In vivo-Analyse des LIM-Domäne-bindenden Kofaktors RLIM in Vertebraten

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereiches Biologie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Michael Bossenz

aus Hamburg

Hamburg, März 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am "Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg (ZMNH)" in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ingolf Bach in der Zeit von Mai 1999 bis Februar 2004 durchgeführt.

Referent: PD Dr. Ingolf Bach

Koreferent: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Tag der Disputation:23.04.2004

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1.	Einleitung				
	1.1.	Die Struktur eukaryotischer Gene			
	1.2.	Expre	Expression eukaryotischer Gene		
		1.2.1.	Prinzipien der Transkription	2	
		1.2.2.	Transkriptionsfaktoren	3	
		1.2.3.	Koaktivatoren und Korepressoren der Transkription	4	
	1.3. LIM-Proteinnetzwerk			6	
		1.3.1.	LIM-Homeodomänen-Proteine (LIM-HD-Proteine)	8	
		1.3.2.	LIM-only-Proteine (LMO-Proteine)	10	
	1.4.	Die L	IM-Domäne	11	
		1.4.1.	CLIM-Kofaktor-Familie	13	
		1.4.2.	RLIM-Kofaktor	15	
		1.4.3.	Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau	17	
	1.5.	Gente	chnologie	19	
		1.5.1.	Inaktivierung von Genen im Mausmodell (Mus musculus)	19	
		1.5.2.	Überexpressionsanalysen im Zebrafisch (Danio rerio)	21	
	1.6.	Probl	emstellung	22	
2.	Erge	ebnisse		23	
	2.1. Funktionelle C		ionelle Charakterisierung des RLIM-kodierenden		
		Rnf12-Gens		23	
		2.1.1.	RLIM als Korepressor der Transkription	23	
	2.2.	Ektopische Überexpression von RLIM während der frühen			
	Zebrafischent		fischentwicklung	25	
		2.2.1.	Proteinstabilität von RLIM während der		
			Zebrafischembryogenese	26	
	2.3.	Isolie	Isolierung und Charakterisierung des RLIM-kodierenden		
		Rnf12	2-Gens	31	
		2.3.1.	Genomische Organisation von Rnf12	31	
		2.3.2.	Bestimmung des Rnf12-Transkriptionsstarts mittels		
			5'-RACE	34	
		2.3.3.	Charakterisierung der Rnf12-Promotorregion	35	
		2.3.4.	Isolierung und Analyse von humanem RLIM	36	

	2.4. Generierung einer Knockout-Maus		37
		2.4.1. Aufbau des Rekombinationskonstruktes für eine	
		RLIM-defiziente Maus	38
		2.4.2. Elektroporation und Selektion von ES-Zellen	41
		2.4.3. Nachweis der homologen Rekombination	41
		2.4.4. Nachweis der kompletten funktionalen RLIM-	
		Eliminierung in ES-Zellen	44
		2.4.5. RLIM-Eliminierung in ES-Zellen führt zum Anstieg	
		von CLIM-Kofaktoren	45
		2.4.6. Versuch des Aufbaus einer RLIM-defizienten Mauslinie	46
	2.5.	Generierung von konditionalen RLIM-Mausmutanten	47
		2.5.1. Aufbau des konditionalen Rekombinationskonstruktes	47
		2.5.2. Nachweis der homologen Rekombination	50
		2.5.3. Cre/loxP-abhängige Rekombination in ES-Zellen	52
		2.5.4. Aufbau von konditionalen Mausmutanten	55
3.	Diskussion		
	3.1.	Die Stabilität von RLIM während der frühen	
		Zebrafischentwicklung	58
	3.2.	Die biologische Funktion von RLIM während der	
		Entwicklung von Vertebraten	62
	3.3.	Ubiquitin-Ligasen als Regulatorproteine im Zellkern	68
	3.4.	Schlussfolgerung und Ausblick	71
4.	Mat	erialien	73
	4.1.	Chemikalien und molekulare Reagenzien	73
	4.2.	Liste gebräuchlicher Lösungen	73
	4.3.	Bakterienstämme	74
	4.4.	Vektoren	74
	4.5.	Mausstamm	75
	4.6.	Nukleotide	75
	17	Oligonukleotide	75
	 ./.		
	4.8.	Restriktionsenzyme	76

	4.10.	Antik	örper		76
		4.10.1	Primäre Antikör	per	76
		4.10.2	Gekoppelte seku	undäre Antikörper und Protein A	77
	4.11.	Zellku	lturmedien		77
		4.11.1	Fibroblasten-Me	edium	77
		4.11.2	ES-Zellmedium		78
5.	Meth	oden			79
	5.1.	Allgen	neine Methode		79
		5.1.1.	Anzucht von Est	cherichia coli	79
	5.2.	Herste	ellung und Aufa	rbeitung von DNA-Fragmenten	79
		5.2.1.	Agarosegelelekt	rophorese	79
		5.2.2.	Ethidiumbromid	lfärbung	80
		5.2.3.	Bestimmung vor	n DNA- und RNA-Konzentrationen	81
		5.2.4.	Spaltung von Di	NA durch Restriktionsendonukleasen	81
		5.2.5.	Isolierung von E	DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	82
		5.2.6.	Phenol-/Chlorof	form-Extraktion	83
		5.2.7.	Ethanolfällung		83
		5.2.8.	Herstellung von	DNA-Fragmenten mittels	
			Polymerase-Ket	tenreaktion (PCR)	84
		5.2.9.	Reverse Transkr	iptase Polymerase-Kettenreaktion	85
			(RT-PCR)		
		5.2.10	5'-RACE (Rapid	d Amplification of cDNA Ends)	85
		5.2.11	Modifizierung v	on DNA-Enden	86
			5.2.11.1. E	Dephosphorylierungen von 5'-Enden	86
			5.2.11.2. A	Auffüllung überhängender 5'-Enden	86
		5.2.12	Radioaktive Ma	rkierung von DNA	87
			5.2.12.1. R	Radioaktive Markierung von 3'-Enden	87
			5.2.12.2. N	Aarkierung von DNA durch	
			,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	Random-Primer"	87
			5.2.12.3. Is	solierung radioaktiv markierter DNA	88
		5.2.13	Klonierung von	DNA-Fragmenten	88
			5.2.13.1. P	räparation von Vektoren	88
			5.2.13.2. K	Klonierung von PCR-Fragmenten	88
			5.2.13.3. L	igation von DNA-Fragmenten in Vektoren	89
			5.2.13.4. H	Ierstellung kompetenter Bakterienzellen	89

		5.2.13.5.	Transformation von Bakterienzellen	90		
	5.2.14	. Sequenzieru	ng von DNA	90		
5.3.	Isolie	rung und Reinigung von Plasmid-DNA				
	5.3.1.	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab				
		(STET-Präpa	aration)	91		
	5.3.2.	Isolierung vo	n Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	91		
5.4.	Isolie	rung und Rei	nigung von genomischer DNA	92		
	5.4.1.	Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen9				
	5.4.2.	Isolierung von hochreiner genomischer DNA aus				
		Mausschwan	zspitzen	92		
	5.4.3.	Isolierung vo	on genomischer DNA aus			
		Mausschwan	zgewebe	93		
5.5.	Identi	Identifikation von DNA-Fragmenten durch				
	South	ern-Hybridis	ierung	94		
	5.5.1.	DNA-Transf	er aus Agarosegelen auf Membranen	94		
	5.5.2.	Hybridisieru	ng von genomischer DNA nach Transfer auf			
		Membranen		95		
5.6.	Präpa	aration von RNA				
	5.6.1.	Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen				
	5.6.2.	Herstellung von mRNA mittels <i>in vitro</i> -Transkription 9				
	5.6.3.	mRNA-Injektionen in Zebrafischembryonen				
5.7.	Protei	inanalytische	Methoden	97		
	5.7.1.	Proteinbestimmung nach Bradford 9				
	5.7.2.	Elektrophorese in denaturierenden SDS-				
		Polyacrylam	id-Gelen	97		
	5.7.3.	. Färbung von denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen				
		mit Coomassie-Farbstoff				
	5.7.4.	Herstellung von Gewebehomogenaten für SDS-				
		Polyacrylamid-Gele				
	5.7.5.	Immunocher	nischer Nachweis von Proteinen durch das	0.0		
		Western-Blo	t-Verfahren	99		
		5.7.5.1.	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen	0.0		
			aur Nitrozellulosemembranen	99		
		5.7.5.2.	Immunochemischer Nachweis von	00		
F 0	C	• •	immobilisierten Proteinen	99 100		
5.8.	Gener	ierung von K	nockout-Mäusen	100		

	5.8.1.	Aufbau eir	100	
	5.8.2.	5.8.2. Methoden in der Zellkultur		102
		5.8.2.1.	Präparation und Kultur primärer	
			embryonaler Fibroblasten	102
		5.8.2.2.	Lagerung von Säuger-Zellen	102
		5.8.2.3.	Kultur, Transfektion und Selektion	
			embryonaler Stammzellen	103
	5.8.3. Blastozysteninjektionen und Blastozystenimplantatione			104
	5.8.4.	Aufbau eir	er Knockout-Mauslinie	105
Anh	ang			106
6.1.	Abkü	rzungsverze	eichnis	106
	6.1.1.	Allgemein	e Abkürzungen	106
	6.1.2.	Spezielle A	Abkürzungen	109
6.2.	Liste	der verwen	deten Oligonukleotide	110
Lite	Literaturverzeichnis 1			113

7. Literaturverzeichnis

6.

Lebenslauf

Publikationsliste

Danksagung

Zusammenfassung

Bei der LIM-Domäne handelt es sich um ein Proteinmotiv, das Protein-Protein-Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Proteinen vermittelt. Im Zellkern gibt es mindestens zwei Proteinklassen die LIM-Domänen besitzen, und zwar die LIM-Homeodomänen-Proteine (LIM-HD) und die LIM-only-Proteine (LMO). LIM-HD-Transkriptionsfaktoren übernehmen essentielle Funktionen in der Entwicklung des Nervensystems und sind dort u.a. für die Differenzierung verschiedener Zelltypen während der Neurogenese verantwortlich. Die Familie der CLIM/Ldb/NLI/Chip-Kofaktoren und das RING Zinkfinger Protein RLIM wurden aufgrund ihrer Fähigkeit an LIM-Domänen zu binden, identifiziert. Die Interaktionen der CLIM-Kofaktorfamilie mit LIM-Domänen sind wichtig für die biologische Aktivität, die durch die LIM-HD-Proteine vermittelt werden. Bei RLIM handelt es sich um einen Kofaktor, der sowohl mit LIM-Domänen als auch mit CLIM-Kofaktoren wechselwirken kann. RLIM wirkt dabei als transkriptioneller Korepressor und hemmt die biologische Aktivität von LIM-HD- Proteinen während der Embryogenese von Vertebraten.

Da RLIM einen RING Zinkfinger enthält und dieses Motiv in Ubiquitin-Ligasen weitverbreitet zu finden ist, wurde untersucht, ob RLIM ebenfalls eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt. RLIM konnte in der Tat als eine Ubiquitin-Protein-Ligase identifiziert werden, die fähig ist sich selbst, CLIM-Kofaktoren und LMO-Proteine zu ubiquitinieren. RLIM markiert auf diese Weise CLIM-Kofaktoren für den proteolytischen Abbau durch das 26S Proteasom und hemmt somit die Aktivität von LIM-HD-Proteinen, da die CLIM-Kofaktoren ihre positive Wirkung auf die LIM-HD-Faktoren nicht weiter aufrechterhalten können. Um die entwicklungsbiologische in vivo-Funktion von RLIM während der Entwicklung von Vertebraten zu untersuchen, sollte auf der einen Seite das für RLIM-kodierende Rnf12-Gen durch homologe Rekombination in der Maus inaktiviert werden. Auf der anderen Seite sollte mit ektopischen Überexpressionsversuchen von RLIM der entwicklungsbiologische Einfluß von RLIM während der frühen Zebrafischentwicklung erforscht werden. Zur Verwirklichung dieser Aufgaben wurde zuerst das Rnf12-Gen aus einer murinen genomischen λ -Bibliothek isoliert und nachfolgend charakterisiert. Das Rnf12-Gen erstreckt sich über 20 kb des murinen Genoms und kodiert für ein aus 600 Aminosäuren bestehendes RLIM-Protein. Die Sequenzanalysen zeigen, dass das Rnf12-Gen zwischen verschiedenen Spezies konserviert ist. Die Homologien auf Proteinebene zwischen Mensch, Frosch, Huhn und Maus sind sehr hoch. Basierend auf diesen genomischen Daten wurde zunächst versucht, das Rnf12-Gen durch homologe Rekombination in der Maus komplett zu inaktivieren. Diese komplette Knockout-Methode führte allerdings nicht zur Keimbahntransmission der rekombinierten ES-Zellen. Durch die Etablierung einer konditionalen Knockout-Mauslinie konnten die Probleme bei der Generierung der Rnf12-defizienten Mauslinie umgangen werden. Allerdings wurden auch hier, trotz erfolgter Keimbahntransmission der rekombinierten ES-Zellen, bei der konditionellen kompletten Knockout-Variante weder männliche noch weibliche homozygote Rnf12defiziente Nachkommen erzielt. Diese und die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen weisen auf eine frühe embryonale Lethalität von Rnfl2-defizienten Mausembryonen hin Die ektopische Überexpression von RLIM während der frühen Zebrafischentwicklung führte zu keinem detektierbaren Phänotyp. Ein Grund dafür könnte sein, dass das RLIM-Protein in Zebrafischen instabil ist und es deshalb trotz Überexpression zu keinem Phänotyp führt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, entwickelte ich eine in vivo-Methode mit entwicklungsbiologischer Relevanz, mit der es möglich ist, Proteinstabilitäten während der frühen Zebrafischentwicklung direkt miteinander vergleichen zu können. In der Tat zeigte sich, dass ektopisch überexprimiertes RLIM-Protein nach den ersten 24 Stunden der frühen embryonalen Zebrafischentwicklung nicht mehr zu detektieren ist.

Sowohl unsere Ergebnisse als auch die Ergebnisse aus anderen Laboratorien weisen auf eine wichtige entwicklungbiologische Rolle von RLIM während der Entwicklung von Vertebraten hin.

1. Einleitung

1.1 Die Struktur eukaryotischer Gene

Ein eukaryotisches Gen besteht typischerweise aus regulatorischen Elementen wie Enhancer und Silencer, einer Promotorregion, einem Transkriptionsstartsignal, einem Translationsstartsignal, Exons und Introns, einem Translationsstopsignal und einer 3'-nichttranslatierten Region (Alberts et al., 1994; Lewin, 1997; Gilbert, 2000; Lee und Young, 2000; Veenstra und Wolffe, 2001; Näär et al., 2001).

Gene benötigen kurze Sequenzelemente, die sogenannten Kernpromotorelemente, an denen die RNA-Polymerase II binden und die Transkription initiieren kann. Diese Kernpromotorelemente befinden sich stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt und verteilen sich gewöhnlich über eine ungefähr 100 bp lange Region (Lee und Young, 2000). Die Kernpromotorelemente der von der RNA-Polymerase II transkribierten Gene können eine TATA-Box mit der Konsensussequenz TATAAA bei Position -20 bis -30 (relativ zum Transkriptionsstartsignal) und den Transkriptionsstartpunkt (INR) enthalten (Breathnach und Chambon, 1981; Lewin, 1997; Gilbert, 2000).

Weiter stromaufwärts befindliche Promotorelemente besitzen dagegen Sequenzeinheiten, typischerweise weniger als 20 Nukleotide lang, welche als Bindungsstellen für spezifische DNA-bindende Faktoren, den sogenannten Transkriptionsfaktoren, dienen. Die Transkriptionsfaktoren sind für die effiziente Transkription in allen Zelltypen verantwortlich (Lewin, 1997). Einige dieser Sequenzelemente kommen in vielen Promotoren vor und werden konstitutiv genutzt. Andere wiederum sind spezifisch, sie identifizieren bestimmte Klassen von Genen zu bestimmter Zeit und in bestimmter Umgebung und regulieren so ihre Aktivität. Die Effizienz und die Spezifität mit der ein Promotor erkannt wird, hängt von diesen kurzen Sequenzelementen ab. Solche Elemente kommen in verschiedenen Kombinationen in den einzelnen Promotoren vor. An der Funktionalität eines Promotors können eine Vielzahl von Sequenzelementen beteiligt sein. Keines dieser Elemente ist jedoch für alle Promotoren essentiell. Weitere regulatorische Elemente für die Kontrolle der Genexpression wie Enhancer und Silencer befinden sich entweder stromaufwärts, stromabwärts oder innerhalb vom Gen selbst und können in jeder Orientierung relativ zum Startpunkt wirksam sein (Verrijzer und Tijan, 1996). Ihre Funktion ist die Erhöhung bzw. Verminderung der Aktivität des Promotors, obwohl sie selbst keine Promotoraktivität besitzen (Khoury und Gruss, 1983). Man geht davon aus, dass Transkriptionsfaktoren, die an Regionen des Promotors binden, mit den weiter davon entfernten an Enhancer bindenden Faktoren interagieren können, indem sich eine DNA-Schleife bildet (Lewin, 1997).

1.2 Expression eukaryotischer Gene

Die Expression eukaryotischer Gene ist ein komplexer Prozeß, der auf verschiedenen Ebenen reguliert werden kann. Eine Regulation kann auf der Ebene der Transkription, auf der Ebene der RNA-Prozessierung und der RNA-Stabilisierung sowie des RNA-Transports vom Zellkern in das Cytoplasma erfolgen. Ebenso ist eine Kontrolle im Rahmen der Translation, des RNA-Abbaus sowie des Proteinabbaus möglich. Die meisten der bis heute charakterisierten eukaryotischen Gene werden auf Transkriptionsebene reguliert.

1.2.1. Prinzipien der Transkription

Die Transkription der RNA-Polymerase II läßt sich in mehrere Phasen unterteilen: die Bindung der RNA-Polymerase an die doppelsträngige DNA, den Kettenstart (Initiation), die Kettenverlängerung (Elongation), den Kettenabbruch (Termination) und die Freisetzung der RNA. Voraussetzung für die Transkription ist ein stabiler Initiationskomplex der sich zwischen der relevanten RNA-Polymerase und der Promotorregion bildet (Zawel und Reinberg, 1995). Die meisten Promotoren enthalten eine TATA-Box. Sie stellt das einzige stromaufwärts gelegene Promotorelement dar, das in Bezug auf den Startpunkt eine relativ fixe Position einnimmt. Voraussetzung für die Initiation ist, dass sich die Transkriptionsfaktoren in einer bestimmten Ordnung an der TATA-Box zu einem Multienzymkomplex zusammenfinden (Buratowski, 1994; Roeder, 1996) an den die RNA-Polymerase bindet.

1.2.2. Transkriptionsfaktoren

Bei den Transkriptionsfaktoren handelt es sich um DNA-bindende Proteine, die durch Bindung an Promotorregionen und Enhancer sowie durch Interaktionen mit anderen Proteinen auf die Transkription von bestimmten Genen aktivierend oder inhibierend einwirken können (Lewin, 1997; Ryan und Rosenfeld, 1997; Gilbert, 2000).

Dabei binden Transkriptionsfaktoren in sequenzspezifischerweise an die regulatorisch wirkenden Bereiche in der DNA. Transkriptionsfaktoren sind modular aufgebaut und weisen daher charakteristische Proteinabschnitte und Strukturen auf. So unterscheidet man generell zwischen dem DNA-bindenden Abschnitt (DNA-Bindedomäne) des Proteins und einem Abschnitt mit transaktivierender Funktion (Transaktivierungsdomäne) (Lewin, 1997; Gilbert, 2000). Diese Domänen sind in der Regel gut abgrenzbaren Abschnitten in der Proteinsequenz zuzuordnen. Die DNA-Bindedomänen wurden im Laufe der Evolution besonders stark konserviert (Nelson, 1995). Sie erlauben somit eine Einteilung in verschiedene Familien von Transkriptionsfaktoren. Wichtige Familien sind beispielsweise die Zinkfingerprotein-Familie (Evans und Hollenberg, 1988), die basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Protein-Familie (Wadman et al., 1994; Lewin, 1997), die Leucinzipper-Familie (Landschulz et al., 1988; Murre et al., 1989) und die Homeodomänen-Familie (Kessel et al., 1988).

Ein wichtiger Mechanismus in der Funktionsweise einiger Transkriptionsfaktoren ist ihre Fähigkeit, nach Bindung an ihre DNA-Erkennungssequenz Veränderungen der dreidimensionalen DNA-Struktur hervorzurufen. Hierbei können dieselben Transkriptionsfaktoren je nach Orientierung der Bindungsstelle in der DNA als Aktivator oder Repressor wirken, wobei sie den Kontakt von anderen Faktoren mit TATA-Box-bindenden Proteinen entweder verstärken oder abschwächen (Lewin, 1997; Gilbert, 2000).

Neben diesen indirekten Effekten durch Konformationsänderungen der DNA können einige Transkriptionsfaktoren auch direkt aktivierend auf die Genexpression wirken.

Hierbei bringen sie ihre transaktivierende Domäne in die Nähe der TATA-Box, an der die basale Transkriptionsmaschinerie zusammengesetzt wird, interagieren mit den dortigen Proteinen und verstärken die Aktivität der TATA-bindenden Proteine. So interagiert beispielsweise das Zinkfingerprotein Sp1 mit einer Komponente des TFIID-Komplexes, dem TAFII-110 (Emili und Greenblatt, 1994; Gill et al., 1994), während die POU-Proteine Oct-1 und Oct-2 mit TBP interagieren (Zwilling et al., 1994). Im Gegensatz zu den basalen Faktoren können manche spezifische Transkriptionsfaktoren besser transaktivieren, wenn sie in einer proximalen oder Promotorposition zur TATA-Box oder in einer Enhancerposition binden können. Die Transkription kann aber auch durch Repressoren inhibiert werden. Einige reprimierende Faktoren konkurrieren direkt um die Bindungsstelle für einen transaktivierenden Faktor oder blockieren sterisch dessen Bindung. Zudem können reprimierende Faktoren transaktivierende Proteine, die bereits an DNA gebunden haben, inhibieren. Transkriptionsfaktoren können auch an Enhancerelemente binden. Aktivatoren und Repressoren sowie die zugehörigen regulatorischen Sequenzen können so die Aktivität und Effizienz der Transkription kontrollieren und somit auf die Bedürfnisse der Zelle reagieren.

Letztlich bestimmen die komplexen Interaktionen von aktivierenden und reprimierenden Transkriptionsfaktoren die molekulare Feinsteuerung der Zelle. Hierfür stellt eine Zelle einen spezifischen Satz von Transkriptionsfaktoren zur Verfügung. Die Zusammensetzung dieser Faktoren kann dann allerdings im Laufe der verschiedenen Differenzierungsprozesse wechseln.

1.2.3. Koaktivatoren und Korepressoren der Transkription

Bei den Kofaktoren der Transkription handelt es sich um genregulatorische Proteine. Diese Faktoren binden nicht direkt an die DNA, sondern sie vermitteln ihre regulatorische Aktivität durch die Bindung an DNA-bindende Transkriptionsfaktoren oder durch die Assoziation mit anderen aktivierend oder reprimierend wirkenden Kofaktoren. Die Kofaktoren vermitteln beispielsweise die Verbindung von Transkriptionsfaktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie. Andere Kofaktoren unterstützen Aktivatoren und somit den Transkriptionsapparat bei der Umsetzung ihrer Aufgaben im Zellkern.

Einleitung

Einige Kofaktoren stellen Adaptoren dar, die direkt über aktivierende oder reprimierende Effekte auf den Transkriptionsapparat wirken können. Andere Kofaktoren wiederum sind Chromatin-remodulierende oder -modifizierende Proteine. Transkriptionskofaktoren sind oft Bestandteil von großen multifunktionalen Komplexen. (Lee und Young, 2000). Innerhalb dieser Komplexe können Koaktivatoren und Korepressoren auch miteinander interagieren und somit an der Regulation und Kontrolle der Transkription teilhaben (Hermanson et al., 2002).

Die FOG- (Friend of GATA) Kofaktoren besitzen z.B. transkriptionelle Repressor-Funktionen und interagieren mit GATA-Transkriptionsfaktoren (Deconinck et al., 2000). Sie sind essentiell für die biologische Funktion vom Zinkfinger Transkriptionsfaktor GATA-1. So führt die Abwesenheit von FOG oder von GATA-1 zum selben Phänotyp, und zwar zu einer Störung in der Erythropoese (Tsang et al., 1998).

Die transkriptionellen Koaktivatoren BOB.1/OBF.1 (<u>B</u>-Zell <u>Oct-b</u>indendes Protein 1/<u>Oct</u> Protein-<u>b</u>indender <u>F</u>aktor) verleihen dem POU Transkriptionsfaktor Oct1 seine B-Zellen Spezifität (Hess et al., 2001). Aus diesem Grund führen Mutationen in den Genen von BOB.1/OBF.1 zu Defekten in der B-Zellen-Differenzierung (Schubart et al., 1996).

Auch Chromatin-modifizierende Enzyme wurden als Kofaktoren identifiziert. Beim Euchromatin liegen definierte genomische Regionen dekondensiert vor und werden aktiv transkribiert, während beim Heterochromatin diese Regionen kondensiert vorliegen und somit transkriptionell inaktiv sind (Näär et al., 2001). Somit muss eine bestimmte genomische Region zum Zwecke der Transkription zuerst dekondensiert werden (Gilbert, 2000; Lee und Young, 2000). Hyperacetylierte Histone befinden sich dabei in aktiv transkribierten Regionen während hypoacetylierte Histone in Regionen transkriptioneller Inaktivität zu finden sind (Lee und Young, 2000; Näär et al., 2001). Deshalb besitzen einige transkriptionelle Koaktivatoren und Korepressoren eine Histon-Acetyltransferase- (HAT) bzw. Histon-Deacetylasen-(HDAC) Aktivität (Lee und Young, 2000). Zu den Kofaktoren, die eine HAT-Aktivität besitzen und somit die Aktivator-abhängige transkriptionelle Aktivierung fördern, gehören bespielsweise CBP (<u>CREB-b</u>indendes <u>P</u>rotein), p300 und die p160-Koaktivatorfamilie. TAFIID besitzt eine HAT-Aktivität (Näär et al., 2001), die die Promotoren- und Enhancerregionen für die

Transkription zugänglich macht. Auf der anderen Seite führt die Histon-Deacetylase-Aktivität zur Inhibierung der Transkription. Hierzu werden Histon-Deactylase-Komplexe wie der mSin3-Komplex oder der NuRD (<u>Nu</u>cleosome <u>R</u>emodeling and Histone <u>D</u>eactylation)-Komplex über DNA-bindende Proteine an die DNA herangeführt (Lee und Young, 2000).

Diese Beispiele zeigen, dass es vorkommen kann, dass Transkriptionsfaktoren nicht allein wirksam sein können. Die Kooperation mit Kofaktoren, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt wird, kann essentiell für die Erfüllung der biologischen Aufgaben dieser Transkriptionsfaktoren sein.

1.3. LIM-Proteinnetzwerk

Die LIM-Domäne ist ein in der Evolution konserviertes Proteinmotiv. Sie wurde zuerst bei den Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren Lin11, Isl1 und Mec3 entdeckt und nach ihnen benannt. Bei der LIM-Domäne handelt es sich um eine Doppel-Zinkfinger-Struktur die, im Gegensatz zu DNA-bindenden Zinkfinger-Motiven, an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist (Abb. 1).



Abb. 1: Allgemeine Struktur der LIM-Domäne. Die LIM-Domäne ist eine Doppel-Zinkfinger-Struktur, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Jede Zinkfinger-Struktur ist um ein zentrales Zinkatom aufgebaut. In einem Zinkfinger befinden sich zwei benachbarte Cystein- und/oder Histidin- bzw. Asparaginsäurereste, die gemeinsam mit ihren Seitenketten das Zinkatom koordinieren. Die Aminosäuren-Primärstruktur ist als schwarze Linie dargestellt. X, beliebige Aminosäure; C, Cystein; H, Histidin; D, Asparaginsäure; Zn, Zinkatom. (Modifiziert nach Dawid et al., 1998).

Im folgenden wurden weitere Proteinklassen identifiziert die LIM-Domänen enthalten. Neben den LIM-Homeodomänen-Proteinen (LIM-HD), die zusätzlich zu den zwei sich wiederholenden N-terminalen LIM-Domänen noch eine DNA-bindende Homeodomäne besitzen, wurden die LIM-only-Proteine (LMO) entdeckt. Diese LMOs bestehen nur aus zwei konservierten LIM-Domänen und können, im Gegensatz zu den LIM-HD-Proteinen, nicht an DNA binden (Abb. 2), sind aber wie die LIM-HD-Proteine vorwiegend im Zellkern lokalisiert. (Dawid et al., 1998; Jurata und Gill, 1998; Bach, 2000).



Abb. 2: Schematische Darstellung von LIM-Homeodomänen-(LIM-HD) und LIM-only-(LMO) Proteinen. LIM-HD-Proteine enthalten neben den beiden N-terminalen LIM-Domänen, die für die Protein-Protein-Interaktionen notwendig sind, noch eine DNA-bindende Homeodomäne. LMO-Proteine bestehen quasi nur aus den zwei LIM-Domänen und können deshalb nicht direkt an DNA binden. LMO-Proteine vermitteln ihre regulierende Aktivität als Adaptoren. Beide Proteine sind vorwiegend im Kern lokalisiert.

Das LIM-Domänen-Motiv wurde aber auch in den vorwiegend im Zytoplasma vorkommenden LIM-Kinasen (Lmk1 und Lmk2) gefunden. Hierbei handelt es sich um eine Proteinklasse, die neben den LIM-Domänen noch eine Kinase-Domäne enthält. Darüber hinaus wurden weitere LIM-Domänen-enthaltende Proteinklassen gefunden, die genau wie die LIM-Kinasen vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert sind (Dawid et al., 1998; Curtiss und Heilig, 1998; Jurata und Gill, 1998; Bach, 2000).

1.3.1. LIM-Homeodomänen-Proteine (LIM-HD-Proteine)

Die Mitglieder der LIM-HD-Protein-Familie werden in sechs Klassen unterteilt (Hobert und Westphal, 2000). Zu dieser Unterteilung werden konservierte Merkmale innerhalb der Homeodomäne herangezogen (Tab. 1).

LIM-HD-Klassen	Ausgesuchte Mitglieder der Klassen		
Apterous Gruppe	DM-Apterous, H-Lhx2, C-Lhx2a, C-Lhx2b, M-Lhx2, M-Lhx9		
Lhx6/7 Gruppe	M-Lhx6, M-Lhx7, DM-Arrowhead, CE-Lim-4		
Islet Gruppe	ZF-Isl1, ZF-Isl2, ZF-Isl3, DM-Islet, C-Isl1, C-Isl2, M-Isl1		
Lmx Gruppe	H-Lmx-1b, C-Lmx-1, MA-Lmx-1-1, MA-Lmx-1-2, M-Lmx-1a		
Lim-3 Gruppe	C-Lim-3, XLim-3, M-Lhx4, ZF-Lim-3, M-Lhx3, DM-Lim3		
Lin-11 Gruppe	<u>CE-Lin-11</u> , <u>CE-Mec-3</u> , C-Lim1, H-Lim1, <u>M-Lhx5</u> , <u>M-Lim1</u> , XLim-1, ZF-Lim1		

Tabelle 1: Unterteilung der LIM-HD-Protein-Familie in sechs Klassen

C, Huhn; CE, Fadenwurm; DM, Taufliege; H, Mensch; M, Maus; MA, Hamster; X, Krallenfrosch; ZF, Zebrafisch. Die unterstrichenen Faktoren werden im Text näher beschrieben.

LIM-HD-Proteine übernehmen essentielle Funktionen bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen innerhalb der Embryogenese und während der Entwicklung von Organen. Insbesondere bei der Entwicklung des Nervensystems im Laufe der Neurogenese spielen sie eine wichtige Rolle (Tab. 2).

Der LIM-HD-Transkriptionsfaktor Mec-3 ist bei der Spezifizierung von mechanosensorischen Neuronen in *Caenorhabditis elegans* beteiligt (Way und Chalfie, 1988), während Lin11 für die Entwicklung von spezifischen thermoregulatorischen Neuronen wichtig ist (Hobert et al., 1997; Hobert et al., 1998). Das *Drosophila* LIM-HD-Protein Apterous ist dagegen essentiell bei der Entwicklung der Flügel (Cohen et al., 1992; Diaz-Benjumea und Cohen, 1993; Blair et al., 1994).

In Mäusen führt das Fehlen des Faktors Lhx1 während der Entwicklung zum Verlust der gesamten vorderen Kopfstrukturen (Shawlot und Behringer, 1995). Lhx2 ist wichtig für die Entwicklung der Augen, des Vorderhirns sowie für die Erythropoese (Xu et al., 1993; Porter et al., 1997; Pinto do et al., 1998) und für die Entwicklung der Extremitäten bei Hühnern (Rodriguez-Esteban et al., 1998). Die *Lhx1*- und *Lhx2*-Knockout-Mäuse sind embryonal lethal.

LIM-HD-Gen	Spezies	Biologische Funktion
Isl1	Vertebraten	Erforderlich für die Entwicklung bestimmter Moto- und Interneurone sowie für die Differenzierung der Hypophyse und des Pankreas.
Mec-3	C. elegans	Erforderlich für Entwicklung von spezifischen mechanosensorischen Neuronen.
Lhx1	Vertebraten	Essentiell für die Ausbildung der vorderen Kopfstrukturen.
Lhx2	Vertebraten	Involviert in die Entwicklung der Augen und des Großhirns sowie die Erythropoese.
Lhx3	Vertebraten	Nötig für die Spezifizierungen von Zelltypen der Adenohypophyse und für die Projektionen spezifischer Motoneurone.

Tabelle 2: Biologische Funktionen einiger ausgesuchter LIM-HD-Faktoren

LIM-HD-Proteine spielen wichtige Rollen in der neuronalen Entwicklung.

Lhx3/Plim und Lhx4/Gsh4 sind für die Entwicklung spezifischer Zelltypen des Hypophysenvorderlappens und bei der Spezifizierung von bestimmten Motoneuronen notwendig (Li et al., 1994; Sheng et al., 1996; Sheng et al., 1997; Thor et al., 1999; Sharma et al., 1998). Lhx3 spielt beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Genexpression der Hypophysenhormone (Netchine et al., 2000). Die *Lhx3-* und *Lhx4-* Knockout-Mäuse sind perinatal lethal. Lhx5 organisiert die Morphogenese von Strukturen des Hippocampus (Zhao et al., 1999). Die *Lhx5-*Knockout-Maus ist postnatal lethal. Lhx9 ist wichtig für die murine Gonaden-Entwicklung (Birk et al., 2000). *Isl1-* Knockout-Mäuse sind nicht fähig bestimmte Moto- und Interneurone zu entwickeln,

außerdem können sich bestimmte Hypophysenzellen in diesen Tieren nicht mehr differenzieren (Pfaff et al., 1996; Takuma et al., 1998). Desweiteren ist bei diesen Knockout-Mäusen die Bildung des embryonalen Pankreas-Bindegewebes und dessen Inselzellen beeinträchtigt (Ahlgren et al., 1997). Bei den sogenannten Dreher-Mäusen, bei denen Punktmutationen im *Lmx1a*-Gen vorliegen, kommt es zu Störungen bei der Bildung der Neuralplatte und somit nachfolgend zu Störungen bei der Spezifizierung von dorsalen Zellen des ZNS (Chen et al., 1998; Millonig et al., 2000). Dagegen führen Mutationen im *Lmx1b*-Gen beim Menschen zum Nagel-Patella-Syndrom. Hierbei kommt es u.a. zu Missbildungen mit Fehlen oder deutlicher Rückbildung von Fingerund Zehennägeln (Dreyer et al., 1998; Chen et al., 1998).

1.3.2. LIM-only-Proteine (LMO-Proteine)

LMO-Proteine bestehen nur aus zwei konservierten LIM-Domänen-Strukturen (Abb. 2/ Dawid et al., 1998; Jurata und Gill, 1998). Obwohl sie vorwiegend im Zellkern lokalisiert sind, können sie nicht direkt an DNA binden. Sie vermitteln ihre modulatorische und regulierende Aktivität als molekulare Adaptoren an spezifischen Genen (Jurata und Gill, 1997). LMO-Proteine fördern den Aufbau von Proteinkomplexen, indem sie andere Proteine und Faktoren an diese Komplexe heranführen (Lee und Young, 2000).

LMO-Proteine sind während der Embryogenese von entwicklungsbiologischer Bedeutung (Rabbitts, 1998). LMO-2 ist beispielsweise essentiell für die Erythropoese. Aus diesem Grund sind *LMO-2*-Knockout-Mäuse embryonal lethal (Warren et al., 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LMO-2 auch für die Hämopoese in erwachsenen Tieren erforderlich ist (Yamada et al., 1998). LMO-Proteine wurden außerdem als Onkogene identifiziert (Rabbitts, 1998; Bach, 2000; Lee und Pfaff, 2001). Die Gene von LMO-1 und LMO-2 wurden zuerst aufgrund ihres Vorkommens in Translokationsbruchstellen bei Patienten mit T-Zell-Leukämie entdeckt. Diese Translokationen führen zu einer stark erhöhten Expression von LMO-1 und LMO-2 im Thymus und in T-Zellen, also in Geweben in denen die beiden LMO-Proteine normalerweise nur in geringen Mengen exprimiert werden. Eine Überexpression von LMO-1 oder LMO-2 im Thymus von transgenen Tieren führt darüber hinaus zu einer Transformation der T-Zellen (Larson et al., 1995; Larson et al., 1996).

1.4. Die LIM-Domäne

Die LIM-Domäne ist ein Proteinmotiv das Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt (Abb. 1+2). Diese Wechselwirkungen spielen bei vielen biologischen Vorgängen eine bedeutende Rolle (Schmeichel und Beckerle, 1994; Feuerstein et al., 1994; Arber und Caroni, 1996). Eine LIM-Domäne besteht aus einer Cystein-Histidinreichen Doppel-Zinkfinger-Struktur, bei dem jeder Zinkfinger um ein zentrales Zinkatom aufgebaut ist (Dawid et al., 1998; Jurata und Gill, 1998). Diese Doppel-Zinkfinger-Struktur weist Ähnlichkeiten zur Doppel-C₄-Zinkfinger-Struktur der GATA Zinkfinger-Familie auf (Perez-Alvarado et al., 1994;. Perez-Alvarado et al., 1996). Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Zinkfinger-Typen liegt in der Art der Wechselwirkung mit den jeweiligen Interaktionspartnern. Während die Zinkfinger der GATA-Familie zur DNA-Bindung dienen, vermitteln die Zinkfinger der LIM-Domänen spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen (Schmeichel und Beckerle, 1994; Feuerstein et al., 1994; Arber und Caroni, 1996). LIM-Domänen-Proteine interagieren über ihre LIM-Domänen mit einer Vielzahl von Proteinen und Faktoren in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten. So werden die LIM-Domänen u.a. für die regulierte Aktivierung von spezifischen Genen des Wachstums und die Zelldiffenzierung durch LIM-HD-Faktoren benötigt (German et al., 1992; Bach et al., 1995; Jurata und Gill, 1997). Lhx3/Plim interagiert beispielsweise während der Entwicklung des Hypophysenvorderlappens mit dem POU-Domänen-Transkriptionsfaktor Pit-1. Diese Interaktion führt zu einer koordinierten Aktivierung von Promotor- und Enhancerregionen einiger spezifischer Hypophysen-Gene (Bach et al., 1995; Meier et al., 1999). Darüber hinaus kann die LIM-Domäne von Lhx3/Plim auch direkt mit der Homeodomäne von Isl1 und Isl2 interagieren. Die Interaktionen innerhalb des Lhx3-Isl1/Isl2-Komplexes können durch den LIM-Kofaktor CLIM (auch bekannt als NLI und Ldb) gestört werden (Jurata et al., 1998). Es wurde anschließend gezeigt, dass Lhx3 direkt an CLIM unter Bildung eines tetrameren Komplexes

(2x Lhx3/2x CLIM) binden kann, um auf diese Weise die Differenzierung der V2 Interneurone auszulösen. In Motoneuronen bindet Isl1 unter Bildung eines hexameren Komplexes an den Lhx3-CLIM-Komplex (2x Lhx3/2x CLIM/2x Isl1), wobei Lhx3 durch Isl1 von den C-terminalen LIM-Interaktionsdomänen des CLIM-Kofaktors verdrängt wird und stattdessen an eine Bindungsstelle in der C-terminalen Region von gebunden wird. Durch die Verlagerung von Lhx3 durch spezifische Isl1 Proteininteraktionen innerhalb des Lhx3-CLIM-Isl1-Komplexes wird aus dem Interneuronen-fördernden Faktor ein Motoneuronen-fördernder Faktor. Die zelltypspezifischen Protein-Protein-Interaktionen des LIM-HD-Faktors Lhx3 tragen somit zur Spezifizierung von Moto- und Interneuronen bei (Thaler et al., 2002).



Abb. 3: LIM-Domänen-Interaktionspartner. LIM-HD-Proteine binden über ihre Homeodomänen an die DNA. CLIM/NLI/Ldb-Kofaktoren können an die LIM-Domänen der LIM-HD-Proteine binden und so die durch die LIM-HD-Proteine vermittelte Transkription verstärken. RLIM kann ebenfalls an die LIM-Domänen binden und auf diese Weise die Transkription inhibieren. LMO-Proteine können CLIM-Kofaktoren von ihren LIM-HD-Partnern wegkompetieren. CLIM und RLIM sind somit LIM-Domänen-Interaktionskofaktoren. Sie sind auch in der Lage miteinander zu interagieren. Die LIM-Domänen von LIM-HD- und LMO-Faktoren vermitteln auch die Protein-Protein-Interaktionen mit den Kofaktoren der CLIM-Familie und mit RLIM. Sie dienen somit als Grundstruktur für den Aufbau eines Protein-Komplexes. Für das Zustandekommen dieser Komplexe binden LIM-HD-Proteine über ihre Homeodomänen an die DNA. Die Interaktionen der CLIM-Kofaktoren mit den LIM-HD-Proteinen führt zu einer Verstärkung der Transkriptionsleistung. RLIM inhibiert dagegen die Transkription (Abb. 3).

1.4.1. CLIM-Kofaktor-Familie

Die vorwiegend im Kern lokalisierten LIM-Proteine interagieren mit ihren LIM-Domänen nicht nur mit Transkriptionsfaktoren, sondern auch mit Kofaktoren, die nicht an DNA binden können. Zu diesen Kofaktoren gehört auch die konservierte Familie der CLIM- (cofactors of LIM-HD proteins) Kofaktoren, bestehend aus CLIM1/Ldb2 und CLIM2/Ldb1/NLI/Chip, die mit hoher Affinität an nukleäre LIM-Proteine binden (Agulnick et al., 1996; Jurata et al., 1996; Bach et al., 1997; Morcillo et al., 1997; Visvader et al., 1997). Die unterschiedliche Bezeichnung des Faktors innerhalb der jeweiligen CLIM-Kofaktorgruppe ist damit zu erklären, dass verschiedene Laboratorien unabhängig voneinander die LIM-Domäne-bindenden Kofaktoren isolierten und anschließend als Ldb- (LIM-domain-binding protein) NLI- (nuclear LIM interactor) oder CLIM-Kofaktoren bezeichneten. Es wurde gezeigt, dass CLIM-Kofaktoren homodimerisieren und an alle getesteten LIM-Domänen von LMO- und LIM-HD-Proteinen binden können (Abb. 4/ Jurata et al., 1996; Bach et al., 1997; Jurata et al., 1998; Bach et al., 1999). Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die Bindung von CLIM-Kofaktoren an LIM-Domänen von essentieller Bedeutung für die transkriptionelle und biologische Aktivität von LIM-HD-Proteinen während der Embryogenese ist (Bach et al., 1999; Milan und Cohen, 1999; van Meyel et al., 1999). Im Einklang dazu wurden auch die größten Mengen von CLIM1- und CLIM2-Transkriptionsprodukten in Regionen mit spezifischer LIM-HD-Genexpression gefunden (Jurata et al., 1996; Bach et al., 1997; Visvader et al., 1997; Toyama et al., 1998). Die CLIM-Kofaktoren wurden darüber hinaus auch in Multienzym-



Abb. 4: Darstellung von CLIM-Molekülen. CLIM-Kofaktoren können homodimerisieren und binden mit hoher Affinität an nukleäre LIM-Proteine. CLIM in voller Länge (CLIM FL) enthält eine Dimerisierungs-Domäne (DD), ein Kernlokalisierungs-Signal (NLS) und die N-terminale LIM-Interaktions-Domäne (LID). Beim dominant-negativen CLIM-Molekül (DN-CLIM) fehlt die Dimerisierungs-Domäne.

Komplexen gefunden, die neben den LIM-HD-Faktoren auch LMO-, Pitx-, bHLH- und GATA-Faktoren enthalten (Agulnick et al., 1996; Jurata et al., 1996; Bach et al., 1997; Wadman et al., 1997; Jurata und Gill, 1997; Morcillo et al., 1997; Visvader et al., 1997; Breen et al., 1998; Jurata et al., 1998). So scheint die grundlegende Funktion der CLIM-Kofaktoren in der Bildung von Multienzym-Komplexen der Transkription zu liegen.

In *Drosophila* wurde gezeigt, dass LMO-Proteine *in vivo* mit Apterous-Proteinen um den Kofaktor Chip (*Drosophila* CLIM-Homolog)/CLIM kompetieren und so die biologische Aktivität von LIM-HD-Proteinen hemmen können (Milan et al., 1998; Milan und Cohen, 1999; van Meyel et al., 1999). Aus diesem Grund nimmt man an, dass LMO-Proteine auch in Vertebraten generell in der Lage sind CLIM-Kofaktoren von ihren LIM-HD-Partnern wegzukompetieren und so die Aktivität von LIM-HD-Proteinen zu inhibieren (Abb. 5/ Milan et al., 1998; Zeng et al., 1998; Milan und Cohen, 1999; van Meyel et al., 1998; Zeng et al., 1998; Milan und Cohen, 1999; van Meyel et al., 1999).



Zelldifferenzierung

Abb. 5: Regulation von LIM-HD-Proteinen durch LMO-Proteine und die Kofaktoren CLIM und RLIM. LIM-HD-Proteine übernehmen essentielle Funktionen bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen während der Embryogenese und bei der Organogenese. LIM-HD-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der neuronalen Strukturen. Auf der einen Seite ist die Bindung von CLIM notwendig für die biologische Aktivität von LIM-HD-Proteinen. Auf der anderen Seite können LMO-Proteine mit LIM-HD-Proteinen um CLIM kompetieren und auf diese Weise die Aktivität der LIM-HD-Proteine hemmen. RLIM inhibiert die transkriptionelle Aktivität der LIM-HD-Proteine.

1.4.2. RLIM-Kofaktor

RLIM (<u>R</u>ING finger <u>LIM</u> domain-binding protein) wurde wegen seiner Fähigkeit zur Interaktion mit nukleären LIM-Domänen identifiziert (Bach et al., 1999). RLIM enthält ein RING Zinkfingermotiv. Ein RING Finger besitzt acht streng konservierte Cysteinund Histidinreste. Das RING Fingermotiv ist definiert als: Cys-X₂-Cys-X₉₋₃₉-Cys-X₁₋₃- His-X₂₋₃-Cys/His-X₂-Cys-X₄₋₄₈-Cys-X₂-Cys, wobei X jede Aminosäure sein kann (Freemont, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000). Die Cystein- und Histidinreste vermitteln die Zink-Bindung, wodurch es zur Ausbildung der charakteristischen RING Zinkfinger kommt (Freemont, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000). Diese Formation unterscheidet den RING Finger von den als Tandem angeordneten Zinkfingern. Die RING Finger werden grundsätzlich nahe des N- oder C-Termini gefunden (Freemont, 2000). RLIM enthält einen RING-H2-Zinkfinger, der auf dem C-Terminus des Proteins lokalisiert ist.

Die RLIM-kodierende mRNA wird ubiquitär verbreitet exprimiert und ist während der Entwicklung in der Maus schon früher als Embryonaltag 7.5 (E7.5) nachweisbar. Der Kofaktor RLIM interagiert nicht nur mit nukleären LIM-Domänen-enthaltenden Proteinen, sondern auch mit den Kofaktoren der CLIM-Familie und mit dem Sin3A-Histon-Deacetylase-Korepressor-Komplex (Bach et al., 1999). RLIM wirkt als negativer Koregulator auf die LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktoren und hemmt deren biologische Aktivität während der Embryogenese von Vertebraten (Bach et al., 1999). So inhibiert RLIM bei transienter Kotransfektion die transkriptionelle Aktivität von Lhx3/Plim und Lhx2. Die Rekrutierung des Sin3A-Histon-Deacetylase-Korepressor-Komplexes scheint mit verantwortlich für die Hemmung dieser Transkription zu sein (Bach et al., 1999). Mit in vivo-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die retroviral-vermittelte Überexpression von RLIM im sich entwickelnden Hühner-Flügel zu einem ähnlichen Phänotyp führt wie die Überexpression von dominant-negativen CLIM-Molekülen (DN-CLIM). Der gleiche Phänotyp ist auch bei der Inhibierung von LIM-HD-Proteinen während der Entwicklung der Flügel zu sehen (Bach et al., 1999). In allen Fällen kommt es zu Störungen bei der Entwicklung und Ausbildung distaler Flügelstrukturen.

Zudem konnte RLIM in Patienten mit Nierenkarzinomen nachgewiesen werden (Scanlan et al., 1999). In diesen Tumoren zeigte sich eine veränderte RLIM-Expression. Somit könnte eine veränderte Expression von RLIM für die Entstehung von Tumoren relevant sein.

Über die molekularen Inhibierungsmechanismen und über die biologische Funktion von RLIM ist bisher nicht viel bekannt. Ebenso ist unklar, welche Rolle RLIM/CLIM-

Interakionen dabei spielen und ob die Inhibierungen von LIM-HD-Proteinen durch RLIM direkt oder über CLIM-Kofaktoren geschehen.

1.4.3. Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau

Die Degradation von Proteinen ist nur eine von vielen Aufgaben des Ubiquitins. Ubiquitinierungen spielen darüber hinaus essentielle Rollen in der funktionellen Regulation von eukaryotischen Zellen (Pickart, 2001). So sind Ubiquitinierungen beispielsweise involviert in die Regulation des Zellzyklus, der zellulären Differenzierung, der Endozytose, dem Abbau anomaler Proteine und der Apoptose (Pickart, 2001; Weissman, 2001). Durch die Möglichkeit des schnellen Abbaus einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und regulatorischer Faktoren sind Ubiquitinierungen auch Bestandteil vieler Signal-Transduktionsprozesse (Weissman, 2001). Bei Ubiquitinierungen werden Ubiquitinmonomere kovalent an Proteine gebunden und dadurch markiert. Diese Markierungen können dann zum Abbau der Proteine innerhalb der Zelle durch das 26S-Proteasom führen. Ubiquitin wurde im Laufe der Evolution zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert und besteht aus 76 Aminosäuren (Weissman, 2001).

Die kovalente Bindung des Ubiquitins an die Proteine wird über eine enzymatische Ubiquitin-Kaskade vermittelt (Abb. 6/ Hershko und Ciechanover, 1998; Freemont, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000; Pickart, 2001; Weissman, 2001). Diese Kaskade beginnt mit der Bindung eines Ubiquitins in einem ATP-abhängigen Schritt an das Cystein des aktiven Zentrums eines Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1). Dieses aktivierte Ubiquitin wird anschließend auf einen Cystein-Rest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Die Ubiquitin-Ligasen (E3s) können nun an die E2s und spezifisch an bestimmte Proteine binden. Die E3s vermitteln dann die Bindung eines Ubiquitins auf die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes innerhalb des Substrates, d.h. auf ein spezifisches Protein oder auf ein schon vorhandenes Ubiquitin während einer Polyubiquitinierung. Ein Protein kann an einem oder mehreren Lysinresten durch ein Ubiquitin-Molekül (Monoubiquitinierung), durch eine Kette von Ubiquitinmolekülen (Polyubiquitinierung) oder durch eine Kombination von beiden

Ubiquitinierungsarten modifiziert werden (Pickart, 2001; Weissman, 2001). Das Ubiquitin-Molekül selbst verfügt dabei über sieben konservierte Lysinreste, die alle potentielle Bindungsstellen für andere Ubiquitin-Moleküle darstellen. So wurde für die Lysinreste K¹¹, K²⁹, K⁴⁸ und K⁶³ eine *in vivo*-Ubiquitin-Interaktion nachgewiesen (Weissman, 2001; Hicke, 2001). Monoubiquitinierungen sind dabei bei mindestens drei zellulären Funktionen wichtig, und zwar bei der Histon-Regulation, der Endozytose und der Funktion von Membranproteinen (Weissman, 2001; Hicke, 2001). Diese Monoubiquitinierungen können zu Modifikationen in der Funktion und Lokalisierung von Proteinen führen.

Viele bisher bekannte E3s bewerkstelligen den Ubiquitin-Transfer mit einer von zwei bekannten katalytischen Domänen, der HECT-Domäne oder dem RING-Finger. Die HECT (Homologous to E6-APC Terminus)-Domänen-Familie von E3-Enzymen enthält eine ungefähr 350 Aminosäuren enthaltende HECT-Domäne, die zuerst in E6-AP gefunden wurde (Scheffner et al., 1993). Diese HECT-Domäne enthält ein katalytisches Cystein, welches ein Thioester-Zwischenprodukt mit Ubiquitin eingeht. Anschließend kann das Ubiquitin dann auf das Substrat übertragen werden (Jackson et al., 2000; Pickart, 2001). Viele andere bekannte E3s enthalten einen etwa 70 Aminosäuren langen RING (Really Interesting New Gene)-Finger (Pickart, 2001). Die RING-Finger-Ubiquitin-Ligasen binden beim Ubiquitin-Transfer nicht direkt an Ubiquitin. Sie vermitteln durch eine gleichzeitige enge Bindung an den E2-Ubiquitin-Komplex und an das Substrat-Protein den Transfer des Ubiquitins vom E2 auf das Substrat-Protein. Nachdem das erste Ubiquitin auf das Substrat-Protein übertragen wurde, spielt während einer Polyubiquitinierung die Position der Lysinreste im Ubiquitin eine herausragende Rolle bei der weiteren Prozessierung. Sehr häufig wird das nachfolgende Ubiquitin an den Lys⁴⁸ (K⁴⁸)-Rest des vorherigen Ubiquitins angehängt (Hershko und Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). Die über K⁴⁸-verbundenen Polyubiquitin-Ketten werden vom 26S-Proteasom-Komplex erkannt und das auf diese Weise markierte Protein in einem ATP-abhängigen Prozeß abgebaut (Jackson et al., 2000; Pickart, 2001). Dabei genügen Polyubiquitinketten von vier oder mehr Ubiquitin-Molekülen zur Erkennung und zum Abbau (Weissman, 2001; Hicke, 2001). Die abgebauten Peptide bestehen dann aus ungefähr acht Aminosäuren (Schwartz und Ciechanover, 1999). Die über K⁶³-verbundenen Polyubiquitin-Ketten führen dagegen nicht zum Abbau von Proteinen.

Sie sind wichtig bei der DNA-Reparatur, der Endozytose, der Translationskontrolle oder dem Transport (Weissman, 2001). Der ubiquitinvermittelte Abbau von Proteinen durch das Proteasom ist die bisher am besten analysierte Funktion des Ubiquitins. Die Stabilität von Transkriptionsfaktoren und der transkriptionellen Kofaktoren kann durch Ubiquitinierungen und nachfolgendem proteasomalen Abbau reguliert werden. So werden beispielsweise die BOB.1/OBF.1-Kofaktoren in B-Zell-Linien über diesen Weg abgebaut (Boehm et al., 2001).



Abb. 6: Ubiquitin-Kaskade. Ubiquitin (ub) wird zuerst in einem ATP-abhängigen Schritt durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Die Ubiquitin-Ligasen (E3s) binden an die E2s und vermitteln die spezifische Bindung des Ubiquitins an ein bestimmtes Substrat.

1.5. Gentechnologie

1.5.1. Inaktivierung von Genen im Mausmodel (Mus muculus)

Mäuse sind die Vertebraten der Wahl für klassische genetische Studien. Bei dem Verfahren des sogenannten Gen-Targeting handelt es sich um eine Allelen-Austausch-Technik, mit deren Hilfe Mäuse mit einem bestimmten Genotyp hergestellt werden können. Mit dem Einsatz der Gentechnologie ist es möglich gezielt bestimmte Gene auszuschalten. Es entstehen die sogenannten Knockout-Mäuse, die über gentechnologisch spezifisch mutierte Gene verfügen. Durch diese Technik kann man die komplette Inaktivierung ("Loss-of-function") eines spezifischen Gens erreichen. Dadurch können Funktionen bzw. die Rolle des Gens während der Entwicklung der Maus von Funktionen abgegrenzt werden, die durch andere Faktoren kompensiert werden.

Mit Knockout-Mäusen ist es somit möglich, die Funktion eines spezifischen Gens in der Komplexität eines ganzen Organismus zu erforschen. Dies umfaßt die Rolle des Gens während der Entwicklung (Embryogenese, Ontogenese und Organogenese) sowie dessen Einfluß in Prozessen in adulten Organismen. Die Generierung von Tiermodellen für das Verständnis von Erkrankungen des Menschen wurde ebenfalls durchgeführt. So gehörte die Generierung von Mausmodellen für die zystische Fibrose (Dorin et al., 1992; Snouwaert et al., 1992) zu den ersten Anwendungen der transgenen Technologie. Die Auswirkungen des Fehlens eines Gens lassen sich so während der gesamten Entwicklung eines Organismus analysieren. Gelegentlich ist die Inaktivierung eines bestimmten Gens für die Tiere embryonal oder neonatal lethal. In diesen Fällen wird das Rekombinationskonstrukt mit den üblichen Gen-Targeting-Techniken und der Rekombinationstechnik des Cre/loxP-Systems des Bakteriophagen P1 (Lewandoski, 2001; Kwan, 2002) aufgebaut. Eine andere Möglichkeit die frühe Lethalität der Tiere zu umgehen, ist die Verwendung des von der Hefe abstammenden FLP/FRT-Systems (Rodriguez et al., 2000). Mit Hilfe beider Systeme wird die Mutation auf bestimmte Zelltypen und/oder auf spezifische Zeitpunkte während der Entwicklung begrenzt. Diese Systeme helfen auch bei der Untersuchung von gewebsspezifischer und entwicklungsstadiumspezifischer Genregulation. Ebenso finden diese Systeme Verwendung bei Zellablationsstudien (Borelli et al., 1988). Die Herstellung von Knockout-Mäusen hat wesentlich zum Verständnis der Funktion von Transkriptionsfaktoren beigetragen.

1.5.2. Überexpressionsanalysen im Zebrafisch (Danio rerio)

Zebrafischembryonen gleichen einerseits in vielen Aspekten den Embryonen anderer Vertebraten. Auf der anderen Seite sind sie für Vertebraten vergleichsweise einfach aufgebaut und gut zugänglich für zelluläre und genetische Analysen. Darüber hinaus bietet das Zebrafisch-System weitere Vorteile für genetische Studien. Die adulten Tiere sind klein (3 cm) und die Generationszeit ist kurz (3-4 Monate). Eine einzige Verpaarung erzeugt 10² Nachkommen und die Tiere können nach ein paar Tagen erneut verpaart werden. Die embryonale Entwicklung verläuft sehr schnell. Schon nach 12 hpf (hours post-fertilization) kommt es zur Entwicklung eines für Vertebraten typischen Aufbaus und nach 20 hpf haben viele Zellen damit begonnen, sich morphologisch zu differenzieren. Die Zebrafischembryonen sind fast transparent, da die Eischale sehr lichtdurchlässig und weich ist. Diese Schale kann leicht durch Mikrodissektion entfernt werden, ohne die Embryonen dabei zu stören. Deshalb sind die Embryonen während ihrer Entwicklung zu jedem Zeitpunkt zugänglich für Untersuchungen und Analysen. So sind entwicklungsbiologische Einwirkungen von Mutationen, auch wenn diese zum Tod der Embryonen führen, relativ einfach zu studieren (Kimmel, 1989).

Zebrafische sind bevorzugte Vertebraten für neurobiologische Studien, da ihr Nervensystem relativ einfach aufgebaut und wegen der Tranzparenz während der Entwicklung leicht zugänglich ist. Darüber hinaus handelt es sich beim Zebrafisch um ein exzellentes Tiermodel zur Erforschung der Auswirkungen von ektopisch überexprimierten Molekülen nach Injektion von mRNAs in befruchtete Zebrafischeier. Der große Vorteil liegt darin, dass die zu injiziierenden Eier sehr groß sind und dass die Eier vor allem außerhalb der Elterntiere gentechnisch verändert und anschließend analysiert werden können. Ein Nachteil der ektopischen Überexpression in Zebrafischen liegt im Zeitpunkt der Injektionen. Die Injektionen erfolgen sehr früh in der Entwicklung, so dass es schon aus diesem Grund evtl. nicht zur Entwicklung eines Phänotyps kommt.

1.6. Problemstellung

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, die biologische Regulation von LIM-Proteinen im Zellkern durch ihre assoziierten Kofaktoren aufzuklären. Das Hauptaugenmerk lag auf der Erforschung der Funktionen und Aufgaben, die RLIM während der Entwicklung von Vertebraten bei biologischen Regulations- und Entwicklungsprozessen übernehmen könnte. Eine entwicklungsbiologische Rolle von RLIM konnte bis heute nicht überzeugend gezeigt werden.

Da RLIM einen RING-Zinkfinger enthält und dieses Motiv in Ubiquitin-Protein-Ligasen weitverbreitet zu finden ist (Lorick, 1999), sollte zuerst untersucht werden ob RLIM Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivitäten besitzt. Anschließend sollten die molekularen Mechanismen, in die RLIM involviert ist, aufgeklärt werden. Um einen Einblick in die entwicklungsbiologische Rolle des RLIM-kodierenden *Rnf12*-Gens zu erhalten, sollte eine *Rnf12*-defiziente Maus generiert werden, in welcher der gesamte Leserahmen des *Rnf12*-Gens deletiert wurde.

In *Xenopus* und Huhn führt die Überexpression von DN-CLIM- und RLIM-Molekülen zu ähnlichen phänotypischen Auswirkungen. Durch die ektopische Überexpression von RLIM während der Entwicklung von Zebrafischembryonen sollte der entwicklungsbiologische Einfluß von RLIM untersucht werden. Das Ergebnis sollte mit den bereits bekannten Resultaten der Überexpression eines dominant negativen CLIM-Moleküls (DN-CLIM) in Zebrafischen verglichen werden.

2. Ergebnisse

2.1. Funktionelle Charakterisierung des RLIM-kodierenden *Rnf12*-Gens

Einer der Forschungsschwerpunkte in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ingolf Bach am Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH) liegt in der Suche nach grundlegenden Mechanismen, die die Beziehung zwischen RLIM, CLIM und den LMO-Proteinen während der durch die LIM-HD-Transkriptionsfaktoren vermittelten Regulation der Gen-Transkription erklären. Die Erforschung dieser Mechanismen soll letztlich auch zur Aufklärung der entwicklungsbiologischen Funktion von RLIM sowie der anderen beteiligten Faktoren während der Entwicklung von Vertebraten beitragen.

2.1.1. RLIM als Korepressor der Transkription

Die LIM-Domäne ist ein konserviertes Proteinmotiv, das Protein-Protein-Interaktionen mit der Koaktivatorfamilie CLIM/Ldb/NLI/Chip und dem RING Zinkfingerprotein RLIM vermittelt. Die Wechselwirkungen der CLIM-Kofaktorfamilie sind wichtig für die biologische Aktivität, die durch die LIM-HD-Proteine vermittelt wird. LMO-Proteine wirken dagegen als transkriptionelle Faktoren negativ auf die LIM-HD-Proteine, da sie in der Lage sind, die CLIM-Kofaktoren von LIM-HD-Proteinen durch Kompetition zu entfernen. Bei RLIM handelt es sich um einen Kofaktor, der sowohl mit LIM-Domänen als auch mit CLIM-Kofaktoren wechselwirken kann (Bach et al., 1999). RLIM agiert dabei als Korepressor der Transkription, wobei er die *in vivo*-Aktivitäten von LIM-HD-Proteinen inhibiert, und dies obwohl die CLIM-Kofaktoren mit höherer Affinität an LIM-Domänen binden als RLIM (Ostendorff et al., 2002).

RLIM konnte als eine Ubiquitin-Protein-Ligase identifiziert werden, die fähig ist in Gegenwart des E2-Enzyms UbcH5 sich selbst, CLIM-Kofaktoren und LMO-Proteine zu ubiquitinieren, während LIM-HD-Proteine nicht ubiquitiniert werden (Ostendorff et al.,

2002). Durch die Ubiquitinierung markiert RLIM auf spezifische Weise CLIM-Kofaktoren für den proteolytischen Abbau durch das 26S-Proteasom. Aus diesem Grund führt eine RLIM-Überexpression in der gonadotropen Hypophysenzell-Linie αT3 zum Abbau der endogenen CLIM-Proteine im Zellkern, während gegen RLIM gerichtete "small interfering" RNA (siRNA) im Zuge eines RNA "interference" (RNAi)-Experiments für eine Zunahme von CLIM auf Proteinebene sorgt. Darüber hinaus konnte bei Vorhandensein von LIM-Domänen-assoziierten CLIM-Kofaktoren eine ubiquitinabhängige Verbindung zwischen RLIM und LIM-HD-Proteinen dargelegt



Abb. 7: Regulationsmodell von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren durch die Kofaktoren CLIM und RLIM. RLIM ist eine Ubiquitin-Protein-Ligase, die fähig ist sich selbst, CLIM-Kofaktoren und LMO-Proteine zu ubiquitinieren. RLIM markiert CLIM und sich selbst für den proteolytischen Abbau durch das 26S-Proteasom. Die schwarzen Pfeile zeigen Protein-Protein-Interaktionen, während die roten Pfeile Ubiquitinierungsaktivität darstellen. Ubiquitinierte Proteine sind mit roten Ubiquitinketten (Ub) dargestellt.

werden. RLIM ist dabei in der Lage an LIM-HD-Proteinen gebundene CLIM-Kofaktoren selektiv zu markieren, diese CLIM-Kofaktoren dem proteasomalen Abbau zuzuführen und somit die durch LIM-HD-Proteine vermittelte Genexpression zu regulieren. Durch den selektiven Abbau von CLIM-Molekülen sind die LIM-HD-Proteine bereit Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Molekülen einzugehen, was auf einen ubiquitinierungsabhängigen Kofaktoraustausch hinweist (Ostendorff et al., 2002). Diese Ergebnisse führen zu einem Modell zur Regulierung von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren durch die Kofaktoren CLIM und RLIM (Abb. 7). RLIM ist also für eine Ubiquitinierung von CLIM und LMO-Proteinen verantwortlich, nicht aber für die Ubiquitinierung von LIM-HD-Proteinen.

2.2. Ektopische Überexpression von RLIM während der frühen Zebrafischentwicklung

Nach der Identifizierung von RLIM als eine LIM-Domänen-bindende Ubiquitin-Protein-Ligase, stellte sich die Frage nach der entwicklungsbiologischen Rolle von RLIM umso stärker, da Ubiquitinierungen essentielle Funktionen bei Regulationsabläufen im Zellkern wahrnehmen (Pickart, 2001).

Die ektopische Überexpression von RLIM während der frühen Zebrafischentwicklung führte zu keinem detektierbaren Phänotyp (persönliche Mitteilung von Dr. T. Becker). Es gibt viele Möglichkeiten, die diese Beobachtung erklären könnten. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass das Ergebnis auf ein Problem der Proteinstabilität von RLIM zurückzuführen war. Aus diesem Grund sollte zuerst die Frage nach der Stabilität der von Ubiquitin-Ligasen für den proteolytischen Abbau markierten Proteine während der Entwicklung beantwortet werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die frühe Zebrafischentwicklung als Modellsystem verwendet. Dieses *in vivo*-System gestattet die Analyse und den Vergleich von Proteinstabilitäten während der frühen Entwicklung von Zebrafischembryonen.

Die für die Analyse speziell entwickelte Methode beinhaltet die ektopische Überexpression Myc-Epitop-markierter Proteine. Die Überexpression wird über mRNA-Injektionen in den Dottersack von Zebrafischembryonen im 1-4 Zellstadium initiiert (Becker et al., 2003). Die Kontrolle der ektopischen Überexpression während der Zebrafischentwicklung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt (Becker et al., 2003). Die mRNA-Injektionen in Zebrafischembryonen und die anschließenden immunhistochemischen Färbungen wurden in einer Kooperation mit Dr. Thomas Becker und Dr. Catherina Becker (ZMNH) durchgeführt.

2.2.1. Proteinstabilität von RLIM während der Zebrafischembryogenese

Für diesen Zweck wurde *in vitro*-transkribierte mRNA hergestellt. Hierfür wurde ein pCS2-MT-Plasmid, welches die Myc-Epitop-markierte kodierende RLIM-Sequenz in voller Länge (Myc-RLIM) und als Kontrolle ein pCS2-MT-NLS-Plasmid (NLS-Myc), welches ein Kernlokalisations-Signal (NLS) enthielt, verwendet (Abb. 8). In den Zebrafischembryonen wurden somit Fusionsproteine überexprimiert, die aus der NLS bzw. der nukleären Ubiquitin-Ligase RLIM, welche beide mit einer sechsfachen Myc-Epitop-Markierung verbunden waren, bestanden. Da in beiden Fällen der pCS2-Basisvektor verwendet wurde, hatten alle injizierten mRNAs identische 5'-und 3'-nichttranslatierte Regionen. Aus diesem Grund war es auch möglich, für die spätere Detektion der injizierten mRNAs mittels RT-PCR das gleiche Primerpaar zu benutzen (Abb. 8). Allerdings war durch die Gegenwart der NLS-Sequenz innerhalb des amplifizierten Fragmentes vom NLS-Myc das PCR-Produkt im Vergleich zu den 255 bp des Myc-RLIM-Fragmentes mit 288 bp länger. Nachdem die Myc-RLIM- und NLS-Myc-kodierenden mRNAs hergestellt waren, wurden deren Konzentrationen gemessen, um gleiche mRNA-Mengen für die Injektionen einsetzen zu können.


Abb. 8: Schema der Plasmide für die ektopische Überexpression in Zebrafischen. Die Plasmide wurden für die *in vitro*-mRNA-Transkription verwendet. Die mRNAs wurden dann in Zebrafisch-Embryonen im 1-4 Zellstadium injiziert. Beide cDNAs wurden in den gleichen pCS2-Vektor kloniert und enthielten somit identische 5'- und 3'-nichttranslatierte Sequenzen. Das Primerpaar für die PCR-Amplifikationen war identisch für NLS-Myc und Myc-RLIM und ist mit Pfeilen dargestellt. Die für die sechs Myc-Markierungen kodierende Region ist mit weißen Kästen dargestellt, die NLS ist durch einen schwarzen Kasten gekennzeichnet, während der RING-Finger durch einen roten Kasten und das SV40 Polyadenylierungssignal durch einen grauen Kasten dargestellt ist. Das ATG-Startcodon, das TGA-Stopcodon und die RLIM-kodierende Region sind angegeben.

Um zu prüfen, ob ähnliche mRNA-Mengen injiziert wurden, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die RNA aus vier injizierten Embryonen nach 5 hpf (hours post-fertilization) isoliert und anschließend eine RT-PCR mit 13, 18, 23 und 28 Zyklen durchgeführt (Abb. 9 A). Die ungefähr gleich starken Banden der RT-PCR-Reaktion zeigen, dass ähnliche mRNA-Mengen injiziert worden waren. Um die Stabilität der injizierten mRNAs zu kontrollieren, wurde ein ähnliches RT-PCR-Experiment durchgeführt. Nur wurde hierfür RNA verwendet, die nach 24 hpf isoliert worden war. Wegen der generellen mRNA-Degradierung über die Zeit, wurde die Anzahl der Amplifikationszyklen auf 15, 20, 25 und 30 erhöht. Nach 24 h können vergleichbare Mengen von NLS-Myc- und Myc-RLIM-kodierender mRNA detektiert werden (Abb. 9A). Als weitere Kontrolle wurde ein RT-PCR-Experiment mit RNA von vier nichtinjizierten Embryonen durchgeführt (Abb. 9 A). Sie zeigen, dass die RT-PCR-Experimente nur zur Amplifikation des injizierten Materials führten. Um den





Abb. 9: In Zebrafischembryonen injizierte mRNAs zeigen ähnliche Stabilitäten. (A) Die RNAs von NLS-Myc-injizierten, Myc-RLIM-injizierten und nichtinjizierten Embryonen wurden nach 5 oder 24 hpf präpariert und in eine RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Das NLS-Myc-Plasmid enthielt das Kernlokalisations-Signal (NLS) stromaufwärts von den sechs Myc-Markierungen, das amplifizierte Fragment war deshalb 288 bp lang im Vergleich zu den 255 bp des Myc-RLIM. Dabei wurden 13, 18, 23 und 28 Zyklen für die 5 hpf cDNA und 15, 20, 25 und 30 Zyklen für die 24 hpf cDNA verwendet. Die erwarteten Größen der PCR-Fragmente von NLS-Myc und Myc-RLIM sind durch Pfeile angezeigt. (B) Kontroll-PCR-Reaktion mit derselben cDNA wie unter A, aber unter der Verwendung eines Primerpaares, das ein 429 bp-Fragment der Zebrafisch β -Aktin cDNA amplifizierte. Als Kontrolle wurde eine Reaktion ohne cDNA durchgeführt. Der Pfeil zeigt die erwartete Größe des β -Aktin-Fragmentes an. In A und B stammen alle Banden von demselben Gel, sie wurden zur besseren Präsentation neu zusammengestellt. RNA-Input in die PCR-Reaktionen abschätzen zu können, wurde eine PCR-Reaktion mit derselben cDNA durchgeführt, allerdings verwendete ich spezifische Primer, die ein 429 bp-Fragment des Zebrafisch β -Aktins amplifizieren (Abb. 9 B).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Amplifikationen spezifisch und die eingesetzte cDNA Menge ungefähr gleich waren (Abb.: 9 A+B). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass während der ersten 24 h der Zebrafischentwicklung die Stabilitäten der injizierten mRNAs (NLS-Myc und Myc-RLIM) ähnlich sind (Abb. 9 A+B).

Die immunhistochemischen Experimente wurden mit einem FITC-konjugierten Myc-Antikörper an Embryonen durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Expression der Proteine, die aufgrund der mRNA-Injektionen erfolgte, während der Entwicklung der Embryonen verfolgt werden. Nach 5 hpf ist die Proteindetektion von NLS-Myc und Myc-RLIM sehr ähnlich (Abb. 10 A+B). Dies zeigt, dass es auf der Ebene der mRNA-Translation keine gravierenden Unterschiede gab. Nach 24 hpf kann ein starker Unterschied bei der Proteindetektion zwischen NLS-Myc und Myc-RLIM festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt bestanden die Embryonen schon aus wesentlich mehr Zellen, die aber eine geringere Konzentration der anfänglich injizierten mRNAs enthielten. Trotzdem können große Mengen vom NLS-Myc-Protein detektiert werden (Abb. 10 C+D), während keine oder nur sehr geringe Mengen des Myc-RLIM-Proteins festgestellt werden können (Abb. 10 E+F). Das Experiment wurde dreimal wiederholt und erbrachte jedesmal das gleiche Resultat. Um diese Ergebnisse besser zu Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür quantifizieren, wurden wurden Zellextrakte von Zebrafischembryonen verwendet, die zuvor mit NLS-Myc- oder Myc-RLIM-kodierender mRNA injiziert worden waren. Auch mit Hilfe der Western-Blot-Analyse ist das NLS-Myc-Protein nach 24 hfp eindeutig nachweisbar (Abb. 10 G), während das Myc-RLIM-Protein nicht detektiert werden kann (Abb. 10 H). Dagegen sind nach 5 hpf beide Proteine deutlich nachzuweisen. Das NLS-Myc-Protein zeigt dabei ein Molekulargewicht von 18 kD, während Myc-RLIM eine Größe von 60 kD zeigt. Als Ladekontrolle diente die Hybridisierung der Blots mit einem Tubulin-Antiserum. Die Tubulin-Kontrolle zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden.



Abb. 10: Myc-Epitop-markierte Proteine zeigen während der Zebrafischentwicklung unterschiedliche Proteinstabilitäten. In Zebrafischembryonen wurde im 1-4 Zellstadium mRNA (NLS-Myc und Myc-RLIM) injiziert. Anschließend wurden die Embryonen nach 5 hpf (A, B) und 24 hpf (C-F) mit dem Myc-Antikörper angefärbt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. (A) Das Bild zeigt die Region eines Zebrafischembryos 5 hpf nach einer Injektion mit NLS-Myc-mRNA. (B) 5 hpf-Embryo nach Injektion mit Myc-RLIM-mRNA. (C). Rumpfregion eines 24 hpf-Embryos nach Injektion mit NLS-Myc-mRNA. (D) Überblick über einen ganzen 24 hpf-Embryo nach Injektion mit NLS-Myc-mRNA. Der Schwanz befindet sich dabei in der linken oberen Ecke und der Kopf in der rechten unteren Ecke. Der Dottersack wurde vorher teilweise entfernt. (E) Rumpfregion eines 24 hpf-Embryos nach Injektion mit Myc-RLIM-mRNA. (F) Überblick über einen ganzen 24 hpf-Zebrafischembryo nach Injektion mit Myc-RLIM-mRNA. Hier zeigt sich der deutliche Unterschied in der Proteinstabilität zwischen Myc-RLIM- und NLS-Myc-Proteinen in 24 hpf-Zebrafischembryonen. (G) Western-Blots von Ganzembryonen-Zellextrakten aus nichtinjizierten und NLS-Myc-mRNA injizierten Zebrafischembryonen nach 5 oder 24 hpf wurden mit einem polyklonalen Myc-Antiserum inkubiert. Als Ladekontrolle diente derselbe Blot, der mit einem Tubulin-Antiserum hybridisiert wurde. (H) Western-Blots von Embryonen-Zellextrakten aus nichtinjizierten und Myc-RLIMmRNA injizierten Zebrafisch-Embryonen nach 5 oder 24 hpf wurden mit einem polyklonalen Myc-Antiserum inkubiert. Derselbe Blot diente erneut als Ladekontrolle, der wieder mit einem Tubulin-Antiserum hybridisiert wurde.

Obwohl die absoluten Proteinmengen in den Embryonen schwer zu bestimmen sind, zeigen die Ergebnisse dieser Methode doch, dass die relativen Proteinmengen von Myc-RLIM nach 24 hpf eindeutig niedriger sind als die der NLS-Myc-Kontrolle. Ich denke daher, dass diese Methode auch generell eingesetzt werden kann, um relative Stabilitäten von Proteinen zu vergleichen, so z.B. um Instabilitätsdomänen in Proteinen zu identifizieren.

2.3. Isolierung und Charakterisierung des RLIM-kodierenden *Rnf12*-Gens

An der Isolierung und genomischen Charakterisierung des murinen RLIM-kodierenden *Rnf12*-Gens war ich vor allem im Bereich der Durchführung der molekularbiologischen bzw. gentechnologischen Methoden maßgeblich beteiligt (Ostendorff et al., 2000). Im Zuge dieser Charakterisierung wurde die gesamte genomische Sequenz von *Rnf12* isoliert. Aufbauend auf diese Arbeiten konnten die Intron-Exon-Strukturen bestimmt sowie der proximale Promotorbereich und das Transkriptionsstartsignal analysiert werden.

2.3.1. Genomische Organisation von Rnf12

Für die Isolierung der Sequenzen des RLIM-kodierenden *Rnf12*-Gens wurde eine murine genomische Lambda (λ)-Bibliothek mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden durchgemustert. Als Sonden dienten hierfür eine RLIM-cDNA in voller Länge und ein 600 bp-RLIM-*Sac I*-Fragment. Aus der verwendeten pGEM11-Bibliothek (Promega) konnten drei sich überlappende λ -Klone (G1.b, G12 und G18) isoliert werden, die das gesamte *Rnf12*-Gen darstellen. Diese drei Klone enthalten Inserts mit genomischen Sequenzen von 17 (G1.b), 16 (G12), und 14.5 (G18) kb Länge (Abb. 11 B). Zur besseren Handhabung wurden die genomischen Inserts anschließend mit dem Restriktionsenzym *Xho I* aus den λ -Klonen herausgeschnitten und die daraus erhaltenen Fragmente in Bluescript-Vektoren (Stratagene) subkloniert. Solche, in dieser Weise subklonierten Bluescript-Vektoren, konnten nun für Restriktions- und Sequenzierungsanalysen herangezogen werden. Wir konnten darlegen, dass sich das Rnf12-Gen auf über 20 kb des murinen Genoms erstreckt. Die darauf folgenden Sequenzierungsuntersuchungen zeigen, dass das Rnfl2-Gen aus mindestens fünf Exons besteht, und zwar Exon 1 (Position 1-208), Exon 2 (Position 209-270), Exon 3 (Position 271-460), Exon 4 (Position 461-44) sowie Exon 5 (Position 545-mindestens 2230), welche durch mindestens vier Introns unterbrochen werden (Abb. 11 A). Die bei diesen Sequenzanalysen untersuchten Intron-Exon-Übergänge zeigen bei allen vier analysierten Introns die GT-Spleiß-Spender- und GA-Spleiß-Akzeptor-Konsensussequenzen (Ostendorff et al., 2000). Die ersten beiden Introns befinden sich in der 5'-nichtkodierenden Region und haben eine Länge von 1.8 bzw. 12 kb. Das dritte und vierte Intron befinden sich dagegen in der N-terminalen kodierenden Region des Rnf12-Gens und besitzen eine Länge von 1.0 bzw. 1.1 kb. Die verbleibenden 1.5 kb der C-terminalen kodierenden Sequenz sind nicht durch Introns unterbrochen. Die Intron-Exon-Struktur innerhalb der 3'-nichttranslatierten Region von Rnf12 wurde nicht weiter untersucht.

Auch die ersten beiden Exons befinden sich auf dem Hauptanteil der 5'-nichtkodierenden Region. Das ATG-Translationsstartsignal befindet sich dagegen im dritten Exon. Das Exon 5 enthält den Hauptanteil der für RLIM-kodierenden Sequenz einschließlich des Kernlokalisierungs-Signals (NLS), des RING-H2-Zinkfingers und des TAA-Stopcodons.

Abb. 11 (nächste Seite): Genomische Organisation des RLIM-kodierenden *Rnf12*-Gens. (A) Das *Rnf12*-Gen erstreckt sich auf über 20 kb des murinen Genoms. Das Gen besteht aus mindestens fünf Exons, welche durch vier Introns unterbrochen werden. Die Exons sind als schwarze Kästen dargestellt. Die genomische Struktur der 3'-nichttranslatierten Region wurde nicht untersucht und ist deshalb als grauer Kasten dargestellt. (B) Drei sich überlappende λ -Klone (G1.b, G12 und G18), die das gesamte *Rnf12*-Gen darstellen, konnten aus einer murinen pGEM11- λ -Bibliothek isoliert werden. Die dargestellten Inserts der λ -Klone wurden herausgeschnitten und die daraus erhaltenen Fragmente in Bluescript-Vektoren subkloniert.



Im Rahmen einer Kooperation mit den Gruppen von Prof. Lichter (Heidelberg) und Prof. Jenkins (Bethesda, MD) konnte das *Rnf12*-Gen der zentralen Region des murinen und humanen X-Chromosoms zugeordnet werden (Ostendorff et al., 2000).

Die genomische Charakterisierung des *Rnf12*-Gens, insbesondere die Sequenzierungsstudien und die Analyse der Exon-Intron-Struktur, wurde im weiteren Verlauf bei der *in vivo*-Analyse der biologischen Funktion von RLIM genutzt. Durch diese Informationen wurde es möglich Rekombinationsvektoren zu konstruieren, mit deren Hilfe das *Rnf12*-Gen durch homologe Rekombination inaktiviert werden konnte.

2.3.2. Bestimmung des Rnf12-Transkriptionsstarts mittels 5'-RACE

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des *Rnf12*-Gens wurde die 5'-RACE (<u>Rapid Amplification of cDNA Ends</u>) verwendet. Für diese 5'-RACE wurden Gesamt-RNA von Embryonen der Stadien E9.5 und E13.5 sowie verschiedene genspezifische Antisense Primer (GSP), die in der Lage sind an RLIM-kodierenden und 5'-nichtkodierenden Sequenzen zu binden, verwendet. Die genspezifischen Primer waren in diesem Fall RACE1, TSU und ASD.



Abb. 12: Bestimmung des *Rnf12***-Transkriptionsstarts.** Der *Rnf12*-Transkriptionsstart wurde mit der 5'-RACE-Methode analysiert. Nach der Sequenzierung der 5'-RACE-PCR-Produkte zeigte sich eine 24 Nukleotide umfassende Transkriptionsstartregion. Die umrahmten Nukleotide stellen diese Region dar, während die Pfeile das 5'-Ende mindestens eines 5'-RACE-Produkts wiederspiegeln.

Im Laufe der Analyse wurden zwei unterschiedliche Reaktionsserien durchgeführt. Die 5'-RACE-PCR-Produkte wurden anschließend repräsentativ sequenziert und analysiert. Bei der Begutachtung der Ergebnisse konnte kein einheitlicher Transkriptionsstartpunkt identifiziert werden. Es zeigt sich vielmehr eine Transkriptionsstartregion, welche sich ungefähr 300 Nukleotide stromaufwärts des Translationsstartpunktes befindet (Abb. 12). Diese Region besteht aus einer 24 Nukleotide umfassenden Einheit, die dabei allerdings eine YYAN(T/A)YY-Initiator-Konsensussequenz enthält (Smale und Baltimore, 1989). Das erste Nukleotid vom längsten 5'-RACE-Produkt wurde als Position +1 für den Transkriptionsstart festgelegt.

2.3.3. Charakterisierung der Rnf12- Promotorregion

Die Daten der Sequenzierungsanalysen wurden desweiteren für die Untersuchung der *Rnf12*-Promotorregion verwendet. Um die Erkennungs-Konsensussequenzen der Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, wurden die Sequenzierungsdaten stromaufwärts vom *Rnf12*- Gen benötigt (Ostendorff et al., 2000).

Die 5'-stromaufwärts gelegene Region des *Rnf12*-Gens enthält weder die typische TATA-Box noch eine CAAT-Box. Stattdessen enthält die Promotorregion zwei Sp1-Bindungsstellen, die oft in TATA-Box-losen Promotoren zu finden sind (Smale, 1997). Desweiteren wurden konservierte Bindungsstellen für die "Krüppel-like"-Transkriptionsfaktoren der Säugetiere entdeckt (Philipsen und Suske, 1999; Turner und Crossley, 1999) sowie für die nachstehenden Transkriptionsfaktoren: RBP-J (Jarriault et al., 1995), CREB/CREM (De Cesare et al., 1999; Fimia et al., 1999), Zen 1 und Zen 2 (Rushlow et al., 1987; Hirsch et al., 1991), PU.1/Spi-1 (Gauthier et al., 1993; Scott et al., 1994), GATA (Orkin, 1998), Sox (Wegner, 1999) und C/EBPα (Umek et al., 1991). Die Promotorsequenzanalyse erfolgte mit TESS: Transcription Element Search Software aus dem WWW (URL: http://www.cbil.upenn.edu/tess).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde mit Hilfe von transienten Kotransfektionen untersucht, ob die mit den Bindestellen korrespondierenden Transkriptionsfaktoren tatsächlich in der Lage sind den *Rnf12*-Promotor zu aktivieren. Hierfür wurde die genomische Region des *Rnf12*-Gens von Position –667 bis zur Transkriptionsstartstelle

vor ein Luziferase-Reportergen in einen pGL2-Einheitsvektor kloniert. Das Promotor-Konstrukt wurde dann mit den verschiedenen Expressionsvektoren der oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren in Hela- und CHO K1-Zellen kotransfiziert und die Luziferase-Aktivität gemessen (Ostendorff et al., 2000). Die Ergebnisse zeigen, dass einige der oben aufgeführten Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Sox, RBP-J und die "Krüppel-like"-Transkriptionsfaktoren der Säugetiere, in der Lage sind den *Rnf12*-Promotor in signifikant erhöhtem Maße zu aktivieren. Allerdings kommt es nach der Kotransfektion von verschiedenen Kombinationen der aufgeführten Transkriptionsfaktoren zu keiner synergistischen Aktivierung des *Rnf12*-Promotors.

2.3.4. Isolierung und Analyse von humanem RLIM

Die Sequenz einer humanen RLIM cDNA wurde bereits veröffentlicht (Scanlan et al., 1999) und zeigt dabei eine starke Homologie zum RLIM von Maus und Huhn. Dem offenen Leserahmen dieser RLIM cDNA fehlen allerdings im Vergleich zu den Sequenzen von Maus und Huhn die ersten 145 N-terminalen Aminosäuren. Um dieses Ergebnis näher zu untersuchen, isolierten und analysierten wir ebenfalls eine humane RLIM cDNA. Für die Isolierung dieser RLIM cDNA amplifizierten wir eine humane, von Hela-Zellen abgeleitete, cDNA-Bank mit RLIM-spezifischen Primern mittels PCR. Die Sequenzierung der erhaltenen Fragmente zeigt auf Proteinebene über die gesamte Länge eine sehr starke Homologie des humanen RLIM mit den RLIM-Proteinen von Maus, Huhn und Frosch (Abb. 13). Eine genaue Analyse zeigt, dass unserem RLIM-Klon, im Vergleich zu den bereits veröffentlichten Sequenzdaten, zwei Nukleotide auf den Positionen 574 und 613 fehlen. Die Abwesenheit dieser beiden Nukleotide führt zur Veränderung des offenen Leserahmens und damit zur Verwendung eines weiter stromaufwärts gelegenen ATG-Startcodons. Das Ergebnis ist ein am N-Terminus verlängertes Protein, welches über die gesamte Länge stark homolog zu den RLIM-Proteinen von Maus, Huhn und Frosch ist. So sind die humanen RLIM-Protein-Sequenzen zu 89 % identisch mit den Sequenzen der Maus und zu 85 % bzw. 81 % identisch mit den Protein-Sequenzen von Huhn bzw. Frosch.



Abb. 13: Das RLIM-Protein ist stark konserviert vom Menschen bis zum Frosch. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der RLIM-Protein-Sequenzen von Mensch (*Homo sapiens*, Ostendorff et al., 2000), Maus (*Mus musculus*, Bach et al., 1999), Huhn (*Gallus gallus*, Bach et al., 1999) und Frosch (*Xenopus laevis*, Hiratani et al., 2003).

2.4. Generierung einer Knockout-Maus

Um die Funktion von RLIM während der Entwicklung von Organismen zu untersuchen, wurde zuerst versucht eine RLIM-defiziente Knockout-Maus zu generieren. Die genomischen Daten von RLIM (siehe 2.3.1.) waren dabei die Voraussetzung für die Konstruktion des Targeting-Vektors.

2.4.1. Aufbau des Rekombinationskonstruktes für eine RLIM-defiziente Maus

Das Rekombinationskonstrukt wurde so aufgebaut, dass es zum Austausch des kompletten RLIM-kodierenden *Rnf12*-Gens, inklusive des Start- und Stopcodons, durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette (NEO) führen sollte (Abb. 14)

Die Inserts der subklonierten λ -Klone (siehe 2.3.1.) wurden deshalb für weitere umfangreiche Sequenzierungsarbeiten und die Erstellung einer Restriktionskarte die verwendet. Für stromaufwärts gelegenen homologen Sequenzen der 5'-Homologieflanke des Rnf12-Gens wurden Sequenzinformationen des λ -Klons G1.b benutzt. Mit Hilfe dieser Daten konnten Oligonukleotid-Primer entworfen werden, die im Rahmen einer PCR für die Amplifikation der 5'-Homologieflanken-Sequenzen eingesetzt wurden. Als Matrize dienten hierbei erneut die genomischen Rnf12-Sequenzen des G1.b-Klons. Die Primer wiesen hierbei folgende Besonderheit auf: an ihre jeweiligen 5'-Enden wurden künstliche Restriktionsstellen eingeführt. Diese Schnittstellen waren notwendig, um das PCR-Fragment anschließend in den basalen Rekombinationsvektor pTV-O klonieren zu können. Bei der 5'-Homologieflanke enthielten die Primer eine Not I (5')-, bzw. eine Xho I (3')-Schnittstelle. Mit den Primern KO-5-5'-Not und KO-5-3'-Xho wurde dann ein 4.3 kb Not I/Xho I (5')-Fragment amplifiziert, das nach der Restriktion mit den jeweiligen Enzymen in eine passende Stelle der multiplen Klonierungsregion des basalen Austauschvektors pTV-O, der für diese Zwecke eine von zwei Poly-Linkern flankierte NEO-Kassette enthält, (bereitgestellt von Dr. Dieter Riethmacher) kloniert wurde. Das Fragment endete dabei direkt vor dem ATG-Translationsstartcodon. Durch eine Restriktionsanalyse wurde sichergestellt, dass die künstlich eingeführten Restriktionsstellen der beiden Amplifikate nicht noch einmal in den Sequenzen der Homologieflanken vorkamen.

Auf die gleiche Weise wurde die 3'-Homologieflanke konstruiert. Auch hier dienten die Sequenzdaten des λ -Klons G1.b zur Entwicklung von Primern zur Amplifikation von homologen Sequenzen in der 3'-nichttranslatierten Region. Bei dieser 3'-Homologieflanke enthielten die Primer allerdings eine *Bam HI* (5')-, bzw. eine *Sal I* (3')-Schnittstelle. Mit den Primern KO-3-5'-BamHI und KO-3-3'-SalI wurde dann ein 3.8 kb *Bam HI/Sal I* (3')-Fragment amplifiziert, das ebenfalls nach der Restriktion mit den jeweiligen Enzymen in die passende 3'-Stelle der multiplen Klonierungsregion des pTV-O-Vektors kloniert wurde. Die 3'-Homologieflanke begann direkt nach dem TAA-Stopcodon. Das Konstrukt war letztendlich über eine Länge von 8.1 kb homolog zu RLIM. Der modifizierte pTV-O-Vektor enthielt neben der von den homologen Sequenzen flankierten NEO-Kassette ebenfalls noch das Thymidinkinase-Gen für die Doppelselektion. Da die Rekombinationshäufigkeit von linearisierten Rekombinations-Konstrukten mit freiem 5'-Ende höher ist als bei Konstrukten mit freiem 3'-Ende (Hasty et al, 1991b), wurde der Rekombinationsvektor am 5'-Ende mit *Not I* geschnitten.

Abb. 14 (nächste Seite): Gen-Targeting am Rnf12-Gen mit einer kompletten Knockout-Methode. (A) Genomische Organisation des RLIM-kodierenden Rnf12-Gens. Das Rnf12-Gen besteht aus mindestens fünf Exons, die durch vier Introns unterbrochen werden. Die kleinen schwarzen Balken repräsentieren die externen 5'- und 3'-Sonden, die für die Southernbenötigt wurden. Finales Rekombinationskonstrukt Hybridisierung **(B)** und Klonierungsstrategie: Der Vektor ersetzt das komplette RLIM kodierende Rnf12-Gen, einschließlich des Start- und Stopcodons, durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette (NEO). Die 5'-Homologieflanke stellt ein 4.3 kb Not I/Xho I -Fragment flankierender homologer genomischer Sequenzen dar, während das 3.8 kb Bam HI/Sal I -Fragment, die auf der 3'-Seite gelegene, homologe genomische Sequenz der 3'-Homologieflanke repräsentiert. Das Thymidinkinase-Gen (TK) befindet sich auf der nicht-homologen 3'-Region des Vektors. Das finale Rekombinationskonstrukt wurde mit dem Restriktionsenzym Not I linearisiert. Der aufgereinigte Vektor wurde anschließend in ES-Zellen elektroporiert. (C) Homolog rekombiniertes Rnf12-Allel: Ausgewählte Restriktionsstellen sind angezeigt. Die Exons sind als schwarze Kästen dargestellt. Transfizierte Zellen wurden einer Doppelselektion unterworfen. Resistente ES-Zell-Klone wurden zur Überprüfung der gezielten Deletion des RLIM-Gens durch homologe Rekombination mit der Southern-Hybridisierung analysiert.



Der auf diese Weise präparierte Rekombinationsvektor wurde für die anschließende Elektroporation der pluripotenten ES-Zellen verwendet.

2.4.2. Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Die Elektroporation des Rekombinations-Konstruktes erfolgte in 129/Sv R1-ES-Zellen. Sie wurde mit 10^7 ES-Zellen und 20 μ g linearisiertem und aufgereinigtem Rekombinationsvektor in einem totalen Volumen von 800 µl durchgeführt. Die elektroporierten ES-Zellen wurden anschließend auf Mitomycin-behandelten Feeder-Zellen ausgesät und für 10-12 Tage unter selektiven Bedingungen gehalten. Die Doppelselektion der rekombinanten ES-Zellen erfolgte mit Geneticin und Gancyclovir. Die resistenten ES-Zell-Klone wurden anschließend einzelnen gepickt und separat in weitervermehrt. Da die nicht-homologen 96-Lochplatten Rekombinationen 100-1000 mal häufiger auftreten als korrekte homologe Rekombinationen, mussten die ES-Zell-Klone anschließend auf das Vorhandensein der homologen Rekombination getestet werden. Nur die Tatsache, dass ES-Zell-Klone die positive Selektion überlebten, reichte nicht aus, um die Deletion des Rnf12-Gens zu belegen.

2.4.3. Nachweis der homologen Rekombination

Die resistenten ES-Zellklone wurden auf die gezielte Zerstörung des RLIM-Gens durch homologe Rekombination getestet. Der Nachweis wurde mit der Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde die genomische ES-Zell-DNA mit Restriktionsenzymen verdaut, auf eine Membran transferiert und mit spezifischen radioaktiv-markierten Sonden hybridisiert (Abb. 15).



Abb. 15: Southern-Blot-Analyse der resistenten ES-Zell-Klone der kompletten Knockout-Methode. Genomische DNA von ES-Zell-Klonen wurde isoliert und mit den Enzymkombinationen *Ava I/Xho I* und *Bam HI/Ava I* geschnitten. Für die Southern-Blot-Analyse wurden spezifische externe 5'- und 3'-Sonden verwendet. Korrekt rekombinierte ES-Zellen haben kürzere Banden. Die 5'-Sonde identifiziert ein 8.5 kb *Ava I/Xho I*-Fragment des rekombinierten Allels (WT: 11.3 kb), während mit der 3'-Sonde das 7.3 kb *Bam HI/Ava I*-Fragment des mutierten Allels detektiert wird (WT: 8.5 kb). Korrekt rekombinierte ES-Zell-Klone wurden in Blastozysten injiziert. 5'-Sonde: Spur 1, WT; 2, korrekt rekombinierter ES-Zell-Klon. 3'-Sonde: Spur 1, korrekt rekombinierter ES-Zell-Klon; 2, WT.

Die genomische ES-Zell-DNA der selektierten ES-Zell-Klone wurde zuerst mit bestimmten Restriktionsenzymen geschnitten. Die Schnittstellen mussten dabei jeweils außerhalb der 5'- und 3'-Homologieflanken liegen. Dies bedeutete für beide homologen Bereiche jeweils eine Schnittstelle in den kodierenden Sequenzen des *Rnf12*-Gens und für die 5'-Homologieflanke eine zweite Schnittstelle weiter stromaufwärts bzw. für die 3'-Homologieflanke eine weitere Schnittstelle weiter stromabwärts der einklonierten Sequenzen. Zur Schnittstellenanalyse dienten die beiden λ -Klone G1.b und G12 (Abb. 11 B). Für den Nachweis der homologen Rekombination wurde für den 5'-Bereich die Restriktionsenzymkombination *Ava I/Xho I* und für den 3'-Bereich die Kombination *Bam HI/Ava I* gewählt (Abb. 15). Dabei stellte das Enzym *Ava I* jeweils die in der nicht-kodierenden Region schneidende Komponente dar. Bei *Ava I* handelt es

Ergebnisse

sich um ein Enzym, das sich aber für die Restriktion von genomischer DNA als nicht besonders effizient erwies. Dies gestaltete die Analyse äußerst zeitaufwändig.

Die verdaute genomische DNA wurde anschließend auf Membranen transferiert und mit radioaktiv-markierten, spezifischen Sonden hybridisiert. Es war darauf zu achten, dass die Sonden nicht mit Bereichen der Homologieflanken hybridisieren konnten, d.h. die Sonden mußten jeweils zwischen der *Ava I*-Schnittstelle und dem Beginn der Sequenzen der jeweiligen Homologieflanke liegen, um selektiv an ein homolog rekombiniertes Allel hybridisieren zu können. Für den 5'-Bereich konnte ein *Eco RI/Xho I*-Restriktionsfragment des G1.b-Klons von 1 kb Länge verwendet werden (Abb. 14 A). Für den 3'-Bereich wurde ein PCR-Produkt verwendet, das für diesen Zweck mit den Primern 38T7B und 38M13D hergestellt wurde. Das Amplifikat hatte eine Länge von 1.2 kb (Abb. 14 A).

Die externe 5'-Sonde hybridisierte mit einem 8.5 kb *Ava I/Xho I* –Fragment. Diese Bande war im Radiogramm nur zu detektieren, wenn es in einem Allel des *Rnf12*-Gens zu einer korrekten homologen Rekombination gekommen war. Das verdaute Wildtyp-Allel-Fragment hybridisierte mit der Sonde bei einer Höhe von 11.3 kb. Die externe 3'-Probe konnte dagegen ein 7.3 kb *Bam HI/Ava I* –Fragment eines homolog mutierten *Rnf12*-Gens detektieren, während die Wildtyp-Bande ein Signal bei 8.5 kb ergab (Abb. 15). Die korrekt rekombinierten ES-Zell-Klone konnten nun aufgetaut und für die Blastozysteninjektion in Kultur gebracht werden.

Für die homologe Rekombination des kompletten Knockout-Konstruktes in ES-Zellen wurden insgesamt fünf verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Dabei konnten drei unabhängige ES-Zell-Klone, 2H1, 2E2 und 3D1 identifiziert werden, bei denen es zu einer homologen Rekombination gekommen war. Die Klone 2H1 und 2E2 wurden anschließend im Hinblick auf die komplette funktionale RLIM-Eliminierung auf Proteinebene untersucht.

2.4.4. Nachweis der kompletten funktionalen RLIM-Eliminierung in ES-Zellen

Um den kompletten funktionalen Knockout des *Rnf12*-Gens zu bestätigen, wurden Wildtyp- und RLIM-Knockout-ES-Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene miteinander verglichen. Für den Proteinvergleich wurden Wildtyp-ES-Zellen und die ES-Zellen von zwei unabhängigen RLIM-Knockout-Klonen (2H1, 2E2) verwendet. Dabei wurden die verschiedenen ES-Zell-Proteine mit einem Anti-RLIM-Antiserum detektiert (Abb. 16).

Für die Protein-Präparationen wurden von den jeweiligen Petrischalen ES-Zell-Klone einzeln gepickt und vereinigt. Diese Vorgehensweise sollte dafür sorgen, dass möglichst wenig Feeder-Zellen in die Ansätze gelangen, die die Ergebnisse verfälschen konnten. Die Proteinextrakte der ES-Zellen wurden anschließend getrennt präpariert und aufgetrennt. Die RLIM-Proteine auf den Membranen wurden dann mit einem, im Kaninchen erzeugten und in unserem Labor generierten, RLIM-Antiserum detektiert. Die Western-Blot-Analyse bestätigt eindeutig, dass in RLIM-defizienten ES-Zellen, im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen, kein RLIM-Protein mehr detektierbar ist. Ebenso zeigen *in Situ*-Hybridisierungen, dass in den RLIM- defizienten ES-Zellen keine RLIM-



Abb. 16: Funktionale Bestätigung des kompletten *Rnf12*-Knockouts auf Proteinebene. Western Blot von Wildtyp-ES-Zellen (WT) und von zwei unabhängigen RLIM-Knockout-ES-Zell-Klonen (2H1 und 2E2). Die Proteine der ES-Zellen wurden präpariert, aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einem Anti-RLIM-Antikörper aus Kaninchen detektiert. Im Unterschied zu den WT-ES-Zellen kann bei den beiden unabhängigen RLIM-Knockout-ES-Zell-Klonen kein RLIM-Protein mehr detektiert werden. Als Ladekontrolle diente derselbe Blot, der mit einem Aktin-Antiserum hybridisiert wurde. Spur 1, WT; 2, 2H1 und 3 2E2.

mRNA mehr nachweisbar ist (persönliche Mitteilung von Dr. Annette Rünker). Die beiden ES-Zell-Klone wurden daraufhin, neben einem weiteren RLIM-defizienten Klon (3D1), für den Generierungsversuch einer RLIM-defizienten Maus verwendet.

2.4.5. RLIM-Eliminierung in ES-Zellen führt zum Anstieg von CLIM-Kofaktoren

Ein RLIM-Knockout-ES-Zell-Klon (2H1) wurde dafür verwendet, das Verhalten von CLIM-Kofaktoren in RLIM-defizienten ES-Zellen auf Proteinebene im Vergleich zu Wildtyp-ES-Zellen zu testen. Für diesen Vergleich wurden die ES-Zell-Proteine von den Wildtyp- und RLIM-Knockout-ES-Zellen aufgetrennt und gleichzeitig mit einem Gemisch aus RLIM- und CLIM1-Antikörpern detektiert (Abb. 17).

Auch für diesen Versuch wurden die ES-Zell-Klone einzeln gepickt und vereinigt (siehe 2.4.4.). Die Proteine der ES-Zell-Klone wurden präpariert, aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit RLIM- und CLIM-Antiseren detektiert. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zeigt, dass in den Zellen des RLIM-defizienten Klons, im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen, kein RLIM-Protein mehr nachweisbar ist.



Abb. 17: Anstieg der CLIM-Protein-Konzentrationen in *Rnf12*-Knockout-ES-Zellen. Western Blot von Wildtyp-ES-Zellen (WT) und ein RLIM-Knockout-ES-Zell-Klon (2H1). Die Proteine der ES-Zellen wurden präpariert, aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und simultan mit Anti-RLIM-und Anti-CLIM1-Antikörpern aus Kaninchen detektiert. Im Unterschied zu den WT-ES-Zellen kann bei dem RLIM-Knockout-ES-Zell-Klon kein RLIM-Protein mehr detektiert werden. Gleichzeitig kann aber ein leichter Anstieg der CLIM-Proteinkonzentrationen im RLIM-Knockout-ES-Zell-Klon detektiert werden. Als Ladekontrolle diente derselbe Blot, der mit einem Aktin-Antiserum hybridisiert wurde. Spur 1, WT; 2, 2H1.

Dafür kommt es aber gleichzeitig zu einem leichten Anstieg der CLIM-Kofaktorproteine in den Knockout-Zellen. Dies ist eine zusätzliche Bestätigung, dass CLIM ein *in vivo*-Zielsubstrat von RLIM ist. Außerdem wird dadurch demonstriert, dass RLIM die Konzentration von CLIM-Kofaktoren schon in ES-Zellen reguliert.

2.4.6. Versuch des Aufbaus einer RLIM-defizienten Mauslinie

Um die RLIM-mutierte Mauslinie aufbauen zu können, mussten chimäre Mäuse erzeugt werden. Hierfür wurden korrekt rekombinierte 129/Sv R1-ES-Zellen von drei unabhängigen Klonen (2H1, 2E2 und 3D1) in C57BL/6-Blastozysten injiziert. Diese Blastozysteninjektionen wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Service-Einheit-"Transgene Tiere" des ZMNH, unter der Leitung von Dr. Michael Bösl, von Tina Mordhorst durchgeführt.

Unter den geborenen Mäusen waren schwarze und gleichmäßig braun-gefärbte Tiere sowie schwarz-braun gefleckte Tiere aller Chimäritätsgrade. Von allen drei unabhängigen RLIM-defizienten ES-Zell-Klonen wurden hochchimäre Männchen geboren, welche dann mit C57BL/6-Weibchen verpaart werden konnten. Auch nach zahlreichen Verpaarungen kam es nur zu einer schwarz-gefärbten Nachkommenschaft und somit nur zur Geburt von C57/BL6 Abkömmlingen, d.h. dass die RLIM-defizienten ES-Zellen nicht in die Keimbahn der männlichen Chimären transmittiert wurden. Dies könnte auf einen Defekt bei der Keimzellenentwicklung hindeuten. Dafür spricht ebenfalls, dass auch andere Proteine im LIM-HD-Proteinnetzwerk wichtige Funktionen in der Keimzellentwicklung besitzen. So wurde bereits gezeigt, dass CLIM2-Knockout-Mäuse Keimzellendefekte aufweisen (Mukhopadhyay et al., 2003).

Aus diesem Grund entschloss ich mich, nach diesem konventionellen Knockout, eine konditionale Knockout-Maus zu erzeugen.

2.5. Generierung von konditionalen RLIM-Mausmutanten

Mit dem konditionalen Knockout-Verfahren ist es möglich, die Auswirkungen bestimmter Gen-Deletionen auf spezifische Zelltypen und/oder auf spezifische Zeitpunkte während der Entwicklung zu begrenzen. Bei diesen Verfahren bleiben die Gene vorerst intakt. Die Inaktivierung erfolgt dann mit der Cre-Reaktion nach gewebsspezifischen und entwicklungsstadiumsspezifischen Aspekten. Der Aufbau eines konditionalen Rekombinationskonstrukts unterscheidet sich dabei kaum von dem eines konventionellen Austauschvektors (siehe 2.4.1.). Die Sequenzierungs- und Restriktionsinformationen der subklonierten λ -Klone konnten auch beim Aufbau des konditionalen Konstrukts genutzt werden.

2.5.1. Aufbau des konditionalen Rekombinationskonstruktes

Für den Aufbau des konditionalen Konstrukts wurden die beiden basalen Vektoren pTV Flox-O und ploxP-DR16 verwendet (beide Vektoren bereitgestellt von Dr. Dieter Riethmacher). Bei ploxP-DR16 handelt es sich um einen einfachen Bluescript-Vektor, der eine integrierte loxP-Sequenz besitzt. Der pTV Flox-O Vektor enthält eine von loxP-Sequenzen flankierte NEO-Kassette, die wiederum von zwei Poly-Linkern flankiert wird. Außerdem enthält der Vektor ein Thymidinkinase-Gen für die negative Selektion. Das Konstrukt wurde erneut mit Standardtechniken hergestellt. Es wurde entwickelt, um eine einzelne loxP-Sequenz in Intron 4 und eine loxP-flankierte Neo-Kassette in die 3'-nichttranslatierte Region von Exon 5 zu integrieren. Auf diese Weise wurden kodierende Sequenzen von Exon 5 mit loxP-Sequenzen flankiert, man spricht hier auch vom sogenannten "floxen" eines Gens. Das fünfte Exon enthält den Hauptanteil der RLIM-kodierenden Sequenzen, einschließlich der NLS, dem RING-H2-Zinkfinger und dem TAA-Stopcodon (Abb. 18).

Für den Aufbau des Konstrukts wurden drei homologe DNA-Fragmente benötigt, die nach der Entwicklung von speziellen Primern mittels PCR hergestellt wurden. Diese Primer enthielten wieder künstliche 5'-Restriktionsstellen für die Klonierung der Fragmente in den pTV Flox-O Vektor. Die 5'-Homologieflanke stromaufwärts der loxP-Stelle wurde mit den Primern newkKO-5'-5'-Bam und newkKO-5'-3'-Asc amplifiziert. Das 5.5 kb *Bam HI/Asc I* –Fragment enthielt das das Startcodon enthaltene Exon 3 sowie Exon 4. Die 5'-Homologieflanke stromabwärts der loxP-Stelle wurde mit den Primern newkKO-E-5'-Asc und newkKO-E-3'-Pml amplifiziert. Das 2.7 kb *Asc I/Pml I* –Fragment enthielt die kodierenden Sequenzen von Exon 5. Die 3'-Homologieflanke beinhaltete große Teile der 5' nichtkodierenden Region von Exon 5. Mit den Primern newkKO-3'-5'-Not und newkKO-3'-3'-Cla wurde ein 3.3 kb *Not I/Cla I* –Fragment hergestellt und in den Vektor kloniert (Abb. 18 B).

Abb. 18 (nächste Seite): Gen-Targeting am Rnf12-Gen mit einer konditionalen Knockout-Methode. (A) Genomische Organisation des RLIM-kodierenden Rnf12-Gens. Das Rnf12-Gen besteht aus mindestens fünf Exons (schwarze Kästen), die durch vier Introns unterbrochen werden. Die kleinen schwarzen Balken repräsentieren die externen 5'- und 3'-Sonden, die für die Southern-Hybridisierung benötigt wurden. (B) Finales Rekombinationskonstrukt und Klonierungsstrategie: Der konditionale Rekombinationsvektor wurde konstruiert um eine einzelne loxP-Sequenz (Dreieck) in das Intron 4 sowie eine mit loxP-Stellen flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette (NEO) in die 3'-nichttranslatierte Region von Exon 5 einzuführen. Die kodierenden RLIM-Sequenzen von Exon 5, einschließlich der NLS, dem RING-H2 Zinkfinger und dem TAA-Stopcodon, wurden auf diese Weise gefloxt. Dafür wurden drei homologe, genomische DNA-Fragmente in den Targeting-Vektor plaziert. Bei diesen Fragmenten handelt es sich, um ein 5.5 kb Bam HI/Asc I-Fragment, welches Exon 3 (mit Startcodon) und Exon 4 enthielt; ein 2.7 kb Asc I/Pml I-Fragment, das die kodierenden Sequenzen von Exon 5 auf der 5'-Seite beinhaltete bzw. um ein 3.3 kb Not I/Cla I-Fragment einschließlich der nichtkodierenden Region von Exon 5 auf der 3'-Seite. Zwischen das Bam HI/Asc I- und Asc I/Pml I-Fragment wurde abschließend die einzelne loxP-Stelle kloniert. Das Thymidinkinase-Gen für die negative Selektion befindet sich auf der nicht-homologen 3'-Region des Vektors. Der finale Vektor wurde mit Bam HI linearisiert und aufgereinigt. Der präparierte Vektor wurde in ES-Zellen elektroporiert. (C) Homolog rekombiniertes *Rnf12*-Allel: ausgewählte Restriktionsstellen sind angezeigt. Die Exons sind als schwarze Kästen dargestellt. Transfizierte Zellen wurden einer Doppelselektion unterworfen. Resistente ES-Zell-Klone wurden zur Überprüfung auf die gezielte Modifizierung des RLIM-Gens durch homologe Rekombination mit der Southern-Hybridisierung analysiert.



Abschließend wurde mit den Primern ploxP-DR-16-5'c und ploxP-DR-16-3'b die einzelne loxP-Stelle amplifiziert. Mit den Primern wurden gleichzeitig zwei *Asc I*-Restriktionsstellen eingeführt. Nach der Klonierung des loxP-Fragments zwischen die beiden Fragmente der 5'-Homologieflanke wurde die korrekte Orientierung der loxP-Stelle mittels einer PCR mit dem Primer Intron 4-5' überprüft. Das Konstrukt enthielt 11.5 kb an totaler Homologie (Abb. 18 B). Der finale Vektor wurde dann mit *Not I* linearisiert und anschließend mit einer Phenol-/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Das konditionale Rekombinationskonstrukt wurde dann in ES-Zellen elektroporiert.

2.5.2. Nachweis der homologen Rekombination

Das konditionale Rekombinationskonstrukt wurde, wie bereits unter Punkt 2.4.2. beschrieben, in 129/Sv R1-ES-Zellen elektroporiert und selektioniert. Um endogene von rekombinanten Allelen unterscheiden zu können, wurden die selektierten ES-Zell-Klone durch eine Southern-Blot-Hybridisierung mit spezifischen externen 5-' und 3'-Sonden auf homologe Rekombinationsereignisse untersucht. Die genomische ES-Zell-DNA wurde zum Nachweis für die korrekte Rekombination der 5'- und 3'-Homologie mit den Enzymen *Ava I* und *Asc I* bzw. *Ava I* und *Xho I* verdaut (Abb. 19). Die verdaute genomische DNA wurde im Southern-Blot-Verfahren aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Als spezifische externe 5'- und 3'-Sonden dienten die schon beim Nachweis des kompletten Knockouts verwendeten Sonden (siehe 2.4.3.).



Abb.: 19: Southern-Blot-Analyse der resistenten ES-Zell-Klone der konditionalen Knockout-Methode. Genomische DNA von ES-Zell-Klonen wurde isoliert und mit den Enzymkombinationen *Ava I/Asc I* und *Ava I/Xho I* geschnitten. Für die Southern-Analyse-wurden spezifische externe 5'- und 3'-Sonden verwendet. Korrekt rekombinierte ES-Zellen haben kürzere Banden. Die 5'-Sonde identifiziert ein 12.4 kb *Ava I/Asc I*-Fragment des rekombinierten Allels (WT: 13.4 kb), während mit der 3'-Sonde das 6.9 kb *Ava I/Xho I*-Fragment des mutierten Allels detektiert wird (WT: 8.5 kb). Korrekt rekombinierte ES-Zell-Klone wurden für die Transfektion mit einem Cre-Rekombinase-Expressionsvektor verwendet. 5'-Sonde: Spur 1, WT; 2, korrekt rekombinierte ES-Zell-Klon. 3'-Sonde: Spur 1, korrekt rekombinierte ES-Zell-Klon; 2, WT.

Die radioaktiv markierte 5'-Sonde hybridisierte an eine 13.4 kb *Ava I/Asc I*- Wildtypund an eine 12.4 kb *Ava I/Asc I*- rekombinante Bande. Mit der 3'-Sonde konnte eine 8.5 kb *Ava I/Xho I* –Wildtyp- und eine 6.9 kb *Ava I/Xho I*-rekombinante Bande detektiert werden (Abb. 19).

Die konditionale Knockout-Methode bzw. die Herstellung von rekombinierten ES-Zell-Klonen wurde einmal durchgeführt. Dabei konnten zwei unabhängige ES-Zell-Klone identifiziert werden, bei denen es zu einer homologen Rekombination des konditionalen Konstruktes gekommen war. Die beiden Klone II-C4 und III-E12 konnten nun in einem weiteren Schritt mit dem Cre-Rekombinase-Vektor transfiziert werden.

2.5.3. Cre/loxP-abhängige Rekombination in ES-Zellen

Die beiden korrekt rekombinierten Klone II-C4 und III-E12 enthalten neben dem gefloxten RLIM-kodierenden Sequenzbereich von Exon 5 auch noch die gefloxte NEO-Kassette. Diese Kassette musste vor der Blastozysteninjektion entfernt werden, da sonst eine dritte loxP-Stelle in den ES-Zell-Klonen verblieben wäre. Diese dritte loxP-Stelle hätte bei der folgenden Cre/loxP-abhängigen Rekombination in Mäusen zu Problemen geführt. So wäre beispielsweise in den betreffenden Zellen kein reiner Genotyp entstanden, sondern eine Art Zellen-Mosaik. In manchen Zellen wäre das Gen noch aktiv geblieben, wenn hier nur die NEO-Kassette "nachträglich" entfernt worden wäre (Abb. 20). Die Klone II-C4 und III-E12 wurden deshalb mit dem Cre-Rekombinase-Expressionsvektor pPGKcre-bpA transient transfiziert. Man spricht hier auch von der Cre/loxP-abhängigen Rekombination. Außerdem bestand so nochmals die Möglichkeit, Zellen mit einem komplett inaktivierten RLIM-Allel zu erhalten und somit die zweite Chance auf die Generierung einer RLIM-defizienten Mauslinie. So wurde nach der Transfektion mit dem Cre-Rekombinase-Vektor nach beiden Rekombinationstypen gesucht, d.h. nach ES-Zellklonen mit Rekombinationen vom Typ I mit dem kompletten Verlust der gefloxten Sequenzen und vom Typ II mit dem Verlust der gefloxten Neo-Kassette. Beide Rekombinationtsypen sind wegen der Deletion der NEO-Kassette Geneticin-empfindlich. Deshalb wurden die einzelnen Subklone der beiden transfizierten Klone auf jeweils drei separate 96-Lochplatten transferiert und weiterkultiviert. Eine Platte wurde jeweils weggefroren. Die anderen beiden Platten wurden jeweils für die DNA-Präparation und die Geneticinbehandlung benötigt.

Abb. 20 (nächste Seite): Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination in ES-Zellen. Zwei unabhängige homolog rekombinierte ES-Zell-Klone wurden mit einem Cre-Rekombinase-Expressionsvektor transient transfiziert. Die resultierenden Rekombinationstypen der Geneticinsensitiven ES-Zell-Klone wurden durch Genotypisierungen identifiziert. Bei den Rekombinationen vom Typ I kommt es zur Rekombination zwischen der ersten und dritten loxP-Stelle, während es beim Typ II zum Verlust der NEO-Kassette zwischen der zweiten und dritten loxP-Stelle kommt. Die Exons sind durch schwarze Kästen dargestellt, während die 3'-nichttranslatierte Region von Exon 5 als grauer Kasten dargestellt ist. Ausgesuchte Restriktionsstellen sind angegeben.





Abb. 21: Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination in ES-Zellen. Bei Typ I-Rekombinationen kommt es zur Amplifikation einer 291 bp-Rekombinanten-Bande, während der Verlust der gefloxten NEO-Kassette (Typ II-Rekombination) zu einer 233 bp-Rekombinanten-Bande führt. Die WT-Bande hat bei beiden Genotypisierungen mit 157 bp die identische Länge. Das Auftauchen der WT-Bande bei homolog rekombinierten ES-Zellen hat ihre Ursache in der Kontamination der PCR-Ansätze mit Feeder-Zell-DNA. Korrekt rekombinierte ES-Zell-Klone wurden in Blastozysten injiziert. Typ I-Rekombination: Spur 1, rekombinierter ES-Zell-Klon; 2, WT-ES-Zellen. Typ II-Rekombination: Spur 1, rekombinierter ES-Zellen.

Für die Austestung wurden nur die Geneticin-sensitiven ES-Zell-Klone verwendet. Nach der Aufarbeitung der genomischen DNA wurde die Analyse mit einer PCR durchgeführt. Hierfür wurden spezifische PCR-Primer entworfen. So führten die Primer (Kontrolle-newkKO-5'-3', Kontrolle-newkKO-3'-5' und Kontrolle-newkKO-Asc-neg.) nach dem Verlust der gefloxten Sequenzen (Typ I) zwischen der ersten und dritten loxP-Stelle zu einer 157 bp Wildtyp- und zu einer 291 Rekombinanten-Bande (Abb. 21). Die Primer (Kontrolle-newkKO-5'-3', ploxP-DR-16-5'c und Kontrolle-newkKO-Asc-neg.) für den Nachweis des Verlustes der gefloxten NEO-Kassette (Typ II) zwischen der zweiten und dritten loxP-Stelle ergaben eine 157 bp-Wildtyp- und eine 233 bp-Rekombinanten-Bande (Abb. 21).

Eigentlich hätte es bei den rekombinierten ES-Zell-Klonen keine WT-Bande geben dürfen, da das RLIM-kodierende *Rnf12*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Die

WT-Bande ist damit zu erklären, dass beim Ansatz der PCR Feeder-Zell-DNA mit in den Ansatz gerät und dadurch die WT-Bande mit aufamplifiziert wird. So konnten als Ergebnis jeweils zwei positive Klone vom Typ I (2E3 und 2E8) und vom Typ II (1E2 und 1H5) identifiziert werden. Alle vier Klone stammen dabei vom Grundklon II-C4 ab. Diese vier Klone und die beiden zugehörigen Grundklone II-C4 und III-E12 wurden anschließend in die C57BL/6-Blastozysten injiziert.

2.5.4. Aufbau von konditionalen RLIM-Mausmutanten

Die 129/Sv R1-ES-Zellen der Klone II-C4, III-E12, 2E3, 2E8, 1E2 und 1H5 wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert. Diese Injektionen wurden erneut von der Service-Einheit-"Transgene Tiere" des ZMNH, aber unter der Leitung von Dr. Irm Hermans-Borgmeyer von Tina Mordhorst durchgeführt.

Von allen injizierten ES-Zell-Klonen wurden chimäre Mäuse geboren, wobei quasi alle Chimäritätsgrade vorhanden waren. Um die rekombinierten Allele in die Keimbahn der Mäuse zu transferieren, wurden die hochchimären männlichen Mäuse mit C57BL/6-Weibchen verpaart. Es zeigte sich, dass alle rekombinanten ES-Zell-Klone zur Keimbahntransmission fähig sind. Die Keimbahntransmission der rekombinanten ES-Klone wurde durch die Geburt braun-gefärbter Nachkommen (F1-Generation) belegt. Um zu überprüfen, ob das rekombinierte Allel wirklich vererbt worden ist, wurden Genotypisierungen von Schwanzbiopsien der braun-gefärbten Nachkommen angefertigt. Dazu wurde genomische DNA aus den Schwanzbiopsien gewonnen und mit einer PCR überprüft. Für diese Genotypisierungen konnten die selben Primerpaare benutzt werden, die auch schon für die Identifizierung der Rekombinationstypen verwendet wurden (siehe 2.5.3.). Hierbei zeigte sich, dass fast alle rekombinierten Allele in heterozygoter Form in die Genome der Mäuse übernommen wurden. Die einzigen Ausnahmen bildeten die männlichen Nachkommen der kompletten Knockout-Form vom Typ I. Hier kam es nicht zur Übernahme des rekombinierten Allels in das Mausgenom. Es wurden hierfür insgesamt 127 männliche Mäuse genotypisch analysiert. Da das Rnfl2-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, wären die männlichen Tiere auch quasi homozygote Träger des mutierten Gens gewesen. Ein Teil

Ergebnisse

der weiblichen Tiere konnte das rekombinierte Allel vom Typ I in heterozygoter Form integrieren. Diese heterozygoten Weibchen erwiesen sich als unauffällig und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Zählung der Nachkommen einer großen Anzahl von Verpaarungen zwischen heterozygoten Weibchen und WT-Männchen zeigte, dass heterozygote weibliche Nachkommen von Generation zu Generation immer geringer vertreten sind. In der vierten Generation waren von insgesamt 28 geborenen Weibchen nur noch 2 heterozygote Weibchen zu ermitteln. Damit konnten die beiden Linien vom Typ I, TGH RLIM 2C4 – 2E3 und TGH RLIM 2C4 – 2E8, nicht mehr dazu verwendet werden, homozygote Trägertiere zu erzeugen.

Dann wurden die heterozygoten Träger des Gesamtkonstruktes der Linien II-C4 und III-E12 sowie die heterozygoten Träger des gefloxten *Rnf12*-Gens der Linien TGH RLIM 2C4 - 1E2 und TGH RLIM 2C4 - 1H5 jeweils miteinander verpaart. Bei allen vier Linien konnten homozygote Tiere erzeugt werden.

Die homozygoten Träger des gefloxten Rnf12-Gens der Linien TGH RLIM 2C4 - 1E2und TGH RLIM 2C4 - 1H5 können für die Cre/loxP-abhängige Rekombination in Mäusen verwendet werden. Damit lassen sich die Auswirkungen bestimmter Gen-Deletionen auf spezifische Zelltypen und/oder auf spezifische Zeitpunkte während der Entwicklung begrenzen. Die Inaktivierung erfolgt dabei nach gewebs- und entwicklungsspezifischen Aspekten. Die Cre-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle spezifischer Promotoren. Dies führt zu einer gewebs- bzw. entwicklungsstadiumsspezifischen Deletion des Rnf12-Gens. Für die weitere Analyse bieten sich zwei Mauslinien besonders an: Nestin-Cre und HoxB6-Cre.

Die Verpaarungen der konditionalen RLIM-Mäuse mit den transgenen Nestin-Cre-Mäusen haben bereits begonnen. Die dafür verwendeten Nestin-Cre-Mäuse habe ich von Prof. Dr. Dr. Thomas J. Jentsch vom Institut für Molekulare Neuropatholobiologie am ZMNH erhalten. Der Nestin-Promotor induziert die Expression der Cre-Rekombinase in neuronalen Vorläufer-Zellen (NPC, Zimmerman et al., 1994). In Mäusen, in denen das *Rnf12*-Gen über Nestin-Cre-Expression "ausgeknockt" wird, werden besonders die Auswirkungen auf die Entwicklung des ZNS untersucht. Da LIM-HD-Gene und CLIM-Kofaktoren wichtige Funktionen für die Entwicklung des Groß- und Mittelhirns, der Mittel-Hinterhirn-Grenzstruktur, der Augen, Trigeminal- und Motoneuronen in Vertebraten besitzen (Becker et al., 2002), wird bei der Analyse des Phänotyps ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung dieser Strukturen auf morphologischer Ebene sowie auch auf die Expression spezifischer Genmarker (Becker et al., 2002) in diesen Organen bzw. Zelltypen gelegt.

HoxB6-Cre-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase restriktiver und zwar sehr früh u.a. im extra-embryonalen Mesoderm, welches urogenitale Vorläuferzellen beherbergt, sowie in der Mittel-Hinterhirn-Grenzstruktur (Lowe et al., 2000). Da Proteine aus dem LIM-HD-System für die Entwicklung beider Strukturen wichtig sind (Tsang et al., 2000; Becker et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2003), könnte man Hinweise über die Rolle von RLIM bekommen, wenn das *Rnf12*-Gen in diesen Strukturen spezifisch deletiert wird.

3. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, unter Verwendung sich ergänzender *in vivo-* und *in vitro-* Strategien, die entwicklungsbiologische Rolle von RLIM aufgeklärt werden.

Zwei *in vivo*-Methoden sollten dabei im Mittelpunkt dieser Studie stehen. Auf der einen Seite wollte ich durch RLIM-Überexpressionsexperimente in Zebrafischen einen möglichen entwicklungsbiologischen Einfluß von RLIM untersuchen. Auf der anderen Seite inaktivierte ich das für RLIM-kodierende *Rnf12*-Gen, um so Rückschlüsse auf die Funktion von RLIM während der Entwicklung der Maus ziehen zu können.

3.1. Die Stabilität von RLIM während der frühen Zebrafischentwicklung

Für die in vivo-Analyse zur Klärung der entwicklungsbiologischen Funktion von RLIM wurde zuerst die frühe Zebrafischentwicklung als Modellsystem ausgewählt. Dieses System wurde bereits verwendet um die biologische Rolle von CLIM-Kofaktoren zu untersuchen. Hierbei wurden die entwicklungsbiologischen Auswirkungen der ektopischen Überexpression eines dominant-negativen CLIM-Moleküls (DN-CLIM) während der frühen Zebrafischentwicklung analysiert (Becker et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeiten konnte einerseits demonstriert werden, dass die Überexpression des DN-CLIM-Moleküls während der frühen Entwicklungsphase in Zebrafischembryonen zu Störungen bei der Entwicklung der Augen bzw. der Mittel-Hinterhirn-Grenzstruktur (MHB) führt. Darüber hinaus werden die Projektionen von peripheren Axonen der Rohon Beard (RB)- und sensorischen Trigeminalneuronen sowie der Motoneuronen inhibiert (Becker et al., 2002). Andererseits konnte gezeigt werden, dass CLIM-Kofaktoren während der Zebrafischentwicklung mit hohen Proteinmengen in spezifischen neuronalen Zelltypen, in denen ebenfalls das LIM-HD Protein Isl1 synthetisiert wird, exprimiert werden. Da DN-CLIM-Moleküle neben dem Kernlokalisierungs-Signal (NLS) vor allem noch die LIM-Interaktionsdomäne (LID) enthalten (Abb. 4), sind die DN-CLIM-Moleküle in der Lage, mit endogenen CLIM-Kofaktoren um die LIM-Domänen der LIM-HD-Proteine zu kompetieren und auf diese Weise diese LIM-HD-Proteine bei der Ausübung ihrer biologischen Aktivität im Zellkern zu hemmen.

Bei einer Überexpression von RLIM in Zebrafischen war von einem ähnlich signifikanten Phänotyp auszugehen, da RLIM und DN-CLIM, wenn auch auf unterschiedlichen Wegen, letztendlich zu einer Inaktivierung der CLIM-Kofaktoren führen. Dies konnte bereits in unterschiedlichen Vertebratensystemen bestätigt werden. So führt die Überexpression von RLIM oder von DN-CLIM im sich entwickelnden Hühner-Flügel zu einem ähnlichen Phänotyp. Durch die jeweiligen Überexpressionen der beiden Moleküle kommt es zu Inhibierungen bei der Entwicklung der distalen Flügelstrukturen (Bach et al., 1999). In Xenopus führt die Überexpression der beiden Faktoren ebenfalls zu einem vergleichbaren Phänotyp (unveröffentliche Daten, persönliche Mitteilung von PD Dr. Bach). Allerdings erbrachte die ektopische Überexpression von RLIM in Zebrafischen keinen verwertbaren Phänotyp. Es stellte sich also die Frage, warum überexprimiertes RLIM im Zebrafischsystem, im Vergleich zum Xenopus- und Hühnersystem, zu keinem Phänotyp führt, obwohl es sich bei den Zebrafischen ebenfalls um Vertebraten handelt. Eine Möglichkeit, die das Fehlen eines Phänotyps erklären könnte, war, dass es sich bei RLIM um ein instabiles Protein handelt, das sich selbst zum Abbau markiert. Um zu untersuchen, ob es sich bei RLIM in Zebrafischen tatsächlich um ein instabiles Protein handelt war es nötig, eine Methode mit entwicklungsbiologischer Relevanz zu entwickeln, um Proteinstabilitäten direkt miteinander vergleichen zu können. Aus diesem Grund entwickelte ich die unter Kapitel 2.2. beschriebene in vivo-Methode, die eine Analyse und den Vergleich von Proteinstabilitäten während der frühen Zebrafischentwicklung ermöglicht. In der Tat zeigen die Ergebnisse, dass ein Myc-Epitop-markiertes RLIM-Protein nach 24 hpf im Vergleich zu einem Protein, das aus einem Myc-Epitop und einem Kernlokalisierungs-Signal besteht, während der frühen Zebrafischentwicklung erheblich instabiler ist (Abb. 10).

Um auszuschließen, dass dieser beobachtete Effekt nicht schon während der Translation der injizierten mRNAs auftritt, sondern auf unterschiedlichen Stabilitäten der beiden translatierten Fusionsproteine in den Zebrafischembryonen beruht, führte ich verschiedene Maßnahmen zur Sicherstellung der Qualität und Stabilität der mRNAs durch. Um optimale Bedingungen auf der Translationsebene zu schaffen, wurden für die in vitro-Transkription der mRNA nur Konstrukte verwendet, die auf den pCS2-Vektoren basierten. Bei den pCS2-Vektoren handelt es sich um speziell optimierte Vektoren, die ausreichende Mengen von qualitativ hochwertiger mRNA produzieren (Roth et al., 1991). Die Verwendung desselben Basisvektors hat den zusätzlichen Vorteil, dass alle mRNAs identische 5'- und 3'-nichttranslatierte Regionen enthalten, was für eine vergleichbare Transkriptionrate und Transkriptionsqualität sorgt. Mit einer RT-PCR-Analyse der 5 hpf-Embryonen konnte gezeigt werden, dass ähnliche Mengen der beiden mRNAs injiziiert wurden (Abb. 9). Mit einer weiteren RT-PCR-Analyse der 24 hpf-Embryonen konnte ferner nachgeweisen werden, dass die Stabilitäten der injizierten mRNAs vergleichbar sind (Abb. 9). Die Tatsache, dass die ektopische Überexpression der beiden injiziierten mRNAs in 5 hpf-Embryonen auch in immunhistochemischen Experimenten und der Western-Blot-Analyse vergleichbar ist (Abb.: 10), spricht ebenfalls dafür, dass es keine offensichtlichen Unterschiede auf der Ebene der mRNA-Translation gab. Zu diesem Zeitpunkt besaßen alle embryonalen Zellen noch eine relativ hohe Konzentration der injizierten mRNA. Mit jeder Zellteilung nahm diese mRNA-Konzentration in den Zellen jedoch ab. Aus diesem Grund scheinen die großen Mengen vom NLS-Myc-Protein nach 24 hpf das Ergebnis einer Protein-Akkumulation zu sein (Abb. 10 C+D). Die Tatsache, dass die injizierten NLS-Myc- und Myc-RLIM-mRNA-Mengen während der untersuchten embryonalen Stadien miteinander vergleichbar sind, zeigt, dass die nachgewiesenen Unterschiede in der Proteindetektion ihre Ursache in der Proteinstabilität haben.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei RLIM um eine Ubiquitin-Protein-Ligase handelt (siehe 2.1.). Wie auch andere RING Finger Ubiquitin-Ligasen kann RLIM sich selbst ubiquitinieren und somit für den proteolytischen Abbau im 26S Proteasom markieren. Deshalb ist zu vermuten, dass diese Fähigkeit auch zur Instabilität vom Myc-RLIM-Protein in Zebrafischembryonen beiträgt, während sich das NLS-Myc-Protein mit der Zeit in den Embryonen anhäufen konnte. Die Stabilität vieler Schlüsselenzyme wird durch den proteasomalen Abbau reguliert (Pickart, 2001; Bach and Ostendorff, 2003; Freiman und Tjian, 2003). Dies geschieht auch durch den Mechanismus der Ubiquitinierung und den anschließenden proteolytischen Abbau im 26S Proteasom (Pickart, 2001; Hickel, 2001; Kloetzel, 2001). Dieser Vorgang ist beispielsweise beteiligt an der Regulation von entwicklungsbiologischen Regulatoren wie NF κB, c-Jun, Tramtrack (Hershko und Ciechanover, 1998) und BOB.1/OBF (Tiedt et al., 2001; Boehm et al., 2001). So könnte RLIM auch in Zebrafischen während der Embryogenese eine wichtige Funktion als regulierendes Protein einnehmen, da Unterschiede in den Proteinkonzentrationen von wichtigen entwicklungsbiologischen Regulatoren eine bedeutende Rolle während der Embryogenese einnehmen. Aber warum sollte RLIM in Zebrafischen instabiler sein als in der Maus oder in Xenopus ? Diese Frage ist nicht eindeutig zu beantworten. Eine Möglichkeit, die diesen Umstand vielleicht am besten erklären könnte, ist die Tatsache, dass Zebrafische über ein verdoppeltes Genom verfügen. Somit stehen den Zebrafischen auch mehr von den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen zur Verfügung. Die oft limitierend auf den proteasomalen Abbau wirkenden E2s könnten auf diese Weise den proteasomalen Druck auf RLIM erhöhen und somit die RLIM-Abbaurate steigern. Das Resulat wäre eine schnellere Degradation von RLIM in Zebrafischen im Vergleich zur Maus und Xenopus.

Neben der mutmaßlich erhöhten Instabilität von RLIM in Zebrafischen könnte ein anderer Grund dafür sein, dass die Überexpression von RLIM in Zebrafischen nicht zur Ausbildung eines detektierbaren Phänotyps führt, dass das überexprimierte RLIM-Protein die CLIM-Moleküle in Zebrafischen nicht erkennt. Das Myc-RLIM-Konstrukt ist mit murinen RLIM-Sequenzen aufgebaut worden und so erkennt das davon abgeleitete Protein das Zebrafisch-CLIM-Substratprotein eventuell aus Gründen der Speziesschranken nicht mehr. Für das Ubiquitin-System konnte eine derartige Möglichkeit bereits aufgezeigt werden. So vermitteln das RING E3-Protein Neuralized in *Drosophila* (DNeur) und das Ortholog in *Xenopus* XNeur den Abbau des Transmembranproteins Delta in *Drosophila* (D1) bzw. in *Xenopus* (XDelta1). In Experimenten konnte dann gezeigt werden, dass DNeur nicht in der Lage ist Ubiquitin auf XDelta1 zu übertragen (Deblandre et al., 2001; Lai et al., 2001). Zwischen den beiden Spezies sind die Ubiquitin-Systeme somit nicht kompatibel. Das zwischen

Diskussion

Zebrafischen und Mäusen ein vergleichbares Phänomen existieren könnte ist als eher unwahrscheinlich einzustufen, da die RLIM-Proteine von Vertebraten über die ganze Länge eine starke Homologie zueinander aufweisen und die basische Domäne, die für die Interaktion mit den CLIM-Kofaktoren sorgt, zwischen den verschiedenen Vertebratenspezies noch stärker konserviert ist. Hierzu ist allerdings anzufügen, dass wir bisher nicht in der Lage waren mit Western-Blot-Analysen ein RLIM-ähnliches Protein in Zebrafischen nachzuweisen. Dieser Umstand ist aber erstaunlich, da sogar in Vertebraten wie Xenopus ein RLIM-Ortholog identifiziert werden konnte. Die bisher nicht erfolgte Identifikation eines RLIM-ähnlichen Moleküls könnte deshalb vor allem ein Problem der Spezifität der Antikörper bei der Identifikation von RLIM in Zebrafischen sein. Ein weiterer Grund für die Nichtausprägung eines Phänotyps im Zebrafischsystem könnte sein, dass RLIM keine oder nur eine untergeordnete Rolle während der Entwicklung von Zebrafischen zukommt. Zusätzlich ist allerdings davon auszugehen, dass auch andere Faktoren und Mechanismen. die keine Autoubiquitinierungsaktivität aufweisen, zur geringeren Proteinstabilität von Myc-RLIM beitragen.

Es ist wahrscheinlich, dass es noch wesentlich mehr Beispiele von Entwicklungssystemen gibt, die durch die Eliminierung von regulatorisch wirkenden Proteinen geleitet werden.

3.2. Die biologische Funktion von RLIM während der Entwicklung von Vertebraten

Der durch homologe Rekombination vermittelte konventionelle- bzw. Deletions-Knockout führte zur kompletten Inaktivierung des *Rnf12*-Gens in den ES-Zellen. Die korrekt rekombinierten ES-Zell-Klone sind im Gegensatz zu den Wildtyp-ES-Zellen nicht mehr in der Lage, ein funktionelles RLIM-Protein zu translatieren (Abb. 16). Trotz der Verwendung von drei unabhängigen ES-Zell-Klonen und mehrmaliger Wiederholung der Blastozysteninjektionen transmittierten die ES-Zellen nicht in die Keimbahn der männlichen chimären Mäuse. Aus diesem Grund wurden auch keine, in Bezug auf das RLIM-defiziente Allel, heterozygoten weiblichen Mäuse geboren. Da nur
Diskussion

chimäre Männchen mit C57/BL6-Weibchen verpaart wurden, spricht diese Beobachtung dafür, dass RLIM eventuell eine Rolle bei der Keimzellentwicklung einnehmen könnte. Für diese Annahme spricht auch, daß CLIM2-Knockout-Mäuse einen Phänotyp in der Entwicklung von Keimzellen (Mukhopadhyay et al., 2003) zeigen. So scheint es durch die bekannten funktionellen Verbindungen zwischen CLIMund RLIM-Proteinen sehr gut möglich zu sein, dass auch RLIM Funktionen in der Keimzellenentwicklung übernimmt. Das Ausbleiben der männlichen RLIM-defizienten Nachkommenschaft könnte auch den Grund haben, dass das Fehlen von RLIM zur embryonalen Lethalität führt. Wegen der X-chromosomalen Lokalisation des *Rnf12-*Gens wären die männlichen Tiere praktisch homozygote Träger des deletierten Gens. Für die Hypothese der embryonalen Lethalität spricht, dass in der Zellkultur die rekombinierten ES-Zell-Klone eindeutig langsamer wachsen als die zur Kontrolle mitgeführten Wildtyp-ES-Zellen. Hierzu ist anzufügen, dass es sich bei den rekombinanten 129/Sv R1-ES-Zellen um Zellen männlichen Ursprungs handelt und die ES-Zellen somit RLIM-defizient sind.

Einen weiteren Aspekt, der die Hypothese der embryonalen Lethalität unterstützt, liefern die Experimente von Dr. Annette Rünker. Hierbei nutzte Dr. Rünker die RLIMdefizienten Knockout-ES-Zellen für ihre Differenzierungsversuche. In ihren Experimenten hat sie RLIM-defiziente ES-Zellen in neuronale Vorläuferzellen differenziert. Hierbei stellte sie fest, dass es bei der Bildung der "embryoid bodies" zu Abweichungen von der normalen Organisation des Zellverbandes kommt (persönliche Mitteilung). Bei den "embryoid bodies" handelt es sich um die erste Bildungsstufe von ES-Zellen in Suspensionskultur nachdem der Faktor LIF abgesetzt und die ES-Zellen ohne Feeder-Zellen kultiviert werden. Die ES-Zellen bilden dadurch Blastozystenähnliche Strukturen aus, welche aus einer äußeren Schicht aus viszeralen entodermalen Zellen und einem inneren Kern aus wenig entwickelten ektodermalen Zellen bestehen (Grabel, 1992; Maye et al., 2004). Wenn es nun bei RLIM-defizienten ES-Zellen schon auf der Ebene der Blastozystenorganisation zu Störungen kommen kann, würde dies sehr gut eine frühe embryonale Lethalität der RLIM-defizienten Tiere erklären. Außerdem sprechen die erst kürzlich gemachten Beobachtungen und Resultate anderer Forschergruppen stark für die Hypothese der embryonalen Lethalität von RLIMdefizienten Mäusen.

Die Arbeitsgruppe von Igor B. Dawid konnte zeigen, dass das LIM-HD Protein Lim1 (auch XLim-1 oder Lhx1 genannt) während der frühen embryonalen Entwicklung von Xenopus und Maus essentiell für die korrekte Wanderung von mesodermalen Zellen während der Gastrulation und somit für die Bildung der anterior-posterioralen Körperachse ist (Hukriede et al., 2003). Bei Lim1-defizienten Mäusen ist die Entwicklung der vorderen Kopfstrukturen deshalb derart stark gestört, dass die Tiere embryonal lethal sind und meist am embryonalen Entwicklungstag 10.5 sterben. Der Verlust der vorderen Kopfstrukturen von Lim1-defizienten Xenopusund Mausembryonen beruht auf einem ähnlichen Mechanismus. Hier wird das axiale Mesoderm nicht korrekt positioniert und somit kann keine Interaktion mit dem Neuroektoderm stattfinden, die für die Bildung der Kopfstrukturen aber unbedingt nötig ist. Es konnte dabei demonstriert werden, dass in Lim1-Knockout-Mausembryonen und im Spemann-Organisationszentrum von Lim1-defizienten Xenopus-Embryonen keine Expression des Zelladhäsionsmoleküls Protocadherin im sich entwickelnden Mesoderm mehr stattfindet. Zelladhäsionsmoleküle spielen generell bei der Gastrulation, sowohl bei der Wanderung von Einzelzellen als auch bei der Umlagerung von Zellverbänden, eine essentielle Rolle. Während der Gastrulation wird im wesentlichen die Grundorganisation des Embryos festgelegt. Zu Beginn der frühen Gastrulation wandern dafür die primären Mesenchymzellen als Einzelzellen ins Blastocoel ein. Auf der Innenseite sind die Blastulazellen von einer Basallamina bedeckt, die neben anderen Proteinen auch Zelladhäsionsmoleküle enthält. Auf diese Weise können die einwandernden Mesenchymzellen Kontakt mit der Blastulawand aufnehmen und die gastrulatorischen Gestaltungsbewegungen von Einzelzellen und Zellverbänden initiieren. Bei RLIM-defizienten ES-Zellen kommt es bereits bei der Organisation der Blastula-ähnlichen "embryoid bodies" zu Störungen. Da Zelladhäsionsmoleküle bereits auf der Ebene der Blastula eine Rolle spielen und nachgewiesenermaßen der LIM-Domäne-bindende Kofaktor RLIM eine regulatorische Funktion innerhalb des LIM-Proteinnetzwerks besitzt, scheint eine Beteiligung von RLIM bei der sehr frühen Organisation von Embryonen möglich zu sein. Damit wäre das Gleichgewicht von LIM-HD-Proteinen bereits in ES-Zellen gestört. Die Arbeitsgruppe um Masanori Taira konnte kürzlich die Verbindung von XLim-1 (Taira et al., 1994) und seinem positiven Regulator CLIM2 (auch bekannt als Ldb1, NLI) zu dem RING Finger Protein XRnf12

Diskussion

(Xenopus Ortholog von Rnf12/RLIM) während der frühen Xenopus-Entwicklung aufzeigen (Hiratani et al., 2003). Dabei wurde gezeigt, dass während der frühen Xenopus-Entwicklung das korrekte stöchiometrische Verhältnis von XLim-1 zu dessen Koaktivator CLIM2 wichtig für die Funktionen des Spemann-Organisationszentrums ist. Eine Störung dieses stöchiometrischen Gleichgewichts, z.B. durch ein Übergewicht von CLIM2, unterdrückt die positive biologische Aktivität des XLim-1/CLIM2-Komplexes. XRnf12 besitzt ebenfalls eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität und hält durch die Markierung von CLIM2 zum proteasomabhängigen Abbau das XLim-1/CLIM2-Verhältnis im Gleichgewicht (Hiratani et al., 2003). Die Regulation dieses Gleichgewichts ist wichtig, da LIM-HD-Faktoren die Differenzierungsprozesse während der Entwicklung von vielen Spezies regulieren. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass kritische Konzentrationen von Regulatorproteinen ausschlaggebend sind für viele biologische Prozesse wie z.B. in der Entwicklung und im Zell-Zyklus. Da der Verlust der vorderen Kopfstrukturen von Lim-1-defizienten Xenopusund Mausembryonen auf einem ähnlichen Mechanismus beruhen, kann man davon ausgehen, dass RLIM eine ähnlich essentielle Funktion während der Entwicklung der Mausembryonen zukommt. Somit wäre in RLIM-defizienten Embryonen das Regulatorproteingleichgewicht extrem früh gestört. Dieser Umstand wird umso wichtiger, da bereits gezeigt werden konnte, dass CLIM nicht das einzige Substrat von RLIM darstellt (siehe 3.3.).

Zusammengefasst diese Ergebnisse, bedeutende zeigen dass RLIM eine Regulationsrolle während der frühen Entwicklung von Vertebraten spielen könnte. Da RLIM noch früher als das LIM-HD-Protein Lim1 exprimiert wird, könnte RLIM tatsächlich bei der Formierung einer so frühen embryonalen Struktur wie der Blastula beteiligt sein. Diese Möglichkeit würde die embryonale Lethalität der RLIM-Knockout-Mäuse sehr gut erklären. Die Frage nach der entwicklungsbiologischen Rolle von RLIM kann allerdings durch den kompletten RLIM-Knockout nicht hinreichend erklärt werden. Um der Klärung dieser noch offenen Frage nachzugehen, entschied ich mich eine konditionale RLIM-Knockout-Maus zu generieren.

Nach der Verpaarung der hochchimären Männchen der Rekombinationstypen I und II (Abb. 20) mit C57/BL6-Weibchen zeigte sich, dass alle rekombinanten ES-Zell-Klone

zur Keimbahntransmission fähig sind. Die rekombinierten Allele liegen in den Genomen der Weibchen in heterozygoter Form und bei den Männchen der Typ II-Rekombination des Rnf12-Gens quasi in homozygoter Form vor. Die Weibchen der Typ I-Rekombination sind unauffällig und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp, obwohl rein statistisch gesehen nur 50 % der Zellen über ein intaktes RLIM-Allel verfügen, da die Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms in den Weibchen normalerweise zufällig während der Embryonalentwicklung geschieht. Da die heterozygoten Weibchen aber keinen verwertbaren Phänotyp zeigen und dies aufgrund der von uns bisher erhaltenen Ergebnisse zumindest unerwartet ist, könnte es sein, dass die Zellen, die ein aktiviertes RLIM-defizientes X-Chromosom enthalten, während der Entwicklung aussortiert und von den RLIM-exprimierenden Zellen überwachsen werden. Um dies näher zu untersuchen, führte Kerstin Cornils mit ausgesuchten Organen der heterozygoten Rekombinationstyp I-Weibchen Western-Blot-Analysen zum Nachweis des RLIM-Proteingehalts in den Organen im Vergleich zu Organen von Wildtyp-Mäusen durch. Sie stellte fest, dass der RLIM-Proteingehalt in den Organen der heterozygoten Weibchen praktisch dem Niveau der Organe der Wildtyp-Mäuse entspricht (persönliche Mitteilung). Dies spricht in der Tat dafür, dass die Zellen, die ein aktives RLIMdefizientes X-Chromosom enthalten, aussortiert werden und nicht an der Entwicklung der heterozygoten Weibchen beteiligt sind. Dieser Effekt wurde bereits bei einem anderen X-chromosomal lokalisierten Gen beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass bei Missense Mutations-Experimenten mit dem Zelladhäsionsmolekül L1 in der Maus über 80 % der Zellen über ein intaktes L1-Allel verfügen (Rünker et al., 2003). Wenn tatsächlich vor allem die Zellen, die das aktive RLIM-defiziente X-Chromosom enthalten, nicht am Aufbau der Tiere mitwirken, würde dies auch erklären, warum die Urkeimzellen noch fähig sind aus dem Entoderm in die Gonadenanlage zu wandern.

Die Männchen der Typ I-Rekombination konnten dagegen nicht generiert werden. Hier kam es nicht zur Übernahme des rekombinierten Allels. Wegen der X-chromosomalen Lokalisation des *Rnf12*-Gens wären die Tiere praktisch homozygote Träger des deletierten Gens. Somit konnte also weder mit dem kompletten RLIM-Knockout noch mit dem konditionellen Knockout vom Typ I eine komplette Inaktivierung des *Rnf12*-Gens erreicht werden. Dies scheint eine zusätzliche Bestätigung dafür zu sein, dass das *Rnf12*-Gen von Relevanz für die frühe Entwicklung der Maus sein könnte. Das Fehlen

des *Rnf12*-Gens hat unter Umständen die embryonale Lethalität der Mäuse zur Folge. Allerdings führen die ES-Zellen des konditionellen Knockout vom Typ I zur Keimbahntransmission. Dies spricht eher gegen die Beteiligung von RLIM während der Keimzellentwicklung. So könnte das Ausbleiben der Keimbahntransmission beim kompletten Knockout ihre Ursache auch in den RLIM-defizienten ES-Zellen gehabt haben. Dies wäre eine durchaus mögliche Alternative, da alle Elektroporationen mit 129/Sv R1-ES-Zellen desselben Ursprungs durchgeführt wurden und diese ES-Zellen eventuell nicht mehr über die Totipotenz verfügten, die für die Generierung von Knockout-Mäusen nötig wären.

Zur Aufklärung der entwicklungsbiologischen Rolle von RLIM ist die biologische Beziehung der Kofaktoren CLIM und RLIM zueinander von besonderem Interesse. Dies umso mehr, da die funktionale Verbindung der beiden Faktoren bekannt ist (Bach et al., 1999; Ostendorff et al., 2002; Hiratani et al., 2003) und von mir bereits unter Punkt 3.1. diskutiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass RLIM am CLIM-Abbau beteiligt ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass es beim Fehlen des Rnf12-Gens in vivo zu einem Anstieg der CLIM-Proteinkonzentrationen kommt (Abb. 17). Aus diesen Gründen könnte RLIM möglicherweise eine bedeutende Rolle in der entwicklungsbiologischen Kontrolle von CLIM-Faktoren einnehmen (Ostendorff et al., 2002). Beide Kofaktoren werden überdies während der Entwicklung von Vertebraten schon sehr früh exprimiert. RLIM-kodierende mRNA, genauso wie die von CLIM2, wird in vielen Körperregionen überlappend exprimiert und kann während der Mausentwicklung schon früher als E7.5 detektiert werden (Bach et al., 1999). Es konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass beide Proteine bereits auf der Entwicklungsstufe von ES-Zellen detektierbar sind (Abb. 16). Dies ist ein erstaunlich frühes Erscheinungsbild von CLIM und RLIM während der Mausentwicklung. Dieser Umstand allein könnte schon ein Indiz für die wichtige Funktion der beiden Faktoren sein.

Aber auch andere Dinge sprechen für eine wichtige Rolle von RLIM während der Entwicklung von Vertebraten. Das *Rnf12*-Gen ist zwischen verschiedenen Spezies konserviert. Die Homologien von RLIM auf Proteinebene zwischen Mensch, Frosch, Huhn und Maus sind sehr hoch (Abb. 13). So ist die humane RLIM-Proteinsequenz zu 89 % identisch mit dem murinen RLIM und zu 85 % bzw. 81 % identisch mit den RLIM-Sequenzen vom Huhn bzw. vom Frosch. Hinzu kommt, dass das *Rnf12*-Gen beim Mensch und bei der Maus auf derselben Region des X-Chromosoms lokalisiert ist (Ostendorff et al., 2000). Dies deutet auf eine während der Evolution konservierte Funktion von RLIM in diesen Spezies hin. Dagegen verfügt weder *C. elegans* noch *Drosophila* über ein Gen, das für ein RLIM-ähnliches Produkt kodiert.

3.3. Ubiquitin-Ligasen als Regulatorproteine im Zellkern

Im eukaryotischen Zellkern laufen viele unterschiedliche Prozesse parallel ab. Die Vielzahl der nukleären Abläufe und Funktionen erfordert aus diesem Grund eine übergeordnete Regulation. Es ist bereits gezeigt worden, dass E3-Ubiquitin-Ligasen Schlüsselpositionen bei der Regulation dieser Zellkernfunktionen wahrnehmen (Bach und Ostendorff, 2003). Ob RLIM ebenfalls eine übergeordnete regulatorische Position innerhalb des nukleären Proteinnetzwerks einnimmt, soll in der näheren Zukunft noch genauer untersucht werden. Diese Position könnte bei solch generellen regulatorischen Mechanismen wie der Synchronisation oder Integration von nukleären Funktionen liegen, da die Kernantwort auf spezifische Signale oft eine gleichzeitige Aktivierung bzw. Modifikationen von unterschiedlichen Regulationswegen erfordert.

Bei der Synchronisation von Interaktionen im Zellkern wird die Aktivität einer einzigen E3-Ubiquitin-Ligase nach einem aktivierenden Signal, wie der Phosphorylierung durch Kinasen, induziert. Daraufhin kann die aktivierte E3-Ubiquitin-Ligase verschiedenartige Substrate ubiquitinieren und diese markierten Substrate somit nach einer Polyubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zuführen oder bei einer Monoubiquitinierung die Funktion des Zielproteins modifizieren (Abb. 22). E3-Enzyme sind oft in der Lage unterschiedliche Substrate zu ubiquitinieren. Ein E3-Enzym, das verschiedene Zielproteine auf diese Weise markieren kann, ist SIAH1 (Seven In <u>Absentia Homologue</u>).



Abb. 22: Modell der Synchronisierung von zellulären Funktionen durch E3-Ubiquitin-Ligasen. Eine einzige E3-Ubiquitin-Ligase (rot) ist in der Lage nach einem aktivierenden Signal (grüner Pfeil) verschiedenartige Substratproteine (x, y und z in gelb) zu markieren, um auf diese Weise unterschiedliche Regulationsprozesse in der Gegenwart von Ubiquitin (Ub in rot) und den E1- und E2-Enzymen (grau) zu synchronisieren. Die schwarzen Pfeile stellen die Ubiquitinierungsaktivitäten des E3-Enzyms dar.

Zu diesen Zielproteinen gehören Substrate mit unterschiedlichen Aufgaben bei der die Regulation verschiedenen Proteinnetzwerken, wie beiden von Transkriptionsfaktoren c-Myb (Tanikawa et al., 2000) und β-Catenin (Liu et al., 2001; Matsuzawa et al., 2001) sowie der transkriptionelle Koaktivator OBF-1/BOB1 (Boehm et al., 2001; Tiedt et al., 2001), der transkriptionelle Repressor TIEG1 (Johnsen et al., 2002) und das Membranprotein Numb (Susini et al., 2001). Somit ist SIAH1 in der Lage regulatorisch in unterschiedliche zelluläre Prozesse einzugreifen und auf diese Weise die verschiedenen Wege hierbei weiter stromabwärts zu synchronisieren. Wir konnten bereits zeigen, dass CLIM durch die von RLIM vermittelte Polyubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zugeführt wird und das LMO-Proteine durch RLIM monoubiquitiniert werden. Darüber hinaus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Histon-regulierende HDAC2-Komplex durch RLIM polyubiquitiniert wird.

RLIM ist somit ebenfalls in der Lage regulatorisch in verschiedene Systeme einzugreifen und wäre deshalb ein Kandidat für die Synchronisation von nukleären Funktionen.

E3-Ubiquitin-Ligasen können auch bei der Integration bzw. bei der Zusammenführung von unterschiedlichen Regulationsprozessen eine wichtige Rolle spielen. Ein spezifisches Proteinsubstrat kann dabei von zwei oder mehreren aktivierten E3-Ligasen markiert werden und somit verschiedene E3-vermittelte Regulationsprozesse zusammenführen (Abb. 23).



Abb. 23: Modell der Integration von verschiedenen zellulären Prozessen durch E3-Ubiquitin-Ligasen. Ein Substrat (x in gelb) kann von unterschiedlichen E3-Ubiquitin-Ligasen (rot) in der Gegenwart von Ubiquitin (Ub in rot) sowie E1- und E2-Enzymen (grau) markiert werden um so verschiedene E3-vermittelte Regulationsprozesse zusammenzuführen. Die schwarzen Pfeile stellen die Ubiquitinierungsaktivitäten des E3-Enzyms dar. Die aktivierenden Signale der E3-Enzyme sind als grüne Pfeile dargestellt.

Die mit RLIM eng verwandte und vorwiegend im Zytoplasma lokalisierte Ubiquitin-Ligase Rnf6 könnte einen Integrationspartner von RLIM darstellen, zumal von uns schon mit dem Kofaktor CLIM ein gemeinsames Substrat für die beiden E3-Ligasen identifiziert werden konnte (persönliche Mitteilung von Anne Schlüter). Ein weiterer interessanter Aspekt des Zusammenwirkens dieser beiden Integrationspartner ist die Möglichkeit der Kompartiment-übergreifenden zellulären Regulation. Da RLIM vorwiegend im Zellkern und Rnf6 überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, könnten durch die Modifikation des gemeinsamen Substratproteins die Antworten der unterschiedlichen zellulären Kompartimente zusammengeführt werden.

Zur Klärung der Frage nach der möglichen Stellung von RLIM bei der Regulation von nukleären Prozessen müssen in der Zukunft noch weitere Experimente durchgeführt werden.

3.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Der molekulare Mechanismus, durch den das für RLIM-kodierende *Rnf12*-Gen die Aktivitäten von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren hemmen kann, wurde aufgedeckt. Trotz aller Bemühungen konnte die entwicklungsbiologische Rolle von RLIM im Rahmen dieser Arbeit leider nicht eindeutig geklärt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass RLIM eine entwicklungsbiologische Funktion während der Entwicklung von Vertebraten zukommt, ist trotzdem als relativ hoch zu bewerten. Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine bedeutende Funktion, zumindest während der Entwicklung von höheren Vertebraten, hin. Hierbei ist die wahrscheinliche embryonale Lethalität von RLIM-defizienten Mäusen der absolut größte Anhaltspunkt.

Aus diesem Grund sollen zur weiteren Klärung der Funktion von RLIM die in der näheren Zukunft geplanten bzw. bereits begonnenen Verpaarungen der konditionalen *Rnf12*-Knockout-Mäuse mit passenden transgenen Cre-Mausmutanten beitragen. Die beiden Mauslinien, die sich hierbei besonders anbieten, sind die Nestin-Cre- und HoxB6-Cre-Mauslinie. Mithilfe der Nestin-Cre-Mäuse, deren Verpaarungen mit den konditionalen RLIM-Mäusen bereits begonnen haben, kann eine Beteiligung von RLIM in neuronalen Vorläufer-Zellen untersucht werden. Mit den HoxB6-Cre-Mäusen können die Mittel-Hinterhirn-Grenzstruktur und das extra-embryonale Mesoderm, nachdem das *Rnf12*-Gen spezifisch deletiert wurde, analysiert werden.

Mithilfe dieser und weiterer Cre-Mauslinien sollte es möglich sein, die entwicklungsbiologische Rolle von RLIM zu etablieren.

4. Materialien

4.1. Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Übliche Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Darmstadt; Sigma, München; Boehringer, Mannheim; Roth, Karlsruhe; Amersham-Pharmacia, UK; Gibco-BRL, Eggensten; Serva, Heidelberg und Pharmacia, Freiburg, bezogen.

4.2. Liste gebräuchlicher Lösungen

Denhardt (50x)	1 g Ficoll 400, 1 g Polyvinylpyrrolidon, 1 g BSA (Fraktion V), ad. 100 ml ddH ₂ O
DNA-Probenpuffer (6x)	40 % Sucrose, 0.25 % O-Bromphenolblau, 0.25 % Xylen-Cyanolblau
Laemmli Probenpuffer (3x)	 360 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6 % SDS, 30 % Glycerol, 5 % β-Mercaptoethanol, 0.05 % O-Bromphenolblau
PBS-Puffer	0.14 M NaCl, 2.7 mM Kcl, 3.2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄
SDS-PAGE-Lauf-Puffer (1x)	25 mM Tris-HCL, 190 mM Glycerol, 0.1 % SDS, pH 8.3
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat, pH 7.0
TAE-Puffer (1x)	40 mM Tris-Acetat (pH 7.8), 2 mM EDTA (pH 8.0)

TBE-Puffer (1x)	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, pH 8.3
TE-Puffer (1x)	10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0
Western-Blot-Transfer-Puffer	50 mM Tris, 380 mM Glycin, 0.1 % SDS,
	20 % Methanol

4.3. Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue MRF	(Stratagene)	Bullock et al., 1987;	
		Jerpseth, 1992	
<i>Escherichia coli</i> DH 5α MRC	(Gibco-BRL)	Hanahan, 1983	

4.4. Vektoren

pBluescript KS+/SK- (Klonierungsvektor, Stratagene)		Short et al, 1988;	
		Alting-Mees und Short, 1989	
pCR 2.1 TOPO-TA	(Klonierungsvektor, Invitrogen)		
pCS2	(Eukaryotischer Expressionsvektor)	Roth et al., 1991	
pCS2 + MT	(Myc-Epitop beinhaltender		
	eukaryotischer Expressionsvektor)	Roth et al., 1991	
pCS2 + NLS + MT	(Myc-Epitop und NLS beinhaltender		
	eukaryotischer Expressionsvektor)	Roth et al., 1991	

pTV-O	(Rekombinationsvektor;	Marsh et al., 1984
	Gabe von Dr. D. Riethmacher,	
	Grundgerüst: pIC19R)	
pTV Flox-O	(Rekombinationsvektor;	
	Gabe von Dr. D. Riethmacher,	
	Grundgerüst: pTV-O, Dr. D. Riethmacher)	
ploxP-DR16	(enthält loxP-Sequenz,	
	Gabe von Dr. D. Riethmacher)	
pPGKCrebpA	(Cre-Expressionsvektor, Gabe von	
	Dr. M. Bösl, Transgene Tiereinheit, ZMNH)

4.5. Mausstamm

Die verwendeten C57BL/6-Mäuse stammten aus eigener Zucht oder wurden aus der Tierhaltung des ZMNH von der Tierpflegerin Janina Nest bereitgestellt.

4.6. Nukleotide

Alle verwendeten Nukleotide stammten, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Boehringer, Mannheim und MBI-Fermentas, St.Leon-Rot.

4.7. Oligonukleotide

Genspezifische Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt. Alle Oligonukleotide wurden lyophilisiert geliefert und dann mit ddH₂O auf

eine Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt. Eine Auswahl der wichtigsten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

Die verwendeten Plasmid-Universalprimer (T3, T7, M13 und SP6) wurden von der Firma Boehringer, Mannheim bezogen.

4.8. Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs; Boehringer, Mannheim und MBI-Fermentas, St.Leon-Rot, bezogen.

4.9. Enzyme (ohne Restriktionsenzyme)

Folgende modifizierende Enzyme wurden eingesetzt:

Klenow-Fragment, Taq-Polymerase, Lysozym, Proteinase K und RNase von Boehringer, Mannheim sowie T4-DNA-Ligase und Alkalische Phosphatase von MBI-Fermentas, St.Leon-Rot.

4.10. Antikörper

4.10.1. Primäre Antikörper

Polyklonaler Antikörper gegen RLIM aus Kaninchen	Verdünnung	1:3000
(hergestellt von Dr. H.P. Ostendorff)	in Western-B	lots
Polyklonaler Antikörper gegen CLIM1 aus Kaninchen (hergestellt von Dr. H.P. Ostendorff)	Verdünnung in Western-B	1:3000 lots
Polyklonaler c-myc-Antikörper (Kaninchen IgG, Santa Cruz)	Verdünnung in Western-B	:3000 lots

Aktin-Antikörper aus Kaninchen (Santa Cruz)Verdünnung 1:3000
in Western-BlotsTubulin-Antikörper aus Maus (Sigma)Verdünnung 1:25000
in Western-Blots

4.10.2. Gekoppelte sekundäre Antikörper und Protein A

Protein A Meerettich-Peroxidase (HRP, Biorad)	Verdünnung	1:3000
	in Western-Blo	ots
Anti-Maus Meerettich-Peroxidase (HRP, Biorad)	Verdünnung	1:5000
	in Western-Blo	ots

4.11. Zellkulturmedien

4.11.1. Fibroblasten-Medium

- 500 ml Dulbecco's MEM (high glucose) mit Glutamax-I, 4500 mg/ Glukose, mit Pyridoxin und Na-Pyrovat (Gibco-BRL)
- 50 ml Fötales Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 56°C für 30 min; Gibco-BRL)
- 5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x NEAA, Gibco-BRL)
- 5 ml Glutamin (100x, Gibco-BRL)
- 5 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin/ 10000 μg/ml Streptomycin, Gibco-BRL)

4.11.2.	ES-Zellmedium
500 ml	Dulbecco's MEM (high glucose) mit Glutamax-I, 4500 mg/ Glukose, mit Pyridoxin und Na-Pyrovat (Gibco-BRL)
75 ml	Fötales Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 56°C für 30 min; Gibco-BRL).
	Das FCS wurde speziell auf die Bedürfnisse von ES-Zellen hin ausgetestet.
5 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren (100x NEAA, Gibco-BRL)
5 ml	Glutamin (100x, Gibco-BRL)
5 ml	Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin/ 10000 µg/ml Streptomycin, Gibco-BRL)
1.2 ml	50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco-BRL)
100 µl	LIF (10 µg/ml, Chemicon)
	LIF (Leukemia inhibitory factor) hält die ES-Zellen in ihrem pluripotenten, undifferenzierten Zustand.

Die Schalen, Platten und Pipetten für die Zellkultur wurden von der Firma Renner, Darmstadt, bezogen.

5. Methoden

5.1. Allgemeine Methoden

5.1.1. Anzucht von Escherichia coli

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E.coli*) erfolgte in LB-Medium (Luria-Bertani/1% (w/v) Bacto-Trypton; 1% (w/v) Hefeextrakt; 0.5 % (w/v) NaCl, pH 7.0) unter ständigem Schütteln bei 37°C. Für die Anzucht auf LB-Platten wurde dem LB-Medium 2% (w/v) Agar zugegeben. Bei *E.coli*-Stämmen, die Plasmide mit dem β -Lactamase-Gen als Selektionsmarker enthielten, wurde zu den LB-Medien Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben. Im Falle einer Plasmid-vermittelten Kanamycinresistenz wurde zu den Medien Kanamycin (100 µg/ml) gegeben.

Für die blau/weiß-Selektion der Transformanten über die β -Galaktosidaseaktivität wurde den LB-Ampicillin-Platten zusätzlich noch X-Gal (80 µg/l) und IPTG (48 µg/l) zugegeben.

5.2. Herstellung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten

5.2.1. Agarosegelelektrophorese (nach Sambrook et al., 1989)

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Eine effektive Auftrennung der Fragmente erfolgte in 0.6 - 2.0 %igen (w/v) Agarosegelen nach dem Molekulargewicht im elektrischen Feld der Elektrophorese. Die Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Spannung beeinflußt. Der Bereich zur Auftrennung von linearer DNA liegt bei den

0.6 %igen Gelen bei 0.5 - 20 kb, bei den 1 %igen Gelen bei 0.5 - 10 kb und bei den 2.0 %igen Gelen bei 0.3 - 6.0 kb.

Die Elektrophoresen wurden in Flachbettapparaturen durchgeführt, in denen sich auf einer Trägerplatte gegossenes Agarosegel befand. Die Agarose wurde dazu in den für die jeweilige Elektrophorese benutzten Laufpuffern aufgekocht und nach Abkühlung auf 50-60°C in das Gelbett gegossen. Die Gele für die Southern-Blot-Hybridisierungen wurden mit 1x TAE-Laufpuffer angesetzt, für alle anderen Gele wurden 1x TBE-Laufpuffer verwendet. Durch die Möglichkeit zur Variation der Geldicke, der Größe der Geltaschen bzw. der Wahl des Gelkammes, konnten Probenvolumen von mindestens 5µl bei analytischen Gelen und bis zu höchstens 150 µl bei präparativen Gelen aufgetragen werden. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt. Diese Puffer erlauben wegen ihrer hohen Dichte eine Beladung der Taschen des bereits im Laufpuffer befindlichen Gels durch Unterschichtung. Außerdem ermöglichten die beigefügten Farbstoffe (O-Bromphenolblau und Xylen-Cyanol) eine Überwachung des Probenauftrags und eine Verfolgung des Fortschreitens der Gelelektrophorese. Zur Kontrolle und Abschätzung der Fragmentgrößen wurde zusätzlich Marker- bzw. Standard-DNA mit aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurden mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III verdaute λ -DNA und verschiedene DNA-Längenstandards der Firma MBI-Fermentas verwendet. Die Elektrophoresen wurden bei 8-12 V/cm Gellänge durchgeführt. Nach dem Gellauf konnte die ethidiumbromidgefärbte DNA unter UV-Licht analysiert und bei Bedarf fotografiert (Video copy processor P68E, Mitsubishi) werden.

5.2.2. Ethidiumbromidfärbung

DNA-Banden in Agarosegelen können durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden, da dieser Farbstoff unter ultravioletter Bestrahlung fluoresziert. Hierfür wurde den Gelen vor dem Gießen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.1µl/ml zugegeben. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator mit einer Wellenlänge von 254 nm belichtet. Zur Dokumentation konnten die Gele fotografiert werden.

5.2.3. Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Konzentrationen wässriger Nukleinsäurelösungen wurden photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt (Sambrook et al., 1989). Die Quantifizierung erfolgte in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und dem Ultrospec 3000-Photometer (Pharmacia). Der bei 260 nm gemessene Wert ermöglichte die Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung. Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- und doppelsträngige DNA als auch für RNA das Absorptionsmaximum. Der 280 nm-Wert zeigte eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder Phenolresten an. Die reine DNA sollte ein Verhältnis der Ratio260/280 von ungefähr 1.8 aufweisen. Kleinere Verhältnisse deuteten auf eine Verunreinigung hin. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 μ g/ml für doppelsträngige (ds) DNA sowie 20 μ g/ml für einzelsträngige (ss) DNA und 40 μ g/ml für RNA.

Eine ausreichend gute Abschätzung von Nukleinsäure-Konzentrationen ließ sich auch mit der Testgel-Methode (Sambrook et al., 1989) erreichen. Hierbei wurden die Fluoreszenz-Intensitäten von Nukleinsäure-Banden in ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen mit Standard-DNA verglichen. Ein Vorteil dieser Methode kann darin gesehen werden, dass es möglich ist, eine gleichzeitige Qualitätskontrolle der aufgetragenen Nukleinsäure durchzuführen.

5.2.4. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für Restriktionsanalysen und Verdauung von DNA-Molekülen wurden die Restriktionsenzyme (Typ II) der Firmen MBI-Fermentas und New England Biolabs verwendet. Die Inkubationstemperatur und der verwendete Puffer waren vom jeweils benutzten Enzym abhängig und wurden gemäß der Angaben der beiden Enzymhersteller gewählt. Neben den jeweils mitgelieferten optimalen Puffern für die Enzyme, wurde zur Stabilisierung bei einigen Restriktionsenzymen BSA in einer Endkonzentration von 0.1 mg/ml zugegeben. Die Inkubationszeiten betrugen in der Regel mindestens 2-3 Stunden. Das Gesamtvolumen pro Restriktionsansatz betrug mindestens 20 μ l. Das Enzymvolumen sollte dabei nicht über $\frac{1}{10}$ des Reaktionsvolumens hinausgehen. Bei der Restriktion größerer Mengen DNA für Klonierungsansätze oder genomischer DNA wurden das Reaktionsvolumen und die Enzymmenge erhöht und die Inkubationszeit verlängert. In der Regel wurden 1-2 U eines Enzyms pro μ g DNA eingesetzt. Bei Doppelverdaus wurde nur jeweils die Hälfte der sonst verwendeten Enzymmenge eingesetzt. Der Verlauf und die Analyse der Restriktionen wurden über den Auftrag eines Aliquots auf ein Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromidanfärbung kontrolliert.

Die meisten Restriktionsenzyme konnten mit einer Inkubation von 20 min bei 60°C inaktiviert werden. Die Reaktion konnte aber auch durch eine Phenolextraktion oder durch die Zugabe von Probenpuffer mit anschließender Gelelektrophorese gestoppt werden.

5.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die DNA-Reinigungssysteme der Firmen Millipore (Ultrafree DA) und Qiagen (QIAspin Gel Extraction Kit) verwendet. Für die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die betreffende Bande zuerst mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend in die jeweiligen Reaktionsgefäße überführt.

Bei der Ultra-DA-Methode wurde das Gelstück in Mikrozentrifugationssäulen gegeben und bei 5000 xg für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417). Das Eluat konnte sofort weiterverwendet werden. Bei der Methode der Firma Qiagen wurde die Agarose in 3 Volumen eines Puffers mit einer hohen Salzkonzentration bei 37 - 55°C gelöst und die DNA anschließend an eine Trägermatrix gebunden. Nach einigen Waschschritten wurde die DNA mit einem 1 x TE-Puffer bei 37 - 55°C wieder eluiert. Ein Vorteil dieser Methode war, dass die Puffermenge zur Elution dabei sehr gering gehalten werden konnte und somit die DNA aufkonzentriert wurde.

5.2.6. Phenol-/Chloroform-Extraktion

Die Phenolisierung ist die Standard-Extraktionsmethode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen (Sambrook et al., 1989). Phenol dissoziiert Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten, während Chloroform Proteine denaturiert und die Phasentrennung erleichtert.

Hierfür wurden DNA-haltige Lösungen mit dem gleichen Volumen eines wassergesättigten Phenol-/Chloroform-Gemisches (1:1,w/v) versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung bei 12000 xg für 5 min zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je einem Volumen Chloroform die restliche Phenollösung entfernt. Die obere DNA-enthaltende Phase wurde abgenommen und die DNA anschließend durch eine Ethanolfällung ausgefällt.

5.2.7. Ethanolfällung

Nukleinsäuren können durch Zugabe von 2 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt werden, da auf diese Weise den Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen wird (Sambrook et al., 1989). Die Zugabe von monovalenten Kationen, Na⁺ auf 0.3 M Endkonzentration als Acetat, ändert selektiv die Löslichkeit der DNA und erhöht dadurch die Effizienz der Ethanolfällung.

Durch Zugabe von 0.1 Volumen 3M Na-Acetat-Lösung (pH 5.4) und 2 Volumen Ethanol wurde die DNA 30 min bei -80°C gefällt. Danach wurde das DNA-Präzipitat für 15-30 min bei 12000 xg abzentrifugiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem gewählten kleinen Volumen 1x TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen.

5.2.8. Herstellung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur exponentiellen in vitro-Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten (Mullis et al., 1986). Hierzu benötigt man zwei synthetische Oligonukleotid-Primer, die an die beiden Enden (5'-3'-Richtung, freie OH-Gruppe am 3'-Ende) des zu amplifizierenden DNA-Bereiches (Template-DNA) hybridisieren. In einem Hitzeschritt (Denaturation) wird die Doppelstrang-DNA mit dem zu amplifizierenden Bereich denaturiert. Die Reaktionsbedingungen sind dabei so eingestellt, dass im folgenden die Primer spezifisch mit der Einzelstrang-DNA renaturieren (Annealing), so dass im Syntheseschritt (Extension) sowohl Primer als auch eine Matrize für die Kettenverlängerung zur Verfügung stehen. Durch die Wiederholung dieses Zyklus aus Denaturierung (94°C), Anlagerung von Primern (Temperatur ist Primer-abhängig) und davon ausgehender Komplementärstrangsynthese (72°C) durch eine hitzestabile DNA-Polymerase erreicht man eine Vermehrung des DNA-Fragmentes zwischen den Primern. Der Zyklus sollte 20-40 mal durchlaufen werden. Die Reaktionsansätze wurden standardmäßig in einem Volumen von 50 µl vorgenommen und enthielten neben 20-100 ng Template-DNA, 50 mM Kcl, 1-4 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.08 % Nonidet P40 (NP-40), dNTPs mit je 250µM, 100 ng von jedem Primer und 1-2 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas). Zur Amplifikation genomischer DNA-Fragmente beim Aufbau von Rekombinationskonstrukten wurde das ExpandTMLong Template PCR System (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dieses System verfügte über DNA-Polymerasen mit Korrekturlese-Funktion. Die PCR-Ansätze wurden auf einem PTC-2000 Peltier Thermal Cycler der Firma MJ Research durchgeführt. Die PCR-Ergebnisse wurden in einer Gelelektrophorese überprüft und ausgewertet. Die Amplifikationsprogramme wurden den jeweiligen Anforderungen angepaßt

5.2.9. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird als Template-DNA eine aus Gesamt-RNA oder mRNA synthetisierte cDNA eingesetzt. Die cDNA wurde mit dem SuperScriptTM II Reverse Transcriptase System (Invitrogen/Life Technologies) synthetisiert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit 2 μ g einer Gesamt-RNA. Für alle Schritte der RT-PCR wurde ausschließlich DEPC-H₂O verwendet. Die RNA wurde zuerst bei 70-80°C für 3 min denaturiert und der Reaktionsansatz wurde anschließend auf Eis zusammenpipettiert. Er enthielt neben der Gesamt-RNA, 2 μ l DTT (0.1 M), 4 μ l eines 5x Reaktionspuffers (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 μ l Random Hexamers (3 μ g/ μ l), 4 μ l dNTP-Mix mit je 2.5 mM, 1 μ l Super Script Reverse Transkriptase (200 U/ μ l) und 0.5 μ l RNase-Inhibitor. Der Ansatz wurde 1 h bei 42°C inkubiert, die Reaktion anschließend durch eine Inkubation bei 100°C für 2 min abgestoppt und dann sofort auf Eis gelagert. Für die RT-PCR wurden dann 4 μ l des Ansatzes eingesetzt. Die verbleibende cDNA konnte bei -80°C für mehrere Monate aufbewahrt werden. Der Reaktionsansatz und die Durchführung der PCR erfolgte wie schon unter Punkt 5.2.8. beschrieben.

5.2.10. 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *Rnf12*-Gens wurde eine 5'-RACE (<u>Rapid Amplification of cDNA Ends</u>) von der Firma Gibco BRL durchgeführt. Dies ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäure-Sequenzen einer mRNA-bzw. cDNA-Matrize zwischen einem definierten internen Punkt und möglicherweise unbekannten Sequenzen am 5'-Ende der mRNA. Als Template wurde hierfür cDNA verwendet.

Die Synthese des cDNA-Erststranges erfolgte wie unter 5.2.9. beschrieben. Hierfür wurde Gesamt-RNA von Ganzembryonen der embryonalen Stadien E9.5 und E13.5 verwendet. Die folgenden Schritte der 5'-RACE erfolgten nach den Angaben des

Herstellers. Die Amplifikationen wurden als "nested PCR" durchgeführt. Hierbei kam ein zweiter Oligonukleotid-Primer-Satz zum Einsatz. Die bereits mit den ersten Primern kopierte DNA wurde in einer neuen Reaktion mit dem zweiten Primerpaar eingesetzt. Die neuen Primer waren dabei innerhalb des ersten Paares plaziert.

Die 5'-RACE-PCR-Produkte wurden anschließend in die pCR 2.1-TOPO-Vektoren des TOPO-TA-Cloning Kit-Systems der Firma Invitrogen kloniert und mit Universalprimern sequenziert.

5.2.11. Modifizierung von DNA-Enden

5.2.11.1. Dephosphorylierungen von 5'-Enden

Eine Religation von Vektoren kann durch die Entfernung der Phosphatgruppen am 5'-Ende mit Hilfe von alkalischen Phosphatasen verhindert werden. Alkalische Phosphatasen sind Phosphomonoesterasen, die 5'-Phosphate von DNA-Enden abspalten können. Sie sind somit vor einer Insertionsligation zur Dephosphorylierung von Vektoren geeignet. Da die T4-DNA-Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wird durch die Behandlung gespaltener Vektor-DNA mit einer alkalischen Phosphatase die Religation des Vektors vermieden, wodurch der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz steigt. Hierfür mussten die linearisierten Vektoren zuerst umgepuffert werden. Dazu wurde die Vektor-DNA mit Ethanol gefällt, das Pellet gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen. Nach Zugabe von 1 μ l alkalischer Phosphatase (1 U/ μ l; Boehringer, Mannheim) und 10x AP-Puffer wurde bei 37°C für 1-2 h inkubiert. Zur DNA-Reinigung erfolgte eine Phenol-/Chloroform-Extraktion und eine erneute Ethanolfällung. Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in ddH₂O aufgenommen.

5.2.11.2. Auffüllung überhängender 5'-Enden

Für einige molekularbiologische Verfahren waren DNA-Fragmente mit glatten ("blunt ends") Enden notwendig. Überhängende 5'-Enden wurden dabei durch das Klenow-

Fragment (Boehringer, Mannheim) der *E.coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt. Ein 50 μ l-Reaktionsansatz enthielt dabei neben dem DNA-Fragment (0.5-5 μ g), 5 μ l 10x NT-Puffer, 4 μ l dNTP-Mix mit je 2.5 mM und 1 U Klenow-Fragment. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Phenolisierung beendet und die aufgefüllten DNA-Fragmente durch Ethanolfällung isoliert.

5.2.12. Radioaktive Markierung von DNA

5.2.12.1. Radioaktive Markierung von 3'-Enden

Die radioaktive Markierung von 3'-Enden eines doppelsträngigen DNA-Moleküls erfolgte durch Auffüllung der überhängenden 5'-Enden durch das Klenow-Fragment (5.2.11.2.), wobei 50-100 ng des zu markierenden DNA-Fragments eingesetzt und nicht-radioaktives dCTP durch 10 μ Ci α -³²P-dCTP ersetzt wurde.

5.2.12.2. Markierung von DNA durch "Random-Primer"

Für diese Art der radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten wurde das Random Primer Labbeling Kit der Firma Gibco-BRL verwendet. Diese Methode produzierte markierte DNA mit besonders hoher spezifischer Aktivität (bis 10⁹ cpm/µg). Hier sorgte das Klenow-Fragment für die Auffüllung der 3'-terminalen Enden von Random Hexamer-Primern.

Ungefähr 20-40 ng verdauter, gelaufgereinigter dsDNA wurden auf ein Volumen von 22 μ l mit ddH₂O aufgefüllt und bei 95°C für 3 min denaturiert. Durch schnelle Abkühlung auf Eis wurde die Rehydrierung der Einzelstränge verhindert. Der wässrigen DNA-Lösung wurden 2 μ l 0.5 mM dATP, 2 μ l 0.5 mM dGTP2 μ l 0.5 mM dTTP, 15 μ l eines Gemisches aus degenerierten Primern (18 OD₂₆₀-Einheiten pro μ l Hexa-Desoxyribonukleotid-Primer in 0.67 M HEPES, 0.17 M Tris-HCl (pH 6.8), 17 mM MgCl₂, 33 mM β -Mercaptoethanol, 1.33 mg/ml BSA), 50 μ Ci α -³²P-dCTP sowie

3 U Klenow-Fragment zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 0.2 M Na-EDTA pH 7.5 abgebrochen.

5.2.12.3. Isolierung radioaktiv markierter DNA

Für die Abtrennung der nach der radioaktiven Markierung nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide von der dsDNA wurden die Mini Quick Spin Columns der Firma Boehringer, Mannheim verwendet. Die Sephadexgelfiltrationssäulen wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die gesamte Reaktion einer radioaktiven Markierung wurde jeweils auf eine Säule gegeben und mit 4000x g für 4 min durch die Matrix gepresst. Die markierte und aufgereingte DNA konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

5.2.13. Klonierung von DNA-Fragmenten

5.2.13.1. Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearer Vektor-DNA wurde der jeweilige Vektor mit einem oder einer Kombination von Restriktionsenzymen geschnitten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel geladen. Anschließend wurde die DNA durch Phenolisierung und Ethanolfällung gereingt. Zur Verhinderung einer Religation der Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert worden war, wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

5.2.13.2. Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Amplifikation und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte wie unter den Punkten 5.2.5., 5.2.8., 5.2.9. und 5.2.10. beschrieben. Wenn die Primer künstliche Restriktionsschnittstellen enthielten, wurden die Fragmente zuerst mit den passenden

Restriktionsenzymen geschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt, bevor die Fragmente für die Ligation in einen präparierten Vektor eingesetzt wurden.

Die PCR-Fragmente konnten aber auch zuerst nach den Angaben des Herstellers in den pCR.2.1-TOPO-Vektor des TOTO-TA Cloning Kit Systems (Invitrogen/Life Technologies) kloniert werden. Die Taq-Polymerase hängt einzelne Adeninreste an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Der linearisiert vorliegende TOTO-Vektor besitzt überhängende 3'-Thyminreste, welches zum einen eine effiziente Ligation von PCR-Produkten erlaubt und zum anderen die Selbst-Ligation von Vektor-DNA reduziert. Nach der Transformation und Vermehrung des Vektors in optimierten *E.coli*-Bakterien, konnten aus diesem Vektor die DNA-Fragmente herausgeschnitten und in andere Vektoren einkloniert werden.

5.2.13.3. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Für intermolekulare Ligationen von DNA-Fragmenten mit überstehenden (kohäsiven, "sticky ends") und glatten ("blunt ends") Enden wurde die T4-DNA-Ligase (MBI-Fermentas) verwendet. Die Ligationen wurden möglichst in einem kleinen Volumen (höchstens 10 μl) vorgenommen. Der Reaktionsansatz wurde dabei mit einem mitgelieferten Reaktionspuffer auf 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP eingestellt und mit 1 μl T4-Ligase (1.5 U/μl) über Nacht bei 16°C inkubiert. Alternativ wurden die Ansätze über Nacht auf tauendem Eis stehengelassen. Bei den Ligationen wurde ein molekulares Vektor-/Insert-Verhältnis von 4:1 bzw. 5:1 gewählt. Waren intramolekulare Reaktionen gewünscht, wurde das Reaktionsvolumen möglichst groß gehalten (bis 400 μl).

5.2.13.4. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Eine 5 ml LB-Vorkultur wurde mit einer Einzelkolonie eines *E.coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Von der Vorkultur wurden 3 ml zur Beimpfung einer 150 ml-LB-Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultur enthielt ebenfalls 10 mM MgCl₂ und wurde solange bei 37°C geschüttelt bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase (mid-log Phase) erreicht hatten. Diese Phase wurde erreicht, wenn die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ von 0.45-0.5 ergab. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert (Beckman J2-21 M/E-Zentrifuge; Rotor JA 10) und der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet. Das Zell-Pellet wurde anschließend in 50 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für weitere 30 min bei gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus, Hannover). Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung (+ 15 % Glycerol) resuspendiert und über Nacht auf Eis bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension auf Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

5.2.13.5. Transformation von Bakterienzellen

Die kompetenten Bakterienzellen wurden zuerst langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA (1-25 ng) wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für 90 sec ein Hitzeschock bei 42°C. Der Ansatz wurde sofort wieder auf Eis abgekühlt und dort für mindestens 10 min inkubiert. Die transformierten Zellen wurden zur Stabilisierung ihrer Zellwände in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium überführt und für 30-45 min bei 37°C und bei 150-200 rpm schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden dann auf antibiotikahaltige LB-Platten (0.1 mg/ml Ampicillin oder 0.1 mg/ml Kanamycin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Ein Teil der Kolonien wurde in antibiotikumhaltigen LB-Flüssigmedien im analytischen Maßstab angezüchtet und die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsverdau und anschließende Agarosegelelektrophorese analysiert.

5.2.14. Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierungsarbeiten wurden von der Service-Einheit "DNA-Sequenzierung" des ZMNH durchgeführt. Diese Gruppe wird geleitet von Dr.W.Kullmann und Frau Däumigen-Kullmann. Für die Sequenzierungen wurden pro Ansatz maximal 800 ng dsDNA und 10-15 pmol Primer in einem Totalvolumen von 8 µl benötigt. Die Sequenzierungen wurden nach den Angaben des Herstellers mit einem ABI Prism TM377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer) unter Verwendung des ABI PrismTM-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kits (Perkin Elmer) durchgeführt. Der Sequenzierungsmethode liegt Prinzip des das Kettenabbruchverfahrens zugrunde. Als Sequenzierungsprimer wurden sowohl Universalprimer als auch synthetische Oligonukleotide verwendet.

5.3. Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

5.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (STET-Präparation)

Für diese Plasmid-Minipräparation wurden 1.5 ml einer 5 ml-Übernachtkultur 5 min bei 6000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5417) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 350 μ l STET-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, 8 % Sucrose, 0.5 % Triton X-100) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 20 μ l Lysozym (10 mg/ml) wurde der Ansatz erneut gemischt und wieder 5 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 2 min bei 95°C aufgekocht und dann 10 min bei 14000 rpm bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde aus dem Reaktionsgefäß entfernt, der Überstand mit 25 μ l Phenol versetzt, geschüttelt und dann mit 400 μ l Isopropanol aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde durch Inversion vorsichtig gemischt und für 5 min bei 14000 rpm bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 μ l 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und in 50-100 μ l 1x TE-Puffer mit RNase (20 μ g/ml) aufgenommen.

5.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde mit Plasmid "Maxi-Präparations-Systemen der Firmen Qiagen und Gibco-BRL durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen einer 200 ml (bei "multi copy"-Vektoren) bzw. 500 ml (bei "low-copy"-Vektoren) Übernachtkultur benötigt. Die Zellen wurden zuerst bei 6000 rpm für 10 min bei 4°C (Beckman J2-21 M/E Zentrifuge, JA 10-Rotor) abzentrifugiert. Die Plasmide wurden anschießend nach den Angaben der Hersteller mit dem QIA-Filter Plasmid Maxiprep Kit (Qiagen) oder dem Concert High Purity Plasmid Maxiprep Kit (Gibco-BRL) isoliert.

5.4. Isolierung und Reinigung von genomischer DNA

5.4.1. Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen

Für den Nachweis von homologen Rekombinationen in embryonalen Stammzell-Klonen (ES-Zell-Klonen) mittels Southern-Hybridisierung wurde die genomische DNA in 96 Loch-Platten präpariert (Ramirez-Solis et al., 1992). Die auf gelatinierten 96 Loch-Platten konfluent gewachsenen ES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in je 50 μ l ES-Zell-Lysispuffer (10 mM Tris-HCL (pH 7.5), 10mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5 % N-Lauroylsarcosin, 200 μ g/ml Proteinase K) bei 55-60°C in einer mit Parafilm abgedichteten Feuchtkammer über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ l eiskaltem absoluten Ethanol mit $\frac{1}{20}$ Volumen 5 M Natriumchlorid pro Loch wurde die DNA für 30 min bei RT gefällt. Anschließend wurden die Überstände abgegossen, die DNA zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und für etwa 20 min luftgetrocknet. Die DNA wurde mit je 100 μ l 1x TE-Puffer pro Loch gelöst.

Nach einem Restriktionsverdau konnte die genomische DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel zur Southern-Hybridisierung eingesetzt werden.

5.4.2. Isolierung von hochreiner genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen

Die Schwanzspitzen (ca. 0.5 cm) adulter Mäuse wurden jeweils mit 500 µl Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl, 1% SDS) in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Dann wurde jeweils 20 µl Proteinase K (14 mg/ml) zugegeben und die Ansätze über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert.

Danach wurde pro Ansatz 10 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und die Ansätze für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion der Proteine wurden die Ansätze mit je 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und für 30-60 min kopfüber rotiert. Anschließend erfolgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 14000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5417). Die Überstände wurden für die DNA-Fällung vorsichtig abpipettiert. Dafür wurde den Überständen je 50 µl 3M Na-Acetat-Lösung (pH 7.0) zugefügt, gemischt und für 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Dann wurden die Pellets mit je 500 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Die DNA-Pellets wurden luftgetrocknet und in jeweils 200-400µl 1x TE-Puffer aufgenommen.

5.4.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzgewebe

Das Schwanzgewebe adulter Mäuse wurde in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit jeweils 200 μ l Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.9), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.45 % NP-40, 0.45 % Tween 20 , 25 μ g/ml Proteinease K) versetzt und über Nacht bei 55°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 165 μ l Isopropanol zugefügt und die genomische DNA durch mehrfaches Invertieren der Reaktionsgefäße gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 20 min pelletiert, in 500 μ l 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich in 200-400 μ l ddH₂O resuspendiert. 4 μ l dieser Lösung wurden für die Genotypisierung in der PCR-Reaktion eingesetzt.

Zur DNA-Isolierung für Southern-Hybridisierungen wurde murines Schwanzgewebe mit einem Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.5; 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 %SDS, 100 μ g/ml Proteinase K) über Nacht bei 55°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Nach Phenol-/Chloroform-Extraktion der Lösung wurde die DNA gefällt und das Präzipitat in 100 μ l 1x TE-Puffer aufgenommen.

5.5. Identifikation von DNA-Fragmenten durch Southern-Hybridisierung

5.5.1. DNA-Transfer aus Agarosegelen auf Membranen

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mittels Standard-Methode auf Membranen transferiert (Sambrook et al., 1989). Die verdaute DNA wurde über ein 0.8 %iges Agarosegel (in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter leichtem Schütteln in 0.25 M HCI-Lösung für 30 min inkubiert. Dieser Schritt führte zur Depurinierung und somit zur Spaltung der DNA-Fragmente. Dadurch verbesserte sich der Transfer langer (> 5 kb) DNA-Fragmente. Danach wurde das Gel kurz in ddH₂O gewaschen und anschließend für 30 min in einem Denaturierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierdurch wurde die DNA in hybridisierbare Einzelstränge denaturiert. Dann folgte eine 30 minütige und nach einem Pufferwechsel eine weitere 15 minütige Inkubation in einem Neutralisierungspuffer

(0.5 M Tris-HCl (pH 7.5, 1.5 M NaCl). Anschließend wurde das Gel 30 min in 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat) äquilibriert. Gleichzeitig wurde eine DuraloseTM-Membran (Stratagene) 5 min mit ddH₂O befeuchtet und dann mindestens 10 min in 20x SSC äquilibriert. Der Transfer der DNA erfolgte für mindestens 12-16 h über den 20x SSC-Diffusionsgradienten mittels Kapillarkraft auf die Membran. Hierfür wurde das DNA-enthaltende Agarosegel auf eine Blotting-Apparatur, die mit 20x SSC getränkten Whatman 3MM-Filterpapieren bedeckt war, überführt. Eine Duralose-Membran wurde luftblasenfrei in Gelgröße aufgelegt. Auf die Membran wurden 5-10 weitere, mit 20x SSC getränkte, Whatman 3MM-Filterpapiere der gleichen Größe gelegt. Darüber wurden, bis zu einer Höhe von 10 cm, Einweg-Handtuchpapiere geschichtet und der Aufbau mit einem Gewicht von ca. 500-1000 g beschwert.

Die DNA wurde nach der Übertragung auf die Membran durch UV-Bestrahlung beider Membranseiten mit 120000 μ J/cm² in einem UV-Crosslinker-Gerät (UV-Stratalinker 2400, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

5.5.2. Hybridisierung von genomischer DNA nach Transfer auf Membranen

Die präparierte Duralose-Membran wurde in eine 100 ml Glasröhre (Schott) überführt und in 10 ml Prähybridisierungslösung (50 % Formamid (v/v), 5x SSC, 5x Denhardt-Reagenz, 0.1 %SDS, 100 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA) für mindestens 1 h bei 42°C in einem Rollofen (Biometra) prähybridisiert. Danach folgte die Zugabe der mit α -³²P-dCTP markierten Sonde. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Danach wurde die unspezifisch gebundene Sonde durch folgende Waschschritte entfernt: in Puffer 1 (2x SSC/0.1 %SDS) für 30 min bei RT, dann für 30 min bei 65°C und zuletzt in Puffer 2 (0.2x SSC/0.1 % SDS) für weitere 30 min bei 65°C. Anschließend wurde die Membran im feuchten Zustand in Saran-Folie verpackt. Auf diese Membran wurde ein Röntgenfilm (X-OMAT-Blue-Film und Biomax, Kodak) aufgelegt und bei -80°C mithilfe einer signalverstärkenden Folie (Intensifier, Kodak) exponiert.

5.6. Präparation von RNA

5.6.1. Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Bei der Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen war besonders auf RNase-freies Arbeiten zu achten. Deshalb wurde beispielsweise ausschließlich DEPCddH₂O verwendet. DEPC-ddH₂O wurde hergestellt, indem man in ddH₂O 0.1 % DEPC löste, über Nacht bei 37°C inkubierte und abschließend autoklavierte. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das TrizolTM-Reagenz (Gibco-BRL) verwendet. Dafür wurden zuerst die Zellverbände mit einem Ultratorax (Kinematica) vereinzelt. Die Zellen wurden anschließend in Trizol aufgenommen und durch mehrmaliges vorsichtiges Aufund Abpipettieren lysiert. Nach der Überführung der Zellsuspension in sterile 15 ml-Polypropylenröhrchen (Greiner) wurde für 5 min bei RT inkubiert und dann pro ml Trizol 0.2 ml Chloroform zugegeben. Nach starkem Schütteln des Röhrchens mit der Hand für 15 sec folgte eine erneute Inkubation für 3 min bei RT mit anschließender Zentrifugation der Probe bei 9500 rpm für 18 min bei 4°C im JA 20 Rotor mit Adaptor (Beckman J2-21 M/E Zentrifuge, JA 10-Rotor). Die DNA-haltige wäßrige Phase wurde in ein frisches Polypropylenröhrchen überführt und mit 0.5 ml Isopropanol pro ml des anfänglich eingesetzten Trizol-Volumens versetzt, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 9500 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das RNA-Pellet mit 300 µl DEPC-ddH₂O gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 30 µl NaOAc und 2.5 Volumen absolutem Ethanol wurde die RNA gefällt. Dafür wurde die Probe gemischt und bei -80°C für mindestens 15 min gelagert. Dann folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5417) für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet für 5 min an der Luft getrocknet. Nach der Lösung des Pellets in 50 µl DEPC-H₂O konnte die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt werden. Die Gesamt-RNA konnte nun für die verschiedenen Experimente eingesetzt werden.

5.6.2. Herstellung von mRNA mittels in vitro-Transkription

Für die ektopischen Überexpressionsexperimente im Zebrafisch-System wurden die benötigten *in vitro*-transkribierten mRNAs mit dem mMessage mMachine Kit der Firma Ambion und der Sp6 RNA-Polymerase nach den Angaben des Herstellers transkribiert.

5.6.3. mRNA-Injektionen in Zebrafischembryonen

Mit in vitro-transkribierter mRNA war es möglich, in Zebrafischembryonen eine ektopische Überexpression der jeweils injizierten mRNA zu bewirken. Die mRNA wurde in den Dottersack von Zebrafisch-Embryonen im 1-4 Zellstadium injiziert. Nach 5 bzw. 24 hpf (hours post-fertilization) Entwicklungszeit wurden die Zebrafischembryonen für immunhistochemische Experimente, RNA-Isolierung oder Western-Blots präpariert bzw. aufgearbeitet. Die mRNA-Injektionen und die anschließenden immnunhistochemischen Analysen der injizierten Zebrafischembryonen wurden von Dr. Thomas Becker und Dr. Catherina G. Becker (Institut für die Biosynthese neuraler Strukturen, ZMNH) durchgeführt.

5.7. Proteinanalytische Methoden

5.7.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung proteinhaltiger Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Dabei wurden 800 μ l PBS mit 10 μ l der zu analysierenden Proteinlösung versetzt. Zu diesem Ansatz wurden 200 μ l der Färbstofflösung (Biorad) gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Aus der Extinktionsmessung bei 595 nm konnte die Proteinkonzentration anhand einer mit BSA erstellten Eichgerade berechnet werden.

5.7.2. Elektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen

Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele werden entsprechend ihrer Größe zur Auftrennung von Proteingemischen eingesetzt. Es wurden entweder kleine (10 x 10.5 x 0.5 mm, Hoefer MightySmall SE 245, Amersham Pharmacia) oder große (18 x 16 cm x 1.5 mm, Hoefer SE 600, Amersham Pharmacia) Vertikal-Gelsysteme verwendet. Die Gele setzten sich dabei aus einem unteren Polyacrylamid-Trenngel unterschiedlicher Prozentigkeit und einem oberen Sammelgel aus 5 % Polyacrylamid zusammen.

Die Lösung für ein 10 %iges Trenngel setzt sich aus 8 ml 30 %iger Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29:1), 6 ml Trenngellösung (1.5 M Tris-HCl; (pH 8.8), 0.4 % SDS) und 10 ml ddH₂O zusammen. Zur Polymerisation wurden 90 µl einer 20 %igen Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung und 20 µl TEMED zugesetzt. Die Gelapparaturen wurden bis ca. 3 cm unterhalb der oberen Glaskante mit der Gellösung befüllt. Zur Ausbildung einer geraden, luftblasenfreien Oberfläche wurde die Gellösung sofort mit ddH₂O oder 0.1 %iger SDS-Lösung überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das ddH₂O bzw. die SDS-Lösung abgenommen, das Trenngel mit der Lösung für das Sammelgel überschichtet und ein Gelkamm eingesetzt. Das Sammelgel setzte sich aus 1.67 ml der Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29:1), 2.5 ml Sammelgelpuffer

 $(0.5 \text{ M Tris-HCl} (\text{pH 6.8}), 0.4 \% \text{SDS}), 5.8 \text{ ml ddH}_2\text{O}, 20 \text{ µl 20 %iger APS-Lösung und}$ 8 µl TEMED zusammen. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in 3x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 3-5 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 100-130 Volt. Wenn die untere Ionenfront mit dem Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Die Proteine im Gel konnten nun zur Sichtbarmachung mit Coomassie-Blau-R250 angefärbt werden oder auf Nitrozellulose transferiert und im Western-Blot-Verfahren analysiert werden.

5.7.3. Färbung von denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Farbstoff

Nach der Elektrophorese wurde das Proteingel für 5 min in einer Coomassie-Färbelösung (1.1 g Coomassie-Blau-R250, 200 ml Methanol, 40 ml Eisessig, 200 ml ddH₂O) geschwenkt. Zur Entfernung nicht-gebundenen Farbstoffs wurde das Gel mit Entfärbungs-Lösung (50 % Methanol, 10 % Eisessig) behandelt. Nach der Entfärbung wurde das Gel auf Whatman-3MM-Filterpapier (Schleicher und Schüll) gelegt und in einem Vakuum-Geltrockner (Model 583, Biorad) bei 80°C für 1-2 h getrocknet.

5.7.4. Herstellung von Gewebehomogenaten für SDS-Polyacrylamid-Gele

Die Gewebeproben wurden möglichst ohne Flüssigkeit in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Für die Aufarbeitung wurden die Proben langsam auf Eis aufgetaut und ca. 1 μ l Lysis-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.5 % NP-40 und eine Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette (Roche, Mannheim) in 50 ml Gesamtvolumen) dazugegeben, d.h. je nach Gewebemenge auch mehr, z.B. bei gepoolten Zebrafischembryonen 1 μ l pro Embryo. Mit einem Pistell eines 0.1 ml Mikro-Homogenisators (Wheaton) wurde das Gewebe bei 4°C vollständig in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zermörsert. Der Pistell wurde möglichst gut abgestreift und sofort in Laemmli-Probenpuffer (Gesamtmenge sollte immer 20 μ l sein) eines weiteren 1.5 ml
Eppendorf-Reaktionsgefäßes gespült und dort ebenfalls gut abgestreift. Dieser Probenpuffer wurde dann vollständig zum zermörserten Gewebe zugegeben, kurz gemischt und anzentrifugiert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert. Alle Proben wurden danach bei 100°C für 5 min denaturiert, 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der gesamte Überstand aller Proben sofort auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dabei sollten möglichst keine Gewebeteilchen auf das Gel geladen werden. Die Proteine konnten anschließend auf Nitrozellulosemembran transferiert und durch den immunochemischen Nachweis analysiert werden.

5.7.5. Immunochemischer Nachweis von Proteinen durch das Western-Blot-Verfahren

5.7.5.1. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Transfer Proteinen SDS-Polyacrylamidgel Der von aus einem auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mit der Semi-Dry-Transfer-Methode. Für den Transfer wurde eine Graphitblot-Apparatur (Phase, Lübeck) verwendet. Vier Whatman-3MM-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran (Protran; Schleicher und Schüll, Dassel) wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden in Transferpuffer (50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycerin, 0.1 % SDS, 20 % Methanol) getränkt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran auf das Proteingel gelegt und beide zusammen auf beiden Seiten mit jeweils zwei Whatman-Filterpapieren umhüllt. Der ganze Stapel wurde anschließend zwischen die Graphitplatten gelegt, wobei die Nitrozellulosemembran zur Anode hin orientiert war. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 0.8 mA/cm² für 60-120 min.

5.7.5.2. Immunochemischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran mit einem Blockierungspuffer (3-5 g Non-Fett-Milchpulver in PBS) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Überschüssige Milch wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-T (PBS und 0.1 % Tween-20) für je 5 min bei RT entfernt. Dann wurde der gegen

das gesuchte Protein gerichtete primäre Antikörper, gelöst in 3 % Non-Fett-Milch (in PBS), zugegeben und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit PBS-T für je 5 min bei RT und danach dreimal mit PBS für je 5 min bei RT gewaschen. Dann wurde der sekundäre, an Peroxidase gekoppelte Antikörper, gelöst in 3 % Non-Fett-Milch (in PBS), zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Es erfolgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS-T für je 5 min bei RT und anschließend dreimaliges Waschen in PBS für je 5 min bei RT. Die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mit dem ECL- (Enhanced Chemiluminescence) Reagenz nach den Angaben der herstellenden Firma Amersham. Die Nitrozellulosemembran wurde 1-2 min mit der Lösung inkubiert. Anschließend wurde die ECL-Lösung wieder entfernt, die Nitrozellulosemembran luftblasenfrei in Frischhaltefolie verpackt und ECL-Filme (Hyperfilm-ECL, Amersham) auf der Membran mit unterschiedlicher Dauer exponiert. Zur Größenbestimmung diente ein vorgefärbter Proteingrößenmarker (Bench Mark Prestained Protein Ladder, Gibco-BRL).

5.8. Generierung von Knockout-Mäusen

5.8.1. Aufbau eines Rekombinationskonstrukts

Die Generierung einer Knockout-Maus beginnt mit dem Aufbau eines Rekombinationskonstruktes. Bei diesen Konstrukten werden die exogenen DNA-Abschnitte, die in ein bestimmtes Gen eingeführt werden sollen, mit zum Zielgen homologen chromosomalen Sequenzen flankiert, den sogenannten Homologieflanken. Nach der homologen Rekombination eines solchen Konstruktes kommt es beispielsweise zur Unterbrechung eines Gens (Hasty et al, 1991a; Johnson et al., 1989) oder zur Deletion eines ganzen bzw. von Teilen eines bestimmten Gens (Supp et al., 1996; Farmer et al., 1997). Beim Aufbau eines Konstruktes sollten einige Grundregeln beachtet werden (Capecchi, 1994). So nimmt die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination mit der Länge der Homologieflanke zu (Hasty et al., 1991b). Es gibt bestimmte Längen und Übereinstimmungen der Homologie, die für eine effiziente

Rekombination optimal sind (Hasty et al., 1991a; Hasty et al., 1991b). So sollten die Homologieflanken für eine effiziente homologe Rekombinationsreaktion mit mindestens einem Rekombinationsereignis pro Zelle eine Homologie von mindestens 5 kb bis höchstens 15 kb enthalten (Hasty et al., 1991b). Es ist allerdings auch schon dass eine Homologie von 472 bp für ein homologes gezeigt worden, Rekombinationsereignis ausreichend sein kann (Hasty et al., 1991b). Außerdem neigen Konstrukte, die mit zuviel homologen genomischen Sequenzen entworfen werden, bei der Bearbeitung zu vermehrten Strangbrüchen. Die Häufigkeit eines Rekombinationsereignisses ist darüber hinaus abhängig von der Zugänglichkeit des zu modifizierenden Gens. Zusätzlich kommt es auch zu zufälligen nicht-homologen Integrationen der Konstrukte in das Genom. Um diesen unerwünschten Integrationen entgegenzuwirken, enthalten die Rekombinationskonstrukte in der Regel Selektionsmarker. In meinen Konstrukten wurde hierfür ein virales Thymidinkinase-Gen verwendet. In Gegenwart der Thymidinkinase erhält das Nukleosid-Analogon Gancyclovir durch Phosphorylierung eine cytotoxische Wirkung (St.Clair et al., 1984). Bei nicht-homologer Rekombination und gleichzeitiger Integration der Thymidinkinase führt diese sogenannte negative Selektion schließlich zum Zelltod (Mansour et al., 1988). Nicht-homologe Rekombinationen treten 100- 1000 mal häufiger auf als korrekte homologe Rekombinationen. Mit der positiven Selektion werden dagegen nichtrekombinierte Zellen ausselektiert. Hierfür enthielten meine Konstrukte eine Neomycin-Resistenz-Kassette. Dieses Resistenzgen wird bei der Rekombination ko-integriert und schützt die ES-Zellen so vor Geneticin (G418), einem auch für Säugetierzellen toxisch wirkenden antibiotischen Wirkstoff (Thomas und Capecchi, 1987). So werden alle rekombinanten ES-Zellen selektioniert. Allerdings wird auf diese Weise eine nichthomologe Rekombination nicht ausgeschlossen.

Das fertige Rekombinationsprodukt wurde vor der weiteren Verwendung linearisiert und aufgereinigt. Die Linearisierung des Vektors ist essentiell, weil nur linearisierte Vektoren zu einer homologen Rekombination führen (Capecchi, 1994). Die darauf folgende Aufarbeitung des linearisierten Vektors war notwendig, da nur die Verwendung reiner exogener DNA (ohne Proteine oder andere Faktoren) zu einer effizienten Rekombination führen. Die homologe Rekombination geschieht sehr schnell. Nach der Penetration der exogenen DNA in den Kern, läuft die Rekombination innerhalb einer Stunde ab (Capecchi, 1994). Danach kommt es zu keinen weiteren Rekombinationsereignissen, da die exogene DNA bereits als Chromatin verpackt wurde.

5.8.2. Methoden in der Zellkultur

5.8.2.1. Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten, die sogenannten Feeder-Zellen, sind essentielle Bestandteile bei der Kultivierung von ES-Zellen. Die Fibroblasten wurden aus Embryonen präpariert, die aus Kreuzungen von Wildtyp-Mäusen mit transgenen Neomycin-resistenten Mäusen stammten. Diese Neomycin-resistenten Fibroblasten bildeten die Matrix für das Wachstum embryonaler Stammzellen (ES-Zellen). Die Fibroblasten mussten, vor der Ko-Kultivierung mit ES-Zellen, in der Vermehrung inhibiert werden. Dazu wurde zu 10 ml Mediumvolumen pro 150 mm Petrischale 100 μ l Mitomycin C-Lösung (1 mg/ml Mitomycin C in PBS und 5 % DMSO, Sigma) hinzugefügt. Nach 2 h Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf neue gelatinierte (0.4 % Gelatine in ddH₂O) Zellkulturschalen passender Größe transferiert. Die wachstumsinaktivierten Fibroblasten konnten etwa zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten werden.

5.8.2.2. Lagerung von Säuger-Zellen

Die Zellen wurden von den Kulturschalen durch Zugabe von 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco-BRL) abgelöst, in FCS/10%igem Medium/DMSO (5:4:1) aufgenommen und in Aliquots von 1 ml auf Kryo-Einfrierröhrchen (Renner) verteilt. Diese wurden langsam auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt. Durch diese Art der Lagerung konnten die Zellen für mehr als 20 Monate aufbewahrt werden.

5.8.2.3. Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Für die Generierung von transgenen Mäusen wurden embryonale R1-Stammzellen (ES-Zellen) der Linie 129/Sv verwendet. Diese ES-Zellen wurden nach dem Auftauen in ES-Zell-Medium aufgenommen und auf Mitomycin-behandelte Fibroblasten in gelatinierten 35 oder 60 mm Schalen kultiviert. Neben diesen Feederzellen benötigen die ES-Zellen noch weitere Faktoren zur Unterstützung. Vor allem brauchen ES-Zellen speziell ausgetestetes Fötales Kälberserum (FCS) und einen Faktor namens Leukemia inhibitory factor (LIF), der die ES-Zellen in ihrem undifferenzierten bzw. pluripotenten Zustand belässt. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen nach Erreichen einer definierten Dichte mit vielen einzelnen ES-Zellklonen auf 100 mm Petrischalen weiterkultiviert. Für die Transfektion bzw. Elektroporation wurden 1-2 x 10⁷ ES-Zellen in 800 µl PBS in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette mit 0.4 cm, Bio-Rad) mit 20-25 µg linearisierter Rekombinationskonstrukt-DNA gemischt (Capecchi, 1994) und bei 300 V, 1200 µF mit einem Impuls von 2 msec elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen sofort auf 4-5 gelatinierte 100 mm Schalen mit wachstumsinaktivierten Feeder-Zellen plattiert und bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur Positiv- und Negativ-Selektion auf korrekt homolog rekombinierte ES-Zell-Klone, wurde dem ES-Zellmedium ab einem bestimmten Zeitpunkt Geneticin (G418, Gibco-BRL) und Gancyclovir (Sigma) zugegeben.

So wurde am zweiten Tag nach der Elektroporation die Selektion mit 400 μ g/ml Geneticin im ES-Zellmedium begonnen. Ab dem vierten Tag wurde zusätzlich mit Gancyclovir in einer Endkonzentration von 2 μ m doppelselektiert. Die resistenten ES-Zell-Klone wurden acht bis zehn Tage nach der Transfektion isoliert. Dazu wurden die ES-Zellen einmal mit PBS gewaschen und die ES-Zell-Klone daraufhin einzeln mit einer Pipettenspitze in 25 μ l PBS auf eine unbehandelte 96 Loch-Platte überführt. Danach wurden die ES-Zell-Klone durch die Zugabe von 25 μ l 0.05%igem Trypsin/0.02 % EDTA (Gibco-BRL) bei 37°C vereinzelt. Nach der visuell kontrollierten Vereinzelung der ES-Zellen wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe von je 50 μ l ES-Zellmedium gestoppt und die Zellen auf eine neue gelatinierte und mit Feeder-

Zellen dicht bewachsene 96 Loch-Platte transferiert. Zwei Tage später wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und mit ES-Zellmedium ergänzt. Die eine Hälfte dieser Zellsuspension wurde auf eine gelatinierte 96 Loch-Platte mit einer spärlichen Feeder-Zell-Lage, die andere Hälfte auf eine dicht mit wachstumsinaktivierten Feeder-Zellen bewachsene 96 Loch-Platte überführt. Auf der dichtbewachsenen Feeder-Platte wurden die ES-Zell-Klone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Einzelkolonien kultiviert und anschließend eingefroren. Die Klone wurden dafür mit PBS gewaschen, trypsiniert und mit je 75 µl eines eiskalten Einfriermediums (40 % ES-Zellmedium, 50 % fötales Kälberserum (FCS), 10 % DMSO) ergänzt. Die 96 Loch-Platte wurde mit Parafilm abgedichtet, in Papiertücher und Aluminiumfolie verpackt und sofort bei -80°C eingefroren. Da hier vor allem eine ausreichende Zellzahl zur Isolierung genomischer DNA aus den ES-Zell-Klonen wichtig war und eine frühzeitige Differenzierung der ES-Zellen in Kauf genommen werden konnte, wurden die ES-Zell-Klone auf der spärlich mit Feeder-Zellen bewachsenen Platte bis zur Konfluenz hochgezogen. Die ES-Zell-Klone, in denen das Rekombinationskonstrukt homolog integriert war, wurden mit Hilfe der Southern-Hybridisierung identifiziert.

5.8.3. Blastozysteninjektion und Blastozystenimplantationen

Die Blastozysteninjektionen wurden von der Service-Einheit-"Transgene Tiere"- des ZMNH, unter der Leitung von Dr. Michael Bösl bzw. Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, von Tina Mordhorst durchgeführt.

ES-Zell-Klone, in denen das Rekombinationskonstrukt homolog integriert war, wurden aufgetaut und der Zellzahl entsprechend auf präparierten Fibroblasten kultiviert. Die ES-Zellen wurden weiter kultiviert und durch den Transfer auf 24 Loch-, 12 Loch- und 6 Loch-Platten vermehrt. Mehrere Blastozysten wurden mit ES-Zellen injiziert. Die Blastozysten stammten von schwangeren C57BL/6-Mäusen vom Tag 3.5 (*post coitum*). Es wurden jeweils 10-12 rekombinierte ES-Zellen in das Blastocoel einer Blastozyste injiziert. Die injizierten Blastozysten wurden anschließend scheinschwangeren Mäusen, den sogenannten Ammen, vom Tag 2.5 (*post coitum*) implantiert. Diese scheinschwangeren Mäuse erhielt die Service-Einheit durch die Verpaarung von

Weibchen mit sterilen Männchen. Die Schwangerschaft dauerte 19-20 Tage und die Stillzeit betrug 3 Wochen. Die jungen Mäuse waren somit nach sechs bis acht Wochen geschlechtsreif.

5.8.4. Aufbau einer Knockout-Mauslinie

Die aus injizierten und transplantierten Blastozysten resultierenden hochchimären Tiere, bei denen das rekombinierte Allel in die Keimbahn transmittierte, wurden als Gründertiere der Knockout-Linien verwendet.

Diese chimären Mäuse bestanden aus Zellen beider ES-Zell-Linien. Dabei war der Grad der Chimärität um so höher, je gleichmäßiger die Durchmischung der Zellen beider ES-Zell-Linien während der Ontogenese war. Der Grad der Chimärität wurde dabei anhand der Fellfärbung bestimmt. Wenn der Anteil der C57BL/6-Zellen in den Chimären überwog, zeigte sich eine schwarze Fellfärbung, während eine schwarz-braun gefleckte Fellfärbung für eine ungleichmäßige Mischung der 129/Sv- und C57BL/6-Zellen sprach. In beiden Fällen war die Wahrscheinlichkeit für eine Keimbahntransmission der rekombinanten Zellen nicht besonders hoch. In Chimären mit einer gleichmäßigen braunen Fellfärbung waren die 129/Sv- und C57BL/6-Zellen gleichmäßig durchmischt der 129/Sv-Anteil überwog. Bei diesen Chimären wäre oder aber die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die rekombinanten Zellen in die Keimbahn transmittieren würden. Die Chimären könnten dann das rekombinante Allel vererben und als Gründertiere für eine Knockout-Mauslinie dienen

Um das rekombinierte Allel in die Keimbahn der Mäuse zu transferieren, wurden die hochchimären Mäuse mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Die Keimbahntransmission des rekombinanten RLIM-Allels wäre durch die Geburt braun-gefärbter Nachkommen angezeigt worden, da die homologe Rekombination in ES-Zellen der braunen 129/Sv-Mauslinie generiert wurde.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

6.1.1. Allgemeine Abkürzungen

A, mA	Ampere, Milliampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa, ungefähr
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cm, mm	Zentimeter, Millimeter
cpm	Anzahl pro Minute
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethlypyrocarbonat
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPE	stromabwärts gelegenes Promotorelement
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

Anhang	
et al.	et altera
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isohiocyanat
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
HRP	Peroxidase aus Meerettich (horseradish-peroxidase)
INR	Initiator-Element
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L, ml,µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
МеОН	Methanol
mRNA	Messenger RNA
NaOAc	Natriumacetat
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
рН	potentium hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Anhang	
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit (unit)
UTR	Nicht-translatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galaktosid
WT	Wildtyp

Abkürzungen der Nukleinsäuren:

A	Adenin
С	Cytosin
G	Guanin
Т	Thymidin
U	Uracil

Symbole für Aminosäuren:

А	Ala	Alanin	М	Met	Methionin
С	Cys	Cystein	Ν	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	Р	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin

Anhang					
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
Η	His	Histidin	Т	Thr	Threonin
Ι	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

6.1.2. Spezielle Abkürzungen

bHLH	basische Helix-Loop-Helix-Proteine	
CBP	<u>C</u> REB- <u>B</u> indeprotein	
CLIM/Ldb/NLI	Kofaktor von LIM-HD-Proteinen	
Cre	Cre-Rekombinase	
Ε	embryonaler Entwicklungstag, dabei wurde für Embryonen der Tag nach dem Auftreten des Vaginalverschlusses als Tag 0.5 <i>postcoitum</i> (E0.5) definiert.	
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym	
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym	
E3	Ubiquitin-Proteinligase	
ES-Zelle	embryonale Stammzelle	
G418	Geneticin	
НАТ	Histon-Acetyltransferase	
HSV	Herpes Simplex Virus	
HDAC	Histon-Deacetylase	
HECT-Domäne	<u>h</u> omolog zum <u>E</u> 6-AP <u>C</u> - <u>T</u> erminus	
LIM	konserviertes Zinkfinger-Interaktionsmotiv, abgeleitet von den Genen Lin11, Isl-1 und Mec-3	
LIM-HD	LIM-Homeodomänen-Protein	

Anhang	
LMO	LIM only Protein
NEO	Neomycin Phosphotransferase Gen
Р	postnataler Tag
Pax	<u>Pa</u> ired-Bo <u>x</u> -Protein
PNS	peripheres Nervensystem
POU	abgeleitet von Pit-1, Oct-1/2, unc86
RING	really interesting new gene
RLIM	<u>R</u> ING-Finger <u>LIM</u> -Domänen-Bindeprotein
TAF	TBP-assoziierter Faktor
ТВР	<u>T</u> ATA- <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
TF	Transkriptionsfaktor
Ub	<u>Ub</u> iquitin
ZNS	zentrales Nervensystem

6.2. Liste der verwendeten Oligonukleotide

<u>5'-RACE:</u>	
RACE1	5'-GCAAATTGTTGTCTCTCATAA-3'
TSU	5'-GTCTTTTAGGACATAGTATTG-3'
ASD	5'-CAGATGCCACAGATAAAGCAC-3'

Aufbau des RLIM-defizienten Rekombinationskonstruktes:

KO-5-5'-Not	5'-TTTTTAGCGGCCGCATGGGAACCTTACGTGAAAGAG-3'
KO-5-3' Xho	5'-GAACTCGAGTTCTCCATCTTGGTGATCAAGTGG-3'
KO-3-5' Bam HI	5'-CGGGATCCAGACCAGAACTCTGAGCTGTGTAGC-3'
KO-3-3'-Sal I	5'-TTTTGTCGACATATTGAACTGTACTAAAGGGGA-3'

i inner der 5 bonde für die boutnern fryblidibierung.

38T7B	5'-CTACCCACCTATCACTGTGTGATG-3'
38M13D	5'-GCTGCCCAGCCTTAACTCTGTTC-3'

Aufbau des konditionalen RLIM-Rekombinationskonstruktes:

newkKO-5'-5'-Bam	5'-TTAGGATCCCAGCATGGGAACCTTACGTGAAAGAG-3'
newkKO-5'-3'-Asc	5'-CAGGCGCGCCACCAAACATGTCTCCAGTC-3'
newkKO-E'-5'-Asc	5'-TAGGCGCGCCGATGGAAGTGTAAATTACTCTAGG-3'
newkKO-E'-3'-Pml	5'-AGCCACGTGTAAGGCGGCCCTTAAGACAACAAAG-3'
newkKO-3'-5'-Not	5'-ATAAGAGCGGCCGCAAGAAAGTCCCCACTCAAGAC-3'
newkKO-3'-3'-Cla	5'-TGCATTATCGATATTGAACTGTACTAAAGGGGA-3'
Asc-Fragment:	
ploxP-DR-16-5'c	5'-GTGGCGCGCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATC-3'
ploxP-DR-16-3'b	5'-GACGGCGCGCCAATTGTAATACGACTCAC -3'

Primer zur Überprüfung der Rekombinationskonstrukte:

Intron 4-5'	5'-CCACCACCACAGAGCCCCATG-3'
Intron 4-3'	5'-CTGTTGGTCACATCATCTGAAG
Kontrolle-newkKO-5'-5'	5'-CCAAAACCAAGTAACCGCAAC-3'
Kontrolle-newkKO-5'-3'	5'- GGAAATGCTGTTGTTAGCCCAGC-3'
Kontrolle-newkKO-3'-5'	5'-CAGAATGTGAACGAATTTGTGTC-3'
Kontrolle-newkKO-3'-3'	5'-GCAGGGCACTTAGATTCTTGGC-3'
Kontrolle-newkKO-Bam-5'	5'-CCTGCAGAGAAGCACCATTCC-3'
Kontrolle-newkKO-Asc+	5'-CTGCAGGAATTCGATATCAAG-3'

Primer für die Genotypisierungen: Typ I-Rekombination: Kontrolle-newkKO-5'-3' 5'-GGAAATGCTGTTGTTAGCCCAGC-3' (WT/KO) Kontrolle-newkKO-3'-5' 5'-CAGAATGTGAACGAATTTGTGTC-3' (KO) Kontrolle-newkKO-Asc-neg 5'-CCTGCAGAGAAGCACCATTTC-3' (WT) Typ II-Rekombination: Kontrolle-newkKO-5'-3' 5'- GGAAATGCTGTTGTTAGCCCAGC-3' (WT/KO) ploxP-DR-16-5'c 5'-GTGGCGCGCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATC-3' (KO) Kontrolle-newkKO-Asc-neg 5'- CCTGCAGAGAAGCACCATTTC-3' (WT)

Primer für die RT	-PCR der Zebrafischembryonen:
Myc-5'	5'-GCTACTTGTTCTTTTTGCAGGATCC-3'
Myc-3'	5'-GAGGTCGCCCAAGCTCTCCATTTC-3'
Act-F	5'-CTTGCGGTATCCACGAGAC-3'
Act-R	5'-GCGCCATACAGAGCAGAA

7. Literaturverzeichnis

Agulnick, A. D., Taira, M., Breen, J. J., Tanaka, T., Dawid, I. B. and Westphal, H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature* **384**, 270-272.

Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T. and Edlund, H. (1997). Independent requirement for Isl1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* **385**, 257-260.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. (1994). Molecular Biology of the Cell. 3rd.edn. New York, Garland Publishing, Inc. Ref Type: Serial (Book, Monograph).

Alting-Mees, M. A. and Short, J. M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic. Acids. Res.* 16, 7583-7600.

Arber, S. and Caroni, P. (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* 10, 289-300.

Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. Mech. Dev. 91, 5-17.

Bach, I and Ostendorff, H. P. (2003). Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends Biochem Sci.* 28, 189-195.

Bach, I., Carriere, C., Ostendorff, H. P., Andersen, B. and Rosenfeld, M. G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev.* **11**, 1370-1380.

Bach, I., Rhodes, S. J., Pearse, R. V., Heinzel, T., Gloss, B., Scully, K. M., Sawchenko, P. E. and Rosenfeld, M. G. (1995). P-Lim, a LIM homeodomain factor, is expressed during pituitary organ and cell commitment and synergizes with Pit-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2710-2724.

Bach, I., Rodriguez-Esteban, C., Carriere, C., Bhushan, A., Krones, A., Rose, D. W., Glass, C. K., Andersen, B., Izpisua Belmonte, J. C. and Rosenfeld, M. G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* **22**, 394-399.

Becker, T., Bossenz, M., Tursun, B., Schlüter, A., Peters, M. A., Becker, C. G., Ostendorff, H. P. and Bach, I. (2003). Comparing protein stabilities during zebrafish embryogenesis. *Methods in Cell Science* **25**, 85-89.

Becker, T., Ostendorff, H. P., Bossenz, M., Schlüter, A., Becker, C. G., Peirano, R. I. and Bach, I. (2002). Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafisch development. *Mech. Dev.* 117, 75-85.

Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J. A., Parker, K. L., Porter, F. D. and Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403, 909-913.

Blair, S. S., Brower, D. L., Thomas, J. B. and Zavortink, M. (1994). The role of apterous in the control of dorsoventral compartmentalization and PS integrin gene expression in the developing wing of Drosophila. *Development* **120**, 1805-1815.

Boehm, J., He, Y., Greiner, A., Staudt, L. and Wirth, T. (2001). Regulation of BOB.1/OBF-1 stability by SIAH. *EMBO J.* 20, 4153-4162.

Borelli, M., Kolobow, T., Spatola, R., Prato, P. and Tsuno, K. (1988). Severe acute respiratory failure managed with continuous positive airway pressure and partial extracorporeal carbon dioxide removal by an artificial membrane lung. A controlled, randomized animal study. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 1480-1487.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 148-254.

Breen, J. J., Agulnick, A. D., Westphal, H. and Dawid, I. B. (1998). Interactions between LIM domains and the LIM domain-binding protein Ldb1. *J. Biol. Chem.* 273, 4712-4717.

Breathnach, R. and Chambon, P. (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short J. M. (1987). Biotechniques 5, 376-379.

Buratowski, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77, 1-3.

Capecchi, M. R. (1994). Targeted Gene Replacement. Scientific American 3, 34-41.

Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K. C., Pepicelli, C. V., Gan, L., Lee, B. and Johnson, R. L. (1998). Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvment of LMX1B in human nail patelle syndrome. *Nat. Genet.* **19**, 51-55.

Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M. (1992). Apterous, a gene required for imaginal disc development in Drosophila encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev.* 6, 715-729.

Curtiss, J. and Heilig, J. S. (1998). DeLIMiting development. Bioessays 20, 58-69.

Dawid, I. B., Breen, J. J. and Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* 14, 156-162.

Deblandre, G. A., Lai, E. C. and Kintner, C. (2001). *Xenopus* neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta and regulates Notch signaling. *Dev. Cell* **1**, 795-806.

Deconinck, A. E., Mead, P. E., Tevosian, S. G., Crispino, J. D., Katz, S. G., Zon, L. I. and Orkin, S. H. (2000). FOG acts as a repressor of red blood cell development in Xenopus. *Development* **127**, 2031-2040.

De Cesare, D., Fimia, G. M. and Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 281-285.

Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1993). Interactions between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in Drosophila. *Cell* **75**, 741-752.

Dorin, J. R., Dickenson, P., Alton, E. W. F. W., Smith, S. N., Geddes, D. M., Stevenson, B. J., Kimber, W. L., Fleming, S., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Anderson, L., Beddington, R. S. and Porteous, D. J. (1992). Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 359, 211-215.

Dreyer, S. D., Zhou, G., Baldini, A., Winterpacht, A., Zabel, B., Cole, W., Johnson, R. L. and Lee, B. (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat. Genet.* **19**, 47-50.

Emili, A. and Greenblatt, J. (1994). Species-specific interactions of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 14, 1582-1593.

Evans, R. M. and Hollenberg. S. M. (1988). Zinc fingers: gilt by association. *Cell* 52, 1-3.

Farmer, S. C., Sun, C.-W., Winnier, G. E., Hogan, B. L. M. and Townes, T. M. (1997). The bZIP transcription factor LCR-F1 is essential for mesoderm formation in mouse development. *Genes Dev.* **11**, 786-798.

Feuerstein, R., Wang, X., Song, D., Cook, N. E. and Liebhaber, S. A. (1994). The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10655-10659.

Fimia, G. M., De Cesare, D. and Sassone-Corsi. P. (1999). CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* **398**, 165-169.

Freemont, P. S. (2000). RING for destruction ? Curr. Biol. 10, R84-R87.

Freiman, R. N. and Tjian, R. (2003). Regulating the regulators. Lysine modifications make their mark. *Cell* **112**, 11-17.

Gauthier, J. M., Bourachot, B., Doucas, V., Yaniv, M. and Moreau-Gachelin, F. (1993). Functional interference between the Spi-1/PU.1 oncoprotein and steroid hormone or vitamin receptors. *EMBO J.* **12**, 5089-5096.

German, M. S., Wang, J., Chadwick, R. B. and Rutter, W. J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev.* **6**, 2165-2176.

Gilbert, S. F. (2000). Developmental Biology, 6 th edn., Ref Type: Severial (Book, Monograph).

Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z. H. and Tijan, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFIII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. USA* **91**, 192-196.

Grabel, L. (1992). Use of teratocarcinoma cells to study the morphogenesis of extraembryonic lineages in the early mouse embryo. In: Rossomando, E., Alexander, S. (eds.), Morphogenesis. Marcel Dekker, New York, 411-437.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* plasmids. *J. Med. Biol.* 166, 557-580.

Hasty, P., Ramirez-Solis, R., Krumlauf, R. and Bradley, A. (1991a). Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature* **350**, 243-246.

Hasty, P., Rivera-Perez, J. and Bradley, A. (1991b). The Length of Homology required for Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell Biol.* 11, 5586-5591.

Hermanson, O., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol.* 13, 55-60.

Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem. 67, 425-479.

Hess, J., Nielsen, P. J., Fischer, K. D., Bujarg, H. and Wirth, T. (2001). The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1531-1539.

Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195-201.

Hiratani, I., Yamamoto, N., Mochizuki, T., Ohmori, S.-Y. and Taira, M. (2003). Selective degradation of excess Ldb1 by Rnf12/RLIM confers proper Ldb1 expression levels and Xlim-1/Ldb1 stoichiometry in *Xenopus* organizer function. *Development* **130**, 4161-4175.

Hirsch, M. R., Valarche, I., Deagostini-Bazin, H., Pernelle, C., Joliot, A. and Goridis, C. (1991). An upstream regulatory element of the NCAM promotor contains a binding site for homeodomains. *FEBS Lett.* **287**, 197-202.

Hobert, O., D'Alberti, T., Liu, Y. and Ruvkun, G. (1998). Control of neural development and function in a thermoregulatory network by the LIM homeobox gene Lin-11. *J. Neurosci.* **18**, 2084-2096.

Hobert, O., Mori, I., Yamashita, Y., Honda, H., Ohshima, Y., Liu, Y. and Ruvkun, G. (1997). Regulation of interneuron function in the C. elegans thermoregulatory pathway by the ttx-3 LIM homeobox gene. *Neuron* **19**, 345-357.

Hobert, O. and Westphal, H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 16, 75-83.

Hukriede, N. A., Tsang, T. E., Habas, R., Khoo, P.-L., Steiner, K., Weeks, D. L., Tam, P. P. L. and Dawid, I. B. (2003). Conserved requirement of Lim1 Function for Cell Movements during gastrulation. *Dev. Cell* **4**, 83-94.

Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J., Kaiser, B. K. and Reimann, J. D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* **10**, 429-439.

Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-358.

Jerpseth. (1992). XL1-Blue MRF' E.coli cells. Strategies 5, 81-93.

Joazeiro, C. A. and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.

Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Monroe, D. G., Janknecht, R. and Spelsberg, T. C. (2002). Modulation of transforming growth factor β (TGF β)/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGF β -inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue. *J. Biol. Chem.* **277**, 30754-30759.

Johnson, R. S., Sheng, M., Greenberg, M. E., Kolodner, R. D., Papaioannou, V. E. and Spiegelman, B. M. (1989). Targeting of nonexpressed genes on embryonic stem cells via homologous recombination. *Science* 245, 1234-1236.

Jurata, L. W. and Gill, G. N. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol. Cell Biol.* 17, 5688-5698.

Jurata, L. W. and Gill, G. N. (1998). Structure and function of LIM domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 228, 75-113.

Jurata, L. W., Kenny, D. A. and Gill, G. N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neural development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11693-11698.

Jurata, L. W., Pfaff, S. L. and Gill, G. N. (1998). The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 3152-3157.

Kessel, M., Fibi, M. and Gruss, P. (1988). Organization of homeodomain proteins. *Prog. Clin. Biol. Res.* 284, 93-104.

Khoury, G. and Gruss, P. (1983). Enhancer elements. Cell 33, 313-314.

Kimmel, C. B. (1989). Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet.* 5, 283-288.

Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasom. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179-187.

Kwan, K. M. (2002). Conditional alleles in mice: practical considerations for tissuespecific knockouts. *Genesis* **32**, 49-62.

Lai, E. C., Deblandre, G. A., Kintner, C. and Rubin, G. M. (2001). *Drosophila* neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta. *Dev. Cell* **1**, 783-794.

Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.

Larson, R. C., Osada, H., Larson, T. A., Lavenir, I. and Rabbitts, T. H. (1995). The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* 11, 853-862.

Larson, R. C., Lavenir, I., Larson, T. A., Baer, R., Warren, A. J., Wadman, I., Nottage, K. and Rabbitts, T. H. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T-cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* **15**, 1021-1027.

Lee, S. K. and Pfaff, S. L. (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci.* **4** Suppl., 1183-1191.

Lee, T. I. and Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* 34, 77-137.

Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Rev. Genet.* 2, 743-755.

Lewin, B. Genes VI. (1997). Oxford University Press. Ref Type: Serial (Book, Monograph).

Li, H., Witte, D. P., Branford, W. W., Aronow, B. J., Weinstein, M., Kaur, S., Wert, S., Singh, G., Schreiner, C. M., Whitsett, J. A., Scott, W. J. and Potter, S. (1994). Gsh-4 encodes a LIM-type homeodomain, is expressed in the developing central nervous system and is required for early postnatal survival. *EMBO J.* **13**, 2876-2885.

Liu, J., Stevens, J., Rote, C. A., Yost, H. J., Hu, Y., Neufeld, K. L., White, R. L. and Matsunami, N. (2001). Siah-1 mediates a novel β -catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol. Cell* **7**, 927-936.

Lorick, K. L. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. USA* **96**, 11364-11369.

Lowe, L. A., Yamada, S. and Kuehn, M. R. (2000). HoxB6-Cre transgenic mice express Cre recombinase in extra-embryonic mesoderm, in lateral plate and limb mesoderm and at the midbrain/hindbrain junction. *Genesis* 26, 118-120.

Mansour, S. L., Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1988). Disruption of the protooncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348-352.

Marsh, J. L., Erfle, M. and Wykes, E. J. (1984). The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**, 481-485.

Matsuzawa, S. I. and Reed, J. C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for β -catenin degradation linked to p53 responses. *Mol. Cell* **7**, 915-926.

Maye, P., Becher, S., Siemen, H., Thorne, J., Byrd, N., Carpentino, J. and Grabel, L. (2004). Hedgehog signaling is required for the differentiation of ES cells into neurectoderm. *Dev. Biol.* 265, 276-290.

Meier, B. C., Price, J. R., Parker, G. E., Bridwell, J. L. and Rhodes, S. J. (1999). Charakterization of the porcine Lhx3/LIM-3/P-Lim LIM homeodomain transcription factor. *Mol. Cell Endocrinol.* 147, 65-74.

Milan, M. and Cohen, S. M. (1999). Regulation of LIM homeodomain activity in vivo: a tetramer of dLDB and apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. *Mol. Cell* **4**, 267-273.

Milan, M., Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1998). Beadex encodes an LMO protein that regulates Apterous LIM-homeodomain activity in Drosophila wing development: a model for LMO oncogene function. *Genes Dev.* **12**, 2912-2920.

Millonig, J. H., Millen, K. J. and Hatten, M. E. (2000). The mouse Dreher gene Lmx1a controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* **403**, 764-769.

Morcillo, P., Rosen, C., Baylies, M. K. and Dorsett, D. (1997). Chip, a widely expressed chromosomal protein required for segmentation and activity of a remote wing margin enhancer in Drosophila. *Genes Dev.* 11, 2729-2740.

Mukhopadhyay, M., Teufel, A., Yamashita, T., Agulnick, A. D., Chen, L., Downs, K. M., Schindler, A., Grinberg, A., Huang, S.-P., Dorward, D. and Westphal, H. (2003). Functional ablation of the mouse *Ldb1* results in servere patterning defects during gastrulation. *Development* 130, 495-505.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51** Pt 1, 263-273.

Murre, C., McCaw, P. S. and Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.

Näär, A. M., Lemon, B. D. and Tjian, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 475-501.

Nelson, H. C. M. (1995). Structure and function of DNA-binding proteins. *Curr. Biol.* 5, 180-189.

Netchine, I., Sobrier, M. L., Krude, H., Schnabel, D., Maghnie, M., Marcos, E., Duriez, B., Cacheux, V., Moers, A., Goossens, M., Gruter, A. and Amselem, S. (2000). Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* **25**, 182-186.

Orkin, S. H. (1998). Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoisis. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 927-934.

Ostendorff, H. P., Bossenz, M., Mincheva, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lichter, P. and Bach, I. (2000). Functional charakterization of the gene encoding RLIM, the corepressor of LIM homeodomain factors. *Genomics* **69**, 120-130.

Ostendorff, H. P., Peirano, R. I., Peters, M. A., Schlüter, A., Bossenz, M., Scheffner, M. and Bach, I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* **416**, 99-103.

Perez-Alvarado, G. C., Kosa, J. L., Louis, H. A., Beckerle, M. C., Winge, D. R. and Summers, M. F. (1996). Structure of the cysteine-rich intestinal protein, CRIP. J. Mol. Biol. 257, 153-174.

Perez-Alvarado, G. C., Miles, C., Michelsen, J. W., Louis, H. A., Winge, D. R., Beckerle, M. C. and Summers, M. F. (1994). Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine-rich protein CRP. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 388-398.

Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T. and Jessell, T. M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**, 309-320.

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

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503-533.

Pinto do, O. P., Kolterud, A. and Carlsson, L. (1998). Expression of the LIMhomeobox gene LH2 generates immortalized steel factor-dependent multipotent hematopoietic precursors. *EMBO J.* **17**, 5744-5756.

Porter, F. D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S. S., Wassif, C., Huang, S. P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J. S., Bodine, D., Alt, F. and Westphal, H. (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain and definitive erythrocyte development. *Development* 124, 2935-2944.

Rabbitts, T. H. (1998). LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and development processes. *Genes Dev.* **12**, 2651-2657.

Ramirez-Solis, R., Rivera-Perez, J., Wallace, J. D., Wims, M., Zheng, H. and Bradley, A. (1992). Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal. Biochem.* 201, 331-335.

Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J. W., Pena, J. D., Rincon-Limas, D. E., Magallon, J., Botas, J. and Belmonte, J. C. (1998). Lhx2, a vertebrate homoloque of apterous, regulates vertebrate limb outgrowth. *Development* **125**, 3925-3934.

Rodriguez, C I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A. F. and Dymecki, S. M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is a alternative to Cre-loxP. *Nature Genetics* **25**, 139-141.

Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21, 327-335.

Roth, M. B., Zahler, A. M. and Stolk, J. A. (1991). A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J. Cell Biol.* **115**, 587-596.

Rünker, A. E., Bartsch, U., Nave, K. A. and Schachner, M. (2003). The C264Y Missense Mutation in the Extracellular Domain of L1 Impairs Protein Trafficking In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci.* **23**, 277-286.

Rushlow, C., Doyle, H., Hoey, T. and Levine, M. (1987). Molecular characterization of the zerknüllt region of the Antennapedia gene complex in Drosophila. *Genes Dev.* **1**, 1268-1279.

Ryan, A. K. and Rosenfeld, M. G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships and developmental codes. *Genes Dev.* 11, 1207-1225.

Sambrook, J. F., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2 nd edn., Cold Spring Habor, NY: Cold Spring Habor Laboratory.

Scanlan, M. J., Gordan, J. D., Williamson, B., Stockert, E., Bander, N. H., Jongeneel, V., Gure, A. O., Jager, E., Knuth, A., Chen, Y.-T. and Old, L. J. (1999). Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **83**, 456-464.

Scheffner, M. Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. and Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.

Schmeichel, K. L. and Beckerle, M. C. (1994). The LIM domain is a modular proteinbinding interface. *Cell* **79**, 211-219.

Schubart, D. B., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M. H., Botteri, F. and Matthias, P. (1996). B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* **383**, 538-542.

Schwartz, A. L. and Ciechanover, A. (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57-74.

Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.

Sharma, K., Sheng, H. Z., Lettieri, K., Li, H., Karavanov, A., Potter, S. Westphal, H. and Pfaff, S. L. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* **95**, 817-828.

Shawlot, W. and Behringer, R. R. (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer functions. *Nature* **374**, 425-430.

Sheng,H. Z., Moriyama, K., Yamashita, T., Li, H., Potter, S. S., Mahon, K. A. and Westphal, H. (1997). Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278, 1809-1812.

Sheng, H. Z., Zhadanov, A. B., Mosinger, B. Jr., Fujii, T., Bertuzzi, S., Grinberg, A., Lee, E. J., Huang, S. P., Mahon, K. A. and Westphal, H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* **272**, 1004-1007.

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. and Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage *lambda* expression vector with in vitro excision properties. *Nucleic*. *Acids. Res.* 16, 7583-7600.

Smale, S. T. (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochem. Biophys. Acta.* **1351**, 73-88.

Smale, S. T. and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcriptional control element. *Cell* 57, 103-113.

Snouwaert, J. N., Brigman, K. K., Latour, A. M., Malouf, N. N., Boucher, R. C., Smithies, O. and Koller, B. H. (1992). An Animal Model for Cystic Fibrosis made by Gene Targeting. *Science* 257, 1083-1088.

St.Clair, M. H., Miller, W. H., Miller, R. L., Lambe, C. U. and Furman, A. (1984). *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 25, 191-194.

Supp, D. M., Witte, D. P., Branford, W. W., Smith, E. P. and Potter, S. S. (1996). Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability and male fertility. *Dev. Biol.* **176**, 284-299.

Susini, L., Passer, B. J., Amzallag-Elbaz, N., Juven-Gershon, T., Prieur, S., Privat, N., Tuynder, M., Gendron, M. C., Israel, A., Amson, R., Oren, M. and Telerman, A. (2001). Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15067-15072.

Taira, M., Otani, H., Saint-Jeannet, J. P. and Dawid, I. B. (1994). Role of the LIM class homeodomain protein Xlim-1 in neural and muscle induction by the Spermann organizer in Xenopus. *Nature* **372**, 677-679.

Takuma, N., Sheng, H. Z., Furuta, Y., Ward, J. M., Sharma, K., Hogan, B. L., Pfaff, S. L., Westphal, H., Kimura, S. and Mahon, K. A. (1998). Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* **125**, 4835-4840.

Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., Kanei-Ishii, C., Nakai, A., Matsuzawa, S.-I., Reed, J. C. and Ishii, S. (2000). P53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J. Biol. Chem.* 275, 15578-15585.

Thaler, J. P., Lee, S.-K., Jurata, L. W., Gill, G. N. and Pfaff, S. L. (2002). LIM Factor Lhx3 Contributes to the Specification of Motor Neuron and Interneuron Identity through Cell-Type-Specific Protein-Protein Interactions. *Cell* **110**, 237-249.

Thomas, K. R. and Capecchi, M. R. (1987). Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem Cells. *Cell* **51**, 503-512.

Thor, S., Andersson, S. G., Tomlinson, A. and Thomas, J. B. (1999). A LIMhomeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* **397**, 76-80.

Tiedt, R., Bartholdy, B. A., Matthias, G., Newell, J. W. and Matthias, P. (2001). The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. *EMBO J.* **20**, 4143-4152.

Toyama, R., Kobayashi, M., Tomita, T. and Dawid, I. B. (1998). Expression of LIMdomain binding protein (Ldb) genes during zebrafish embryogenesis. *Mech. Dev.* 71, 197-200. Tsang, T. E., Shawlot, W., Kinder, S. J., Kobayashi, A., Kwan, K. M., Schughart, K., Kania, A., Jessell, T. M., Behringer, R. R., Tam, P. P. (2000). Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 223, 77-90.

Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B. and Orkin, S. H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoisis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* **12**, 1176-1188.

Turner, J. and Crossley, M. (1999). Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem. Sci.* 24, 236-240.

Umek, R. M., Friedman, A. D. and McKnight, S. L. (1991). CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251, 288-292.

van Meyel, D. J., O'Keefe, D. D., Jurata, L. W., Thor, S., Gill, G. N. and Thomas, J. B. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during Drosophila development. *Mol. Cell* **4**, 259-265.

Veenstra, G. J. and Wolffe, A. P. (2001). Gene-selective developmental roles of general transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* 26, 665-671.

Verrijzer, C. P. and Tijan, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* 21, 338-342.

Visvader, J. E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K. and Orkin, S. H. (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and is partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13707-13712.

Wadman, I. A., Li, J., Bash, R. O., Forster, A., Osada, H., Rabbitts, T. H. and Baer, R. (1994). Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T-cell leukemia. *EMBO J.* **13**, 4831-4839.

Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A. and Rabbitts, T. H. (1997). The LIM-only Protein LMO2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.

Warren, A. J., Colledge, W. H., Carlton, M. B., Evans, M. J., Smith, A. J. and Rabbitts, T. H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.

Way, J. C. and Chalfie, M. (1988). mec-3, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor in C. elegans. *Cell* **54**, 5-16.

Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic*. *Acids. Res.* 27, 1409-1420.

Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 169-178.

Xu, Y., Baldassare, M., Fisher, P., Rathbun, G., Oltz, E. M., Yancopoulos, G. D., Jessell, T. M. and Alt, F. W. (1993). LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 227-231.

Yamada, Y., Warren, A. J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R. and Rabbitts, T. H. (1998). The T cell leukemia LIM protein LMO2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3890-3895.

Zawel, L. and Reinberg, D. (1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 533-561.

Zeng, C., Justice, N. J., Abdelilah, S., Chan, Y. M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1998). The Drosophila LIM-only gene, dLMO, is mutated in Beadex alleles and might represent an evolutionarily conserved function in appendage development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10637-10642.

Zhao, Y., Sheng, H. Z., Amini, R., Grinberg, A., Lee, E., Huang, S., Taira, M. and Westphal, H. (1999). Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene Lhx5. *Science* **284**, 1155-1158.

Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G. and McMahon, A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**, 11-24.

Zwilling, S., Annweiler, A. and Wirth, T. (1994). The POU domain of Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. *Nucleic. Acids. Res.* 22, 1655-1662.

Publikationsliste

Becker, T., Bossenz, M., Tursun, B., Schlüter, A., Peters, M. A., Becker, C. G., Ostendorff, H. P. and Bach, I. (2003). Comparing protein stabilities during zebrafish embryogenesis. *Methods in Cell Science* 25, 85-89.

Becker, T., Ostendorff, H. P., Bossenz, M., Schlüter, A., Becker, C. G., Peirano, R. I. and Bach, I. (2002). Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafisch development. *Mech. Dev.* 117, 75-85.

Ostendorff, H. P., Peirano, R. I., Peters, M. A., Schlüter, A., Bossenz, M., Scheffner, M. and Bach, I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* **416**, 99-103.

Ostendorff, H. P., Bossenz, M., Mincheva, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lichter, P. and Bach, I. (2000). Functional charakterization of the gene encoding RLIM, the corepressor of LIM homeodomain factors. *Genomics* **69**, 120-130.

Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. and Schäfer, W. (2000). Secreted lipases of Candida albicans: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch. Microbiol.* **174**, 362-374.

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1999 bis Februar 2004 unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Ingolf Bach am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) durchgeführt. Ich danke Herrn PD Dr. Ingolf Bach für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, dem ständigen Interesse am Fortschritt der experimentellen Arbeit sowie für die intensive Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Für sein freundliches Interesse und für die Bereitschaft, die Begutachtung der Arbeit zu übernehmen, bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer.

Sehr viele Dinge wären ohne die Hilfe der Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe nicht möglich gewesen. Ich möchte mich für die eigentlich immer positive Stimmung bedanken. Aber noch wichtiger ist, dass ich mich immer auf jeden einzelnen meiner Kollegen zu jeder Zeit verlassen konnte. Bei uns herrscht tatsächlich das Motto: "Einer für alle und alle für einen".

Marvin Peters wünsche ich, dass Werder Meister wird. Der SVW ist eben die Nr. 1 im Norden und war es praktisch eigentlich immer. Kollege Baris Tursun danke ich für einen unvergeßlichen Abenteuerurlaub auf der Ilmenau. Und wir sind doch ein gutes Team. Zu Anne Schlüter möchte ich sagen: "Ich bin von deinen analytischen Fähigkeiten und von deiner Menschenkenntnis wirklich beeindruckt". Alexander Drung danke ich als "Pauli-Fan". Micky Braun danke ich für die Erkenntnis, dass "Das habe ich immer so gemacht" nicht immer der Weisheit letzter Schluß ist. Bei Birte Viehweger möchte ich mich für ihre Sicht auf den Mauerfall bedanken. Unserem Zugereisten Dr. Steve Johnsen danke ich vor allem für die Wiederentdeckung der eigenen Musik. Und "last, but not least" möchte ich Dr. Heather P. Ostendorff für unsere ganz besondere Beziehung danken. Wir hatten es beim Aufbau der Arbeitsgruppe wirklich nicht leicht. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Reto Peirano, Dr. Annette Rünker und Yvonne Bodingbauer für ihre Unterstützung bedanken.

Den Mitarbeitern der Nachwuchsgruppen des ZMNH danke ich für ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Dieter Riethmacher für die Bereitstellung der Vektoren und für die vielen wertvollen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Bei Dr. Catherina Becker und Dr. Thomas Becker bedanke ich mich für die Bereitstellung des Zebrafischsystems und die sehr gute Zusammenarbeit im Rahmen unserer erfolgreichen Kooperation.

Bei den Mitarbeitern der Service-Einheiten möchte ich mich für die qualitativ sehr gute Arbeit bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Tina Mordhorst und Janina Nest.

Meiner lieben Mutter Anke Bossenz danke ich vom ganzen Herzen für ihre Hilfe, die mir erst den Abschluß dieser Arbeit ermöglicht hat.

Bei meiner Freundin Margot, meinen Freunden und meiner Familie bedanke ich mich für ihre freundschaftliche Hilfe, das Verständnis und für das Vertrauen, dass sie in mich haben.