologische Materialien	19
3.1.4.1 Oligodesoxynucleotide.....	19
3.1.4.2 Maus BAC-Bank.....	20
3.1.4.3 Fragmentlängenstandards.....	20
3.1.4.4 Verwendete Enzyme.....	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Embryologische Methoden	21
3.2.1.1 Vasektomie von männlichen Mäusen.....	21
3.2.1.2 Ovulationszyklusbestimmung bei Spendermäusen.....	21
3.2.1.3 Präparation der befruchteten Eizellen.....	22
3.2.1.4 Herstellung transgener Mäuse durch Vorkerninjektion von DNA-Konstrukten.....	23
3.2.1.5 Retransfer der Zygoten.....	24
3.2.1.6 Herstellung von chimären Mäusen.....	25
3.2.1.6.1 Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten.....	25
3.2.1.6.2 Aggregation von frühen Morulastadien mit ES-Zellen.....	26
3.2.2 Zellkulturmethoden	28
3.2.2.1 Präparation embryonaler Fibroblasten als Feederzellen für die ES-Zellkultur.....	28
3.2.2.2 Bestrahlen von Feederzellen.....	30
3.2.2.3 Füttern von Zellen.....	30
3.2.2.4 Trypsinisieren von Feeder- und ES-Zellkulturen.....	31
3.2.2.5 Einfrieren von Feeder- und ES-Zellen.....	32
3.2.3 Gezielter Austausch genomischer Regionen in ES-Zellen (ES-Zell-Targeting)	32
3.2.3.1 Elektroporation von ES-Zellen.....	33
3.2.3.2 Vereinzeln (Picken) der positiv selektierten ES-Zellklone.....	34
3.2.3.3 Splitten und Einfrieren der vereinzelteten ES-Zellklone.....	35
3.2.3.4 Auftauen der positiv getesteten Klone.....	36
3.2.3.5 Vorbereitung der ES-Zellen für die Morulaaggregation.....	36
3.2.4 Molekularbiologische Methoden	36
3.2.4.1 DNA Präparationen.....	36
3.2.4.1.1 DNA-Präparation aus genomischen BAC-Klonen (Qiagen Maxi-Präp., modifiziert).....	36
3.2.4.1.2 DNA-Präparation aus ES-Zellkulturen (96-well-Format, Ramirez-Solis et al., 1992).....	37
3.2.4.1.3 DNA-Präparation aus Maus-Schwanzspitzen-Biopsien (Tailcuts) ..	38
3.2.4.1.4 DNA-Präparation aus Geweben (Niere, Lunge).....	38
3.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	39
3.2.4.3 Restriktionsspaltung von genomischer ES-Zell-DNA.....	39
3.2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	40
3.2.4.5 Agarose-Gelelektrophoresen.....	41
3.2.4.5.1 Analytische Gelelektrophorese.....	41
3.2.4.5.2 physiologische Gelelektrophorese.....	42
3.2.4.5.3 Elektroelution von BAC-Inserts aus Agarose-Gelen.....	42
3.2.4.6 DNA-Transfer auf Nylonmembranen („Southern-Blotting“).....	43
3.2.4.7 RNA-Methoden.....	43
3.2.4.7.1 RNA-Isolierung aus Geweben (Chomczynski und Sacchi, 1987) ...	43

3.2.4.7.2 Präparation von mRNA mittels magnetischer Kügelchen (Dynabeads)	44
3.2.4.7.3 RNA-Minigele	45
3.2.4.7.4 Große, denaturierende RNA-Gele	45
3.2.4.7.5 RNA-Transfer auf Nylonmembranen („Northern-Blotting“).....	45
3.2.4.8 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	46
3.2.4.9 Hybridisierung (Church & Gilbert, 1984)	46
3.2.4.10 Autoradiographie	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Generierung von BAC-transgenen Mäusen	48
4.1.1 Aufbereitung der BAC-DNA für die Pronukleusinjektion	48
4.1.2 Prinzip des Nachweises der BAC-Integration	50
4.1.3 Nachweis des BACs 48H20 in transgenen Mäusen	51
4.1.3.1 Genomische Allelverteilung der 48H20-BAC-transgenen Founder und Nachkommen am <i>wr</i> -Locus	52
4.1.4 Nachweis des BACs 45M7 in transgenen Mäusen	56
4.1.4.1 Genomische Allelverteilung ausgewählter 45M7-BAC-transgener Nachkommen am <i>wr</i> -Locus	57
4.1.4.2 Vergleich der <i>Pellino1</i> -Genexpression zwischen transgenen und nicht transgenen Tieren der Linie <i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	60
4.2 Innerhalb des Serviceprojekt Z3 des SFB 549 erzeugte transgene Mäuse	62
4.3 Gezieltes Einbringen von Vektoren in embryonale Stammzellen (ES-Zelltargeting).....	63
4.3.1 Auszüchtung des <i>Clc²⁻</i> Allels auf den <i>CD1</i> Hintergrundstamm	63
4.3.2 Einbringen der Vektoren in die ES-Zellen durch Elektroporation	64
4.3.2.1 Prinzip des Nachweises der ortsspezifischen (homologen) Rekombination am Beispiel des SMDF-K.o.-Versuchs.....	65
4.3.2.2 Identifizierung der SMDF-ES-Zellklone mit homologer Rekombination	66
4.3.3 Weitere verwendete Targetingvektoren.....	67
5. Diskussion und Ausblick	69
5.1 Auswertung der BAC-transgenen Mäuse	69
5.1.1 Auswahl der zur Injektion verwendeten BACs.....	69
5.1.2 Nachweis der transgenen <i>Pellino1</i>-Expression	70
5.1.3 Überprüfung der Hypothese einer unvollständigen Integration der BACs:	72
5.1.4 Ort der genomischen Integration der BACs.....	73
5.1.5 Ausblick über zukünftige Anwendungen von BAC-transgenen Mäusen 	74
5.2 Erzeugung von chimären Mäusen mit der Aggregationsmethode:	75
6. Literatur.....	77
7. Lebenslauf und Erklärung	89

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnten zwei Techniken zur genetischen Manipulation von Mäusen am Lehrstuhl etabliert werden. Die Kultur von embryonalen Stamm- (ES-) Zellen, und das gezielte Ersetzen genomischer Sequenzen in diesen Zellen, bilden die Grundlage für Gene-Targeting Experimente. Verschiedene Knock-out Konstrukte wurden in ES-Zellen eingeführt und deren korrekte, ortsspezifische Insertion nachgewiesen. Durch Aggregation dieser ES-Zellklone mit *CD1*-Embryonen wurden chimäre Mäuse hergestellt. Eine Keimbahntransmission (Beteiligung der ES-Zellen am Aufbau der Keimbahn der Chimären) und die Vererbung des K.o.-Allels konnte bislang bei den Nachkommen dieser chimären Tiere noch nicht gezeigt werden.

Durch direkte Injektion von DNA-Fragmenten in die Vorkerne von befruchteten Eizellen (Pronukleusinjektion) können Mäuse mit zusätzlicher genetischer Information (transgene Mäuse) erzeugt werden. Experimente zur transgenen Rettung der *wobbler*-Mutation (transgenic rescue) stellten einen Anwendungsschwerpunkt dieser Technik in dieser Arbeit dar. Die autosomal rezessiv vererbte Mutation *wobbler* (Gensymbol: *wr*, Phänotyp: WR) der Maus ist ein gut untersuchtes Mausmodell für humane spinale Muskelatrophien (SMA). Zusätzlich führt die pleiotrope Mutation zu einem Defekt der Spermiogenese. Mit Hilfe einer genetischen (*Cct4*) Frühdiagnostik konnte gezeigt werden, daß die Degeneration von Neuronen im Thalamus, Cerebellum und Hirnstamm sowie von Interneuronen im cervikalen Rückenmark am Tag 13 nach der Geburt die frühesten, pathologischen Veränderungen bei Wobbler-Individuen darstellen, welche auf eine zellautonome Wirkung des mutierten Genprodukts in diesen Geweben zurückgeführt werden kann. Bereits 1992 konnte der Erbgang auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus kartiert werden, und einige der eng gekoppelt vererbten Gene wurden mit verschiedenen Methoden einer Mutationsanalyse unterzogen. Weder mit biologischen Assays wie enzymatischen Aktivitätsvergleichen (cytoplasmatischen Malat-Dehydrogenase (*Mor2*) und Uridin-Diphosphoglucose-Pyrophosphorylase (*Ugp2*)), noch mit Expressionsanalysen (*Homoloc-13*, *Peli1*) oder Sequenzierungen von kodierenden (cDNAs, *Homoloc-13*, *Kiaa0903*) oder genomischen (*Mor2*, *Peli1*, *Otx1*) Abschnitten konnte ein Unterschied zwischen Wobbler- und Wildtyptieren ermittelt werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein *wr*-Kandidatengen einer funktionellen Prüfung in vivo unterzogen werden. Durch die Injektion von genomischen BAC-Klonen in die Pronuklei befruchteter Eizellen konnten transgene Mäuse erzeugt werden. Northern-Blot Analysen eines *Peli1*-BAC-transgenen Wobblers zeigten gegenüber einem Kontrolltier ohne Transgeninsertion ein erhöhtes Expressionsniveau für dieses Gen, womit die Verwendung des Transgens durch den Organismus gezeigt werden konnte. Trotz dieser transgenen Expression des *Pellino1*-Gens in Kleinhirn, (Testis) und Rückenmark konnte der WR-Phänotyp von homozygoten *wr*-Mutationsträgern nicht gerettet werden. Der Versuch zeigt, daß die Präparationsmethode zur Aufreinigung großer genomischer Fragmente (BACs) mittels Elektroelution eine ausreichend saubere, für die Injektion in Pronukleusstadien geeignete DNA-Qualität liefert, welche die Herstellung von BAC-transgenen Mäusen ermöglicht. Innerhalb des Serviceprojekts Z3 des Sonderforschungsbereichs (SFB) 549 wurden weitere, plasmidbasierte Konstrukte in befruchtete Oocyten injiziert, aus welchen transgene Mäuse hervorgegangen sind.

2. Einleitung

2.1 Grundlagen der Genomforschung

2.1.1 genetische Kartierung des Mausgenoms

Bereits seit fast hundert Jahren existieren Mauszüchtungen, welche in getrennten Kolonien, ohne genetischen Austausch untereinander, gehalten wurden. Nach mind. 20 Generationen Bruder-Schwester Verpaarung gelten die Tiere als genetisch homogen und werden als Inzuchtstamm bezeichnet, von denen bereits ca. 500 verschiedene beschrieben sind (Festing 1994, Frankel 1995).

Die genetische Kartierung wurde in erster Linie durch Kreuzungsexperimente zwischen diesen Mausstämmen mit Hilfe der während der Meiose zufällig auftretenden Rekombinationsereignisse durchgeführt. Je enger benachbart zwei Gene (oder anonyme Loci) liegen, desto unwahrscheinlicher wird ein Rekombinationsereignis zwischen ihnen. Das Maß für den genetischen Abstand zweier Loci wird in Centimorgan (cM) berechnet. Werden sie unter 100 beobachteten Meiosen gerade einmal entkoppelt, so ist die genetische Distanz zwischen ihnen genau 1 cM. Die Auflösung einer solchen Karte hängt daher von der Zahl der auswertbaren Meiosen sowie von der Anzahl und Verteilung der getesteten Marker und Gene ab. Mauskreuzungen am Jackson Laboratorium (TJL), am Massachusetts Institute of Technology (MIT, Dietrich et al., 1992) und des EUCIB in Cambridge bildeten zahlenmäßig die meisten auswertbaren Meiosen, woraus drei untereinander vergleichbare genetische Karten des Mausgenoms abgeleitet werden konnten (Brown, 1994).

Ihre Auflösung konnte durch die Einführung der sogenannten Mikrosatellitenmarker, di- und tri-Nukleotidrepeats, welche durch Klonierung, Hybridisierung und Ansequenzierung am MIT gefunden wurden, enorm verbessert werden (Dietrich et al., 1996, Dib et al., 1996). Diese anonymen (nicht kodierenden) Sequenzen unterliegen keinem Selektionsdruck, wodurch sie sich bereits zwischen den verschiedenen Mausinzuchtstämmen in ihrer Länge voneinander unterscheiden lassen. Diese Längenpolymorphismen sind mit Hilfe der PCR detektierbar und können in den Mauskreuzungen kartiert werden.

2.1.2 genomische Kartierung mittels Bestrahlungshybrid-Zellen

Parallel wurde die Kartierung mit Bestrahlungshybrid-Zellen (Radiation Hybrids) weiter verfeinert. Sowohl murine als auch humane Zelllinien wurden mit der Hamsterzelllinie A23 (Thymidinkinase defizient) stabil fusioniert, nachdem sie zuvor radioaktiver Strahlung ausgesetzt worden waren (Cox et al., 1990, Walter et al., 1994). Durch die Bestrahlung wurden Chromosomenbruchstücke in der genomischen DNA erzeugt, wodurch die zufälligen Rekombinationsereignisse der Meiosen ersetzt wurden. Die Anzahl dieser „künstlichen Rekombinationen“ konnte stark erhöht werden. Anschließend wurden definierte Sätze dieser Hybridzellen molekular charakterisiert. Genetische Marker, bekannte Gene und Mikrosatelliten, wurden mittels PCR einzelnen Zellklonen zugeordnet, wodurch sehr genau bestimmt werden konnte, welche Chromosomenstücke in einzelnen Hybridklonen enthalten sind. Durch Abgleich mit den existierenden Genkarten konnten auch Bruchstücke mehrerer muriner/humaner Chromosomen in derselben Hybridzelle ausgewertet werden. Die Kartierung neu gefundener Gensequenzen (Expressed Sequence Tags, ESTs, Boguski et al., 1995) geschieht dann durch das Auffinden von PCR-positiven, gut charakterisierten Hybridzellen. Besonders die Kartierung des humanen Genoms konnte somit enorm vereinfacht und verbessert werden, da Genkarten zuvor nur mittels der Vererbung polymorpher genetischer Marker unter den Mitgliedern von Großfamilien erstellt werden konnten. Der Abstand zwischen Loci ist bei Radiation Hybrid Kartierungen von der Strahlendosis abhängig und wird in centiRad (cR) angegeben.

Die Vergleiche der humanen und murinen Genkarten führten zu der Erkenntnis, daß große Bereiche zwischen Mensch und Maus bezüglich der Genabfolge konserviert vorliegen. Wurde bei einer der beiden Spezies ein neues Gen gefunden und kartiert, ließen diese Bereiche konservierter Syntänie es zu, daß eine Vorhersage über den wahrscheinlichen Genort eines homologen Gens bei der anderen Spezies getroffen werden konnte (Nadeau, 1989, Brown, 1992).

2.1.3 Entwicklung von genomischen Klonen und sequence ready BAC-Contigs

Die Entwicklung von YACs (Burke et al., 1987, Kusumi et al., 1993, Larin et al., 1993, Chumakov et al., 1995), BACs und PACs (Yeast, Bacterial und Bakteriophage Artificial Chromosomes) machte es möglich, genomische Regionen in kleinen

Stückchen zu vervielfältigen und molekularbiologischen Techniken wie der cDNA-Selektion (Lovett et al., 1991) und des Exon-Trappings (Buckler et al., 1991) bis zur direkten Sequenzierung zugänglich zu machen (Osoegawa et al., 2000). Anders als bei plasmidbasierten Klonierungsvektoren, deren Aufnahmekapazität bei etwa 10kb begrenzt ist, können diese künstlichen Chromosomen Fremd-DNA in einer Größenordnung zwischen 50-250 kb (BACs und PACs) bis zu 1 Mb (YACs) aufnehmen. Die Anordnung durch überlappende Bereiche zu sogenannten „Contigs“ führte zur physikalischen Darstellung komplexer genomischer Regionen (Bates et al., 1992). Die tatsächlichen Abstände zwischen genomischen Loci wurden durch die Bestimmung der Klongrößen erstmals in bp greifbar (Bellanné-Chaqtelot et al., 1992). Dies bildete die Grundlage der Technik der Positionsklonierung (Collins 1992, 1995), welche die Identifizierung zahlreicher, durch Genmutationen verursachter, Erbkrankheiten möglich werden ließ (Cox et al., 1993, Zhang et al., 1994).

2.1.4 Die draft-Sequenz des humanen Genoms

Im Jahr 1998 trat die Firma Celera Genetics in direkte Konkurrenz zu den öffentlich geförderten Genomprojekten. Während letztere zunächst das komplette Genom des Menschen und später der Maus mit sequenzierfertigen Contigs abdecken wollte, war die Strategie von Celera eine Zufallsklonierung und direkte Sequenzierung. Die so erhaltenen Sequenzstückchen sollten dann computerunterstützt anhand ihrer Überschneidungen in der richtigen Reihenfolge wieder zusammengesetzt (anotuiert) werden. Im Dezember des Jahres 2000 wurde die sogenannte „draft“-Sequenz des humanen Genoms gemeinsam der Öffentlichkeit präsentiert (Lander et al., 2001) und dieser zum großen Teil seit Februar 2001 in Datenbanken via Internet zugänglich gemacht. Da in dieser reinen Abfolge der Basenpaare in den DNA Molekülen der Chromosomen die Informationen der Gene und deren Produkte gespeichert ist, sind somit auch die (kodierenden) Sequenzen sämtlicher menschlicher Gene in den Datenbanken bereits erfasst. Die Zahl der Gene des Menschen wird derzeit mit nicht viel mehr als 30.000 angegeben, eine erste Überraschung, war man doch bislang von der mehr als dreifachen Zahl ausgegangen (Lander et al., 2001, Venter et al., 2001).

Erst kürzlich ist das Chromosom 22 (das kleinste Autosom) des Menschen mit Hilfe von sequenzierten, geschlossenen Contigs komplett überarbeitet worden, wodurch

gezeigt werden konnte, daß in der ersten draft-Sequenz noch mit vielen Fehlern bezüglich ihrer Anotation gerechnet werden muß.

Das dem HUGO angegliederte Mausgenomprojekt befindet sich kurz vor dem Abschluß der Sequenzierungsphase, und große Teile dieser Sequenzen sind bereits in den Datenbanken abgelegt. Eine Rohversion des Mausgenoms mit 7-facher Abdeckung ist unter www.ensemble.org öffentlich verfügbar (Hubbard et al., 2002).

2.1.5 funktionelle Genomanalyse (functional genetics)

Parallel wurde bereits seit Ende der 80iger Jahre an der nächsten, eigentlichen Herausforderung der Genomforschung zu arbeiten begonnen, der Aufklärung der Wirkungsweise der Gene (Hogan et al., 1994). Die ersten Mäuse, denen zusätzliche genetische Information unterschiedlichster Herkunft stabil in ihr Genom eingebaut wurde (transgene Mäuse), wurden bereits in den frühen 80er Jahren erstmals vorgestellt (Lacy et al., 1983). Die ständig wachsende Zahl neuer Gene konnte erstmals experimentell in vivo untersucht, ihre Funktionen im Organismus aufgeklärt werden. Die Art der verschiedenen Fragestellungen, die mit transgenen Mäusen untersucht werden können, ist äußerst vielfältig und reicht von der Regulation der Genaktivitäten, welche aus den proteinkodierenden Sequenzen allein nicht abzuleiten sind, bis hin zu funktionellen Studien auch über Artgrenzen hinaus.

Die Isolierung und Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) war ein weiterer Schritt für die gezielte Untersuchung von Genen und deren Funktionen. Aus Blastozysten (vielleicht das erste embryonale Stadium, in dem eine Differenzierung von Zellen für unterschiedliche Funktionen stattfindet), wurden die Zellen der „inneren Zellmasse“ gewonnen und kultiviert. Diese ES-Zellen wurden zunächst als totipotent, heute als pluripotent bezeichnet, da sie sich von den trophoblastenbildenden Zellen der Blastozyste (Trophoektoderm) bereits unterscheiden. Sie sind daher nicht in der Lage, ohne einen „Partnerembryo“ an der Implantation in den Uterus und der Ausbildung der Plazenta teilzunehmen. Von Trophoblastenzellen abgesehen können sie jedoch zu allen Körperzelltypen differenzieren und am Aufbau jeden Organs, inklusive der gametenbildenden Stammzellen der Keimbahn (Keimbahntransmission), beteiligt werden. Die in vitro Manipulation dieser Zellen ermöglichte das gezielte Erzeugen von Mutationen in definierten Genen (homologe Rekombination), welche dann durch chimäre Mäuse an folgende Generationen vererbt werden können (Thomas und Capecchi, 1987,

Mansour et al., 1988, Capecchi, 1989). In den letzten zehn Jahren ist die Zahl der Mäuse mit ausgeschalteten (Knock-out) oder veränderten (Knock-in) Genen dramatisch angestiegen.

Die vorläufig letzte Entwicklung in der funktionellen Genomforschung beschäftigt sich mit großen Mutageneseprogrammen, deren Ziel es ist, das gesamte Mausgenom mit mehreren Mutationen in sämtlichen Genen abzudecken. Hierfür werden z.B. Mutationen in männlichen Keimzellen der Maus oder in embryonalen Stammzellen erzeugt, sei es durch chemische Agenzien oder radioaktive Strahlung (Rinchik und Russell, 1990, Rinchik, 1991). Die daraus entstandenen Mäuse werden anschließend einem Phänotyp-orientierten Screening unterzogen. Die Anwendung des Harnstoffderivats ENU (Ethyl-Nitroso-Urea), welches zu Punktmutationen und Minideletionen führt, wird zur Zeit weltweit mit großem Aufwand zur Random Mutagenese von Mäusen eingesetzt (Hrabe de Angelis et al., 2000). Von besonderer Bedeutung ist dabei, daß die Gene, im Gegensatz zu Knock-out-Allelen, nicht zwangsläufig einen totalen Verlust ihrer Funktion erleiden müssen (hypomorphe Allele statt Null-Allele). Die direkte Kopplung von Mutationen und dadurch verursachten, resultierenden Phänotypen ermöglicht die Identifizierung von humanmedizinisch relevanten Allelen von Genen.

2.2 Die Signalproteine des Neuregulin1 Gens

Innerhalb der Neureguline sind derzeit vier Gene (*Nrg1-4*) identifiziert worden, die aufgrund ihrer Genprodukte und Genstrukturen zu einer Genfamilie zusammengefaßt werden (Holmes et al., 1992, Carraway et al., 1997, Zhang et al., 1997 und Harari et al., 1999).

Neuregulin-1 kodiert für eine Vielzahl von Signalmolekülen, die u.a. während der Embryonalentwicklung von Säugetieren am Aufbau des Nervensystems von Bedeutung sind. Bei der Signalübertragung ist die EGF (Epidermal Growth Factor)-ähnliche Domäne als Ligand für die membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptorkomplexe erbB2/B3 oder erbB2/B4 der Zielzellen identifiziert worden.

Das *Nrg1*-Gen besitzt 17 Exons und bislang sind 15 verschiedene Genprodukte dieses Gens identifiziert worden, die durch alternatives Spleißen der mRNA gebildet werden (Marchionni et al., 1993; Meyer und Birchmeier, 1994; Lemke, 1996; Fischbach und Rosen, 1997). Zusätzlich gibt es Hinweise für die Verwendung unterschiedlicher Transkriptionsstarts. Die unterschiedlichen Isoformen besitzen

2. Einleitung

verschiedene Domänen, die in den Exons des *Nrg1*-Gens kodiert sind, und die sowohl membranständig als auch sezerniert in unterschiedlichen Zusammensetzungen gefunden werden konnten. Ihnen allen gemeinsam ist lediglich die extrazelluläre, EGF (Epidermal Growth Factor) ähnliche Domäne (Exon 8 und 9 bzw. 10). Je nach Zusammensetzung der übrigen Domänen werden drei Neuregulin-Isoformen unterschieden:

Typ I Neureguline sind membranständig, besitzen im N-terminalen, extrazellulären Teil eine Signaldomäne (Exon 2) und eine immunglobulinähnliche (Ig-) Domäne (Exon 3 und 4). Der cytoplasmatische C-Terminus (Exon 13-17) endet variabel (zwischen Exon 15-17) und ist vermutlich über die LIM Kinase1 an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt (Wang et al., 1998).

Typ II Neuregulinen fehlt der cytoplasmatische Anteil, sie sind aber membrangebunden (Exon 12) und besitzen eine zusätzliche extrazelluläre kringel-ähnliche Domäne (Exon 1), während Typ III Neureguline sezerniert werden und praktisch nur die EGF- und eine zusätzliche cysteinreiche Domäne (CRD, Exon 7) besitzen.

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkungsweisen der *Nrg1*-Isoformen, sind die Genprodukte des *Nrg1*-Gens mit einer Vielzahl von Namen bekannt geworden (Heregulin (HGL), Holmes et al., 1992, Glial Growth Factor (GGF), Marchionni et al., 1993, Acetylcholin Receptor Inducing Activity (ARIA), Falls et al., 1993 oder Sensory and Motoneuron derived Factor (SMDF), Ho et al., 1995).

Die Genprodukte werden zeitlich und räumlich sehr unterschiedlich gebildet, was bereits auf eine große Zahl unterschiedlicher Funktionen hindeutet. Die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen des *Nrg1*-Gens sind bislang nur unzureichend bekannt. In Abbildung 2.1 ist die Genstruktur des Neuregulin1-Gens dargestellt.

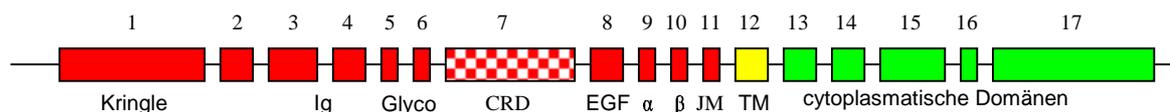


Abbildung 2.1

Abb. 2.1: Genstruktur des Neuregulin1 (*Nrg1*) Gens

2. Einleitung

Exon1 bis 11 kodieren für extrazelluläre Domänen der gebildeten Neuregulin1-Proteine (rot), die Cysteinreiche Domäne ist kariert hervorgehoben. Exon12 (gelb) kodiert für die Transmembrandomäne und Exon 13 bis 17 (grün) für intrazelluläre (cytoplasmatische) Proteindomänen.

TypI Neureguline besitzen N-terminal eine Signalsequenz (Exon2), gefolgt von der Ig-Domäne und der Glycosylierungsdomäne. Die Variation in der EGF-Domäne führt zu α - und β -Isoformen (Exon9 bzw. 10). TypII ist durch die N-terminale Kringel Domäne (Exon1) gekennzeichnet. Die Glycosylierungsdomäne fehlt.

TypIII beginnt mit der cysteinreichen Domäne (Exon7) gefolgt von der EGF-Domäne.

2.2.1 Knock-out verschiedener *Nrg1*-Isoformen

Durch homologe Rekombination wurde die in den Exons 8-10 kodierte EGF-Domäne des *Nrg1*-Gens zerstört, was zu einem Funktionsverlust sämtlicher Isoformen und embryonaler Letalität (dE 10.5) führte (Meyer und Birchmeier, 1995). Auch die Ausschaltung der Ig-ähnlichen (Exons 3 und 4, Kramer et al., 1996) und der cytoplasmatischen Domäne (Exons 13-17, Liu et al., 1998) sowie der erbB-Rezeptoren (Gassmann et al., 1995; Lee et al., 1995; Erickson et al., 1997; Rietmacher et al., 1997; Britsch et al., 1998) führten zu embryonaler Letalität, welche u.a. auf einen Defekt in der Herzentwicklung zurückgeführt werden konnte. Embryonale Letalität wurde bei einer Vielzahl von Mäusen mit gezielt ausgeschalteten Genen beobachtet (Copp, 1995). Das andere Extrem, K.O.-Mäuse ohne phänotypische Beeinträchtigungen, tritt ebenfalls häufig auf. In manchen Fällen konnte gezeigt werden, daß verwandte Isogene in der Lage sind, die Funktion des zerstörten Gens zu übernehmen, was jedoch für das *Nrg1*-Gen offensichtlich unzutreffend ist.

2.2.2 Die SMDF-Isoform des *Nrg1*-Gens

Bei der SMDF (Sensory and Motoneuron Derived Factor)-Isoform des *Nrg1*-Gens handelt es sich um eine sezernierte (oder prozessierte, ehemals membranständige) Typ III Isoform, welche die im 7. Exon kodierte CRD (s. Abbildung 2.1) besitzt. Die Funktion dieser, vornehmlich in sensorischen und motorischen Neuronen gebildeten, Isoform war zu Beginn dieser Arbeit noch unklar und sollte in Zusammenarbeit mit Jana Beikert durch Inaktivierung der CRD in Knock-out-Mutanten untersucht werden. Unglücklicherweise wurde exakt dieser Knock-out im Verlauf des Projektes veröffentlicht (Wolpowitz et al., 2000). Die homozygoten Mutanten sterben bereits bei der Geburt. Dabei konnte gezeigt werden, daß es zunächst zu einer Ausbildung von peripheren, neuromuskulären Synapsen kommt, welche jedoch nicht erhalten

werden. Die Degeneration der Synapsen hat ein Absterben sensorischer und motorischer Neuronen zur Folge. Mit diesem Knock-out konnte zumindest gezeigt werden, daß das Gen eine bislang unbekannte Funktion erfüllt, welche direkt oder indirekt die Erhaltung der Synapsen bewirkt. Die embryonale Letalität der übrigen Knock-out-Varianten dieses Gens kann offensichtlich nicht mit der CRD Isoform in Verbindung gebracht werden.

Das *Nrg1*-Gen ist ein Beispiel dafür, daß die Kenntnis der reinen Basenpaarabfolgen der Genome nicht ausreichend sein wird, die Komplexität und Vielseitigkeit der Funktionen der Genprodukte zu verstehen. Die weitere Aufklärung der Mechanismen der Genregulation wird vermutlich auch in Zukunft nur experimentell, durch gezielt oder ungezielt (s.o.) genetisch veränderte Mäuse, eindeutig geklärt werden können (s. auch Ausblick, 5.1.6).

2.3 Die pleiotrope Mutation *wobbler* der Maus

2.3.1 Das Krankheitsbild der Wobbler-Individuen

Die Mutation *wobbler* (Phänotyp: WR, Gensymbol: *wr*) entstand 1955 spontan im Mausstamm C57BL/Fa (Falconer, 1956) und wurde 1968 von Duchon und Strich erstmalig umfassend beschrieben. Später wurde die Mutation auf den C57BL/6J Mausstamm ausgekreuzt. Auf diesem Hintergrundstamm besitzt die Krankheit einen autosomal rezessiven Erbgang mit 100 prozentiger Penetranz. Klinisch beginnt der stark progressive Krankheitsverlauf in der 3. bis 4. postnatalen Woche und die meisten Tiere sterben innerhalb des ersten Jahres. Homozygote Träger der Mutation zeigen bereits ab dem ca. 17. Lebenstag einen charakteristischen Tremor. Etwa in der 4. Woche nach ihrer Geburt wird ein wackliger, unsicherer Gang beobachtet, der für diese Mutation namensgebend war. Ursache hierfür ist eine Atrophie der Muskulatur der Vorderextremitäten. Diese selbst ist die Folge einer Motoneuronendegeneration in den Vorderhörnern des cervikalen und thorakalen Rückenmarks, die von einer Proliferation der Astrocyten (Astrogliose) begleitet wird (Laage et al., 1988). Histologisch erscheinen die Zellkörper der betroffenen Motoneurone vakuolisiert und stark vergrößert (Andrews et al., 1975). Mit Hilfe der genetischen *Cct4*-Diagnostik (eigene Diplomarbeit, Nabetani et al., 1996) konnte der Beginn der Krankheit noch genauer definiert werden; die Motoneuronendegeneration folgt einer praeklinisch beginnenden Neurodegeneration im Thalamus, Cerebellum und Hirnstamm ab Tag 13 p.n. (Rathke-Hartlieb et al., 1999). Ab Tag 23 p.n. kommt

es bei Wobbler-Mäusen zu einer Mikroglia-Aktivierung, die ebenfalls im Verlauf der Krankheit zunimmt.

Weiterhin zeigt die *wr*-Mutation einen pleiotropen Effekt, neben den neurologischen Defekten kommt es zu einer schweren Beeinträchtigung der Spermio-genese. Die Spermien betroffener männlicher Wobbler-Individuen bilden kein funktionelles Akrosom aus, ihre Köpfe bleiben rund. Die Abflachung zur sichelförmigen Spermienkopfform der Wildtypen findet nicht statt (Heimann et al., 1991). Aggregationschimären ergaben Hinweise auf eine zellautonome Wirkung des *wr*-Gens in den betroffenen Geweben, Testis und Rückenmark (Augustin et al., 1997). Die primäre molekulare Ursache der *wr*-Mutation konnte trotz eingehender histologischer und biochemischer Befunde bis heute nicht aufgeklärt werden.

2.3.2 Chromosomale Lokalisation des *wr*-Gens

Mittels Kopplungsanalysen des WR-Phänotyps in einer Interspezies-Rückkreuzung zwischen *Mus musculus C57BL/6J-wr* und *Mus spretus ((C57BL/6J-wr x SPRET/Ei) F₁ x C57BL/6J-wr)* konnte das *wr*-Gen auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus zwischen dem Erythroblastosis Onkogen (*ErbB*) und dem Reticuloendotheliosis Onkogen (*Rel*) erstmals kartiert werden (Kaupmann et al., 1992). Eine Intraspezies Rückkreuzung mit dem Mausstamm *AKR* nach o.g. Kreuzungsschema führte zur weiteren Eingrenzung des Kandidatengenbereichs (Wedemeyer et al., 1996; Korthaus, Diplomarbeit 1996).

In meiner Diplomarbeit (1997) wurde eine Intraspezieskreuzung mit dem Mausstamm *CAST/Ei* als Intercross zwischen heterozygoten F₁ (*wr/+*) Tieren etabliert, die zur weiteren Eingrenzung des Kandidatengenbereichs beitrug.

Vorteile bestanden aus einem hohen Polymorphiegrad zwischen den Mausstämmen *C57BL/6J-wr* und *CAST/Ei*, einem guten Zuchterfolg und dem mit dieser Zucht durchgeführten F₂-F₃-Rekombinationsscreening (eigene Diplomarbeit, 1997), welches, durch Weiterverpaarung interessanter Wildtyp F₂-Rekombinationsträger mit heterozygoten F₁ und F₂ Tieren, zum Ausschluß weiterer Kandidatengene führte (M. Ulbrich, Diplomarbeit 2000; S. Fuchs, Dissertation 2002). Aus den Informationen dieser verschiedenen Kreuzungen waren hochauflösende genetische Karten des proximalen Mausechromosoms 11 erstellt worden, welche die Grundlage für eine Positionsklonierung bildeten und welche in deren Verlauf Aussagen über weitere Gene in Bezug auf die *wr*-Mutation ermöglichten.

2. Einleitung

In Abbildung 2.2 ist die Eingrenzung der Kandidatengenregion mittels dieser Kreuzungen zusammengefaßt.

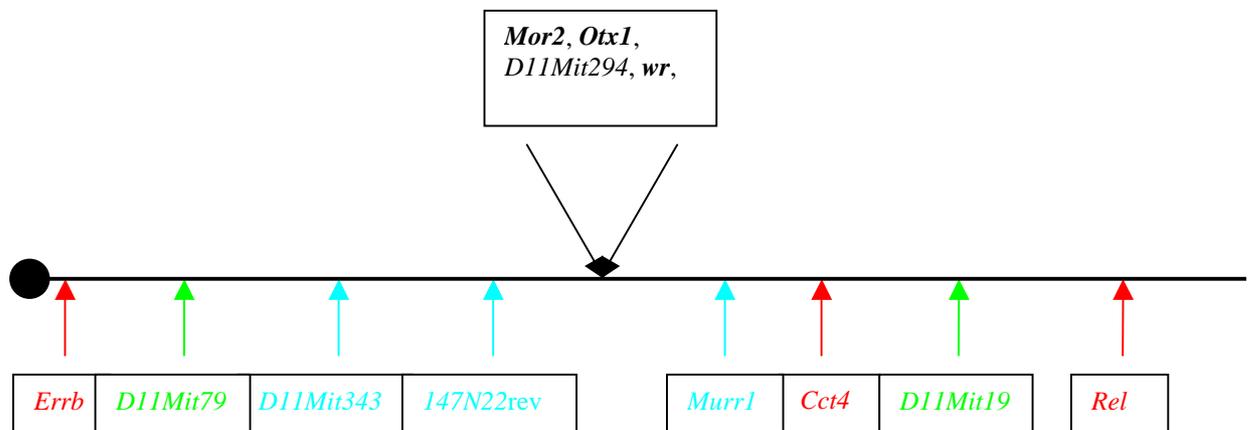


Abb. 2.2:

Schematische Darstellung einiger Mikrosatelliten und Gene, die in den verschiedenen Kreuzungen genetisch kartiert und zur Eingrenzung der *wr*-Mutation durch aufgetretene Rekombinationsereignisse beigetragen haben.

SPRET/Ei (rot), *AKR* (grün) und *CAST/Ei* (blau). Oberhalb des Chromosoms sind die Gene dargestellt, die in allen Kreuzungen mit der *wr*-Mutation kosegrigieren. Das akrosomische Zentromer ist als Punkt dargestellt.

2.3.3 genetische Einflüsse auf den Phänotyp der Mutanten

Die Individuen innerhalb eines Maus-Inzuchtstammes gelten als genetisch homogen und sollten somit eine nahezu identische phänotypische Ausprägung ihres Genoms besitzen. Durch die zur Kartierung verwendeten, definierten Kreuzungen zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen (s.o.) kommt es gleichermaßen zu einer zufälligen Neukombination der Genloci auf den anderen Chromosomen. In vielen Fällen wurde dabei eine Veränderung der ursprünglichen Ausprägung der verfolgten Phänotypen beobachtet, welche auf modifizierende Einflüsse eingebrachter Allele des Kreuzungspartners zurückgeführt werden können. Diese Genloci (Modifier, Quantitative Trait Loci, QTL) sind im Falle von Mausmutationen häufig beobachtet und durch Kopplungsanalysen kartiert worden (*vibrator*, Hamilton et al., 1997, *nmd*, Cox et al., 1999). Im Falle der *wobbler*-Mutation sind positiv und negativ wirkende Einflüsse sowohl auf den neurologischen als auch den Spermio-genese-Phänotyp in

fast allen Inter- und Intraspezifischen Kreuzungen (s.o.) beobachtet worden (Augustin, pers. Mitteilung).

In dem zur Positionsklonierung eingesetzten F₂-Intercross mit dem *Mus musculus castaneus* (*CAST/Ei*) Stamm kam es bei etwa einem Viertel der betroffenen Wobbler Tiere zu einer Verstärkung des neurologischen Phänotyps, weshalb zunächst von einem homozygot negativen Castaneus Einfluß ausgegangen worden war. In einer genomweiten Kopplungsanalyse konnte kein homozygoter *CAST/Ei*-Locus in den betroffenen Individuen gefunden werden, weswegen von einer Beteiligung mehrerer (in Kombination dominant, negativer) *CAST/Ei*-Loci ausgegangen wurde. Ein Abschnitt des Chromosom 14 war jedoch bei allen betroffenen Tieren wenigstens heterozygot für *CAST/Ei*-Allele. In einer speziellen Rückkreuzungsstrategie konnten Tiere gezüchtet werden, die den entsprechenden Chromosom 14 Abschnitt, mit *CAST/Ei*-Allelen, bei gleichzeitiger Ausdünnung des *C57BL/6J* Hintergrunds besaßen. Der Anteil der negativ modifizierten wobbler-Phänotypen konnte dadurch signifikant gesteigert werden. Damit ist sicher gezeigt, daß in diesem Abschnitt ein Gen lokalisiert sein muß, dessen *CAST/Ei*-Allel einen negativen Einfluß auf das mutierte *wr*-Genprodukt nimmt. Die Originalarbeit ist im Anhang beigefügt (Ulbrich et al., 2002).

2.3.4 Positionsklonierung am Beispiel des *wr*-Gens

N. Wedemeyer und A. Lengeling begannen in ihren Doktorarbeiten mit der Erstellung eines ersten, YAC-basierten Contigs in der Region des *Rab1*-Gens, welches später durch Rekombinationsereignisse außerhalb des *wr*-Bereichs lokalisiert werden konnte. Die Dissertationen von D. Korthaus, K. Resch und S. Fuchs beschäftigten sich u.a. mit dem weiteren Ausbau dieses Contigs unter Einbeziehung von BAC-Klonen. Die Suche nach darin enthaltenen Genen, welche potentielle, positionelle Kandidatengene für die *wr*-Mutation sind, wurde sowohl mit direkten, molekularbiologischen Verfahren (cDNA-Selektion; Korthaus, Dissertation 1999) als auch mit datenbankunterstützten Methoden durchgeführt.

Die Erstellung eines physikalischen Contigs des humanen Bereichs konservierter Syntanie (Chr.2p13-14, Korthaus et al., 1996; Resch et al., 1998) erbrachte zahlreiche ESTs, welche im Rahmen des HUGO gefunden und über Radiation-Hybrid-Kartierung auf dem humanen Chromosom 2p kartiert worden waren. Diese konnten teilweise auf die Maus übertragen werden, homologe Gene der Maus auf

dem Chromosom 11, welche mit Hilfe der PCR auf den genomischen Klonen des Maus-Contigs wiedergefunden werden konnten (Resch, Dissertation 2001, Fuchs, Dissertation 2002). Weitere Unterstützung bei der Suche nach neuen Kandidatengen für die *wr*-Mutation erbrachte eine Kooperation mit dem Institut für molekulare Biotechnologie (IMB) in Jena, wo ausgesuchte BACs des Bielefelder Maus-Contigs subkloniert und sequenziert wurden.

Trotz dieser immensen Anstrengungen konnte bis heute bei keinem der bislang, überwiegend im kodierenden Bereich, untersuchten Gene eine Mutation bei Wobbler-Mäusen gefunden werden. Keines der Gene zeigte auf Expressionsebene einen Unterschied zwischen Wildtyp- und Wobbler-Tieren, und auch die bei manchen Kandidaten durchgeführten biologischen Assays (Mor2, Korthaus et al., 1996; Ugp2, Resch et al., 1998) ergaben keinen Hinweis auf eine Veränderung.

2.4 Ziele dieser Arbeit

Die Ziele dieser Arbeit lagen in erster Linie in der Etablierung der Techniken zur Generierung von gentechnisch veränderten Mäusen.

Dabei sollten zum einen transgene Mäuse durch direkte Injektion von DNA-Fragmenten in Pronukleusstadien von befruchteten Eizellen hergestellt werden.

Die homologe Rekombination in ES-Zellen und die Generierung von chimären Mäusen zwischen ES-Zellklonen und Praeimplantationsembryonen, Grundlage für die Erschaffung von gezielten Genveränderungen, war das zweite Ziel dieser Arbeit.

Erstere Technik sollte u.a. zu transgenen Rettungsexperimenten der Wobbler-Mutation eingesetzt werden. Hierzu sollten transgene Mäuse hergestellt werden, welche relevante BACs der *wr*-Kandidatengenregion als zusätzliche Kopien stabil in das Genom eingebaut haben. Im Falle einer Aufhebung des Phänotyps bei BAC-transgenen, homozygoten *wr*-Mutationsträgern wäre die Mutation innerhalb der Sequenzen dieses BACs zu suchen. 1997 konnte erstmals eine Mausmutante, die Vibrator-Maus (*vb*), mit dieser Strategie aufgeklärt werden (Hamilton et al., 1997).

Das gezielte Ausschalten von Genprodukten sollte in Zusammenarbeit mit der Wobbler-Arbeitsgruppe zur Generierung von Kandidatengen-Knock-out-Mäusen eingesetzt werden. Anschließend sollten Allelietests, durch Kreuzung zwischen heterozygoten *wr*- und K.o.-Allelträgern, durchgeführt werden, die zur Aufklärung der Identität des *wr*-Gens führen können. Da aber die funktionelle Bedeutung der meisten Kandidatengene selbst nicht bekannt ist, wären Knock-out-Studien auch bei

2. Einleitung

einem negativen Allelietest von großem Wert und Interesse. Für das Gen Pellino1 (*Peli1*) wurde von S. Fuchs ein Knock-out-Konstrukt kloniert, welches in dieser Arbeit in ES-Zellen eingebracht wurde, die zur Herstellung von chimären Mäusen eingesetzt werden konnten.

Innerhalb des Sonderforschungsbereichs 549 (Prozessierung und Signalwirkung extrazellulärer Makromoleküle) der Universität Bielefeld sollte das Serviceprojekt Z3 aufgebaut werden, welches zur Realisierung weiterer transgener und K.o.-Mäuse verschiedener Fragestellungen beitragen sollte.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Mausstämme

3.1.1.1 *Mus musculus castaneus*

1996 wurden die Gründertiere dieses Mausstammes, *CAST/Ei*, vom Jackson Laboratory, Bar Harbor USA, bezogen. Weitere Tiere wurden von J.-L.Guenet, Institute Pasteur, Paris zur Verfügung gestellt und in die bestehende Zucht integriert.

3.1.1.2 *Mus musculus C57BL/6J-wr*

Dieser Inzuchtstamm (heterozygote Träger der *wr*-Mutation (*wr/+*)) wurde dem Lehrstuhl 1980 von der Mauszucht des Childrens Hospital, Harvard Medical School, Boston zur Verfügung gestellt. Homozygote Träger der Mutation (*wr/wr*) sind beiden Geschlechts infertil. Mit Hilfe eines stamminternen Polymorphismus im eng gekoppelt vererbten *Cct4*-Gen konnten heterozygote Träger des *wr*-Allels leicht detektiert und weitergezüchtet werden (Rathke-Hartlieb et al., 1999).

3.1.1.3 Der Mausstamm *CD129^{Clc2-}*

Von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jentsch (ZMNH, Hamburg) wurde unserer Abteilung ein Mausstamm zur Verfügung gestellt, in dem das Gen für den Chloridkanal-2 (*Clc2*) durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden war (*Clc2^{-/-}*, Bosl et al., 2001).

Dieses künstlich erzeugte Null-Allel des *Clc2*-Gens wurde auf den Hintergrund des *CD1* Stammes ausgekreuzt und der resultierende Stamm *CD129^{Clc2-}* genannt, da das Knock-Out-Allel in einer *129sv/J* ES-Zelllinie hergestellt wurde. Der Stamm wurde für zahlreiche Aspekte der ES-Zellkultur und Knock-Out Versuchen verwendet.

3.1.1.4 Der Mausstamm *C57BL/6J-gfp*

Dieser transgene Mausstamm wurde unserer Abteilung von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schachner (ZMNH, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Bei diesen Mäusen handelt es sich um transgene Mäuse, welche das *gfp*-Gen (Green Fluorescent Protein) aus der Qualle (*Aequorea victoria*) ubiquitär exprimieren.

3.1.1.5 weitere verwendete Mausstämme

Die Mausstämme *C57BL/6J*, *CD1* und *FVB* werden u.a. von der Firma Harlan/Winkelmann kommerziell vertrieben, von der Uni-Bielefeld bezogen und teilweise bereits seit Jahren weitergezüchtet.

3.1.1.6 Intraspezies Kreuzung *CAST/B6-wr*

Im Zuge der Positionsklonierung des *wr*-Gens wurde 1997 eine Intercross Zucht zwischen den Mausstämmen *C57BL/6J-wr* (*wr/+*) x *CAST/Ei* (*+/+*) generiert (eigene Diplomarbeit). Die hieraus entstandenen F₁-Tiere, konnten mit Hilfe der *Cct4*-Diagnostik als heterozygote Träger des *wr*-Allels identifiziert und zur F₂-Generation weitergezüchtet werden. Ihre Nachkommen wurden zur Kartierung und weiteren Eingrenzung des Kandidatengenbereichs des *wr*-Locus eingesetzt.

Für diese Arbeit wurden heterozygote (*wr/+*) Tiere der F₂-Generation miteinander verpaart, um befruchtete Eizellen für transgene Rettungsexperimente zu erhalten.

3.1.2 Materialien für die Kultur von Praeimplantationsembryonen

3.1.2.1 Verwendete Hormone

Die verwendeten Hormone zur Superovulation von Mäusen Pregnant Mares Serum (PMS, Handelsname: Intergonan, Intervet) und Human Chorionic Gonadotropin (HCG, Handelsname: Predalon, Intervet) sind als verschreibungspflichtige Arzneimittel im pharmazeutischen Handel erhältlich.

3.1.2.2 Kulturmedien für Praeimplantationsembryonen

Die verwendeten Kulturmedien M2 und M16 werden von der Firma Sigma (M 7167 bzw. M 7292) als fertige Lösungen vertrieben. M2-Medium behält an der Luft einen PH-Wert von 7,5 während M16-Medium im Brutschrank mit 5% CO₂ begast werden muß.

3.1.2.3 Weitere verwendete Lösungen

Ebenfalls von der Firma Sigma wurde embryogetestetes Mineralöl (M 8410), das Enzym Hyaluronidase (H 4272) als Trockensubstanz sowie Saure Tyrode (T 1788) als fertige Lösung bezogen. Die Hyaluronidase wurde in 1 ml sterilfiltriertem M2-Medium gelöst und in Portionen von 30µl auf -20° C gelagert.

3.1.3 Zellkulturmaterialien

3.1.3.1 Herkunft der verwendeten embryonalen Stammzellen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene, aus Mäusen gewonnene, embryonale Stammzelllinien (ES-Zellen) verwendet, welche in Tabelle 3.1 aufgeführt sind. Diese ES-Zellklone waren zuvor von den zur Verfügung stellenden Laboratorien auf ihre Fähigkeit, in die Keimbahn zu gelangen, getestet worden.

Name der Zelllinie:	Zur Verfügung gestellt von:	Ursprünglich etabliert im Labor von:
F1 (129J1 x C57BL/6J)	Dr. John Schimenti (TJL, Bar Harbor)	Dr. Rudi Jaenisch
R1 (129sv/ev x 129sv/J)	Dr. Anne Plück (EMBL, Heidelberg)	Dr. Andras Nagy / Dr. Janet Rossant
E14.1 (129ola x 129ola)	Dr. Anne Plück (EMBL, Heidelberg)	Dr. Klaus Rajewski

Tabelle 3.1:

Herkunft der verwendeten ES-Zellen

3.1.3.2 Feeder- und ES-Zellkulturmedien

Die Rezeptur der Zellkulturmedien entsprach der, wie sie im Labor von John Schimenti (The Jackson Laboratory (TJL), Bar Harbor, Maine, USA) verwendet wurden.

Die Zutaten für die Medien wurden zunächst von Gibco, später von der preisgünstigeren Firma PAA bezogen. Dem Hauptbestandteil DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Media, high Glucose) wurden unterschiedliche Mengen weiterer Substanzen zugesetzt. Hergestellt wurden hierfür zwei verschiedene Stammlösungen, welche bei -20°C gelagert wurden, ein ES-Zell-komplett-Mix und ein Feeder-Mix (s.Tabelle 3.2). Das in beiden Stammlösungen verwendete $100 \times \beta$ -Mercaptoethanol wurde jedesmal frisch angesetzt (10 ml dd/H₂O und 7 ml β -Mercaptoethanol) und vor Zugabe in den Mix sterilfiltriert (0,2 μm Filter).

Das für die Fibroblasten (Feeder) verwendete Feedermedium enthielt 10% FCS, für ES-Zellen wurde der Anteil auf 15% erhöht. Tabelle 3.3 zeigt die Zusammensetzung

3. Material und Methoden

von je 100 ml der verwendeten Medien, welche dann im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden konnten.

Zutaten	Feeder-Mix	ES-Zell-komplett-Mix	Firma/Bestellnr.
100 x Penstrep (5000U/ml)	20 ml	12 ml (12)	Gibco / 15140-122
100 x β -Mercaptoethanol	10 ml	6 ml (6)	Sigma / M 6250
Glutamax I	10 ml	6 ml (6)	Gibco / 35050-038
Non essential aminoacids	-	6 ml (6)	Gibco / 11140-050
Natrium-Pyruvat	-	6 ml (6)	Gibco / 11360-070
Mix (-20° C)	40 ml	36 ml	

Tabelle 3.2:

Stammlösungen zur Herstellung der Zellkulturmedien

100 ml Medium enthielten:	Feeder-Medium	ES-Zellmedium	Firma
Mix (s.Tab. 3.2)	4 ml	6 ml	
FCS (foetales Kälberserum)	10 ml	15 ml	Gibco
DMEM (high Glucose)	86 ml	79 ml	PAA / E15-002
Esgro ^R (Leukemia Inhibitory Factor, LIF)	-	500 U/ml auf Feedern 1000 U/ml ohne Feeder	Chemicon ESG 1107

Tabelle 3.3:

Zusammensetzung der Kulturmedien. Zur Selektion elektroporierter ES-Zellen wurden je 100 ml ES-Zellkulturmedium 0,6 ml des Antibiotikum Genitacin (50 mg/ml, Gibco) zugegeben.

3.1.3.3 Weitere verwendete Medien und Lösungen in der ES-Zellkultur

-Einfriermedium:

Das Einfriermmedium wurde für die Feeder- und ES-Zellen in gleicher Weise verwendet. Es wurde doppelt konzentriert angesetzt (20% foetales Kälberserum (FCS), 20% DMSO und 60% DMEM) und mit dem gleichen Volumen Zellkulturmedium mit den darin enthaltenden Zellen vermischt.

3. Material und Methoden

-Gelatinlösung (0,2%):

Zwei Gramm Gelatine (Sigma, G 1393) wurden in einem Liter doppelt destiliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

-1 x PBS (Phosphate Buffered Saline):

Ein Liter 1 x PBS enthält: NaCl (8,0 g), KCl (0,2 g), Na₂HPO₄ (1,44 g) und K₂HPO₄ (0,24 g), wurde als fertige Mischung von Gibco bezogen und in doppelt destiliertem Wasser gelöst und sterilfiltriert. PAA lieferte 1 x PBS als fertige Lösung für die Zellkultur (H15-002).

-Trypsin:

wurde ebenfalls als fertige Lösung (0,25%) von Gibco und PAA (L11-002) bezogen.

3.1.4. molekularbiologische Materialien

3.1.4.1 Oligodesoxynucleotide

Die verwendeten Oligodesoxynukleotide (PCR-Primer) wurden von TIB Molbiol (Berlin), Life Technologies (Eggenstein) und MWG (Ebersberg) synthetisiert und vertrieben. In Tabelle 3.4 sind die Sequenzen der verwendeten PCR-Primer aufgelistet, Tabelle 3.5 ist aus der Datenbank des Jackson Laboratoriums erstellt und enthält die PCR-Produktgrößen der drei wichtigsten, zur Diagnostik am *wr*-Locus verwendeten, Mikrosatelliten der Mausstämmen *C57BL/6J-wr* und *CAST/Ei*.

Name	Sequenz (5' - 3')	Annealing Temp. (° C)	Quelle
<i>D11Mit343 a</i>	AGATTCCTGCTTCTCCCCTC	64	MIT
<i>D11Mit343 b</i>	TGAGTTAGCAGGTTTTTATCTCAC	64	MIT
<i>D11Mit294 a</i>	TTCTGCACACAGGCATTCATTCAT	60	MIT
<i>D11Mit294 b</i>	TTGATTCACAGAATAATTTGTATTTGG	60	MIT
<i>D11Mit19 a</i>	CTAGCTGCTTCTAGAACCTTCCC	60	MIT
<i>D11Mit19 b</i>	TTTGATCCTGAGCACAAACG	60	MIT
<i>Cct4 da</i>	TCAGAATAAAGATGATGCCATGGG	60	Rathke-Hartlieb et al. 1999
<i>Cct4 db</i>	TCATCGATTTTCAGAATGCTCCGC	60	Rathke-Hartlieb et al. 1999
<i>Clc2-K.O. da</i>	GGGTACAGAGTAGGAACACTTTG	62	Jentsch
<i>Clc2-K.O. db1</i>	AGGTTAGCCCAATGACCTTAGC	62	Jentsch
<i>Clc2-K.O. db2</i>	CTAAAGCGCATGCTCCAGACTGCC	62	Jentsch
M13uni23	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT	60	diese Arbeit
M13rev24	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	60	diese Arbeit
48H20forb	GTTCTAGTTCTTCAGGTGTGT	60	K. Resch
48H20revb	TTCCATGGCCTCTCACAGTC	60	K. Resch

3. Material und Methoden

45M7forb	GAGTTCTGCTTGTAACCAACCTGAAG	60	K. Resch
45M7revb	GCTGAACAAAGAATTCTCACCTGA	60	K. Resch

Tabelle 3.4:

Verwendete Oligodesoxynukleotide (Primer, 5'-3').

Mikrosatellit	C57BL/6J	CAST/Ei
<i>D11Mit343</i>	108	120
<i>D11Mit294</i>	117	87
<i>D11Mit19</i>	140	164

Tabelle 3.5:

Zur Diagnostik am *wr*-Locus verwendete, polymorphe Mikrosatelliten (PCR-Produktgrößen in Basenpaaren) zwischen den verwendeten Mausstämmen C57BL/6J-*wr* und CAST/Ei.

3.1.4.2 Maus BAC-Bank

Die verwendete BAC-Bank „DOWN TO THE WELL Mouse ES BAC“ (DTTW, FBAC-4432.1) von Incyte Genomics, Palo Alto, USA, ist aus partiell mit *HindIII* geschnittener DNA von RW4 Zellen (Stamm 129/SvJ) hergestellt. Die DNA-Fragmente sind in den Vektor pBeloBAC11 kloniert, dessen durchschnittliche Insertgröße 120 kb beträgt. Die zur Mikroinjektion verwendeten BACs wurden im Zuge des *wobbler*-Positionsklonierungsprojekts isoliert. Sie waren Teil eines den Kandidatengenbereich fast lückenlos umspannenden BAC-Contigs.

3.1.4.3 Fragmentlängenstandards

Alle verwendeten DNA-Marker zur Fragmentgrößenbestimmung elektrophoretisch aufgetrennter DNA Proben wurden von der Firma MBI Fermentas, Vilnius (Litauen) bezogen. Für Mini-Gele wurden die Marker GeneRuler 100bp Ladder (80-1000 bp) oder ϕ X174-*HaeIII*-Restriktionsfragmente (118-1353 bp), zur Auftrennung großer DNA-Fragmente auf großen Gelen wurde der Marker ladderMix (100-10.000 bp) verwendet.

3.1.4.4 Verwendete Enzyme

Die verwendeten Enzyme zur Restriktion von DNA wurden von der Firma Life Technologies und MBI-Fermentas erworben. Von der Firma Qiagen (Hilden) wurde der zur PCR verwendete Taq-PCR-Mastermix (Taq-Polymerase) bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Embryologische Methoden

3.2.1.1 Vasektomie von männlichen Mäusen

Damit weibliche Mäuse ihnen eingesetzte Embryonen austragen können, müssen sie entweder selbst schwanger sein (wodurch die Chance ausgetragen zu werden für zusätzlich eingepflanzte Embryonen durch Competition sinken würde) oder in einen Zustand versetzt worden sein, der als „pseudoschwanger“ bezeichnet wird. In letzterem Fall kommt es nicht zu einer Befruchtung ihrer eigenen Eizellen und somit zur Vermeidung einer unerwünschten Konkurrenzsituation für die verpflanzten Zellen. Da es jedoch unbedingt notwendig ist, daß eine Kopulation stattgefunden hat, müssen die Männchen zuvor sterilisiert worden sein, wodurch deren Sexualverhalten jedoch unbeeinträchtigt blieb.

Männliche Mäuse im Alter von ca. 6 Wochen wurden mit 15µl/g Körpergewicht Ketamin/Xylazin-Stammlösung zunächst betäubt. Durch einen ca. 1cm langen Schnitt auf der Bauchseite wurden die Hoden an ihrem Fettpolster aus der Bauchhöhle hervorgezogen. Die Samenleiter wurden dann so gefasst, daß diese eine Schlaufe bildeten, welche mit einer rotglühenden Pinzette herausgetrennt wurde. Dabei wurden die entstehenden offenen Enden der Samenleiter zugleich verschmolzen und räumlich weit voneinander getrennt, wodurch ein späteres Zusammenwachsen dauerhaft verhindert wurde. Nachdem die Hoden vorsichtig in die Bauchhöhle zurückgesetzt worden waren, wurde die Wunde mit Klammern verschlossen. Nach einer zweiwöchigen Rekonvaleszenzzeit konnten die Tiere dann erstmals für Verpaarungen eingesetzt werden.

Durch die ersatzweise Verwendung von homozygoten $CD129^{C1c2-}$ Männchen (s.3.2.2.1) konnte die Vasektomie von Männchen später gänzlich eingestellt werden.

3.2.1.2 Ovulationszyklusbestimmung bei Spendermäusen

Als Eizellenspender wurden Mäuse im Alter von wenigstens acht bis zu einem maximalen Alter von 12-14 Wochen verwendet. Um die Zahl der in einem Experiment zur Verfügung stehenden, befruchteten Eizellen zu erhöhen, wurden die Spendertiere hormonell superovuliert. Von entscheidender Bedeutung ist dabei, neben der genauen zeitlichen Abfolge der verwendeten Hormone PMS (pregnant mares serum) und HCG (human chorionic gonadotropin), in welchem natürlichen

Zyklus sich die Spendertiere befinden. Der natürliche Ovulationszyklus, welcher bei Mäusen ca. vier Tage beträgt, soll hierdurch nicht durchbrochen, sondern hormonell unterstützt werden. Mit Hilfe eines Vaginalabstriches kann dieser relativ genau bestimmt werden. Mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette wird die Vagina mit lauwarmen Leitungswasser gespült und ein Tropfen auf einen Objektträger aufgebracht. Die in der Lösung vorhandenen Zelltypen können dann unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden.

Ein ausschließliches Auftreten von granulierten, eckigen Epithelzellen zeigt den Tag des Östrus und somit den Zeitpunkt der Ovulation an. Im Metöstrus sind hingegen nur die kleineren, runden Leukozyten vorhanden. Diesen Mäusen wurden zunächst 10 I.U. (international units) PMS und 46 Stunden später 5 I.U. HCG intraperitoneal gespritzt. Das Zwischenstadium des Proöstrus wurde nur dann verwendet, wenn die Zahl der Leukozyten deutlich überwog und neben diesen in nur geringem Maße als runde, glasig erscheinende Zelltypen degenerierende Epithelzellen vorhanden waren. Nach der HCG-Gabe wurden die Mäuse direkt mit fertilen Männchen verpaart. Die befruchteten Eizellen konnten dann am nächsten Morgen präpariert werden (Pronukleusstadium).

3.2.1.3 Präparation der befruchteten Eizellen

Die superovulierten Weibchen wurden durch Durchtrennung des cervicalen Rückenmarks getötet. Nach dem Öffnen der Bauchdecke wurde der Uterus mit einer Pinzette möglichst kurz hinter dem Eileiter gegriffen. Mit einem ersten Schnitt knapp hinter dem Ovar und einem zweiten Schnitt direkt hinter der Pinzette wurde der Eileiter vorsichtig herauspräpariert, ohne dabei verletzt zu werden. Nach kurzem Waschen in sterilem 1 x PBS wurde der Eileiter in einen 1ml Tropfen, auf 37° C vorgewärtes, M2-Medium überführt, derselbe Vorgang wurde mit dem zweiten Eileiter wiederholt.

Unter dem Binokular waren die ovulierten, von Follikelzellen umgebenen Eizellen bereits an einer Schwellung des Eileiters in diesem zu erkennen. Der Eileiter wurde mit einer Pinzette so gegriffen, daß er zu beiden Seiten neben dieser Schwellung verschlossen war. Mit einer zweiten Pinzette wurde dann die geschwollene Stelle des Eileiters eingerissen, wodurch die Eizellen freigesetzt wurden.

Die mit den Eizellen verbundenen Follikelzellen wurden in einem weiteren 1ml Tropfen M2-Medium, versetzt mit 30µl einer 10mg/ml Stammlösung des Enzyms

3. Material und Methoden

Hyaluronidase (in M2-Medium gelöst), von den Eizellen abgedaut. Anschließend wurden die Eizellen ein weiteres mal in M2-Medium gewaschen, bevor sie in M16-Medium im Inkubator (37° C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) bis zur Injektion der DNA gelagert werden konnten.

Neben der routinemäßigen VP-(vaginal plug) Kontrolle, welche die stattgefundenene Kopulation anzeigt, konnte unter dem Binokular sofort festgestellt werden, ob tatsächlich eine Befruchtung stattgefunden hatte. Das Zytoplasma unbefruchteter Eizellen ist bei Betrachtung unter dem Binokular kugelförmig, während befruchtete Eizellen einen sichtbaren Polkörper abschnüren und zusätzlich das Zytoplasma eine deutlich erkennbare Halbmondform ausbildet. Nicht selten wurde beobachtet, daß trotz eines fehlenden, offensichtlichen VPs eine Befruchtung stattgefunden hatte.

In Tabelle 3.6 ist der zeitliche Ablauf aller wichtigen Schritte für die Vorbereitung der Pronukleusinjektion zusammengefaßt.

PMS-Gabe (i.p.)	15.00 Uhr
HCG-Gabe (i.p.)	13.00 Uhr, (46h nach PMS)
Verpaarung	direkt nach HCG-Applikation
Ovulation und Befruchtung	ca. 0.00 Uhr
Vorkernstadium	ca. 10-17h post coitum (p.c.)
Verschmelzen der Vorkerne	ca. 17-20h p.c.

Tabelle 3.6:

Zeitplan für die Gewinnung befruchteter Eizellen (12h hell-dunkel-Rythmus, 6:00-18:00 Uhr)

3.2.1.4 Herstellung transgener Mäuse durch Vorkerninjektion von DNA-Konstrukten

Die Injektion fremder DNA in einen der beiden Vorkerne von befruchteten Eizellen erfolgte unter einem Inversen Mikroskop mit Nomarski-Optik bei 40facher Vergrößerung. Die Eizellen wurden auf eine ca. 1mm starke Glasplatte (ca.8 x 12cm) in einen Tropfen M2-Medium überführt. Die Haltekapillare (GB100 TF10, Science Products) wurde so installiert, daß sie die Glasplatte gerade eben nicht berührte, wodurch die Zellen, durch manuelles Verschieben der Glasplatte, auf dieser bewegt werden konnten. Durch Erzeugung eines Unterdrucks (Cell-tram Air, Fa. Eppendorf) konnten die Eizellen in die gewünschte Position gebracht und während der Injektion fixiert werden.

Die Injektion der DNA erfolgte mit einer Glaskapillare (GB100 TF10, Science Products), welche mit Hilfe eines Pullers (P95, Sutter Instruments) angeschmolzen und dabei unter Zug ausgezogen wurde. Die zu injizierende DNA wurde nach mindestens einstündiger Zentrifugation mit Hilfe eines Microloaders (Eppendorf) in die Injektionskapillare pipettiert. Durch vorsichtiges Anstoßen an der Haltekapillare konnte sie abgebrochen und dadurch geöffnet werden, scharf genug, sowohl die Zona pellucida als auch das Zytoplasma und die Vorkernmembran zu durchdringen. Die Injektion wurde mit einem N₂-Gasdruck betriebenen Mikroinjektor (5242, Eppendorf) ausgeführt, dessen Druck für jede Nadel so eingestellt wurde, daß ein permanentes, leichtes Ausfließen der DNA-Lösung gegeben war. Die Injektion wurde an einem über eine Kamera installierten Fernsehbildschirm beobachtet, wobei das „Aufpumpen“ der Zellkerne als sicheres Zeichen einer erfolgreichen Injektion diente.

3.2.1.5 Retransfer der Zygoten

Die injizierten Eizellen wurden in der Regel am späten Nachmittag des Injektionstages in den Eileiter eines pseudoschwangeren Weibchens transferiert. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Eizellen noch immer im Ein-Zell-Stadium. Die Narkose der Empfängerweibchen erfolgte ebenfalls mit 15µl pro Gramm Körpergewicht der vorgewärmten Betäubungslösung (Ketamin/Xylazin, 37° C), welche intraperitoneal verabreicht wurde. Den auf dem Bauch gelagerten Weibchen wurde parallel der Wirbelsäule, etwas über der Hüfte, mit einem ca. 1 cm langen, transversalen Schnitt das Fell geöffnet. Mit einer Pinzette konnte das Fell dann so verschoben werden, bis durch das Bauchfell (Peritoneum) das Fettpad des Ovars hell durchscheinend zu erkennen war. An dieser Stelle wurde das Bauchfell eingeschnitten, so daß mit einer zweiten Pinzette das Fettpad gegriffen und herausgezogen werden konnte. Mit diesem wurde automatisch das Ovar und der Eileiter bis hin zum oberen Verlauf des Uterus freigelegt. Mit einer kleinen chirurgischen Klammer wurde dann das Fettpad gegriffen und die Klammer über die Wirbelsäule abgelegt, wo diese, als Gegengewicht wirkend, ein Hinabgleiten des Ovars in die Bauchhöhle verhinderte.

Unter der Vergrößerung des Binokulars wurde die Bursa eingerissen, ein Häutchen das zwischen Ovar und Eileiter, welche nicht unmittelbar miteinander verwachsen sind, gelegen ist. Mit einer Glaskapillare, in der die Eizellen in minimalem Volumen

M2-Medium aufgenommen wurden, konnten diese dann in den Eileiter eingebracht werden.

Nach vorsichtigem Zurückgleitenlassen des Ovars in die Bauchhöhle wurde die Wunde mit zwei Wundklammern verschlossen.

In Einzelfällen konnte der Retransfer auch am darauffolgenden Tag erfolgen. Dies war dann der Fall, wenn bei keinem der Empfängerweibchen ein VP (s.o.) festgestellt werden konnte, wodurch eine erneute Verpaarung mit vasktomierten Männchen (oder *clc2*^{-/-}-Männchen, s. 3.2.2.1) durchgeführt werden musste. Die Eizellen wurden dann über Nacht in M16-Medium in Kultur genommen, wo sie sich bis zum Zweizellstadium weiterentwickelten. In diesen Fällen wurden nur die Zwei-Zell-Stadien retransferiert, da eine Schädigung durch die Injektion bei diesen weitergereiften Embryonen relativ unwahrscheinlich erschien. Eizellen, welche zu diesem Zeitpunkt nicht das Zwei-Zell-Stadium erreicht hatten, wurden nicht retransferiert. Die Operation erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.1.6 Herstellung von chimären Mäusen

Als chimäre Mäuse bezeichnet man allgemein Mäuse, deren Körperzellen sich aus einem Mosaik von Zellen zusammensetzen, die aus unterschiedlichen biologischen Eltern entstanden sind. In dem Zeitraum vor der Implantation in den Uterus ergeben sich dabei verschiedene Möglichkeiten, Embryonen und aus Blastozysten gewonnene, kultivierte Zellen (ES-Zellen) miteinander zu fusionieren. Die Blastozysteninjektion und die Morula-Aggregation.

3.2.1.6.1 Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten

Als Spendertiere für die Blastozysten wurden Weibchen des Stammes *C57BL/6J* und *C57BL/6J-gfp* verwendet, welche nach der Superovulation mit Männchen des gleichen Stammes verpaart worden waren. Die Präparation der Blastozysten (3.5 Tage p.c.) ist der von befruchteten Eizellen (0.5 Tage p.c.) sehr ähnlich. Neben dem Eileiter wurde in diesem Fall jedoch immer auch der Uterus herauspräpariert. Dabei erfolgte der erste Schnitt analog der Eizellpräparation zwischen Ovar und Eileiter, der zweite Schnitt trennte die beiden Uterushörner von der Vagina, ein dritter Schnitt trennte den zweiten Eileiter von seinem Ovar, so daß letztlich der gesamte Uterus mit beiden Eileitern an einem Stück in einen 3ml Tropfen M2-Medium überführt werden konnte.

3. Material und Methoden

Mit einer 1ml Spritze, gefüllt mit M2-Medium, und einer Kanüle (30G) wurde dann jede Uterushälfte in beide Richtungen gründlich gespült, wodurch die Embryonen in das Medium freigesetzt und gesammelt werden konnten. Ihre Größe entspricht der einer Eizelle, und die weitere Handhabung ist der der Eizellen analog. Bis zur Injektion der embryonalen Stammzellen wurden die Blastozysten ebenfalls in M16-Medium gelagert.

Die Injektion der embryonalen Stammzellen in die Blastozysten erfolgte wiederum in M2-Medium; dabei war der Aufbau der Injektionseinrichtung der bei der Vorkerninjektion verwendeten analog. Der Injektionsdruck wurde jedoch nicht mit dem Mikroinjektor erzeugt. Verwendet wurde hierfür eine Vorrichtung (Cell-tram Oil, Eppendorf) mit der sowohl ein Unter- (Beladen der Kapillare mit ES-Zellen) als auch ein Überdruck (Entlassen der ES-Zellen in das Blastocoel) erzeugt werden konnte.

Die ES-Zellen wurden nach dem Abtrypsinisieren ca. 25-30 mal in ES-Zellkulturmedium auf und ab pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Etwa 30µl dieser Zellsuspension wurden dann zu den Blastozysten in den Tropfen auf der Glasplatte zugegeben, wo sie in die Injektionskapillare aufgenommen werden konnten. Nach erfolgreicher Injektion wurden die Blastozysten erneut bis zum Retransfer in M16-Medium gelagert.

Die Operation zum Retransfer der Blastozysten entsprach der unter 3.2.1.5 beschriebenen zum Retransfer der Eizellen. Ihrem fortgeschrittenen Entwicklungsstand Rechnung tragend wurden sie jedoch nicht in den Eileiter der pseudoschwangeren Empfängermäuse, sondern in deren Uteri eingebracht. Dabei wurde dieser zunächst mit einer feinen Kanüle (30G) angestochen; in das so erzeugte Loch konnte die Transferkapillare eingebracht und die Embryonen mit dem Mund hineinpipettiert werden. Der Zeitpunkt der Anpaarung war bei Spender- und Empfänger-Weibchen in der Regel identisch, die Verpaarung der Empfänger konnte aber auch um einen Tag (nach den Spendertieren) versetzt werden.

3.2.1.6.2 Aggregation von frühen Morulastadien mit ES-Zellen

Neben der Injektion von embryonalen Stammzellen in das Blastocoel von Praeimplantationsembryonen (Blastozystenstadium) gibt es eine weitere, technisch weit weniger aufwendige Methode, um chimäre Mäuse zu erzeugen (Wood et al., 1993). Bei Säugetieren folgt auf das 8-Zellstadium in der Embryonalentwicklung die sogenannte Kompaktation. Die bis dahin recht lose zusammenliegenden Blastomere

3. Material und Methoden

lagern sich sehr eng aneinander an, wodurch nach erneuter Zellteilung die 16-zellige Morula entsteht. In diesem Zeitraum der beginnenden Kompaktation können die Embryonen relativ leicht mit weiteren Zellen versehen werden, welche in die entstehende Morula eines Embryos eingegliedert werden. Dabei können sowohl zwei Embryonen miteinander, als auch eine kleine Anzahl von ca. 8-15 ES-Zellen mit einem Embryo verschmolzen werden. Da ES-Zellen aus der sogenannten inneren Zellmasse von Blastozysten generiert wurden, sind sie nicht mehr in der Lage sich zu Trophoektoderm-Zellen zu differenzieren, die das Chorion, den embryonalen Teil der späteren Plazenta bilden. Ist der Prozess der Kompaktation bereits zu weit fortgeschritten, ist die Eingliederung der ES-Zellen nicht mehr möglich (vermutlich, weil diese keinen Kontakt zu den innenliegenden, am späteren Aufbau des eigentlichen Embryos beteiligten Zellen der Morula mehr erhalten).

In Vorversuchen wurden zunächst 8-Zell- und frühe Morula-Stadien der Mausstämme *C57BL/6J-gfp* und *CD1* miteinander aggregiert (in Zusammenarbeit mit Daniel Eberhard), welche ca. 2,5 Tage post coitum aus den Eileitern befruchteter Mäuse gewonnen werden. In der Regel befanden sich die 8-Zell-Praeimplantationsembryonen zu diesem Zeitpunkt noch im Eileiter. Nicht selten waren sie aber auch bereits in den vorderen Teil des Uterus eingespült worden, weswegen die komplette Entnahme der Reproduktionsorgane einen Verlust der Embryonen ausschloß. Nach dem Spülen der Morulae wurde die, den Praeimplantationsembryo umschließende, Zona-Pellucida mit Hilfe von saurer Tyrode (Sigma) abgedaut. Saure Tyrode entfernt die Proteinhülle sehr viel schneller als das alternativ verwendbare Enzym Pronase (Sigma).

Zunächst wurden die Embryonen (2.5d p.c.) aus den Eileitern befruchteter Mäuse gespült und in M16-Medium im Inkubator gesammelt und aufbewahrt, bis alle Tiere eines Versuchstages präpariert worden waren (s.o.).

Anschließend wurden zwei weitere Zellkulturschalen vorbereitet. Eine 60mm mit einem 1ml Tropfen M2-Medium und eine 100mm, in der neben einem ca. 200µl großen Tropfen saurer Tyrode vier ebenso große Tropfen M2-Medium aufgetragen wurden. Nach Überführung aller Embryonen eines Stammes in die Schale mit dem Tropfen M2-Medium wurden nacheinander je zehn Embryonen, unter ständiger Beobachtung unter dem Binokular, in die saure Tyrode abgelegt, wobei die minimal mögliche Menge M2-Medium in den Tropfen saurer Tyrode gelangen sollte. In dem Moment, wo die Zona-Pellucida fast vollständig abgedaut ist (sie erscheint dann

3. Material und Methoden

glasig und kantig), müssen die Embryonen in den ersten Tropfen M2-Medium überführt und anschließend in den drei weiteren sorgfältig gewaschen werden. Dabei wurde sowohl die Zona als auch die saure Tyrode restlos entfernt. Anschließend wurden die Embryonen wiederum in M16-Medium gelagert, welches in einer weiteren Kulturschale, in der mit einem spitzen Gegenstand Vertiefungen erzeugt wurden, zuvor mindestens 1-2 Stunden mit CO₂ begast wurde. In diesen Vertiefungen konnten die Embryonen des ersten Stammes zunächst vereinzelt werden, bevor je ein Embryo des zweiten Stammes, nach Durchlaufen der gesamten Prozedur, einfach in dieselbe Vertiefung zugegeben wurde (alternativ wurden auch Mikrotiterplatten verwendet).

Am folgenden Mittag wurden die hieraus entstandenen Blastozysten und kompakte Morulae (die Entwicklung der Embryonen verläuft in Kultur und experimentellen Bedingungen nicht immer 100% gleich schnell) in die Uteri pseudoschwangerer Empfängermäuse transferiert (s.o.).

3.2.2 Zellkulturmethoden

Die angewendeten Methoden wurden im Labor von John Schimenti (www.jax.org/~jcs/) erlernt und am Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie & molekulare Pathologie in Bielefeld etabliert.

Die Kultur von Feeder-Zellen ohne ES-Zellen erfolgte stets mit Feedermedium. Nach dem Aussäen von ES-Zellen auf die Feeder, wurde ausschließlich das ES-Zellkulturmedium verwendet (s. Tab. 3.2). ES-Zellen ohne Feeder wurden mit der doppelten Menge zugesetztem LiF (1000U/ml, Esgro^R) kultiviert, wenn eine unerwünschte Zelldifferenzierung verhindert werden sollte. Jeder Wechsel des Mediums wurde mit einem zwischenliegenden Waschschrift mit 1 x PBS durchgeführt.

3.2.2.1 Präparation embryonaler Fibroblasten als Feederzellen für die ES-Zellkultur

Als Spendermäuse für die Gewinnung von 13.5 d Embryonen wurden weibliche Mäuse des Stammes *CD129^{Clc2⁻}*, welche homozygote Träger des *Clc2⁻*-Allels waren, verwendet. Sie wurden mit heterozygoten (männliche *Clc2⁻* (-/-) Mäuse sind aufgrund eines Spermiendefekts steril) Tieren desselben Stammes verpaart, wodurch die resultierenden Embryonen mindestens ein K.o.-Allel besaßen. Da dieses mit einer

3. Material und Methoden

Neomycinresistenz verleihenden Cassette erzeugt worden ist, waren die aus ihnen gewonnenen embryonalen Fibroblasten alle gegen Neomycin (Handelsname: Genitacin, Gibco) resistent.

Zunächst wurden die Spendermäuse superovuliert (s. 3.2.1.2). Hierdurch wurde zum einen die Zahl der Embryonen erhöht, zum anderen war die zeitgerechte Anpaarung erleichtert. Nach positiver VP-Kontrolle am Morgen nach der Verpaarung konnte das Alter der Embryonen auf 0.5 d festgesetzt werden. Die Präparation erfolgte dann 13 Tage nach VP. Die Spendermütter wurden durch Durchtrennung des cervicalen Rückenmarks getötet, die Bauchdecke geöffnet. Beide Uteri, mit den sehr gut erkennbaren Embryonen, wurden entnommen und in eine Petrischale mit sterilem 1 x PBS überführt. Jeder sich noch in der Embryohülle befindende Embryo wurde dann aus dem Uterus herauspräpariert und in eine weitere Schale mit PBS überführt. Nach dem Freipräparieren der Embryonen aus ihrer Hülle wurden die „roten Organe“ (Herz und Leber) entfernt und die übrigen embryonalen Gewebe in einer Petrischale mit sterilem Feedermedium (s. 3.1.3.2) gesammelt, worin sie mit einer Schere grob homogenisiert werden konnten. In ein geöffnetes 50 ml Greiner Röhrchen wurde ein Sieb mit der Porengröße 100 µm (Cell-strainer, Falcon) gestellt, durch das das embryonale Gewebe mit dem Stopfen einer sterilen 2 ml Spritze 4-5 mal mit Feedermedium hindurchgerieben wurde. Abschließend wurde der Inhalt des Greiner Röhrchens in eine mit 25 ml Feedermedium befüllte Zellkulturflasche (Falcon) geschüttet und über Nacht inkubiert (37° C, 5% CO₂). Tags darauf hatten sich die Fibroblasten auf dem Boden der Zellkulturflasche abgeheftet und das Medium wurde einmal gewechselt, wodurch verbliebene Gewebeklumpen restlos entfernt werden konnten.

Die sehr schnell heranwachsenden primären Fibroblasten konnten nach wenigen Tagen abtrypsinisiert und pro Zellkulturflasche auf fünf 150 mm Zellkulturschalen aufgeteilt werden. Nach wenigen Tagen waren diese erneut konfluent bewachsen. Die Fibroblasten wurden wiederum abtrypsinisiert, pelletiert und auf Kryoröhrchen verteilt eingefroren (s. 3.2.2.4). Jede Trypsinisierung erhöht die Passagenzahl der Zellen um den Wert eins, so daß diese Zellen als P2-Fibroblasten bezeichnet wurden.

3.2.2.2 Bestrahlen von Feederzellen

Die Kultur von ES-Zellen ist mit und ohne embryonale Fibroblasten als Feederzellen prinzipiell möglich. Die Verwendung von Fibroblasten ist jedoch aus zwei Gründen von Vorteil: Zum einen heften sich ES-Zellklone leichter an ihnen ab, wodurch die Gefahr beim Medienwechsel Klone abzuspülen gering ist, zum anderen produzieren sie selbst LIF, ein zusätzlicher Schutz vor unerwünschter Differenzierung der ES-Zellklone. Damit die Fibroblasten möglichst wenig mit den ES-Zellen um die vorhandenen Medienressourcen konkurrieren und sie weiterhin nicht überwachsen, ist es notwendig, die Teilung der Fibroblasten zu verhindern. Hierfür stehen im wesentlichen zwei Verfahren zur Auswahl, die Inhibierung der Zellteilung mittels Mitomycin, einem Spindelgift, oder, kostengünstiger und einfacher, die radioaktive Bestrahlung, wodurch das Erbgut der Zellen irreversibel geschädigt wird.

In der Strahlentherapie des St. Franziskus Hospitals in Bielefeld wurden die Zellen mit einer einmaligen Dosis von 5000 rad teilungsinaktiviert. In Tabelle 3.7 ist die Anzahl der erzielten Zellkulturschalen dargestellt, die mit $1,5 \times 10^6$ bestrahlten Feederzellen (s.3.2.2.5) hergestellt werden konnten, und deren Böden eine flächendeckende Auskleidung mit Feederzellen besaßen.

Zellkulturschale (Ø)	Anzahl
35 mm	10
60 mm	5
100 mm	4
150 mm	3
6-well-Platte	1
24-well-Platte	1
96-well Platte	1

Tabelle 3.7:

Anzahl der erzielten Kulturschalen aus $1,5 \times 10^6$ bestrahlten Feederzellen

3.2.2.3 Füttern von Zellen

Tabelle 3.8 zeigt die jeweilige Menge Kulturmedium in Abhängigkeit von der Größe der verwendeten Zellkulturschale. Generell sollte das Medium von ES-Zellkulturen

3. Material und Methoden

täglich gewechselt werden. Verbrauchtes Medium ist an der gelblichen, frisches an einer rötlichen Färbung erkennbar.

Zellkulturschale (∅)	Kulturmedium / PBS
35 mm	2 ml
60 mm	4 ml
100 mm	10 ml
150 mm	25 ml
6-well-Platte	2 ml / well
24-well-Platte	1ml / well
96-well Platte	150 µl / well

Tab. 3.8:

Verwendete Menge Kulturmedium in Abhängigkeit von dem Kulturschalen-Durchmesser

3.2.2.4 Trypsinisieren von Feeder- und ES-Zellkulturen

Zunächst wurde das Kulturmedium aus den Kulturschalen mit sterilen, an eine Vakuumpumpe angeschlossenen „gelben Spitzen“ abgesogen. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurde gerade soviel Trypsin in die Kulturschale gegeben, daß der Boden bedeckt war. Nach 5-10 Minuten im Inkubator bei 37° C wurde die Trypsinisierung durch Zugabe der mindestens doppelten Menge Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden 15-20 mal mit einer Pipette auf- und abpipettiert, um die Zellklone in eine Einzelzellsuspension zu dissoziieren. Die Zeit, in der das Trypsin einwirken muß, ist bei ES-Zellklonen besonders kritisch. Zu kurzes Einwirken verhindert die Aufspaltung in eine Einzelzellsuspension, zu langes Einwirken schädigt die Zellen, und vermindert deren Qualität. Dennoch sollte ein Kompromiß immer in die Richtung geschlossen werden, daß die Zellen vereinzelt werden können, da ein Verklumpen der Klone zu einem größeren Qualitätsverlust der ES-Zellen führt, und diese in ihrer Teilungsfahig- und geschwindigkeit erheblich eingeschränkt werden.

Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Greiner-Röhrchen pipettiert und 3 min. bei 190 g zentrifugiert (Zentrifuge, Eppendorf), wodurch die Zellen pelletiert wurden. Der Überstand wurde abgesogen und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen konnten nun zur weiteren Expandierung erneut ausgesät (das Verhältnis

sollte immer 1:5 betragen, d.h. die Zellen einer Kulturschale beliebiger Größe sollten auf fünf derselben verteilt werden) oder eingefroren werden (s.3.2.2.5). ES-Zellkulturen wurden immer auf tags zuvor ausgesäte Feederplatten übertragen, deren Medium bereits durch ES-Zellkulturmedium ersetzt worden war.

3.2.2.5 Einfrieren von Feeder- und ES-Zellen

Wenn eine Zellkulturschale den gewünschten Bewuchs erreicht hatte, wurden die Zellen ca. 3-4 Stunden vor dem Einfrieren noch einmal mit frischem Medium gefüttert, bevor sie von der Kulturschale abtrypsinisiert und pelletiert wurden (s.3.2.2.4). Nach dem Resuspendieren des Pellets wurden je 0,5 ml gelöste Zellen in die vorbereiteten, mit 0,5 ml Einfriermedium befüllten, Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden dann in Styroporboxen gestellt, mit einem Deckel verschlossen und mindestens über Nacht auf -80°C eingefroren. Von dort konnten die Kryoröhrchen zu einem späteren Zeitpunkt in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt werden. Die Haltbarkeit auf -80°C beträgt ca. ein Jahr, im flüssigen Stickstoff (-196°C) sind die Zellen hingegen unbegrenzt haltbar.

Teilungsfähige Feeder-Zellen und expandierte ES-Zellklone wurden in der Regel so aufgeteilt, daß eine zuvor konfluent bewachsene Kulturschale ein Kryoröhrchen ergab, welches nach erneutem Auftauen auf fünf Kulturschalen derselben Größe ausgesät werden konnte.

Feeder-Zellen, welche nach Expandierung bestrahlt wurden (s.3.2.2.2), wurden mit Hilfe einer Zählkammer (nach Neubauer) ausgezählt. Die zugegebene Menge des Mediums wurde dann so eingestellt, daß in 0,5 ml $1,5 \times 10^6$ Zellen gelöst waren. Dies entsprach somit der Anzahl der Feeder-Zellen pro eingefrorenem Kryoröhrchen.

3.2.3 Gezielter Austausch genomischer Regionen in ES-Zellen (ES-Zell-Targeting)

Im folgenden soll der gesamte Versuchsablauf dargestellt werden, welcher ein ortsspezifisches Ersetzen von genomischen Regionen durch einen Zielvektor ermöglicht. Je nach Ziel des Versuchs unterscheidet man in Knock-out- (K.o.) und Knock-in-Vektoren. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren wurden konstruiert von:

- Sonja Fuchs (K.o.-Vektor für das Gen *Peli1*)
- Jana Beikert (K.o.-Vektor für die SMDF-Isoform des *Nrg1*-Gens)

- xxx (K.o.-Vektor für das Gen *Adam8*)
- Daniela Ehling (Vektor zur Einführung einer TK-Neo-Kassette (J.C. Schimenti) in die *wr*-Kandidatengenregion)

Alle diese Target-Konstrukte waren mit einer Neomycinresistenz-Kassette konstruiert worden. Das Arbeitsverfahren war daher für alle Versuche identisch. Die Verwendung unterschiedlicher ES-Zelltypen hing von Besonderheiten der jeweiligen Versuchsziele ab.

3.2.3.1 Elektroporation von ES-Zellen

Zunächst wurden zehn 60mm Kulturschalen mit teilungsinaktivierten Feederzellen ausgesät, auf die tags darauf ES-Zellen (Einzelzellsuspension) ausgesät und expandiert wurden. Nach „konfluentem“ Bewuchs (ca. 1 Woche, bei täglichem Medienwechsel) entsprach dies einer Zahl von ca. 1×10^7 ES-Zellen.

Die Zellen wurden abtrypsinisiert, pelletiert und in 1 ml sterilem 1 x PBS gelöst, in eine 0,4 cm Elektroporationsküvette überführt und auf Eis gekühlt. Unmittelbar darauf wurden 30µl des linearisierten Vektors in TE-Puffer (1µg/µl) dazupipettiert und mit 500µF, 0,23 keV elektroporiert. Die Abbildung 3.1 zeigt schematisch die Aufbauten des Gene-Pulsers der Firma BioRad für die Elektroporation von Bakterien- bzw. Säugetierzellen. Die Suspension wurde in 9ml ES-Zellmedium überführt und nach gutem Durchmischen auf zehn mit Feedern bewachsene 60 mm Zellkulturschalen verteilt, welche zuvor mit je 3 ml frischem ES-Zellmedium „gefüttert“ worden waren. Mit dem nächsten Medienwechsel begann tags darauf die Selektion gegen Genitacin (300 µg/ml). Die ES-Zellen, welche den Vektor aufgenommen und in ihr Genom eingebaut hatten, benötigten ca. 7-9 Tage unter Selektionsbedingungen, um zu gut sichtbaren Zellkolonien heranzuwachsen.

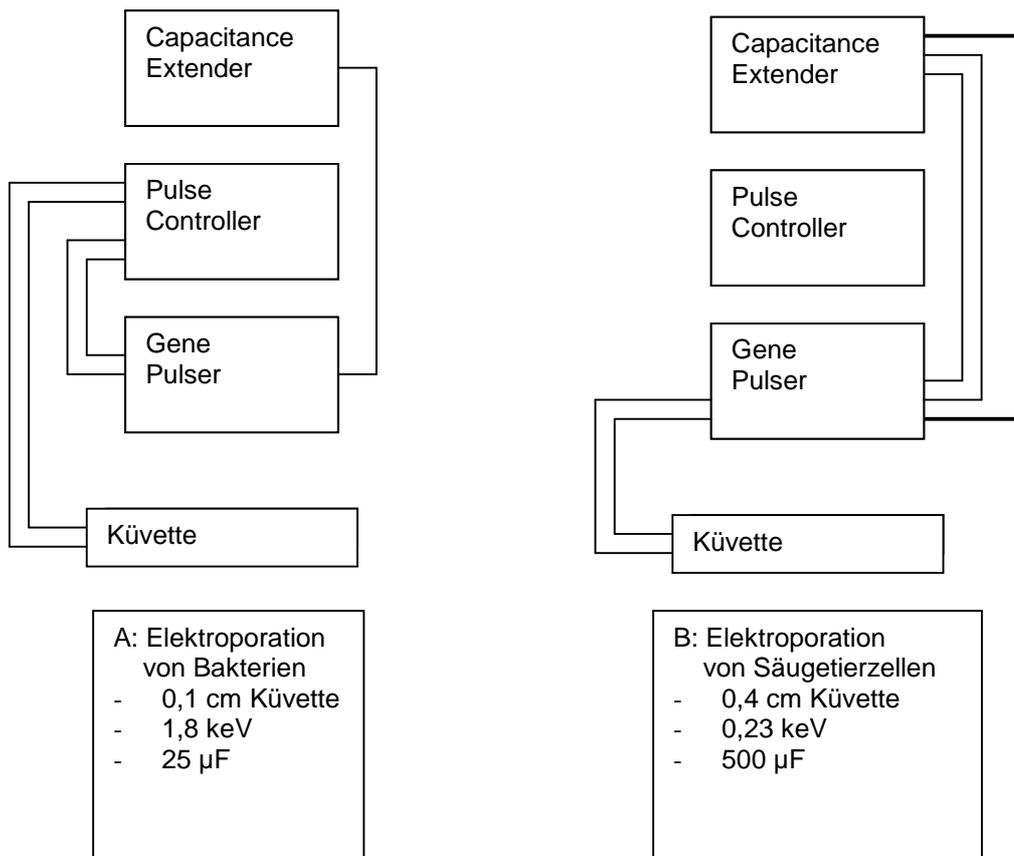


Abbildung 3.1:

Elektroporation von Bakterien- vs. Säugetierzellen. Anschlüsse und Einstellungen (Allan Bradley) des GenePulsers

3.2.3.2 Vereinzeln (Picken) der positiv selektierten ES-Zellklone

Die Targetingvektoren werden in der Regel mit 3-4 kb großen, die Selektionskassette flankierenden, genomischen Sequenzen konstruiert, welche die homologe Rekombination ermöglichen sollen. Dennoch ist der ortsspezifische Einbau ein relativ seltenes Ereignis, das bei den meisten Experimenten nur bei ca. 5% liegt. Deshalb muß eine weitere, aufwendigere Überprüfung der Klone durchgeführt werden, wozu die Klone zunächst vereinzelt werden müssen.

Einen Tag bevor die Klone gepickt werden können, werden 1-3 (je nach Zahl der überlebenden Klone) 96-well-Platten mit Feederzellen vorbereitet.

Einige Stunden vor dem Beginnen werden die Zellen noch einmal mit frischem Medium versorgt und pro Feederplatte wird eine 96-well-Platte (U-Boden-Form) mit je 30 μ l Trypsin befüllt. Dann wird das Medium der ES-Zellen durch 1 x PBS ausgetauscht. Mit einer auf 3 μ l eingestellten Pipette (Pipetman P-20) wird unter dem Binokular jede Kolonie mit einer frischen Pipettenspitze leicht am Rande angekratzt,

3. Material und Methoden

wobei die Pipette am ersten Druckpunkt gehalten wird. Durch plötzliches hochschnappen lassen wird die gesamte Kolonie in die Spitze aufgenommen und in der Trypsinplatte in einem well vereinzelt. Die Platte sollte nach möglichst 30 bis max. 40 min. mit 96 einzelnen Klonen befüllt sein. Während diese dann für 5 min. in den 37° C Inkubator gestellt wird, wird das Medium auf einer Feederplatte durch 50µl ES-Zellkulturmedium ersetzt. Die Trypsinisierung wird dann durch Zugabe von 75µl ES-Zellkulturmedium / well gestoppt, und jede Reihe wird (ca. 25-30 x) schnell auf und abpipettiert, um die Klone in eine Einzelzellsuspension zu überführen, bevor der gesamte Inhalt auf die vorbereitete Feederplatte übertragen wird.

Wiederum nach ca. 7 Tagen sollte ein großer Teil eines jeden wells gut bewachsen sein, nach jedem Trypsinisieren wachsen die Klone mit unvorhersehbarer, unterschiedlicher Geschwindigkeit, und es gilt einen guten Kompromiß zwischen den ersten, dann oftmals schon zu stark hochgewachsenen Klonen, gegenüber den mittelschnellen zu finden. Etwa die Hälfte bis zwei Drittel der Klone sollte gut gewachsen sein.

3.2.3.3 Splitten und Einfrieren der vereinzelt ES-Zellklone

Um die Ortsspezifität des Einbaus der Fremd-DNA zu zeigen, muß in der Regel ein Southern-Blot angefertigt werden. Die geringe homologe Rekombinationsrate erfordert einen Kompromiß zwischen möglichst vielen zu untersuchenden Klonen und einfacher DNA-Präparation von relativ schlechter Qualität.

Hierzu werden die Platten nach erneutem Füttern 2 x mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend mit 50µl Trypsin für 5-7 min. auf 37° C inkubiert. Dann werden in jedes well 50µl Einfriermedium (s.3.1.3.3) gegeben und mit einer Zwölfkanalpipette (auf 80µl eingestellt) 25-30 x auf- und abpipettiert. Ca. 30µl jeden wells werden in eine neue, zuvor mit 125µl ES-Zellmedium befüllte, 96-well-Platte (DNA-Platte) gegeben. Dies ist der einzige Zeitpunkt in der Zellkultur, in dem das ES-Zellkulturmedium kein LIF enthalten muß, da eine Differenzierung nicht verhindert zu werden braucht. Auch Feeder-Zellen würden hier nur die Analyse des Southern-Blots stören, da ihre DNA mitanalysiert werden würde. Nach wiederum ca.7-9 Tagen kann die DNA dann präpariert werden (s. 3.2.4.1.2)

Die verbleibenden ca. 70µl ersterer Platte (Masterplatte) werden mit 100µl sterilfiltriertem, embryogetestetem Öl (Sigma) überlagert und fest verschlossen in

einem Styroporbehälter auf -80°C eingefroren, wo sie solange gelagert wird, bis das Ergebnis des Southern-Blots festgestellt worden ist.

3.2.3.4 Auftauen der positiv getesteten Klone

Einen Tag vor dem Auftauen wurden wiederum Feeder auf eine 24-well-Platte ausgesät. Die Masterplatte wurde mit dem Boden in ein 37°C Wasserbad getaucht, und das Medium mit den positiv getesteten ES-Zellklonen wurde mit einer Pipette aus der Platte herausgesogen und auf die Feeder mit übertragen. Nach einigen Tagen waren Klone sichtbar, welche schrittweise (durch Trypsinisieren und Vereinzeln) auf nächstgrößere Kulturschalen übertragen und zuletzt auf 60 mm Platten expandiert werden konnten.

3.2.3.5 Vorbereitung der ES-Zellen für die Morulaaggregation

Drei Tage vor der Morulaaggregation (-3) werden die ES-Zellen auf 60mm Platten mit Feederzellen ausgesät. Tags darauf (-2) wird das Medium gewechselt. Wiederum einen Tag später (-1) werden die Zellen abtrypsinisiert, um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten. Die Zellen einer 60mm Platte werden auf eine gelatinisierte 100mm Platte ohne Feeder ausplattiert und mit 10 ml ES-Zellkulturmedium (1000 U/ml LIF) gefüttert. Am darauffolgenden Tag werden die Klone ca. 1-2h vor der Aggregation erneut abtrypsinisiert (5 min.). Nach Inaktivierung des Trypsins mit 10 ml ES-Zellkulturmedium werden die ES-Zellklone der passenden Größe (8-15 Zellen) unter dem Binokkular mit einer Glaspipette herausgesucht und direkt zu den Zona-freien Morulae gegeben. Die Fusion erfolgt durch direkten Kontakt der Morulae mit den ES-Zellklonen in M16-Medium im Inkubator (37°C , 5% CO_2) über Nacht. Anderntags werden die sich teilweise bereits zu Blastozysten entwickelten Fusionsembryonen und kompakte, fusionierte Morulae transferiert (s.3.2.1.4).

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 DNA Präparationen

3.2.4.1.1 DNA-Präparation aus genomischen BAC-Klonen

(Qiagen Maxi-Präp., modifiziert)

5 ml einer Vorkultur in LB-Chloramphenicol ($12,5\mu\text{g/ml}$) der BAC tragenden Bakterien wurde in 500 ml desselben Mediums überimpft und über eine weitere Nacht im 37°C Schüttler inkubiert. Tags darauf wurden die Bakterien bei 6000 g (4000rpm, Sorvall-

3. Material und Methoden

GS3-Rotor) pelletiert und anschließend in 30 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Überführung in die GSA-Zentrifugenbecher und Zugabe weiterer 30 ml des Puffers P2 wurde die Lösung 5 x vorsichtig invertiert und die Bakterienzellen 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysis wurde durch Zugabe von 30 ml P3-Puffer (-20° C) gestoppt, die Lösung auf Eis inkubiert und mehrfach vorsichtig invertiert. Nach einer weiteren 30 minütigen Zentrifugation bei 20.000 g (11,500 rpm im GSA-Rotor bei 4° C) wurde der Überstand mit der darin enthaltenden DNA durch einen Faltenfilter (angefeuchtet) filtriert und in einen frischen GSA-Behälter überführt.

Mit 60 ml 100% Isopropanol wurde die DNA bei Raumtemperatur zunächst gefällt, wiederum 30 min. bei 20.000 g (s.o.) pelletiert und anschließend mit 20 ml 70% Ethanol gewaschen und ein weiteres mal 20 min. zentrifugiert (10.000 rpm). Das Pellet wurde in 2,75 ml Wasser gelöst (15 min., 37° C) und in ein SS34Röhrchen überführt und nach erneuter Fällung mit 1 ml 7,5 M NH₄-Acetat 30 min. bei 13.000 rpm (4° C) zentrifugiert. Das Pellet wurde dann ein weiteres mal mit 100% Ethanol (-20° C) gewaschen und erneut bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch Zugabe von 2 ml H₂O und 10 ml QBT-Puffer wurde das Pellet resuspendiert und auf eine zuvor mit QBT-Puffer äquilibrierte Säule gegeben, an der die DNA gebunden wurde. Nach dreimaligem Waschen mit 30 ml QC-Puffer wurde die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert und mit 15 ml 100% Isopropanol gefällt und 15 min. auf Eis inkubiert.

Nach erneuter 30 min. Zentrifugation (13.000 rpm, 4° C) wurde das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol (-20° C) gewaschen, zentrifugiert (20 min.) und an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 200 µl H₂O gelöst und bei 4° C gelagert.

3.2.4.1.2 DNA-Präparation aus ES-Zellkulturen

(96-well-Format, Ramirez-Solis et al., 1992)

Jedes well einer „konfluent bewachsenen“ DNA-Kulturplatte (s.3.2.3.3) wurde nach dem Waschen mit PBS mit 50µl DNA-Lysis-Puffer (10mM Tris, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 0,5% Sarkosyl und 100µg/ml frisch zugesetzter Proteinase K) befüllt. Dann wurde die Platte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 55° C im Wärmeschrank inkubiert, wodurch die Zellen lysiert wurden. Eine Lösung gemischt aus 10 ml 100% Ethanol (-20° C) und 1,5 ml 5M NaCl wurde in jedes well pipettiert (100µl / well), um die in dem viskosen Zell-Lysat befindliche DNA 30 min. bei Raumtemperatur zu fällen. Nach 10 minütiger Zentrifugation (Eppendorf, U/min) wurde die Platte, eine Lage Zellstoff über die Öffnungen haltend, vorsichtig auf den Kopf gestellt. Nach

dreimaligem Waschen der DNA mit je 100µl Ethanol (70%, -20° C) / well wurde die Platte luftgetrocknet, bis sämtlicher Ethanol verdampft gewesen ist. Die am Boden sichtbare DNA wurde in 60µl TE-Puffer / well bei 37° C über Nacht resuspendiert und im Kühlschrank bei 4° C bis zur enzymatischen Spaltung für einen genomischen Southern-Blot gelagert.

3.2.4.1.3 DNA-Präparation aus Maus-Schwanzspitzen-Biopsien (Tailcuts)

Zur Extraktion der DNA wurde einer Maus ca. 0,5 cm des Schwanzes abgeschnitten und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 300µl 1x PCR-Puffer (1mM Tris-Hcl, 5 mM Kcl), dem 0.45% NP 40 und 0.45% Tween20 zugesetzt wurde, überführt. Mit einer Schere wurde die Schwanzspitze in möglichst kleine Stücke geschnitten und nach Zugabe von 5µl einer 20 mg/ml Stammlösung Proteinase K bei 55° C über Nacht im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 10 min. auf 95° C erhitzt um die Proteinase K zu denaturieren. Nach kurzer Zentrifugation konnte 1µl des Überstandes direkt für eine PCR-Reaktion (s.3.2.4.4) eingesetzt werden.

Diese Methode wurde von Pomp und Murray zur PCR-Diagnostik transgener Mäuse vorgestellt. Aufgrund der fehlenden Phenol-/Chloroform-Extraktionsschritte ist die DNA relativ unsauber und nur zur Darstellung kleiner PCR-Produkte (~1000 bp) verlässlich einsetzbar. Die DNA-Proben werden bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

3.2.4.1.4 DNA-Präparation aus Geweben (Niere, Lunge)

Für die DNA-Präparation wurde Lungen- oder Nierengewebe verwendet. Das Gewebe wurde direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend unter flüssigem N₂ mit einem vorgekühlten Pistill, in einem ebenfalls vorgekühlten Mörser, pulverisiert. Das Pulver wurde in 4 ml DNA-Extraktionspuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS pH 8,0) aufgenommen und nach Zugabe von 5µl Proteinase K (20 mg/ml) über Nacht bei 55° C inkubiert. Anschließend extrahiert man die Proben dreimal bei Raumtemperatur:

- 1.) mit 3 ml Phenol für 2,5 h
- 2.) mit 4 ml Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) für 1,5 h
- 3.) mit 4 ml Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1) für 30 min.

Hierzu wurden die Probenröhrchen an einem senkrecht aufgestellten Plattenspieler befestigt und bei 45 U / min rotiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurden die

Röhrchen in einer Hettich-Zentrifuge (Typ Rotana S) bei 9000 U / min zentrifugiert. Danach wurden die wässrigen Überstände vorsichtig, um das Scheren der DNA zu vermeiden, mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (1 ml, Eppendorf) abgenommen und in ein neues 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Nach der letzten Extraktion wurde die DNA in den Überständen durch Zusatz von einem halben Volumen 7,5 M Ammoniumacetat Lösung und dem doppelten Volumen 100% Ethanol (-20° C) gefällt. Zur Vermeidung von Luftblasenbildung an der präzipitierten DNA wurde das Röhrchen vorsichtig invertiert und 10 min bei 9000 U / min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 3 ml 70% Ethanol (-20° C) gewaschen, an der Luft getrocknet, in 2 ml TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,6, 1 mM EDTA) bei 4° C für eine Woche auf einer Wippe durch langsames Invertieren resuspendiert und abschließend bei 4° C gelagert.

3.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung der gereinigten DNA wurde eine 1: 50 Verdünnung der Probe bei Wellenlängen von 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) photometrisch (BioPhotometer 6131, Eppendorf) gemessen. Die Gesamtkonzentration in µg/ml wurde durch Angabe der Verdünnung von dem Gerät berechnet. Der Reinheitsgrad der Präparation wurde durch den Quotient aus OD 260 / OD 280 überprüft, welcher automatisch durch das Photometer bestimmt wurde. Dieser sollte nicht größer als 1,8 sein, um eine hinreichende Reinheit der DNA zu gewährleisten.

Für die Generierung von BAC-transgenen Mäusen wird eine BAC-DNA Konzentration von ca. 1-2 ng/µl in der Injektionslösung benötigt. Diese geringe Menge läßt sich photometrisch nicht exakt bestimmen. Daher wurden zur Konzentrationsbestimmung der eluierten BAC-DNA Verdünnungsreihen angefertigt und auf ein Kontrollgel aufgetragen. Somit konnte der benötigte Verdünnungsfaktor optisch über die DNA-Menge abgeschätzt werden.

3.2.4.3 Restriktionsspaltung von genomischer ES-Zell-DNA

Alle zur Restriktion eingesetzten Enzyme wurden von Life Technologies bezogen und mit den mitgelieferten 10fach Puffern verwendet. Die genomische DNA der ES-Zellen wurde über Nacht (in den 96-well-Platten) bei den vorgegebenen Temperaturen gespalten, wobei wiederum eine feuchte Kammer verwendet wurde (s. 3.2.4.1.2).

3.2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Diese 1988 von Saiki et al. entwickelte Methode dient der in vitro Vervielfältigung von DNA Molekülen. Zu dem gewünschten DNA-Abschnitt muß jedoch in jeder Richtung ein Stück flankierende Sequenz bekannt sein, so daß man zwei Oligonukleotide (Primer) synthetisieren kann, welche komplementär zu der bekannten Sequenz sind und als Startermoleküle dienen, an deren freies 3'-OH-Ende von der DNA-Polymerase I weitere Nukleotide gemäß der Matrize (Template) angefügt werden können. In einer zyklischen Reaktion können innerhalb weniger Stunden DNA-Fragmente milliardenfach kopiert werden. Diese Vervielfältigung wird durch folgende drei Reaktionen, die in einer Programmschleife (s.Tab. 3.9, Schritte 2-4) 35 mal wiederholt werden, erreicht:

- 1) Hitzedenaturierung der DNA
- 2) Anlagerung der spezifischen Primer (Annealing)
- 3) Polymerisation des jeweilig komplementären DNA-Stranges

Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem Taq PCR Master Mix (Qiagen, Hilden) in 0,5 ml Gefäßen (Perkin Elmer) durchgeführt. Ein Standardansatz (20 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl Master Mix (enthält 0,5 U Taq DNA-Polymerase, 1 x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und dNTPs, je 200 µM)
0,4 µl Primer a (50 pmol/µl),
0,4 µl Primer b (50 pmol/µl),
8,2 µl H₂O,
1 µl DNA (~100 ng).

Grundlage der Automatisierung dieser Reaktionsabfolge war die Isolierung der DNA-Polymerase I aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, welche heute jedoch rekombinant in großem Maßstab hergestellt wird. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72° C, der Temperatur, bei der die Polymerisationsreaktion durchgeführt wird. Gleichzeitig ist sie aber hitzestabil genug, um kurzfristige Temperaturanstiege, die zur Denaturierung der DNA benötigt werden, unbeschadet zu überstehen. Die Anlagerungstemperatur der Primer ist sequenzabhängig und wird mit Hilfe der 2+4-Regel ermittelt, die durch Addition von je 2° C für eine A/T- und 4° C für eine C/G Basenpaarung grob bestimmt werden kann. Jede PCR-Reaktion muß daher zunächst etabliert werden, d.h. neue Primer müssen zunächst bei mehreren

3. Material und Methoden

Temperaturen getestet werden. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Trio-Thermoblock, Biometra) durchgeführt. Anschließend wurden 8µl der PCR-Ansätze im Agarosegel aufgetrennt (s. 3.2.4.5.1).

Programm	Temperatur (° C)	Dauer
1. initiale Denaturierung	94° C	4 min
2. Anlagerung der Primer	Primersequenz-spezifisch	1 min
3. Polymerisation	72° C	1 min
4. Denaturierung	92° C	1 min
5. abschließende Polymerisation	72° C	10 min

Tab.3.9:

Angewendetes PCR-Programm. Die Schritte 1. und 5. wurden außerhalb der Schleife (4.→2., 35 x) einmalig ausgeführt.

3.2.4.5 Agarose-Gelelektrophoresen

DNA-Moleküle tragen wegen ihres Phosphodiesterückgrats eine negative Ladung; in einem Spannungsfeld wandern sie zur Kathode. Neben der Höhe der angelegten Spannung ist die Porengröße der Gele, welche von der Prozentigkeit der gelösten Agarose (0,8-2 %, Gibco, BRL) abhängig ist, für die Mobilität der DNA-Fragmente verantwortlich, wodurch sie der Größe nach aufgetrennt werden können.

3.2.4.5.1 Analytische Gelelektrophorese

Zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente (PCR-Produkte und genomische Fragmente) wurde die DNA mit BPB-Probenpuffer (6x Probenpuffer: 0,025% Bromphenolblau ; 0,25% Xylen Cyanol ; 40% (w/v) Saccharose in H₂O) versetzt und in 1 x TBE-Puffer, (0,089 M Tris-Cl pH 8,0 ; 0,089 M Borsäure ; 20 mM EDTA), welcher dann auch als Laufpuffer verwendet wurde, in Minigelen (7 x 10 cm, ca. 3 mm Gelhöhe) bei ca. 10 V/cm für 45-60 min. oder großen Gelen (13 x 15 cm, ca. 6 mm Gelhöhe) bei 5 V/cm 4-5 h (oder 1 V/cm über Nacht) aufgetrennt.

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Färbebad (1µg/ml 1 x TBE) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, und kann auf einem

Transilluminator (INTAS UV-Systeme) durch UV-Licht (312 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Die so sichtbar gemachten DNA-Banden wurden mit einer digitalen Kamera (CCD-Kamera KP-16a, Hitachi) aufgenommen und auf einem Photodrucker (Mitsubishi Photo Printer P 500) dokumentiert.

Bei Bedarf können die Gele anschließend für einen Southern-Blot weiterverarbeitet werden (s. 3.2.3.6).

3.2.4.5.2 physiologische Gelelektrophorese

Im Gegensatz zur analytischen Gelelektrophorese, bei der die aufgetrennte DNA nach erfolgter Dokumentation direkt verworfen oder geblottet wird, diente diese Gelelektrophorese der Aufreinigung von großen DNA-Fragmenten, welche durch Injektion in Pronuklei von befruchteten Eizellen zur Herstellung transgener Tiere verwendet werden sollte. Der verwendete Laufpuffer 1 x TAE (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) unterschied sich vom später verwendeten Injektionspuffer durch eine 10fach höhere Konzentration des EDTA, außerdem fehlte die für Zellen giftig wirkende Borsäure.

Für die Injektion von BACs sollte der BAC-Klonierungsvektor (7,4 kb) entfernt werden. Das darin enthaltene Maus-DNA-Fragment (BAC-Insert) wurde zunächst enzymatisch (*NotI*) herausgespalten und elektrophoretisch in einem großen Agarose-Gel (Gibco, 0,8%) von dem Vektor getrennt. Um den Kontakt des zu injizierenden Inserts mit Ethidiumbromid und UV-Strahlung zu vermeiden, wurde eine Geltasche als Testspur mit dem Spaltungsansatz beladen, die von dem übrigen Gel abgeschnitten und mit Ethidiumbromid gefärbt werden konnte. Die Insertbande wurde aus dem Gel herausgeschnitten, wodurch nach Anlegen dieses Gelstücks die daneben aufgetragene ungefärbte Insert-DNA aus dem übrigen Gel ausgeschnitten und elektroeluiert werden konnte.

3.2.4.5.3 Elektroelution von BAC-Inserts aus Agarose-Gelen

Um große DNA-Fragmente aus Gelen wieder in Lösung zu bekommen, ohne sie zu schädigen, kursieren in der Literatur verschiedene Protokolle. Eines der häufigsten ist der enzymatische Verdau des Gels mit β -Agarase. Weitaus schonender ist die elektrophoretische Elution, bei der das ausgeschnittene Fragment einfach aus dem Gel, durch eine permeable Membran hindurch, in eine Falle wandert. Verwendet wurde hierfür das Biotrap 1000 System (Schleicher & Schuell), womit sowohl DNA

als auch Proteine aus Gelen eluiert werden können (45 V / 19,5 h). Zur Kontrolle wurde das Gelstückchen anschließend noch einmal mit Ethidiumbromid gefärbt.

3.2.4.6 DNA-Transfer auf Nylonmembranen („Southern-Blotting“)

Dieses von E. M. Southern (1975) entwickelte Verfahren dient der Immobilisierung von DNA auf Membranen, um spezifische Fragmente durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden zu identifizieren. Die über Nacht im Agarosegel (0,8 %) aufgetrennten, gespaltenen ES-Zell DNA-Proben wurden partiell depuriniert, indem das Gel für 45 min bei RT in 500 ml 0,25 N HCl geschüttelt wurde. Eine anschließende Behandlung des Gels mit 500 ml (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl) für 30 min. führte zur Denaturierung der DNA. Dieser Denaturierungspuffer wurde auch als Transferpuffer beibehalten. Der Kapillar-Blot (Sambrook et al., 1989) zum Transfer der DNA auf eine positiv geladene Membran (Pall oder Nylonbind, Serva) erfordert folgende Apparatur:

1. eine mit dem Denaturierungspuffer gefüllte Wanne; darüber eine Glasplatte, auf der ein 3 MM-Whatman-Papier so plaziert wird, daß die überhängenden Enden in den Puffer ragen;
2. das umgekehrt aufgelegte Gel, dessen Taschen abgeschnitten werden;
3. die mit Puffer angefeuchtete Membran;
4. drei angefeuchtete 3 MM Whatman-Papiere;
5. ein etwa 10 cm hoher Stapel Zellstoff;
6. eine mit Gewichten beschwerte Glasplatte.

Durch den entstehenden Kapillarsog wird die DNA mit dem Puffer aus dem Gel auf die aufliegende Membran transportiert. Die Vollständigkeit des über Nacht erfolgten Transfers wurde durch erneutes Färben des Gels mit Ethidiumbromid kontrolliert. Zuletzt wurde die Membran für 1 h bei 80° C gebacken, wodurch die DNA kovalent an sie gebunden wird.

3.2.4.7 RNA-Methoden

3.2.4.7.1 RNA-Isolierung aus Geweben (Chomczynski und Sacchi, 1987)

Verwendet wird frisch präpariertes oder direkt nach Präparation schockgefrorenes Gewebe, welches bei -80° C gelagert werden kann, versetzt es mit 1 ml/100 mg Gewebe Denaturierungslösung (4M Guanidinium-Thiocyanat, 25 mM Na-Citrat pH 7,0, 0,5% Na-Sarcosyl (v/v), 0,1 M β -Mercaptoethanol). Danach wird die Probe für 1 min im Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) homogenisiert und auf Eis gekühlt. Je 100 mg verwendetem Gewebe wird 1 ml wassergesättigtes Phenol, 200 μ l

3. Material und Methoden

CHCl₃/Isoamylalkohol (49:1) und 100 µl 2 M Na-Acetat pH 4 hinzugegeben und die Probe kräftig geschüttelt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10.000 U/min in der Kühlzentrifuge (4° C) wird die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Greiner-Röhrchen überführt. Zur Fällung wird die Probe mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol (-20° C) versetzt und für 15 min bei -70° C inkubiert. Anschließend erfolgt die Sedimentation der RNA unter gleichen Bedingungen. Man dekantiert den Überstand und resuspendiert das Sediment in 300 µl Denaturierungslösung. Die Lösung wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 300 µl eiskaltem Isopropanol versetzt. Nach 15-minütiger Fällung bei -70° C erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 10.000 U/min in der Eppendorfszentrifuge (4° C, Kühlraum). Der Überstand wird verworfen, das Sediment mit 300 µl 70 % EtOH gewaschen, der Überstand erneut vollständig abgesaugt und das Pellet luftgetrocknet. Abschließend werden die Proben in 100 µl DEPC-H₂O aufgenommen und in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei 65° C für ca. 10 min gelöst.

3.2.4.7.2 Präparation von mRNA mittels magnetischer Kügelchen (Dynabeads)

Für die Gewinnung von mRNA aus Gesamt-RNA wurde das Dynabeads mRNA Purification Kit (Dyna, Oslo, Schweden) verwendet. Die Hauptkomponente des Kits sind superparamagnetische Polystyrol-Kügelchen, an die 25 Desoxy-Thymidin-Nukleotide auf ihrer Oberfläche gebunden sind. Die Aufreinigung der mRNA erfolgt durch komplementäre Basenpaarung zwischen dem polyA-Schwanz der mRNA-Moleküle und der oligo dT-Kette der Kügelchen, nicht gebundene tRNA und rRNA kann abgewaschen werden. Die Elution erfolgt in einer salzfreien Lösung, wodurch die Basenpaarung gelöst und die mRNA-Moleküle von der Oberfläche der Dynabeads entfernt werden.

Für die Aufreinigung wurden 15 µg total RNA in 100 µl H₂O aufgenommen und für 2 min bei 65° C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. In der Zwischenzeit gibt man 200 µl (entspricht 1 mg) der gelösten Dynabeads in ein Eppendorfreaktionsgefäß in einen Magnetständer. Nach 30 s wird der Überstand abgenommen, die Dynabeads mit 100 µl Bindungspuffer (20 mM Tris-HCl pH7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA) einmal gewaschen und anschließend erneut in 100 µl des Bindungspuffers aufgenommen. Die denaturierte RNA wird zu den Dynabeads zugegeben und für 5 min bei RT in einen Schüttler gestellt, wo die mRNA an die Dynabeads binden kann. Danach trennt man mit Hilfe des magnetischen Ständers

den Bindungspuffer ab und wäscht zwei Mal mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M LiCl, 1 mM EDTA). Mit 10 bis 20 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5) wird die gebundene mRNA bei 65° C (2 min.) wieder in Lösung gebracht.

3.2.4.7.3 RNA-Minigele

Um die Qualität isolierter RNA abzuschätzen werden RNA-Minigele angefertigt. Die Gelkammern werden zur RNase-Dekontamination für eine halbe Stunde mit 3% H₂O₂ behandelt und danach kurz in DEPC-H₂O gespült. Für ein 1%-iges Gel werden 0,3 g Agarose in 3 ml 10 x MOPS-Puffer (0,2 M 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure pH 7,0, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA pH 7,0) und 27 ml DEPC-H₂O eingewogen und unter Aufkochen gelöst. Nach der Erstarrung von 30 min wird das Gel mit 1 x MOPS überschichtet.

Die RNA-Proben werden folgendermaßen vorbereitet: 1 bis 2 µg RNA in 9 µl RNA-Probenpuffer (50% Formamid, 10% 10 x MOPS, 0,45% Formaldehyd, 7% Glycerin, 0,5% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Es wird 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei 65° C denaturiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wird die Probe sofort auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt bei 10 V/cm solange bis die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreicht hat.

3.2.4.7.4 Große, denaturierende RNA-Gele

Für ein großes RNA-Gel werden 1,25 g Agarose in 12,5 ml 10 x MOPS und 108,8 ml DEPC-H₂O eingewogen und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 50° C gibt man 6,38 ml Formaldehyd hinzu.

10-20 µg lyophilisierte RNA wird in 20 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen und 2 µl EtBr (1 mg/ml) zugegeben. Nach 15-30-minütiger Denaturierung bei 65° C und 5-minütiger Inkubation auf Eis trägt man die Probe direkt auf das Gel auf. Der Gellauf erfolgt bei 70 V für 4 h.

3.2.4.7.5 RNA-Transfer auf Nylonmembranen („Northern-Blotting“)

Für das Northern Blotting wurde ein Kapillarblot-Verfahren durchgeführt. Nach dem Lauf wurde das Gel für eine halbe Stunde in RNase-freiem Wasser gespült und danach der Blot wie unter 3.2.3.6 beschrieben aufgebaut. Nach dem Transfer über Nacht erfolgte die kovalente Bindung an die positiv geladene Membran für eine Stunde bei 80° C.

3.2.4.8 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Um einen komplementären, markierten DNA-Strang zu erhalten, muß das DNA-Fragment denaturiert vorliegen. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* benötigt als Start zur in-vitro-Replikation freie 3'-OH Enden, die durch ein Gemisch von Oligonukleotiden zufälliger Sequenz angeboten wurden. Als Substrat wurden die vier Nukleotide zugesetzt, von denen das ATP in α -Stellung das Isotop- ^{32}P trug. Namengebend "random primed" für diese Methode war das Oligonukleotidgemisch (Feinberg und Vogelstein, 1983).

In 14 μl Aqua bidest wurden 50-100 ng aufgereinigte DNA-Fragmente durch 10 min Kochen denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 μl Randomprimern in 10 x Klenow-Puffer (2,5 μg Hexanukleotidgemisch in 0,1 mM MgCl_2 ; 1 mM DTE; 2 mg/ml BSA; 0,5 M Tris-Cl pH 7,2; Boehringer Mannheim), 1 μl Nukleotidgemisch (dCTP, dGTP und dTTP; je 1 mM, Pharmazia), 1 μl Klenow-Polymerase (2 U, Boehringer, Mannheim) und 2 μl dATP (α - ^{32}P ; spezifische Aktivität 800 Ci/mmol [Hartman]) wurde gemischt, kurz zentrifugiert und für 2-3 h bei 37° C inkubiert. Die Probe wurde in 180 μl TEN-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,1 M NaCl; 1mM EDTA) aufgenommen und mit Hilfe einer Sephadex-G50-Säule (1 ml-Eppendorf-Pipettenspitze, gestopft mit silikonisierter Glaswolle und aufgefüllt mit in TEN-Puffer äquilibriertem Sephadex-G50-Medium; Pharmazia) durch Zentrifugation (Hermel Typ Z 364) für 5 min bei 1500 U/min von den nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt. Der Inhalt des als Sammelgefäß benutzten 1,5 ml Eppendorfgefäßes mit Schraubverschluß wurde mittels Handmonitor hinsichtlich seiner Radioaktivität untersucht. Anschließend wurde die Probe durch 10 min Kochen erneut in Einzelstränge getrennt, und nach weiteren 5 min Inkubation auf Eis zur Hybridisierung eingesetzt.

3.2.4.9 Hybridisierung (Church & Gilbert, 1984)

Das Prinzip der Hybridisierung beruht auf der Basenpaarung einzelsträngiger DNA aufgrund komplementärer Sequenzen. Die Nylonmembran wurde luftblasenfrei an die Wandung spezieller Hybridisierungsröhren gelegt. Zunächst wurden die freien DNA-Bindungsstellen der Nylonmembran durch Zugabe von 10ml Church-Lösung (0,5 M Na_2HPO_4 , pH 7,2; 7% SDS (w/v); 1 mM EDTA; filtriert) für 30 min. bei 65° C

abgesättigt. Nach Zugabe der markierten DNA-Sonde wurden die Röhren über Nacht bei 65° C inkubiert. Beide Schritte erfolgten in einem Rollinkubator (Bachofer).

Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur und Erniedrigung der Ionenkonzentration wurden dann die unspezifisch gebundenen Sonden von den Filtern entfernt. Mit einem Handmonitor ließ sich der Zeitpunkt bestimmen, an dem fast nur noch spezifische Bindungen vorhanden waren, auf dem Filter konnte die Radioaktivität (30-50 counts pro Minute (cpm)) an definierten Stellen gemessen werden.

Standard Waschbedingungen:

- 1) 2 x 10 min. bei RT mit je 500ml 2 x SSC; 0,1% SDS
- 2) Je nach Stärke der gemessenen Radioaktivität, variable Zeit bei 40-70° C; 200ml 0,1 x SSC; 0,1% SDS

3.2.4.10 Autoradiographie

Nach Beendigung des Waschvorgangs wurde der Filter in Haushaltsfolie eingeschlagen und in eine Expositionskassette (Amersham) zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) zwischen Verstärkerfolien gelegt. Die Exposition erfolgte bei -70° C war zeitlich abhängig von der verbliebenen Radioaktivität auf der Membran und variierte zwischen 3-10 Tagen. Der Röntgenfilm wurde anschließend in der Dunkelkammer folgendermaßen entwickelt: 5 min in Entwickler-Lsg. (1:5 verdünnt), 3 min im Stopp-Bad (H₂O mit wenigen Tropfen Essigsäure) und 5 minütiger Fixierung (Fixierer 1:5 verdünnt). Nach 10 minütigem Wässern wurde der Film an der Luft getrocknet.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung von BAC-transgenen Mäusen

Die klonierte und linearisierte DNA der BACs (s. 4.1.1) wurde in die Vorkerne von befruchteten Oocyten (F2 *CAST/B6-wr (wr/+)* x F2 *CAST/B6-wr (wr/+)*) injiziert, wobei die Chance direkt ein transgenes Tier mit dem natürlichen Genotyp *wr/wr* zu erhalten bei 25% lag, 50% der Tiere sind heterozygote (*wr/+*) Träger der Mutation. Injizierte Oocyten wurden in pseudoschwangere Empfängerweibchen transferiert und alle geborenen Tiere wurden zunächst mit den BAC-End spezifischen Primern (Resch et al., 1998, Dissertation 2001), welche mit den auf 24bp verlängerten Primern M13for und M13rev kombiniert wurden, via PCR auf das Vorhandensein der BACs als Transgen getestet (s. 4.1.2). Als positiv Kontrolle diente die injizierte, reine BAC-DNA, als negativ Kontrolle wurde (neben der bei jeder PCR-Reaktion immer mitgeführten Wasserkontrolle) die DNA eines beliebigen F2-Tieres desselben Stammes verwendet, um unspezifische genomische PCR-Produkte auszuschließen.

4.1.1 Aufbereitung der BAC-DNA für die Pronukleusinjektion

Die Schritte zur Aufreinigung der BAC-Insert-DNA für die Pronukleusinjektion soll anhand der BACs *48H20* und *45M7* ausführlicher gezeigt werden. Ziel ist es, eine saubere DNA ohne für die Eizellen giftige Stoffe und ohne den Klonierungsvektor zu erhalten. Molekularbiologische Methoden der DNA-Aufreinigung, insbesondere das Waschen der DNA mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, ist für die Injektionslösung ungeeignet, da Phenol Proteine sehr effektiv vernetzt und die Eizellen bereits durch Spuren von Phenol geschädigt werden. Nach dem Herausschneiden des Vektors, wodurch die BAC-Insert-DNA gleichzeitig linearisiert wird (s. 4.1.2), muß das Insert durch Gelelektrophorese von dem Vektor getrennt und wieder in Lösung gebracht werden. Der Verdau des Gels mit β -Agarase führte dabei auch bei sehr vorsichtigem Arbeiten zu einer Scherung der DNA. Die Durchschnittliche Größe der erhaltenen Fragmente lag bei ca. 20 kb und betrug somit nur ein Viertel bis ein Fünftel der ursprünglichen Insertgröße. In Abbildung 4.1 ist die mit Ethidiumbromid gefärbte Testspur in dem linken, abgetrennten Agarosegel nach *NotI* Verdau des BACs *48H20* gezeigt. Die rechts daneben aufgetragenen, ungefärbten BAC-Insert-Fragmente wurden dann in der gleichen Höhe aus dem Gel herausgeschnitten und in

4. Ergebnisse

einer Biotrap1000-Elektrophoresekammer (s. 3.2.4.5.3) über Nacht aus dem Gelstückchen eluiert. Die so erhaltene, aus der Falle wieder aufgenommene DNA wurde auf einem weiteren Testgel aufgetragen und zeigte stets eine einzige diskrete Bande.

In Abbildung 4.2 ist die anschließende Verdünnungsreihe gezeigt, die zur Konzentrationsbestimmung ebenfalls auf ein Testgel aufgetragen wurde. Photometrisch bestimmte Werte des Eluats wurden auf verschiedene Konzentrationen eingestellt und auf dem Gel mit den bekannten DNA-Mengen der Marker verglichen. Die Endkonzentration der Injektionsverdünnung des BAC-Inserts wurde abschließend auf 1-2 ng/μl DNA in sterilfiltriertem Injektionspuffer eingestellt.

Linearisierung und Eliminierung des Vektors

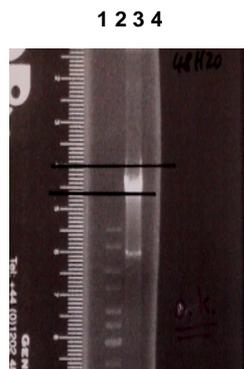


Abbildung 4.1

Einstellen der Injektions- verdünnung der BAC-DNA

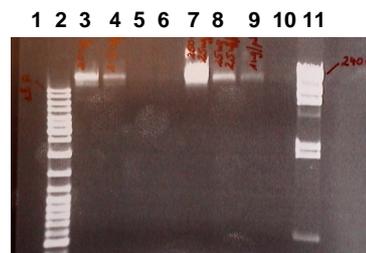


Abbildung 4.2

Abb.: 4.1 *NotI*-Verdau des BAC 48H20

In Spur 2 des Gels ist der Marker Ladder-Mix aufgetragen. Rechts daneben die *NotI*-geschnittene DNA des BACs 48H20 (20μl des 200μl Restriktionsansatz). Der herausgeschnittene BAC-Vektor ist als diskrete Bande zu erkennen, eine *NotI*-Schnittstelle im Insert des BACs ist nicht vorhanden. Mit einem angelegten Lineal wird der Bereich, der aus dem rechts abgetrennten Gelstück ausgeschnitten werden soll, zusätzlich markiert. Mit zwei Geltaschen Abstand waren darin die übrigen 180μl des Restriktionsansatzes auf das Gel aufgetragen, welche somit weder mit Ethidiumbromid noch mit UV-Licht in Kontakt gekommen sind.

Abb.: 4.2: Ermittlung der Konzentration der BAC-Injektionslösung

Spur 1: Leer

Spur 2: 5μl Marker, Ladder-Mix (oberste Bande (10kb) ≅ 12 ng)

Spur 3: aufgereinigtes BAC 45M7-Insert (~30 ng)

Spur 4: BAC 45M7-Insert, 1:10 Verdünnung (~3 ng)

Spur 5 u. 5: BAC 45M7-Insert, 1:100 Verdünnung (~0,3 ng, nicht sichtbar)

Spur 6: Leer

4. Ergebnisse

Spur 7: BAC 65J11-Insert, (~250 ng)

Spur 8: BAC 65J11-Insert, 1:10 Verdünnung (~25 ng)

Spur 9: BAC 65J11-Insert, 1:20 Verdünnung (~1,2 ng)

Spur 10: BAC 65J11-Insert, 1:100 Verdünnung (~0,2 ng, nicht sichtbar)

Spur 11: 5µl Marker, *HindIII*-verdaute λ DNA (oberste Bande \cong 240 ng)

4.1.2 Prinzip des Nachweises der BAC-Integration

Für den Nachweis der Integration der injizierten BAC-DNA in das Genom der aus den Experimenten geborenen Tiere wurde aus Tailcut-Biopsien gewonnene DNA mit Hilfe der PCR getestet. Da sämtliche Sequenzen des BAC-Inserts auch in den genetisch nicht veränderten Mäusen vorkommen und innerhalb der BACs keine weiteren Polymorphen Marker zwischen den beteiligten Mausstämmen bekannt waren, konnte eine Insertion nur über die BAC-Enden gezeigt werden.

Alle verwendeten BACs zur Generierung transgener Mäuse wurden im Zuge des Wobbler-Positionsklonierungsprojekts ansequenziert, um neue STS-Marker zu erhalten und Überlappungsbereiche zu finden (Korthaus, Dissertation 1999; Resch, Dissertation 2001). In dieser Arbeit wurden die dabei erhaltenen BAC-End spezifischen PCR-Primer, die aus dem jeweiligen BAC-Insert herauslesen (for.b und rev.b), mit den verlängerten M13uni23 und M13rev24 Primern (s.3.1.4.1), welche aus der künstlichen Vektorsequenz abgeleitet wurden (s. Abb. 4.3), kombiniert. Tiere, die den BAC nicht integriert haben, geben kein spezifisches Produkt für diese Reaktion, da nur der Insert-spezifische Primer in ihrem natürlichen Genom vertreten ist.

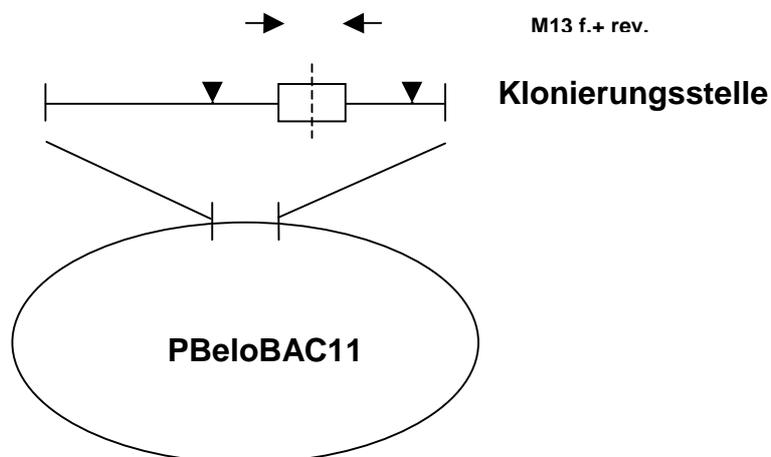


Abb.: 4.3
Abbildung 4.3
Schematische Darstellung des BAC-Vektor (pBeloBAC11)

4. Ergebnisse

Im oberen Ausschnitt sind die *NotI*-Schnittstellen innerhalb der multiplen Klonierungsstelle als schwarze Dreiecke angedeutet. Die gestrichelte Linie stellt die *HindIII*-Klonierungsstelle dar, in die die genomische DNA der Maus als BAC-Insert hineinkloniert worden ist. Die Pfeile oberhalb der Klonierungsstelle deuten die verlängerten PCR-Primer M13 forward und reverse an, deren tatsächlicher Abstand von der *HindIII*-Schnittstelle je ca. 100 bp beträgt.

4.1.3 Nachweis des BACs 48H20 in transgenen Mäusen

Nach dem oben vorgestellten Prinzip wurden alle geborenen Tiere zunächst auf das Vorhandensein des injizierten BACs in einer PCR-Reaktion getestet.

Die Etablierung der jeweiligen PCR wurde zuvor mit der Injektionslösung der BAC-DNA als Positivkontrolle (H₂O als negative Kontrolle) und verschiedenen DNA-Proben von Tieren aller beteiligten Mausstämme als genomische Negativkontrollen durchgeführt. In Abbildung 4.4 ist das Ergebnis der ersten beiden BAC-transgenen Mäuse und einer ersten Nachzucht gezeigt. Die beiden Founder wurden als 48-1 und 48-15 bezeichnet, da diese ihre Nummern in einer Reihe getesteter Tiere waren.

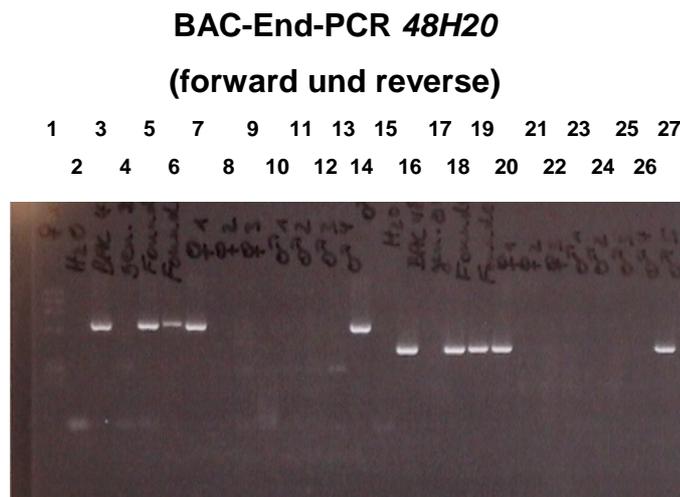


Abbildung 4.4

Abb.: 4.4

Produkte der 48H20 for. (Spur 2-14) und rev. (Spur 15-27) PCR-Ansätze mit folgender template DNA:

Spur 1: DNA-Marker ϕ x *HaeIII*

Spur 2 und 15: Wasser als negativ Kontrolle

Spur 3 und 16: Injektionslösung des BACs 48H20 (1-2 ng/ μ l)

Spur 4 und 17: genomische DNA als negativ Kontrolle

Spur 5 und 18: Founder 48-1

Spur 6 und 19: Founder 48-15

Spur 7-14 und 20-27: Nachzucht des Tieres 48-1

4. Ergebnisse

Neben den Foundern 48-1 und 48-15, welche neben der Injektionslösung als interne Positivkontrollen in der PCR mitgeführt wurden, zeigen zwei Tiere der Nachzucht ein positives Signal sowohl für das forward- (7 bzw. 14) als auch das reverse- (20 bzw. 27) BAC-Ende. Die übrigen Geschwister und die genomische Maus-DNA zeigen kein PCR-Signal mit dieser verwendeten Primerkombination. Diese Nachkommen des Tieres 48-1 haben das Transgen nicht vererbt bekommen.

4.1.3.1 Genomische Allelverteilung der *48H20*-BAC-transgenen Founder und Nachkommen am *wr*-Locus

Die transgenen Founder 48-1 und 48-15 waren aus heterozygoten *CAST/B6-wr* F₂-Elterntieren hervorgegangen. Jede Weiterzuchtung geschah ebenfalls mit heterozygoten *CAST/B6-wr* F₂-Tieren. Mit Hilfe der polymorphen Mikrosatelliten *D11Mit19* und *D11Mit343*, welche als distal und proximal flankierende Marker die Grenzen des Kandidatengenbereichs darstellen, und dem polymorphen Mikrosatelliten *D11Mit294* (s. Tab. 3.5, S.20), der im zentralen *wr*-Kandidatengenbereich des Chromosoms11 liegt, konnte die Allelverteilung am *wr*-Locus stellvertretend dargestellt werden.

Beide *48H20*-Foundertiere wurden als heterozygote Träger des *wr*-Allels identifiziert und weitergezüchtet. Die resultierenden Linien wurden als *CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹* und *CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹⁵* bezeichnet. Die Kombination aus natürlicher Allelverteilung am *wr*-Locus, Vorhandensein des Transgens und resultierendem Phänotyp wurde bei allen BAC-transgenen Tieren und deren Geschwistern analysiert. In der folgenden Abbildung 4.5a – 4.5c sind die PCR-Ergebnisse dieser drei Mikrosatelliten, und den BAC-End for. und rev. PCRs (4.5d – 4.5e) zum Nachweis des Transgens, bei weiteren Nachzuchten gezeigt.

D11Mit19

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

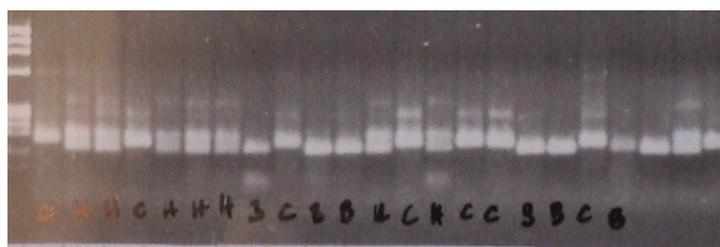


Abbildung 4.5a

4. Ergebnisse

D11Mit 343

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

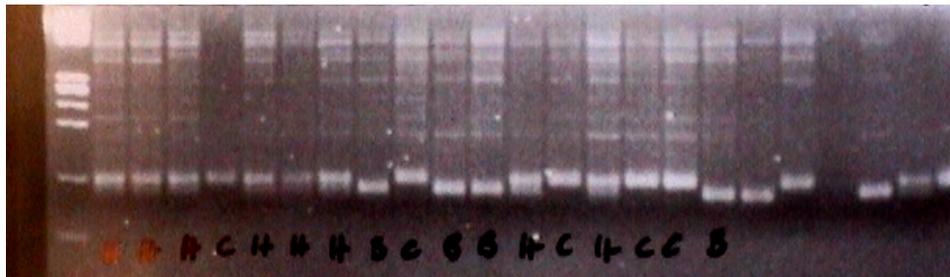


Abbildung 4.5b

D11Mit294

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

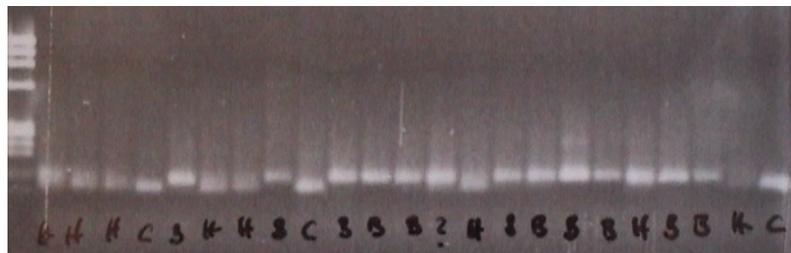


Abbildung 4.5c

48H20-BAC-End-PCR (forward)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

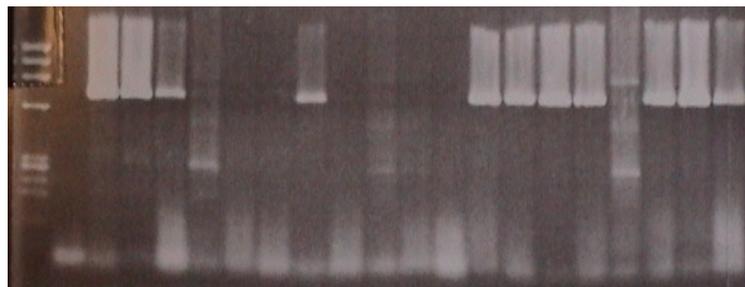


Abbildung 4.5d

48H20-BAC-End-PCR (reverse)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

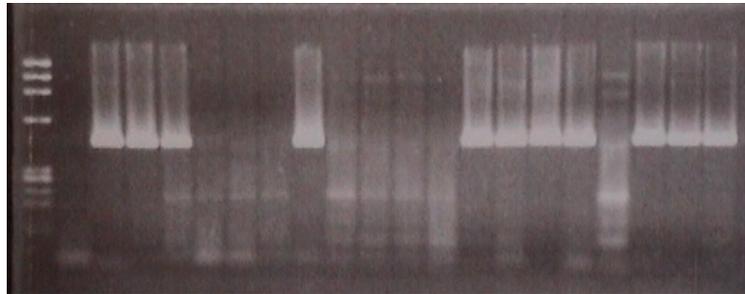


Abbildung 4.5e

Abb.: 4.5 a-e

Mikrosatelliten-Diagnostik und Nachweis des BACs 48H20 als Transgen bei Nachzuchten der Linien CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹ und CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹⁵

Auf den Gelen der Abbildungen 4.5a-c sind die drei Mikrosatelliten in der stets gleichen Reihenfolge aufgetragen:

Spur 1: DNA-Marker ϕ x *HaellI*

Spur 2-18: Nachkommen 1-17 (s. auch Tabelle 4.1)

Spur 19: Nachzucht Weibchen Nr. 1 (s. Abb. 4.4)

Spur 20: Nachzucht Männchen Nr. 5 (s. Abb. 4.4)

Spur 21: BAC 48H20 Eluat

Spur 22: genomische C57BL/6J-Kontroll-DNA

Spur 23: genomische CAST/B6-wr F₁-Kontroll-DNA

Spur 24: genomische CAST/Ei-Kontroll-DNA

Die Gele der Abbildungen 4.5d und e zeigen die 48H20 for. und rev. PCR-Ergebnisse für diese 17 Tiere in der Reihenfolge:

Spur 1: DNA-Marker ϕ x *HaellI*

Spur 2: Wasser als negativ Kontrolle

Spur 3: Injektionslösung des BACs 48H20 (1-2 ng/ μ l)

Spur 4: Nachzucht Weibchen Nr. 1 (s. Abb. 4.4)

Spur 5-21: Nachkommen 1-17 (s. auch Tabelle 4.1)

Die Ergebnisse der Geno- und Phänotypen der getesteten Tiere sind in der Tabelle 4.1 noch einmal zusammengefaßt dargestellt.

4. Ergebnisse

Tier-Nr. (s.Abb.: 4.5)	<i>D11Mit</i> 19	<i>D11Mit</i> 294	<i>D11Mit</i> 343	BAC 48H20	Founderlinie	Phänotyp
Weibchen 1	B6	B6	B6	positiv	CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹	WR
1	CAS	hz?	hz	positiv	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹⁵	WT
2	hz	hz	hz	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹⁵	WT
3	hz	hz	hz	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹⁵	WT
4	CAS	CAS	CAS	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
5	hz	B6 *(hz)	hz	positiv	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
6	hz	hz	hz	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
7	hz	hz	hz	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
8	B6	B6	B6	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WR
9	CAS	CAS	CAS	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
10	B6	B6	B6	positiv	CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹	WR
11	B6	B6	B6	positiv	CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹	WR
12	hz	B6 *(hz)	hz	positiv	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
13	CAS	hz* (CAS)	CAS	positiv	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
14	hz	hz	hz	negativ	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
15	CAS	B6 *(CAS)	CAS	positiv	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
16	CAS	B6 *(CAS)	CAS	positiv	CAST/B6-wr ⁴⁸⁻¹	WT
17	B6	B6	B6	positiv	CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹	WR

Tabelle: 4.1:

Zusammenfassung der Genotypisierungen der *CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹⁵* und *CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹* BAC-transgenen Nachzuchten und ihrer beobachteten Phänotypen.

B6 = homozygot *C57BL/6J-wr* (B6*, s. Text)

CAS = homozygot *CAST/Ei*

hz = heterozygot (hz*, s. Text)

* Der Marker *D11Mit294* liegt mitten in der Sequenz des BACs *48H20* und verhält sich deshalb bei allen *48H20*-transgenen Tieren nicht eindeutig, da auch von dem BAC ein PCR-Produkt gebildet wird, dessen Größe der des *C57BL/6J-wr*-Allels entspricht. In der Tabelle sind diese fraglichen Ergebnisse mit einem Sternchen gekennzeichnet, und in Klammern ist die vermutliche Situation am natürlichen Mikrosatelliten-Locus *D11Mit294* angegeben, abgeleitet aus den flankierenden Mikrosatelliten.

Fett hervorgehoben sind die Tiere „Weibchen 1“, 10, 11 und 17, welche für alle drei Mikrosatelliten einen homozygoten *C57BL/6J-wr*-Allelstatus zeigen und bei denen

4. Ergebnisse

gleichzeitig beide BAC-Enden gefunden werden konnten. Alle vier sind Nachkommen des Tieres 48-1 und zeigen einen normalen Wobbler-Phänotyp.

Die übrigen positiv getesteten BAC-transgenen Mäuse Nr. 1, 5, 12,13, 15 und 16 zeigen eindeutige Allelverteilungen für die flankierenden Marker *D11Mit19* und *D11Mit343* (Tier eins trägt eine Rekombination zwischen diesen Markern) und sind entweder heterozygote Träger des *wr*-Allels oder homozygot für *CAST/Ei*-Allele innerhalb des Kandidatengenbereichs.

4.1.4 Nachweis des BACs 45M7 in transgenen Mäusen

Das Prinzip ist unter 4.1.2 und am Beispiel des BACs *48H20* unter 4.1.3 bereits hinlänglich erklärt. Alle Geburten, die aus mit dem BAC *45M7* injizierten Eizellen hervorgegangen sind, wurden nach genau demselben Muster zunächst auf das Vorhandensein des BACs getestet. Nur im Falle der positiv getesteten Tiere folgte die Genotypisierung am *wr*-Locus.

Der BAC *45M7* wurde als Träger des *Peli1*-Gens identifiziert und hat eine genomische Insertgröße von ca. 75 kb (K. Resch, pers. Mitteilung). In der Abbildung 4.6 sind zunächst die BAC-End positiven und negativen Mäuse eines Wurfes bestehend aus acht Tieren gezeigt, die sich aus den transferierten Eizellen eines Experimentes entwickelt haben und geboren wurden.

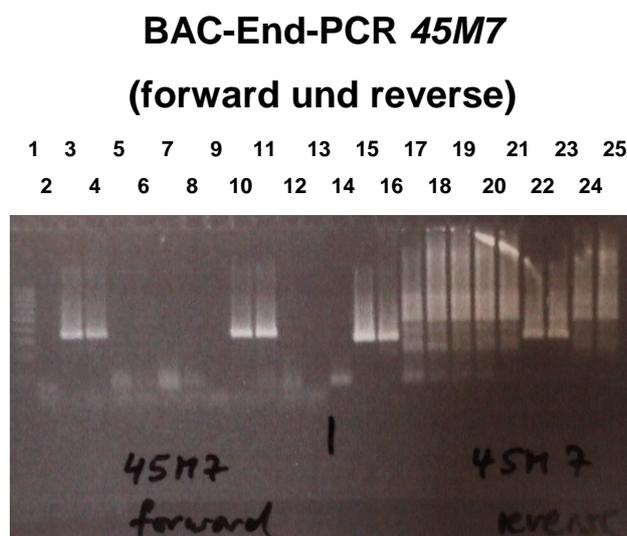


Abbildung 4.6

Abb.: 4.6

45M7-BAC-End PCR Produkte eines aus injizierten Eizellen hervorgegangenen Wurfes

In den Spuren 2-13 sind die PCR-Ergebnisse mit der forward-, die Spuren 14-25 zeigen die reverse Primer Kombination mit der template DNA:

4. Ergebnisse

Spur 1: DNA-Marker 100bp-ladder

Spur 2 und 14: Wasser als negativ Kontrolle

Spur 3 und 15: Injektionslösung des BACs *45M7* (1-2 ng/μl)

Spur 4 und 16: Aus einem früheren Versuchstag geborenes Tier (Nr.1), das nach drei Tagen dem Kannibalismus der Mutter zum Opfer fiel.

Spur 5 und 17: Aus einem früheren Versuchstag geborenes Tier (Nr.2)

Spur 6 - 13: geborene Mäuse 1-8

Spur 18 - 25: geborene Mäuse 1-8

Anhand der BAC-DNA als Positivkontrolle und der DNA des mitgeführten getöteten Tieres Nr.1 ist zu erkennen, daß die getesteten Tiere Nr. 5 und 6 dieses Wurfes Träger beider BAC-Enden sind. Die genomische DNA der übrigen Tiere ergibt kein spezifisches PCR-Produkt. Bei diesen negativen Tieren tritt hingegen ein unspezifisches Bandenmuster mit der reverse Primer Kombination auf, welches offensichtlich durch die Möglichkeit zur Bildung des richtigen PCR-Produkts, wenn der BAC vorhanden ist, unterdrückt wird. Die Tiere 5 und 6 dieses Wurfes waren beide gesunde Weibchen, die Analyse ihrer Allelverteilungen um den *wr*-Locus ergab eine heterozygote Verteilung für *CAST/Ei-* und *C57BL/6J-wr*-Allele. Das getötete Tier Nr.1 war direkt homozygot für das *wr*-Allel, konnte jedoch hinsichtlich seines Phänotyps nicht beurteilt werden. Aus den beiden weiblichen Foundern entstanden die Linien *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹* und *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*.

4.1.4.1 Genomische Allelverteilung ausgewählter *45M7*-BAC-transgener

Nachkommen am *wr*-Locus

Da die beiden Founder 45-1 und 45-2 beide heterozygot am *wr*-Locus waren (Originalbilder nicht gezeigt), wurden sie ebenfalls mit heterozygoten *CAST/B6-wr* F₂-Tieren weitergezüchtet, um transgene Träger des BACs mit homozygotem *wr*-Locus zu erhalten. Dies gelang zunächst für ein Tier der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*. Später wurden weitere Tiere dieses Genotyps erhalten, und auch von der zweiten Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹* konnten homozygote *wr/wr* Tiere mit zusätzlicher BAC-Kopie gezüchtet werden, wie die folgenden Abbildungen 4.7a-e zeigen und in Tabelle 4.2 noch einmal zusammengefaßt ist. Von beiden Linien konnten mehrere transgene Tiere gezüchtet werden, die den Wobbler-Phänotyp entwickelten. Zunächst sind in den Abbildungen 4.7a und b die Produkte der *45M7* BAC-End PCR Reaktionen gezeigt. Die Abbildungen 4.7c-e zeigen die zur Diagnostik am *wr*-Locus eingesetzten Mikrosatelliten (s.4.1.3.1).

4. Ergebnisse

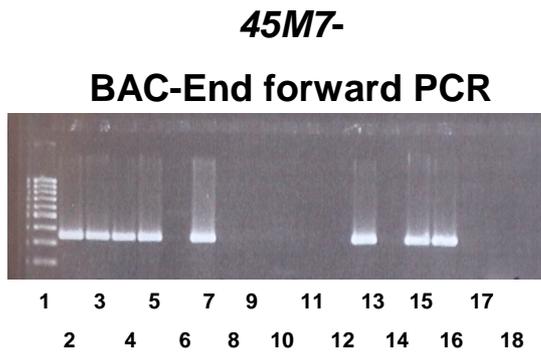


Abbildung 4.7a

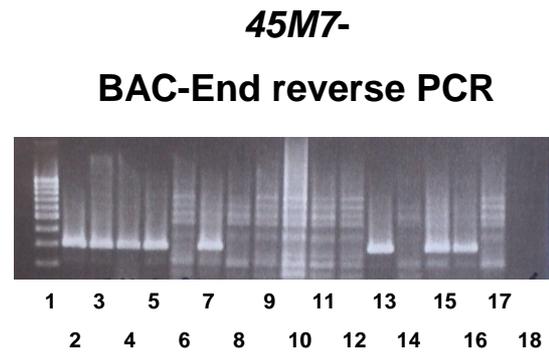


Abbildung 4.7b



Abbildung 4.7c

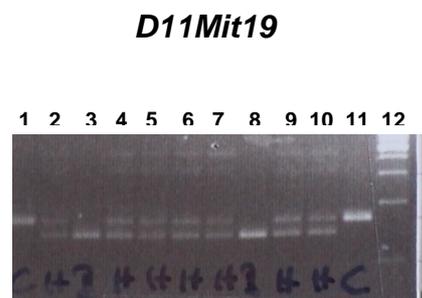


Abbildung 4.7d



Abbildung 4.7e

Abb.: 4.7a-e

Nachweis des BACs 45M7 und Mikrosatelliten-Diagnostik des *wr*-Kandidatengenbereichs bei ausgewählten Nachzuchten der Linien *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹* und *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*.

Die Tiere 14-18 stammen aus der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹*, 20-27 aus der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*. Aufgetragen sind die Produkte in der folgenden Reihenfolge:

4. Ergebnisse

Abb. 4.7a (*45M7*-forward) und b (*45M7*-reverse):

Spur 1: DNA-Marker 100bp-ladder

Spur 2-6: Nachzuchten der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹*

Spur 7-14: Nachzuchten der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*

Spur 15 und 16: *45M7*-BAC-transgene früherer Würfe (positiv Kontrollen)

Spur 17: genomische DNA eines negativen Tieres

Spur 18: Wasser als negativ Kontrolle

Abb. 4.7c-e: Allelverteilung der Mikrosatelliten bei den getesteten Tieren (die Ergebnisse für den Mikrosatelliten *D11Mit19* der Tiere 26 und 27 sind nicht gezeigt, sie sind aber getestet worden und ebenfalls heterozygot an diesem Locus).

Spur 1: DNA-Marker ϕ x *HaeIII*

Spur 2-6: Nachzuchten der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹*

Spur 7-14: Nachzuchten der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*

Tier-Nr. (s.Abb.: 4.7)	<i>D11Mit</i> 19	<i>D11Mit</i> 294	<i>D11Mit</i> 343	BAC 45M7	Founderlinie	Phänotyp
14	CAS	CAS	CAS	positiv	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹</i>	WT
15	hz	hz	hz	positiv	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹</i>	WT
16	B6	B6	B6	positiv	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹</i>	WR
17	hz	hz	hz	positiv	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹</i>	WT
18	hz	hz	hz	negativ	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹</i>	WT
20	hz	hz	hz	positiv	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WT
21	hz	hz	hz	negativ	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WT
22	B6	B6	B6	negativ	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WR
23	hz	hz	hz	negativ	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WT
24	hz	hz	hz	negativ	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WT
25	CAS	CAS	CAS	negativ	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WT
26	hz	hz	hz	positiv	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WT
27	hz	hz	hz	negativ	<i>CAST/B6-wr⁴⁵⁻²</i>	WT

Tabelle 4.2:

Zusammenfassung der in Abbildung 4.7a-e gezeigten Genotypisierungen der *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹* und *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²* BAC-transgenen Nachzuchten und ihrer beobachteten Phänotypen.

B6 = homozygot *C57BL/6J-wr*

CAS = homozygot *CAST/Ei*

hz = heterozygot

4. Ergebnisse

Das Tier mit der Nummer 16 aus der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹* ist für alle drei zur Diagnostik am *wr*-Locus verwendeten Mikrosatelliten homozygot für *C57BL/6J-wr*-Allele und zeigt trotz des im Genom inserierten BACs *45M7*, welcher die vollständige kodierende Sequenz des *Peli1*-Gens enthält, den Wobbler-Phänotyp. Bislang wurden drei transgene Wobbler der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹* und sechs transgene Wobbler der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²* nachgezüchtet, die alle den Wobbler-Phänotyp entwickelten.

4.1.4.2 Vergleich der *Pellino1*-Genexpression zwischen transgenen und nicht transgenen Tieren der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*.

Mit Hilfe von RT-PCR-Studien konnte bereits zuvor gezeigt werden, daß das *Peli1*-Gen ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird, wobei in dem Originalstamm *C57BL/6J-wr* kein Unterschied zwischen Wobbler- und Wildtyp-Tieren in der Expressionshöhe zu beobachten gewesen ist (Resch et al., 2001).

Weiterhin ist keine der beiden *45M7*-BAC-transgenen Linien in der Lage, den Wobbler-Phänotyp zu retten (s.4.1.4.1). Voraussetzung dafür wäre jedoch, daß das als Transgen inserierte *Peli1*-Gen in diesen Linien überhaupt verwendet werden kann. Mit Expressionsstudien anhand eines Northern-Blots sollte geprüft werden, ob das Transkriptniveau bei den transgenen Tieren höher ausfällt als bei den für dieses Gen diploiden Tieren ohne BAC Insertion. Ausgesucht wurden Tiere der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*, je ein Wobbler mit und ohne den BAC *45M7*, sowie ein Wildtyp-Geschwistertier ohne Transgen.

Neben den für die *wr*-Mutation relevanten Geweben Kleinhirn, Rückenmark und Testis wurde die Niere als Vergleichsgewebe für die RNA Präparation ausgewählt. Aus den Geweben der beiden Wobbler-Tiere wurden je 15µg aufgereinigte total RNA zur weiteren Aufreinigung der mRNA mit Hilfe des Dynal-Kits eingesetzt. Die Wildtyp mRNA wurde direkt aus 50 mg Gewebe mit Hilfe des mRNA Direkt™Kit (Dynal) ohne Zwischenaufreinigung der total RNA isoliert, und komplett auf das Gel aufgetragen.

Die Hybridisierung erfolgte mit einem aus genomischer DNA amplifizierten, spezifischem *Peli1*-PCR-Produkt als radioaktiv markierter Sonde. Die Abbildung 4.8 zeigt die entwickelten Röntgenfilme desselben Northernblots, der nach entfernen der *Peli1* spezifischen Sonde (Abb. 4.8, oben (65 und 24h Exposition)) ein weiteres mal gegen eine *HPRT* (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase) spezifische Sonde hybridisiert wurde.

4. Ergebnisse

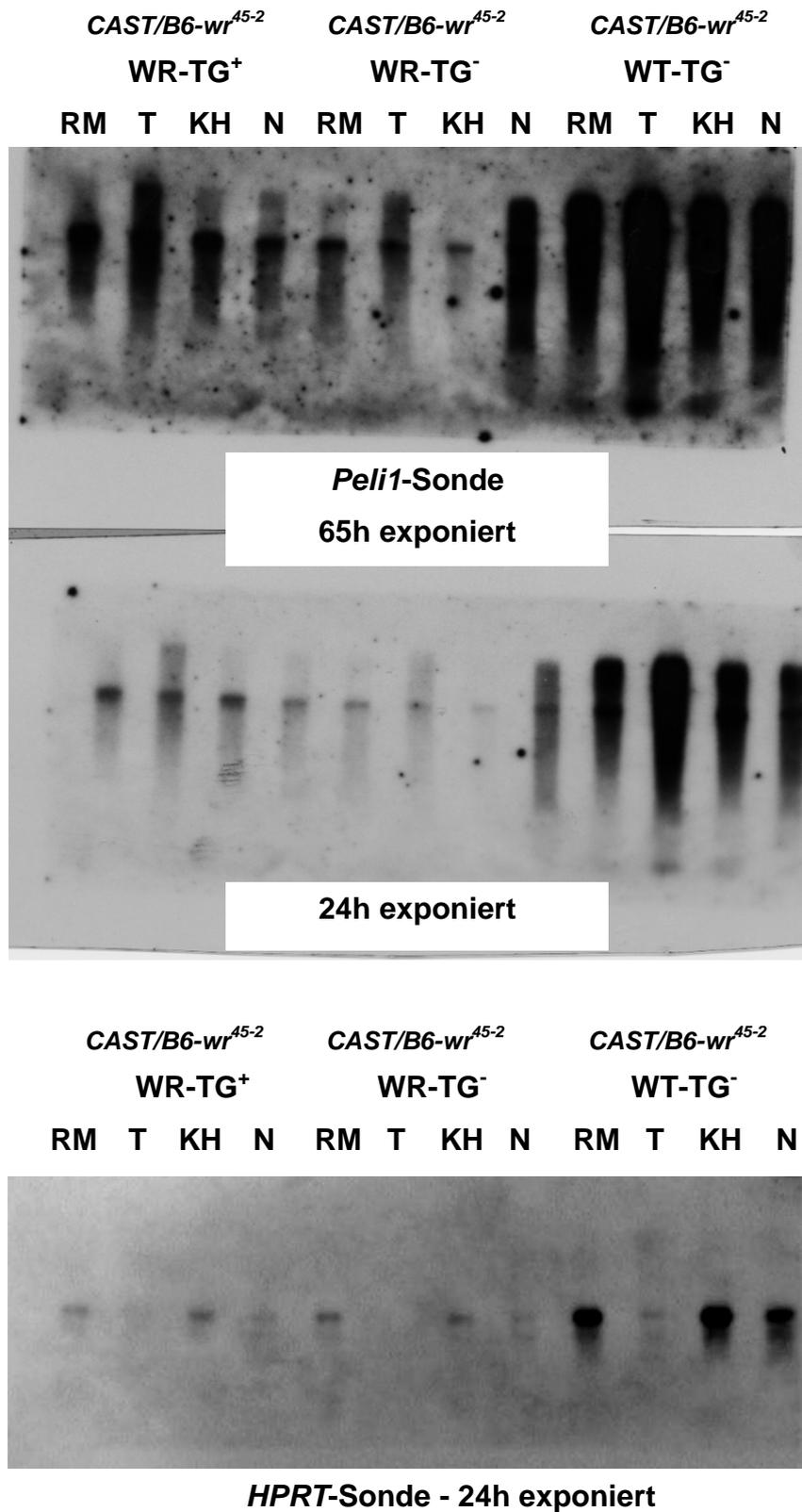


Abb. 4.8:

Vergleich der *Peli1*-Expression zwischen einem transgenen Wobbler, einem nicht transgenen Wobbler und einem Wildtypier der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²*.

4. Ergebnisse

Aufgetragen sind jeweils vier Gewebe in der Reihenfolge:

Rückenmark (RM), Testis (T), Kleinhirn (KH) und Niere (N)

Spur 1-4: *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²* (WR-TG⁺, BAC-positiv)

Spur 2-5: *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²* (WR-TG⁻, BAC-negativ)

Spur 6-9: *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²* (WT-TG⁻, BAC-negativ)

Oberes Bild: Hybridisierung gegen eine *Peli1*-spezifische Sonde (300 cpm, 65 und 24h Exposition des Röntgenfilms)

Unteres Bild: Hybridisierung mit einer *HPRT*-spezifischen Sonde (50 cpm, 24h Exposition des Röntgenfilms) zum Abgleich der aufgetragenen Gesamt-mRNA Konzentration.

Das Expressionsniveau des *Peli1*-Gens ist bei dem transgenen BAC-Träger der Linie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²* eindeutig höher als bei dem Wobbler-Tier ohne Transgeninsertion (Rückenmark und Kleinhirn). Die Hybridisierung mit der *HPRT* spezifischen Sonde zeigt, daß die aufgetragene Gesamt-mRNA-Menge bei den beiden Wobblertieren identisch ist. Die aufgetragene Wildtyp-mRNA-Menge ist durch die methodisch unterschiedliche Präparation deutlich höher und läßt sich daher schlecht mit den beiden Wobblern vergleichen. Ein unerwartetes Ergebnis dieses Northern-Blots ist die sehr niedrige Expression des *HPRT*-Gens im Testis, wodurch die scheinbar höhere Expression von *Peli1* in diesem Gewebe nicht eindeutig belegbar ist, da hierdurch der Vergleich mit der aufgetragenen Gesamt-mRNA-Menge entfällt.

4.2 Innerhalb des Serviceprojekt Z3 des SFB 549 erzeugte transgene Mäuse

Der Aufbau des Serviceprojekts Z3, in dem transgene Mäuse verschiedener Fragestellungen generiert werden sollten, soll hier nur kurz angesprochen werden, da diese Tiere nicht unmittelbarer Bestandteil dieser Arbeit waren. Die weitere Auswertung dieser Tiere unterlag den jeweiligen Wissenschaftlern dieser Projekte und soll deshalb hier nicht näher besprochen werden.

Prinzipiell ist die Injektion der DNA in die Pronuklei und der resultierende Einbau in das Genom der Tiere in keiner Weise von dem verwendeten Mausstamm abhängig. Auch die Art des Transgenkonstrukts sollte theoretisch aus jeder DNA hergestellt und in das Mausgenom eingebracht werden können. Dennoch wird immer wieder beobachtet, daß einzelne Konstrukte nicht in das Genom integrieren. Insgesamt wurden mit 4 verschiedenen Mausstämmen transgene Mäuse erzeugt. Die Projekte und der jeweils verwendete genetische Hintergrundstamm ist in der Tabelle 4.3 gezeigt.

4. Ergebnisse

Wissenschaftler	Projekte	Mausstamm	positive Tiere
Prof. Dr. J. Frey Biochemie II	MT1-MMP	<i>FVB, CD1</i>	<i>FVB</i> und <i>CD1</i>
Prof. Dr. J. Frey Biochemie II	MT3-MMP	<i>C57BL/6J</i>	<i>C57BL/6J</i>
Dipl. Biol. S. Leuchtenberger	verschiedene bakterielle RNAsen	<i>CD1</i>	alle Konstrukte <i>CD1</i>
Dipl. Biol. J. Beikert	S MDF-gfp/cre Fusionsprotein	<i>CD1,</i> <i>C57BL/6J</i>	keine transgenen Tiere erhalten

Tabelle 4.3: Innerhalb des SFB durchgeführte Injektionen

Mit dem Vektor, welcher ein Fusionsprotein aus Green Fluorescent Protein und CRE-Rekombinase unter Kontrolle eines 5' flankierenden Bereichs vor dem Exon 7 (CRD-Isoformen) des *Nrg1*-Gens exprimieren sollte, konnte trotz zahlreicher Versuche keine transgene Maus erhalten werden.

4.3 Gezieltes Einbringen von Vektoren in embryonale Stammzellen (ES-Zelltargeting)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war der Aufbau der ES-Zellkultur für das Serviceprojekt Z3, wodurch gezielte Knock-out Experimente ermöglicht werden sollten. Gearbeitet wurde mit Targetingvektoren, welche unter 3.2.3 bereits kurz beschrieben worden sind.

4.3.1 Auszüchtung des *Clc²⁻* Allels auf den *CD1* Hintergrundstamm

Das Auszüchten des *Clc²⁻* Allels auf den *CD1* Hintergrundstamm diente in erster Linie dazu, neomycinresistente embryonale Fibroblastenzellen als Feederzellen für die ES-Zellkultur herzustellen (s.3.2.2.1). Während der Selektion gegen Neomycin (Geneticin) konnten die ES-Zellen dadurch weiterhin auf Feederzellen kultiviert werden. Ursprünglich war geplant, das Knock-out-Allel homozygot in den *CD1*-Stamm einzukreuzen, was jedoch an der Sterilität der homozygoten (-/-) Männchen scheiterte. Deshalb mußten die gezüchteten Tiere immer wieder mit Hilfe der PCR diagnostiziert werden. Der resultierende Mausstamm *CD129^{Clc²⁻}* wurde später für alle embryologischen Methoden verwendet, da homozygote K.o.-Männchen die Vasektomie männlicher Mäuse überflüssig werden ließ (s. 3.2.2.1) und alle Weibchen

4. Ergebnisse

als Empfänger für Embryonen eingesetzt werden konnten. In der Abbildung 4.8 ist die PCR-Diagnostik eines Wurfes gezeigt, die Primer wurden von Prof. Dr. Jentsch zur Verfügung gestellt (s. Tabelle 3.4). Der in Abbildung 4.9 dargestellte Verpaarungstyp stellt sicher, daß alle Embryonen einer solchen Verpaarung wenigstens ein Neomycinresistenz vermittelndes K.o.-Allel besaßen, wodurch alle Fibroblasten gegen Genitacin resistent waren.

Clc²-Diagnostik PCR

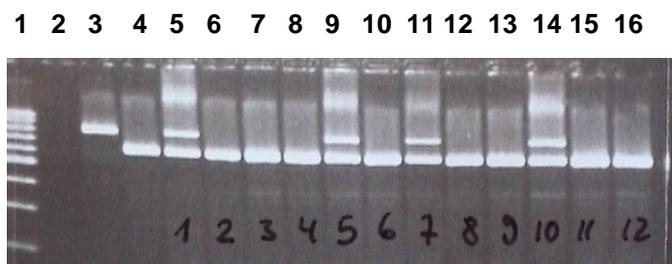


Abbildung 4.8

Abb. 4.9: *Clc²* PCR-Diagnostik einer *CD129^{Clc²}*- Nachzucht eines homozygoten Weibchen (-/-) und einem heterozygoten (+/-) Männchen

Spur 1: DNA-Marker 100bp-ladder

Spur 2: Wasser als negativ Kontrolle

Spur 3: genomische DNA eines Kontrolltieres (+/+)

Spur 4: genomische DNA eines Kontrolltieres (-/-)

Spur 5-16: 12 getestete Nachkommen

Bei dieser Triplet PCR liegt ein Primer in der ersetzten Wildtypsequenz und einer in der Neomycinkassette des Knock-out-Allels, welche in dieselbe Richtung weisen und mit einem entgegengesetzt gelegenen Primer in der Wildtypsequenz ein PCR-Produkt unterschiedlicher Größe ergeben. Homozygotie beider Allele sowie heterozygote Tiere sind leicht voneinander zu unterscheiden.

4.3.2 Einbringen der Vektoren in die ES-Zellen durch Elektroporation

Im Material und Methodenteil ist der gesamte Ablauf eines Targetingexperiments detailliert beschrieben. Die vier Vektoren (s. 3.2.3) wurden in die verschiedenen ES-Zelllinien eingebracht. Im Falle des *Adam8*- und des SMDF-spezifischen Knock-out des *Nrg1*-Gens wurde auch die ortsspezifische Integration des Vektors mit Hilfe eines Southern-Blots (hergestellt aus genomischer DNA der positiv selektionierten

4. Ergebnisse

Klone) überprüft. Ansonsten wurde nur die präparierte DNA-Platte (s.3.2.4.1.2) an die jeweiligen Hersteller der Vektoren gegeben, welche die positiven Klone durch einen genomischen Southernblot selbst herausfanden.

4.3.2.1 Prinzip des Nachweises der ortsspezifischen (homologen)

Rekombination am Beispiel des SMDF-K.o.-Versuchs

Der K.o.-Vektor für die SMDF-Isoform des *Nrg1*-Gens wurde von Jana Beikert so konzipiert, daß In diesem speziellen Fall die Neomycinresistenz-Kassette einen Teil des 7. Exon des *Nrg1*-Gens ersetzt, welches für die Cysteinreiche Domäne (CRD) der TypIII Neuregulin-Isoformen kodiert. Das Prinzip des Nachweises der ortsspezifischen Integration durch Hybridisierung von Southern-Blots wird in der Abbildung 4.10 kurz schematisch vorgestellt. Wichtig ist, daß die verwendete DNA-Sonde außerhalb der Sequenzen der flankierenden, homologen Sequenzarme des Targetingvektors liegt.

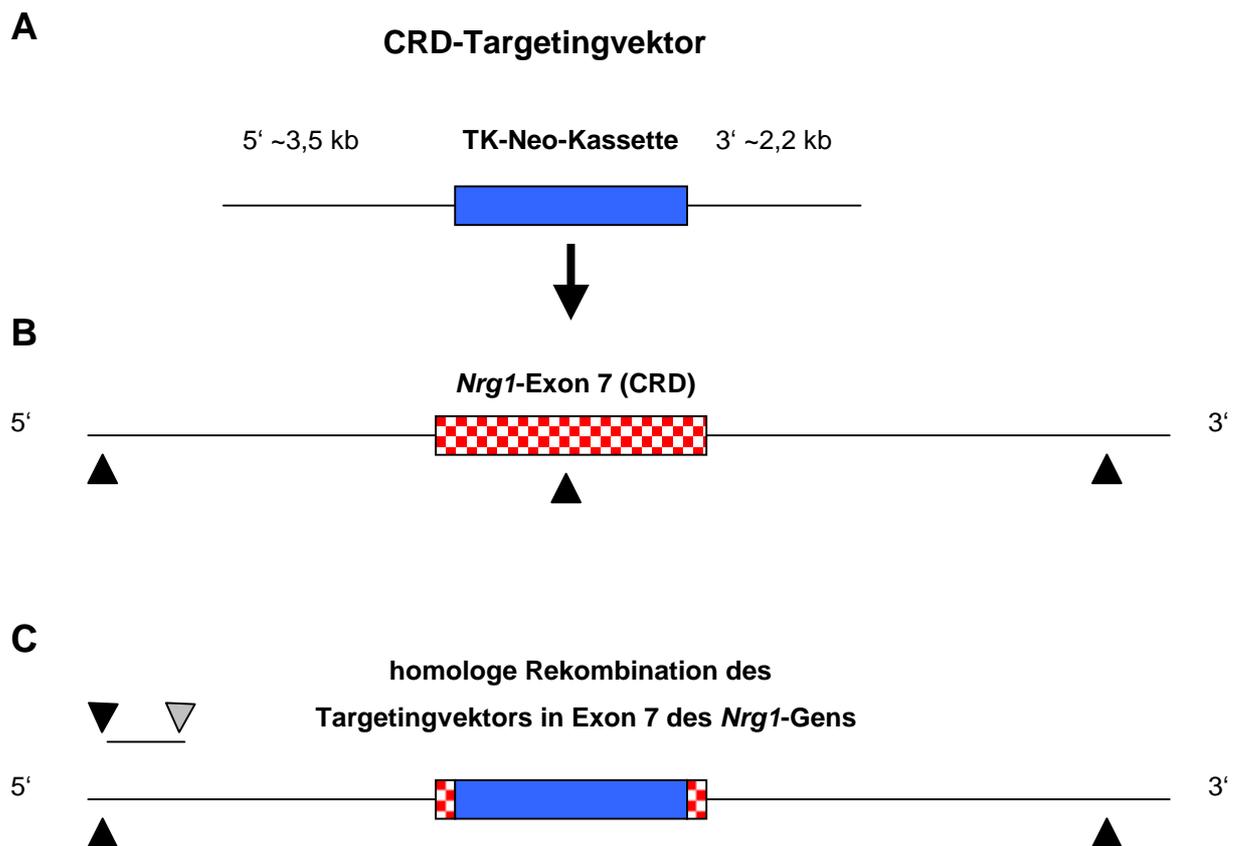


Abbildung 4.10:

Schematische Darstellung des Exon 7 des *Nrg1*-Gens vor (B) und nach (C) der homologen Rekombination des spezifischen Targetingvektors (A).

Dargestellt ist ein Ausschnitt des *Nrg1*-Gens und die relative Position der DNA-Sonde im flankierenden 5'-Bereich vor dem Exon 7. Die schwarzen Dreiecke stellen Schnittstellen für die

4. Ergebnisse

Restriktionsendonuklease *NdeI* dar, das graue Dreieck symbolisiert die *SpeI*-Schnittstelle, welche zur Herstellung der Sonde verwendet wurde. Durch die homologe Insertion des Targetingvektors wird ein großer Teil des 7. Exons deletiert, wodurch die darin enthaltene, natürliche *NdeI*-Schnittstelle entfällt.

4.3.2.2 Identifizierung der SMDF-ES-Zellklone mit homologer Rekombination

Die genomisch vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme in dieser Region waren von Falko Heinemann (Diplomarbeit, 1998) und Jana Beikert zuvor untersucht worden. Aus dem genomischen BAC-Klon, der bereits zur Herstellung des Vektors verwendet wurde, konnte durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *SpeI* ein 2,2 kb Fragment aus der 5'-Region (4-6 kb vor dem CRD-kodierenden Exon 7 des *Nrg1*-Gens) herausgeschnitten werden, das als DNA-Sonde für die Hybridisierung isoliert und aufgereinigt wurde. Der 5'-homologe Arm des Targetingvektors endet ca. 3,5 kb vor dem Exon 7 und kann daher nicht von der DNA-Sonde erkannt werden. Vier Southern-Blots wurden aus der *NdeI*-geschnittenen ES-Zell-DNA (s. Abb. 4.10) der mit Neomycin positiv selektierten Klone angefertigt. In der Abbildung 4.11a und b sind die entwickelten Röntgenfilme der Southern Blots II und III gezeigt.

Southern-Blots: (ES-Zell-DNA der SMDF-Klone)

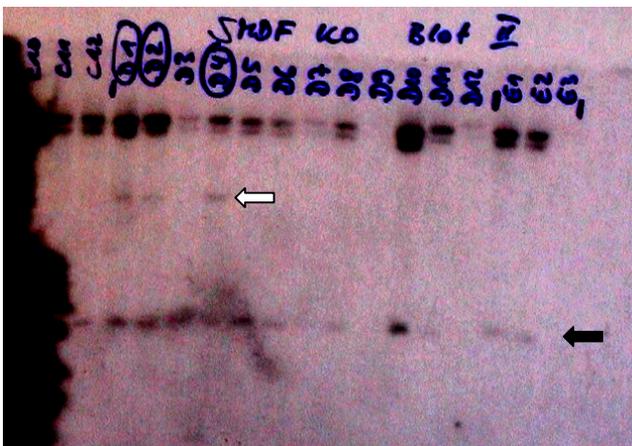


Abbildung 4.11a

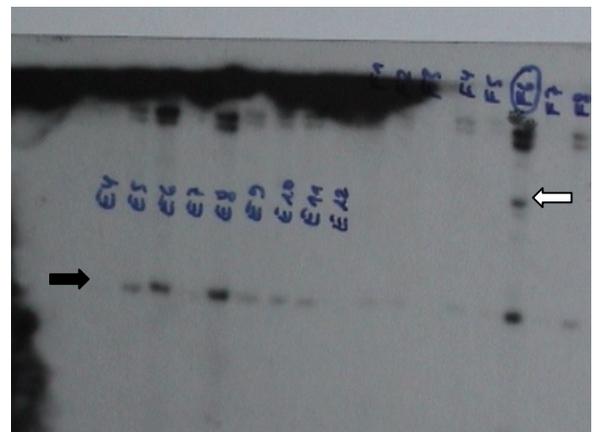


Abbildung 4.11b

Abbildung 4.11: Röntgenfilme der Southern-Blots II und III der SMDF-Klone

Die *NdeI* geschnittene ES-Zell-DNA (F_1 129J1 x C57BL/6J) wurde zunächst elektrophoretisch in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, Southern geblottet und gegen das radioaktiv markierte *NdeI*, *SpeI* Fragment hybridisiert.

Die Klone, welche nur das kleine Fragment (untere Bande, schwarze Pfeile) zeigen, das durch die weiterhin vorhandene *NdeI*-Schnittstelle im Exon 7 des *Nrg1*-Gens entsteht, haben den SMDF-

4. Ergebnisse

Targetingvektor nicht homolog in ihr Genom integriert. Die positiven Klone besitzen ein Wildtyp und ein Knock-out-Allel, zeigen also ein zusätzliches, größeres Signal, das durch die entfallene *NdeI*-Schnittstelle entsteht (weiße Pfeile).

Zum Zeitpunkt der Herstellung der Southern-Blots war über den 3'-Bereich hinter dem 7. Exon keine Sequenzinformation erhältlich. Einzig bekannt war, daß in der Sequenz des 3'-homologen Vektorarms keine weitere *NdeI*-Schnittstelle vorhanden gewesen ist. Dadurch mußte das genomische, *NdeI* geschnittene Fragment, welches von der Sonde bei positiv inseriertem Vektor erkannt werden würde, mindestens 2,5 kb größer sein als das natürlich entstehende *NdeI*-Fragment. Mittlerweile ist durch die im Mausgenomprojekt ermittelte Sequenz bekannt, daß die folgende Schnittstelle des Enzyms etwa 3,5 kb hinter dem Exon 7 liegt.

Von den insgesamt 96 vereinzelt Klone (nicht alle sind auf der „DNA-Platte“ gewachsen) konnten vier positiv getargetete *SMDF*-Klone (D1, D2, D4 und F6) identifiziert werden. Die vielen Neomycin positiv selektierten, aber nicht homolog rekombinierten Klone zeigen, daß es unerlässlich ist, mit einer flankierenden Sonde außerhalb des Targetingvektors zu arbeiten, um homolog rekombinierte Klone zu identifizieren. Alle vier Klone wurden aus der Masterplatte (s. 3.2.3.4) wieder aufgetaut und expandiert. Der Klon F6 wurde mehrfach in *C57BL/6J*-Blastozysten injiziert, wobei jedoch keine chimäre Maus generiert werden konnte. Die Klone wurden alle in flüssigem Stickstoff (-196° C) eingelagert und können jederzeit für weitere Versuche aufgetaut und kultiviert werden.

4.3.3 Weitere verwendete Targetingvektoren

In die zur Verfügung gestellten ES-Zelllinien wurden weitere Targetingvektoren elektroporiert. Für das *Adam8* K.o.-Experiment, welches mit E14.1-ES-Zellen durchgeführt wurde, sind positive Klone nach dem oben dargestellten Muster gefunden worden, welche für die Morula-Aggregation eingesetzt wurden.

Das *Peli1*-K.o.-Konstrukt (S. Fuchs, Dissertation 2002) wurde in R1-ES-Zellen eingebracht.

Als Partnerembryonen wurden immer 8-Zell und frühe Morulastadien des Mausstammes *CD1* verwendet. Während es mit den E14.1 Zellen zunächst nicht gelang chimäre Mäuse zu erhalten, wurden mit einem *Peli1*-Klon in einem Wurf zwei chimäre Tiere geboren, welche in Abbildung 4.12 gezeigt sind.

4. Ergebnisse



Abbildung 4.12

Abb. 4.12: CD1 \leftrightarrow R1-ES-Zell-Chimären

Die verwendeten R1-ES-Zellen sind am *agouti*-Locus homozygot für das Wildtyp-Allel und entwickeln daher eine braune Wildtypfellfarbe. Anhand der dunklen Flecken sind Tiere mit ES-Zell-Beteiligung optisch leicht zu erkennen.

Beide Tiere wurden anschließend mit *CD1*-Wildtypmäusen verpaart. Bislang konnte jedoch von keiner der Chimären ein Nachkomme gezüchtet werden, welcher aus ES-Zell-Gameten hervorgegangen ist.

5. Diskussion und Ausblick

5.1 Auswertung der BAC-transgenen Mäuse

5.1.1 Auswahl der zur Injektion verwendeten BACs

Prinzipiell erscheint jeder der in dem *wr*-Positionsklonierungsprojekt gefundenen BACs, der Sequenzen des Kandidatengenbereichs enthält, geeignet eine transgene Rettung herbeizuführen.

Zu Beginn dieser Arbeit schien der *wr*-Kandidatengenbereich durch fünf überlappende BAC-Klone komplett abgedeckt zu sein (Korthaus, Dissertation 1999). In diesem Bereich gelegene Gene wie *Mor2* und *Otx1* waren und sind weiterhin Kandidaten aufgrund ihrer Position. *Mor2* konnte durch Enzymaktivitätsvergleiche, die zwischen Mutanten und Wildtyp-Kontrolltieren keine Unterschiede erbrachten, als Kandidat für die *wr*-Mutation bereits ausgeschlossen werden (Korthaus et al., 1996). Für das Gen *Otx1* existiert ein Knock-out Modell (Acampora et al., 1996), welches phänotypisch nicht mit der *wr*-Mutation in Einklang gebracht werden konnte. Der Versuch, einen Allelietest durch Kreuzung zwischen einer *Otx1* +/- und einer *wr*-Trägermaus durchzuführen, scheiterte dadurch, daß der Arbeitsgruppe kein solcher Träger der künstlich erzeugten *Otx1*-Nullmutation zur Verfügung gestellt wurde. Sequenzvergleiche zeigten jedoch für dieses Gen keine Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp (S. Fuchs, Diplomarbeit 2000), wodurch auch dieser Kandidat zumindest als unwahrscheinlich eingestuft wurde. Da aber die *wr*-Mutation nicht zwangsläufig eine funktionelle Nullmutation eines Gens sein muß, bleibt *Otx1* bis heute weiterhin ein Kandidatengen, das für den Wobbler Phänotyp verantwortlich sein könnte. Mit BACs, welche das *Otx1*-Gen tragen (BACs *123J24*, *141E23*) wurden ebenfalls Versuche durchgeführt, transgene Mäuse zu generieren, was zunächst jedoch erfolglos blieb und später nicht weiter verfolgt wurde, da das *Pellino1*-Gen in den Vordergrund gerückt war (s.u.).

Der erste BAC, mit welchem eine transgene Maus generiert werden konnte, war der BAC *48H20*, auf dem bis dahin zwar kein Gen (in Form eines EST's) kartiert werden konnte, welcher jedoch den cosegregierenden Mikrosatelliten *D11Mit294* und somit einen Teil des zentralen Kandidatengenbereichs trägt und einzig aufgrund seiner Position ausgewählt wurde. Mittlerweile ist die komplette Sequenz dieses BACs

bekannt. Er enthält keine exprimierten Sequenzen und erwies sich somit experimentell wie theoretisch zum Zwecke einer transgenen Rettung als ungeeignet. Als zweiter BAC wurde der Klon *45M7* erfolgreich injiziert, welcher das *Pellino1*-Gen der Maus trägt, das als Kandidat in den Focus gerückt war, nachdem das Protein in den Hoden von Wobbler Mäusen scheinbar abwesend zu sein schien (Resch et al., 2001). Die Gründer der transgenen Linien *CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹* und *CAST/B6-wr⁴⁸⁻¹⁵* sowie *CAST/B6-wr⁴⁵⁻¹* und *CAST/B6-wr⁴⁵⁻²* wurden mit heterozygoten (*wr/+*) F2-*CAST/B6-wr* Tieren verpaart, und in allen vier Fällen konnten mehrere Tiere gezüchtet werden, welche als homozygote Träger der *wr*-Mutation und heterozygote Träger der BACs *48H20* bzw. *45M7* identifiziert werden konnten. Alle Tiere, die diese Genotypen besaßen, waren phänotypisch mit normalen, nicht transgenen Wobbler Mäusen identisch.

Mittlerweile sind alle Sequenzen der *wr*-Genregion des Maus Chromosoms 11 in den öffentlichen Datenbanken abrufbar (http://www.ensembl.org/Mus_musculus). Alle Sequenzen der BAC-Enden und sämtliche Gene sind darin wiederzufinden, wodurch die Grundlage für eine Auswahl weiterer BACs für zukünftige Rettungsexperimente deutlich verbessert worden ist.

5.1.2 Nachweis der transgenen *Pellino1*-Expression

Die Rettung des Wobbler-Phänotyps durch die zusätzlichen transgenen Sequenzbereiche, das eigentliche Ziel der Versuche, hätte ganz sichere Aussagen über Ort, und im folgenden Art, der Mutation ermöglicht. Ein negatives Ergebnis läßt leider weiterhin Spielraum für Spekulationen, denn eine stille Insertion der BACs ist ebenso wie eine unvollständige Insertion zunächst nicht gänzlich auszuschließen. Auch besteht natürlich das prinzipielle Risiko, gerade im Falle der *Pellino1* BAC-transgenen Tiere, daß ein BAC trotz seiner relativ großen, genomischen Sequenzabschnitte nicht alle notwendigen, bislang jedoch noch unbekanntem CNS-Elemente (Conserved Noncoding Sequences, Cis-Elemente) für eine adäquate Expression des Transgens enthält (Giraldo und Montoliu, 2001, Heintz, 2001).

Im Falle der BACs, welche ein Gen tragen, ergeben sich weitere Möglichkeiten, um zu testen, ob ein Transgen vom Organismus auch verwendet wird.

In einem günstigen Fall gibt es einen stammspezifischen Polymorphismus innerhalb der exprimierten/kodierenden Sequenzabschnitte des betreffenden Gens, so daß ein qualitativer Unterschied innerhalb der gebildeten mRNA zu finden ist (z.B. im 5'- oder

3'- untranslatierten Bereich). Dabei könnte es sich einerseits um einen Basenpaaraustausch an der dritten Position eines kodierenden Triplets handeln, wodurch es, durch den genetischen Code bedingt, zum Einbau derselben Aminosäure in das entstehende Protein kommen würde (stiller, stammspezifischer Polymorphismus). Auch Unterschiede an anderer Position eines Triplets, die zum Einbau einer anderen Aminosäure führen würde, wäre denkbar, da es nicht zwangsläufig zu einer Modulation der biologischen Funktion des Proteins kommen müßte, wäre dies an einer weniger bedeutenden Stelle der Aminosäurekette des Proteins geschehen.

Keiner dieser Fälle ist jedoch für das *Peli1*-Gen zwischen den relevanten Mausstämmen *C57BL/6J-wr* und *129/SvJ* (aus diesem Stamm ist die verwendete BAC-Bibliothek generiert worden) zu beobachten, die kodierenden Sequenzen weisen keinen Unterschied auf (S. Fuchs, pers. Mitteilung). Es ist deshalb qualitativ nicht möglich, bei den transgenen Tieren festzustellen, ob die *Peli1* mRNA nur von den genomischen *C57BL/6J-wr* oder zusätzlich auch von der eingebrachten Transgensequenz des *129/SvJ*-BACs gebildet wird. Auch die Verwendung humaner BACs könnte eine transgene Rettung herbeiführen, wobei die Transgen-Expression eines humanen Gens wesentlich leichter nachzuweisen sein dürfte (Merscher et al.). Aufgrund des hohen Polymorphiegrades (zwischen den Mausstämmen *C57BL/6J-wr* und *CAST/Ei*) könnten vielleicht auch qualitative Unterschiede in der mRNA-Sequenz zwischen den Mausstämmen *129sv/J* und *CAST/Ei* gefunden werden, so daß die genau entgegengesetzte Strategie erfolgreich sein könnte, homozygote *CAST/Ei-Peli1*-Tiere mit integriertem BAC *45M7* zu untersuchen.

Eine zweite Möglichkeit besteht in dem Nachweis eines quantitativen Expressions-Unterschiedes zwischen einer BAC-transgenen Wobbler/Wildtyp Maus und einem normalen Wobbler/Wildtyp Kontrolltier, mittels quantitativer RT-PCR oder eines Northern-Blots, der gegen eine *Peli1*-Sonde hybridisiert wird.

Mit aufgereinigter mRNA wurde ein solcher Northern-Blot mit der Linie *CAST/B6-wr*⁴⁵⁻² durchgeführt. Die Expressionsniveaus des *Peli1*-Gens unterscheiden sich zwischen Wobbler- und transgenen Wobbler-Mäusen eindeutig (s. Abb. 4.10a und b). Die erhöhte Expression des transgenen Tieres ist in den Geweben Kleinhirn und Rückenmark durch den Northern-Blot eindeutig belegt und kann auf die Verwendung der zusätzlichen Kopie(n) des *Peli1*-Gens zurückgeführt werden.

Dieses Ergebnis ist ein experimenteller Beweis für die unterschiedliche Identität von *Peli1* und dem von der *Wobbler*-Mutation betroffenen Gen.

Ein Unterschied in der Expressionshöhe auf Proteinebene wäre ebenfalls denkbar, konnte jedoch mit den *Peli1*-BAC-transgenen Mäusen nicht nachgewiesen werden (Wiegand, pers. Mitteilung). Der für diesen Versuch verwendete Antikörper wurde jedoch gegen das *Drosophila* Pellino-Protein hergestellt, von welchem es bei der Maus wenigstens zwei Isogene (*Peli1*/Chr.11 und *Peli2*/Chr.14, Resch et al., 2001) gibt und nicht sicher geklärt werden konnte, welche dieser Isoformen von dem Antikörper erkannt wird.

5.1.3 Überprüfung der Hypothese einer unvollständigen Integration der BACs:

Aufgrund der Größe der hinzugefügten DNA ist es schwierig, die Unversehrtheit dieser transgenen Sequenzen zu überprüfen. So ist beispielsweise die Möglichkeit einen Southern-Blot aus der genomischen DNA der transgenen Tiere herzustellen nicht sehr aussagekräftig, da bereits die Suche nach einem geeigneten Restriktionsenzym bei Fragmenten dieser Größenordnung aussichtslos erscheint. *NotI*, das zur Linearisierung der BAC-DNA benutzt wurde, käme als selten schneidendes Enzym in Frage, doch auch in einer sehr guten Auftrennung mittels Pulse-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) wäre bestenfalls eine Abschätzung darüber möglich, ob die gesamten 75kb beispielsweise des BACs-45M7 integriert worden sind.

Für alle vier transgenen Mäuse ist ein starkes Argument für die unversehrte Integration der BACs die Vererbung derselben auf ihre Nachkommen. In keinem Fall wurden nur einzelne Enden der injizierten DNA bei diesen gefunden, entweder konnten beide oder keines der BAC-Enden via PCR nachgewiesen werden. Wäre der BAC bei der Injektion gebrochen, hätte man vermutlich nur eines der Enden in den Foundern nachweisen können. Selbst aber wenn beide Enden durch Scheren während der Injektion integriert worden wären, würde man wohl eine Aufspaltung in den folgenden Generationen erwarten. Dies wurde jedoch in keiner der nachgezüchteten Generationen beobachtet.

Im Falle des BACs 48H20 konnte bei beiden transgenen Foundern ein weiteres Phänomen beobachtet werden, welches dafür spricht, daß die BACs dieser Linien vollständig integriert worden sind. Dieser BAC trägt den Mikrosatelliten *D11Mit294* innerhalb seiner Sequenzen, welcher zwar zwischen den Mausstämmen *C57BL/6J*-

wr und *CAST/Ei*, nicht aber zwischen den Mausstämmen *C57BL/6J-wr* und *129/SvJ* polymorph ist. Das PCR-Produkt letzterer Mausstämmen kann daher nicht unterschieden werden.

Bereits die heterozygoten Foundertiere beider Linien zeigten bei der Auftrennung der PCR-Produkte dieses Mikrosatelliten ein deutlich verstärktes „*C57BL/6J-wr*-Signal“, welches eindeutig auf das Vorhandensein der zusätzlichen *129/SvJ*-Kopie zurückgeführt werden kann. Selbst wenn der BAC in nur einer Kopie integriert worden wäre, wäre das Verhältnis *C57BL/6J-wr* und *129/SvJ* gegenüber *CAST/Ei* für diesen Mikrosatelliten 2:1, wodurch das PCR-Produkt mit erhöhter Wahrscheinlichkeit von einer dieser Kopien gebildet wird. Alle gezüchteten Träger dieses Transgens beider Linien zeigten dieses Phänomen, was sehr dafür spricht, daß die Methoden der Präparation und Injektion der BAC-DNA keine offensichtlichen Schädigungen derselben zur Folge hatten. Weiterhin wurden in einer Veröffentlichung (Chrast et al., 1999) verschiedene BAC-DNA-Aufbereitungen zum Zwecke der Pronukleusinjektion miteinander verglichen. Eine nahezu identische BAC-Präparationsmethode, wie sie in dieser Arbeit entwickelt wurde, erzielte dabei die besten Ergebnisse. Das erhöhte Expressionsniveau des *Peli1*-Gens bei der Linie *CAST/B6-wr*⁴⁵⁻² unterstützt diese Annahme zusätzlich.

Aus den Versuchen kann insgesamt eindeutig geschlossen werden, daß die Mutation weder im Bereich der Sequenzen des BACs *48H20* noch im *Peli1*-Gen zu suchen ist.

5.1.4 Ort der genomischen Integration der BACs

Keiner der heterozygoten Träger der Transgene zeigte körperliche Dysformationen oder Verhaltensauffälligkeiten, weswegen getestet werden sollte, ob das homozygote Vorkommen des Transgens zum Auftreten irgendeines abnormen Phänotyps führen würde. Nachdem gezeigt werden konnte, daß keine der beiden *48H20*-transgenen Linien den Wobbler-Phänotyp kompensieren konnte, wurden je zwei Träger einer Linie miteinander verpaart, welche gleichwohl keine Träger des *wr*-Allels waren (alle getesteten Marker im Kandidatengenbereich waren homozygot für *CAST/Ei*- Allele). Die so gezüchteten Nachkommen zeigten ebenfalls keinerlei abnormale Anzeichen, auch war die Zahl der Nachkommen pro Wurf unauffällig, ein offenkundiger homozygoter Effekt konnte daher nicht beobachtet werden.

Natürlich muß man sagen, daß einzig offensichtliche Veränderungen hätten bemerkt werden können, da eine aufwendige Suche nach möglichen Schädigungen, ein

sogenanntes Phänotypen-Screening, in unserem Labor nicht routinemäßig durchgeführt wurde. Auf tiefgreifendere Untersuchungen des Integrationsortes wurde in dieser Arbeit verzichtet.

5.1.5 Ausblick über zukünftige Anwendungen von BAC-transgenen Mäusen

Ein Problem bei der Fortsetzung der Versuche, die zu einer transgenen Rettung des Wobbler-Phänotyps bei natürlicherweise homozygoten (*wr/wr*) Mutanten führen können, sind fehlende BAC-Klone, die die gesamte genomische Sequenz für einige der übriggebliebenen Kandidaten für die *wr*-Mutation enthalten.

Ein Beispiel wäre das Gen *Kia0903*, dessen Genstruktur sich über einen genomischen Bereich von über 300 kb erstreckt. Bislang sind vier überlappende BAC-Klone isoliert worden (S. Fuchs, pers. Mitteilung), die diesen Bereich komplett überspannen. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, daß die CO-Injektion mehrerer überlappender genomischer Klone zu einer gemeinsamen Integration mit korrekter Aneinanderreihung geführt hat, wodurch diese Problematik gelöst werden könnte (Tacken et al., 2001). Ein K.o.-Vektor für dieses Gen ist ebenfalls kürzlich fertiggestellt worden (A. Fritzenkötter, Diplomarbeit, Uni-Bielefeld 2002).

Eine weitere Anwendung für BAC-transgene Mäuse konnte durch die gezielte, homologe Rekombination in BAC-Insert-Sequenzen erreicht werden. Verschiedene Modifizierungsmethoden wurden bereits erfolgreich angewendet (ET-Rekombination, Zhang et al., 1998, Recombineering, Copeland et al., 2001). Eine zu inserierende Kassetten wird mittels PCR zusammen mit einem Selektionsmarker und kurzen homologen Bereichen, die den Integrationsloкус flankieren, amplifiziert und in die BAC-tragenden *E. coli* Bakterien elektroporiert. Durch gleichzeitige Expression von Rekombinationsproteinen werden die Sequenzen des BAC-Inserts ortsspezifisch modifiziert (Muyrers et al., 1999).

Das Rekombinationsplasmid pKD46 (Datsenko und Wanner, 2000), von dem die Red Rekombinationsproteine des Lambda Phagen exprimiert werden, sowie das pGETrec Plasmid wurden verwendet, um die Cre (causes recombination)/GFP Kassetten (Gagneten et al., 1997) in das CRD-kodierende Exon 7 des *Nrg1*-Gens in einem BAC-Klon einzuführen (C. Drepper, Diplomarbeit, Uni-Bielefeld 2002). Mit diesem BAC werden derzeit transgene Mäuse hergestellt, welche das Fusionsprotein mit Cre-Rekombinase-Aktivität unter der Kontrolle des *SMDF* spezifischen Promotors im

peripheren Nervensystem exprimieren sollen. Die Chancen, das spezifische Expressionsmuster von Genen für derartige Anwendungen zu erhalten, wird durch die großen flankierenden genomischen Sequenzbereiche der BAC-Klone erheblich verbessert (Heintz, 2001, John et al., 2001).

Je nach Lokalisation und Orientierung der von der Cre-Rekombinase erkannten *LoxP*-Elemente, welche über homologe Rekombination in ES-Zellen in genetisch veränderte Mäuse eingebracht wurden, kommt es durch Kreuzungen dieser transgenen und genetisch veränderten Mäuse zu verschiedenen, genomischen DNA-Rearrangements. Hierbei sind Deletionen, Inversionen und Translokation möglich (Nagy, 2000, Zheng et al., 2001, Mills et al., 2001, Yu und Bradley, 2001). Eine Übersicht über Mäuse mit *LoxP*-flankierten Genen für konditionelle Knock-out-Versuche, bzw. gewebespezifisch exprimierende Cre-Mäuse gibt u.a. die Internet-Homepage von Andras Nagy (Barlow et al., 1997, Nagy Lab, <http://www.mshri.on.ca/nagy>).

5.2 Erzeugung von chimären Mäusen mit der Aggregationsmethode:

Mit der Aggregationsmethode wurden zunächst Morulae verschiedener Mausstämmen (*CD1* \leftrightarrow *C57BL/6J-gfp*) miteinander fusioniert (Zusammenarbeit mit D. Eberhard). Diese Versuche dienten in dieser Arbeit im wesentlichen der technischen Übung für die Aggregation von Morulae des Mausstammes *CD1* mit positiv getesteten ES-Zellklonen der Linien R1 und E14.1 (Wood et al., 1993).

In den R1 ES-Zellen wurde die homologe Rekombination mit dem von S. Fuchs klonierten *Peli1* Knock-out Vektor erzeugt. Aufgrund des Fehlens einer vernünftigen Sonde konnte bislang nicht eindeutig gezeigt werden, daß der Vektor tatsächlich an der korrekten Stelle inseriert wurde, da die verwendete Sonde innerhalb der Sequenzen des Targetingvektors gelegen war (Fuchs, Dissertation 2002). Betrachtet man die Quote von vereinzelt ES-Zellklonen mit den daraus positiv getesteten Klonen (s. 4.3.2.2), welche bei dem *SMDF*-K.o.-Versuch gerade einmal bei ca. vier Prozent liegt, ist die ortsspezifische Integration des *Peli1*-Vektors eher als unwahrscheinlich zu betrachten. Dennoch wurde mit einem der Zellklone begonnen zu arbeiten. Zwei chimäre Mäuse konnten durch Aggregation von R1-ES-Zellen mit *CD1*-Morulae hergestellt werden, ein Männchen und ein Weibchen. Der Fellchimärismus war bei beiden Tieren gering, und die ersten Würfe zeigten keine Transmission der Keimbahn.

Dennoch ist die Fellchimärität von keinem sonderlichen Interesse, dient dieser doch zunächst einmal nur dazu, die Tiere als chimär auszuweisen. Eine Aussage über die erfolgreiche Beteiligung der ES-Zellen an der Keimbahn ist nur anhand der mit ihnen gezüchteten Nachkommen zu beurteilen und wurde auch mit einem Fellchimärismus von weniger als 1 % bereits beobachtet. Chimäre Tiere sollten daher solange wie irgend möglich verpaart bleiben, da auch schon von Fällen berichtet wurde, wo nur ein Germline-Tier aus 300 gezeugten Nachkommen hervorgegangen ist.

Auch die ungewöhnliche Vererbung des Targetingereignisses durch weibliche chimäre Mäuse ist bereits beobachtet worden, obwohl ES-Zellen aus männlichen Zelllinien gewonnen werden.

Die E14.1 ES-Zelllinie wurde für einen zur Verfügung gestellten Knock-out Vektor für das Gen *Adam8* verwendet. Eindeutig positiv getargetete Klone konnten identifiziert und expandiert werden. Die ersten Versuche einer Morula-Aggregation verliefen jedoch negativ, es konnten keine chimären Mäuse hergestellt werden. Mittlerweile konnte eine bereits existierende *Adam8* Knock-out Maus erhalten werden (Bartsch, pers. Mitteilung), weswegen die positiven Klone zunächst eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

6. Literatur

- Acampora, D., Mazan, S., Avantaggiato, V., Barone, P., Tuorto, F., Lallemand, Y., Brulet, P. und Simeone, A. (1996) Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nature Genet.* **14** (2): 218-22
- Anand, R., und Southern, E.M. (1990). Pulsed field gelelectrophoresis. In "Gelelectrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach" (P. Rickwood und B.D. Hames, Eds.), pp. 101-122, IRL Press, Oxford.
- Andersen, P.M., Nilsson, P., Ala-Hurula, V., Keranen, M.-L., Tarvainen, I., Haltia, T., Nilsson, L., Binzer, M., Forsgren, L. und Marklund, S.L. (1995) Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an asp90-to-ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. *Nature Genet.* **10**: 61-66.
- Andrews, J.M. (1975) The fine structure of the cervical spinal cord, ventral root and brachial nerves in the wobbler (wr) mouse. *J.Neuropath. Exp. Neurol.* **34**: 12-27.
- Andrews, J.M., Gardner, M.B., Wolfgram, F.J., Ellison, G.W., Porter, D.D. und Brandkamp, W.W. (1974) Studies on a murine form of spontaneous lower motoneuron degeneration-the wobbler (wr) mouse. *Am. J. Pathol.* **76**: 63-78.
- Angrand, P.O., Daigle, N., van der Hoeven, F., Schöler, H.R. und Stewart, A.F. (1999) Simplified generation of targeting constructs using ET recombination. *Nucleic Acids Research* **27** (17): e16
- Auerbach, W., Dunmore, J.H., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Auerbach, A.B., Huszar, D. und Joyner, A.L. (2000) Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* **29**: 1024-8, 1030, 1032.
- Augustin, M., Heimann, P., Rathke, S. und Jockusch H. (1997) Spinal muscular atrophy gene wobbler of the mouse: Evidence from chimeric spinal cord and testis for cell-autonomous function. *Dev. Dyn.* **209**: 286-295.
- Babinet C, Cohen-Tannoudji M. (2001) Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An Acad Bras Cienc* **73**: 365-83.
- Ball, S.T., Moseley, H.J., und Peters, J. (1994). Mor2, supernatant malate dehydrogenase, is linked to wa2 and Hba on mouse chromosome 11 in a region of homology with human chromosome 2p. *Genomics* **24**: 399-400
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., Sadeh, M., Mahjneh, I., Marconi, G., Passos-Bueno, M.R., Moreira, E.d.S., Zatz, M., Beckmann, J.S. und Bushby, K. (1998) A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nature Genet.* **20** (1): 37-42
- Bashir, R., Strachan, T., Keers, S., Stephenson, A., Mahjneh, I., Marconi, G., Nashef, L., und Bushby, K.M.D. (1994). A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum. Mol. Gen.* **3**: 455-457
- Bates, G.P., Valdes, J., Hummerich, H., Baxendale, S., Le Paslier, D.L., Monaco, A.P., Tagle, D., MacDonald, M.E., Altherr, M., Ross, M., Brownstein, B.H., Bentley, D., Wasmuth, J.J., Gusella, J.F., Cohen, D., Collins, F., und Lehrach, H. (1992)

6. Literatur

- Characterization of a yeast artificial chromosome contig spanning the Huntington's disease gene candidate region. *Nature Genet.* **1**: 180-187
- Baulac, M., Rieger, F. und Meininger, V. (1983) The loss of motoneurons corresponding to specific muscles in the wobbler mouse mutant. *Neurosci. Lett.* **37**: 99-104
- Bellanné-Chaquentelot, C., Lacroix, B., Ougen, P., Billault, A., Beaufils, S., Bertrand, S., Georges, I., Gilbert, F., Gros, I., Lucotte, G., Susini, L., Codani, J.-J., Gesnoux, P., Pook, S., Vaysseix, Lu-Kuo, J., Ried, T., Ward, D., Chumakov, I., Le Paslier, D., Barillot, E. und Cohen, D. (1992) Mapping the whole human genome by fingerprinting yeast artificial chromosomes. *Cell* **70**: 1059-1068
- Bhandari, B., Roesler, W.J., DeLisio, K.D., Klemm, D.J., Ross, N.S., und Miller, R.E. (1990). A functional promoter flanks an intronless glutamine synthetase gene. *J. Biol. Chem.* **266**: 7784-7792
- Bloom, M.L., Lee, B.K., Birkemeier, C.S., Ma, Y., Zimmer, W.E., Goodman, S.R., Eicher, E.M., und Barker, J.E. (1992). Brain β spectrin isoform 235 (Spnb-2) maps to mouse chromosome 11. *Mamm. Genome* **3**: 293-295
- Boguski, M.S., und Schuler, G.D. (1995). ESTablishing a human transcript map. *Nature Genet.* **10**: 369-370
- Bosl, M.R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S.E., Mukhopadhyay, A.K., Davidoff, M.S., Holstein, A.F. und Jentsch, T.J. (2001) Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl(-) channel disruption. *EMBO J.* **20**: 1289-99
- Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C. und Riethmacher, D. (1998) The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev.* **12**: 1825-1836
- Brown, S.D. (1992) The Mouse Genome Project and Human Genetics. *Genomics* **13**: 490-92
- Brown, S.D. (1994) Integration maps of the mouse genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**: 389-394
- Buckler, A.J., Chang, D.D., Graw, S.L., Brook, J.D., Haber, D.A., Sharp und Housman, D.E. (1991) Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 4005-9
- Burke, D.T., Carle, G.F. und Olson, M.V. (1987) Cloning large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosomes. *Science* **236**: 806-812
- Capecchi MR (1989) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics* **5** (3): 70-76
- Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288-92
- Carraway, K.L. III, Weber, J.L., Unger, M.J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M. und Lai, C. (1997) Neurogulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* **387**: 512-516
- Carvajal, J.J., Cox, D., Summerbell, D. und Rigby, P.W. (2001) A BAC transgenic analysis of the Mrf4/Myf5 locus reveals interdigitated elements that control activation and maintenance of gene expression during muscle development. *Development.* **128**: 1857-68
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162** (1): 156-9

6. Literatur

- Chrast R., Scott H.S. und Antonarakis, S.E. (1999) Linearization and purification of BAC DNA for the development of transgenic mice. *Transgenic Res.* **8** (2): 147-50
- Chumakov, I. M., Rigault, P., Le Gall, I., Bellanne-Chantelot, C., Billault, A., Guillou, S., Soularue, P., Guasconi, G., Poullier, E., Gros, I. et al. (1995). "A YAC contig map of the human genome." *Nature* **377**(6547 Suppl): 175-297
- Church, G.M. und Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 1991-95
- Collins, F.S. (1992) Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nature Genet.* **1**: 3-6
- Collins, F.S. (1995) Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nature Genet.* **9**: 347-350
- Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Eppig, J.T., Maltais, L.J., Miller, J.C., Dietrich, W.F., Weaver, A., Lincoln, S.E., Steen, R.G., Stein, L.D., Nadeau, J.H. und Lander, E.S. (1993) A genetic linkage map of the mouse: Current applications and future prospects. *Science* **262** (5130): 57-66
- Copeland, N.G., Jenkins, N.A. und Court, D.L. (2001) Recombineering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature Reviews Genetics* **2**: 769-79
- Copp, A.J. (1995) Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends in Genetics* **11** (3):87-93
- Cox, G.A., Mahaffey, C.L. und Frankel, W.N. (1998). "Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele." *Neuron* **21** (6): 1327-37
- Cox, D. R., Burmeister, M., Price, E.R., Kim, S. und Myers, R.M. (1990). "Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes." *Science* **250**(4978): 245-50
- Cox, D.R., Meier-Ewert, S., Ross, M., Larin, Z., Monaco, A.P. und Lehrach, H. (1993) Genome mapping and cloning of mutations using yeast artificial chromosomes. *Methods Enzymol.* **225**: 637-53
- Creutz, C.E., Liou, A., Snyder, S.L., Brownawell A. und Willison, K. (1994) Identification of the major chromaffin granule-binding protein, Chromobindin A, as the cytosolic chaperonin CCT (chaperonin containing TCP-1). *J. Biol. Chem.* **269**: 32035-32038
- Datsenko, K.A. und Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* **97** (12): 6640-45
- DeGregorio, L., Manenti, G., Simeone, A. und Dragani, T.A. (1996). "Genetic mapping of the homeobox-containing gene *Otx1* on mouse chromosome 11." *Mamm Genome* **7**(3): 241
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. und Weissenbach, J. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**: 152-154
- Dietrich, W.F., Katz, H., Lincoln, S.E., Shin, S.H., Friedman, J., Dracoploi, N.C. und Lander, E.S. (1992) A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* **131**: 423- 47
- Dietrich, W.F., Miller, J.C., Steen, R.G., Merchant, M.A., Damron, D., Nahf, R., Gross, A., Joyce, D.C., Wessel, M., Dredge, R.D. et al. (1994). "A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms." *Nat Genet* **7**(2 Spec No): 220-45

6. Literatur

- Dietrich, W.F., Miller, J.C., Steen, R., Merchant, M.A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M.J., Ingalls, K.A., O'Connor, T.J., Evans, C.A., DeAngelis, M.M., Levinson, D.M., Kruglyak, L., Goodman, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Hawkins, T.L., Stein, L., Page, D.C. und Lander, E.S. (1996) A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**: 149-152
- Drepper, C. (2002) Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Duchen, L.W., und Strich, S.J. (1968). An hereditary motor neuron disease with progressive denervation of muscle in mouse: The mutant "wobbler". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **31**: 535-542
- Edwards, J.H. (1987) Exclusion mapping. *J. Med. Genet.* **24**: 539-43
- Erickson, S.L., O'Shea, K.S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L.H. und Moore, M.W. (1997) ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* **124**: 4999-5011
- Falconer, D.S. (1956) Wobbler (wr), *Mouse News Letters* **15**: 22
- Falls, D.L., Rosen, K.M., Corfas, G., Lane, W.S. und Fischbach, G.D. (1993) ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis is a member of the neu ligand family. *Cell* **72**: 801-815
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13
- Festing, M.F.W. (1994) Inbred strains of mice. *Mouse Genome* **92**: 373-495
- Fischbach, G.D. und Rosen, K.M. (1997) ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Ann Rev Neurosci* **20**: 429-458
- Frankel, W.N. (1995) Taking stock of complex trait genetics in mice. *Trends Genet.* **11**: 471-77
- Fuchs S. (2002) Mutationsanalyse von Kandidatengenen für die neurologische Mutation wobbler der Maus. Dissertation, Uni-Bielefeld
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Kloin, R. und Lemke, G. (1995) Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* **378**: 390-4
- Giraldo, P. und Montoliu, L. (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Research* **10**: 83-100
- Goodart, S.A., Huynh, C., Chen, W., Cooper, A.D. und Levy-Wilson, B. (1999) Expression of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **266**:454-9
- Gordon, J.W., Uehlinger, J., Dayani, N., Talansky, B.E., Gordon, M., Rudomen, G.S. und Neumann, P.E. (1990) Analysis of the hotfoot (ho) locus by creation of an insertional mutation in a transgenic mouse. *Dev. Biol.* **137**: 349-358
- Green, E.D., und Olson, M.V. (1990). Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 1213-17
- Green, E.D., Mohr, R.M., Idol, J.R., Jones, M., Buckingham, J.M., Deaven, L.L. Moyzis, R.K. und Olson, M.V. (1991) Systematic generation of sequence-tagged sites (STSs) for physical mapping of human chromosomes: application to the mapping of human chromosome 7 using yeast artificial chromosomes. *Genomics* **11**: 548-564

6. Literatur

- Guénet, J.-L. (1986) The contribution of wild derived mouse inbred strains to gene mapping methodology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **127**: 109-13
- Hamilton, B. A., Smith, D. J., Mueller K. L., Kerrebrock, A. W., Bronson, R. T., van Berkel, V., Daly, M. J., Kruglyak, L., Reeve, M. P., Nemhauser, J. L., Hawkins, T. L., Rubin, E. M. und Lander, E. S. (1997) The vibrator Mutation causes neurodegeneration via reduced expression of PITP α : Positional complementation cloning and extragenic suppression. *Neuron* **18**: 711-722
- Hantaz-Ambroise, D., Blondet, B., Murwsky, M. und Rieger, F. (1993) Abnormal astrocyte differentiation and defective cellular interactions in wobbler mouse spinal cord. *J. Neurocytol.* **23**: 179-92
- Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J.H., Andrews, G.C. und Yarden, Y. (1999) Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **18**: 2681-89
- Hardison, R.C. (2000) Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. *Trends Genet.* **16** (9): 369-72
- Hardison, R.C., Oeltjen, J. und Miller, W. (1997) Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome. *Genome Research* **7**: 959-66
- Harrison, S.M. und Roffler-Tarlov, S. (1994) Male-sterile phenotype of the neurological mouse mutant weaver. *Dev. Dyn.* **200**: 26-38
- Heimann, P. und Herkströter, E. (1993) Mid piece and axonomal defects in spermatozoa of the neurological mouse mutant `wobbler`. *Eur. J. Biol. Supplement* **60**: 127
- Heimann, P., Laage, S., und Jockusch, H. (1991). Defect of sperm assembly in a neurological mutant of the mouse, wobbler (WR). *Differentiation* **47**: 77-83
- Heintz, N. (2000) Analysis of mammalian central nervous system gene expression and function using bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis. *Hum Mol Genet.* **9**: 937-43. Review
- Heintz, N. (2001) BAC to the future: The use of BAC transgenic mice for neuroscience research. *Nature Reviews Neuroscience* **2**: 861-70
- Herman, G.E., Nadeau, J.H. und Hardies, S.C. (1992) Dispersed repetitive elements in mouse genome analysis. *Mammal.Genome* **2**: 207-214
- Hirotsune, S., Takahara, T., Sasaki, N., Hirose, K., Yoshiki, A., Ohashi, T., Kusakabe, M., Murakami, Y., Muramatsu, S., Nakao, K., Katsuki, M. und Hayashizaki, Y. (1995) The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons *Nature Genet.* **10**: 77-83
- Ho, W.-H., Armanini, M.P., Nuijens, A., Phillips, H.S. und Osheroff, P.E. (1995) Sensory and motor neuron-derived factor. *J Biol. Chem.* **270**: 14523-32
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F. und Lacy, E. (1994) Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G.D., Shepard, H.M., Kuang, W.J., Wood, W.I., Goeddel, D.V. und Vandlen, R.L. (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p¹⁸⁵ErbB2. *Science* **256**: 1205-10
- Hrabe de Angelis, M.H., Flaswinkel, H., Fuchs, H., Rathkolb, B., Soewarto, D., Marschall, S., Heffner, S., Pargent, W., Wuensch, K., Jung, M., Reis, A., Richter, T., Alessandrini, F.,

6. Literatur

- Jakob, T., Fuchs, E., Kolb, H., Kremmer, E., Schaeble, K., Rollinski, B., Roscher, A., Peters, C., Meitinger, T., Strom, T., Steckler, T., Holsboer, F., Klopstock, T., Gekeler, F., Schindewolf, C., Jung, T., Avraham, K., Behrendt, H., Ring, J., Zimmer, A., Schughart, K., Pfeffer, K., Wolf, E. und Balling, R. (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by NEU mutagenesis. *Nature Genet.* **25**(4): 444-7
- Huang, Y., Liu, D.P., Wu, L., Li, T.C., Wu, M., Feng, D.X. und Liang, C.C. (2000) Proper Developmental Control of Human Globin Genes Reproduced by Transgenic Mice Containing a 160-kb BAC Carrying the Human beta-Globin Locus. *Blood Cells Mol Dis.* **26**: 598-610
- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyraas, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiecki, L., Kasprzyk, A., Lehvaslaiho, H., Lijnzaad, P., Melsopp, C., Mongin, E., Pettett, R., Pocock, M., Potter, S., Rust, A., Schmidt, E., Searle, S., Slater, G., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Stupka, E., Ureta-Vidal, A., Vastrik, I. und Clamp, M. (2002) The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res.* **30** (1): 38-41
- Jockusch, H. (1992) Neuromuskuläre Erbkrankheiten: Tiermodelle und Molekulargenetik. *BIUZ* **22**, 203-211
- John RM, Aparicio SA, Ainscough JF, Arney KL, Khosla S, Hawker K, Hilton KJ, Barton SC, Surani MA. (2001) Imprinted expression of neuronatin from modified BAC transgenes reveals regulation by distinct and distant enhancers. *Dev Biol.* **236**: 387-99
- Junier, M.-P., Culpier, M., Le Forestier, N., Cadusseau, J., Susuki, F., Peschanski, M. und Dreyfus, P.A. (1994) Transforming growth factor α (TGF α) expression in degenerating motoneurons of the murine mutant wobbler: a neuronal signal for astrogliosis? *J. Neurosci.* **14**: 4206-16
- Kaupmann, K. (1992) Genetische Kopplungsanalyse an Interspezies-Hybriden der Maus. Chromosomale Kartierung des Gens für die spinale Muskelatrophie "Wobbler". Dissertation, Universität Bielefeld.
- Kaupmann, K., Sendtner, M., Stöckli, K.A., und Jockusch, H. (1991). The gene for ciliary neurotrophic factor (CNTF) maps to murine chromosome 19, and its expression is not affected in the hereditary motoneuron disease "wobbler" of the mouse. *Eur. J. Neurosci.* **3**: 1182-86
- Kaupmann, K., Simon-Chazottes, D., Guénet, J.-L., und Jockusch, H. (1992). Wobbler, a mutation affecting motoneuron survival and gonadal functions in the mouse, maps to proximal chromosome 11. *Genomics* **13**: 39-43
- Kondoh, G., Yamamoto, Y., Yoshida, K., Suzuki, Y., Osuka, S., Nakano, Y., Morita, T. und Takeda, J. (1999) Easy assessment of ES cell clone potency for chimeric development and germ-line competency by an optimized aggregation method. *J Biochem Biophys Methods* **39**: 137-42
- Korthaus, D., Wedemeyer, N., Wiegand, Ch., und Jockusch, H. (1995). The gene for cytoplasmic malate dehydrogenase, Mor2, is closely linked to the wobbler spinal muscular atrophy gene (wr). *Mamm. Genome.* **7** (3): 250
- Korthaus, D. (1996) Feinkartierung des Gens Mor2 für die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase auf Chromosom 11 der Maus in der Nähe des Wobbler-Gens, und seines Homologons MDH1 auf dem humanen Chromosom 2p. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

6. Literatur

- Korthaus, D., Wedemeyer, N., Lengeling, A., Ronsiek, M., Jockusch, H. und Schmitt-John, T. (1997) Integrated radiation hybrid map of human chromosome 2p13: Possible involvement of Dynactin in neuromuscular diseases. *Genomics* **43**: 242-44
- Kramer, R., Buzay, N., Kane, D.J., Martin, L.E., Tarpley, J.E., Theill, L.B. (1996) Neuregulins with an Ig-like domain are essential for mouse myocardial and neuronal development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 4833-38
- Krulewski, T.F., Neumann, P.E. und Gordon, J.W. (1989) Insertional mutation in a transgenic mouse allelic with Purkinje cell degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 3709-12
- Kubota, H., Hynes, G., Carne, A., Ashworth, A., Willison, K. (1994) Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin. *Curr. Biol.* **4** (2): 89-99
- Kusumi, K., Smith, J.S., Segre, J.A., Koos, D.S. und Lander, E.S. (1993) Construction of a large-insert yeast artificial chromosome library of the mouse genome. *Mamm Genome* **4**: 391-92
- Laage S. (1989) Spinale Atrophie und Spermiendefekt als Folge der Mutation Wobbler (wr) bei der Maus. Histochemische und biochemische Analysen an gewebespezifischen Proteinen. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Laage, S., Zobel, G. und Jockusch, H. (1988) Astrocyte overgrowth in the brain stem and spinal cord of mice affected by spinal atrophy, wobbler. *Dev. Neurosci.* **10**: 190-98
- Lacy, E., Roberts, S., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. und Constantini, F.D. (1983) A foreign beta-globin gene in transgenic mice: Integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues. *Science* **34** (2): 343-58
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P. J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A.,

6. Literatur

- Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan M.J. and Szustakowki, J. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409** (6822): 860-921
- Larin, Z., Monaco, A.P., und Lehrach, H. (1991) Yeast artificial chromosome libraries containing large inserts from mouse and human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 4123-27
- Larin, Z., Monaco, A.P., Meier-Ewert, S. und Lehrach, H. (1993) Construction and characterization of yeast artificial chromosome libraries from the mouse genome. *Methods Enzym.* **225**: 623-37
- Lee, K.F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.-C., Hauser, C. (1995) Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* **378**: 394-98
- Leestma, J.E. und Sepsenwol, S. (1980). Sperm axoneme alterations in the wobbler mouse. *J. Reprod. Fertil.* **58**: 267-70
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frezal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A. und Melki, J. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**: 155-65
- Lemke, G. (1996) Neuregulins in development. *Molecular and Cellular Neuroscience* **7**: 247-62
- Lengeling, A., Zimmer, W.E., Goodman, S.R., Ma, Y., Bloom, M.L., Bruneau, G., Krieger, M., Thibault, J., Kaupmann, K., und Jockusch, H. (1994b). Exclusion of two candidate genes, Spnb-2 and Ddc, for the wobbler spinal muscular atrophy gene on proximal mouse chromosome 11. *Mamm. Genome* **5**: 163-6
- Liu, X., Hwang, H., Cao, L., Buckland, M., Cunningham, A., Chen, J., Chien, K.R., Graham, R.M. und Zhou, M. (1998) Domain-specific gene disruption reveals critical regulation of neuregulin signaling by its cytoplasmic tail. *PNAS* **22**: 13024-29
- Loeb, J.A. und Fischbach, G.D. (1985) ARIA can be released from the extracellular matrix through cleavage of a heparin-binding domain. *J. Cell. Biol.* **130**: 127-35
- Lovett, M., Kere, J. und Hinton, L.M. (1991) Direct selection: A method for the isolation of cDNA's encoded by large genomic regions. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 9628-32
- Marchionni, M.A., Goedarl, A.D., Chen, M.S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danehy, F., Mitsumi, D., Sudhalter, J., Kotayashi, K. et al. (1993) Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**: 312-18
- Merscher, S., Funke, B., Epstein, J.A., Heyer, J., Puech, A., Lu, M.M., Xavier, R.J., Demay, M.B., Russell, R.G., Factor, S., Tokooya, K., Jore, B.S., Lopez, M., Pandita, R.K., Lia, M., Carrion, D., Xu, H., Schorle, H., Kobler, J.B., Scambler, P., Wynshaw-Boris, A., Skoultschi, A.I., Morrow, B.E. und Kucherlapati, R. (2001) TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* **104**:619-29

6. Literatur

- Meyer, D. und Birchmeier, C. (1994) Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development. *PNAS* **91**: 1064-68
- Meyer, D. und Birchmeier, C. (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378**: 386-90
- Meyer, D., Yamaai, T., Gerratt, A., Riethmacher-Sonnenberg, E., Kane, D., Theill, L.B., Birchmeier, C. (1997) Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* **124**: 3575-86
- Monaco, A. P. and Z. Larin (1994). "YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools." *Trends Biotechnol* **12** (7): 280-6
- Mountford P, Nichols J, Zevnik B, O'Brien C, Smith A. (1998) Maintenance of pluripotential embryonic stem cells by stem cell selection. *Reprod Fertil Dev* **10**: 527-33
- Mullins, L.J., Payne, C.M., Kotelevtseva, N., Brooker, G., Fleming, S., Harris, S. und Mullins, J.J. (2000) Granulation rescue and developmental marking of juxtglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *J Biol Chem.* **275**: 40378-84
- Nabetani, A., Hatada, I., Morisaki, H. und Mukai, T. (1996). Chromosomal assignment and imprinting tests for the mouse delta subunit of the cytosolic chaperonin containing TCP-1 (Cct4) gene to proximal chromosome 11. *Genomics* **34**: 246-49
- Nadeau, J.H. (1989) Maps of linkage and synteny between mouse and man. *Trends Genet.* **5**: 82-86
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P.Y., Frengen, E., Mammoser, A.G., Catanese, J.J., Hayashizaki, Y. und de Jong, P.J. (2000). "Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis." *Genome Res* **10** (1): 116-28
- Patil, N., Cox, D.R., Bhat, D., Faham, M., Myers, R.M. und Peterson, A.S. (1995) A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nature Genet.* **11**: 126-29
- Pollin, M.M., McHanwell, S., und Slater, C.R. (1990) Loss of motor neurons from the median nerve motor nucleus of the mutant mouse 'wobbler'. *J. Neurocytol.* **19**: 29-38
- Pook, M.A., Al-Mahdawi, S., Carroll, C.J., Cossee, M., Puccio, H., Lawrence, L., Clark, P., Lowrie, M.B., Bradley, J.L., Cooper, J.M., Koenig, M, und Chamberlain, S. (2001) Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis. *Neurogenetics* **3**: 185-93
- des Portes, V., Couplier, M., Melki, J., und Dreyfus, P.A. (1994). Early detection of mouse wobbler: A model of pathological motoneurone death. *Neuro Report* **5**: 1861-64
- Probst, F.J., Fridell, R.A., Raphael, Y., Saunders, T.L., Wang, A., Liang, Y., Morell, R.J., Touchman, J.W., Lyons, R.H., Noben-Trauth, K., Friedman, T.B. und Camper, S.A. (1998) Correction of deafness in shaker-2 mice by an unconventional myosin in a BAC transgene. *Science* **280** (5368): 1444-7
- Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J.D., Wims, M., Zheng, H. und Bradley, A. (1992) Genomic DNA microextraction: A method to screen numerous samples. *Anal Biochem.* **201** (2): 331-5
- Rathke-Hartlieb, S., Schmidt, V.C., Jockusch, H., Schmitt-John, T. und Bartsch, J.W. (1999). Spatiotemporal progression of neurodegeneration and glia activation in the wobbler neuropathy of the mouse. *Neuroreport* **10** (16): 3411-6
- Resch, K. (1997). Physikalische Kartierung von Genen und anonymen Markern auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus und dem humanen Chromosomenabschnitt

6. Literatur

- 2p13: Ein Beitrag zur Positionsklonierung des wobbler-Gens. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Resch, K. (2000). Interspezies-Genom-Vergleich im Bereich des humanen Chr 2p13: Neue Kandidatengene für die neurologische Mutation wobbler der Maus. Dissertation, Universität Bielefeld.
- Resch, K., Jockusch, H. und Schmitt-John, T. (2000) Assignment of homologous genes, Peli1/PELI1 and Peli2/PELI2, for the Pelle adaptor protein Pellino to mouse chromosomes 11 and 14 and human chromosomes 2p13.3 and 14q21, respectively, by physical and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* **92** (1-2):172-4
- Resch, K., D. Korthaus, N. Wedemeyer, A. Lengeling, M. Ronsiek, C. Thiel, K. Baer, H. Jockusch and T. Schmitt-John (1998). "Homology between human chromosome 2p13.3 and the wobbler critical region on mouse chromosome 11: comparative high-resolution mapping of STS and EST loci on YAC/BAC contigs." *Mamm Genome* **9** (11): 893-8
- Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannilkuchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P. und Roudaut, C. (1995) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81**: 27-40
- Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R. und Birchmeier, C. (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* **389**: 725-30
- Rinchik, E.M. und Russell, L.B. (1990) Germ-line deletion mutations in the mouse: tools for intensive functional and physical mapping of regions of the mammalian genome. In *Genome analysis, Vol. 1: Genetic and physical mapping* (K.E. Davies und S.M. Tilghman) S. 121-158. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Rinchik, E.M. (1991) Chemical mutagenesis and fine-structure functional analysis of the mouse genome. *Trends Genet.* **7**: 15-21
- Ripps, M.E., Huntley, G.W., Hof, P.R., Morrison, J.H., und Gordon, J.W. (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 689-92
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McCenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.A., Gerger, R., Tanzi, R.E., Halperin, J.J., Herzfeldt, B., Van den Bergh, R., Hung, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R. und Brown jr., R.H. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**: 59-62
- Saiki, R.K., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharff, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K.B. und Ehrlich, H. (1988) Primer-detected enzymatic amplification with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-92
- Saiki, R.K., Scharf, S.J., Falcoona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-54
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, V.C. (1997). Ausschluß des Gens Cct4, das die delta-Untereinheit des cytosolischen TCP-1 enthaltenden Chaperonin-Komplexes (CCT) kodiert, für die

6. Literatur

- Mutation wobbler der Maus und weitere Eingrenzung des Kandidatengenbereichs auf dem proximalen Chromosom 11, Universität Bielefeld.
- Schmitt-John, T., Schmidt, V.C., Augustin, M., Korthaus, D., Jockusch, H. (1998): "Neue genetische Strategie für die Positionsklonierung von "Krankheitsgenen" der Maus": BIOforum 22, Git Verlag, Darmstadt
- Schmitt-John T (2001) Identifikation und Analyse von Krankheitsgenen bei Mensch und Maus durch Funktionelle Genomik. Habilitationsschrift für das Fach Genetik, Universität Bielefeld.
- Setoyama, C., Joh, T., Tsuzuki, T. und Shimada, K. (1988) Structural Organisation of the Mouse Cytosolic Malate Dehydrogenase Gene: Comparison with that of the Mouse Mitochondrial Malate Dehydrogenase Gene. *Mol. Biol.* **202**: 355-64
- Shimada H, Kaname T, Suzuki M, Hitoshi Y, Araki K, Imaizumi T und Yamamura K. (1999) Comparison of ES cell fate in sandwiched aggregates and co-cultured aggregates during blastocyst formation by monitored GFP expression. *Mol Reprod Dev* **52**: 376-82
- Silverman, G.A., Ye, R.D., Pollock, K.M., Sadler, J.E., und Korsmeyer, S.J. (1989). Use of yeast artificial chromosome clones for mapping and walking within human chromosome segment 18q21.3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 7485-89
- Sinn, P.L. und Sigmund, C.D. (2000) Identification of three human renin mRNA isoforms from alternative tissue-specific transcriptional initiation. *Physiol Genomics.* **29**:25-31
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-17
- Tacken, P.J., van der Zee, A., Beumer, T.L., Florijn, R.J., Gijpels, M.J., Havekes, L.M., Frants, R.R., van Dijk, K.W. und Hofker, M.H. (2001) Effective generation of very low density lipoprotein receptor transgenic mice by overlapping genomic DNA fragments: high testis expression and disturbed spermatogenesis. *Transgenic Res.* **10** (3): 211-21
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**: 971-83
- Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51** (3): 503-12
- Ulbrich, M. (2000) Kartierung von Rekombinations-Bruchpunkten in der wobbler-kritischen Region auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus. Diplomarbeit, Uni-Bielefeld.
- Ulbrich, M., Schmidt, V.C., Ronsiek, M., Mussmann, A., Bartsch, J.W., Augustin, M., Jockusch, H. und Schmitt-John, T. (2002) Genetic modifiers that aggravate the neurological phenotype of the wobbler mouse. *Neuroreport* **13** (4): 535-9
- Vartanian, T., Fischbach, G. und Miller, R. (1999) Failure of spinal chord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *PNAS* **96**: 731-35
- Vartanian, T., Goodearl, A., Lefebvre, S., Park, S.K. und Fischbach, G. (2000) Neuregulin induces the rapid association of focal adhesion kinase with the erbB2-erbB3 receptor complex in schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun* **271** (2): 414-17
- Venter, J.C. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-51
- Walter, M.A., Spillett, D.J., Thomas, P., Weissenbach, J. und Goodfellow, P.N. (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes. *Nature Genet.* **7**: 22-28

6. Literatur

- Wang, J.Y., Frenzel, K.E., Wen, D. und Falls, D.L. (1998) Transmembrane neuregulins interact with LIM Kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *The Journal of Biological Chemistry* **273** (32): 20525-34
- Wedemeyer, N., Lengeling, A., Ronsiek, M., Korthaus, D., Baer, K., Wuttke, M. und Jockusch, H. (1996) YAC Contigs of the Rab1 and wobblers (wr) Spinal Muscular Atrophy Gene Region on Mouse Chromosome 11 and of the Homologous Region on Human Chromosome 2p. *Genomics* **32**: 447-54
- Wedemeyer, N. (1995) Charakterisierung der Rab1-Genregion auf dem proximalen Chromosom 11 der Maus als Beitrag zur Positionsklonierung des Gens für die spinale Muskelatrophie (Wobbler). Dissertation, Universität Bielefeld.
- White, R., Leppert, M., Bishop, D.T., Barker, D., Berkowitz, J., Brown, C., Callahan, P., Holm, T. und Jerominski, L. (1985) Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* **313**: 101-5
- Wichmann, H., Jockusch, H., Guénet, J.-L., Gallwitz, D., und Kaupmann, K. (1992). The mouse homolog to the ras-related yeast gene YPT1 maps on chromosome 11 close to the wobbler (wr) locus. *Mamm. Genome* **3**: 467-68
- Wines, M.E., Shi, Y., Lindor, M. und Holdener, B.C. (2000) Physical localization of the mesoderm development (mesd) functional region. *Genomics*. **68**: 322-9
- Wolpowitz, D., Mason, T.B., Dietrich, P., Mendelsohn, M., Talmage, D.A. und Role, L.W. (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* **25**: 79-91
- Wuttke, M. (1995) Molekulargenetische Charakterisierung der Region um das "Wobbler"-Gen der Maus und mRNA-Studien an frühdiagnostizierten "Wobbler"-Mäusen. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Yang, X., Kuo, Y., Devay, P., Yu, C. und Role, L. (1998) A cysteine-rich isoform of neuregulin controls the level of expression of neuronal nicotinic receptor channels during synaptogenesis. *Neuron* **20**: 255-70
- Yonekawa, H., Moriwaki, K., Gotoh, O., Hayashi, I., Watanabe, N., Miyashita, N., Petras, M.L. und Tagashira, Y. (1981) Evolutionary relationships among five subspecies of *Mus musculus* based on restriction enzyme cleavage patterns of mitochondrial DNA. *Genetics* **98**: 801-16
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffel, M., Barone, M., Leopold, L. und Friedman, J.M. (1994) Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-32
- Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J. und Godowski, P.J. (1997) Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 9562-67
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muryers, J. und Stewart, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genet.* **20**: 123-28
- Zhang, Y., Muryers, J., Testa, G. und Stewart, A.F. (2000) DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **18**: 1314-17
- Zwart, R., Verhaagh, S., de Jong, J., Lyon, M. und Barlow, D.P. (2001) Genetic analysis of the organic cation transporter genes *Orct2/Slc22a2* and *Orct3/Slc22a3* reduces the critical region for the t haplotype mutant *t(w73)* to 200 kb. *Mamm Genome*. **12**: 734-40

7. Lebenslauf und Erklärung

Lebenslauf

Volker Schmidt

12. 12. 1968	geboren in Gütersloh
1975-79	Besuch der Wellensiek-Grundschule in Bielefeld
1979-89	Besuch des Ratsgymnasiums in Bielefeld
1989	Abitur
1989-90	Zivildienst
1991-97	Studium im Diplomstudiengang Biologie an der Universität Bielefeld
1997	Diplomprüfung Biologie an der Universität Bielefeld
1998-2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Sonderforschungsbereich 549 an der Universität Bielefeld

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel: „Erzeugung von genetisch veränderten Mäusen. Versuche zur transgenen Rettung der *wobbler* Mutation der Maus“ selbständig und nur mit den aufgeführten Materialien und Quellen angefertigt habe.

Ravensburg, 15.06.2002

Volker Christopher Schmidt