

Max-Planck-Institut für Psychiatrie
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

**Die Funktion von FGF2 und FGF8 während der Entwicklung
des Nervensystems in der Maus**

Katja Vetter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. Rudolph Balling
2. Univ.- Prof. Dr. Klaus D. Pfeffer
3. Univ.- Prof. Dr. Alfons Gierl

Die Dissertation wurde am 19.6.2000 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie
am 25.9.2000 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	7
2 EINLEITUNG	9
2.1 Musterbildung im zentralen Nervensystem	9
2.2 Die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren	10
2.3 FGF8 und FGF2 - zwei Signalmoleküle aus der Gruppe der Fibroblasten Wachstumsfaktoren	17
2.3.1 Die Expression und Funktion von FGF2	19
2.3.2 Die Expression und Funktion von FGF8	20
2.4 Der FGF-Rezeptor 2	21
2.5 Experimente zur Funktionsweise von FGF2 und FGF8 während der Entwicklung des Nervensystems der Maus	23
2.5.1 Expression des dominant negativen FGF-Rezeptors 2 unter dem Engrailed 1-Promotor in der Maus	23
2.5.2 Das Genfallen-Experiment mit FGF2 / Analyse des neuen Mausgens mbFZb	25
3 MATERIAL UND METHODEN	26
3.1 Molekularbiologische Standardmethoden	27
3.1.1 Restriktionsenzymatischer Verdau von Plasmid-DNA	27
3.1.2 Auftrennung von DNA im Agarose-Gel	27
3.1.3 Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion	28
3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten	28
3.1.5 Herstellung kompetenter Zellen	30
3.1.6 Transformation von Bakterien	31
3.1.7 Charakterisierung der transformierten Bakterien	32
3.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	34
3.1.9 Screen einer Phagen Library	35
3.1.10 Analyse genomischer DNA	36
3.1.10.1 DNA-Extraktion	36
3.1.10.2 Verdau und Auftrennung genomischer DNA	37
3.1.10.3 genomischer Southern-Blot und Hybridisierung	37
3.1.11 Analyse von RNA	38
3.1.11.1 Präparation von RNA	38
3.1.11.2 RNA-Gel	38
3.1.11.3 Northern Blot und Hybridisierung	39
3.1.12 Reverse Transkription	39
3.1.13 Schnelle Amplifizierung von cDNA Enden (RACE)	40
3.2 Kultur von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)	40
3.2.1 Herstellung von primären Fibroblasten -Zell- und Gelatine-Platten	41
3.2.2 Expansion der ES-Zellen für die Elektroporation (Genemutagenese/ Genfalle)	41
3.2.3 Elektroporation von ES-Zellen (Genmutagenese) / Selektion der Klone	42
3.2.4 Elektroporation von ES-Zellen (Genfalle)	42
3.2.5 Induktion von elektroporierten ES-Zellen mit FGF2 (Genfalle)	43
3.2.6 Picken, Expansion und Einfrieren von resistenten Klonen	43
3.2.7 DNA-Präparation und Verdau der ES-Zell-Klone	44
3.2.8 Auftauen und Expansion der positiven Klone	45
3.2.9 Medien/Lösungen für die Zellkultur	45
3.2.10 Übersichtstabelle Zellkulturgefäße	46
3.3 Schnitttechniken	46

3.3.1	Schneiden von Gewebe mit dem Cryostaten	46
3.3.1.1	Schnitte für die in-situ- Hybridisierung	46
3.3.1.2	Schnitte für die Immunfärbung	47
3.3.2	Schneiden von Embryonen mit dem Mikrotom	47
3.4	Immunohistochemie und Färbungen	48
3.4.1	Immunfärbung auf frei schwimmenden Schnitten	48
3.4.2	LacZ-Färbung	49
3.4.3	Hämatoxylin / Eosin -Färbung	50
3.4.4	Kresylviolett -Färbung	50
3.4.5	Thionin-Färbung	51
3.5	In-situ-Hybridisierung	51
3.5.1	Whole Mount in-situ- Hybridisierung	51
3.5.1.1	Präparation der DNA Probe	51
3.5.1.2	Synthese der RNA Probe	51
3.5.1.3	Vorbereitung der Embryonen	52
3.5.1.4	Hybridisierung der Embryonen mit der RNA Sonde	53
3.5.2	In-situ-Hybridisierung auf Schnitten	55
3.5.2.1	Herstellung der Riboprobe	55
3.5.2.2	Vorbehandlung der Schnitte	56
3.5.2.3	Hybridisierung der Schnitte	56
3.5.2.4	Waschen der Objektträger	59
3.5.2.5	Dippen	59
3.5.2.6	Entwicklung der Objektträger	60
3.6	Liste der Oligonukleotide	60
3.6.1	Oligonukleotide für die Typisierung	60
3.6.2	Oligonukleotide für die 5´ und 3´ Race	61
3.6.3	Oligonukleotide für den Nachweis von FGF-Rezeptoren	61
3.6.4	Oligonukleotide für den Nachweis von mbFZb	62
3.7	Plasmide	62
3.7.1	Der Genfallen-Vektor PT1ATG	62
3.7.2	Der Vektor MIRB-FR2X	63
3.7.3	Der Vektor IRES/lacZ	63
3.7.4	Der En1-knock -in Vektor	64
3.8	In Situ Proben	64
3.9	Liste der verwendeten Kits und Chemikalien	64
4	ERGEBNISSE	65
4.1	Herstellung und Analyse der En1^{+/dnR2lacZ}-Mausmutanten	65
4.1.1	Klonierung des Insertions-Vektors En1/dnR2/IRESlacZ	65
4.1.2	Rekombination in embryonalen Stammzellen und Erreichen der Keimbahntransmission	67
4.1.3	Analyse der En1 ^{+/dnR2lacZ} -Mäuse	71
4.1.3.1	Nachweis der Transkription und Translation des dnR2/IRESlacZ-Konstrukts in der Mittelhirn/Hinterhirnregion	71
4.1.3.1.1	RT-PCR an 11.5 Tage alten Mausembryonen	71
4.1.3.1.2	In situ-Hybridisierung auf Gehirnschnitten 9.5 Tage alter Mausembryonen	73
4.1.3.1.3	Detektion der β-Galaktosidase-Aktivität in 12.5 Tage alten Mäusen	76
4.1.3.2	In- situ-Hybridisierung an 9.5 Tage alten Embryonen	77
4.1.3.3	Färbung und Immunohistochemie an adulten Mausgehirnen	79
4.2	Identifizierung und Analyse des Mausgens mbFZb	84
4.2.1	Genfallen-Experiment mit Fibroblasten Wachstumsfaktor 2	84
4.2.1.1	Expression der FGF-Rezeptoren 1-4 in embryonalen Stammzellen	84

4.2.1.2 Identifizierung des mutierten Klons 16.46 im Genfallen-Experiment	86
4.2.2 Isolierung und Analyse der Sequenz des mutierten Gens	89
4.2.2.1 5' RACE an cDNA aus Neuralrohr	89
4.2.2.2 Screen der Phagenlibrary aus D3 ES-Zellen	90
4.2.2.3 Analyse der Sequenz des Gens mbFZb	92
4.2.2.4 Chromosomale Lokalisierung von mbFZb	93
4.2.3 Expression des Gens mbFZb in ES-Zellen	94
4.2.3.1 RT-PCR an RNA aus ES-Zellen	94
4.2.3.2 Northern-Hybridisierung an RNA aus ES-Zellen	96
4.2.4 Herstellung der mbFZb ^{+lacZ} -Maus	98
4.2.5 Expression des Gens mbFZb in der Maus	100
4.2.5.1 Expression von mbFZb im sich entwickelnden Nervensystem und Auge	100
4.2.6 Analyse des Phänotyps der mbFZb ^{+lacZ} - und mbFZb ^{lacZ/lacZ} -Tiere	112
5 DISKUSSION	114
5.1 Kein Phänotyp der En1^{+dnR2lacZ}-Maus - trotz Expression und Translation des dominant negativen FGF-Rezeptors2	114
5.1.1 Expressionslevel des dnFGF-Rezeptors 2 in der Mittelhirn/Hinterhirnregion	115
5.1.2 Gibt es unbekannte FGF-Rezeptoren im Isthmus ?	117
5.1.3 Die Funktion von FGF8 in der MH-Region	117
5.2 Das neue Maus Gen mbFZb	119
5.2.1 In-vivo-Kolokalisation von mbFZb und FGF2	119
5.2.2 Das mögliche Zusammenspiel von mbFZb und FGF2	121
5.2.3 MbFZb und die Familie der Zic-Transkriptionsfaktoren als potentielle interagierende Faktoren	121
5.2.4 mbFZb als Vermittler zwischen der FGF2-Signaltransduktion und den Zic-Transkriptionsfaktoren	122
6 LITERATURVERZEICHNIS	123
7 ANHANG	138

Abkürzungen

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymintri-phosphat
E	embryonaler Tag
E.coli	Escherichia coli
EP	Elektroporation
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EST	expressed sequence tag
et al.	et alteres
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
Feeder-Zellen	primäre Fibroblasten-Zellen
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor
g	Gramm
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertami
LIF	Leukemia inhibiting factor
Lsg.	Lösung
μ	micro
m	milli
M	Molarität
MH	Mittelhirn/Hinterhirn
Min.	Minute
mRNA	messenger-RNA
n	nano
neo	Neomycin
p	pico
P	postnataler Tag
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pfu	Plaque forming units
RACE	Rapid amplification of cDNA-ends
RE	Restriktionsenym
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Sek.	Sekunden
Sre.	Säure
U	Unit
üN	über Nacht
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

Symbole für Aminosäuren

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

1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass bei der Ausbildung und Differenzierung des Gehirns eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen beteiligt sind. Zu diesen Faktoren zählen auch FGF8, FGF17 und FGF18, die zur Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs) gehören und in die Ausbildung der Mittelhirn/Hinterhirngrenze (MH-Grenze) bei der Maus involviert sind.

Um die spezifische Funktion von FGF8, 17 und 18 im Zusammenspiel mit anderen Faktoren, wie Otx2, Gbx2, Wnt1, En1, Pax2 und 5, die ebenfalls an dieser Musterbildung beteiligt sind aufzuklären, wurde im Rahmen des ersten Projekts der verkürzte, dominant negative Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (FGF-Rezeptor 2) ektopisch unter dem Engrailed 1-Promotor in der MH-Region der Maus exprimiert. Die Dimerisierung des dominant negativen FGF-Rezeptors 2 mit den endogenen Rezeptoren führt zu einer Inaktivierung der FGF-Signalkaskade in der MH-Region. Über diese spezifische Inhibierung der FGF-Signalkaskade sollte die Funktion von FGFs im Isthmus der sich entwickelnden Maus untersucht werden.

Die heterozygoten Mäuse dieser Linie sind weder anhand der Expression früher Musterbildungsgene in der Entwicklung, noch anhand der Anatomie des adulten Gehirns vom Wildtyp zu unterscheiden, d. h. sie zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Erklärung hierfür ist vermutlich auf einen zu geringen Transkriptionslevel der ektopischen sense-RNA, die ektopische Expression der antisense-RNA oder auf die FGF-FGF-Rezeptor Interaktion als solche zurückzuführen.

Auch FGF2 ist wie FGF8 ein wichtiges Signalmolekül, welches an der Ausbildung des Gehirns beteiligt ist. FGF2 ist bisher eher für seine Involvierung in zelluläre Differenzierungsvorgänge bekannt. Da über die Faktoren, welche durch FGF2 im Gehirn reguliert werden wenig bekannt ist, wurde in einem zweiten Projekt ein Genfallen-Experiment mit FGF2 (bFGF) durchgeführt. Dabei wurde ein neues Maus Gen mbFZb (Maus bFGF reprimiertes, mögliches Zic3 hindendes Protein) isoliert und anschließend dessen Expression während der Entwicklung der Maus studiert.

MbFZb kommt im Embryo in zwei Spliceformen vor. Diese beinhalten einen 600 Basenpaare umspannenden, translatierbaren Bereich. Das mbFZb-Protein zeigt eine starke Homologie zu dem möglichen Zic3 (Zink finger in cerebellum 3)-bindenden Transkriptionsfaktor in Xenopus (Acc. Nr. AF12913), ist jedoch in keine bekannte Klasse von Proteinen einzuordnen.

Aus den mbFZb-mutierten Zellen des Genfallen-Experiment wurden Mäuse generiert. Da es jedoch in diesen Tieren im Rahmen der Transkription zum Splicen um den Genfallenvektor herum kommt, und somit ein Teil (ca. 10%) des Wildtyptranskripts weiterhin für die Translation bereitsteht, zeigen auch die homozygoten Tiere dieser Linie keinen Phänotyp. In Wildtyp-Mäusen ist mbFZb schon am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung ubiquitär zu detektieren. Später ist zudem eine Verstärkung der Expression im Gehirn (v. a. den Ganglien der cranialen Nerven IV, V, VIII, IX und X) im Neuralrohr und den Spinalganglien zu beobachten. Auch im sich entwickelnden Auge ist mbFZb in der Linse und der neuronalen Retina zu detektieren. Im Gehirn adulter Mäuse konzentriert sich die Expression auf den Hippocampus, den piriformen Cortex und Zellpopulationen im olfaktorischen Bulbus. Diese Expressionsbereiche überlappen zu einem Großteil mit den für FGF2 und die Zic-Gene beschriebenen Expressionsdomänen.

Diese Expression läßt zusammen mit der Tatsache, dass die Expression von mbFZb im Genfallensexperiment durch FGF2 reprimiert wird, die Vermutung zu, dass mbFZb im Zusammenspiel mit FGF2 und Zic vor allem eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von neuronalen Zellen während der Entwicklung und bei plastischen Vorgängen in der adulten Maus übernimmt.

2 Einleitung

2.1 *Musterbildung im zentralen Nervensystem*

Die Entwicklung des zentralen Nervensystems der Wirbeltiere, ausgehend von dem unsegmentierten Neuralrohr hin zu dem hochkomplexen Gehirn und Rückenmark, eröffnet viele Fragen in Bezug auf die strukturelle und funktionelle Differenzierung der einzelnen Bereiche.

Die anteriore Region des Neuralrohrs (das zukünftige Gehirn) ist zu einem frühen Stadium in drei Bläschen unterteilt (Vorderhirn, Mittelhirn und Rautenhirn). Das Vorderhirn gliedert sich später noch in das Endhirn, welches Großhirnhemisphäre, Streifenkörper, Amygdala und den olfaktorischen Bulbus bildet und das Zwischenhirn, das Thalamus, Hypothalamus, Neurohypophyse und die Augenbläschen hervorbringt. Das Mittelhirn bildet im dorsalen Bereich die superioren und inferioren Colliculi, das Endhirn bildet dorsal das Cerebellum und ventral den Hirnstamm aus.

Die frühe Differenzierung der verschiedenen Gehirnbereiche findet offensichtlich nach zwei Prinzipien statt: Segmentierung und Organisation von Signalzentren aus.

Das Hinterhirn ist in sieben Segmente (Rhombomere) unterteilt, welche durch die differenzierte Expression verschiedener Gene determiniert werden. Jedes Rhombomer zeigt dabei ein anderes Expressionsmuster, welches ihm eine eindeutige Identität zuweist. Diese Identität ist z.B. für das zielrichtige Auswachsen der Motoneurone der Cranialnerven von entscheidender Bedeutung. Vor allem die Familie der Hox-Gene spielt bei dieser Determinierung der Rhombomer-Segmente eine wichtige Rolle (Übersicht in (Lumsden und Krumlauf, 1996)).

Auch die Domänen des Vorderhirns werden vermutlich nach einem ähnlichen Prinzip determiniert. Die Analyse der überlappenden Expression verschiedener Gene (Nkx2.1, Nkx2.2, Dlx2, Gbx2, Otx2, Shh etc.) führte zur Einteilung in die Prosomere 1-6 (Rubenstein et al., 1994; Rubenstein et al., 1998).

Im Gegensatz zu dieser segmentierten Organisation des Vorder- und Hinterhirns steht die Musterbildung im Mittelhirn. Schon das lokal begrenzte Expressionsmuster der Musterbildungsgene En1, FGF8, Pax5, Wnt1 und Pax2 an der Grenze zwischen Mittelhirn und Hinterhirn zeigt, dass es sich bei dieser Isthmusregion um ein Gewebe mit besonderem Potential handelt. Die Transplantation von Isthmusgewebe in das caudale Vorderhirn und rostrale Hinterhirn zeigte, dass dieser Gehirnbereich ektopisch die Expression der entsprechenden Musterbildungsgene induzieren kann, mit nachfolgender Entwicklung der Gehirnbereiche (Mittelhirnstrukturen im Vorderhirn, Cerebellumstrukturen im Hinterhirn), welche normalerweise durch die Isthmusregion determiniert werden. Damit stellt die Mittelhirn/Hinterhirngrenze ein Organisationszentrum dar, von dem aus das Mittelhirn und Teile des Hinterhirns in ihren Domänen bestimmt werden (siehe 2.5.1, Joyner, 1996; Wassef und Joyner, 1997).

Der Prozeß dieser "groben" Strukturierung des Gehirns wird dann abgelöst von vielen weiteren Differenzierungsvorgängen, bei dem die jeweiligen Gehirnregionen ihren Funktionen entsprechend gestaltet werden.

In die Prozesse der Musterbildung und Differenzierung im zentralen Nervensystem sind auch Mitglieder der Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren involviert so z.B. FGF8 (siehe 2.3.2), welches im Rahmen der Neurulation und bei der Determinierung der Mittelhirn/Hinterhirngrenze eine wichtige Rolle spielt sowie FGF2, welches z.B. bei der Ausbildung der Schichten im Cortex von Bedeutung ist (siehe 2.3.1).

2.2 Die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren

Die ersten Mitglieder der Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs) wurden aus dem Gehirn von Rindern isoliert und aufgrund ihres positiven Einflusses auf die Zellteilung und Blutgefäßbildung charakterisiert (Gospodarowicz et al., 1975; Maciag et al., 1979). Bisher sind 19 verschiedene FGFs bei den unterschiedlichsten Tierfamilien, angefangen von *C.elegans* (Nematod), über die Fruchtfliege *Drosophila* (Insekt) bis hin zu den verschiedensten Mitgliedern der Familie der Wirbeltiere (Fisch, Huhn, Frosch, Maus und Mensch) identifiziert worden (FGF1-19, siehe (Szebenyi und Fallon, 1999)). Die Homologie der FGFs zwischen den Tierfamilien beträgt auf der Aminosäure-Ebene zwischen 71% und 100%.

Die Funktion der FGF-Proteine ist vor allem im Rahmen der Embryonalentwicklung und auch während der Morphogenese der verschiedensten Organe sehr vielfältig und komplex. Mitglieder der Familie der FGFs sind zu bestimmten Zeitabschnitten in allen Gewebetypen (Epithel-, Muskel-, Binde- und Nervengewebe) des sich entwickelnden Organismus zu finden.

Die FGFs werden im Rahmen ihrer Synthese verschiedensten Modifikationen auf der Ebene der Transkription, der Translation und der posttranslationalen Veränderung unterworfen. Diese Modifikationen führen z.B. zur Entstehung von Spliceformen der einzelnen FGFs und FGF-Rezeptoren, welche gewebsspezifisch wirken.

Die meisten FGFs werden durch drei Exons codiert, wobei die Länge der cDNA ca. 600bp umfaßt. Jedes Exon codiert für einen β -Strang, so dass die drei Stränge gemeinsam eine sogenannte Kleeblattstruktur ausbilden (Murzin et al., 1992).

Die 19 verschiedenen FGFs haben einen 120bp umspannenden hochkonservierten "Herzbereich" gemeinsam, in welchem zum einen die Bindungsstellen für die verschiedenen Rezeptoren liegen und zum anderen Signale für posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Glycosylierung etc.) (siehe Abb. 1).

Einige der FGF-Proteine (FGF1, 2, 3, 12, 13) weisen im 5' Bereich nukleäre Lokalisationssignale auf, welche für den Transport der FGFs in den Kern der Zelle sorgen. FGF2 besitzt neben dem konservierten Translationsstart (ATG), der allen FGFs gemein ist noch drei weitere potentielle Transkriptions-Initiationsstellen (CUG, siehe 2.3.1)

Eine spezielle Signalsequenz 3' des ATG sorgt bei einigen FGFs (FGF4, 5, 6, 7, 8, 10, 15) für die Sekretion der Moleküle über den ER-Golgi Weg (siehe 2.3.2.).

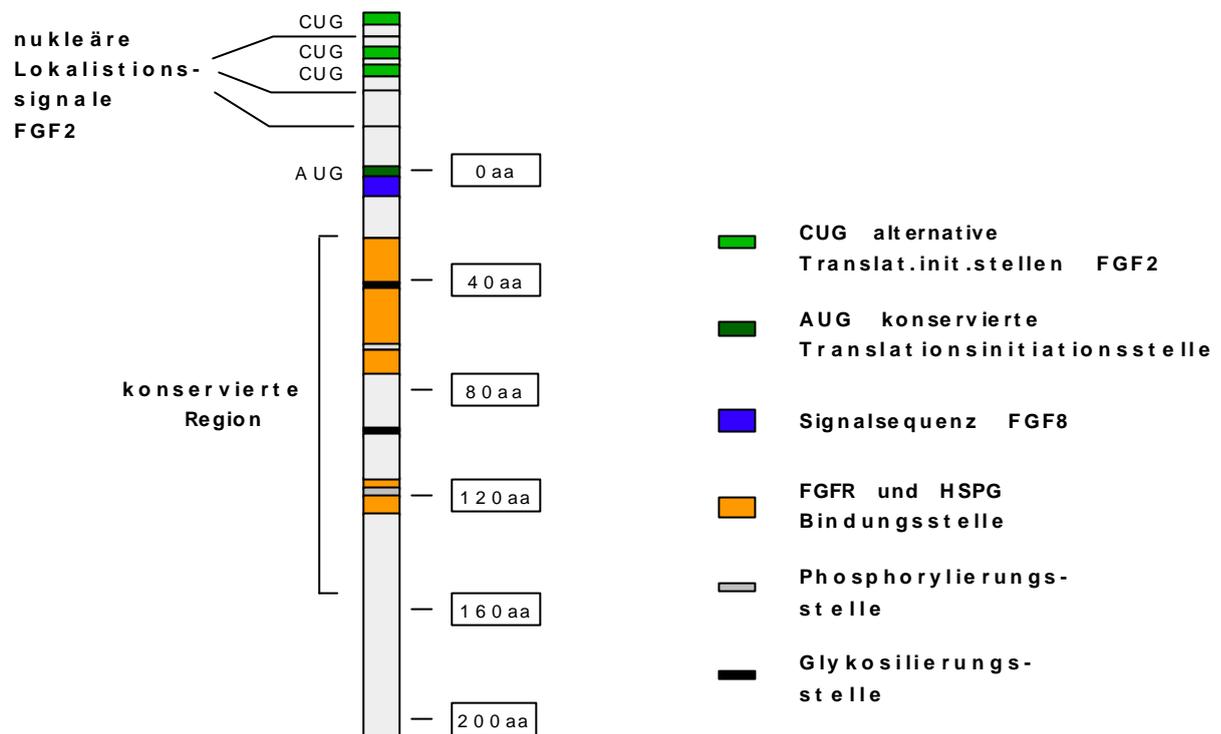


Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung eines FGF-Proteins, wobei die Besonderheiten des FGF8-Proteins (Signalsequenz) bzw. FGF2-Proteins (alternative Translationsinitiationsstellen und nukleäre Lokalisations-signale) gesondert bezeichnet sind, modifiziert nach (Szebenyi und Fallon, 1999).

Die sekretierten FGF-Signalproteine interagieren auf der Zelloberfläche der Zielzellen mit drei verschiedenen Klassen von Rezeptoren. Zu diesen gehören auf der einen Seite die hoch-bindungsspezifischen FGF-Rezeptoren 1-4, auf der anderen Seite die weniger bindungsspezifischen Heparansulfat Proteoglycane (HSPGs) und die cysteinreichen FGF-Rezeptoren (CFRs).

Die FGF-Rezeptoren 1-4 gehören zur Familie der einfach-membranspannenden Proteine (siehe Abb. 2). Ihr extrazellulärer Bereich bildet drei Immunglobulin-Domänen (IgD) aus, wobei nur die IgDII und IgDIII wichtig für die spezifische Bindung der FGFs an die Rezeptoren sind (Wang et al., 1995b; Shi et al., 1993; Cheon et al., 1994; Zimmer et al., 1993). Natürlich vorkommende Spliceformen, denen die IgDI fehlt, zeigen volle Aktivität (Dionne et al., 1990; Johnson et al., 1990). Die Funktion der IgDI liegt vermutlich in der Erhöhung der Affinität des Rezeptors bezüglich der Interaktion mit HSPG und FGF (Wang et al., 1995a).

Der Bereich zwischen der IgDI und IgDII beherbergt eine Bindungsstelle für Zell-Adhäsionsmoleküle (CAM: L1, neurales CAM), welche auch über die FGF-Rezeptoren die intrazelluläre Signalkette aktivieren können (Doherty und Walsh, 1994; Williams et al., 1994a; Williams et al., 1994b). Des weiteren befindet sich dort auch eine "acidic box",

welche spezifisch für die Klasse der FGF-Rezeptoren ist und über die Bindung zweiwertiger Kationen den FGF-Rezeptor-Komplex stabilisiert (Chaudhuri et al., 1993). Die intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne ist essentiell für die Aktivierung der Signalkaskade in der Zelle nach der Bindung eines FGFs an den Rezeptor. Diese Tyrosin-Kinase-Domäne ordnet die FGF-Rezeptoren in die Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ein, zusammen mit den Rezeptoren für Insulin, den epidermalen Wachstumsfaktor, den Nerven-Wachstumsfaktor, den Hepatozyten-Wachstumsfaktor etc. (van der Geer et al., 1994).

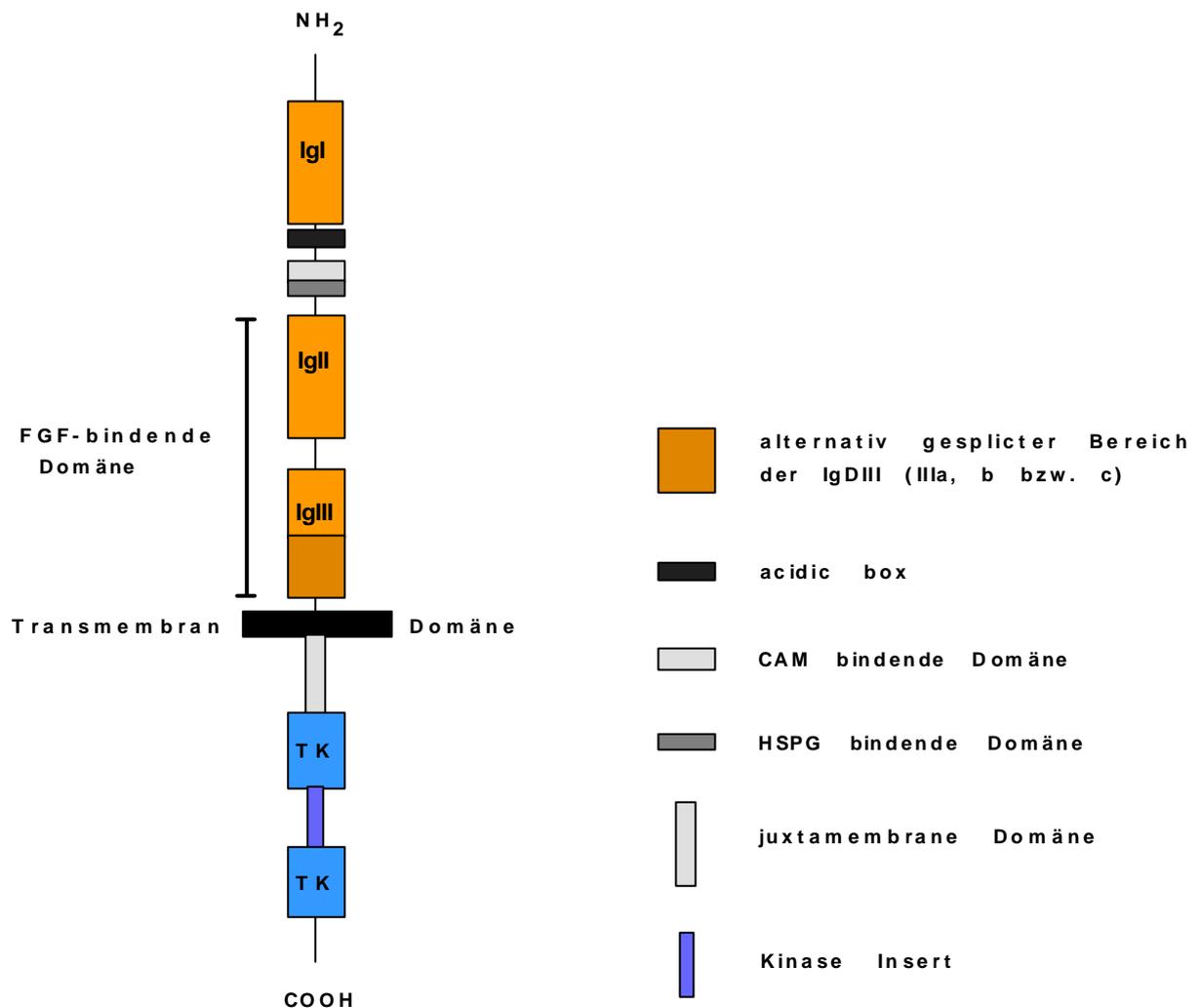


Abbildung 2 zeigt das Schema eines FGF-Rezeptor-Proteins nach (Szebenyi und Fallon, 1999). Die Domänensymbole sind im Bild benannt. Beschreibung der Domänen im Text. IgI-III: Immunglobulindomäne I-III, TK: Tyrosin-Kinase Domäne.

Die FGF-Rezeptoren kommen in einer Vielzahl verschiedener Spliceformen vor. Diese weisen z.B. Verkürzungen im extrazellulären Bereich der IgDs oder im transmembranenen und intrazellulären Bereich des Proteins auf. So gibt es auch FGF-Rezeptoren, die mangels einer Transmembrandomäne frei im Cytoplasma existieren. Einige Beispiele verschiedener FGF-Rezeptor-Moleküle sind für den FGF-Rezeptor 2 in Abb. 3 gezeigt.

Diesen fehlen z.B. N-terminale Bereiche (KGFR, K-sam), oder sie beinhalten Modifikationen am C-terminalen Ende (K-sam, TK25, siehe Abb.3).

Neben den FGF-Rezeptoren, denen einzelne Domänen fehlen, existieren auch alternative Spliceprodukte für die IgDIII der Rezeptoren (IgDIIIa, b oder c in Abbildung 2, 3). Die verschiedenen Spliceprodukte innerhalb der IgDIII bestimmen auch die Bindungsaffinität der FGFs an die FGF-Rezeptoren. Die Isoform IIIc des FGF-Rezeptors 2 bindet FGF8 z.B. zehnmal so stark wie die Isoform IIIb (Ornitz et al., 1996).

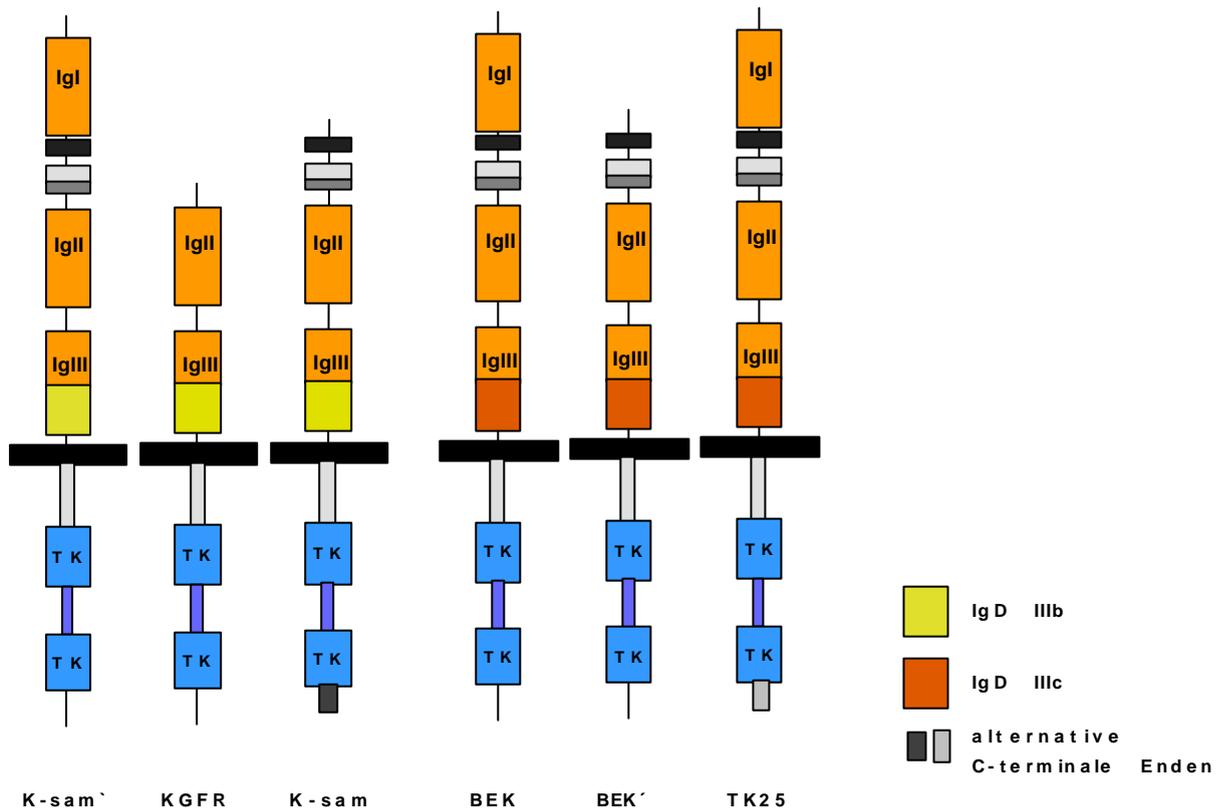


Abbildung 3 zeigt bekannte Spliceformen des FGF-Rezeptors 2.

Neben alternativen Splicevarianten der IgDIII treten Verkürzungen im 5' Bereich und Modifikationen im 3' Bereich des Proteins auf.

Die Spliceformen K-sam, K-sam' wurden aus einer Magen-Krebszelllinie isoliert. KGFR steht für Keratinozyten-Wachstums-Rezeptor. BEK und BEK' wurden aus einer Maus Leber cDNA-Library isoliert, TK25 aus einer Tumor cDNA-Library.

Benennung der Domänen siehe Abb. 2. Die Zeichnung wurde nach (Johnson und Lewis, 1993) modifiziert, dort sind auch die Literaturzitate für die Splicevarianten zu finden.

Die Bindung der FGFs an die hochaffinen FGF-Rezeptoren 1-4 erfolgt nach einem bestimmten Modell. Jedes FGF-Molekül bindet ein HSPG-Molekül, wobei dieser Komplex an einen FGF-Rezeptor "andockt" (Plotnikov et al., 1999). Eine Aktivierung des Rezeptors passiert jedoch nur dann, wenn ein benachbarter FGF-Rezeptor ebenfalls gebunden wird. Dabei kann es zur Bildung von Homodimeren (Moleküle einer FGF-Rezeptor-Art bilden den Komplex) oder zur Bildung von Heterodimeren (Rezeptoren zwei

verschiedener Arten bilden den Komplex) kommen (Abb. 4a). Das Zusammenfinden dieser Doppeldimere aus zwei FGF-Molekülen und zwei FGF-Rezeptor-Molekülen, führt dann zu einer intermolekularen Autophosphorylierung der FGF-Rezeptoren im intrazellulären Bereich (Bellot et al., 1991). Diese Phosphorylierung aktiviert wiederum die Tyrosin-Kinase, welche dann ihrerseits Moleküle innerhalb der verschiedenen Signalkaskaden phosphoryliert und so aktiviert (Heldin, 1995; Mohammadi et al., 1996).

Im Allgemeinen interagieren die phosphorylierten FGF-Rezeptoren mit verschiedenen Enzymen oder Adapter-Molekülen, welche eine SH2-Domäne beinhalten. Hierzu gehört z.B. die PhospholipaseC- γ oder die Adaptor-Moleküle FGF-Rezeptor-Substrat 2 und Grb2, welche über verschiedene Wege zur Aktivierung von Raf und Ras führen und somit eine Regulation der Transkription über die MAP-Kinase nach sich ziehen (Übersicht in (Klint und Claesson-Welsh, 1999)). Die aktivierte Signalkette führt dann in der Zielzelle z.B. zu einer vermehrten Proliferation der Zelle als Reaktion auf die Bindung von FGF an den Rezeptor (siehe Abb. 4a).

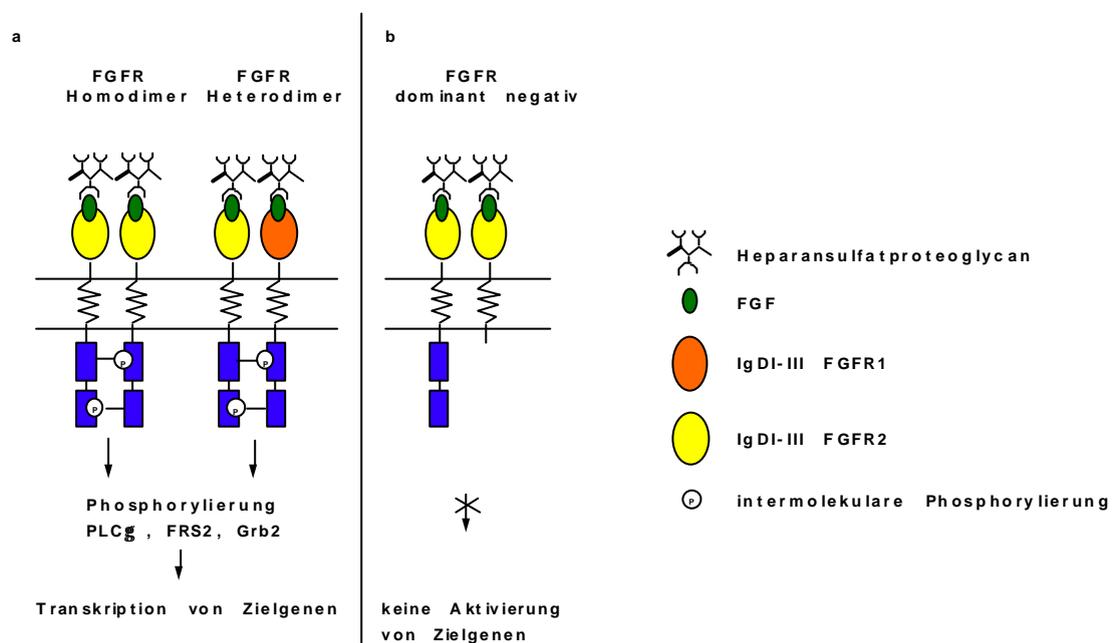


Abbildung 4 zeigt schematisch die Aktivierung von FGF-Rezeptoren durch die Bildung von Homo- oder Heterodimeren zwischen den Rezeptoren (4a). Diese Aktivierung der FGF-Rezeptoren über den FGF/HSPG Komplex führt über die Phosphorylierung der Tyrosin-Kinasen zur der Aktivierung von PLC γ (PhospholipaseC- γ), FRS2 (FGF-Rezeptor Substrat2) und Grb2. Auf diese Weise wird die Transkription von Zielgenen reguliert.

Die Bindung von dominant negativen Rezeptoren führt zur Inaktivierung der Signalkaskade (4b).

Neben den hoch bindungsspezifischen FGF-Rezeptoren sind noch die Heparansulfatproteoglycane und die cysteinreichen FGF-Rezeptoren als Moleküle bekannt, welche mit FGFs interagieren können und daher eine Rolle bei der FGF-Signaltransduktion spielen.

Heparansulfatproteoglycane (HSPGs) sind ubiquitär exprimierte Makromoleküle, welche mit der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Sie bestehen aus einem Proteinstamm, an den Heparansulfat-Glycosaminoglykane (HS-GAG) angelagert sind. Diese HS-GAG-Ketten sind negativ geladen und für die Bindung der FGFs

verantwortlich (Esko, 1991; DiGabriele et al., 1998). Die Bindung der FGFs an die HSPGs bewahrt erstere zum einen vor proteolytischer Spaltung, zum anderen wird die Konzentration der FGFs an der Oberfläche der Zelle erhöht und die Bindung der FGFs an die FGF-Rezeptoren 1-4 erleichtert (Quarto und Amalric, 1994; Roghani et al., 1994; Faham et al., 1996).

Daß diese Rolle der HSPGs auch in vivo von Bedeutung ist, konnte in *Xenopus* und *Drosophila* gezeigt werden. In *Xenopus* führt die Abspaltung von Seitenketten der HSPGs zur Inhibierung der Mesoderm Differenzierung, in einem anderen Ansatz wird das Wachstums und die Zielfindung von Axonen des optischen Systems durch die Modifikation der HSPGs beeinträchtigt (Itoh und Sokol, 1994; Walz et al., 1997).

In Fliegen, bei denen die, für die Synthese die HSPGs verantwortlichen Enzyme mutiert sind, wurde ein Phänotyp beschrieben, welcher dem von FGF-Rezeptor-Inaktivierungs-Experimenten ähnelt. Die Ausbildung des Tracheensystems in diesen Tieren ist stark gestört. Die Überexpression des FGF-Rezeptor-Liganden in den Fliegen, welche die Enzym-Mutation zeigen, führt zu einer fast vollständigen Normalisierung des Phänotyps (Lin et al., 1999). Das Ergebnis dieser Experimente untermauert auch die Vorstellung, dass die HSPGs die Interaktion von FGF und FGF-Rezeptoren erleichtern und den Komplex stabilisieren (Burgess und Maciag, 1989; Ornitz et al., 1995; Schlessinger et al., 1995; Venkataraman et al., 1996; Plotnikov et al., 1999).

Cysteinreiche FGF-Rezeptoren (CFRs) sind Glykoproteine, die im extrazellulären Bereich 16 cystein-reiche Wiederholungssequenzen besitzen, gefolgt von einer Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulären Bereich (Burrus et al., 1992). Die Bindung der CFRs an die FGFs findet in dem selben Bereich der FGF-Proteine statt, in dem auch die Bindung zu den hochspezifischen FGF-Rezeptoren passiert (Zhou et al., 1997).

CFRs sind im Golgi-Apparat der Zelle lokalisiert und führen in Zellen, welche keine FGF-Rezeptoren exprimieren, zur Verringerung des intrazellulären FGF-Levels (Zuber et al., 1997). HSPGs haben vermutlich auch eine Funktion in Bezug auf die Verteilung der FGFs zwischen dem extrazellulären Bereich und dem Cytoplasma der Zelle. In Zellen, denen die FGF-Rezeptoren fehlen, wird FGF2 über einen Mechanismus, bei dem HSPGs involviert sind, in die Zelle transportiert (Quarto und Amalric, 1994).

Das Vorhandensein von FGF-Rezeptoren, die für die spezifische Aktivierung der FGF-Signalkaskade verantwortlich sind auf der einen Seite, und den HSPGs und CFRs, welche die Aktivierung der Signalkaskade unterstützen und für die Verteilung der FGF-Moleküle im Gewebe verantwortlich sind auf der anderen Seite, ermöglicht eine feine Regulation der FGF-Signaltransduktion in den Zellen.

Die Funktionen der FGFs im Organismus werden so durch einen komplexen Regulationsmechanismus gesteuert, der ein feines Zusammenspiel der exprimierten Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren in verschiedenen Geweben zu verschiedenen Entwicklungsstadien erfordert und ermöglicht.

Die Komplexität dieses Systems entsteht wie bereits beschrieben durch das Vorhandensein von:

- 19 FGFs
- verschiedenen Rezeptoren (FGF-Rezeptor1-4, HSPG, CFR)
- Homo- und Heterodimerenbildung der Rezeptoren
- Splicevarianten der FGFs und FGF-Rezeptoren

- gewebespezifischer Expression

Bei einer Beeinträchtigung dieses feinen Zusammenspiels zwischen FGFs und ihren Rezeptoren, kann es zu erheblichen Störungen während der Entwicklung kommen. Tabelle A1 zeigt eine Übersicht über die Auswirkung der verschiedenen Mutationen von FGFs bzw. FGF-Rezeptoren in der Maus. Die meisten Mutationen der aufgeführten FGF-Moleküle, führen zu Mißbildungen verschiedener Organe, welche die Tiere zumindest bis zur Geburt überleben lassen (FGF3, FGF5, FGF6 etc.).

Andere FGFs, wie FGF8 führen bei einer Null-Mutation zu einem sehr frühen, letalen Phänotyp (E8.5) in der Maus. FGF8 ist jedoch nicht nur sehr früh bei der Ausbildung des Primitivstreifens von Bedeutung, es besitzt auch zu einem späteren Zeitpunkt (E9.5) eine wichtige Funktion in Bezug auf die Etablierung der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze in der Maus (siehe 2.3.2). Die Null-Mutante von FGF8 zeigt nur die frühe Funktion des Gens auf. Daher sind zeit- und gewebsspezifische Funktionsstudien bei den FGFs, deren Null-Mutationen einen sehr frühen letalen Phänotypen zeigen, notwendig.

Für die Klasse der FGF-Rezeptoren gilt das gleiche. Die Null-Mutante des FGF-Rezeptors 3 überlebt mit spezifischen Veränderungen (Veränderungen der Knochen und Taubheit) bis nach der Geburt, während die Null-Mutanten der FGF-Rezeptoren 1 und 2 sehr frühe, letale Phänotypen haben. Auch hier wird die differenzierte Analyse von Tieren, bei denen die FGF-Rezeptoren zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem bestimmten Gewebe inhibiert sind, weiter Aufschluß über deren spezifische Funktion geben.

Gen	Mutationen	letal	Phänotyp	Referenzen
FGF2, bFGF	Null		Zytoarchitektur des Neocortex verändert überleben	(Ortega et al., 1998) (Dono et al., 1998) (Zhou et al., 1997)
FGF3	Null	postnatal	Innenohrdefekte,	(Mansour et al., 1993)
FGF4	Null	E 5.5	Epiblast Defekte,	(Feldman et al., 1995)
FGF5	Null		Haar Follikel Defekt, überleben	(Hebert et al., 1994)
FGF6	Null		Muskel Regenerations-Probleme	(Floss et al., 1997)
FGF7	Null		Keratinocyten Organisation beeinträchtigt	(Guo et al., 1996)
FGF8	Null	E 8.5	Primitive Streifen Defekt,	(Meyers et al., 1998) (Sun et al., 1999)
FGF9	Null		normal	Ornitz, siehe (Xu et al., 1999b)
FGF10	Null	P0	Extremitäten und Lunge fehlen	(Min et al., 1998)
FGFR1	Null	E 7.5-9.5	Wachstumsretardation, mesodermale Defekte,	(Deng et al., 1994) (Yamaguchi et al., 1994)
FGFR1	a-Isoformen zerstört	E 9.5-12.5	Extremitätenknospen verkürzt, posteriore Defekte,	(Xu et al., 1999c)
FGFR2	Null	E 4.5-5.5		(Arman et al., 1998)
FGFR2	Deletion IgIII	E 10.5	Extremitäten Initiierungs- und Placentabildungsdefekte,	(Xu et al., 1998)
FGFR3	Null	postnatal	Knochen Überproliferation, Innenohr Defekte	(Colvin et al., 1996) (Deng et al., 1996)

FGFR4	Null		normal	(Weinstein et al., 1998)
-------	------	--	--------	--------------------------

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über einige Ergebnisse verschiedener FGF- bzw. FGF-Rezeptor (FGF-Rezeptor)-Mutationen in der Maus, nach (Xu et al., 1999b).

Beim Menschen sind eine Vielzahl von Mutationen der FGFs und ihrer Rezeptoren bekannt. So zeigen z.B. Patienten mit Innenohrdefekten Mutationen im FGF3-Gen. Patienten, bei denen das Haarwachstum gestört ist, zeigen Veränderungen des FGF5-Gens. Astrocytome können durch Defekte im FGF1- und FGF2-Gen verursacht werden (Muenke und Schell, 1995).

Bei Mutationen der FGF-Rezeptoren handelt es sich zumeist um Punktmutationen, die vor allem die IgD der FGF-Rezeptoren betreffen und zu einer ständigen Aktivierung der Signalkaskade führen. Diese Hyperaktivierung führt zu verschiedenen Krankheitsbildern wie der Achondroplasie, dem Pfeiffer-, Apert- und Crouzon-Syndrom. Die Patienten zeigen je nach Art der Erkrankung Fehlbildungen im Bereich der Extremitäten, der Schädelknochen, des Innenohrs und des Gesichts (Muenke und Schell, 1995; Yamaguchi und Rossant, 1995; Webster und Donoghue, 1997; Wilkie, 1997).

Für die meisten der humanen Krankheiten, die durch Mutationen in den FGFs bzw. den FGF-Rezeptoren verursacht werden, existieren Mausmodelle (siehe Tabelle 1), die sehr ähnliche Phänotypen aufweisen und somit gut geeignet sind die humanen Krankheiten zu erklären und mögliche Therapien zu erarbeiten.

2.3 FGF8 und FGF2 - zwei Signalmoleküle aus der Gruppe der Fibroblasten Wachstumsfaktoren

Nach der allgemeinen Vorstellung der Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren werden nun die beiden Fibroblasten Wachstumsfaktoren FGF2 und FGF8 im Detail beschrieben. FGF2 und FGF8 spielen beide eine wichtige Rolle während der Entwicklung und der Differenzierung des Nervensystems in der Maus.

FGF8 (AIGF) wurde bei Experimenten in Zellkultur (SC3-Mammary Carcinom Zellen) aufgrund seiner, das Zellwachstum stimulierenden Eigenschaft identifiziert. Hierbei konnte FGF8 durch den Zusatz von Testosteron in das Medium induziert werden (AIGF: Androgen Induced Growth Factor) (Tanaka et al., 1992).

FGF2 (bFGF: basic FGF) wurde ursprünglich aus Rinder Hypophysen isoliert und aufgrund seines isoelektrischen Punkts benannt (Bohlen et al., 1984; Abraham et al., 1986).

FGF2 und FGF8 gehören beide zur Familie der FGF-Signalmoleküle (siehe 2.2). Daher entspricht ihre Struktur im Prinzip dem in Abb. 1 gezeigten Proteinmodell, jedoch mit einigen Besonderheiten, welche dort auch angeführt sind.

FGF2 ist im Organismus in vier verschiedenen molekularen Größen zu finden (18, 22, 22.5, 24kDa). Die HMW-Formen (high molecular weight, 22-24kDa) entstehen durch alternative Translation und beinhalten im N-terminalen Bereich des Proteins ein Zellkern-spezifisches Lokalisierungssignal (siehe Abb. 1). Der kleinen, cytoplasmatischen Form (18kDa) fehlt dieses Signal (Florkiewicz und Sommer, 1989; Prats et al., 1989; Bugler et al., 1991; Zuniga Mejia Borja et al., 1993). Die beiden Isoformen werden gewebsspezifisch

translatiert (Coffin et al., 1995), und zeigen unterschiedliche biologische Aktivität. Nur die 18kDa-Form hat in vitro eine Mitose stimulierende Eigenschaft (Bikfalvi et al., 1995).

FGF8 besitzt kein nukleäres Lokalisationssignal, tritt allerdings auch in verschiedenen Spliceformen auf. Die acht Varianten des FGF8-Transkripts zeigen Variationen der Sequenz im mittleren Bereich des Gens; der Leserahmen, der 5' und der 3' Bereich des Gens der unterschiedlichen Formen sind jedoch identisch (Abb. 5) (Crossley und Martin, 1995; MacArthur et al., 1995a). Die Signalsequenz, welche die Sekretion von FGF8 über den ER-Golgi-Pathway bestimmt, ist in allen Spliceformen vorhanden (siehe Abb. 1, 5) (Fernig und Gallagher, 1994). Die Ursache für das Vorhandensein der verschiedenen Spliceformen liegt in der Unterteilung des ersten Exons des FGF-8 Gens in mindestens vier Exons (1A-D, siehe Abb. 5), wodurch FGF8 mit insgesamt mindestens sechs codierenden Exons eine gesonderte Stellung in der Gruppe der übrigen FGFs einnimmt, die in der Regel nur drei Exons codiert werden (siehe 2.2) (Szebenyi und Fallon, 1999).

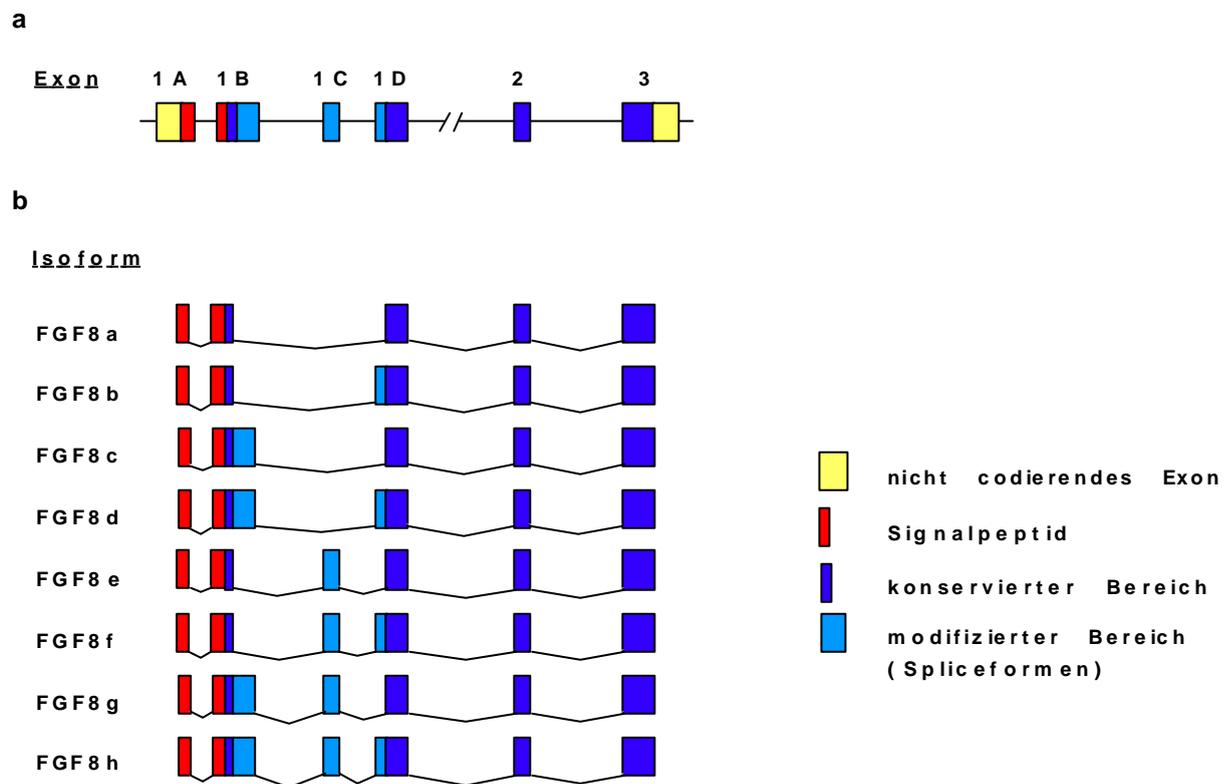


Abbildung 5 beschreibt die bekannten Spliceformen von FGF8 nach (MacArthur et al., 1995a). Abb. 5a zeigt die genomische DNA von FGF8, Abb. 5b die verschiedenen für die Translation gesplittenen Isoformen. Für die Codierung der acht Isoformen von FGF8 sind mindestens 6 Exons verantwortlich. Das Exon 1 der anderen FGFs ist auf mindestens 4 Exons (A1-A4) aufgeteilt. Das Signalpeptid und der 3' Bereich sind konserviert und in allen Spliceformen zu finden.

Die Sekretion von FGF8 aus der Zelle erfolgt wie bereits erwähnt über den üblichen ER-Golgi-Weg. Im Gegensatz zur Sekretion dazu findet die Sekretion von FGF2 mangels eines

Signals für diesen Sekretionsweg auf bisher unbekannt Weise statt (Mignatti et al., 1992; Florkiewicz et al., 1995).

FGF2 und FGF8 zeigen wie alle Fibroblasten Wachstumsfaktoren neben der niederaffinen Bindung an HSPG und CFR auch spezifische Bindungen zu den FGF-Rezeptoren (siehe 2.2). Dabei bindet FGF2 in Zellkultur mit zunehmender Affinität die FGF-Rezeptoren 3IIIb, 2IIIb, 1IIIb, 2IIIc, 1IIIc, 3IIIc und 4IIIc. FGF8b zeigt Bindung zu R1IIIc, 3IIIb, 1IIIb, 2IIIb, 2IIIc, 3IIIc und 4IIIc mit zunehmender Bindungsstärke (Ornitz et al., 1996). Für FGF8 wurde zudem eine detaillierte Analyse der Interaktion der verschiedenen FGF8-Spliceformen (siehe Abb. 5) mit den FGF-Rezeptor-Spliceformen (siehe Abb. 3) durchgeführt (Blunt et al., 1997). Dabei binden die Isoformen FGF8c, d, e und g den FGF-Rezeptor 3IIIc und FGF-Rezeptor 4 während FGF8b und f die Rezeptoren 2IIIc, 3IIIc und 4 binden. Für FGF8a konnte hier keine spezifische Bindung nachgewiesen werden. Da diese Experimente in Zellkultur unternommen wurden, geben sie nur einen Hinweis auf mögliche FGF-FGF-Rezeptor Interaktionen in vivo. Eine genaue Beschreibung der Expressionsmuster und Interaktionen der FGF- und FGF-Rezeptor-Spliceformen in den verschiedenen Geweben werden die in-vivo-Daten in Zukunft erbringen.

2.3.1 Die Expression und Funktion von FGF2

Im Gegensatz zu den sehr restringiert exprimierten anderen FGFs ist FGF2 im sich entwickelnden Embryo vom Stadium der Neurulation an sehr weitläufig in verschiedenen Geweben vorhanden. Hierzu gehören nicht nur verschiedenen Bereiche des Nervensystems sondern z.B. auch die sich entwickelnden Extremitäten, Herz, Lunge und Nieren (Gonzalez et al., 1990; Weise et al., 1993; Dono und Zeller, 1994; Riese, Zeller, 1995). Entsprechend vielfältig sind auch die Aufgaben, die FGF2 während der Embryogenese und im adulten Tier übernimmt. In einer Vielzahl von in-vitro- und in-vivo-Experimenten konnten FGF2 verschiedene Funktionen zugeschrieben werden.

Während der Ausbildung des Nervensystems kommen FGF2 unterschiedliche Funktionen zu. In Zellkultur wurde zunächst gezeigt, dass FGF2 sowohl die Teilung von cortikalen und hippocampalen, multipotenten Stammzellen anregt, als auch die Differenzierung und das Überleben von postmitotischen Neuronen fördert (Vescovi et al., 1993; Ghosh und Greenberg, 1995; Temple und Qiang, 1995; Vicario-Abejon et al., 1995; Qiang et al., 1997; Palmer et al., 1999). Daneben hat FGF2 auch einen Einfluß auf die Morphogenese und Funktionsgestaltung von Glia-Zellen (Petroski et al., 1991; Condrón, 1999). In der Maus wurde gezeigt, dass die Überexpression von FGF2 zu einer Überproliferation des Neuralrohrs führt (Zuniga Mejia Borja et al., 1996). Des weiteren zeigen FGF2 Inaktivierungs-Experimente, dass FGF2 in der Maus eine spezifische Rolle bei der korrekten Ausbildung einzelner Schichten im Cortex übernimmt - in den FGF2-Mutanten finden einzelne Neurone die ihnen zugeordneten Schichten nicht mehr. (Dono et al., 1998; Ortega et al., 1998).

Neben den vielfältigen Funktionen von FGF2 im Nervensystem funktioniert FGF2 in *Xenopus* als Mesoderm induzierender und differenzierender Faktor (Slack et al., 1987; Gillespie et al., 1992; Kimelman und Maas, 1992; Slack et al., 1992; Cornell und

Kimelman, 1994; Labonne und Whitman, 1994; Gato et al., 1995) und kann während der Extremitätenentwicklung im Huhn die AER (apical ectodermal ridge) ersetzen bzw. die Bildung einer neuen Extremitätenknospe induzieren (Fallon et al., 1994; Cohn et al., 1995).

Daneben spielt FGF2 auch eine Rolle beim Tumorwachstum und der Blutgefäßbildung (Basilico und Moscatelli, 1992; Bikfalvi et al., 1997). Der positive Einfluß auf die Blutgefäßbildung wurde in der Maus ebenfalls in Überexpressionsstudien gezeigt (Fulgham et al., 1999). Andererseits haben FGF2-defiziente Tiere einen niedrigeren Blutdruck und eine verzögerte Wundheilung (Dono et al., 1998; Ortega et al., 1998). Die Überexpression von FGF2 zeigt den Einfluß dieses Faktors auf das Knochenwachstum; FGF2 transgene Tiere zeigen eine Verkürzung der Knochen (Coffin et al., 1995).

Wie soeben beschrieben, besitzt FGF2 eine Vielzahl von Funktionen während der Entwicklung der Maus. Welche Gene in den verschiedenen Geweben durch die FGF2-Signalkaskade reguliert werden, muss noch geklärt werden. Eine Möglichkeit bietet z.B. die Genfallen-Methode, bei der gezielt nach Genen gesucht wird, die durch FGF2 reguliert werden (siehe 2.5.2).

2.3.2 Die Expression und Funktion von FGF8

Im Gegensatz zu FGF2 (siehe 2.3.1) ist FGF8 ein Wachstumsfaktor, der während der Embryonalentwicklung ein sehr distinktes Expressionsmuster zeigt. Die Expression von FGF8 in der Maus ist ab dem Tag 5.5 im visceralen, embryonalen Endoderm zu detektieren. Mit Beginn der Gastrulation ist FGF8 im Primitivstreifen, später dann in den Somiten, im sich entwickelnden Herz, in den sich entwickelnden Nieren, im Kopfbereich (Mittelhirn/Hinterhirngrenze, Epithel des 1ten Kiemenbogens und der olfaktorischen Placode bis Tag 10.5 bzw. 12.5) und in den sich entwickelnden Extremitäten (AER der Vorder- und Hinterextremitäten bis Tag 14.5) zu finden (Ohuchi et al., 1994; Crossley und Martin, 1995; Mahmood et al., 1995). In Xenopus, im Zebrafisch und im Huhn ist FGF8 in nahezu identischen Regionen im Lauf der Embryogenese exprimiert (Mahmood et al., 1995; Christen und Slack, 1997; Reifers et al., 1998). Im adulten Tier konnte FGF8 bisher nicht detektiert werden.

Im Rahmen der Gehirnentwicklung ist FGF8 maßgeblich an der Ausbildung der Mittelhirn/Hinterhirngrenze (Isthmus) beteiligt. In Zebrafisch *acerebellar* (*FGF8*) Mutanten fehlt der Isthmus und das Cerebellum (Reifers et al., 1998).

Die Transplantation von FGF8-Trägerkugeln in verschiedene Gehirnregionen im Huhn zeigt, dass FGF8 das Potential besitzt, im entsprechenden Umfeld einen ektopischen Isthmus mit den entsprechenden Markergenen und nachfolgend Mittelhirn- und Cerebellumstrukturen zu induzieren (Crossley et al., 1996a; Martinez et al., 1999).

Mäuse, bei denen im FGF8-Lokus eine allelische Serie von Mutationen erzeugt werden kann, zeigen unterschiedlich schwere Phänotypen: angefangen von Gastrulationsdefekten über Defekte bei der Herzentwicklung bis hin zu Mißentwicklungen bei der Vorderhirn-, Mittelhirn- und Cerebellumentstehung (Meyers et al., 1998).

In FGF8 mutierten Mäusen und FGF8-Überexpressionsstudien im Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass FGF8 schon während der Gastrulation eine entscheidene Rolle bei der

Mesoderm- und Endodermbildung, der dorso-ventralen Definierung und der Differenzierung des Neuroektoderms zukommt (Christen und Slack, 1997; Fürthauer et al., 1997; Sun et al., 1999).

Des Weiteren spielt FGF8 zu einem frühen Stadium auch eine Rolle bei der links-rechts Definition im Embryo (Boettger et al., 1999; Meyers und Martin, 1999).

Die Zebrafisch FGF8-Mutante *acerebellar* zeigt neben den Defekten des Nervensystems (siehe oben) auch, dass FGF8 entscheidend für die Induktion und die Musterbildung der Vorläuferzellen des Herzens ist (Reifers et al., 2000).

Auch die Entwicklung der Extremitäten wird durch FGF8 beeinflusst. Nach der Entfernung der Extremitätenvorläufer bei *Xenopus* ist FGF8 in der Lage die Bildung neuer funktionsfähiger Extremitäten zu induzieren (Christen und Slack, 1997). Im Huhn führt die Applikation von FGF8 getränkten Trägerkugeln zur ektopischen Induktion von Extremitätenknospen und die Entfernung der AER zu einem frühen Stadium kann durch die Applikation von FGF8 ausgeglichen werden (Vogel et al., 1996).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass FGF8 einige spezifische Funktionen im Rahmen der embryonalen Entwicklung zukommen, wobei noch zu klären bleibt, mit welchen FGF-Rezeptoren FGF8 in den verschiedenen Regionen interagiert und über welche Signalkaskaden die Aktivierung von Zielgenen funktioniert.

2.4 Der FGF-Rezeptor 2

Der FGF-Rezeptor 2 gehört zur Familie der hochspezifischen FGF-Rezeptoren (siehe 2.2) und tritt in sechs verschiedenen Spliceformen auf. Diese sechs Formen werden zwei Gruppen zugeordnet, welche sich im Vorhandensein der IgDIIIb (*bek*) bzw. IgDIIIc (*K-sam*) (siehe Abb. 3) unterscheiden. Dabei werden diese beiden Formen auch unterschiedlich exprimiert; die Expression von *bek* findet sich vor allem im Mesenchym, während die Expression von *K-sam* eher im Epithelium auftritt (Johnson, 1993).

Die beiden Spliceformen sind ab E 7.5 in der Maus exprimiert. Zunächst sind sie im primitiven Ektoderm, in der Kopffalte und schwach im Mesoderm zu sehen. Später beschränkt sich die Expression dann auf Strukturen wie die Somiten, die Herz- und Lungenanlage, die Extremitätenanlagen, das otische Vesikel und seine Derivate, das Verdauungs- und Exkretionssystem (Magen, Darm, Leber, Pankreas, Niere etc.), die sich entwickelnden Knochen, Derivate der Kiemenbögen und die Haut mit ihren Derivaten. Im Nervensystem zeigt sich die Expression des FGF-Rezeptors 2 zunächst im vorderen Teil des Neuralrohrs und beschränkt sich dann weitgehend auf Bereiche des Diencephalon, des vorderen Mesencephalon und Metencephalon und des Rückenmarks (Orr-Urtreger et al., 1991; Orr-Urtreger et al., 1993; Peters et al., 1994). Diese Expressionsdomänen sind entsprechend auch im Huhn und im Fisch beschrieben (Noji et al., 1993; Wilke et al., 1997; Carl und Wittbrodt, 1999; Walshe und Mason, 2000).

Die Bindungsspezifität der beiden FGF-Rezeptor 2 Spliceformen wurde in in-vitro-Studien gezeigt. Dabei bindet die IIIb Variante (*bek*) mit absteigender Bindungsstärke FGF7, FGF1, FGF3 und FGF4, die Variante IIIc (*K-sam*) FGF4, FGF9, FGF6 und FGF1 (Ornitz et al., 1996).

Die Bindungsaffinität von FGF8 an FGF-Rezeptor 2 wurde ebenfalls in Zellkultur studiert. Dabei zeigte die IIIc Variante des FGF-Rezeptors 2 eine relativ starke Aktivierung durch

FGF8b, während FGF8c diese Variante nur schwach aktiviert. Die IIIb Variante des Rezeptors zeigt keine Aktivierung durch FGF8. Da die beide FGF8-Isoformen und der FGF-Rezeptor 2IIIc auch in überlappenden Regionen *in vivo* exprimiert werden, scheint eine Interaktion im Tier wahrscheinlich (MacArthur et al., 1995a)!

Neben diesen *in-vitro*-Experimenten wurden einige *in-vivo*-Studien durchgeführt, wobei der FGF-Rezeptor 2 bzw. einzelne Spliceformen gezielt inaktiviert bzw. dominant negative (dn) Versionen des Rezeptors exprimiert wurden, um eine Inhibition der Signalkaskade zu erreichen (siehe Abb. 3, Tabelle 1).

Die FGF-Rezeptor 2 Inaktivierung, bei der beide Spliceformen, die Transmembrandomäne und Teile der Tyrosin-Kinasedomäne betroffen sind, führt zu einem Defekt in der Entwicklung der Tiere schon vor der Gastrulation. Die innere Zellmasse zeigt Probleme bei der Entwicklung; die Differenzierung des visceralen Endoderms bleibt aus (Arman et al., 1998).

Bei einem anderen Inaktivierungs-Ansatz, bei welchem nur die IgDIII des Rezeptors fehlt, überleben die homozygoten Tiere bis zum Tag 10-11 der embryonalen Entwicklung. Die Placenten der homozygoten Tiere entwickeln sich nicht vollständig, außerdem zeigen sie Probleme bei der Ausbildung der Extremitäten. Das Auswachsen der Extremitäten beruht vermutlich auf einer Interaktion von FGF10 mit dem FGF-Rezeptor 2IIIb im Epithel der Extremitätenanlage, was zu einer Aktivierung von FGF8 führt. FGF8 interagiert dann mit dem FGF-Rezeptor 2IIIc im Mesenchym der Extremitätenanlage und führt so zum Erhalt der FGF10 Expression (Xu et al., 1998; Lizarraga et al., 1999).

Mäuse, denen nur die IIIb Variante des FGF-Rezeptors 2 fehlt, sterben bei der Geburt aufgrund einer Unterentwicklung der Lunge. Des Weiteren zeigen sie Defekte im Bereich der Extremitäten, der Augen, der Ohren, der Knochenentwicklung, der Zähne und der Haut (De Moerloose et al., 2000).

In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines dominant negativen FGF-Rezeptors zu Gastrulationsdefekten und einer fehlerhaften Ausbildung des Mesoderm führt (Amaya et al., 1991).

Das gleiche FGF-Rezeptor-Konstrukt wurde in Medaka-Embryonen zu verschiedenen Entwicklungsstadien injiziert, was bei hoher Dosierung zu Defekten während der Gastrulation (siehe oben), bei niedriger Dosierung zu Deletionen im Kopf und Schwanzbereich bzw. zu subtilen Veränderungen in der Mittelhirn/Hinterhirnregion führte (Carl und Wittbrodt, 1999).

Die Überexpression von dnFGF-Rezeptor 2-Konstrukten in der Maus erbrachte unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von dem verwendeten Promotor und FGF-Rezeptor-Konstrukt.

Die Überexpression eines FGF-Rezeptor 2IIIb dem nur die Tyrosin-Kinase-Domäne fehlt, der jedoch membrangebunden bleibt, führt unter dem SP-C Promotor (human surfactant protein C) zu einer starken Beeinträchtigung der Lungenentwicklung (Peters et al., 1994). Die Expression des FGF-Rezeptor 2IIIb unter einem Metallothionein-Promotor zeigte für die membrangebundene Variante keinen Phänotyp, wohingegen die lösliche Variante zu Verkürzungen der Extremitäten, Veränderungen im Gehirn- und Kopfbereich und der Haut führten (Celli et al., 1998).

Der erfolgreiche Einsatz von Konstrukten für membrangebundene, dominant negative Rezeptoren *in vivo* ist demnach auch abhängig vom Expressionslevel der verwendeten Promotoren.

2.5 Experimente zur Funktionsweise von FGF2 und FGF8 während der Entwicklung des Nervensystems der Maus

Um die Funktion von FGF2 und FGF8 im Nervensystem der sich entwickelnden Maus genauer zu studieren, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurden durch die gezielte Überexpression des dominant negativen FGF-Rezeptors 2IIIc die Einflüsse von FGF8 in der Mittelhirn/Hinterhirnregion (MH-Region) der Maus analysiert, zum anderen wurden mit der Genfallen-Technologie Zielgene von FGF2 identifiziert.

2.5.1 Expression des dominant negativen FGF-Rezeptors 2 unter dem Engrailed 1-Promotor in der Maus

Die Unterteilung des Nervensystems in der Maus wird durch die differenzierte Expression bestimmter Gene vollzogen.

So wird die Unterteilung des Hinterhirns in einzelne Segmente (Rhombomere) unter anderem durch ein jedem Segment eigenes Expressionsmuster verschiedener Hox-Gene definiert. Im Mittelhirnbereich erfolgt diese Unterteilung in verschiedene Bereiche von bestimmten Signalzentren aus (Lumsden und Krumlauf, 1996; Wassef und Joyner, 1997). Zu diesen gehört auch der Isthmus, die spätere Grenze zwischen Mittelhirn und Hinterhirn. Verschiedene Gene sind zu dem kritischen Entwicklungsstadium um den Tag 9 der Mausentwicklung im Nervensystem exprimiert und bilden ein Modell zur Ausprägung dieser Mittelhirn/Hinterhirngrenze (Abb. 6a).

Zu diesen Genen gehören zum einen die beiden Transkriptionsfaktoren Otx2 und Gbx2, deren Expression sich genau am Isthmus konfrontiert und so die Ausbildung dieser Grenze initiiert (Millet et al., 1996; Wassarmann et al., 1997; Shamim und Mason, 1998; Hidalgo-Sanchez et al., 1999b). Durch dieses Aufeinandertreffen von Otx2 bzw. Gbx2 exprimierenden Zellen wird die Expression von FGF8 angestoßen, welches als Signalmolekül vom Isthmus aus eine erste Determinierung der Mittelhirn- und Hinterhirnregion vornimmt (Ohuchi et al., 1994; Crossley und Martin, 1995; Mahmood et al., 1995; Broccoli et al., 1999). Ebenfalls im Isthmus exprimiert sind die Mitglieder der Sprouty-Familie (Spry1-4). Diese membranständigen Proteine sind Antagonisten der FGF-Signalkaskade, durch welche sie induziert werden (Minowada et al., 1999). Die genaue Funktion der Sproutys bei der Etablierung der MH-Region muss noch im Detail untersucht werden. Des Weiteren sind an der MH-Grenze die Transkriptionsfaktoren En1, En2, Pax2, Pax5 und das Signalmolekül Wnt1 exprimiert (Joyner und Martin, 1987; Wilkinson et al., 1987; Asano und Gruss, 1992; Rowitch und McMahon, 1995). Diese werden vermutlich aus verschiedenen Wegen induziert, sind aber für ihren gegenseitigen Expressionserhalt zuständig.

Durch die Interaktion dieser Schlüsselproteine wird die isthmische Region gefestigt und die weitere Spezialisierung der Gehirnregionen eingeleitet.

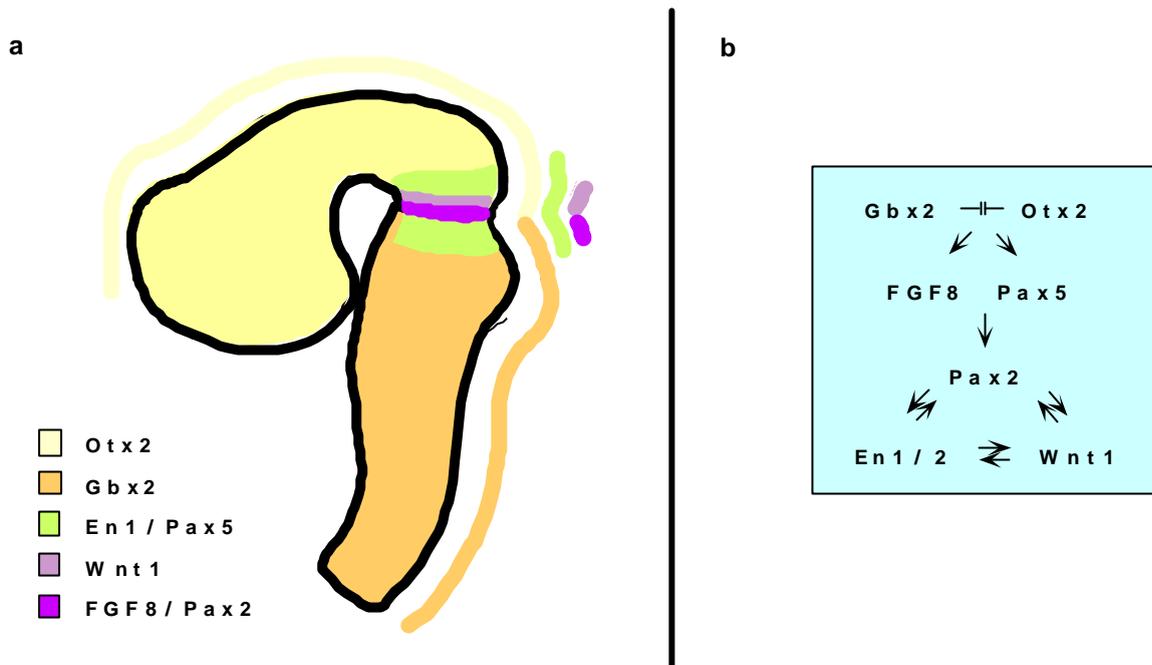


Abbildung 6a zeigt schematisch die Expression der Gene *Otx2*, *Gbx2*, *En1*, *Pax5*, *Wnt1*, *FGF8* und *Pax2* im Gehirn von E9.5 Embryonen. **Abbildung 6b** zeigt vereinfacht die vermeintliche Interaktion der in 6a dargestellten Gene, wobei die Pfeile die positive Regulation derselben anzeigen.

Das Schema der Interaktion der Gene in der Mittelhirn/Hinterhirnregion (siehe Abb. 6b) wurde durch zahlreiche Experimente etabliert.

Hier sind zum einen Transplantations-Experimente am Huhn zu nennen, bei denen entweder Gehirnbereiche oder mit einzelnen Proteinen angereicherte Trägermoleküle eingepflanzt wurden. So konnten z.B. Sensibilitätsbereiche im Gehirn bestimmt werden, welche durch das transplantierte Gewebe oder einzelne Faktoren (z.B. FGF8) modifiziert werden konnten (Martinez et al., 1995; Irving und Mason, 1999; Shamim et al., 1999).

Des Weiteren zeigte die Inaktivierung von Genen bzw. die gezielte Verschiebung von Expressionsdomänen derselben, wie die Proteine untereinander interagieren und in welcher Beziehung sie zueinander stehen (Thomas und Capecchi, 1990; McMahon et al., 1992; Urbanek et al., 1994; Wurst et al., 1994; Danielian und McMahon, 1996; Favor et al., 1996; Broccoli et al., 1999; Liu et al., 1999; Martinez et al., 1999; Millet, K., 1999).

Um die spezifische Funktion von FGF8 in der Mittelhirn/Hinterhirnregion (MH-Region) der Maus zu untersuchen, wurde eine dominant negative Variante des FGF-Rezeptors 2 (dnFGF-Rezeptor 2) unter dem *Engrailed* (*En1*) -Promotor der Maus exprimiert (siehe 4.1). Die ektopische Expression des dnFGF-Rezeptors 2IIIc unter dem starken *En1*-Promotor soll in der MH-Region zu einer Inaktivierung der in diesem Bereich exprimierten Rezeptoren führen. Für die Signaltransduktion kommt es zur Bildung von Homo- und Heterodimeren unter den Rezeptoren - der dominant negative Rezeptor inhibiert im Komplex mit endogenen Rezeptoren die Weiterleitung des FGF-Signals (siehe Abb. 4a,b und 2.4).

En1 ist in der Maus während der embryonalen Entwicklung ab Tag 8.0 im anterioren Neuroepithel in einer Region exprimiert, welche sich zur Mittelhirn/Hinterhirngrenze etabliert. Neben dieser Expression im Isthmus ist *En1* im Rückenmark, in den Somiten, in den

Extremitäten und in der Schwanzspitze des Embryos zu finden (Joyner und Martin, 1987; Davis und Joyner, 1988; Wurst et al., 1994).

Der Verwendung des dominant negativen FGF-Rezeptors bringt bei der Untersuchung der Funktion von FGF8 (und der FGFs im Allgemeinen) in der MH-Region folgende Vorteile:

- Die meisten der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren interagieren auf der Oberfläche der Zelle nicht nur mit einer Art von FGF-Rezeptor sondern mit verschiedenen Arten. Durch die Verwendung des dominant negativen FGF-Rezeptors 2 werden nicht nur die endogenen FGF-Rezeptoren 2 sondern auch, aufgrund der Heterodimerisierung (siehe oben) die endogenen FGF-Rezeptoren 1, 3 und 4 und somit die ganze FGF-Signalkaskade in der MH-Region inhibiert.
- Daneben war zu Beginn dieser Arbeit im Isthmus aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren nur die Expression von FGF8 bekannt. Mittlerweile sind noch zwei weitere FGF-Moleküle, FGF17 und FGF18 beschrieben, welche mit FGF8 in dieser Region koexprimiert sind und in Bezug auf ihre Funktion möglicherweise redundant sind (Maruoka et al., 1998; Ohbayashi et al., 1998; Xu et al., 1999a).
- Die ektopische Expression des dominant negativen Rezeptors verhindert über die Inaktivierung aller FGF-Rezeptoren (1-4) die Signaltransduktion aller drei FGF-Moleküle (FGF8, FGF17 und FGF18) in der MH-Region. Somit kann die Funktion der FGFs im Allgemeinen in diesem wichtigen Signalzentrum analysiert werden. Unter der Verwendung von klassischen Inaktivierungs-Ansätzen wäre das gleiche Projekt mit sehr viel größerem Aufwand (Herstellung dreier transgener Mauslinien und Kreuzung zur dreifachen Mutante) verbunden. Außerdem würden diese Tiere das entscheidende Entwicklungsstadium vermutlich gar nicht erreichen (FGF8 mutante Tiere sind letal am Tag 8.5), so dass mit gewebs- und stadienspezifischer Inhibierung der Expression der FGFs gearbeitet werden müsste.

2.5.2 Das Genfallen-Experiment mit FGF2 / Analyse des neuen Mausgens mbFZb

Mit Hilfe des Genfallen-Experiments können vermeintliche direkte oder indirekte Zielgene von FGF2 bestimmt und deren Expression und Funktion studiert werden (Hill und Wurst, 1993).

Im Induktionstrap werden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) mit einem Genfallen-Vektor elektroporiert, welcher einen Splice-Acceptor und ein an diesen gekoppeltes β -Galaktosidase Gen enthält (siehe 3.7.1). Die Elektroporation führt zur Integration des Vektors in ein beliebiges Zielgen (= mutiertes Gen), so dass die entsprechende ES-Zelle bei Aktivität des Gens nach Färbung (siehe 3.4.2) durch eine Blaufärbung zu erkennen ist. Bei Zugabe von FGF2 in das Medium der ES-Zellen können solche Zellklone identifiziert werden, die eine Veränderung in der Aktivität ihres mutierten Gens zeigen (siehe Abb. 19a, b).

Das Genfallen-Experiment mit FGF2 bietet daher zum einen die Möglichkeit neue Zielgene von FGF2 zu identifizieren, zum anderen können mit den mutierten ES-Zellen Mäuse hergestellt werden, die die entsprechende Mutation und das β -Galaktosidase-Markergen in dem mutierten Locus beinhalten.

Im Rahmen dieses Projekts wurde ein durch FGF2 reguliertes, neues Mausgen (mbFZb) identifiziert. Die Sequenz des Gens wurde analysiert, sein Expressionsmuster studiert und aus den mutierten ES-Zellen Mäuse hergestellt, deren Phänotyp untersucht wurde (siehe 4.2).

3 Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

3.1.1 Restriktionsenzymatischer Verdau von Plasmid-DNA

Zur Charakterisierung von DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Fragmenten können diese mit Restriktionsenzymen (RE) verdaut werden. Diese Endonukleasen erkennen bestimmte Basenabfolgen in der DNA (Erkennungssequenzen) und führen dort durch die Lösung der Phosphodiesterbindung zu einer Unterbrechung des DNA-Doppelstranges.

RE-Ansatz:	1µg	DNA
	2µl	RE-10xPuffer
	0.5µl	RE (10U/µl)
	add. 20µl	Aq.dest.

Der Verdau erfolgt bei 37°C für mindestens eine Std. Zur Kontrolle des Verdaus wird die DNA auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 3.1.2.).

3.1.2 Auftrennung von DNA im Agarose-Gel

DNA kann im Agarosegel ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Fragmente größerer Länge laufen in dem elektrischen Feld langsamer in Richtung des positiv geladenen Poles, als solche mit geringerer Anzahl an Basenpaaren.

Je nach Länge der zu erwartenden DNA-Fragmente werden Agarose/1xTBE-Gele mit einem Anteil von 0.5 Prozent (gute Auftrennung großer Fragmente von 1-10kb) bis zu 1.5 Prozent (gute Auftrennung kleiner Fragmente von 0.1-2kb) Agarose verwendet. Zusätzlich wird dem Gel noch Ethidiumbromid beigemischt (0.2µg/ml, Stock 10mg/ml), welches sich in die DNA einlagert und diese unter UV-Licht sichtbar macht. Die für die Gelelektrophorese anzulegende Spannung und Stromstärke richtet sich zum einen nach dem Abstand der beiden Gelkammerelektroden zueinander und zum anderen nach der beabsichtigten Auftrennungsgenauigkeit der DNA-Banden. Normalerweise werden 80-100V an Spannung und 240mA an Stromstärke verwendet, bei einer Laufdauer von 1-2Std. Die DNA-Proben werden mit 5xProbenpuffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt.

TBE:	1x		10x
	100mM	Tris	108g
	100mM	Borsäure	55g
	2mM	EDTA	9.3g
		Aq.dest.	add. 1l, mit HCl auf pH8.3 einstellen
5x Probenpuffer:	0.2%	Bromphenolblau	0.02g
	50%	Glycerin	5ml (100%)
		Aq.dest.	add. 10ml

Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Isolation der im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe des NucleoTrap Gel Extraction Kits von Clontech. Die gewünschte DNA-Bande wird aus dem Agarosegel (siehe 3.1.2) ausgeschnitten und dem Protokoll entsprechend aufgereinigt.

3.1.3 Vervielfältigung von DNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten kann die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt werden. Dieser Vorgang besteht aus drei Reaktionsschritten.

Im ersten Schritt wird die Template-DNA zusammen mit den Starter-DNA-Fragmenten bei 95°C für 40Sek. denaturiert. In dem darauffolgenden Schritt können sich diese Starter-Moleküle bei einer spezifischen Temperatur für 30Sek. an das Template anlagern und werden im dritten Schritt bei 72°C für 40Sek. durch die Taq-Polymerase (Temperatur unempfindliche Polymerase) zu einem, dem Template entsprechenden Strang verlängert. Die Wiederholung dieser Dreischritt-Reaktion (30-40fach) führt zur Anreicherung des von den Startermolekülen begrenzten DNA-Bereiches.

Zu Beginn dieser Zyklusperiode wird der Ansatz für 4Min. bei 95°C denaturiert. Nach Beendigung der Zyklen wird der Taq die Möglichkeit gegeben für 4Min. bei 72°C die unvollständigen DNA-Enden aufzufüllen.

PCR-Reaktionsansatz:	5µl	10x Taq-Puffer (Roche Diagnostics)
	10ng	DNA-Template
	0.2Mm	dNTP (Stocklsg. 10mM, bei -20°C)
	0.2mM	Starter1 (Stocklsg. 10mM, bei -20°C)
	0.2mM	Starter2 (Stocklsg. 10mM, bei -20°C)
	0.5µl	Taq-Polymerase (5U/µl, Roche Diagnostics)
	add.50µl	Aq.dest.

Die PCR-Reaktion wird dann auf ein Agarosegel (siehe 3.1.2) aufgetragen und die DNA nach Bedarf weiterverarbeitet.

Die für die verschiedenen Reaktionen eingesetzten Primer sind unter 2.6 nach Funktionen geordnet aufgeführt.

3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden freie Enden des DNA-Vektors mit Hilfe der T4-DNA-Ligase mit freien Enden des DNA-Inserts verbunden. Freie Enden (überhängend oder kohesiv) entstehen durch den Verdau der DNA mit Hilfe von RE (siehe 3.1.1). Bei Bedarf können

überhängende Enden aufgefüllt werden (siehe 3.1.4). Um die Ligation effizienter zu machen, können die Enden des Vektors dephosphoryliert werden (siehe 3.1.4) .

Auffüllen von überhängenden DNA-Enden

5' Überhang

Der DNA-Verdau (siehe 3.1.1) wird für 10Min. bei 70°C inkubiert, wodurch die RE inaktiviert werden. Dann werden dNTPs (Endkonzentration 200µM) und 1U/µg DNA Klenow Enzym (5U/µl, Roche Diagnostics) hinzugegeben und der Ansatz für 10-15Min. bei 37°C inkubiert. Das Klenow-Enzym ist in allen RE-Puffern aktiv.

3' Überhang

Der DNA-Verdau (siehe 3.1.1) wird für 10Min. bei 70°C inkubiert, wodurch die RE inaktiviert werden.

Anschließend wird die verdaute DNA durch die Zugabe von 1/10 Vol. 3M Naacetat (pH5.2) und 3fachem Vol. 100% EtOH gefällt.

Die DNA wird für 10Min. bei 13000rpm zentrifugiert, mit 2Vol 70% EtOH gewaschen und erneut für 10Min. bei 13000rpm zentrifugiert.

Das Pellet wird getrocknet, in Wasser gelöst und die DNA-Enden in folgendem Reaktionsansatz aufgefüllt:

11µl Aq.dest.

4µl T4-Puffer (Roche Diagnostics)

4µl dNTP 2mM

1µl T4-DNA Polymerase (1U/µl, Roche Diagnostics; 1U/µg DNA einsetzen)

Die Auffüllreaktion erfolgt bei 37°C für 30Min.

Die aufgefüllten DNA-Fragmente werden im Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.1.2) und für die Ligation isoliert (siehe unten).

Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation des Vektors zu verhindern und die Ligation so effektiver zu gestalten, kann der Vektor vor der Aufreinigung über das Gel dephosphoryliert werden. Hierfür wird er dem Protokoll entsprechend mit der CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 1U/µl) von Roche Diagnostics behandelt.

Der für die Ligation vorbereitete Vektor wird über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 3.1.2).

Ligation überhängender DNA-Enden

Folgender Ansatz wird für die Ligation überlappender Enden verwendet.

50ng	Vektor
3fache	Menge Insert (in Mol!)

1µl	10x Ligasepuffer (Roche Diagnostics)
1µl	T4 DNA-Ligase (5U/µl, Roche Diagnostics)
add. 10µl	Aq.dest.

Die Ligation findet bei RT für 1-2Std. statt.

Ligation kohesiver DNA-Enden

Der Ligationsansatz wird wie oben angesetzt, allerdings wird bis zur 10fachen Menge an Insert verwendet.

Die Ligation erfolgt bei 14°C üN.

Ein Teil des jeweiligen Ligationsansatzes wird dann in Bakterien transformiert (siehe 3.1.6).

3.1.5 Herstellung kompetenter Zellen

Als Bakterienstamm werden E.coli des Stammes DH5α verwendet (Clontech).

Generell ist es für die Herstellung kompetenter Zellen wichtig, alle Schritte auf Eis mit vorgekühlten Geräten durchzuführen und die Bakterien möglichst schonend zu behandeln.

TSS-Methode

Zunächst wird eine Kultur des Bakterienklones in 2ml LB-Medium angesetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden 100ml LB-Medium mit 1ml dieser frischen üN-Kultur angeimpft. Sie werden solange bei 37°C und 175rpm im Schikanekolben geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0.3-0.4 erreicht haben. Dann werden die Bakterien bei 3000rpm für 10Min. bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet auf Eis mit 1/10 Vol. (10ml) TSS resuspendiert. Die kompetenten Zellen können direkt zur Transformation eingesetzt werden oder in 200µl Aliquots bei -80°C gelagert werden. Hierfür werden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

LB-Medium:	10g	Bactotrypton
(Luria-Bertami) 50g		Bacto-Yeast-Extrakt
	10g	NaCl
	add. 800ml	Aq.dest, auf pH 7.0 mit 5M NaOH einstellen.

Auf 1000ml auffüllen und autoklavieren. Bei 4°C lagern.
Bei Bedarf 100µg/ml Ampicillin beifügen

TSS:	50ml	2 x LB (autoklaviert)
	33ml	30% PEG (frisch, steril filtrieren)

5ml	DMSO (Aliquots bei -20°C)
5ml	1M MgCl ₂ (autoklaviert)
7ml	Aq.dest

2x LB-Medium: Bestandteile entsprechend LB-Medium, jedoch in 500ml anzusetzen.

Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgt wie unter 3.1.6 beschrieben.

Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan

100ml LB-Medium, angeimpft mit 1ml einer frischen über Nacht-Kultur, werden bei 175rpm und 37°C im Schikanekolben geschüttelt bis die Bakterienlsg. eine OD₆₀₀ von 0.45-0.5 besitzt (ca. 2Std.). Dann werden die Bakterien in Polypropylen-Röhrchen gefüllt (je 50ml) 15min. auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C und 2500rpm für 15min. abzentrifugiert. Jedes Pellet wird in 16.6ml (1/3 Vol) kalter RF1-Lsg. resuspendiert, erneut 15min. auf Eis inkubiert und danach bei 2500rpm und 4°C für 15min. zentrifugiert. Die entstandenen Pellets werden dann jeweils in 4ml (1/12.5 Vol) kalter RF2-Lsg. aufgenommen, für 15min. auf Eis inkubiert, aliquotiert (200µl) und in einem Methanol / Trockeneis-Bad schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

RF1:	100mM	RbCl	12g
	50mM	MnCl ₂ x 4H ₂ O	9.9g
	30mM	KAc, pH7.5	30ml (1M)
	10mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1.5g
	15%	Glycerol	150ml (100%)
		Aq.dest.	add. 1l, auf pH 5.8 einstellen mit 0.2M Essigsre., steril filtrieren (Porengröße 0,22µm)

RF2:	10mM	MOPS, pH6.8	20ml (0.5M)
	10mM	RbCl	1.2g
	75mM	CaCl ₂ x 4H ₂ O	11g
	15%	Glycerol	150ml (100%)
		Aq.dest	add. 1l., auf pH 6.8 einstellen mit 2M NaOH, steril filtrieren (Porengröße 0,22µm)

Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgt wie unter 3.1.6 beschrieben.

3.1.6 Transformation von Bakterien

Bei der Transformation wird die Zellmembran von Bakterien kurzzeitig durchlässig gemacht, so dass Plasmide in die Bakterien eindringen können. Diese werden dann im Zuge der

Vermehrung der Bakterien mit vervielfältigt. Die Plasmide enthalten Resistenzgene, die die transformierten Bakterien auch in der Gegenwart von Antibiotika (z.B. Ampicillin) wachsen lassen. So können Bakterien, die Plasmide tragen selektioniert werden.

Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wird ein Aliquot der kompetenten Zellen (siehe 3.1.5) mit 1ng pBluescript II KS (+/-) (pKS, Stratagene) transformiert (siehe unten).

Von der gewachsenen Bakteriensuspension werden 100µl (100pg pKS) und 10µl (10pg pKS) ausplattiert. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien auf der 100pg Platte $\times 10^4$ entspricht der Anzahl / µg pKS. Dieser Wert sollte bei mind. 1×10^6 liegen.

Temperaturtransformation

200µl kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut. Anschließend werden ca. 50ng DNA bzw. 1/2 Ligationsansatz (siehe 3.1.4) zugegeben und vorsichtig unter die Bakterien gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30Min. wird der Hitzeschock bei 42°C für 90Sek. im Wärmeblock durchgeführt. Danach werden 800µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien für 1Std. bei 37°C geschüttelt. Parallel werden LB-Agar-Amp (Ampicillin)-Platten (100µg/ml) vorbereitet, die bei offenem Deckel im 37°C -Raum getrocknet werden und auf die nach Ablauf der Zeit 50-200µl transformierte Bakterienlsg. ausplattiert wird. Bis zum nächsten Morgen wachsen die resistenten Kolonien im Warmraum bei 37°C auf der Platte hoch.

LB-Agar: LB-Medium (siehe 3.1.5) +1% Agarose

Ampicillin: 10mg/ml in Aq.dest., bei -20°C lagern

3.1.7 Charakterisierung der transformierten Bakterien

Um die in Bakterien transformierten Plasmide zu charakterisieren, können verschiedene Methoden verwendet werden.

Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß Selektion dient zur Identifizierung von Bakterien, die Plasmide mit Insert tragen.

Einige Plasmide besitzen Klonierungsstellen, bei denen die Integration von Fremd-DNA zur Unterbrechung des β -Galaktosidase-Gen Promotors führt. Werden Bakterien mit solchen Fremd-DNA tragenden Plasmiden transformiert und auf LB-Platten ausplattiert, die mit dem chromogenen Farbstoff X-Gal vorbehandelt worden sind, so können diese Bakterien an

ihrer weißen Farbe erkannt werden (sie können das X-Gal nicht mehr umsetzen). Die Bakterien, welche mit intakten integrationslosen Plasmiden transformiert wurden, können das X-Gal umsetzen und werden blau. Bakterien, welche den Repressor für das β -Galaktosidase Gens exprimieren, müssen zusätzlich zu X-Gal noch auf dem Induktor IPTG ausplattiert werden.

IPTG inhibiert den Repressor und ermöglicht so die Transkription des β -Galaktosidase Gens.

Hybridisierungstechnik

Mit der Hybridisierungstechnik können solche Bakterien identifiziert werden, deren Plasmide Inserts tragen, welche homolog zur Sequenz der verwendeten DNA-Sonde sind.

Lift der Bakterienkolonien

Zunächst wird auf jede bewachsene Petrischale eine Nylon-Membran (HybondTM-N, Amersham LifeScience) gelegt, gemeinsam mit der Platte markiert und wieder abgezogen. Ein Teil jeder Kolonie bleibt so am Filter haften. Die DNA auf dem Filter wird dann für zwei Minuten denaturiert, in dem der Filter auf ein mit der Denaturierungs-Lösung (siehe 3.1.10.3) getränktes Papier gelegt wird. Dabei zeigt die Seite mit der DNA nach oben. Danach erfolgt die Neutralisierung (siehe 3.1.10.3) ebenfalls für zwei Minuten. Falls Bakterienreste auf dem Filter zurückbleiben, kann dieser mit 2xSSC gewaschen werden. Der leicht getrocknete Filter wird dann mit UV-Strahlen bestrahlt (UV-Stratalinker 2400, Stratagene), wodurch die DNA an die Nylon-Membran gebunden wird.

Markierung der DNA-Sonden / Hybridisierung in Church Puffer

Der Filter wird mit der DNA nach innen in eine Hybridisierungsröhre (Hybaid) gegeben und mit Wasser angefeuchtet, so dass er blasenlos an der Wand haftet. Anschließend werden 8ml Church-Puffer in die Röhre gefüllt und bei 65°C für mind. 1Std. prähybridisiert. Die DNA-Sonde wird mit dem Megaprime DNA-Labeling-System von Amersham radioaktiv (P^{32} -dCTP, Amersham) markiert. Anschließend wird die Sonde über die S200 MicrospinTM Columns (Pharmacia Biotech) aufgereinigt, für 5-10Min. bei 95°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und in den Church-Puffer gegeben. Nach Möglichkeit sollte der Puffer zuvor noch einmal gewechselt werden. Die Hybridisierung erfolgt für ca. 2Std., sie kann jedoch auch über Nacht durchgeführt werden.

Anschließend wird der Filter bei 60-65°C zweimal für 20min. in Church-Wasch-Puffer geschwenkt, eingeschweißt und für einige Stunden bei -80°C exponiert. Die auf dem Film erkennbaren Signale werden den Kolonien auf der Petrischale zugeordnet, diese werden mit der Pipette gepickt und über Nacht in 2ml LB-Amp-Medium für eine Minipräp kultiviert (2.1.12).

Church-Puffer:	7%	SDS	175ml (20%)
	0.5M	Na ₂ HPO ₄	144.25m (1M)
	0.5M	NaH ₂ PO ₄	105.75m (1M)
	1mM	EDTA	1ml (0.5M)
		Aq.dest.	add.500ml

Church Wasch-Puffer:	1%	SDS	50ml (20%)
	40mM	Na ₂ HPO ₄	11.6ml (1M)
	40mM	NaH ₂ PO ₄	8.5ml (1M)
		Aq.dest.	add.500ml

Stripen von Filtern

Die Filter, welche wiederholt hybridisiert werden sollen werden zuvor gestript, um die alten DNA-Sonden zu entfernen. Dafür wird 0.5% SDS in Aq.dest. aufgekocht und auf die Filter gegeben. Diese werden so lange im Wasserbad geschüttelt bis die Lsg. RT erreicht hat.

3.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Minipräparation

Eine Bakterienkolonie wird im Glasröhrchen in 1,5ml LB-Amp-Medium (siehe 3.1.5) über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Kultur in einem Eppendorfgefäß 1Min. bei 13000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 100µl kalter Lsg.1 resuspendiert und 3Min. bei RT inkubiert. Anschließend werden zur Lyse 200µl Lsg.2 zugegeben, alles vorsichtig durch Umdrehen gemischt und auf Eis für 3Min. inkubiert. Nach der Zugabe von 150µl Lsg.3, erneut Mischen und einer Inkubation auf Eis von 5Min., werden die ausgefallenen Proteine für 5Min. bei 1300rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 1Vol. Phenol / Chloroform gemischt, gevortext und wieder wie vorher zentrifugiert. Die obere, wässrige und DNA-haltige Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 2 Vol. 100% EtOH gemischt und erneut abzentrifugiert - diesmal für 10Min. Das DNA-Pellet wird mit 70%igem EtOH gewaschen, abzentrifugiert und getrocknet. Je nach Größe des Pellets wird die DNA in 50-200µl TE-Puffer (+20µg/ml RNaseA) gelöst.

Lsg.1 (GET):	50mM Glucose	10ml (1M)
	10mM EDTA	4ml (0.5M)
	25mM Tris-HCl,pH8.0	2.5ml (2M)
	Aq.dest.	add.200ml Lagerung bei 4°C

Lsg.2: 1% SDS in 0.2N NaOH

Lsg.3: 3M KAc-Lsg. (pH4.8)

TE-Puffer:	10mM Tris, pH 8.0	1.21g
	1mM EDTA	0.37g
	Aq.dest.	add.1l, pH8.0 mit HCl einstellen

RNaseA: 10mg/ml Stock, bei -20°C

Maxipräparation

Die Präparation größerer Mengen DNA wird mit dem Wizard Plus Midiprep DNA Purification System von Promega durchgeführt. Pro Ansatz werden 100ml LB-üN-Kultur aufgereinigt (siehe 3.1.5).

Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen bietet es sich an Glycerinstocks anzufertigen (50% Glycerin / 50% Bakterienkultur), die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

3.1.9 Screen einer Phagen Library

Jeder Phage infiziert einen bestimmten Bakterienstamm. Die infizierten Bakterien sterben ab und bilden sogenannte Phagen Plaques.

Bakterienkultur

Zunächst wird eine üN-Kultur des Bakterienstammes (eine Kolonie in 50ml LB-Medium/0.2% Maltose) angesetzt. Die Maltose im Medium induziert die Ausbildung von Maltoserezeptoren auf der Oberfläche der Bakterien. Die Phagen sind in der Lage an diese Rezeptoren zu binden und so die Bakterien zu infizieren. Am nächsten Tag werden die Bakterien für 20min. bei 5000rpm abzentrifugiert und in einer 0.01M MgSO₄-Lsg. resuspendiert. Die OD₆₀₀ sollte bei 1.6×10^9 Zellen/ml liegen. Diese Bakteriensuspension kann bei 4°C für ein bis zwei Wochen gelagert und immer wieder verwendet werden.

Bestimmung von positiven Phagen

100µl der Bakteriensuspension werden mit der entsprechenden Menge Phageneluat (50000 Plaque formende Einheiten/15cm Platte) infiziert. Hierfür werden je 100µl Bakterien mit den Phagen für 20Min. bei 37°C inkubiert, anschließend mit 7ml Top-Agar gemischt (42°C) und jeweils auf einer 15cm LB-Platten (siehe 3.1.6) ausplattiert.

Die LB-Platten werden üN bei 37°C inkubiert bis sie von Plaques überzogen sind.

Anschließend wird ein Filterlift durchgeführt und die Filter mit der ausgewählten Sonde in Church-Puffer hybridisiert (siehe 3.1.7). Positive Plaques werden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus dem Agar gestochen und in 1ml SM-Lsg. gegeben. Zur Abtötung der Bakterien wird pro Eppendorfgefäß ein Tropfen Chloroform hinzugegeben und die Eppendorfgefäße bei RT für 2Std. geschüttelt. Je nach Konzentration des Phageneluates wird noch mal 1:100 in SM-Lsg. verdünnt und jedes Phageneluat mit 100µl Zellsuspension versetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 20min. werden pro Phagen/Bakteriengemisch 3.5ml TOP-Agar hinzugegeben und das Ganze auf eine 10cm LB-Platte ausplattiert.

Am nächsten Tag wird erneut ein Filterlift durchgeführt. Diese Filter werden ebenfalls hybridisiert. Diese Prozedur wird wiederholt bis die Phagen-DNA klonal ist, d.h. bis alle Plaques auf einer Platte ein positives Hybridisierungssignal zeigen.

SM-Lsg.:	100mM	NaCl	5ml (5M)
	8mM	MgSO ₄	2ml (1M)
	50mM	Tris-HCl, pH7.5	12.5ml (1M)
	10mM	Gelatine	1.25ml (2%)
		Aq.dest.	add. 250ml

TOP-Agar: LB-Medium (siehe 3.1.5), 0.7% Bacto-Agar, 10mM MgSO₄

Präparation von Phagen-DNA

Zunächst wird eine Bakterienkolonie von der Platte gepickt und in LB-Medium/10mM MgSO₄ für 2-3Std. bei 37°C geschüttelt.

Dann werden 25µl bzw. 250µl Bakterienkultur mit 25µl Plaqueeeluat für 20Min. bei 37°C inkubiert, es werden 25ml LB-Medium/10mM MgSO₄ hinzugegeben und das Gemisch bei 37°C üN geschüttelt bis die Lyse der Bakterien erfolgt ist. Die Präparation der Phagen-DNA erfolgt mit dem Lamda Midi Kit von Qiagen.

3.1.10 Analyse genomischer DNA

3.1.10.1 DNA-Extraktion

DNA-Extraktion aus Mäuseschwänzen

Die Schwänze werden in ca.1cm Abstand vom Ende mit der Schere kupiert. Anschließend werden zu jedem Schwanz in ein Eppendorf-Gefäß 600µl Tail-Puffer und 0.5mg Proteinase K / ml hinzugegeben. Der Ansatz wird bei 55°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag werden 600µl Phenol / Chloroform-Lsg. zugefügt und der Deckel des Eppendorf-Gefäßes mit Phase Lock Gel (Peqlab Biotechnology) ausgefüllt. Nachdem das Ganze eine Stunde lichtgeschützt bei RT geschüttelt hat, wird für 5min. bei 7000rpm. zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die genom. DNA mit 500µl Isopropanol ausgefällt. Mit einer Pipettenspitze wird die DNA entnommen und in 300µl 70%igem EtOH gewaschen, bevor sie für 10Min. bei 13000rpm abzentrifugiert und anschließend leicht getrocknet wird. Die genom. DNA wird dann über Nacht in 100µl TE-Puffer bei 37°C gelöst. Für die Typisierung mit Hilfe der PCR -Technik (siehe 3.1.3) wird 1µl (ca.1µg) dieser Lsg. eingesetzt, für die Typisierung per genom. Southern-Blot (siehe 3.1.10.3) 10µl.

Tail-Puffer:	50mM	Tris-HCl, pH 8.0	25ml (1M)
	50mM	EDTA	50ml (0.5M)
	100mM	NaCl	10ml (5M)

0.5%	SDS	12.5ml (20%)
	Aq.dest.	add. 500ml

Vor Gebrauch 0.5mg/ml ProteinaseK (Stock20mg/ml, bei-20°C) zufügen!

DNA-Extraktion aus der Amnion-Hülle (E 9.5)

Zu jeder präparierten Amnion-Hülle werden 100µl Tail-Puffer mit Prot.K (siehe oben) zugegeben. Das Gewebe wird 3-4Std. bzw. über Nacht bei 55°C verdaut. Nachfolgend werden 10µl (1/10 Vol.) 3M Kaacetat zugegeben und die genom. DNA mit 300µl 100% EtOH gefällt. Nun wird für 10Min. bei 1300rpm zentrifugiert, zweimal in 100µl 70% EtOH gewaschen und die DNA leicht getrocknet. Das Pellet wird in 50µl TE-Puffer aufgenommen. Für eine PCR-Reaktion (siehe 3.1.3) wird 1µl DNA-Lsg. eingesetzt.

3.1.10.2 *Verdau und Auftrennung genomischer DNA*

Die genom. DNA wird ün bei 37°C wie folgt verdaut:

10µg genom. DNA
 3µl 10x Puffer
 0.3µl RNaseA (Stocklsg.10mg/ml,bei-20°C)
 1µl konzentriertes RE (40U/µl)
 add. 27µl Aq.dest.

Am nächsten Tag wird erneut 1µl RE und 1.2µl Spermidin (Stocklsg.0.1M, bei -20°C) zugegeben und erneut für einige Std. bei 37°C inkubiert.

Die Auftrennung der DNA erfolgt über Nacht im 0.8%igen Agarose-TBE-Gel, (siehe 3.1.2) wobei vor dem Auftragen in die DNA-Proben je 6ml 5x Probenpuffer zugegeben wird. Es wird eine Spannung von 35V und eine Stromstärke von 240mA für ca.16Std. angelegt.

3.1.10.3 *genomischer Southern-Blot und Hybridisierung*

Die DNA im Agarose-Gel (siehe 3.1.10.2) wird für 30-50min. denaturiert und nachfolgend für 50min. neutralisiert. Sollte die bei der Hybridisierung zu erwartende Bande eine Größe von 10kb überschreiten wird zuerst für 15-20min. depuriniert, dann denaturiert und neutralisiert.

Denaturierungslsg.:	1.5M	NaOH	100ml (5M)
	0.5M	NaCl	300ml (5M)
		Aq.dest.	600ml

Neuralisierungslsg.:	0.5M	NaCl	300ml (5M)
----------------------	------	------	------------

	0.5M	Tris-HCl, pH 7.3	500ml (1M)
		Aq.dest.	200ml
Depurinierungslsg.:	0.2N	HCl	
20x SSC:	3M	NaCl	175g
	0.3M	Nacitrat	88g
		Aq. dest.	add. 1l, pH7.0 mit NaOH

Das Gel wird sodann über Nacht mit 10x SSC geblottet. Hierfür wird zum ständigen Flüssigkeitstransfer mit Whatmanpapier eine Brücke in 10x SSC gebaut, darauf zunächst das Gel, darauf eine feuchte (2x SSC) Hybridisation Transfer Membran (NEN), zwei Lagen feuchtes Whatmanpapier (2x SSC) und zuletzt Filterpapier gestapelt. Dieser Blot wird beschwert und erst am nächsten Tag abgebaut. Der Filter wird in 2x SSC gewaschen und gecrosslinkt (siehe 3.1.7).

Anschließend wird der Filter in 8ml Rapidhyb-Puffer (Amersham) mit der markierten DNA (siehe 3.1.7) bei 65°C für 2Std. hybridisiert, in 0.1xSSC/0.1%SDS bei 60°C nach Bedarf gewaschen und über Nacht exponiert.

3.1.11 Analyse von RNA

Alle Arbeiten mit RNA sollten mit Handschuhen und unter der Verwendung von DEPC-Wasser durchgeführt werden, um einer Degradierung der RNA vorzubeugen.

3.1.11.1 *Präparation von RNA*

Die Präparation von RNA erfolgt mit dem Rneasy Kit von Qiagen. Die isolierte RNA wird bei -80°C gelagert. Häufiges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.

3.1.11.2 *RNA-Gel*

Zunächst wird die Gelkammer für 2Std. mit 0.1M NaOH inkubiert, um sie von RNasen zu befreien.

Für ein 1.5% iges Gel werden 1.5 g Agarose in 60ml DEPC-Wasser gelöst und auf eine Temperatur von 60°C gebracht. Dann werden 20ml 5 x Laufpuffer und 17.9ml Formaldehyd (37 %) zugegeben und das Gel in die Kammer gegossen.

Die RNA-Proben werden folgendermaßen vorbereitet:

4.5µl RNA (10-20µg)
2µl 5 x Laufpuffer

3.5µl Formaldehyd
10 µl Formamid

werden bei 65°C für 15Min. erhitzt und dann auf Eis abgeschreckt. Nach der Zugabe von 2µl Lade-Puffer und 2ng/µl EtBr werden die Proben auf das mit 1x Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt über Nacht bei 20V.

DEPC-Wasser: 0.1 % DEPC in Wasser bei 37°C üN lösen und danach zweimal autoklavieren.

5x Laufpuffer: 0.1M MOPS, pH7.0 20.6g
40mM Naacetat 40ml (1M)
auf 800ml mit DEPC-Wasser auffüllen, pH 7.0 mit 2N NaOH einstellen und erst anschließend 5mM EDTA (10ml Stocklsg. 0.5M) zugeben. Das Endvolumen beträgt 1l. Diese Lsg. wird steril filtriert (0.22µm) und lichtgeschützt gelagert.

10x Lade-Puffer: 50% Glycerol 2.5ml (100%)
1mM EDTA, pH 8.0 10µl (0.5M)
0.25% Bromphenolblau 12.5mg
0.25% Xylencyanol FF 12.5mg
DEPC-Aq.dest. add. 5ml

3.1.11.3 Northern Blot und Hybridisierung

Das RNA-Gel (siehe 3.1.11.2) wird zunächst für 20Min. in 10 x SSC geschwenkt, um das Formaldehyd zu entfernen. Der Blot der RNA erfolgt direkt im Anschluß über Nacht in 10 x SSC (siehe 3.1.10.3). Auch die Art der Hybridisierung des Filters ist mit der unter 3.1.10.3 beschriebenen identisch.

3.1.12 Reverse Transkription

Für die Herstellung von cDNA aus einem RNA (Ribonukleinsäure)-Template wird die RNA mit Hilfe der Superscript II (Roche Diagnostics) und random- (GIBCO) oder oligo(dT)-Primern (GIBCO) revers transkribiert.

Diese Reaktion findet in folgendem Ansatz statt:

3-10µg RNA und 100pmol Primer werden mit Aq.dest. auf ein Endvolumen von 11µl gebracht. Zunächst erfolgt eine Denaturierung bei 70°C für 10Min. anschließend wird auf Eis abgeschreckt (15Min.).

Für die reverse Transkription werden dann folgende Bestandteile hinzugegeben:

4µl 5xRT-Puffer
2µl 0.1M DTT
1µl 10mM dNTP
1µl Rnase Inhibitor (40U/µl, Promega)

1µl SuperscriptII (200U/µl, Roche Diagnostics)

Der Ansatz wird bei 37°C für 60Min. inkubiert.

Die RNA wird nun mit 2µl 1M NaOH bei 70°C für 15Min. entfernt und die Lösung mit 2µl 1M HCl neutralisiert.

Die cDNA wird bei -20°C gelagert. Für jede PCR-Reaktion (siehe 3.1.3) wird 1µl cDNA als Template eingesetzt.

3.1.13 Schnelle Amplifizierung von cDNA Enden (RACE)

5' RACE

Die Methode der 5' RACE wird verwendet, um von einer bekannten Sequenz ausgehend eine unbekannt, in 5' Richtung liegende Sequenz zu amplifizieren. Die, mit sequenzspezifischen antisense Primern revers transkribierte cDNA (siehe 3.1.12) wird mit einem polyC-Schwanz bestückt und kann so in einer nachfolgenden PCR-Reaktion (siehe 3.1.3) mit entsprechenden Primern vervielfältigt werden.

Hierfür wurde nach dem GIBCO Protokoll für die 5' RACE gearbeitet, wobei die sequenzspezifischen antisense Primer selber designt wurden (siehe 3.6.2).

3' RACE

Die 3' RACE dient zur Identifizierung von Sequenzen, welche in 3' Richtung von der bekannten Sequenz liegen. Methodisch wurde nach dem Protokoll von GIBCO für die 3' RACE vorgegangen, wobei für die PCR neben den sequenzspezifischen sense Primern, antisense Primer gegen den oligo(dT)-Schwanz der cDNA (nach rev. Transkription der RNA mit oligo(dT)-Primern, siehe 3.1.12) eingesetzt wurden.

3.2 Kultur von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)

Die Arbeit mit ES-Zellen wird an sterilen Werkbänken durchgeführt. Alle wiederverwendbaren Gegenstände werden mit Ampuwa-Wasser gespült und vor der Benutzung autoklaviert. Vor dem Gebrauch werden sie mit 70% EtOH desinfiziert und nach Möglichkeit in der Werkbank abgeflammt. Durch diese Maßnahmen soll eine Kontamination der Zell-Kulturen durch Bakterien und Pilzsporen vermieden werden. ES- und Feeder-Zellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Medien und Lösungen sind unter 2.2.9 zu finden.

3.2.1 Herstellung von primären Fibroblasten -Zell- und Gelatine-Platten

primäre Fibroblasten (Feeder-)Zell-Platten

Ein Aliquot Feeder-Zellen ($5-10 \times 10^6$ Zellen) wird im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und nach der Zugabe von 10ml Feeder-Medium für 5Min. bei 1200rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10ml Medium resuspendiert und auf $5 \times 15\text{cm}$ (je 25ml Medium vorgelegt) Platten verteilt.

Nach vier Tagen sollten die Zellen eine konfluente Schicht ausgebildet haben und können mit Mitomycin C (Zellteilungsinhibitor) behandelt werden.

Hiefür wird das Medium abgesaugt und pro Platte 10ml neues Mitomycin-haltiges Medium ($10\mu\text{g/ml}$) hinzugegeben. Die Feeders werden so für 2-3Std. im Brutschrank inkubiert.

Anschließend werden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen und nach der Zugabe von 8ml Trypsin für 5-10Min. inkubiert, bis sich die Zellen von der Platte lösen.

Die Zellen werden suspendiert bis sie vereinzelt sind, wie oben abzentrifugiert und mit einer Dichte von $2-2.5 \times 10^4$ Zellen/ cm^2 ausplattiert. Die Platten können bereits nach zwei Stunden für die ES-Zellkultur (siehe unten) und dann bis zu einer Woche verwendet werden.

Nach drei Tagen sollte das Medium gewechselt werden.

Bevor ES-Zellen auf den Feeder-Platten ausplattiert werden, muss das Feeder-Medium gegen das ES-Zell-Medium (siehe 3.2.9) ausgewechselt werden.

Gelatine-Platten

Zunächst wird eine 0.1% Lösung von Gelatine in Ampuwa-Wasser hergestellt und autoklaviert.

Mit dieser Gelatinelösung werden Zellkulturschalen beschichtet, indem etwas Gelatine eingefüllt und wieder abgesaugt wird. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Gelatine die Platte überall benetzt. Anschließend wird die Platte bei offenem Deckel getrocknet und kann sodann zum Ausplattieren von ES-Zellen (siehe 3.2.2) verwendet werden.

3.2.2 Expansion der ES-Zellen für die Elektroporation (Genemutagenese/ Genfalle)

ES-Zellen werden auf einer Schicht von Feederzellen kultiviert (siehe 3.2.1). Diese sind aufgrund einer vorhergegangenen Mitomycin-Behandlung nicht mehr in der Lage sich zu teilen und bilden daher einen Monolayer auf dem Boden der Kulturschale, auf dem die ES-Zellen wachsen können.

Zunächst wird ein Röhrchen ES-Zellen (5×10^6) bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in 5ml ES-Zell-Medium aufgenommen und für 5min. bei 1200rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1ml ES-Zell-Medium resuspendiert und auf einer 6cm Feederplatte in einem Gesamtvolumen von 5ml ES-Zell-Medium verteilt.

Die Zellen werden bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO_2 üN inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt.

Einen Tag später wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und nach der Zugabe von 1,5 ml Trypsin für 10-20min. im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen von der Unterlage lösen. Um das Trypsin zu inaktivieren und Einzelzellen zu erhalten werden 2ml Medium zur Zellsuspension hinzugegeben und diese mehrfach auf-und abpipettiert. Anschließend werden die Zellen in einem Volumen von 6ml für 5min. bei 1200rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in einem Volumen von 1,5ml aufgenommen und auf einer vorbereiteten 9cm Feeder-Platte in 10ml Medium verteilt. Das entspricht einer Verdünnung von 1:3.

Nach zwei Tagen werden die ES-Zellen erneut in PBS gewaschen (10ml / Platte) und mit 3ml Trypsin behandelt. Je nach Wachstum der Zellen werden sie auf zwei oder drei 9cm Gelatine-Platten (siehe 3.2.1) verteilt. Nach ca. 40 Std. wird das Medium gewechselt, um das Wachstum der Zellen vor der Elektroporation anzuregen. Die Anzahl der Zellen pro Platte entspricht dann ungefähr der Menge, die für eine Elektroporation benötigt wird.

Falls eine größere Anzahl an Zellen benötigt (10^8 Zellen / EP für Genfalle, siehe 3.2.4) wird, bietet es sich an eine weitere Passage auf Feeder-Platten durchzuführen bevor die endgültige Passage auf Gelatine-Platten erfolgt.

3.2.3 Elektroporation von ES-Zellen (Genmutagenese) / Selektion der Klone

Für die Elektroporation (EP) werden die Zellen wie unter 3.2.2 beschrieben trypsinisiert, abzentrifugiert und in einem kleinen Volumen kaltem PBS resuspendiert. Anschließend wird mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ihre Anzahl bestimmt (die übrigen Zellen bleiben auf Eis!) und das Volumen der Zellsuspension (inklusive DNA) mit kaltem PBS auf eine Menge von 7×10^6 Zellen und 900 μ l/Küvette aufgefüllt.

30 μ g der gewünschten DNA werden zuvor über Nacht in einem Volumen von 80 μ l linearisiert, wobei 5U Restriktionsenzym / μ g DNA verwendet werden. Vor der Elektroporation wird die DNA für 10min. bei 70°C erhitzt und dann auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wird mit der DNA gemischt, in die Elektroporationsküvette übertragen und bei 0,24kV und 500 μ F elektroporiert. Die Zeitkonstante sollte zwischen 5 und 7mSek. liegen. Die Küvette wird nachfolgend für 20Min. auf Eis gestellt .

Die elektroporierten Zellen einer Kuvette werden dann auf zwei 9cm Gelatine-Platten (siehe 3.2.1) verteilt, die bereits mit 10ml ES-Zell-Medium bedeckt sind. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt.

Ab dem zweiten Tag wird als Antibiotikum G418 (200 μ g/ml), ab dem dritten Tag auch Gancyclovir (2mM) in das Medium gegeben, das täglich gewechselt wird. Die Selektion wird solange fortgeführt, bis der Zellrasen verschwunden ist und nur noch einzelne Zellklone zu erkennen sind (nach 8-9 Tagen).

3.2.4 Elektroporation von ES-Zellen (Genfalle)

Die Elektroporation (EP) für Genfallen-Experimente entspricht dem Protokoll der EP für die Genmutagenese (siehe 3.2.3). Allerdings werden hier 1×10^8 Zellen mit 120 μ g DNA

elektroporiert, bei 0.8kV und 3 μ F für 0.1mSek. Die behandelten Zellen werden auf 12 Gelatine-Platten (siehe 3.2.1) verteilt und mit den entsprechenden Antibiotika selektioniert.

3.2.5 Induktion von elektroporierten ES-Zellen mit FGF2 (Genfalle)

Die ES-Zellen werden wie unter 3.2.4 beschrieben elektroporiert und solange selektioniert, bis einzelne Kolonien zu erkennen sind. Das Medium wird abgesaugt und ein Polyester-Filter

(Porengröße 1 μ m, Tetko Inc., Elmsford NY), der zuvor markiert, in Aq. dest gewaschen und autoklaviert wurde, daraufgelegt. Dieser wird zu 80% mit Glas-Kugeln (3mm, Fisher Sci. USA) überschichtet und anschließend wieder mit ES-Zell-Medium bedeckt. Innerhalb von zwei Tagen wachsen die Kolonien in die Membran ein.

Zu diesem Zeitpunkt wird das Medium abgesaugt, die Kugeln abgegossen und der Filter vorsichtig abgezogen. Dieser wird dann mit der bewachsenen Seite nach oben in eine Petrischale mit ES-Zell-Medium gelegt. Die Originalplatte wird wie gehabt weiterkultiviert. Der Filter wird in ES-Zell-Medium mit nur 5% FCS inkubiert, in das der induzierende Faktor FGF2 in einer Endkonzentration von 20ng/ml verdünnt wird. Die Inkubation erfolgt für 48Std. Anschließend wird der Filter mit X-Gal angefärbt (siehe 3.4.2). Klone, die eine Blaufärbung zeigen werden von der Originalplatte gepickt und weiter expandiert (siehe 3.2.6).

3.2.6 Picken, Expansion und Einfrieren von resistenten Klonen

Die ES-Zell Klone werden auf 96well-Feeder-Platten (siehe 3.2.1) gepickt. Hierfür muss zunächst das Feeder-Medium abgesaugt werden und durch ES-Zell-Medium ersetzt werden (150 μ l/well). Das Medium auf den Elektroporationsplatten wird gewechselt und die Klone mit 20 μ l Spitzen gepickt. Anschließend wird jeder Klon in ein 96Well überführt. Am nächsten Tag werden die Zellklone in PBS gewaschen (150 μ l/Well) und mit 30 μ l Trypsin für 10-20Min. behandelt. Nach der Auflösung der Klone in Einzelzellen werden diese in frische 96well-Platten übertragen. Am darauffolgenden Tag wird das Medium gewechselt.

Zwei Tage nach dem Picken müssen die ES-Zellen nach ihrer Wachstumsrate beurteilt und entsprechend behandelt werden. Ziel ist es, für jeden Klon zumindest zwei Kopien auf 96well-Feeder-Platten und zwei Kopien auf 96well-Gelatine-Platten zu haben. Demnach werden die ES-Zell-Klone erneut trypsiniert und mit einer Passage von 1:3 bzw. 1:4 auf die vorbereiteten Feeder- bzw. Gelatine-Platten übertragen. Für langsam wachsende Klone bietet es sich an, die Klone nur auf ein neues Well zu übertragen und entsprechend später zu teilen. Am nächsten Tag wird erneut das Medium gewechselt.

Zwei Tage nach der Passage werden die Feeder-Platten eingefroren. Hierfür werden sie wie beschrieben trypsiniert (30 μ l Trypsin) und anschließend in 70 μ l kaltem Medium resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension werden nun 100 μ l kaltes, 2x konzentriertes Einfriermedium hinzugegeben. Dieses besteht zu fünf Teilen aus FCS, zu drei Teilen aus ES-Zell-Medium und zu zwei Teilen aus DMSO (Dimethylsulfoxid), welches die Ausbildung

von Eiskristallen und somit eine Zerstörung der Zellen während des Einfrierprozesses verhindert. Die 96well Platten werden sofort im -80°C Schrank tiefgefroren. Die Gelatine Platten werden so lange im Brutschrank inkubiert bis sie nahezu konfluent gewachsen sind. Zu diesem Zeitpunkt werden sie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend bei 50°C über Nacht in Lysis-Puffer verdaut.

Lysis-Puffer:	10mM TrisHCl, pH7.5	5ml (1M)
	10mM EDTA	10ml (0.5M)
	10mM NaCl	1ml (5M)
	0.5% Sarcosyl	12.5ml (20%)
	Aq.dest.	add.500ml

vor Gebrauch ProteinaseK hinzugeben 1mg/ml (Stocklsg. 20mg/ml, bei -20°C)

3.2.7 DNA-Präparation und Verdau der ES-Zell-Klone

Nach der Lyse der Zellen (siehe 3.2.7) wird die nun frei zugängliche genomische DNA ausgefällt. Hierfür werden $100\mu\text{l}$ eines Gemisches von 10ml 100% EtOH und 150ml 5M NaCl pro Well hinzugegeben und das Ganze für einen Stunde geschüttelt. Die gen. DNA wird als weißer Film am Boden der Platten sichtbar. Nun werden die Platten für 5min. bei 2500rpm. abzentrifugiert und dreimal mit $150\mu\text{l}$ 70%igem EtOH gewaschen, wobei zwischendurch jeweils für 2min. bei 2500rpm. zentrifugiert wird. Die Flüssigkeit wird jedesmal vorsichtig abgegossen. Nach Beendigung des Waschvorgangs wird die DNA für 10Min. bei RT getrocknet und dann in $25\mu\text{l}$ Wasser bei 37°C für mehrere Stunden gelöst.

Der Ansatz für den Verdau der genom. DNA besteht pro Well aus folgenden Lösungen:

Aq.dest.	25 μl
Puffer	3.0 μl (Roche Diagnostics)
RNaseA	0.3 μl (10mg/ml Stock, bei -20°)
Spermidin	1.2 μl (0.1M Stock, bei -20°)
RE	2.0 μl (40U/ μl , Roche Diagnostics)

Um einen vollständigen Verdau zu garantieren wird zunächst das Wasser, der Puffer, die RNase und $1\mu\text{l}$ des RE hinzugegeben und über Nacht verdaut. Am nächsten Morgen werden das Spermidin und erneut $1\mu\text{l}$ des RE zugesetzt und der Verdau für 5Std. bei 37°C inkubiert.

Die verdauten genom. DNAs der ES-Zell-Klone werden dann über Nacht (ca.16 Std.) in einem 0,8%igen Agarose-TBE-Gel (siehe 3.1.2) bei 35mV aufgetrennt, das Gel in 10xSSC geblottet und der Filter in der Rapidhyb-Puffer mit der entsprechenden Sonde hybridisiert (siehe 3.1.10.3).

3.2.8 Auftauen und Expansion der positiven Klone

Zur Expansion der positiven ES-Zell-Klone werden die 96well-Platten im 37°C Wasserbad aufgetaut. Nachfolgend werden sie für 5Min. bei 1200rpm. abzentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen in 30µl Medium resuspendiert. Diese Lösung wird in neue Wells einer 96well-Feeder-Platte übertragen. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt.

Am Tag darauf werden die Zellen trypsiniert und jeder Klon auf zwei Wells einer 96well-Feeder-Platte verteilt.

Einen bzw. zwei Tage später werden die Zellen der beiden Wells auf ein Well einer 24well-Platte passagiert (in 1ml Medium).

Nach zwei Tagen wird jedes Well mit 200µl Trypsin behandelt und auf eine 6cm Feeder-Platte (5ml Medium) transferiert.

Da es für die spätere Verwendung der Zellen wichtig ist die Passagenzahl möglichst gering zu halten, werden sie nur noch ein weiteres Mal 1:3 auf eine 9cm Feeder-Platte expandiert (1,5ml Trypsin, 10ml Medium) und anschließend eingefroren.

Hierfür werden die Zellen nach zwei weiteren Tagen mit 3ml Trypsin behandelt bei 1200rpm für 5min. abzentrifugiert und in 0.5ml kaltem Medium aufgenommen. Nach der Zugabe von 0.5ml kaltem, 2x konz. Einfriermedium (siehe 3.2.9) werden die Zellen in der Kühlbox zunächst über Nacht bei -80°C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.9 Medien/Lösungen für die Zellkultur

ES-Zell-Medium: 500ml DMEM (+Glucose/Na-Pyruvat)
(15% FCS) 75ml FCS (38P, GIBCO ES-cell qualified)
5ml Glutamin
1ml β-Mercaptoethanol
120µl LIF

Feeder-Zell-Medium: 500ml DMEM (+Glucose/Na-Pyruvat)
(10% FCS) 57ml FCS (34N, GIBCO ES-cell qualified)
5.7ml Glutamin
5.7ml nicht essentielle Aminosäuren (GIBCO)

Wasch-Medium: DMEM komplett, 10% FCS, ohne LIF

Einfriermedium: 5ml ES-Zell-Medium
(2x konz.) 3ml FCS
2ml DMSO

Trypsin: 0.05% in Tris / EDTA-Puffer

Gelatine: 0.1% in Ampuwa - Wasser

Lysis-Puffer:	10mM Tris-HCl, pH 7.5	5ml (1M)
	10mM EDTA, pH 8.0	10ml (0.5M)
	10mM NaCl	1ml (5M)
	0.5% Sarcosyl	12.5ml (20%)
	Aq.dest.	add. 500ml

vor Benutzung 1mg / ml Proteinase K frisch hinzugeben

3.2.10 Übersichtstabelle Zellkulturgefäße

Durchmesser	Oberfläche	Zellzahl	Medium	Trypsin
14cm	145cm ²	1.8x10 ⁷	25ml	7.5ml
9cm	56cm ²	7x10 ⁶	10ml	3cm
6cm	21cm ²	3x10 ⁶	5ml	1.5ml
3.5cm	8cm ²	1x10 ⁶	2.5ml	0.5ml
24well(1.5cm)	1.9cm ²	2.5x10 ⁵	1ml	100µl
96well(0.5cm)	0.3 cm ²	5x10 ⁴	150µl	30µl

3.3 Schnitttechniken

3.3.1 Schneiden von Gewebe mit dem Cryostaten

3.3.1.1 Schnitte für die in-situ- Hybridisierung

Für die in-situ- Hybridisierung (siehe 3.5.2) werden montierte Schnitte verwendet. Die Behandlung des zu schneidenden Gewebes hängt von der Beschaffenheit desselben ab. Gewebe, welches relativ viel Wasser enthält (z.B. Embryonen), müssen vor dem Einfrieren gegen Gefrierschäden und zum Vakuolenerhalt in Succrose cryoprotectiert werden. Das Einbetten in Succrose/Gelatine garantiert einen sehr guten Erhalt der Vakuolen (z.B. Gehirnvesikel).

Adultes Gehirn kann frisch aus dem Tier präpariert, abgetrocknet und sofort auf einem Stück Aluminiumfolie auf Trockeneis tiefgefroren werden. Für einen besseren Gewebeerhalt werden die Mäuse perfundiert, das Gehirn präpariert und eingefroren (siehe unten, Schnitte für die Immunfärbung) und anschließend zum Schneiden aufgezogen.

Embryonen werden aus dem Muttertier präpariert, sofort in 4%PFA/PBS fixiert (üN4°C) und in 20%Succrose/PBS bei 4°C üN inkubiert. Anschließend werden sie auf Trockeneis tiefgefroren.

Sehr junge Embryonen (E 9.5) werden in 15% Succrose/PBS inkubiert bis sie absinken und anschließend in 15% Succrose/7.5% Gelatine/PBS eingebettet. Dieses Einbettmedium wird am Vortag zubereitet und bei 60°C geschmolzen (Lagerung bei 4°C). Das Einbetten der Embryonen erfolgt in Einbettmulden, welche zuvor mit Glycerol ausgerieben werden, um das Lösen der Präparatwürfel zu erleichtern. In die Mulden wird zunächst etwas warmes Einbettmedium gefüllt und abgekühlt, so dass sich eine Grundsicht bildet. Zu jedem Embryo wird etwas warmes Einbettmedium gegeben und dieser anschließend mit dem Medium auf die Grundsicht gegeben. Bei Bedarf wird noch etwas Einbettmedium hinzugefügt. Sobald das Medium fest geworden ist (Lagerung bei 4°C möglich), werden der Präparatwürfel aus der Mulde gelöst und nach Bedarf zugeschnitten (die Embryonen sind in diesem klaren Material sichtbar!). Erst vor dem Schneiden werden sie in einem Isopenthan-Bad auf flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgezogen.

Allgemein ist darauf zu achten, dass tiefgefrorenes Gewebe vor dem Schneiden nicht mehr aufgetaut wird.

Die Schnittdicke für eine in-situ- Hybridisierung beträgt 16µm. Die Schnitte werden direkt auf vorgekühlte Objektträger aufgezogen erwärmt und durch Trocknen auf diesen fixiert. Die getrockneten Schnitte (1Std. bei 37°C) werden dann tiefgefroren und können bis zu einem halben Jahr bei -20°C gelagert werden.

3.3.1.2 Schnitte für die Immunfärbung

Für eine Immunfärbung (siehe 3.4.1) mit anschließender exakter Lokalisierung der gefärbten Zellen ist ein sehr guter Gewebeerhalt von großer Bedeutung.

Um dies zu erreichen wird die zu präparierende Maus mit 4% PFA/PBS perfundiert. Das Gehirn wird herauspräpariert und für 2-3Std. in 4% PFA/PBS nachfixiert. Das fixierte Gehirn wird anschließend in 20% Saccharose/PBS üN bei 4°C geschüttelt (das Gehirn sinkt bei voller Saccharosedurchdringung auf den Boden des Gefäßes). Anschließend wird das Gehirn in Isopenthan auf Trockeneis tiefgefroren. Alternativ dazu kann das Gewebe auch auf ein Stück Aluminiumfolie gelegt und auf Trockeneis eingefroren werden.

Das Gefrierpräparat wird dann mit einer Dicke von 30-40µm am Cryostaten geschnitten, die Schnitte werden direkt in PBS überführt und bei 4°C bis zu einer Woche gelagert.

Immunfärbungen können auch in Abhängigkeit vom Antikörper auf montierten Schnitten durchgeführt werden (siehe oben).

3.3.2 Schneiden von Embryonen mit dem Mikrotom

Mikrotomschnitte können sowohl für die in-situ- Hybridisierung als auch für die Immunfärbung verwendet werden.

Die präparierten Embryonen werden in 4% PFA/PBS für 48Std. fixiert. Anschließend werden sie durch die aufsteigende EtOH-Reihe dehydriert (70%, 96%, 100% und Xylol jeweils für 24Std.). Das Parafin wird währenddessen im Ofen bei 65°C geschmolzen. Die Embryonen werden dann 24-48Std. in Parafin gegeben und eingebettet.

Nach der Aushärtung werden die Embryonen auf die Träger aufgezogen und am Mikrotom mit einer Dicke von 8µm geschnitten. Die Schnitte werden üN bei 37°C getrocknet und bei 4°C bis zur in-situ- Hybridisierung (siehe 3.5.2) gelagert.

3.4 Immunohistochemie und Färbungen

3.4.1 Immunfärbung auf frei schwimmenden Schnitten

Alle Waschschritte werden sofern nicht anders beschrieben bei RT durchgeführt. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität werden die Schnitte zunächst für 15Min. in 0.3% H₂O₂/PBS geschwenkt und anschließend 3x5min. in PBS gewaschen. Danach wird das Gewebe zur Vermeidung unspezifischer Bindungen in Blocking-Lsg. (10% Ziegenserum/0.02% Triton/PBS) für 1Std. inkubiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (Kaninchen Anti-Maus polyklonaler Antikörper) erfolgt bei 4°C üN (oder siehe Tabelle). Dieser AK wird in Blocking-Lsg. nach Anleitung (siehe Tabelle) verdünnt. Am nächsten Tag werden die Schnitte für 3x5Min. in PBS gewaschen und nachfolgend mit dem Anti-Kaninchen-AK für 2Std. inkubiert. Die Verdünnung dieses Zweitantikörpers erfolgt in Blocking-Lsg. ohne Triton und entsprechend der Tabelle (siehe unten). Nach einem weiteren Waschschritt in PBS für 3x5Min. findet die Detektion des Zweitantikörpers mit Hilfe des ABC-Kits von Vector Laboratories statt. Die ABC-Lsg. wird ca. eine halbe Stunde im Vorraus angesetzt (Verdünnung in Blocking-Lsg. ohne Triton, siehe Tabelle), die Schnitte darin für 2Std. inkubiert und anschließend 2x5min. in PBS und 1x5Min. in 0.1M Tris-HCl (pH 7.6) gewaschen. Die Färbereaktion erfolgt in einer DAB-Lsg. (0.05% in Tris-HCl 0.1M, pH7.6), wobei noch 0.02% H₂O₂ zugegeben werden. Die Färbung erfolgt für 1-15Min. bei RT. Nach ausreichender Färbung werden die Schnitte in PBS überführt und auf Superfrost-Objektträgern aufgezogen. Die gut getrockneten Schnitte werden durch die EtOH-Reihe dehydriert und aus Xylol heraus mit DPX (BDH Laboratories supply) eingedeckelt.

Erstantikörper	Zweitantikörper	ABC-Lsg.
TH (Chemicon), polyklonal Kanninchen Anti Maus 1:10000, 4°C 12Std.	IgG Ziege Anti Kanninchen	1:300
Calbindin (Swant, Bellizona), polyklonal Kanninchen Anti Maus 1:2000, 4°C 48Std.	IgG Ziege Anti Kanninchen	1:200
Calretinin (Swant, Bellizona) , polyklonal Kanninchen Anti Maus 1:2000, 4°C 48Std.	IgG Ziege Anti Kanninchen	1:200

DAB-Stocklsg.: 1g/100ml Tris-HCl (0.1M) pH7.6, 5ml Aliquots bei -20°C lagern

3.4.2 LacZ-Färbung

Das für die Herstellung der transgenen Mäuse verwendete Konstrukt (siehe Abb. 7a), wie auch der Vektor für den Genfall-Experiment (siehe 3.7.1) beinhalten das β -Galaktosidase-Gen. Daher können sowohl die elektroporierten ES-Zellen als auch die Mäuse bzw. Embryonen mit X-Gal gefärbt werden.

Mausembryonen

Die Embryonen werden in PBS-Puffer seziiert. Danach werden sie 1x in Phosphatpuffer gewaschen und für 10-20Min. in der Fixierlsg. fixiert. Zum Waschen werden die Embryonen \ddot{u} N in Waschpuffer gegeben und anschließend in X-Gal Färbelsg. über Nacht angefärbt.

Zum Abschluß der Färbereaktion werden die Embryonen 3x für 5-10Min. in Waschpuffer entfärbt. Falls Probleme mit einer Hintergrundfärbung auftreten, kann der pH-Wert des Phosphatpuffers erhöht werden. Eine Verstärkung der Färbung wird durch eine Inkubation der Embryonen bei 4°C in Waschpuffer \ddot{u} N erreicht. Die Embryonen werden in Waschpuffer bei 4°C gelagert.

ES-Zellen

Die lacZ-Färbung von ES-Zellen erfolgt folgendermaßen.

Das ES-Zell-Medium wird abgesaugt, die Zellen werden zunächst zweimal in PBS gewaschen, anschließend für 2Min. fixiert (PFA in der Lsg. ist nicht unbedingt notwendig) und erneut, diesmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Färbereaktion erfolgt ebenfalls bei 37°C. Auch die gefärbten ES-Zellen werden in Waschpuffer bei 4°C gelagert.

PBS-Puffer:	150mM	NaCl	8g
	2mM	KCl	0.2g
	10mM	Na ₂ HPO ₄	1.44g
	1mM	KH ₂ PO ₄	0.24g
		Aq.dest.	add.800ml, pH7.4 mit HCl

Phosphatpuffer:0.1M	NaH ₂ PO ₄	115ml (0.2M)
0.1M	Na ₂ HPO ₄	385ml (0.2M)
	Aq.dest.	add. 1000ml, der pH-Wert sollte bei 7.3 liegen

Fixierlsg.:	0.2%	Glutaraldehyd	0.4ml (25%)
	2%	Paraformaldehyd *	5.0ml (20%)

5mM	EGTA (pH 7.3)	0.5ml (0.5M)
2mM	MgCl ₂	0.1ml (1M)
	Phosphatpuffer, pH 7.3	44.1ml (0.1M)

*Das Paraformaldehyd (PFA) wird bei 62°C in PBS gelöst und bei -20°C gelagert. Da PFA in PBS schwerlöslich ist wird 1/10Vol 5M NaOH zur Erhöhung des pH-Wertes hinzugegeben. Nach der vollständigen Lösung des PFA muss der pH-Wert wieder mit HCl auf pH7 eingestellt werden.

X-gal-Färbelsg.:	1mg/ml X-gal	2ml (25mg/ml in Dimethylformamid)
	5mM Kaliumferrocyanid	0.5ml (0.5M)
	5mM Kaliumferricyanid	0.5ml (0.5M)
	Waschpuffer	48ml

bei -20°C lagern, lichtgeschützt.

Wasch-Puffer:	20mM MgCl ₂	0.4 ml (1M)
	0.2% NP40	4.0 ml (4%)
	Phosphatpuffer, pH 7.3	195.6ml (0.1M)

3.4.3 Hämatoxylin / Eosin -Färbung

Die Hämatoxylin / Eosin (HE)-Färbung wird zum Anfärben der Zellkerne (durch Hämatoxylin)

und des Cytoplasmas (durch Eosin) verwendet.

Zunächst werden die Schnitte für ca. 2min. in Hämatoxylin gefärbt. Anschließend erfolgt die Entfärbung in Aq.dest. für 10min. Die nachfolgende Färbung in Eosin dauert 2min. Zum Entfärben werden die Schnitte kurz in 70% EtOH eingetaucht und danach in 90% und 100% EtOH gewaschen. Nach einem Zwischenschritt in Xylol werden die Schnitte mit DPX eingedeckelt.

Hämatoxylin-Lsg.:	1g Hämatoxylin
	0.2g Natrium-Jodat
	50g Aluminium-Kaliumsulfat
	50g Chloralhydrat
	1g Zitronensäure.
	add. 1l Aq.dest

Lösung filtrieren und lichtgeschützt lagern.

Eosin: 0.5% Eosin in 70% EtOH, Lösung filtrieren und lichtgeschützt lagern.

3.4.4 Kresylviolett -Färbung

Kresylviolett (KV) färbt die Nissl-Schollen in den Zellen an.

Verwendet wird eine 1%ige KV-Lösung, welche vor dem Verwenden gefiltert wird.

Die Schnitte werden zunächst in 50% EtOH und 70% EtOH für 1Min. gewaschen und dann für 1min. in Aq.dest. gegeben. Die anschließende Färbung erfolgt für 3-10Min. in der 1% KV-Lösung. Zum Entfärben werden die Schnitte kurz in Aq.dest und in 70% EtOH geschwenkt und in 96% EtOH mit ein paar Tropfen Eisessig entfärbt (Differenzierung der Färbung). Beim Entfärben ist zu berücksichtigen, dass die anschließende Dehydrierung des Schnitte noch zu einem weiterem Intensitätsverlust der Färbung führt.

Die Dehydrierung erfolgt durch dreimalige Inkubation in 96% EtOH und 100% EtOH (Je 3-5Min.) mit nachfolgender Inkubation in Xylyol (dreimal 5Min.). Eingedeckelt wird in DPX.

3.4.5 Thionin-Färbung

Thionin färbt im Gewebe die Zellkerne an.

Die Länge der Färbung erfolgt in Abhängigkeit von der gewünschten Farbintensität.

Entfärbt wird in 70% EtOH, dem bei Bedarf einige Tropfen Essigsre. zugegeben werden können.

Eingedeckelt wird in DPX.

Thionin: 0.025% Thionin in Aq.dest. (Stocklsg.: 0.25% Thionin in 70% EtOH)

3.5 In-situ-Hybridisierung

3.5.1 Whole Mount in-situ- Hybridisierung

3.5.1.1 Präparation der DNA Probe

Zunächst werden 10µg Plasmid in einem 70 µl Ansatz mit 50-100U RE für ca. 3Std. verdaut. Anschließend wird die DNA mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, für 5min. bei 13000rpm abzentrifugiert und die obere Phase entnommen. Die enthaltene DNA wird mit 1/10tel Vol. 3M NaAcetat und dem 3fachen Vol. 100% EtOH für eine Std. bei -20°C ausgefällt. Nach einer Zentrifugation bei 13000rpm für 15min. wird das Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen und die Probe erneut abzentrifugiert. Das Pellet wird nun getrocknet und danach in 24µl Wasser gelöst. Zur Kontrolle werden 0,5 µl in einem Agarosegel auf die Linearisierung hin getestet.

3.5.1.2 Synthese der RNA Probe

Bei der RNA Synthese wird darauf geachtet nur RNase freies Material und entsprechende Lösungen (DEPC-Wasser) zu verwenden.

Für die RT-Reaktion werden folgende Bestandteile gemischt:

4µl	steriles H ₂ O
2µl	10xTranskriptions-Puffer (Roche Diagnostics)
1µl	0.2M DTT
2µl	10mM rATP
2µl	10mM rCTP
2µl	10mM rGTP
1.2µl	10mM rUTP
0.8µl	10mM rDigUTP
3µl	linearisiertes Plasmid (1µg, siehe 2.5.1.1)
0.5µl	RNAsin (40U/µl, Roche Diagnostics)
1.5µl	SP6, T3 oder T7 RNA Pol. (20U/µl, Roche Diagnostics)

Dieser Ansatz wird für zwei Std. bei 37°C inkubiert.

Anschließend wird die DNA nach der Zugabe von 2µl DNaseI (10U/µl, RNase frei, Roche Diagnostics) bei 37°C für 15Min. verdaut.

Zur Aufreinigung der RNA werden 100µl Wasser, 10µl 4M LiCl pH5.2 und 300µl 100% EtOH zugegeben und so dass die RNA bei -20°C nach 30Min. präzipitiert.

Das nach der Zentrifugation entstandene Pellet (13000rpm, 15Min.) wird mit 70% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert und dann getrocknet.

Das trockene Pellet wird in 100µl Wasser aufgenommen und der gesamte Fällungsvorgang wiederholt.

Nach der zweiten Aufreinigung wird das Pellet in 100µl Wasser aufgenommen und 3µl davon in einem Agarosegel (siehe 3.1.2) bzw. RNA-Gel (siehe 3.1.11.2) auf die Qualität der RNA hin überprüft.

Für die Whole mount in-situ- Hybridisierung werden in 2ml HybMix ca.15µl RNA-Probe verwendet (1µg Probe / ml Hybridisierungspuffer, siehe 3.5.1.4).

3.5.1.3 Vorbereitung der Embryonen

Die Embryonen werden in PBS präpariert und anschließend in 4% PFA/PBS über Nacht bei 4°C fixiert (PBS, siehe 3.4.2).

Nachfolgend werden die Embryonen zweimal in PBT bei 4°C gewaschen und in einer aufsteigenden MeOH/PBS -Reihe dehydriert (25%, 50%, 75%, 100% MeOH).

Zu diesem Zeitpunkt können die Embryonen bei -20°C in 100% MeOH gelagert werden.

Zur Rehydrierung werden sie durch eine absteigende MeOH-Reihe geführt und anschließend zweimal in PBT (PBS mit 0,1% Tween20) gewaschen.

Zur Reduzierung des unspezifischen Hintergrundes werden die Embryonen 1Std. in 6% Wasserstoffperoxid/PBS gebleicht. Nach dem Auswaschen des Wasserstoffperoxids dreimal für 5Min. in PBT, werden die Embryonen mit ProteinaseK (10µg/ml in PBT) dem Alter entsprechend behandelt (siehe unten). Nach diesem Schritt sind sie sehr empfindlich, daher ist beim Pipettieren Vorsicht geboten.

Alter der Embryonen	Behandlungszeit
<E6.5	1min.
E6.5-E7.5	3min.
E8.5	5min.
E9.5	8min.
E10.5	12min.
>E12.5	15min.

Der nachfolgende Waschschrift findet für 20Min. in frisch zubereitetem Glycin/PBS-Puffer (2mg/ml) statt.

Anschließend zweimal für 5Min. in PBT waschen und mit frischem 0.2% Glutaraldehyd/4% Paraformaldehyd in PBT für 20Min. refixieren. Nach erneutem Waschen für 2mal 5Min. in PBT werden die Embryonen in 50% Formamid/5xSSC (pH4.5) überführt und bei -20°C gelagert. Alternativ wird mit der Prähybridisierung fortgefahren.

3.5.1.4 Hybridisierung der Embryonen mit der RNA Sonde

Zunächst werden die Embryonen für mindestens 1Std. im Hybridisierungspuffer bei 55°C im Ofen rotierend prähybridisiert.

Hybridisierungspuffer:	50%	Formamid	10ml (100%)
	5x	SSC pH4.5	5ml (20x)
	1%	SDS	1ml (20%)
	50µg/ml	yeast tRNA	100µl (10mg/ml)
	50µg/ml	Heparin	50µl (20mg/ml)
	0.1%	CHAPS	200µl (10%)
		H ₂ O	2.65ml

Zur Hybridisierung wird der Puffer erneuert (2ml/Hyb.gefäß) und die denaturierte RNA-Sonde (2min. bei 70°C), ca. 1µg/ml (siehe 3.5.1.2), hinzugegeben. Die Hybridisierung findet dann über Nacht bei 55°C im Ofen statt.

Am nächsten Tag wird der Hyb-Mix entfernt und kann für eine erneute Verwendung bei -20°C für 2 bis 4 Wochen gelagert werden.

Die Embryonen werden dann auf folgende Weise gewaschen:

2x30Min.	Lsg.1	55°C
10Min.	Lsg.1/Lsg.2	55°C
2x5Min.	Lsg.2	RT
5Min.	Lsg.2-CHAPS	RT
2x30Min.	100µg/ml RNaseA in Lsg.2-CHAPS	37°C

5Min.	Lsg.2	RT
5Min.	Lsg.3	RT
2x30Min.	Lsg.3	55°C
5Min.	Lsg.3/MABT	RT
2x15Min.	MABT	RT

Anschließend werden die Embryonen in MAB mit 2% Blocking Reagenz (aus 10%igem Stock in MAB bei 4°C) bei RT für mindestens 1Std. inkubiert

Die Blocking -Lsg. wird dann erneuert und Anti-Dig-Fab Erstantikörper von Roche Diagnostics 1:5000 verdünnt hinzugegeben. Das Ganze wird bei 4°C über Nacht geschüttelt.

Die nächsten Tage wird wie unten beschrieben gewaschen.

6x1h	MABT	RT
3-4days	MABT (täglich Lsg. wechseln)	4°C
3x15min.	NTMT	4°C

Zur Entwicklung werden die Embryonen in BM-purple, 0.1% Tween, 2mM Levamisole (Gemisch für 10min. bei 2500rpm zentrifugieren) bei 4°C, lichtgeschützt über Nacht oder länger inkubiert bis die Färbung schön zu sehen ist.

Die Embryonen werden dann in PBT gewaschen und in 4%PFA bei 4°C gelagert.

Lsg.1:	50%	Formamid	5ml (100%)
	5x	SSC pH4.5	2.5ml (20x)
	1%	SDS	0.5ml (20%)
	0.1%	CHAPS	0.1ml (10%)
		Aq.dest	1.9ml

diese Lsg. mit 2,5fachem Volumen ansetzen.

Lsg.2+CHAPS:	0.5M	NaCl	1ml (5M)
	10mM	Tris-HCl pH 7.5	0.1ml (1M)
	0.1%	Tween20	0.1ml (10%)
	0.1%	CHAPS	0.1ml (10%)
		Aq.dest.	8.7ml

diese Lsg. mit 3,5fachem Volumen ansetzen.

Lsg.2 -CHAPS:	0.5M	NaCl	1ml (5M)
	10mM	Tris-HCl pH 7.5	0.1ml (1M)
	0.1%	Tween20	0.1ml (10%)
		Aq.dest.	8.8ml

diese Lsg. mit 3fachem Volumen ansetzen.

Lsg.3:	50%	Formamid	5ml (100%)
	2x	SSC pH 4.5	1ml (20xSSC)
		Aq.dest.	4ml

diese Lsg. mit 3.5fachem Volumen ansetzen.

MAB:	0.1M	Maleinsre.	11.6g
	0.15M	NaCl	8.7g

Aq.dest.

auf 11, pH 7.5 mit 5M NaOH
einstellen.

MABT: MAB + 0.1% Tween20

NTMT :	0.1M NaCl	1ml (5M)
	0.1M Tris-HCl pH 9.5	2.5ml (2M)
	50mM MgCl ₂	1.25ml (2M)
	1% Tween20	5ml (10%)
	Aq.dest.	40.25ml

Diese Lsg. mit 3fachem Volumen ansetzen.

3.5.2 In-situ-Hybridisierung auf Schnitten

Für die in-situ- Hybridisierung wurden Gefrierschnitte von embryonalem und adultem Gewebe (siehe 3.3.1, Schnittdicke 16 µm) und Parafinschnitte von embryonalem Gewebe (siehe 3.3.2, Schnittdicke 8 µm) verwendet.

3.5.2.1 Herstellung der Riboprobe

Für die in-situ-Hybridisierung auf Schnitten werden Riboproben mit einer Länge zwischen 500bp und 1kb verwendet.

Folgende Bestandteile werden pro Transkriptionsansatz eingesetzt:

5µl	Aq.dest.
3µl	10x Transkriptionspuffer
3µl	rATP/rCTP/rGTP-Mix (10mM, Stocklsg. bei -20°C)
2.5µl	DTT (0.2M, Stocklsg. 1M bei -20°C)
1µl	RNasin (40U/µl, Roche Diagnostics)
4.5µl	linearisiertes Plasmid (1.5µg, siehe 3.5.1.1)
10µl	S ³⁵ -rUTP (12.5mCi/mM, NEN)
1µl	RNA-Polymerase (20U/µl, Roche Diagnostics)

Der Ansatz wird für drei Stunden bei 37°C inkubiert, wobei nach einer Stunde noch einmal 1µl der RNA-Polymerase zugegeben wird.

Um die DNA-Vorlage zu zerstören, werden 2µl RNase-freie DNase (10U/µl, Roche Diagnostics) zu dem Ansatz gegeben und dieser erneut für 15Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 200µl tRNA (0.5mg/ml) und 250µl 4M Ammoniumacetat hinzugegeben, das Ganze kurz gevortext und nach der Zugabe von 1ml 100%EtOH für 30Min. bei -20°C inkubiert. Die RNA wird danach bei 13000rpm für 15Min. abzentrifugiert, das Pellet mit 70%EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wird kurz an der Luft getrocknet und danach in 50µl Aq.dest (0.1M DDT) resuspendiert.

Anschließend werden 100µl Hybridisierungs-Mix (siehe unten) hinzugegeben und 2µl daraus in 2ml Szintillationsflüssigkeit verteilt. Diese Probe wird nun im Szintillationsmeßgerät gemessen.

Die Riboprobe wird dann auf einen Wert von 35000-70000cpm/µl mit Hyb.Mix verdünnt. Pro Objektträger werden 90µl Hyb.mix verwendet, was einer Aktivität von 3-6 Millionen cpm entspricht. Die Proben können bei -80°C gelagert werden und sind so bis zu einer Woche verwendbar.

3.5.2.2 Vorbehandlung der Schnitte

Alle Inkubationsschritte erfolgen, sofern nicht anders vermerkt bei RT.

Die Schnitte (Cryo-, bzw. Parafin-) werden zunächst für 30Min. bei Raumtemperatur aufgetaut bevor sie aus der Box genommen und für 15Min. an der Luft getrocknet werden.

Parafinschnitte werden zunächst für zweimal 10Min. in Xylol inkubiert (Auflösen des Parafin), anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (zweimal 100%EtOH 5Min., 70%EtOH 5Min., Aq.dest 3Min.) und in 1xPBS für 5Min. gewaschen. Zur Fixierung werden sie dann für 20Min. in eiskalten 4%PFA/PBS gegeben und erneut zweimal für 5Min. in 1x PBS gewaschen.

Zur Permeabilisierung des Gewebes werden die Schnitte mit 20µg/µl ProteinaseK (Stocklsg. 20mg/ml, bei -20°C) in ProteinaseK-Puffer für 6Min. bei RT behandelt und danach für 5Min. in 1xPBS gewaschen. Anschließend werden sie für 20Min. in eiskaltem 4%PFA/PBS refixiert.

Auch die Cryoschnitte werden nach dem Auftauen und Trocknen (siehe oben) fixiert, wobei 10Min ausreichen. Die nachfolgenden Behandlungsschritte sind für Cryo- und Parafinschnitte identisch.

Nach der Fixierung wird dreimal in PBS für je 5Min. gewaschen. Anschließend werden die Objektträger in ein Glasgefäß gegeben und in 0,1M Triethanolamin-HCl (pH8.0) für 10Min. unter dem Abzug inkubiert. Dabei werden tropfenweise 0,63ml Essigsre.anhydrid dazugegeben. Um eine gute Durchmischung zu garantieren, wird ein Rührfisch am Boden des Gefäßes magnetisch bewegt. Nachfolgend werden die Objektträger zweimal in 2xSSC für 5Min.gewaschen.

Das Gewebe wird nun durch eine EtOH-Reihe (60%, 75%, 95%, 100% für jeweils eine Minute) dehydriert, in Chloroform für 4Min. entfettet. (bei embryonalem Gewebe nur 1Min.!) und danach wieder durch die EtOH-Reihe rehydriert (100%, 95% für jeweils eine Minute). Zum Schluß werden die Schnitte an der Luft getrocknet und anschließend für die Hybridisierung verwendet (siehe 3.5.2.3).

3.5.2.3 Hybridisierung der Schnitte

Zunächst wird der Hybridisierungssofen auf 60-65°C vorgeheizt.

Parafinschnitte werden für eine Std. im Hybridisierungsmix prähybridisiert, Cryoschnitte können direkt hybridisiert werden.

Hierzu werden die vorbehandelten und getrockneten Schnitte (siehe 3.5.2.2) mit 90µl pro Objektträger Hybridisierungsmix überschichtet, mit einem Deckgläschen bedeckt und in einer feuchten Atmosphäre (Box, deren Boden mit Hyb.kammerflüssigkeit bedeckt ist) bei 55-60°C für 1Std. im Hybridisierungssofen inkubiert.

Für die eigentliche Hybridisierung wird der Hybridisierungsmix inklusive der Riboprobe für 2Min. bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt.

Der Prähyb.mix wird mitsamt der Objektträger entfernt, der Hyb.mix wie oben aufgetragen und die Schnitte erneut, diesmal für ca. 18Std. hybridisiert.

Hybridisierungsmix:	50%	deionisiertes Formamid	15ml (100%)
(Hyb.Mix) 30ml	20mM	Tris-HCl pH 8.0	0.6ml (1M)
	0.3M	NaCl	1.8ml (5M)
	5mM	EDTA, pH 8.0	300µl (0.5M)
	10%	Dextransulfat	6ml (50%)
	0.02%	Ficoll 400	3ml (10x
Polymere)			
	0.02%	Polyvinylpyrrolidon	6mg
	0.02%	BSA	6mg
	0.5mg/ml	tRNA	1.5ml
(10mg/ml)			
	0.2 mg/ml	carrier DNA	600µl
(10mg/ml)			
	200mM	DTT	1.2ml (5M)
Hyb.kammerflüssig.:	75ml	Formamid	
150ml	15ml	20xSSC	
	60ml	Aq.dest.	
Deionis. Formamid:	Zur Deionisierung werden 20g "mixed bed ion-exchangeresin" (Bio-Rad) zu 200ml frischem Formamid (Bio-Rad) gegeben, für 30min. bei RT gerührt. Das Säulenmaterial wird abfiltriert und das Formamid als 33ml Aliquots in Aluminium-Folie verpackt bei -20°C gelagert.		
20xSSC:	175.3g	NaCl	
	88.2g	Na ₃ citrat Dihydrat	
	add. 600ml	Aq.dest., pH 7.0 mit NaOH oder Eisessig	
	einstellen, auf 1000ml auffüllen, autoklavieren und bei RT lagern.		
10x Polymere:	0.2g	Ficoll	
	0.2g	BSA	
	0.2g	Polyvinylpyrrolidone	

	add.10ml	Aq.dest., als 2ml Aliquots bei -20°C lagern.
10x PBS:	80g	NaCl
	2g	KCl
	36.2g	Na ₂ HPO ₄
	2.4g	KH ₂ PO ₄
	add. 1000ml	Aq.dest., pH 7.4 einstellen, autoklavieren.
50% Dextransulfat:	Löslichkeit in Aq.dest. wird durch Erhitzen verbessert.	
tRNA (10mg/ml):	<p>Die tRNA (Roche Diagnostics) wird zunächst in 50ml Falcon Tubes in Aq.dest. gelöst (2.5mg/ml). Anschließend wird zweimal mit Phenol/Chloroform ausgefällt (je 5Min. bei 5000rpm abzentrifugiert), das Flüssigkeitsvolumen bestimmt und die tRNA mit 1/10 Volumen 3M Naacetat und 2.5fachem Volumen 100%EtOH ausgefällt. Anschließend wird 30Min. auf Eis inkubiert und für 30Min. bei 4°C und 5000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70%EtOH gewaschen und dann getrocknet.</p> <p>Die tRNA wird in Aq.dest. in einer Konzentration von ca. 15mg/ml gelöst. Nach der Bestimmung der OD₂₆₀ wird die tRNA auf die endgültige Konzentration von 10mg/ml verdünnt. Die Lagerung erfolgt in 1ml Aliquots bei -80°C.</p>	
carrier DNA:	<p>0.5g Salmon Sperm DNA (Sigma) werden in 7.5ml Aq.dest. in einem 50ml Falcon Tube gelöst (15min. bis zu 2Std. auf Schüttler im Warmraum). Die DNA-Lösung sollte gelatineartig erscheinen ohne weiße Präzipitate. Anschließend werden 1.25ml 2M HCl hinzugegeben, die ausgefallene DNA 1Min. mit einer Pipette geknetet und für 15Min. bei RT inkubiert. Danach werden 1.75ml 2M NaOH hinzugefügt und die DNA für 15Min. bei 37°C auf dem Schüttler gelöst. Zur gelösten DNA werden 5ml 1M Tris-HCl, pH 7.4, hinzugegeben und das Volumen mit Aq.dest. auf 20ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit 2M HCl auf 7-7.4 eingestellt und das Volumen mit Aq.dest. auf 30ml gebracht. Die DNA wird auf 4 Gefäße verteilt, jeweils mit 1/10 Vol Naacetat pH 5,5 und dem 2.5fachen Vol. 100%EtOH auf Eis (15Min.) ausgefällt und danach bei 8000rpm für 15Min. abzentrifugiert. Die Pellets werden mit 70%EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend werden sie an der Luft getrocknet und jeweils in 5ml Aq.dest. resuspendiert. Die Lsg. werden gepoolt und die OD₂₆₀ bestimmt. Die DNA wird entsprechend auf die Endkonzentration von 10mg/ml verdünnt, in 1.3ml Aliquots verteilt, für 10Min. bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und danach bei -20°C eingefroren.</p>	

Zur Qualitätskontrolle werden 0.5 bzw 3µg DNA auf einem 1.5%igen Agarosegel (siehe 3.1.2) aufgetragen. Die Fragmentlängen sollten zwischen 50 und 300bp liegen.

3.5.2.4 Waschen der Objektträger

Alle Waschschritte finden, sofern nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur statt. Nach der Hybridisierung wird auf folgende Weise gewaschen.

Zunächst wird ein Wasserbad auf 37°C und eines auf die Hyb.temperatur eingestellt. 250ml NTE werden bei 37°C inkubiert. 2x250ml 0.1xSSC werden bei der Hyb.temp. inkubiert.

Dann werden die Deckgläser von den Objektträgern geschüttelt und diese 4x in 4xSSC für je 5Min. gewaschen. Die Schnitte werden danach in NTE überführt und dort nach der Zugabe von RNaseA (20µg/ml) für 30Min. inkubiert.

Die folgenden Waschschritte finden in SSC statt:

2x in 2xSSC/1mM DTT für 10Min.

1x in 1xSSC/1mM DDT für 10Min.

1x in 0,5xSSC/1mM DDT für 10Min.

2x in 0.1xSSC/1mM DDT für 30Min. bei Hyb.temperatur

2x in 0.1xSSC für 10Min.

Nach dem Waschen werden die Schnitte dehydriert (je 1x für 1min.):

30%EtOH in 300mM NH₄OAc

50%EtOH in 300mM NH₄OAc

70%EtOH in 300mM NH₄OAc

95%EtOH

100%EtOH

100%EtOH

Zuletzt werden die Schnitte an der Luft getrocknet.

NTE:	0.5M NaCl	100ml (5M)
	10mM Tris-HCl, pH 8.0	10ml (1M)
	5mM EDTA	10ml (0.5M)
	Aq.dest.	add. 1000ml

RNaseA: Stockslg. 10mg/ml in Aq.dest., bei -20°C lagern

3.5.2.5 Dippen

Um einen ersten Eindruck von der Qualität der Hybridisierung zu bekommen kann auf die Objektträger über Nacht ein Film aufgelegt werden (BioMax MR, Kodak).

Vom Dippen bis hin zur Entwicklung dürfen die Objektträger nicht in Kontakt mit Licht kommen. Deshalb sollte nur mit Natriumlampen gearbeitet werden.

Zur Beschichtung der Objektträger mit Silberkörnern wird die KODAK NTB2 Lösung verwendet. Diese Lsg. darf nie in Kontakt mit Metall kommen.

Die Lösung wird zunächst bei 42°C für ca. 45Min. erwärmt. Gleichzeitig wird Aq.dest. auf die selbe Temperatur gebracht. Mit diesem wird anschließend die Lsg. im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Die Objektträger werden in die entsprechenden Plastikhalter gesteckt, für ca. 3Sek. in die Lösung getaucht, auf Papier gestellt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag werden die Objektträger in Boxen umgelagert und für 3-4 Wochen bei 4°C exponiert.

3.5.2.6 Entwicklung der Objektträger

Die Objektträger werden von 4°C auf RT aufgetaut (ca.2Std.) und im Dunkeln geöffnet. Die Entwicklung erfolgt im KODAK D19 Entwickler für 3,5 Min., danach wird für 30Sek. in Wasser gespült und anschließend in KODAK Fixer für 6,5Min. fixiert.

Am Ende werden die Objektträger für 30min. unter fließendem Wasser gespült.

Die Silberemulsion wird nun von der Rückseite der Objektträger gekratzt und die Objektträger an der Luft getrocknet.

Anschließend werden die Schnitte mit Kresylviolett (siehe 3.4.4) oder Thionin (siehe 3.4.5) gegengefärbt und mit DPX eingedeckelt.

3.6 Liste der Oligonukleotide

Die Sequenz der Primer ist in 5'-3'Richtung angegeben, gefolgt von der in der PCR-Reaktion verwendeten Anlagerungstemperatur (siehe 3.1.3).

3.6.1 Oligonukleotide für die Typisierung

Für die Typisierung der $En1^{+/dnR2IRESlacZ}$ -Mäuse wurden lacZ bzw. Neo spezifische Primer eingesetzt (siehe 4.1.2).

lacZ

sense Primer:	5'-GGTGGCGCTGGATGGTAAGC-3'	59°C
antisense Primer:	5'-CGCCATTTGACCACTACC-3'	59°C

Neo

sense Primer:	5'-CTGGGCACAACAGACAATCGG-3'	59°C
antisense Primer:	5'-CGATAGAAGGCGATGCGCTGC-3'	59°C

3.6.2 Oligonukleotide für die 5' und 3' Race

Die cDNA als Ausgangsmaterial für die RACE wurde mit dem lacZ spezifischen RT-Reaktions Primer gewonnen. Die RACE selber wurde anschließend mit lacZ (PCR1 Primer) bzw. Engrailed2, Exon2 (PCR2 Primer) spezifischen Oligos durchgeführt (siehe 4.2.2.1).

RT-Reaktion

antisense: 5'-TGGCGAAAGGGGGATGTG-3' 58°C

PCR1 (lacZ spezifisch)

antisense: 5'-GATGTGCTGCAAGGCGATTA-3' 58°C

PCR2 (en2-Exon2 spezifisch)

antisense: 5'-CA6CA6CA6CA6TTGTCGACCTGTTGGTCTGAAACTCAGCCT-3'
62°C

3.6.3 Oligonukleotide für den Nachweis von FGF-Rezeptoren

Die Expression des dnFGFR2/IRES-Fusionstranskriptes wurde mit dem dnFGFR2 und dem IRES-Primer nachgewiesen (siehe 4.1.3.1.1). Die Expression der FGF-Rezeptoren 1-4 wurde mit den jeweiligen spezifischen Oligo-Kombinationen aus sense und antisense Primern gezeigt (siehe 4.2.1.1).

dnFGFR2

sense: 5'-ACTGTGAAGTTCCGCTGTCC-3' 56°C

IRES

antisense: 5'-ACGACATTCAACAGACCTTGC-3' 56°C

FGFR1

sense: 5'-GAGTCTCTCCTGGTCCACCCTG-3' 57°C

antisense: 5'-GTGGCATAGCGAACCTTGTAGC-3' 57°C

FGFR2

sense: 5'-CACTTTAGAACCAGAAGAGCCACC-3' 57°C

antisense: 5'-GTGGCATAGCGAACCTTGTAGC-3' 57°C

FGFR3

sense: 5'-CTGGAGCTACTTCCGAGCCT-3' 57°C

antisense: 5'-AGGATGGAGCATCTGTTACAC-3' 57°C

FGFR4

sense: 5'-TGTCCCTTGAGGCCTCTGAG-3' 57°C

antisense: 5'-AGGAAGCTGGCGATCTCCAG-3' 57°C

3.6.4 Oligonukleotide für den Nachweis von mbFZb

Die Fusionstranskripte von mbFZb und lacZ, bzw. die Transkription des endogenen mbFZb wurden mit entsprechenden Oligokombinationen gezeigt (siehe 4.2.3.1).

lacZ-trap

antisense: 5'-GATGTGCTGCAAGGCGATTA -3' 57°C

N210/MZ3BP

sense: 5'-CCAAAGACAGTGGAGCAGCA-3' 57°C

N210

antisense: 5'-GAAATGAACTATGATCCGGCAC-3' 55°C

P4B/P7B

sense: 5'-GTGCCGGATCATAGTTCATTTC-3' 55°C

P4B



antisense: 5'-AAGGCACCCCCTTCTAACCTA-3' 55°C

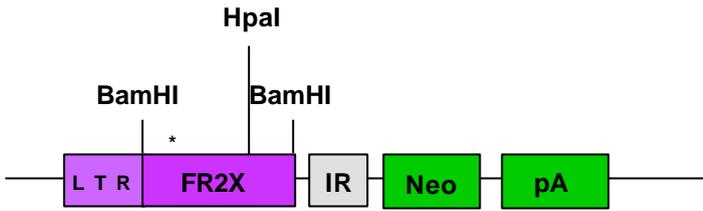
P7B

antisense: 5'-CTGTGGGTGACAAAGGGACTT-3' 55°C

3.7 Plasmide

3.7.1 Der Genfallen-Vektor PT1ATG

Der Vektor PT1ATG (Hill und Wurst, 1993) beinhaltet im 5' Bereich Teile des En-2 Introns eine Splice-Acceptor Sequenz und 180bp des 2.Exons des Gens. Diesem folgt das lacZ-Gen mit eigener Translationsinitiationsstelle (ATG) und abschließendem Polyadenylierungssignal. Für die Selektion beinhaltet der Vektor eine PGK-Neo-Kassette.

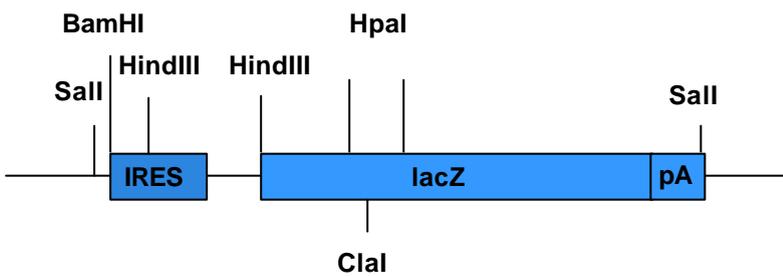


3.7.2 Der Vektor MIRB-FR2X

Von diesem Plasmid wurde die Sequenz des dominant

negativen Rezeptors gewonnen.

Der Vektor MIRB-FR2X stammt aus dem Labor von D.Ornitz und beinhaltet 350bp des 5' UTR des FGF-Rezeptors 2 und die cDNA des translatierten Bereichs des Gens bis 8aa 3' der Transmembrandomäne des Rezeptors. Die cDNA spiegelt die Sequenz der FGF-Rezeptor-Variante bek wieder, bei welcher die Transmembrandomäne IIIc vorhanden ist (Mansukhani et al., 1992). Der Translationsstart (ATG) des Rezeptors ist durch einen Stern gekennzeichnet.



3.7.3 Der Vektor IRES/lacZ

Dieser Vektor wurde uns von A.Mallamaci zu Verfügung gestellt. Aus diesem Plasmid wurde die IRES/lacZ-Kassette verwendet.

3.7.4 Der En1-knock -in Vektor

Dieser Vektor (Hanks et al., 1995) wurde für die Herstellung der dnR2-Mäuse als Shuttle-Vektor verwendet. Er besitzt die beiden Selektionsmarker TK (Thymidinkinase) und Neo (Neomycin). Die Neomycinkassette wird von loxP-Erkennungsstellen flankiert.

Die Klonierung erfolgt in die singuläre (*) KpnI-Schnittstelle zwischen dem 5' Bereich des Engrailed 1-Gens (Teile Promotors und ersten Exons) und die Neomycin-Kassette. Der 3' Bereich von Engrailed1 (Teile des ersten Exons, Intron und Teile des zweiten Exons) schließt das Konstrukt ab.

3.8 In Situ Proben

Sense und antisense-Proben wurden von Plasmiden transkribiert, welche die publizierten Sequenzen für die jeweiligen Gene beinhalten.

Die Plasmide für En1 (Davis und Joyner, 1988), für FGF8 (Tanaka et al., 1992) und Wnt1 wurden uns von K. Schughart, für Gbx2 (Wassarmann et al., 1997) und Otx2 (Simeone et al., 1992) von A. Simeone und für Pax2 von P. Gruss zur Verfügung gestellt.

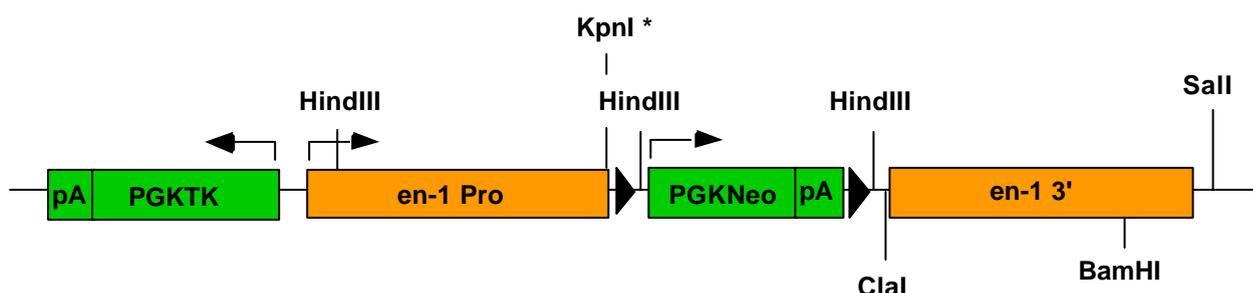
Die Probe für lacZ (985bp kodierende Sequenz) wurde über PCR aus dem IRES/lacZ-Vektor (siehe 3.7.3) amplifiziert und in den pKS-Vektor (Stratagene) subkloniert. Ein Teil der cDNA des FGF-Rezeptors 2 (1.2kb) wurde aus dem MIRB-FR2X-Vektors (siehe 3.7.2) mit BamHI und NcoI isoliert und für die Transkription ebenfalls in den pKS-Vektor (Stratagene) subkloniert.

3.9 Liste der verwendeten Kits und Chemikalien

Die Bezugsquellen der wichtigsten Materialien und Kitsysteme sind direkt bei der entsprechenden Methode angegeben.

Als Gebrauchskemikalien wurden solche der Firmen Sigma und Merck verwendet.

Restriktionsenzyme wurden von Roche Diagnostics und Gibco LIFESCIENCE bestellt, wobei die hochkonzentrierten Enzyme (40U/µl) immer von Roche Diagnostics stammten.



Nukleotide und modifizierende Enzyme, wie die Taq-Polymerase, das Klenow-Enzym usw. wurden ausschließlich von der Firma Roche Diagnostics eingesetzt.

Die Medien und Lösungen für die Zellkultur stammen von der Firma Gibco LIFESCIENCE.

Oligonukleotide wurden intern von der AG BioDV der GSF oder von Metabion hergestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Analyse der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mausmutanten

4.1.1 Klonierung des Insertions-Vektors $En1/dnR2/IRESlacZ$

Für die Klonierung des dominant negativen FGF-Rezeptors 2 unter dem Engrailed 1-Promotor wurde die cDNA für die Splicevariante "bek" des FGF-Rezeptors 2 verwendet ((Mansukhani et al., 1992), siehe Abb. 3), welche in der Immunglobulin-domäne III die Variante "c" beinhaltet. Die cDNA schließt 350bp 5' nicht translatierte Region (5'UTR) mit ein und endet 8aa nach dem 3' Ende der Transmembrandomäne. Der dominant negative FGF-Rezeptor 2 wird im nachfolgenden Text im Zusammenhang mit dem Insertions-Vektor als dnR2 abgekürzt.

Die cDNA des dn-FGF-Rezeptors 2 wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI aus dem Vektor MIRB-FR2X isoliert, welcher aus dem Labor von David Ornitz zur Verfügung gestellt wurde (siehe 3.7.2). Anschließend wurde die dnFGF-Rezeptor 2-cDNA in die BamHI-Schnittstelle des IRES/lacZ1-Vektors ligiert. Dieser beinhaltet eine interne Ribosomen Bindestelle (IRES) aus dem Encephalomyocarditis-Virus gefolgt von einem bakteriellen lacZ-Gen (siehe 3.7.3). Nach Überprüfung der Orientierung wurde mit einem SalI-Verdau die dnR2/IRES/lacZ-Kassette aus dem Vektor isoliert und in die Asp718-Schnittstelle des En1-knock-in-Vektors (En1-K1, (Hanks et al., 1995), siehe 3.7.4) in 5'-3' Orientierung ligiert.

Das endgültige Konstrukt En1/dnR2/IRESlacZ (siehe Abb. 7a) beinhaltet ein Thymidin-Kinase-Gen (inklusive PGK Promotor und pA-Signal, 2.6kb), gefolgt von dem 5' genomischen Arm des En1-Gens (Promotorregion und Beginn des 1.Exons; 4.2kb). Daran schließt sich die dnR2/IRESlacZ-Kassette an, gefolgt von der von loxP-Sequenzen eingerahmten Neomycin-Kassette (inklusive PGK Promotor und pA-Signal; 2.0kb). Den Abschluß bildet der 3' genomische Arm des En1-Gens (Teil des 1.Exons, Intron und Teil des 2.Exons; 3.8kb).

Die Thymidin-Kinase-Kassette und die Neomycin-Kassette dienen der Negativ- bzw. Positivselektion in rekombinanten ES-Zellen. Die loxP-Sites werden bei einer Kreuzung der En1^{+dnR2lacZ}-Mäuse (siehe 4.1.2) mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen von der Rekombinase erkannt. Diese schneidet den zwischen den loxP-Sites liegenden Bereich, die Neomycin-Kassette, heraus.

Das Entfernen der Neomycin-Kassette kann eine Verstärkung der Expression im transgenen Tier bewirken (Broccoli et al., 1999).

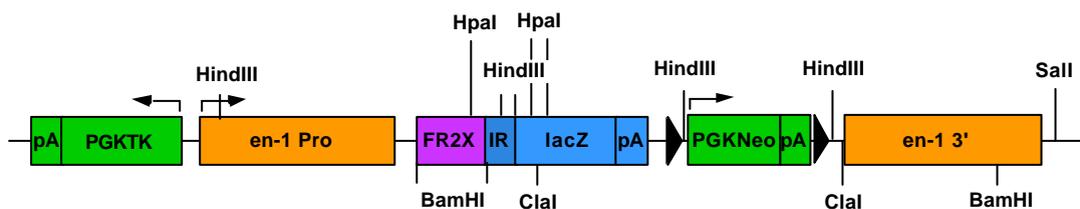
Die En1^{+dnR2lacZ}-Tiere exprimieren sowohl den dominant negativen FGF-Rezeptor 2 als auch die β-Galaktosidase unter dem Promotor des En1-Gens.

Zur Kontrolle der Ligationsschritte wurden Restriktionsverdau am Vektor En1/dnR2/IRESlacZ durchgeführt, die die Orientierung der Inserts eindeutig bestimmen (siehe Tabelle 2 und Abb. 7a,b).

Restriktionsenzym	En1-knock-in Vektor	En1/dnR2/IRESlacZ
Sall	15.1kb (linearisiert)	20.2kb (linearisiert)
HindIII	1.9kb, 3.7kb, 9.5kb	0.4kb, 1.9kb, 3.1kb, 5.1kb, 9.7kb
Clal	15.1kb	4.2kb, 15.8kb
BamHI	15.1kb	1.6kb, 9.4kb, 9.6kb
BamHI/Clal	3.5kb, 11.6kb	1.5kb, 1.6kb, 3.7kb, 5.7kb, 7.7kb
Hpal	-	0.7kb, 1.4kb, 18.1kb
Hpal/Clal	15.1kb	0.3kb, 0.4kb, 1.3kb, 3.9kb, 14.3kb

Tabelle 2 zeigt die zu erwartenden Fragmentlängen der Vektoren En1-knock-in (siehe 3.7.4) und En1/dnR2/IRESlacZ nach Verdau mit den angegebenen Restriktionsenzymen.

a



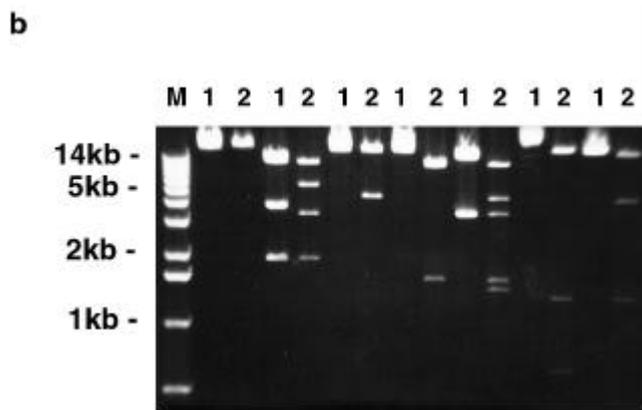


Abbildung 7a zeigt die Karte des Vektors En1/dnR2/IRESlacZ mit den Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsenzyme. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Kassetten an. Die Dreiecke stellen die loxP-Erkennungsstellen dar.

Abb. 7b zeigt den Kontrollverdau des Vektors En1/dnR2/IRESlacZ, sichtbar gemacht durch EtBr in einem Agarosegel (Fragmentlängen siehe Tabelle 2).

In den mit 1 gekennzeichneten Spuren wurde DNA des En1-knock-in-Vektors aufgetragen, in den mit 2 gekennzeichneten Spuren solche des Vektors En1/dnR2/IRESlacZ.

B: BamHI, C: ClaI, H: HindIII, Hp: HpaI, S: SalI

4.1.2 Rekombination in embryonalen Stammzellen und Erreichen der Keimbahntransmission

Der Vektor En1/dnR2/IRESlacZ wurde in embryonale Stammzellen der Maus (129/SvP) elektroporiert und diese auf eine Rekombination hin selektioniert. Zur Negativselektion wurde Gancyclovir, zur Positivselektion G418 verwendet. Ein mögliches Rekombinationsereignis in den En1-Lokus wurde mit genomischen Southernblots überprüft (siehe Abb. 8a). Hierfür wurde die genom. ES-Zell-DNA zur Analyse der 5' Integration des Vektors mit BamHI verdaut und mit einem 1.2kb großen SacI-Fragment (SC1) hybridisiert. Dieses ermöglicht nach einem Rekombinationsereignis neben der Detektion des 10kb großen Wildtyp- Fragments die Detektion der 4.5kb umfassenden Bande des rekombinanten Allels (siehe Abb. 8a, c).

Zur Überprüfung der 3' Integration des Vektors wurde die genomische DNA mit HindIII verdaut und mit einem 700bp großen EcoRI-HindIII Fragment (ES6) hybridisiert. Die zu erwartende Wildtyp- Bande beträgt 7,5kb im Vergleich zur 4,5kb umfassenden Mutanten Bande (siehe Abb. 8a, b).

Um die Einfachintegration des Vektors nachzuweisen, wurde die genomische DNA der positiven Klone mit SacI verdaut und mit einer Sonde für die Neomycin-Kassette hybridisiert (siehe Abb. 8d).

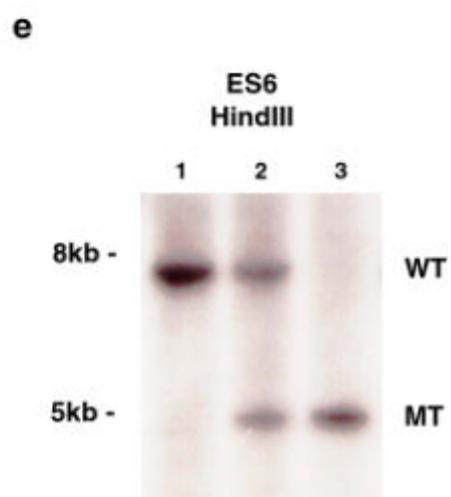
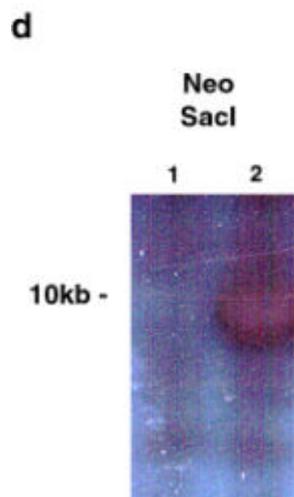
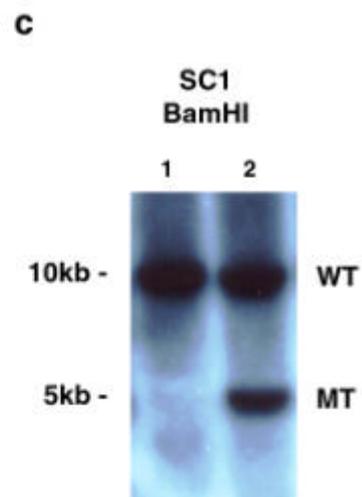
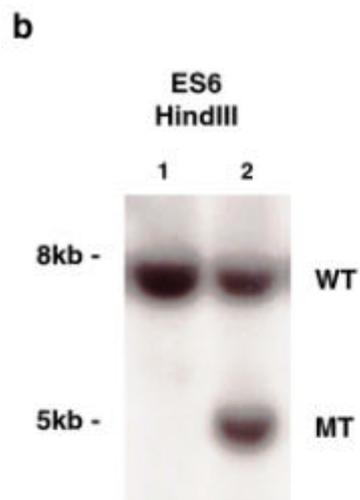
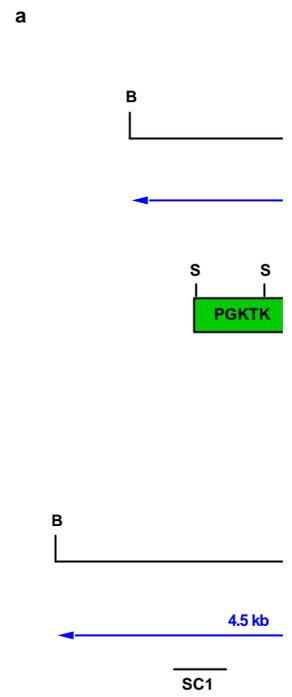


Abbildung 8a zeigt das Schema des Rekombinationsereignisses im genomischen Lokus des En1-Gens in embryonalen Stammzellen. Die blauen Pfeile zeigen die Längen der Wildtyp- (WT)- bzw. Mutanten (MT) - Fragmente an, welche bei der Hybridisierung mit der jeweiligen DNA-Sonde SC1 bzw. ES6 im Southerblot zu sehen sind (siehe b-e).

Abb. 8b-d zeigt genomische Southernblots mit den verschiedenen DNA-Sonden (b:ES6, c:SC1, d:Neo). In Spur 1 ist die genomische DNA eines Wildtyp- ES-Zell-Klons aufgetragen, in Spur 2 solche eines rekombinanten Klons ($En1^{+/dnR2lacZ}$).

Abbildung E2e zeigt einen Southerblot auf genomischer DNA von Wildtyp-Mäusen (Spur 1), $En1^{+/dnR2lacZ}$ - und $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Tieren (Spur 2 bzw. 3) mit der Sonde ES6.

Die DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut (B: BamHI, H: HindIII, S: SacI).

Die rekombinanten ES-Zell-Klone wurden mit Morulae von cD1-Mäusen aggregiert bzw. in Blastozysten aus C57bl6-Mäusen injiziert. Die Blastozysten wurden nachfolgend in cD1-Mäuse transferiert und die gewonnenen Mauschimere zur Keimbahntransmission verpaart.

Für die Herstellung der Mäuse wurden drei verschiedene ES-Zelllinien verwendet, welche unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl der Rekombinationsereignisse und die Chimerenentwicklung erbrachten (Tabelle 3).

Die Elektroporation der R1-ES-Zellen (Nagy et al., 1993) erbrachte zwei positive Klone, aus denen keine Chimere hergestellt werden konnten. Aus der Gruppe der E14-ES-Zellen (Bereitstellung durch M.Huber) konnten keine rekombinanten Klone identifiziert werden. Das beste Ergebnis in Bezug auf die Rekombinationsrate und die Chimerengenerierung erbrachten die TBV2-ES-Zellen mit drei positiven Klonen, wobei aus zwei von ihnen

Chimeren gewonnen werden konnten. Diese Zelllinie wurde in unserem Labor von Dr. V. Blanquet etabliert und für dieses Experiment zur Verfügung gestellt..

Zelllinie	getestete Kolonien	positive Klone	Chimeren
R1	1000	F3 G1	nein nein
E14	400	-	-
TBV2	400	6D5 11E9 15C7	ja ja nicht getestet

Tabelle 3 zeigt das Ergebnis der Elektroporation des En1/dnR2/IRESlacZ-Konstrukts in verschiedene ES-Zelllinien. R1-ES-Zellen (Nagy et al., 1993), E14-ES-Zellen (Bereistellung von M.Huber), TBV2 (Bereistellung von V.Blanquet).

Chimeren aus den beiden injizierten ES-Zellklonen 6D5 und 11E9 erbrachten die Keimbahntransmission (siehe Tabelle 3). Die Mäuse, welche heterozygot für die Integration des En1/dnR2/IRESlacZ-Vektors sind werden im nachfolgenden Text $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse genannt. Die homozygoten Tiere entsprechend $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Mäuse. Der Genotyp der gewonnenen $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse wurde mit genomischen Southernblots (siehe Abb. 8e) bzw. PCR-Technik (siehe Abb. 9) nachgewiesen. Für den Southern-blot wurde die genomische DNA der Tiere mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. Für die PCR wurden lacZ bzw. Neomycin spezifische Primer verwendet (siehe 3.6.1) Beide PCR-Reaktionen wurden nach dem Standardprogramm (siehe 3.1.3) bei einer Anlagerungstemperatur von 59°C für 40Sek. und einer Wiederholungszahl von 35 Zyklen durchgeführt.

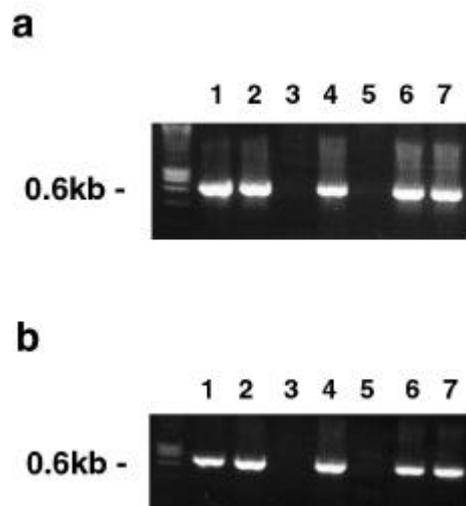


Abbildung 9 zeigt das Ergebnis einer Typisierungs-PCR mit lacZ- bzw. Neomycin-spezifischen Primern (E3a bzw. b). Die erwarteten Amplifikationslängen betragen 613bp für lacZ bzw. 704bp für Neomycin. Die DNA-Vorlage in Spur 1, 2, 4, 6, 7 stammt von $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren, die DNA-Vorlage aus Spur 3 und 5 stammt von Wildtyp-Tieren.

4.1.3 Analyse der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse

Zunächst wurde sowohl die Transkription des $En1/dnR2/IRESlacZ$ -Konstrukts in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen überprüft (siehe 4.1.3.1).

Anschließend wurde der Phänotyp der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere genauer betrachtet. $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp oder Verhaltensauffälligkeiten.

Für die Herstellung der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse wurde der $En1$ -knock-in Vektor verwendet (siehe 3.7.4). Die $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Mäuse zeigen den Phänotyp der $En1^{-/-}$ -Maus ((Wurst et al., 1994); siehe Abb. 12a bzw 12b, homozygote Tiere).

Aus diesem Grund wurde hier nur das Nervensystem der heterozygoten Tiere genauer betrachtet.

Um mögliche Veränderungen während der Entwicklung des Nervensystems der Tiere zu analysieren, wurden zunächst 9.5 Tage alte Embryonen untersucht (siehe 4.1.3.2).

Um die Ausbildung der verschiedenen Gehirnregionen zu verfolgen, wurden auch Gehirne adulter Mäuse in Bezug auf etwaige Veränderungen hin betrachtet (siehe 4.1.3.3).

4.1.3.1 Nachweis der Transkription und Translation des $dnR2/IRESlacZ$ -Konstrukts in der Mittelhirn/Hinterhirnregion

4.1.3.1.1 RT-PCR an 11.5 Tage alten Mausembryonen

Da die $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen, wurde zunächst die Transkription und Translation des $dnR2/IRESlacZ$ -Konstrukts in diesen Tieren überprüft. Zu diesem Zweck wurde RT-PCR mit cDNAs der MH-Region von E11.5 $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen als Vorlage durchgeführt. Der verwendete sense Primer ist spezifisch für die Sequenz des FGF-Rezeptors 2, der antisense Primer ist spezifisch für die IRES-Sequenz (siehe 3.6.3, Abb. 7a).

Somit wird nur das artifizielle Fusionstranskript aus $dnFGF$ -Rezeptor 2 und der IRES-Sequenz amplifiziert und nicht das endogene Transkript des FGF-Rezeptors 2. Die PCR-Reaktion wurde bei 56°C und mit 35 Zyklen durchgeführt.

Das Ergebnis der PCR zeigt, dass nur in den cDNAs der heterozygoten Mäuse das zu erwartende Fusionstranskript mit einer Länge von 940bp amplifiziert wurde (siehe Abb. 10a, b). Der Blot dieses Gels zeigt ein starkes Hybridisierungssignal der dnFGF-Rezeptor 2-Probe für die erwartete Bande (siehe Abb. 10c).

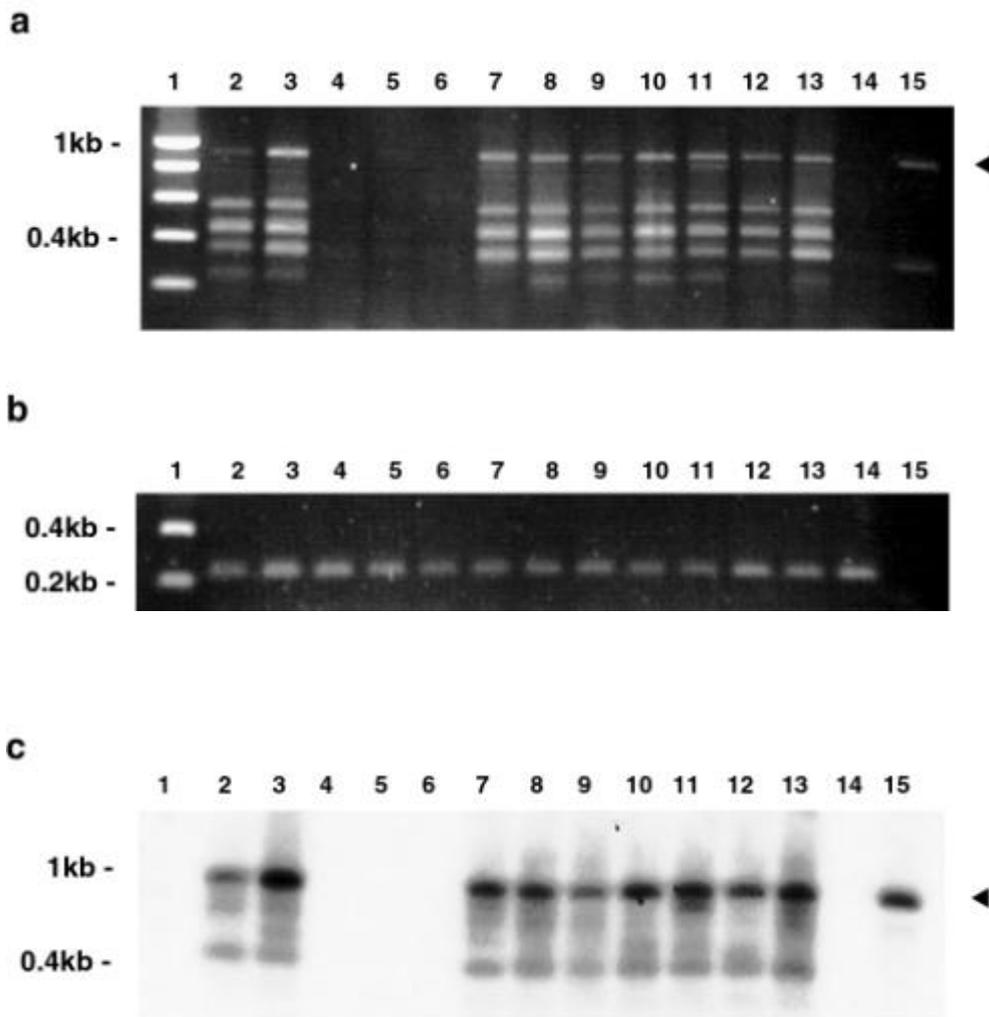


Abbildung 10a zeigt das Ergebnis der RT-PCR für das Fusionstranskript aus dnFGF-Rezeptor 2 und lacZ aus der Mittelhirn/Hinterhirnregion von Embryonen (E11.5) eines Wurfes.

In Spur 1 ist der Längenstandard aufgetragen, in Spur 4-6 und 14 wurde die cDNA von Wildtyp-Tieren und in Spur 2,3 und 7-13 die cDNA von $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren als Vorlage eingesetzt.

Spur 15 zeigt die Plasmidpositivkontrolle. Abb. 10b zeigt die β -Aktin Kontrolle der PCR aus 10a.

In Abb. 10c ist die Southernhybridisierung der Amplifikate aus 10 zu sehen, welche die Mutanten-Bande als solche bestätigt. Der Pfeil in a und b deutet auf das erwartete Amplifikat der PCR-Reaktion, welches auch hybridisiert.

Als Probe für die Hybridisierung wurde die cDNA des dnFGF-Rezeptor 2 verwendet.

4.1.3.1.2 In situ-Hybridisierung auf Gehirnschnitten 9.5 Tage alter Mausembrionen

Um eine detaillierte Information über die Expression der mRNA des dnFGF-Rezeptors 2 als auch der β -Galaktosidase im Gehirn der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere zu erhalten, wurden in-situ-Hybridisierungen auf Schnitten von 9.5 Tage alten Embryonen durchgeführt. Die ektopische Expression des dnFGF-Rezeptor 2-Konstrukts wurde mit Proben für den FGF-Rezeptor 2 bzw. lacZ dokumentiert.

Um die Expressionsdomäne genau zu lokalisieren, wurde parallel mit einer En1-Probe hybridisiert.

Des weiteren wurde die Expression von FGF8 in diesen Tieren analysiert, um die Expression von FGF8 in der Domäne des dnFGF-Rezeptors 2 zu bestätigen.

Bei den 9.5 Tage alten $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Embryonen ist mit den jeweiligen antisense-Proben sowohl für den FGF-Rezeptor 2 als auch für lacZ in der Mittelhirn/Hinterhirn-Region der Tiere eine ektopische Expression zu beobachten (siehe Abb. 11c, c', d, d'). Die Wildtyp-Kontrollen zeigen nahezu keine Expression des Rezeptors in dieser Region (siehe Abb. 11h, h'), mit der lacZ antisense-Probe ist in den Wildtyp-Tieren wie erwartet kein Signal zu detektieren (nicht gezeigt).

Der ektopische Expressionsbereich von lacZ und dem dnFGF-Rezeptor 2 ist dem von En1 ähnlich, dessen Promoter für die ektopische Expression verwendet wurde (siehe Abb. 11b, b'). Allerdings ist die ektopische Expression des Fusionstranskriptes dnR2/IRESlacZ nicht so stark wie die des En1-Gens (Vergleiche Abb. 11b', c', d').

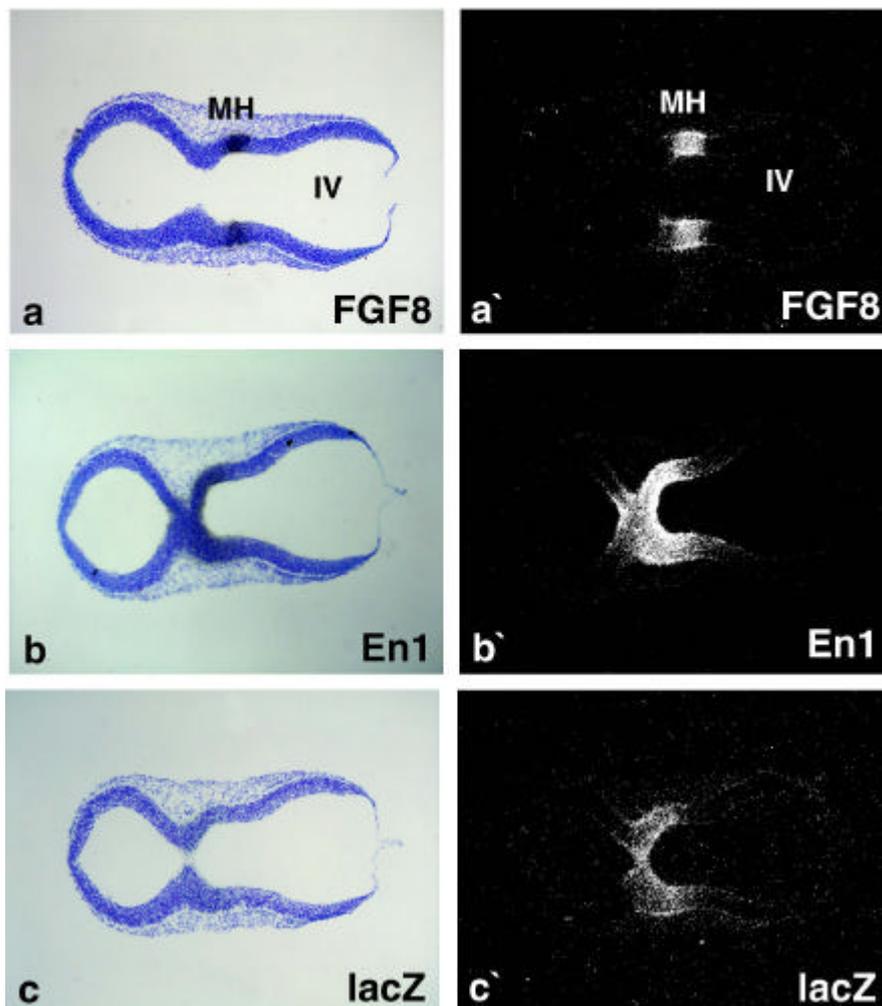
Überraschenderweise zeigte sich bei dieser in-situ-Hybridisierung jedoch auch mit der sense-Probe für den FGF-Rezeptor 2 und lacZ ein Signal in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren (siehe Abb. 11 e, e'). Das sense-Signal ist ebenfalls im En1-Expressionsbereich zu detektieren und nur dort (Vergleiche Abb. 11b, b', e, e'). Die Hybridisierung mit der lacZ sense-Probe ist nicht gezeigt. Wildtyp-Tiere zeigen diese Expression nicht (siehe Abb. 11i, i').

Das bedeutet, dass in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen nicht nur die sense, sondern auch die antisense-RNA des dnR2/IRESlacZ-Fusionstranskripts ektopisch unter dem En1-Promotor exprimiert wird. Da die ektopische antisense-RNA die sense-RNA des dnFGF-Rezeptors 2 binden kann, hat diese dnFGF-Rezeptor 2 antisense-Expression vermutlich einen entscheidenden Einfluß auf die Funktionsfähigkeit des dominant negativen Experiments.

Für die Inhibierung der FGF8-Signalkaskade in der En1-Domäne ist es von Bedeutung, dass der dnFGF-Rezeptor 2 in der FGF8-Expressiondomäne exprimiert wird. Um dies zu überprüfen, wurden Schnitte der E9.5 Embryonen auch mit antisense-Proben für FGF8 hybridisiert. Diese Hybridisierungen zeigen, dass das FGF8-Transkript im caudalen Bereich

der ektopischen Expressionsdomäne des FGF-Rezeptors 2 vorhanden ist (siehe Abb. 11a, a', c, c'). Somit wäre eine Inhibierung der FGF-Signalkette in der FGF8-Expressionsdomäne durch die Expression des dnFGF-Rezeptors 2 theoretisch möglich.

En1^{+/dnR2IRESlacZ}



WT

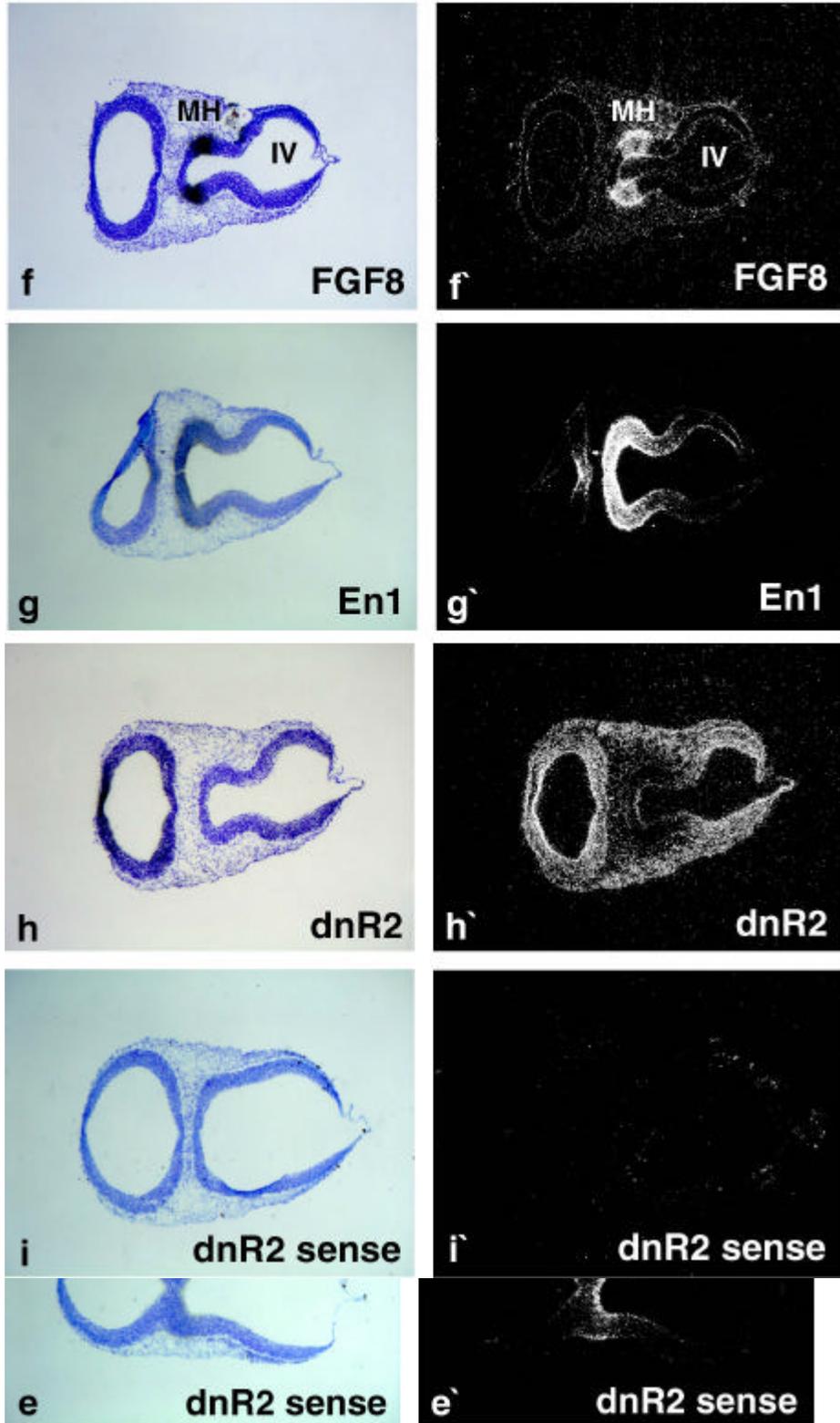


Abbildung 11 zeigt in-situ-Hybridisierungen an horizontalen Gehirnschnitten von E9.5 Mäusen. Die verwendeten in-situ-Proben sind bei den jeweiligen Bildern mit angegeben, es handelt sich in der Regel um antisense-Proben, sense-Proben sind entsprechend bezeichnet. Abb. 11a-e` stammen von $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Embryonen, Abb. Ef-i` von Wildtyp-Embryonen. Der dnFGF-Rezeptor 2 und lacZ sind in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Embryonen in der En1-Domäne ektopisch exprimiert (d, d`, c, c`, b, b`). Zum Vergleich der Wildtyp (h, h`, g, g`). Die sense-Probe des dnFGF-Rezeptors 2 ist ebenfalls ektopisch in der En1-Expressionsregion zu detektieren (e, e`, b, b'). Die Expression von FGF8 (a, a`) überlappt mit der der ektopischen dnFGF-Rezeptor 2-Expression (d, d').

4.1.3.1.3 Detektion der β -Galaktosidase-Aktivität in 12.5 Tage alten Mäusen

Die Translation des lacZ-Gens wurde über die enzymatische Aktivität der β -Galaktosidase in der lacZ-Färbereaktion bestimmt (siehe 3.4.2). Das Translationsprodukt des dnFGF-Rezeptors 2 konnte nicht nachgewiesen werden, da die käuflich erwerbbaeren Antikörper gegen den intrazellulären Bereich des Rezeptors gerichtet sind. Dieser fehlt in dem ektopisch exprimierten dominant negativen Protein (siehe 4.1.1).

Die Färbung von 12.5 Tage alten $En1^{+/dnR2lacZ}$ - und $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Embryonen zeigt β -Galaktosidase Aktivität in der Mittel/Hinterhirnregion und im Neuralrohr (siehe Abb. 12a). Der Vergleich mit den $En1^{+/lacZ}$ - und $En1^{lacZ/lacZ}$ -Mäusen (Hanks et al., 1995) zeigt, dass die $En1^{+/dnR2lacZ}$ - und $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Tiere nur in En1-Expressions-domänen Färbung zeigen (Vergleiche Abb. 12a, b). Der Expressionslevel des β -Galaktosidase Gens in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ - und $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Tieren ist jedoch um einiges geringer. Dieses ist vermutlich der Grund dafür, dass einige Expressionsdomänen, die in den $En1^{+/lacZ}$ - und $En1^{lacZ/lacZ}$ -Mäusen deutlich zu sehen sind, in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ - und $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Tieren nicht zu erkennen sind (Vorderhirn, Somiten, Unterseite der Extremitäten).



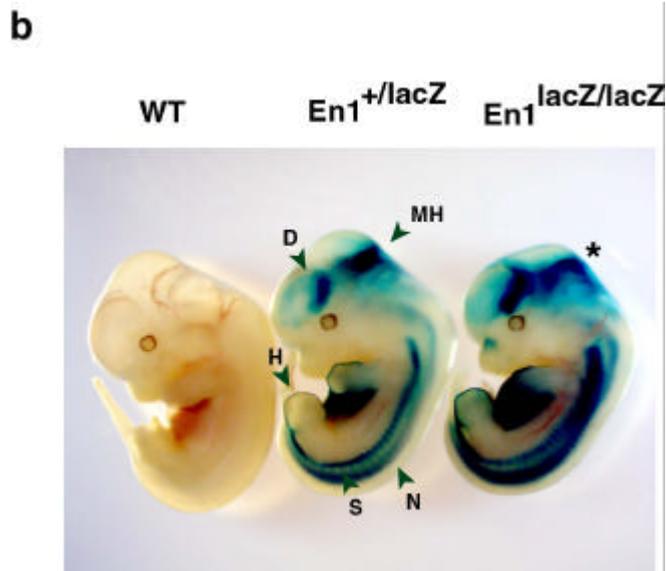


Abbildung 12 zeigt die lacZ-Färbung von 12.5 Tage alten Mausembryonen. In Abb. 12a sind Wildtyp-, $En1^{+/dnR2lacZ}$ - und $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Tiere zu sehen (Die Beschriftung R2lacZ entspricht dnR2lacZ im Text). Die Tiere in 12b sind $En1^{+/lacZ}$ - und $En1^{lacZ/lacZ}$ -Mäuse (Hanks et al., 1995). Der Stern markiert die nicht mehr klar zu erkennende Mittelhirn /Hinterhirngrenze in den homozygoten Tieren. D: Diencephalon, H: Hinterextremität, MH: Mittelhirn/Hinterhirngrenze, N: Neuralrohr, S: Somiten

4.1.3.2 In- situ-Hybridisierung an 9.5 Tage alten Embryonen

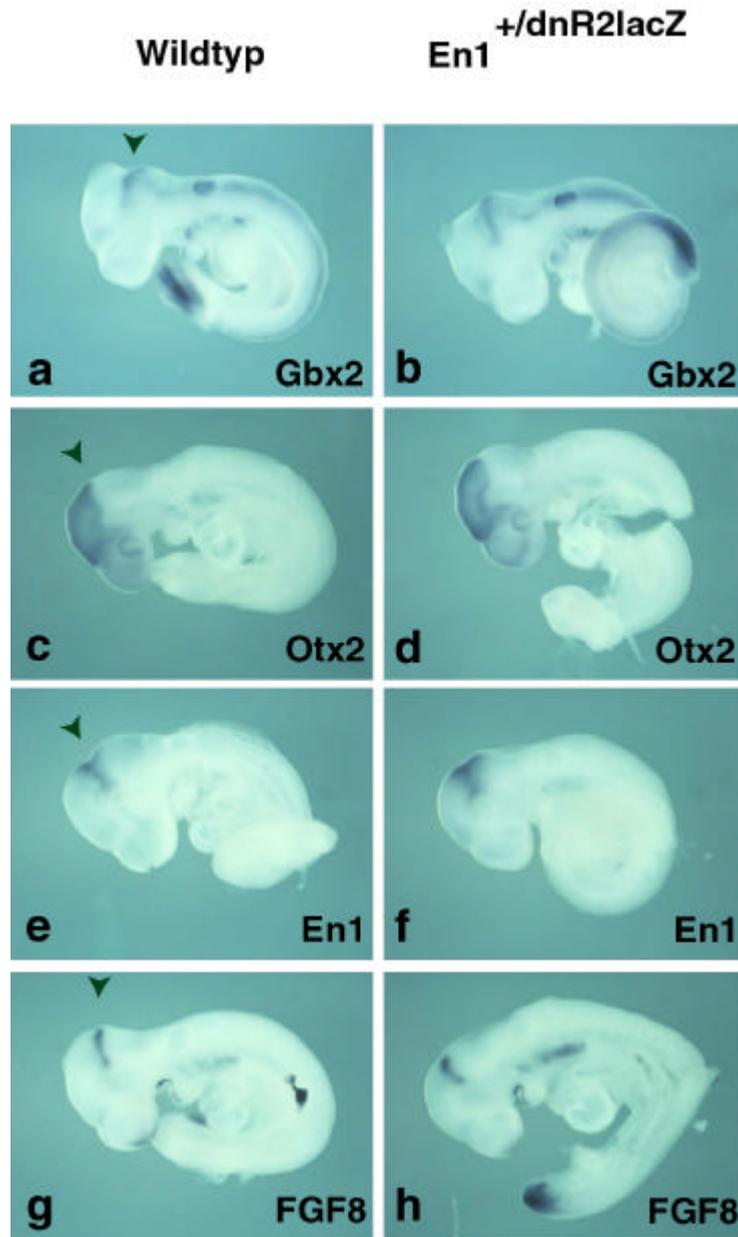
Unter 2.1.3.1/2 wurde gezeigt, dass das dnR2/IRESlacZ-Konstrukt in $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren transkribiert und die β -Galaktosidase auch translatiert wird. Wie bereits erwähnt, zeigen die $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere keinen offensichtlichen Phänotyp, homozygote Tiere zeigen den $En1^{-/-}$ -Phänotyp.

Um mögliche subtile Veränderungen während der Etablierung und des Erhalts der Mittelhirn/Hinterhirnregion in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen zu untersuchen, wurden an ganzen Embryonen in-situ-Hybridisierungen mit einigen der Standardmarkergene für diese Region durchgeführt.

Hierzu zählen zum einen die Transkriptionsfaktoren Otx2, Gbx2, En1 und Pax2, zum anderen Signalmoleküle wie Wnt1 und FGF8 (siehe 2.5.1).

Gbx2 ist im Nervensystem caudal der Mittelhirn/Hinterhirnregion exprimiert (Abb. 13a), im Gegensatz zu Otx2, welches rostral dieser Grenze zu finden ist (Abb. 13c). En1, FGF8, Pax2 und Wnt1 sind an der Grenze zwischen Mittelhirn und Hinterhirn mit unterschiedlicher Ausdehnung exprimiert. Die Expression des En1-Gens ist im grenznahen Bereich sowohl im Mittel- als auch im Hinterhirn zu sehen (Abb. 13e). FGF8 und Pax2 sind nur im rostralen Hinterhirn zu finden (Abb. 13g, i), während Wnt1 nur im caudalen Mittelhirn zu erkennen ist (Abb. 13l)

Für alle sechs Proben konnten keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen WT und $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren in Bezug auf die Lokalisierung der Mittelhirn/Hinterhirngrenze beobachtet werden (siehe Abb. 13a-m).



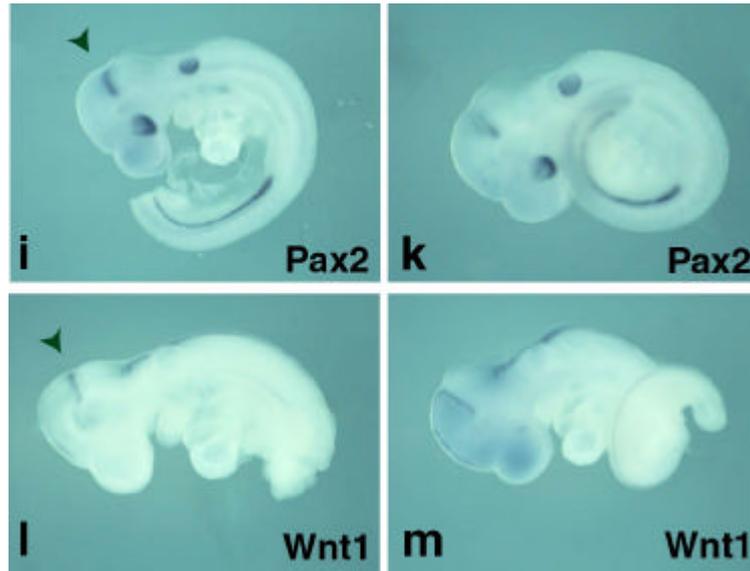


Abbildung 13 zeigt in-situ-Hybridisierungen an 9.5 Tage alten Wildtyp- und $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mausembryonen mit verschiedenen RNA-Proben (siehe Beschriftung). Die Expression in den Wildtyp-Tieren entspricht der in den heterozygoten Tieren. Der Pfeil deutet auf die Mittelhirn/Hinterhirngrenze der Embryonen.

4.1.3.3 Färbung und Immunhistochemie an adulten Mausgehirnen

Die Analyse der Expression der Musterbildungsgene am Tag 9.5 der Entwicklung zeigte keinen Unterschied zwischen den Wildtyp- und den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen (siehe 4.1.3.2). Um mögliche subtile Veränderungen von Gehirnregionen, welche aus der MH-Region differenzieren, auszuschließen, wurde die Struktur der Gehirne adulter $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse untersucht. Mäuse, bei denen zu einem frühen Stadium einzelne Musterbildungsgene im MH-Bereich modifiziert sind, zeigen Mißbildungen im inferioren Collikulum und dem Cerebellum (McMahon et al., 1992; Wurst, Auerbach et al., 1994; Broccoli et al., 1999; Millet, K. et al., 1999 etc.).

Für eine makroskopische Untersuchung der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse wurden Färbungen mit Kresylviolett und für mikroskopische Studien immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt.

Zur Kontrolle der anterior-posterioren Organisation der Gehirne der heterozygoten Tiere wurde eine Kresylviolett-Färbung an sagittalen Gehirnschnitten durchgeführt.

Diese Nisslfärbungen von Wildtyp- und $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren erbrachten keinen Unterschied in Bezug auf die Organisation der Gehirne der beiden Gruppen.

Die einzelnen Gehirnregionen wie der olfaktorische Bulbus, der Cortex, der Hippocampus sowie superiorer und inferiorer Colliculus und das Cerebellum sind vorhanden und zeigen keine auffälligen Veränderungen (siehe Abb. 14a, b).

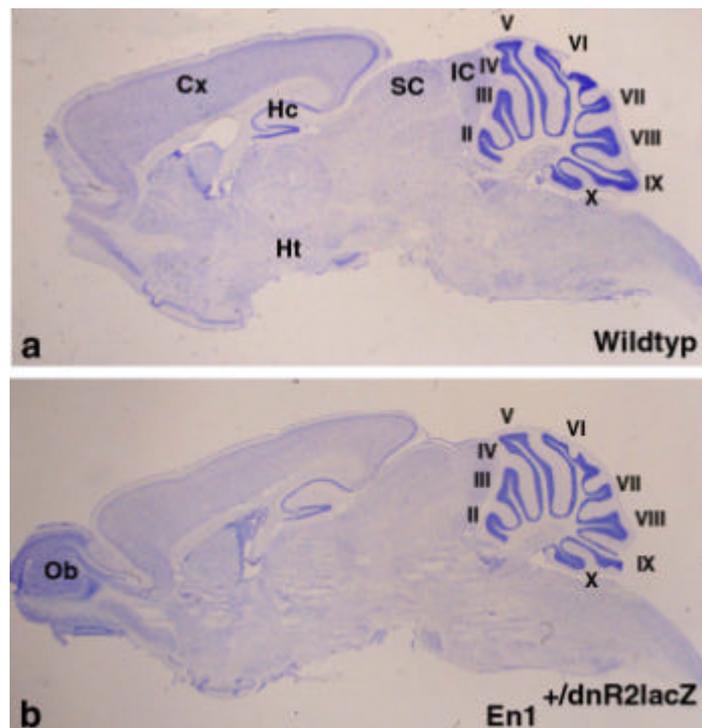


Abbildung 14 zeigt die Kresylviolett-Färbung sagittaler Gehirnschnitte von Wildtyp- bzw. $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen. Der Olfaktorische Bulbus in Abb. 14a fehlt aufgrund eines Präparationsartefaktes. Die Organisation der Gehirnregionen ist in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen unverändert. Cx: Cortex, Hc: Hippocampus, Ht: Hypothalamus, IC: inferiorer Colliculus, SC: superiorer Colliculus, II-X: Äste des Cerebellums

Um die mikroskopische Anatomie der Gehirne der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere im rostralen Bereich der $En1$ -Expressionsdomäne genauer zu analysieren, wurden coronale Gehirnschnitte angefertigt. Diese wurden mit Hilfe der Antikörper gegen die Calcium-bindenden Proteine Calbindin und Calretinin und gegen die Tyrosin-Hydroxylase (TH) auf das Vorhandensein charakteristischer Merkmale hin analysiert. Die TH-positiven, dopaminergen Neurone haben während der Entwicklung ihren Ursprung in der ventralen $En1$ -Expressionsdomäne im Mittelhirn und könnten daher in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren beeinträchtigt sein (Hynes und Rosenthal, 1999).

Die Anti-Calbindin-Färbung (Abb. 15a, b), wie auch die Calretinin-Färbung (Abb. 15c, d) zeigen keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp- und den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren. Die TH-Färbung macht deutlich, dass die dopaminergen Neurone in der ventralen, tegmentalen Region der heterozygoten und der Wildtyp-Tiere keine Veränderungen zeigen und durch die Expression des dnFGF-Rezeptors 2 in der $En1$ -Domäne im Rahmen ihrer Differenzierung nicht beeinflusst worden sind (Abb. 15e, f).

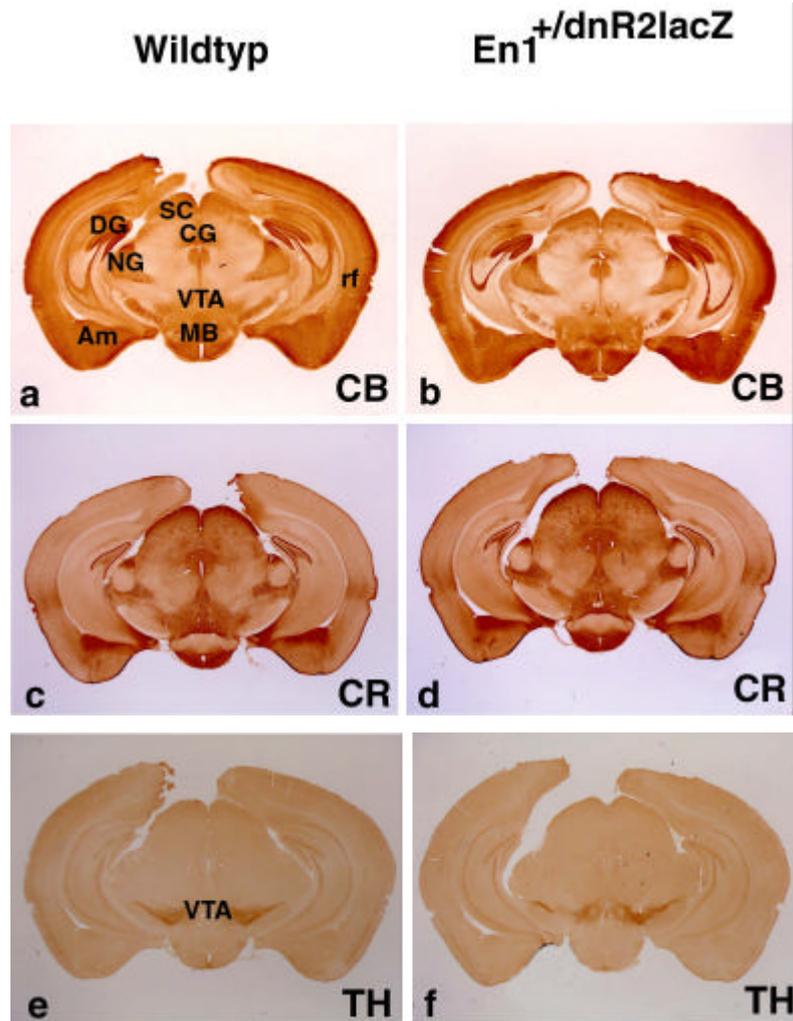


Abbildung 15 zeigt coronale Gehirnschnitte von Wildtyp- und $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen. Die Schnitte sind immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Calbindin (Abb. 15a,b), Calretinin (Abb. 15c, d) und die Tyrosin Hydroxylase (Abb. 15e, f) gefärbt. Die Struktur des Gehirns zeigt für Wildtyp- und $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse keinen Unterschied in Bezug auf die Organisation bestimmter Domänen. Am: Amygdala, ZG: zentrales Grau, DG: Gyrus dentatus, MB: Mamillarkörper, NG: Nukleus geniculatus, VTA: ventrale tegmentale Region

Um mögliche subtile Veränderungen in den Gehirnbereichen, welche aus der MH-Region hervorgehen, aufzuspüren, wurde das Cerebellum strukturell und in Bezug auf die verschiedenen Zelltypen genauer untersucht. Hierfür wurden Kresylviolett- sowie Calbindin- und Calretinin-Färbungen verwendet.

Die totale Ansicht des Cerebellum der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse weist keine Veränderungen auf, die Hemisphären und die zentrale Vermis sind deutlich voneinander abgesetzt und entsprechen der Wildtyp-Aufteilung (nicht gezeigt).

Abb. 16 zeigt das Ergebnis dieser Färbungen an Sagittalschnitten der Cerebelli (siehe Abb. 16a-f). Die zehn Äste des Cerebellums sind bei den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen ebenso strukturiert, wie bei den Wildtyp-Tieren. Auch die Dicke der drei Zellschichten scheint unverändert.

Eine genauere Betrachtung der Zellschichten zeigt Abb. 17. Die Kresylviolett-Färbung in Abb. 17a und b macht die Zellen der molekularen und der granulären Schicht, sowie die Purkinje-Zellen sichtbar. Calbindin färbt die Purkinje-Zellen (Abb. 17c und d), Caretinin färbt die Zellen der granulären Schicht (Abb. 17e und f).

Alle drei Färbungen zeigen keinen Unterschied in Bezug auf die Strukturierung und Dicke der Zellschichten des Cerebellums.

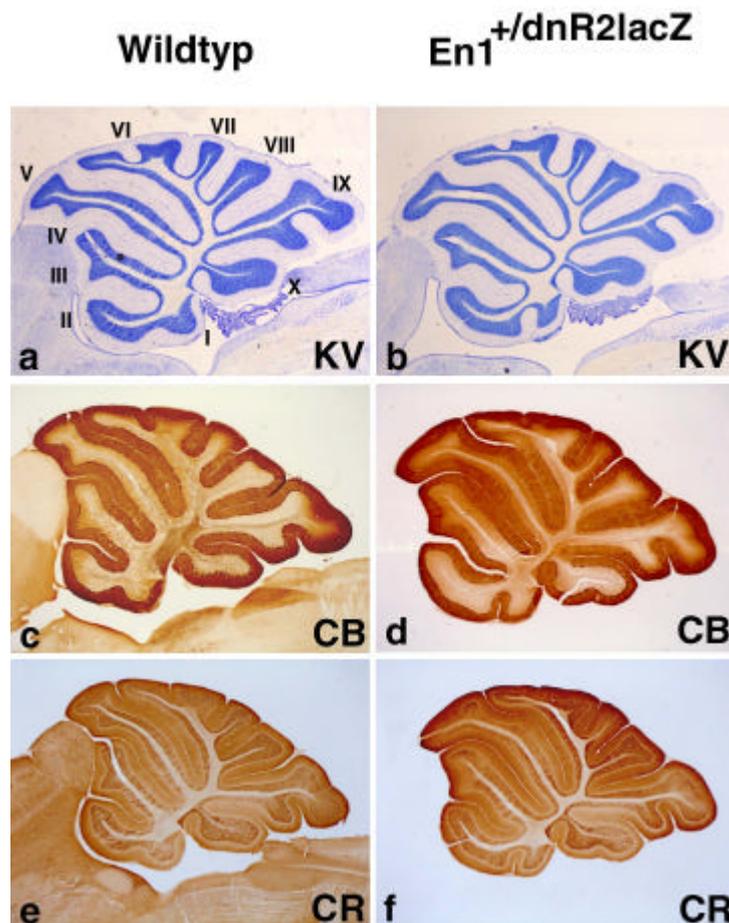


Abbildung 16 präsentiert Färbungen an sagitalen Schnitten der Cerebelli von Wildtyp- und $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen. Abb. 16a und b zeigen Kresylviolett-Färbungen, Abb. 16c und d zeigen Calbindin-Färbungen, Abb. 16e und f schließlich zeigen Calretinin-Färbungen. Das Cerebellum der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus und der Wildtyp-Kontrolle ist gleich strukturiert.

Die Zahlen I-X beziffern die zehn Äste des Cerebellums.

Wildtyp $En1^{+/dnR2lacZ}$

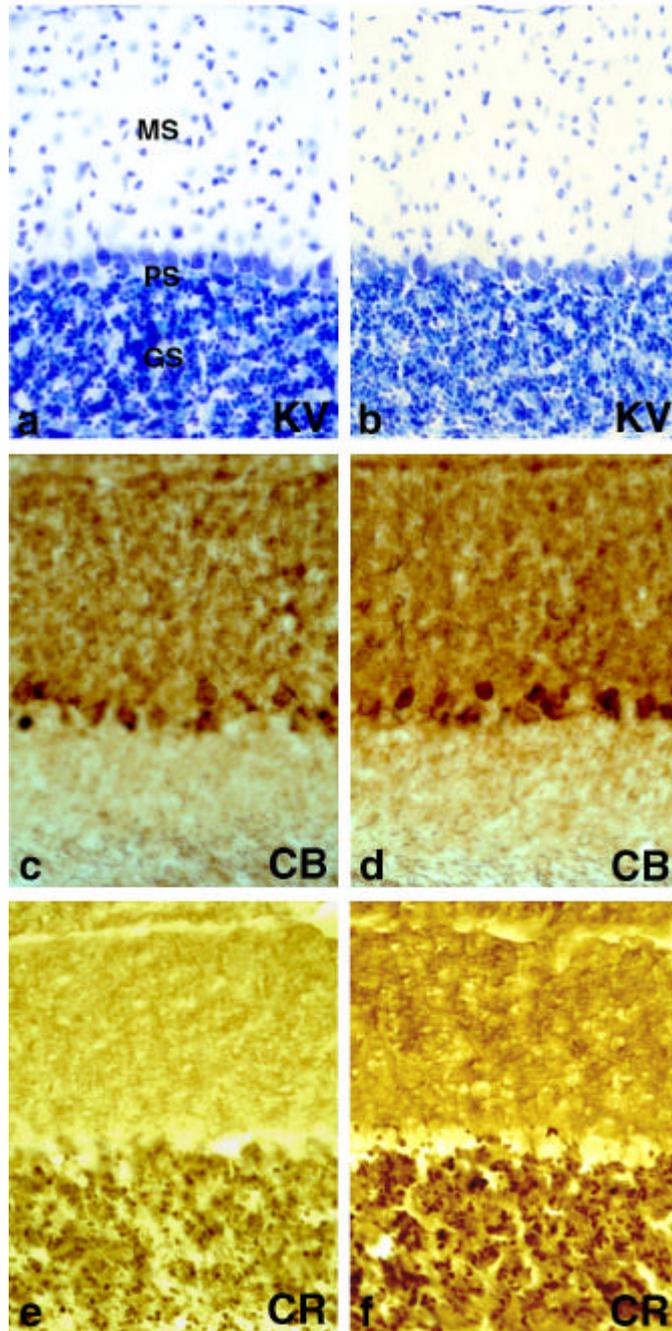


Abbildung 17 zeigt die drei Schichten der Cerebelli von Wildtyp- und $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen. Abb. 17a und b zeigen Kresylviolett-Färbungen, Abb. 17c und d zeigen Calbindin-Färbungen, Abb. 17e und f zeigen Calretinin-Färbungen. Die Dicke der drei Zellschichten des Cerebellums ist bei beiden Tiergruppen gleich.

GS: granuläre Schicht, MS: molekulare Schicht, PS: Purkinje Zellschicht

Die Analyse der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse zeigt zunächst die ektopische Expression des $dnR2/IRESlacZ$ -Fusionstranskripts in der $En1$ -Domäne.

Allerdings wurden sowohl die sense- als auch die antisense-RNA des Transkripts detektiert. Die Translation zumindest der $lacZ$ -cDNA konnte in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäusen gezeigt werden. Die Intensität der β -Galaktosidase-Färbung ist jedoch um einiges geringer als die der $En1^{+/lacZ}$ -Mäuse (siehe 4.1.3.1).

Die Untersuchung der Tiere, sowohl zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung (E9.5), als auch im adulten Stadium zeigte keinen Phänotyp derselben.

Sowohl frühe Musterbildungsvorgänge im Bereich der Mittelhirn/Hinterhirnregion (siehe 4.1.3.2) als auch spätere Determinierungsvorgänge im Gehirn (siehe 4.1.3.3) scheinen durch die ektopische Expression des $dnFGFR2$ -Transkripts in der $En1$ -Domäne in diesen Tieren nicht beeinflusst oder gar inhibiert zu werden.

Verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diese Beobachtung werden im Diskussionsteil im Detail besprochen.

4.2 Identifizierung und Analyse des Mausgens *mbFZb*

4.2.1 Genfallen-Experiment mit Fibroblasten Wachstumsfaktor 2

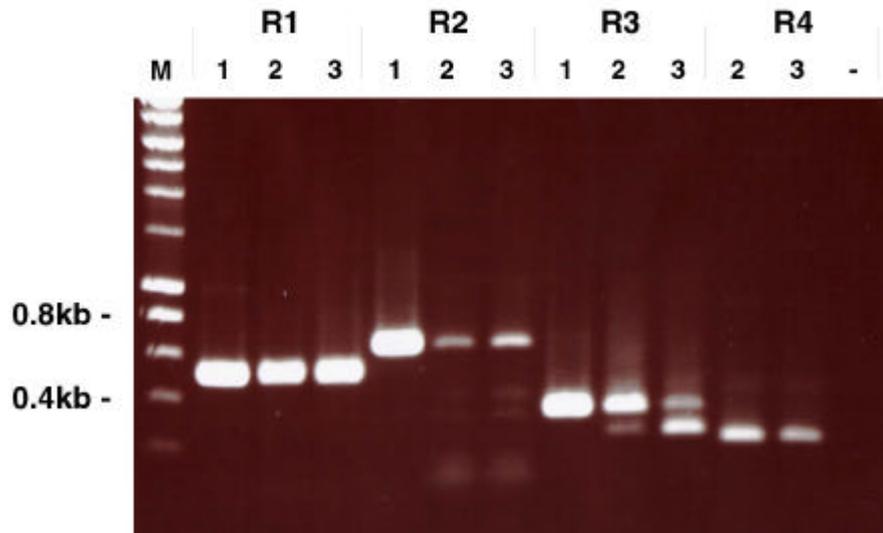
4.2.1.1 Expression der FGF-Rezeptoren 1-4 in embryonalen Stammzellen

Die Voraussetzung für ein erfolgreiches Genfallen-Experiment mit Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (FGF2, bFGF) in embryonalen Stammzellen ist die Anwesenheit der FGF-Rezeptoren in der Zellmembran der embryonalen Stammzellen (siehe Einleitung).

Um die Transkription dieser Rezeptoren nachzuweisen, wurde RT-PCR an ES-Zellen für alle vier FGF-Rezeptoren mit spezifischen Primern durchgeführt (siehe 3.6.3; Anlagerungstemperatur 57°C , 35 Zyklen). Die erwarteten Fragmentlängen betragen 512bp für den FGF-Rezeptor 1, 660bp für den FGF-Rezeptor 2, 339bp für den FGF-Rezeptor 3 und 217bp für den FGF-Rezeptor 4.

Das Ergebnis der RT-PCR zeigt die Expression aller vier FGF-Rezeptoren in den getesteten embryonalen Stammzellen R1 (Nagy et al., 1993).

a



b

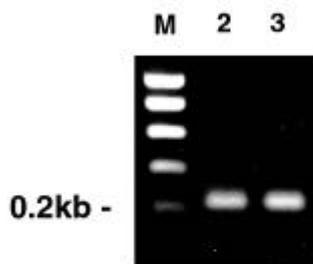


Abbildung 18a zeigt das Ergebnis der RT-PCR mit ES-Zell-cDNA für die FGF-Rezeptoren 1-4. **Abb. 18b** zeigt die β -Actin Kontroll-PCR. In der mit 1 bezeichneten Spur wurde die entsprechende Plasmidpositivkontrolle als DNA-Vorlage verwendet. In der mit 2 bezeichneten Spur wurde DNA aus Wildtyp- ES-Zellen, in der mit 3 bezeichneten Spur wurde DNA des Klons 16.46 (siehe 4.2.1.2) als Vorlage verwendet. Die letzte Spur (-) stellt die Wassernegativkontrolle dar. Beide ES-Zell-Fractionen zeigen die Expression aller vier FGF-Rezeptoren.

4.2.1.2 Identifizierung des mutierten Klons 16.46 im Genfallen-Experiment

Nachdem das Vorhandensein der FGF-Rezeptoren 1-4 in den ES-Zellen gezeigt war (siehe 4.2.1.1) wurde das Genfallen-Experiment mit FGF2 durchgeführt. Es wurden R1-ES-Zellen (Nagy et al., 1993) verwendet.

Entsprechend dem Schema in Abb. 19a wurden 1×10^8 ES-Zellen mit dem Genfallenvektor PT1-ATG (siehe 3.7.1) elektroporiert und auf 12 Gelatine-Platten ausplattiert. Nach der Selektion mit G418 wuchsen pro Platte zwischen 200 und 300 resistente Klone hoch. Von diesen Klonen wurde ein Filterabklatsch gemacht, welcher für 48 Std. mit 20ng/ml FGF2 im entsprechendem Medium inkubiert wurde.

Die nachfolgende lacZ-Färbung des bewachsenen Filters erbrachte pro Platte im Durchschnitt 3-4 ES-Zell-Klone, die eine Blaufärbung zeigten. In Abb. 20 ist der Ausschnitt eines Filters nach der lacZ-Färbung zu sehen, zwei der Klone zeigen eine Blaufärbung (umrandet) die anderen Klone (Pfeile) zeigen keine Färbung.

Die den gefärbten Klonen entsprechenden ES-Zell-Kolonien wurden von der Originalplatte gepickt, expandiert und erneut ohne und mit FGF2 im Medium inkubiert. Sechs dieser Klone zeigten eine eindeutige Veränderung der lacZ-Expression mit und ohne FGF2. Vier von ihnen zeigten eine Verstärkung der lacZ-Expression, der Klon 16.46 eine Verringerung derselben (siehe Abb. 21).

Da dieser Klon 16.46 in den nachfolgenden Testreihen die am besten reproduzierbaren Ergebnisse in Bezug auf die Färbung erbrachte, wurde dieser ES-Zell-Klon genauer analysiert.

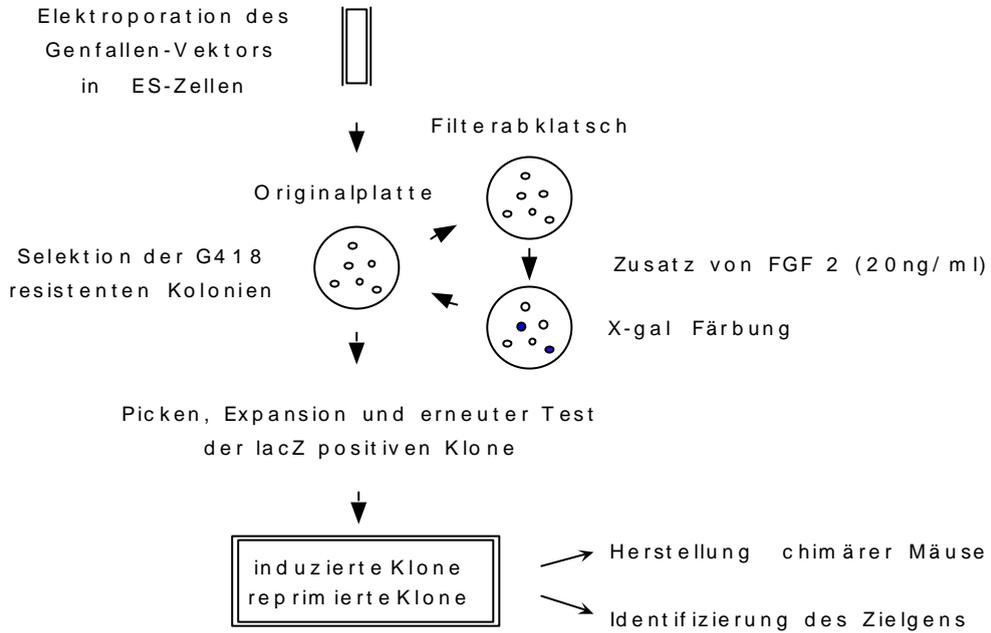
Die Abbildung 19b macht die Vorgänge in einer Zelle deutlich, welche mit dem Genfallenvektor PT1ATG elektroporiert wurde. Der Vektor integriert in den Lokus eines Gens. Bei der Integration des Vektors in das Intron des Gens kommt es im Rahmen der Transkription zur Bildung eines Fusionstranskripts zwischen dem vorangegangenen Exon des betroffenen Gens und dem Genfallenvektor. Neomycin wird unabhängig davon transkribiert. Die Translation führt zur Bildung eines Fusionsproteins zwischen dem mutierten Gen und der β -Galaktosidase und der neo-Phosphotransferase (G418-Resistenz!). Eine ES-Zelle, bei der ein aktives Gen den Genfallenvektor integriert hat, ist resistent gegen G418 und zeigt eine Blaufärbung.

Der Zusatz von FGF2 führte, wie schon erwähnt zur Verringerung der β -Galaktosidase-Färbung in dem Klon 16.46. Aus dieser Beobachtung läßt sich eine mögliche Regulation des in diesem Klon mutierten Gens durch FGF2 ableiten.

Für eine genaue Charakterisierung wurde das mutierte Gen isoliert. Aus den mutierten ES-Zellen des Klons 16.46 wurden Mäuse hergestellt, um zum einen mit Hilfe des lacZ-Reporter-Gens die Expression des mutierten Gens während der Entwicklung zu studieren, und zum anderen, einen durch die Integration des Genfallenvektors hervorgerufenen Phänotyp zu studieren.

a

Schema des Genfallen-Experiments



b

Mutagenese durch Vektor-Integration

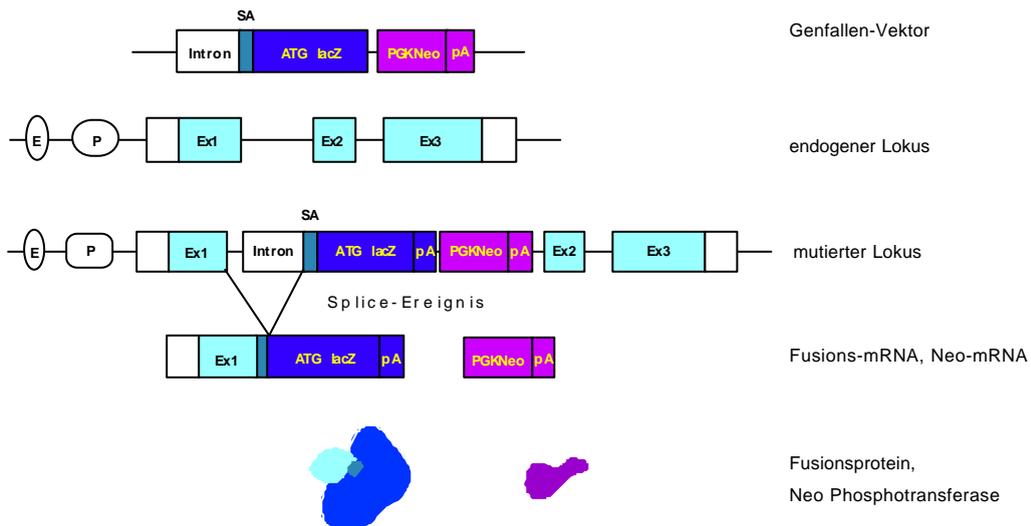


Abbildung 19a zeigt das Schema des Genfallen-Experiments, Abb. 19b die Vorgänge auf DNA-Ebene. Beschreibung der Vorgänge siehe Text.



Abbildung 20 zeigt den Teil eines Filters, an dem eine lacZ-Färbung durchgeführt wurde. Die blau-gefärbten ES-Zell-Klon sind umrandet, zwei der nicht gefärbten Klone sind durch Pfeile markiert.

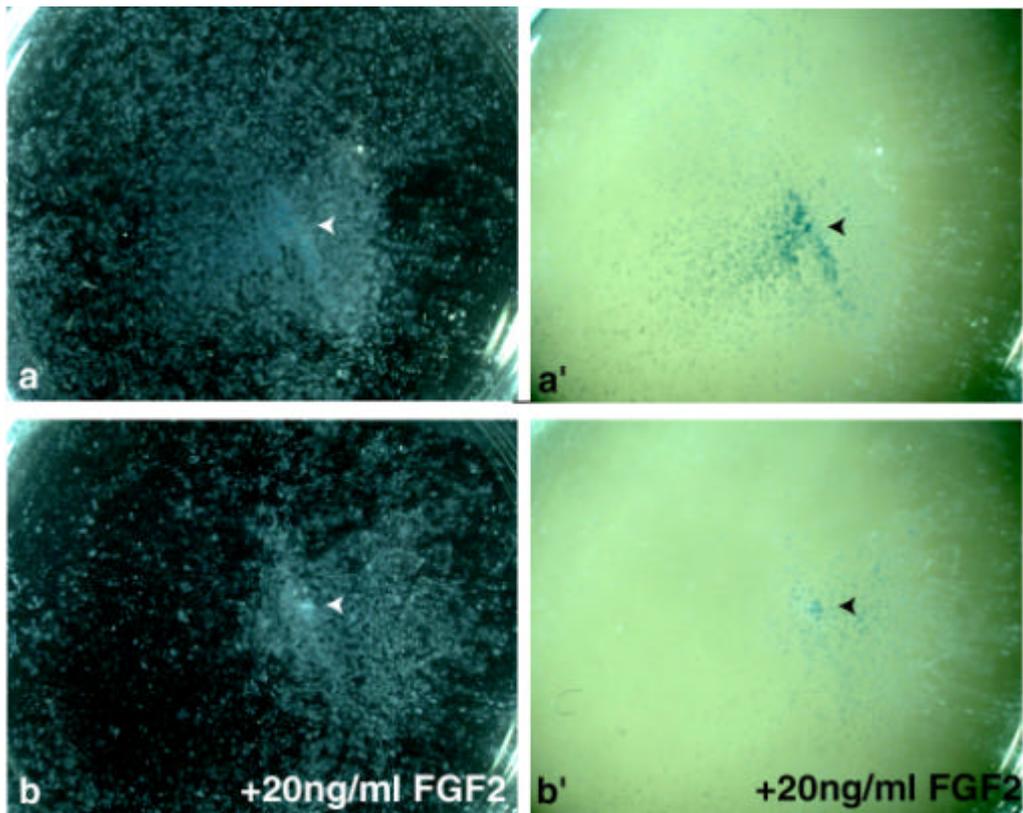


Abbildung 21 zeigt ES-Zellen des Klons 16.46, ohne und mit Zusatz von 20ng/ml FGF2 im Medium für 48hrs. An den Zellen wurde eine lacZ-Färbung durchgeführt. Abb. 21a und b sind Aufnahmen im Dunkelfeld, welche die Zelldichte aufzeigen. Die Aufnahmen im Hellfeld (a' und b') zeigen die lacZ gefärbten Zellen. Der Pfeil deutet auf die differenzierten Zellen, welche nach der Zugabe von FGF2 eine Verringerung der lacZ-Färbung zeigen.

4.2.2 Isolierung und Analyse der Sequenz des mutierten Gens

Im Genfallen-Experiment konnte gezeigt werden, dass die Blaufärbung des Klons 16.46 nach der Zugabe von FGF2 in das Medium reduziert war.

Zur Analyse der Sequenz des mutierten Gens wurde zunächst eine 5' RACE durchgeführt. Die erhaltene Sequenz wurde zur Hybridisierung einer Phagenlibrary verwendet. Die cDNA-Inserts der positiven Phagen wurde sequenziert und die Sequenz mit erneuter 5' bzw 3' RACE von der ersten Racesequenz ausgehend bestätigt.

4.2.2.1 5' RACE an cDNA aus Neuralrohr

Die 5' Race wurde zunächst an cDNA durchgeführt, welcher als Vorlage für die RT-Reaktion RNA des ES-Zell Klons 16.46 diente.

Dieser Ansatz führte trotz mehrfacher Wiederholung nicht zum Erfolg. Die gewonnene Sequenz repräsentierte wiederholt die Sequenz der Neomycin-Kassette des Genfallen-Vektors PT1ATG (siehe 3.7.1), welcher zweifach in den mutierten Locus integriert ist (siehe 4.2.4).

Deshalb wurde nach einer ersten Analyse des Expressionsmusters des Gens in der Maus (siehe 4.2.5) RNA aus dem Neuralrohr 11.5 Tage alter Embryonen gewonnen und die 5' RACE mit dieser wiederholt.

Die RT-Reaktion wurde mit lacZ spezifischen Primern durchgeführt (RT-Reaktion, siehe 3.6.2). Die nachfolgenden PCR-Schritte wurden mit den sense Primern des Gibco-Kits und lacZ bzw. En2-Exon2 spezifischen antisense Primern durchgeführt (PCR1, PCR2, siehe 3.6.2). Nach der zweiten PCR-Reaktion wurden die erhaltenen DNA-Fragmente subkloniert, mit einer Splice-Acceptor -Probe (Positivkontrolle) und einer Neo-Probe (Negativkontrolle) hybridisiert und sequenziert. Die Sequenzierung ergab ein DNA-Fragment mit einer Länge von 490bp 5' der Splice-Acceptor -Stelle des Vektors PT1ATG (siehe Abb. 22).

Mit Hilfe einer erneuten 5' RACE, bei welcher Primer innerhalb der vorher gewonnenen Sequenz verwendet wurden (Primer nicht gezeigt), konnten noch weitere 60bp in 5' Richtung identifiziert werden.

Die im Rahmen der beiden 5' RACE-Reaktionen gewonnene Sequenz (5' der internen Splice-Stelle) ist in Abb. 22 schematisch in der Fusion mit dem Vektor PT1ATG gezeigt. In Abb. 23c ist diese Sequenz durch Fettdruck markiert. Die Farbe der sich entsprechenden Sequenzen in Abb. 22 und 23 ist gleich.

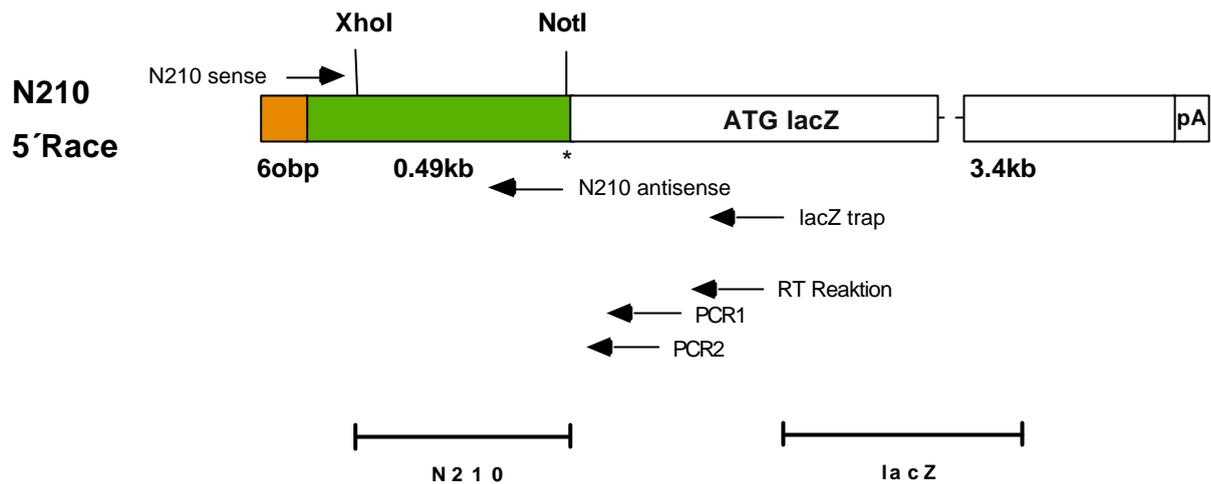


Abbildung 22 zeigt das Schema der mit Hilfe der 5' RACE gewonnenen Sequenz des Klon 16.46 in der Fusion mit dem Genfallenvektor PT1ATG. Die aus der 5' RACE stammende Sequenz N210 umfaßt 550bp und beinhaltet eine Schnittstelle für XhoI und NotI. Die farbigen Bereiche der DNA entsprechen denen in Abb. 23. Die Splice-Stelle ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenzen der Primer sind unter 3.6.4 beschrieben. Die für die Hybridisierungen verwendeten Sonden N210 und lacZ sind als Balken dargestellt.

4.2.2.2 Screen der Phagenlibrary aus D3 ES-Zellen

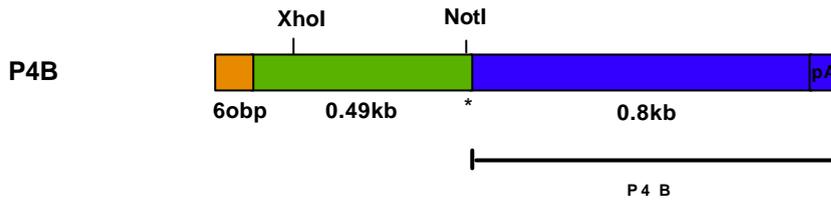
Das mit Hilfe der 5' RACE identifizierte DNA Fragment des mutierten Gens (siehe 4.2.2.1) wurde als Sonde für die Hybridisierung einer D3-ES-Zell Library (129/Sv) verwendet. Diese Library wurde von Dr. D. Hill zur Verfügung gestellt.

Es wurden 10 positive Plaques gefunden, die nach der Subklonierung aufgrund von Verdaus mit verschiedenen Restriktionsenzymen in zwei Gruppen (P4B und P7B, siehe Abb. E23a und b) unterteilt werden konnten. Mehrere Mitglieder jeder Gruppe wurden sequenziert und die Sequenzen auf Übereinstimmungen hin geprüft.

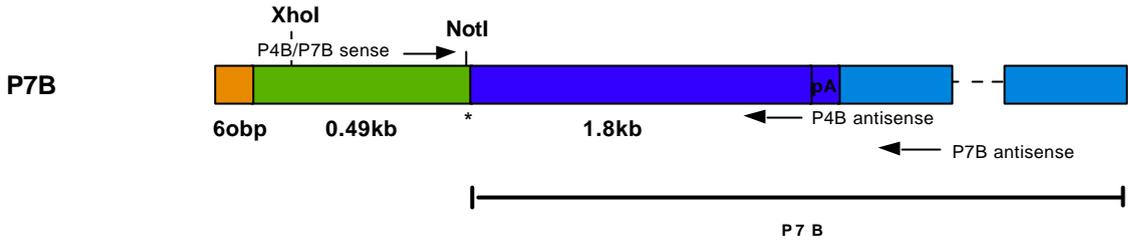
Die DNA-Fragmente der beiden Gruppen beinhalten einen konservierten Bereich, wobei der Klon P7B den Klon P4B in 3' Richtung um 1kb überragt. Der Klon P7B stellt vermutlich eine Splicevariante des Gens dar, welche einen um 1kb längeren 3' UTR beinhaltet.

Das Vorhandensein dieser zwei Spliceformen konnte sowohl mit RT-PCR (siehe 4.2.3.1) als auch mit einer Northern-Hybridisierung (siehe 4.2.3.2) gezeigt werden.

a



b



c

TTTGTGGAGGAA CATGGCGGCA CGAGGTTGCTGGTGCAGATCCTTAGGAACCAGACTACCA TCTCTCA GTGGGTCCAG
 TATGCAGCCAA CTGGTATCAGTGTCTCCTACCCAAAGACAGTGGAGCAGCAC TTCCAGTGGCTCCAGAAAGAA TCAGTCT
 TCGAGTGTGTTTGGGATCAGAACAGACTGTGTGGAGCGGACACAGCGCAGAGTAGGAAATA CCA CAA CACAAGTAAGCTT
 *
 CTTACTACCCAAGATTTCCACAGCCTGTGTGAAGAGAAGGTCGGTCC TTCA CGAAGATA ATAGAAGCCATGGGATTCA
 CTGGACCTTTGAAA TACAGTAAATGGAAGATCAAGA TCGCGCCCTCCGCATGTACACGAGCTGCGTGGAGAAGACTGA
 CTTTCGAGGAGTTC TTTC TGAGGTGTCAGATGCCCT ATACATTCAACTCC TGGT TTCTCATAA CCC TGCTTCA TG TCTGG
ATGTGTCTAGTTCGAAT GAAGCAGGAAGGCCGACTGGGAAGTACA TGTGC CGGATCA TAGTTCAATTTCA TGTGGGAAG
 ATGTGGAGCAGCGCGGCCGCTCATGGGGTTAA TTCCCTATATCCCTAAGAAAGAA CATGGCCCTCATGACGAACAATTT
 CTA TGCAGCAA TCTTGGGATA CGATGAGGGATCCTTTCAGATGAC CATGGCCTGGCTGCTGCTCTGGAGGACCTTC
 TTCAAACGAAA TGTGAGGACCTCGACAGCTTGAA TTGCTGGTGGAGTATGTGAGG aAACAGATGCAA TACTGGA CT
 CCA TGAA CCGTGAAGGATCTGCTGCTGACAGGGGAAGTGAGATGGCGCCCTCTGGTGGAGAAGAA TC CAAAAGCA TCTT
 +
 GAAGCCCA TGCTCTACTTACAA TGA TGA GGGCCTTTGAGAGACTGCTCCCTCGGACAGCTGGCTGGCTGGCTTTGA
 GGA CCCTCCATGGAAGAA GTGCCTGTTTGGCCCAAGGACCTGAAAGAA GGTGGCCTGAA CTGACTTGTGAACA G TACCTG
 TTGAAATCTCAGCCACTCGTGTGATTTCTTCTCTGATCTGGTGGGTTACTGGGAGGTCCTCTTGTCTTCTG
 ACAGGTCCCTCCCTCAAGAGAAGCCCCAGGCA CACTTCCAAAGTCCCTCAGCACACACGTGACTGAGAGCTTTTTC
 CGAAGCTGAGGAAGGATGGTGGTGAAGAGGGGGTGCCTTCACTCAGAGACCCCTGTGCTTGGAGCAGTTTATTAAG
 TTCCAAAGTCA CAGTGGGCAA CTA TATACCGTCCCTCTGTGAGCCA TGGGGTTGAAGTAGCCA TTAAA AAGAGAGA
 CTTATTCTGCCA TGGT TTTCTTTGTTCCAGGTC TTTTAGAAA CATA GTTAAAGC CCA GTGTAGTGGTGA TGTCTT
 TAGTCCAAGTA TTTGGAGGCAGAGGCAGATGACTCTAGCTA GGTCTTAGTTCAGCATGATCTACAGAGTGAA TTTTCAG
 GGCAGC CAAAAGCTACACAGAGAAAGCCTGTCTTGAAAAA CAAAGAGAAAAGAAAAGCGCAGGTGAGGCCGTGGGTCTC
 CAAGCTCAGGGAA TAACTGCACTCA GTTAGAGGCAGCA CGGAGAGGAGCGG agaggagaggA GAGGAGAGGAGGCCAG
 GGGCTCTCTGCTGCTACTCTCTGTCCTCAGGTCACAGAGAGGAGTCA CTGTCTGGGCAAGGTACAGTCTGCCAGGCA CGT
 TCACTGAGATC CAGGAGTCTCAGGACCAAGGGCTTTGCA CACTCTAAGTCA TTTAGAAAGAA CAA AAGTCCCTTTGT
 CACCCACAGTGAAC TGGGGAAGGAACA CACTCTCCGCACTTGGCCTCTCTTTACGTGAGATA CTGTGCGGTGCTGGTAC
 CATCCAA GCCTCGGCTCGGTGTCTPATC CCTCCCAAAGTTCTAAAGCA CGGGCTGTGATGGGAACTTGAGGGCCCTTTT
 CTC TCTGGGCACTTGAAGGGTCTGTCTCTCTCCCCGAGACTTTGGGTCA TCTCTTGGAAAGGTTTCTGAAAT TGAGG
 AAAGGGGGTGGGCCGCTCTCTCTCCCTCCCTCCCAAGCTTCCCTTCA TTGA ACTTGCTATAAAA TGAGTCA TAT
 GAA GA AACCTTATA CTGTGAGGTA TGCGCACTCTGTGAAA ACATTA CAAA TCAAGCCGCTTCTCAGTTTA TTTAAG
 ATGCTTTTGTGCA AGCGGGCTCTGGAGTGAGGCGTCTCTGTGAGCATGAGATAA TAGCACTTGTAACTCAT TACA
 TCTGGGCACTATTTACATAAA CCAAGGCGAGCCAGGCA GGGATTTGCTGATTAATTTATTTTAA TGGACTGAAGTAT
 GCCATGCA CAAAA TAAA CTTTACCTCTGTGCC

Abbildung 23a und b zeigen schematisch die beiden Sequenzen P4B und P7B aus dem ES-Zell-Library Screen. Die 0.55kb 5' und die 0.8kb 3' der Splice-Stelle sind in beiden Sequenzen identisch und stimmen mit der Sequenz der 5' RACE (siehe Abb. 22) überein, Klon P7B schließt im 3' Bereich weitere 1kb mit ein. Die Längen der DNA-Fragmente sind unter den Fragmenten angegeben.

Die Splice-Stelle ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die Hybridisierungssonden P4B und P7B sind als Balken gekennzeichnet.

In Abbildung 23c ist die Sequenz des Klons P7B dargestellt. Die Sequenz der 5' RACE ist in gelber bzw. grüner Farbe dargestellt. Der vermeintliche Translationsstart ist durch einen Stern gekennzeichnet, der vermeintliche Transkriptionsstop durch ein Kreuz. Das Polyadenylierungssignal ist dunkel hinterlegt. Die für die mögliche Transmembrandomäne codierende Sequenz ist durch einen Kasten markiert. Die farbigen Bereiche in a, b und c entsprechen einander und stimmen mit denen in Abb. 22 überein.

Zur Bestätigung der gewonnenen Sequenzdaten im 3' Bereich der cDNA wurde zusätzlich noch eine 3' RACE durchgeführt, ausgehend von der isolierten 5' RACE-Sequenz. Die erhaltenen Basenabfolgen stimmten mit den bereits bekannten überein (Daten nicht dargestellt).

Auch für den 5' Bereich der bekannten cDNA erbrachte eine PCR mit dem Marathon-Kit von Clontech nur eine Bestätigung der Sequenz (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.3 Analyse der Sequenz des Gens *mbFZb*

Aus der Library wurden mit der Sonde aus der 5' RACE zwei Klone isoliert, welche im 5' Bereich übereinstimmen und unterschiedlich lange 3' Bereiche besitzen. Die Sequenz der aus der Library isolierten Klone wurde auf einen translatierbaren Bereich hin untersucht. Die Sequenz des Klons P7B, welcher identisch mit den Klon P4B ist, diesen jedoch um 1kb in 3' Richtung übertrifft, ist in Abb. 23c zu sehen.

Die cDNA-Sequenz besitzt einen Translationsstart und -stop, welcher zu einem Proteinprodukt von 200aa führt. Am Ende der Sequenz des Klons p4B (dkl.blau) ist das identifizierte Polyadenylierungssignal dunkel unterlegt. Die Integration des Genfallenvektors in das Gen befindet sich ca. in der Mitte des hypothetischen Translationsproduktes (Grenze grüne/blau Sequenz, Vergleich auch Stern in Abb. 22).

Die Proteinsequenz des Gens *mbFZb* ist möglicherweise cytoplasmatisch (PSORTII) oder besitzt eine Transmembrandomäne zwischen den Aminosäuren 42 und 62 (ProDom, TMHMM, Tmpred, TopPred2). Diese ist in Abb. 23c durch einen Rahmen gekennzeichnet. Ansonsten konnten keine bekannten Proteinmotive gefunden werden.

Die gewonnenen cDNA-Sequenzen P4B und P7B wurden in der nicht redundanten Datenbank und der EST-Datenbank auf Homologien zu schon bekannten Sequenzen hin getestet.

Dabei wurden Homologien zu ESTs aus unterschiedlichsten Geweben wie Lymphknoten, Thymus, Herz, Myotubes, Niere und Hypothalamus der Maus und des Menschen gefunden. Die Sequenz der beiden Klone zeigte außerdem eine starke Homologie (76% Identität auf Aminosäure Ebene) zu einem Gen, welches im Rahmen eines Two-Hybrid-Screens in *Xenopus* identifiziert wurde (Accession Nr. AF12913, siehe Abb. 24).

Dieses Protein interagiert möglicherweise mit dem Zink-Finger Transkriptionsfaktor Zic3 und wird deshalb im nachfolgenden Text xZ3BP (mögliches Zic3 bindendes Protein aus Xenopus) genannt.

Das Gen des Klons 16.46, welches durch den Genfallenvektor mutiert ist, wird aufgrund der Homologie zu dem Xenopus-Gen im nachfolgenden Text mbFZb (Maus bFGF-reprimiertes, mögliches Zic3-bindendes Protein) genannt.

Zusätzlich zu dieser Maus Sequenz wurde auch die Sequenz des entsprechenden humanen Gens bFZb isoliert. Diese wurde in einer Library von fötalem Gehirn gefunden (λ gt11, NEB Inc.). Die humane Sequenz zeigt im vermeintlichen translatierten Bereich auf aa-Ebene eine Identität zur Maus-Sequenz von 94%.

Das Alignment der aa-Sequenz des ORF der Maus, des Menschen und des Frosches ist in Abb. 24 zu sehen.

Maus	MGFTGPLKYSKWKIKIAALRMYTSCVEKIDFEEFFLRCCMPDTFNSWFLIITLLHVVMCLV	60
Mensch	MGFTGPLKYSKWKIKIAALRMYTSCVEKIDFEEFFLRCCMPDTFNSWFLIITLLHVVMCLV	60
Xenopus	MGFTGPLKYNKWKIKIAALRMYTSCVERIDYDEFFEKCSLPDTLNSWFLVITQLHVVMCLV	60
Maus	RMKQEGRTGKYMCRITIVHEMWEDVEQRGRVMGVNSYILKKNMAMINNFYAAIILGYDEGI	120
Mensch	RMKQEGRSKGYMCRITIVHEMWEDVQQRGRVMGVNPNYILKKNMILMINHFYAAIILGYDEGI	120
Xenopus	RMKQEGRAGKYMCRMIVHEMWEDVEQRGKVMGIDSVTLKNSMRSMTEIFYAAIRGYDEGI	120
Maus	LSDDHGLAAALWRTFFNQKCEDPRQLLELLVEYVRKQIQMLDSMNGEDLLLTGEVVRWRPLV	180
Mensch	LSDDHGLAAALWRTFFNRKCEDPRQLLELLVEYVRKQIQMLDSMNGEDLLLTGEVSWRPLV	180
Xenopus	ISDDRILAAALWRNLLNKQCDPRKLELLVEYVRKQIQMLDTLDGEDLLLTGEVVRWRPLV	180
Maus	EKNPQSILKPHAPTYNDEGL	200
Mensch	EKNPQSILKPHSPTYNDEGL	200
Xenopus	EKDAQSILKPHSTPTYNDEGL	200

Abbildung 24 zeigt einen Homologievergleich des ORF des Maus-Gens mZ3BP mit dem humanen bFZb und dem Zic3-bindenden Protein aus Xenopus (xZ3BP, siehe Text). Die Homologie zwischen der Sequenz aus der Maus und dem Menschen beträgt 94% auf aa- und 90% auf bp-Ebene. Die Homologie zwischen der Maus- und der Xenopus-Sequenz beträgt 72% auf bp-Ebene und 76% auf aa-Ebene.

4.2.2.4 Chromosomale Lokalisierung von mbFZb

Zur chromosomalen Lokalisierung von mbFZb wurden das Radiation Hybrid Panel (RHP) der Jackson Laboratories verwendet. Mit Primern, welche im 3' Bereich von mbFZb binden, wurde zunächst eine PCR auf genomischer DNA von Maus, Hamster und einem Gemisch der genomischen DNAs beider Arten durchgeführt. So wurde die Eindeutigkeit der PCR-Amplifikate bestimmt.

Das RHP wurde dann erst mit β -Aktin-Primern auf das Vorhandensein von genomischer DNA in jeder Spur hin überprüft.

Anschließend wurden zwei unabhängige PCRs mit den mbFZb spezifischen Primern durchgeführt. Die Ergebnisse dieser PCRs wurden zur Auswertung an das Jackson Laboratory und das Whitheat-Institut geschickt. Jackson plaziert das Gen mbFZb auf dem

Chromosom 2 zwischen die Marker D2Mit451 und D2Mit494. Die Auswertung des Whitheat-Instituts plaziert mbFZb zwischen die Marker D2Mit262 und D2Mit451 ebenfalls auf dem Chromosom 2.

Die humane, homologe EST-Sequenz (Acc.Nr. R59654) ist dementsprechend auf dem Chromosom 20q11.2, d.h. auf dem langen Arm des Chromosoms, in den Nähe des Centromers zwischen den Markern D20S106 und D20S107 lokalisiert. Das der humanen Sequenz zugeordnete Unigene-Cluster Hs.26676 besitzt bisher noch keine Verknüpfungen zu Krankheiten, die dem entsprechenden chromosomalen Bereich zugeordnet wären.

4.2.3 Expression des Gens mbFZb in ES-Zellen

Um die Sequenzdaten zu verifizieren wurde RT-PCR und Northern-Hybridisierungen an RNA aus ES-Zellen durchgeführt.

4.2.3.1 RT-PCR an RNA aus ES-Zellen

Die Expression der beiden Splice-Formen des Gens mbFZb wurde in ES-Zellen mit Hilfe einer RT-PCR gezeigt. Hierfür wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet (siehe 3.6.4), welche jeweils spezifisch für die verschiedenen Bereiche bzw. Spliceformen des Gens mbFZb sind (siehe Abb. 22/23).

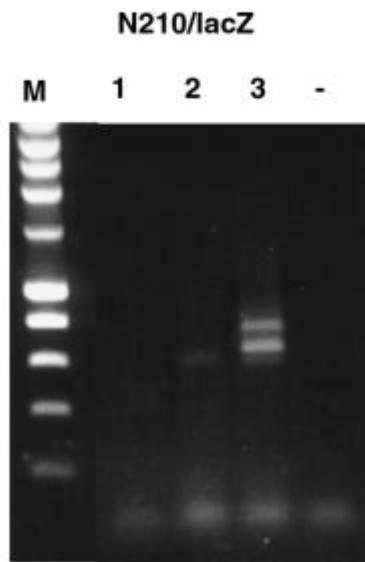
Die Länge der erwarteten Bande beträgt 750bp für das Fusionstranskript aus N210 und lacZ Für diese PCR wurden die Primer N210 sense und lacZ-trap antisense bei einer Anlagerungstemperatur von 57°C verwendet.

Die Längen der anderen Fragmente umfassen für den 5´ Bereich 433bp (Primer: N210 sense, N210 antisense) und die beiden 3´Bereiche 706bp (Primer: P4B/P7B sense, P4B antisense) und 1305bp (Primer: P4B/P7B sense, P7B antisense). Diese PCR wurde bei einer Anlagerungstemperatur von 55°C durchgeführt. Die Position der Primer ist schematisch in Abb. 22 und 23, deren Sequenzen unter 3.6.4 beschrieben.

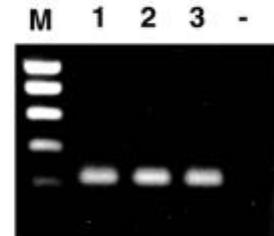
Das Ergebnis dieser RT-PCR zeigt die Expression des lacZ-Fusionstranskripts nur im ES-Zell Klon 16.46 (heterozygot für die Integration des Genfallen-Vektors, mbFZb^{+/lacZ}) und nicht in den Wildtyp- ES-Zellen (Abb. 25a).

Das Transkript des 5´ Bereich des mutierten Gens ist mit gleicher Häufigkeit sowohl in den heterozygoten, als auch in den Wildtyp- ES-Zellen zu finden. Das Transkript des 3´ Bereichs des Gens ist auch in beiden Zelltypen zu finden, allerdings ist die Expression dieses Transkripts in den mbFZb^{+/lacZ} -ES-Zellen um ca. die Hälfte im Vergleich zur Häufigkeit des Wildtyp- Transkripts reduziert (Abb. 25b). Zur Standardisierung der Menge eingesetzter cDNA wurde eine β -Aktin PCR durchgeführt (Abb. 25c).

a



c



b

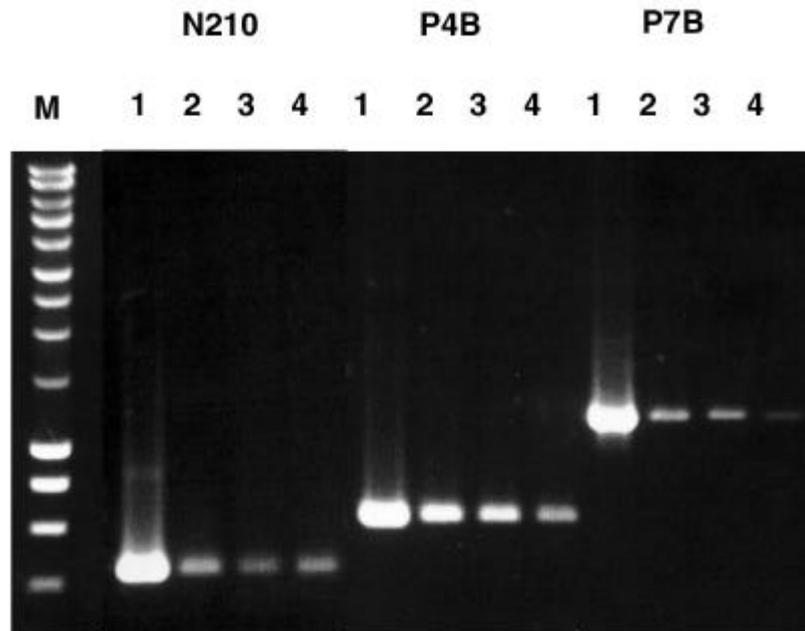


Abbildung 25 zeigt RT-PCRs mit Primern, welche spezifisch für verschiedene Bereiche der Sequenz der Klone P4B bzw. P7B sind.

Abb. 25a zeigt die Amplifikation des N210/lacZ-Fusionstranskriptes nur in ES-Zellen des Klons 16.46 (Primer: N210 sense, lacZtrap antisense). In Spur 1 dient cDNA aus Wildtyp- ES-Zellen als Vorlage, in Spur 2 solche aus einem anderen, durch den Genfallenvektor mutierten Klon und in Spur 3 solche aus dem Klon 16.46.

Abb. 25b zeigt das Ergebnis der PCR mit Oligonukleotide, die eine zum einen das 5' RACE-Fragment (Primer: N210 sense, N210 antisense), zum anderen die beiden unterschiedlich langen 3' Bereiche der Library Klone P4B (Primer: P4B/P7B sense, P4B antisense) und P7B (Primer: P4B/P7B sense, P7B antisense) vervielfältigen. Das 5' RACE-Fragment wird bei allen drei Ansätzen gleich stark amplifiziert; die Amplifikationsprodukte aus dem 3' Bereich sind in den mutierten ES-Zellen um ca. die Hälfte reduziert. Verwendete Oligonukleotide siehe Text. In Spur 1 dient Plasmid-DNA als Vorlage (Positivkontrolle), in Spur 2 und 3 wurde cDNA aus Wildtyp-ES-Zellen und in Spur 4 cDNA des Klons 16.46 als Vorlage für die PCR verwendet.

Abb. 25c zeigt die β -Aktin Ladekontrolle für Abb. 25b.

Die Position der verwendeten Primer ist schematisch in Abb. 22 und 23, deren Sequenzen unter 3.6.4 beschrieben.

4.2.3.2 Northern-Hybridisierung an RNA aus ES-Zellen

Zur Bestätigung der Ergebnisse der RT-PCR (siehe 4.2.3.1) wurden Northern Hybridisierungen an RNA aus ES-Zellen durchgeführt.

Die Northern-Hybridisierung in Abb. 26a mit der Sonde N210 für den 5' Bereich des Gens mbFZb zeigt, dass in Wildtyp- ES-Zellen zwei Signale mit einer Länge von ca. 1.4 kb bzw. 2.4kb zu finden sind (Spur 1). Die gleichen Signale zeigt Abb. 26b, in welcher mit der 3' Sonde des Gens (P4B) hybridisiert wurde.

In den Zellen des Klons 16.46 (heterozygot für die Vektorintegration) ist ein Shift des Signals auf 3.9kb zu sehen (Abb. 26a, Spur 2). Dieses Signal entspricht der Länge des Fusionstranskriptes zwischen dem 5' RACE-Fragment und lacZ. Die Hybridisierung mit der lacZ-Sonde bestätigt dieses Signal (Abb. 26b, Spur 2).

Die beiden Wildtypsignale in Abb. 26a, Spur 2 sind reduziert (Vergleich mit dem Mengenstandard der GAPDH-Hybridisierung, Abb. 26d, e), was dafür spricht, dass das mutierte Gen mbFZb in zwei Splice-Formen in ES-Zellen vorkommt.

Die Sonden für die Hybridisierung sind in Abb. 22 und 23 als Balken dargestellt.

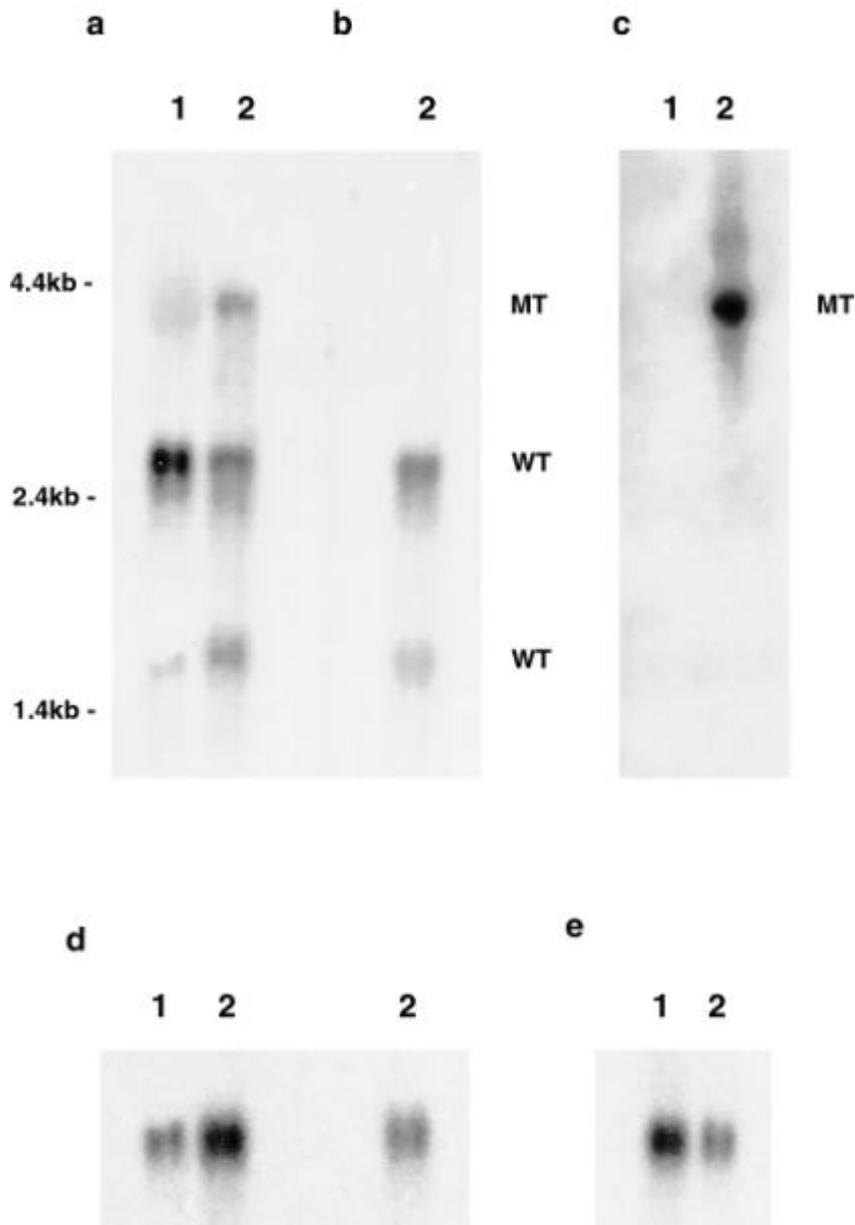


Abbildung 26 zeigt Northern Hybridisierungen mit Proben für den 5' und 3' Bereich des Gens mbFZb und für lacZ. Abb. 26a stellt die Hybridisierung mit N210, 26b die gleiche mit P4B und 26c die gleiche mit lacZ dar. Abb. 26d und e zeigen die RNA-Ladungskontrollen der Blots a und b bzw. c, welche mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert wurden. In Spur 1 wurde RNA aus Wildtyp- ES-Zellen geladen, in Spur 2 solche des Klons 16.46. Mit der 5' Sonde (N210) sind beide Wildtyp-Banden (WT) und die Mutanten-Bande (MT) zu sehen. Die lacZ-Sonde erkennt nur die Mutanten-Bande, die 3' Sonde (P4B) nur die Wildtyp-Banden. Die verwendeten Hybridisierungssonden sind in Abb. 22/23 als Balken gezeigt.

4.2.4 Herstellung der $mbFZb^{+/lacZ}$ -Maus

Um das Expressionsmuster des im Genfallen-Experiment identifizierten Gens $mbFZb$ zu studieren, wurden aus dem ES-Zell-Klon 16.46 Mäuse generiert. $mbFZb$ ist durch den Genfallenvektor PT1ATG (siehe 3.7.1) mutiert und an das $lacZ$ -Gen gekoppelt. Die Expression von $mbFZb$ kann daher mit Hilfe des $lacZ$ -Reportergens in den $mbFZb^{+/lacZ}$ -Mäusen verfolgt werden. Das Erzeugen der $mbFZb^{+/lacZ}$ -Mäuse eröffnet außerdem die Möglichkeit, bei einer Inaktivierung des mutierten Gens $mbFZb$ durch die Integration des Genfallenvektors die Funktion des Gens zu studieren.

Vor der Herstellung der $mbFZb^{+/lacZ}$ -Mäuse wurde zunächst die Anzahl der Integrationen des Genfallen-Vektors in das Genom der Zelle überprüft. Hierfür wurde eine Southern-Hybridisierung an genomischer DNA des Klons 16.46 durchgeführt. Die Hybridisierung der HindIII-verdauten DNA zeigt ein Signal, die Hybridisierung der EcoRI-verdauten DNA zeigt zwei Signale bei der Hybridisierung mit der $lacZ$ -Sonde (Abb. 27a). HindIII schneidet im 5' Bereich des Vektors, EcoRI schneidet sowohl im 5' Bereich des Vektors als auch im 3' Bereich des $lacZ$ -Gens (Schnittstellen siehe 3.7.1). Die exponierten Bereiche der Genfallenvektoren (Lokalisierung der HindIII- und EcoRI-Schnittstelle) gehen häufig bei der Integration verloren.

Das Ergebnis der Hybridisierung zeigt somit, dass es sich um eine Tandem-Integration des Vektors in den Locus von $mbFZb$ handelt. Nur das Gen $mbFZb$ ist von der Integration betroffen.

ES-Zellen des Klons 16.46 (R1 ES-Zellen, 129/Sv) wurden mit cD1-Morulae aggregiert, und die sich entwickelnden Blastozysten in cD1-Mäuse transferiert.

Die entstandenen hochchimeren Mäuse wurden zur Keimbahntransmission verpaart, welche mehrfach erreicht wurde.

Die gewonnenen $mbFZb^{+/lacZ}$ - und $mbFZb^{lacZ/lacZ}$ -Mäuse wurden mit Hilfe von genomischen Southernblots typisiert, wobei die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut wurde und der Blot des Gels anschließend mit einer $lacZ$ -Sonde bzw. dem 5' Bereich des Gens (N210, siehe Abb. 22) hybridisiert wurde. Die DNA der heterozygoten Mäuse zeigte ein ca. 17kb großes $lacZ$ -Signal und eine 7kb großen Mutanten Bande im Vergleich zur ca.9kb großen Wildtyp Bande.

Die homozygoten Tiere konnten über den Vergleich der Intensität der Wildtyp- und der Mutanten Bande eines Tieres und dem Vergleich der Intensität der $lacZ$ Bande zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren bestimmt werden (siehe Abb. 27b).

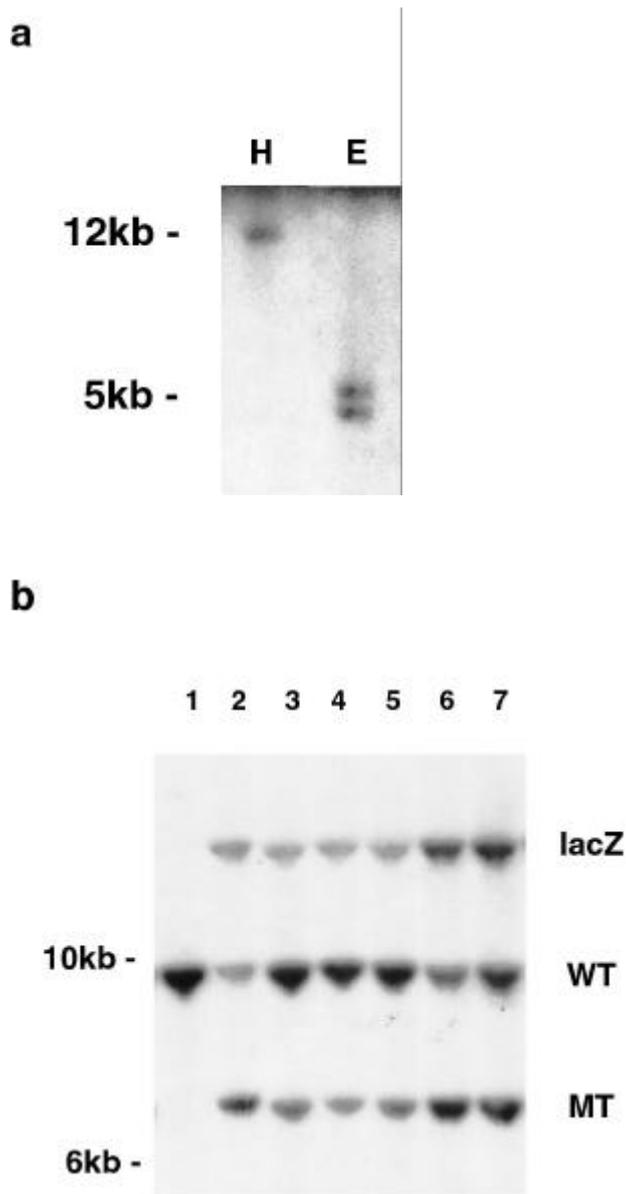


Abbildung 27a zeigt eine Southernhybridisierung von ES-Zell genomischer DNA mit einer lacZ-spezifischen Sonde. Zur Überprüfung der Anzahl der Integrationen des Trap-Vektors wurde mit HindIII bzw. EcoRI verdaut.

Abb. 27b zeigt eine Southernhybridisierung mit lacZ und N210. Die genomische DNA wurde mit HindIII verdaut. Spur 1 enthält genomische DNA eines Wildtyp-Tieres, Spur 3-5 solche heterozygoter und Spur 2,6,7 solche homozygoter Tiere. Das lacZ-Signal (lacZ) ist bei den heterozygoten und noch stärker bei den homozygoten Tieren zu beobachten. Die Wildtyp-Bande (WT) der Hybridisierung mit N210 liegt bei 10kb, die der Mutantenbande (MT) bei 7kb. Die Mutantenbande ist wie auch die lacZ -Bande bei den homozygoten Tieren stärker. Im Bereich der Wildtyp-Bande ist noch ein weiteres Hybridisierungssignal zu sehen, welches von der Integration des Genfallenvektors nicht betroffen ist, und daher auch in den homozygoten Tieren erscheint.

Die Hybridisierungssonden sind in Abb. 22 gezeigt.

4.2.5 Expression des Gens mbFZb in der Maus

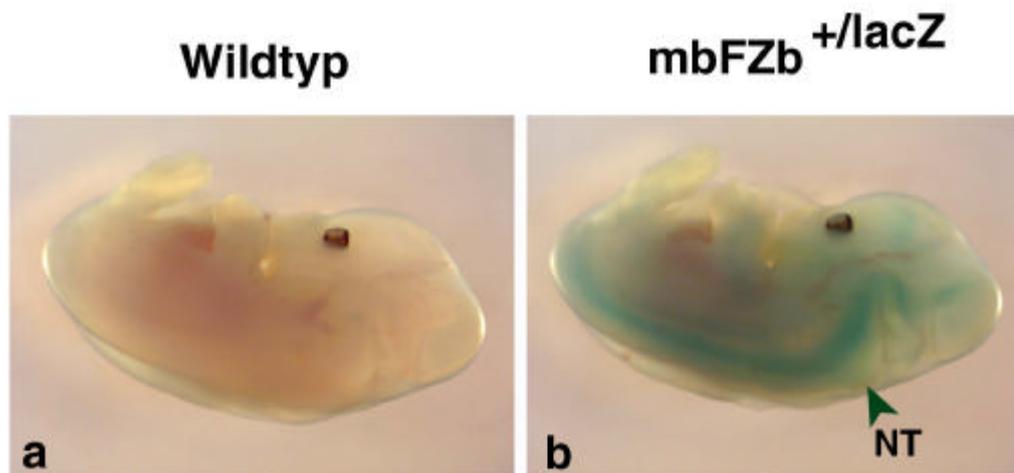
Die Expression des Gens mbFZb wurde zum einen während der Entwicklung der Maus, zum anderen in adulten Tieren studiert. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Expression von mbFZb im Nervensystems.

4.2.5.1 Expression von mbFZb im sich entwickelnden Nervensystem und Auge

Die Expression des Gens mbFZb im Rahmen der Embryonalentwicklung wurde einerseits mit Hilfe des lacZ-Markergens, andererseits an Hand von in-situ-Hybridisierungen genauer analysiert.

Um die Expression des Gens mbFZb im sich entwickelnden Nervensystem zu verfolgen, wurden zunächst lacZ-Färbungen an Embryonen durchgeführt. Ab dem Entwicklungsstadium von 11.5 Tagen konnte die Expression der β -Galaktosidase beobachtet werden.

Diese zeigte sich bei 11.5 bzw.12.5 Tage alten Tieren mit geringem Expressionslevel im gesamten Tier vor allem im Neuralrohr (siehe Abb. 28a und b). Bei 13.5 Tage alten Mäusen konzentrierte sich die Expression dann weiter auf den olfaktorischen Bulbus, den Bereich der Lateralventrikel im Vorderhirn und Bereiche im Mittelhirn (siehe Abb. 28c-f).



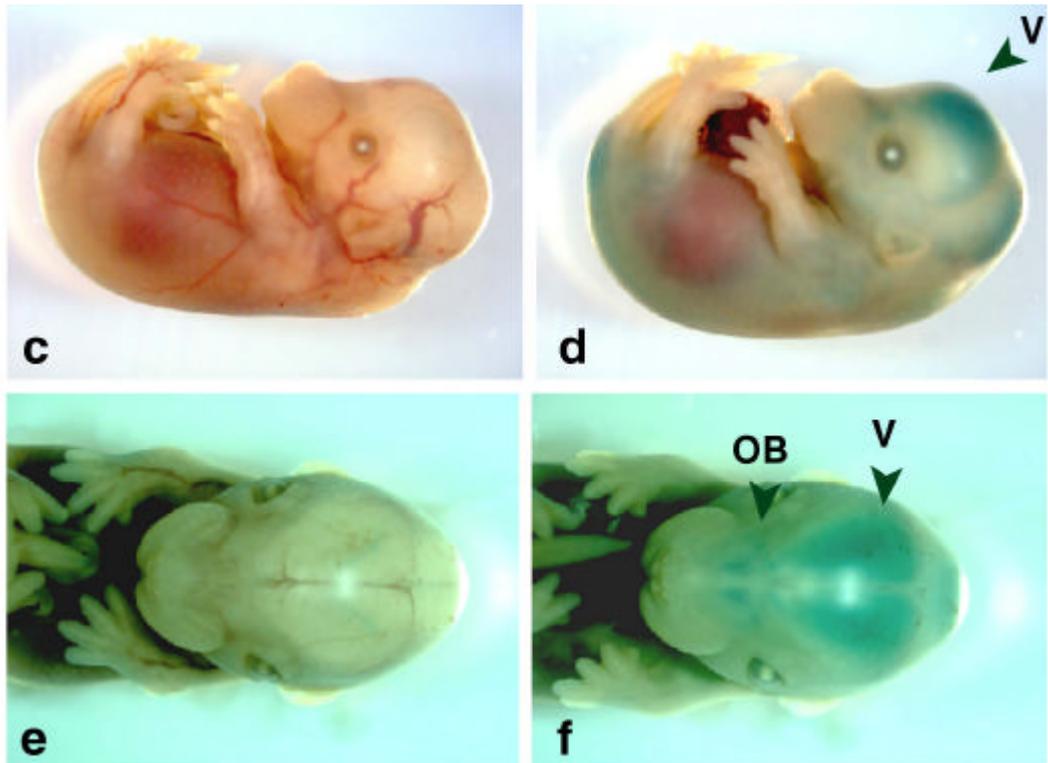


Abbildung 28 zeigt die lacZ Färbung von 12.5 (28a,b) bzw. 13.5 (28c-f) Tage alten Mausembryonen. Die Expression ist vor allem im Neuralrohr, dem olfaktorischen Bulbus und dem Bereich der Lateralventrikel zu sehen.

NT: Neuralrohr, OB: Bulbus olfactorius, V: Lateralventrikel

Um die Expression des Gens mbFZb genauer zu lokalisieren, wurden zusätzlich in-situ-Hybridisierungen an coronalen Schnitten von 9.5, 12.5, 14.5 und 16.5 Tage alten Embryonen durchgeführt. Es wurde die Probe P7B (siehe Abb. 23) für diese Hybridisierungen verwendet.

Die Sagittalschnitte in Abbildung 29a und a` zeigen, dass mbFZb schon ab dem Tag 9.5 in der Embryonalentwicklung der Maus ubiquitär in allen Gewebetypen exprimiert wird. Die Hybridisierung mit der sense-Probe in Abbildung 29a`` zeigt, dass dieses Signal tatsächlich existiert und keinen unspezifischen Hintergrund darstellt.

Diese in allen Gewebetypen verbreitete Expression wurde bei allen untersuchten Stadien (E 9.5-16.5) beobachtet.

Am Tag 12.5 ist eine Spezifizierung der RNA-Expression im Nervensystem zu beobachten. Zum einen zeigt das gesamte proliferierende Neuroepithel im sich entwickelnden Gehirn ein verstärktes Signal (siehe Abb. 29b, b`), zum anderen fallen auch das Ganglion des Trigemini (V) und des vestibulocochleare Nervs (VIII) durch eine starke Expression von

mbFZb auf (siehe Abb. 29c, c'). Auch das Rückenmark und die Spinalganglien zeigen eine Anhäufung von mbFZb-Transkript (Abb. 29c, c').

Dieses Expressionsmuster konnte auch in den lacZ-Färbungen der heterozygoten Tiere (E12.5, E13.5) beobachtet werden, wobei spezifische Expressionsdomänen, wie in den einzelnen Nerven, in dieser Färbung des ganzen Tieres nicht zu erkennen sind (siehe Abb. 28). Im Allgemeinen repräsentiert die Expression des lacZ-Reportergens jedoch, wie erwartet, die Expression von mbFZb.

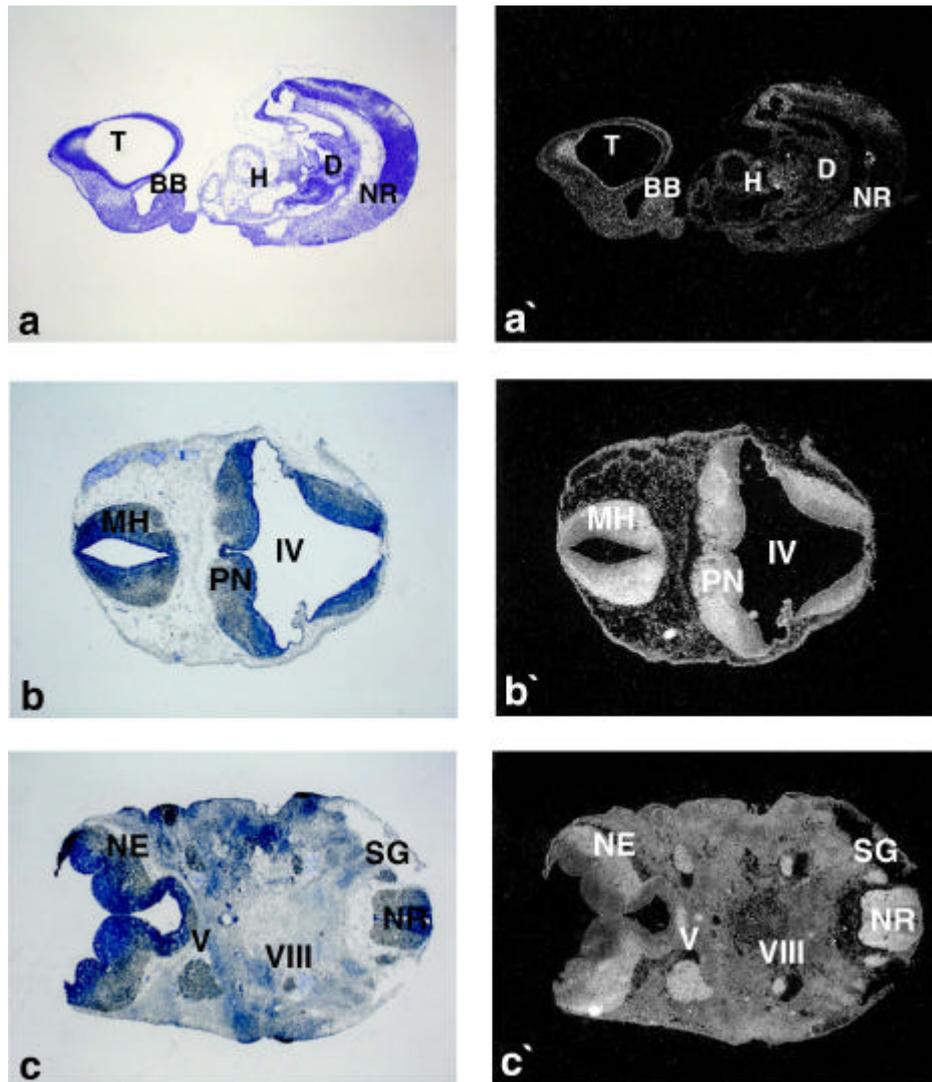


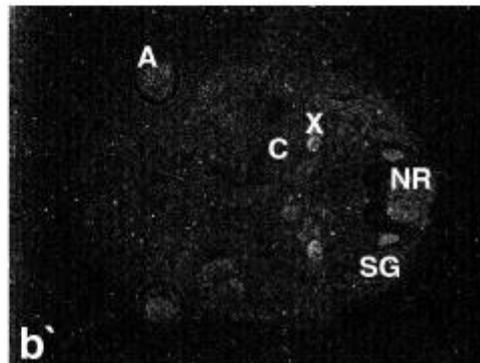
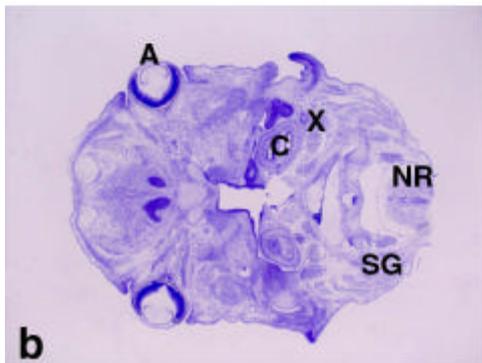
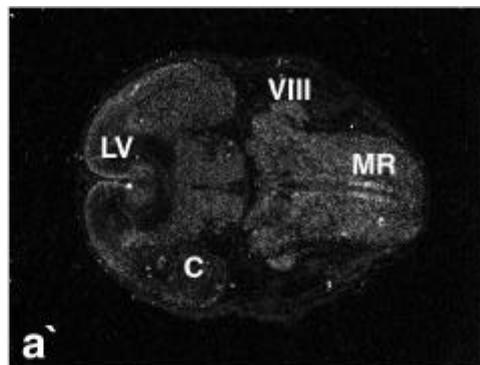
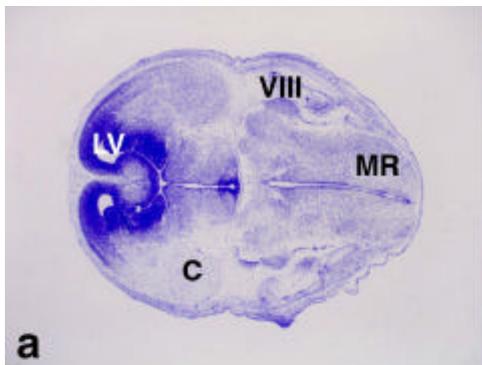
Abbildung 29 zeigt in-situ- Hybridisierungen für mbFZb (Probe P7B, siehe Abb. 23). Abbildungen a-c zeigen Aufnahmen im Hellfeld, Abbildungen a'-c' Aufnahmen im Dunkelfeld. MbFZb ist in 9.5 Tage alten Embryonen ubiquitär exprimiert (a, a'), in 12.5 Tage alten Embryonen kommen Domänen hoher

Expression im Neuroepithel (b, b'), im Rückenmark, in den Spinalganglien und in den Ganglien der Cranialnerven V und VIII (c, c') hinzu.

BB: Branchialbogen, D: Darm, H: Herz, M: Mesencephalon, NR: Neuralrohr, PN: Pons, IV: vierter Ventrikel, V: Ganglion des trigeminus Nervs, VIII: Ganglion des vestibulocochlearen Nervs

Mit zunehmender Differenzierung und Etablierung der einzelnen Gehirnregionen nimmt auch die Kolokalisation von mbFZb mit bestimmten Nervenzellgruppen zu.

Am Tag 14.5 der Mausentwicklung treten neben der schon gezeigten Expression im Rückenmark, den Spinalganglien und den Ganglien der Cranialnerven V und VIII Domänen im Gehirn auf, welche die medullare Raphe in der Pons und die Ganglien der Cranialnerven IX (Glossopharynus) und VII (Facialis) und X (Vagus) markieren (siehe Abb. 30a, a', b, b'). Auch der trigeminale Nerv in der Pons zeigt mbFZb-Expression (Abb. 30c, c').



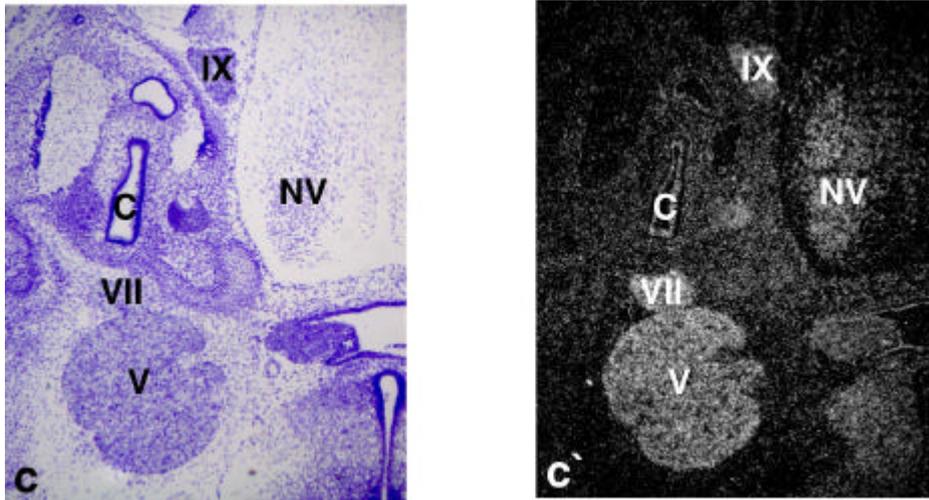


Abbildung 30 zeigt in-situ-Hybridisierungen für mbFZb (Probe P7B, siehe Abb. 23) an horizontalen Schnitten 14.5 Tage alter Embryonen. Abbildungen a-c zeigen Aufnahmen im Hellfeld, Abbildungen a`-c` Aufnahmen im Dunkelfeld. Abbildung a`` stellt die Hybridisierung mit der sense-Probe dar. Neben der ubiquitären Expression im Embryo fallen zum einen die Ganglien der cranialen Nerven V, VIII, IX und X (30a´, b´ und c´), zum anderen das Rückenmark mit den Spinalganglien (30b´) und die medullare Raphe (30a´) durch eine erhöhte Expression auf.

A: Auge, C: Cochlea, LV: Lateralventrikel, MR: Medullare Raphe, NT: Trigeminer Nerv, NR: Neuralrohr, SG: Spinalganglien, V: Ganglion des N. Trigemini, VII: Ganglion des N. Facialis, VIII: Ganglion des N. Vestibulocochlearis, IX: Ganglion des N. Glossopharyngealis, X: Ganglion des N. Vagus.

Zwei Tage später in der Entwicklung (E16.5) besteht die Expression im Rückenmark, in den Spinalganglien und in den Ganglien der cranialen Nerven V, X (siehe Abb. 31b, b`), VII, VIII und IX (nicht gezeigt) weiter fort. Auch der Trigemini-Nerv weist eine erhöhte Menge an mbFZb-Transkript auf (Abb. 31 a, a`). Zu diesem Stadium zeigt sich eine Konzentrierung des mbFZb-Transkripts im sich entwickelnden Cortex (siehe Abb. 31a, a`). Auch sympathetische Ganglien, wie das cervikale sympathetische Ganglion (siehe Abb. 31c, c`) sind im Dunkelfeld aufgrund des mbFZb-Transkripts zu erkennen. Neben diesen Expressionsdomänen im Nervensystem zeigt sich eine starke Expression des Gens mbFZb im braunen Fett (Abb. 31d und d`).

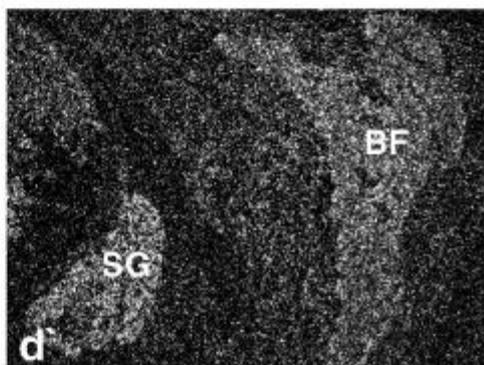
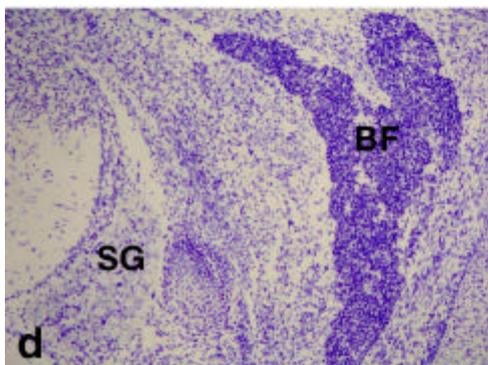
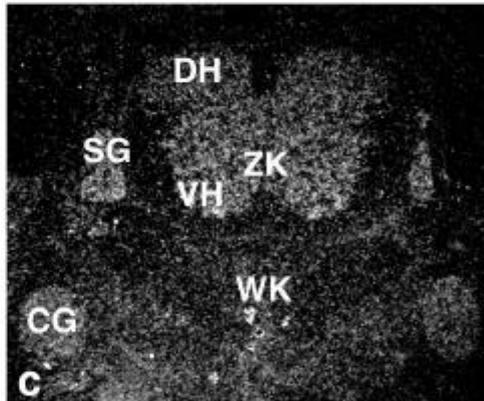
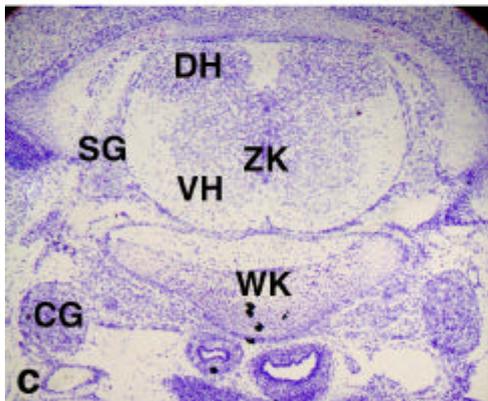
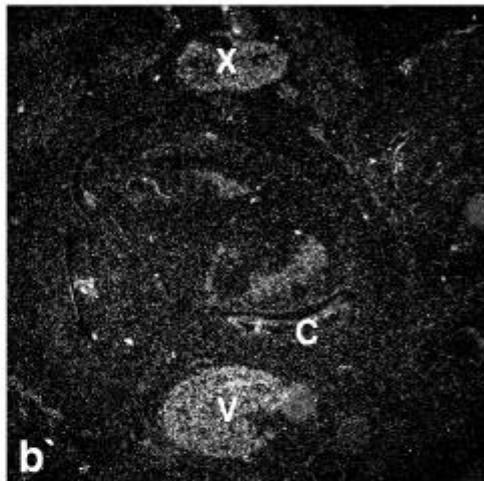
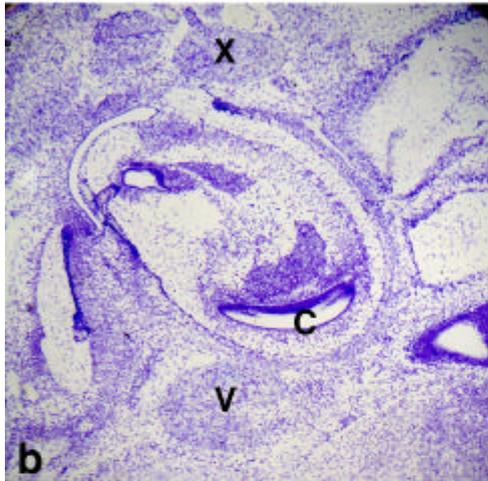
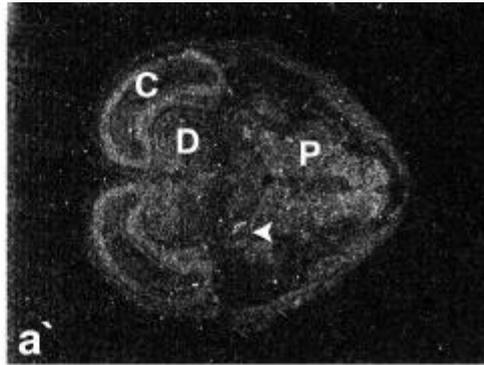
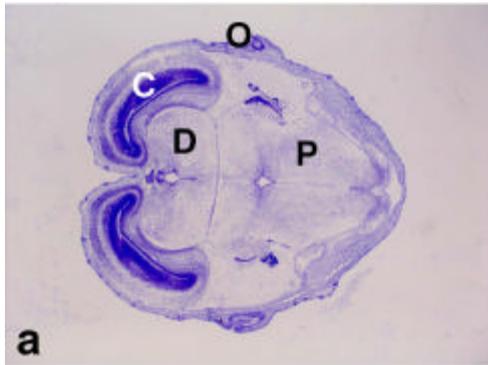


Abbildung 31 zeigt in-situ-Hybridisierungen für mbFZb (Probe P7B, siehe Abb. 23). Abbildungen 31a-d zeigen Aufnahmen im Hellfeld, Abbildungen a`-d` Aufnahmen im Dunkelfeld. In Abb. 31a, a` ist die verstärkte Expression von mbFZb im sich entwickelnden Cortex zu sehen. Der Pfeil deutet auf den trigeminus Nerv. Abbildungen b und b` stellen die Expression von mbFZb in den Cranialnerven, Abb. 31c und c` die Expression im Neuralrohr, den Spinalganglien und dem sympathet. Ganglion dar. In Abb. 31d und d` ist das in-situ- Signal des braunen Fetts gezeigt.
BF: braunes Fett, C: Cochlea, D: Diencephalon, DH: dorsales Horn, P: Pons, SG: cervikales sympathetisches Ganglion, VH: ventrales Horn, WK: Wirbelkörper, ZH: Zentralkanal

Interessanterweise ist mbFZb auch im sich entwickelnden Auge exprimiert.

Am Tag 12.5 ist ein erhöhter Transkriptlevel sowohl in der entstehenden Linse (Epithelzellen, Pfeilspitze in Abb. 32a und a`) zu sehen, als auch in der inneren, neuronalen Retina (Pfeil in Abb. 32a, a`). Die antisense-Kontrolle (Abb. 32a`) zeigt das Hintergrundsignal der Pigmentschicht.

Zu diesem Zeitpunkt (E12.5) ist die zukünftige Linse noch angefüllt mit Epithelzellen, welche zunächst zu Faserzellen differenzieren, die Zellteilung einstellen und dann, angefüllt mit Kristallinen, die lichtdurchlässige Linse bilden.

Im Laufe der Entwicklung (E16.5 und E18.5) zieht sich die Expression von mbFZb mit zunehmender Reifung der Linse in jenen Bereich (Linsenäquator) zurück, in dem die Differenzierung der Epithelzellen zu Linsenfaserzellen noch stattfindet (Pfeilspitze in Abb. 32b, b`, c, c`). Die Expression in der inneren Retina bleibt unverändert erhalten.

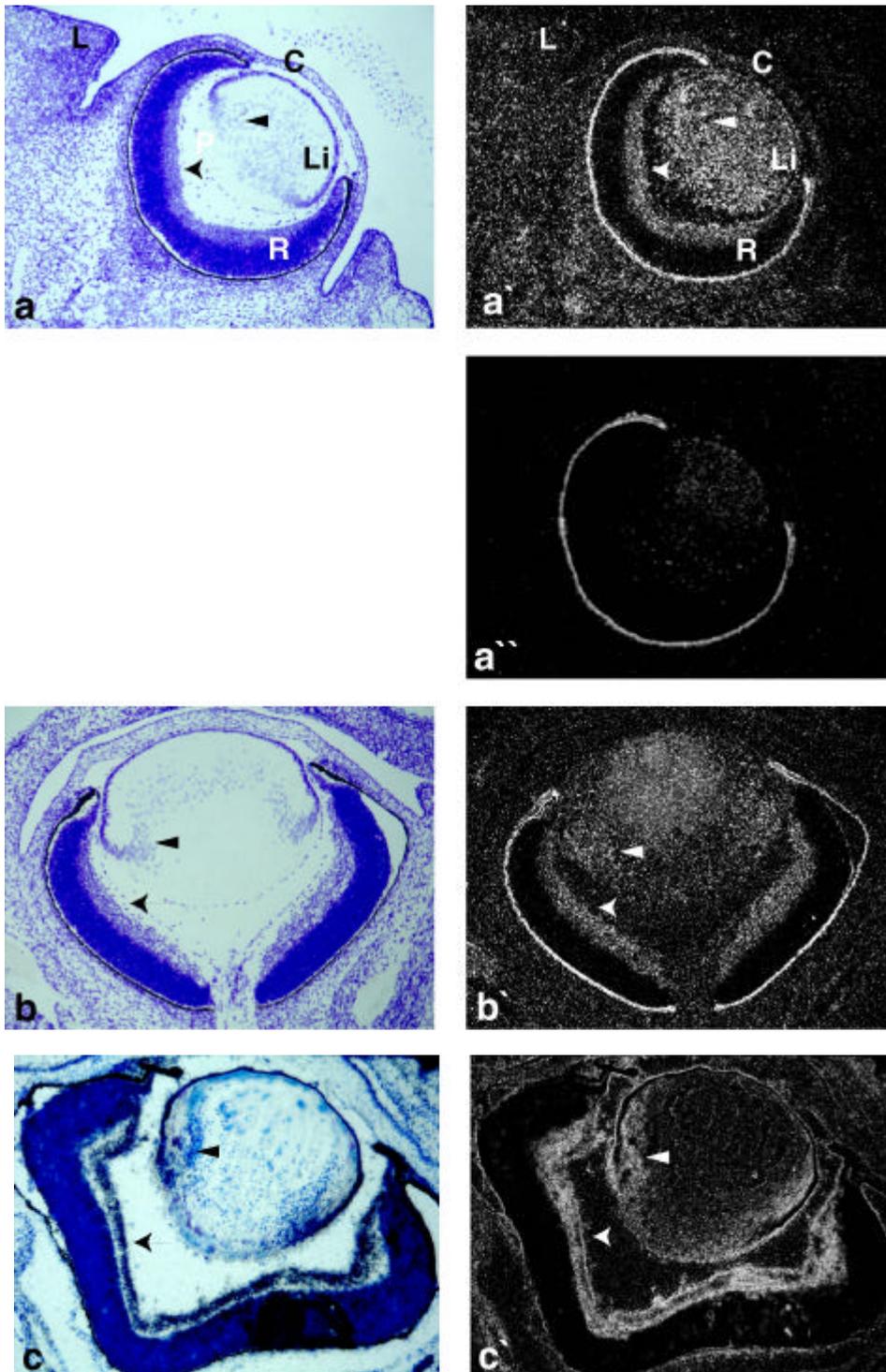


Abbildung 32 zeigt die Expression von mbFZb (Probe P7B, siehe Abb. 23) im Auge zu verschiedenen Stadien der Mausentwicklung (E14.5: a, a[`], a^{``}; E16.5: b, b[`]; E18.5: c, c[`]). Abb. 32a-c stellen Hellfeld-Aufnahmen dar, Abb. 32a[`] bis c[`] solche im Dunkelfeld. Die Expression ist zu allen Stadien in der inneren Retina zu beobachten (markiert durch einen Pfeil). Die Expression in der Linse ist im Bereich der differenzierenden Epithelzellen zu beobachten (Pfeilspitze). C: Cornea, L: Lid, Li: Linse; R: Retina

4.2.5.2 Expression von mbFZb in der adulten Maus

Um einen Eindruck von der Expression von mbFZb im erwachsenen Tier zu bekommen, wurden zunächst Northern-Hybridisierungen mit der Probe P7B (Abb. 23) durchgeführt. Es wurde ein Northern Blot von OriGene Technologies verwendet (Best. Nr. MB-2020), bei dem pro Spur 2µg polyA-RNA aufgetragen sind.

Abbildung 33a zeigt das Ergebnis der Hybridisierung. Fast alle getesteten Organe der adulten Maus zeigen Transkripte für mbFZb. Ausgenommen ist Muskelgewebe und der Thymus. Die Expression im Magen ist auf der gezeigten Abbildung aufgrund der geringen Intensität nicht zu erkennen. Für das Gehirn, wie auch das Herz, die Nieren, die Leber, die Lunge und den Magen konnten mehrere (mindestens zwei) Transkripte identifiziert werden, welche eine Größe zwischen 2kb und 3kb besitzen. Das Lungengewebe zeigt noch ein zusätzliches, sehr starkes Signal bei ca. 0.9kb, welches möglicherweise ein weiteres, lungenspezifisches Transkript von mbFZb darstellt.

In der Haut, dem Darm und der Milz ist vorrangig ein Transkript mit einer Größe von 2.5kb zu detektieren. Die Hoden zeigen, wie auch die Leber, ein breit gestreutes, starkes Hybridisierungssignal, welches eine Vielzahl von Transkripten erkennen läßt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass mbFZb in verschiedenen Spliceformen vorkommt, welche in der Größe zwischen ca. 0.9kb und 6kb variieren.

In ES-Zellen und embryonalem Gewebe sind zwei Spliceprodukte des Gens zu detektieren, welche mit der Länge der Sequenz der amplifizierten cDNAs von mbFZb übereinstimmen (P4B, P7B, siehe Abb. 23).

In der adulten Maus sind dann vorwiegend solche Transkripte zu finden, welche im Größenbereich des längeren Transkripts liegen.

Neben den Mausgeweben wurden auch noch Gewebe des Menschen auf Transkripte des humanen Homologs untersucht. Hierfür wurde dieselbe Probe P7B auf dem OriGene Northern Blot Nr. HB-2010 verwendet.

Im Menschen ist das Ergebnis sehr viel klarer. Die Niere, die Leber, die Lunge, die Placenta und die Milz zeigen keine Expression des Gens mbFZb. Im Dick- und Dünndarm, dem Herzen, Muskelgewebe und dem Magen ist ein Transkript mit einer Länge von 2.2kb zu detektieren (siehe Abb. 33b). Das Gehirn zeigt auch ein Hybridisierungssignal, allerdings bei einer Größe von 2.5kb. Das spricht für eine längere Spliceform des humanen bFZb im Gehirn.

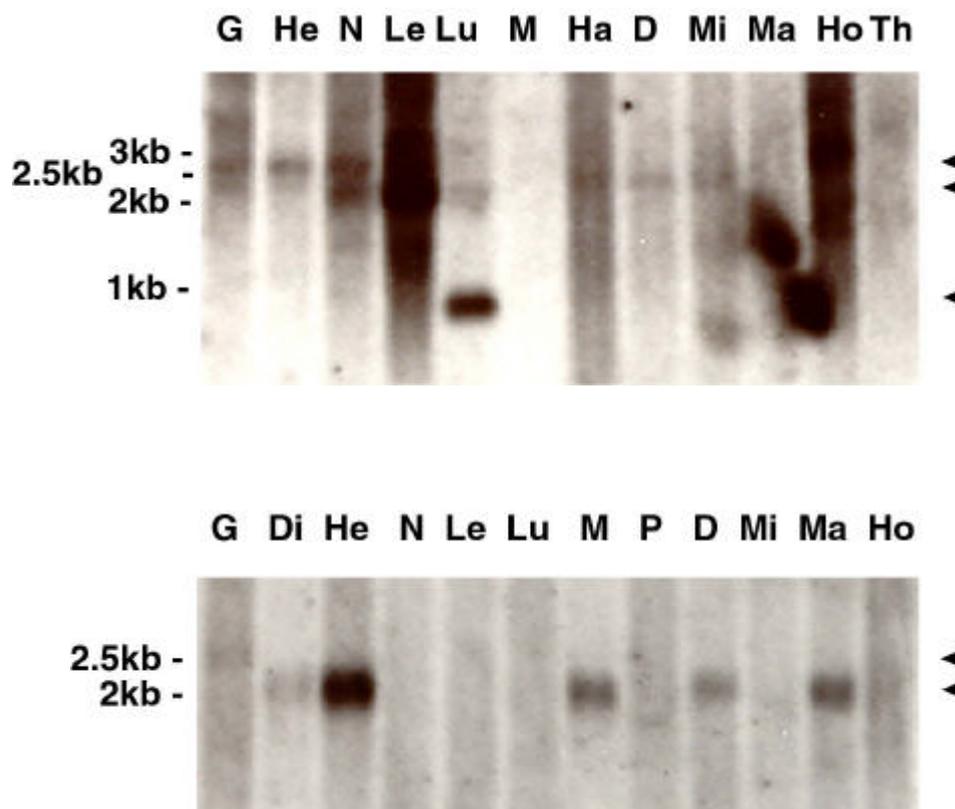


Abbildung 33 zeigt das Ergebnis von Northern-Hybridisierungen an adulten Maus- (Abb. 33a) bzw. menschlichen Geweben (Abb. 33b) mit P7B (siehe Abb. 23). Pro Spur sind 2µg polyA-RNA aufgetragen. Die Pfeile deuten auf die dominanten Transkripte hin.
D: Dünndarm, Di: Dickdarm, G: Gehirn, Ha: Haut, He: Herz, Ho: Hoden, Le: Leber, Lu: Lunge, M: Muskel, Ma: Magen, Mi: Milz, N: Niere, P: Placenta, Th: Thymus.

Neben der Expressionsübersicht des Northernblots wurden in-situ-Hybridisierungen auf Schnitten adulter Maus-Gehirne durchgeführt. Für diese wurde die Probe P7B (siehe Abb. 23) verwendet. Diese Transkriptionsanalyse des Gens mbFZb erbrachte folgende Ergebnisse. Die Expression von mbFZb ist überall im Gehirn mit einem sehr geringen Level zu beobachten. Die Expression kolokalisiert, wie am Beispiel der Zellen des Cortex gezeigt, mit den in der Kresylviolett-färbung nur leicht angefärbten Zellen, den Nervenzellen (Stern in Abb. 34c, c'). Die Glia (stark blau gefärbt) sind frei von Silberkörnern (Pfeil in Abb. 34c, c'). Neben dieser allgemeinen Expression gibt es auch Expressionsdomänen, welche eindeutig einen erhöhten Transkriptionslevel aufweisen.

Hierzu zählt der olfaktorische Bulbus (siehe Abb. 34a, a'). mbFZb ist dort schwach in der granulären Schicht zu detektieren, die interne plexiforme Schicht ist frei von mbFZb. Die Mitralzellen (siehe Abb. 34b, b', Pfeilspitze) zeigen eine starke Expression von mbFZb und

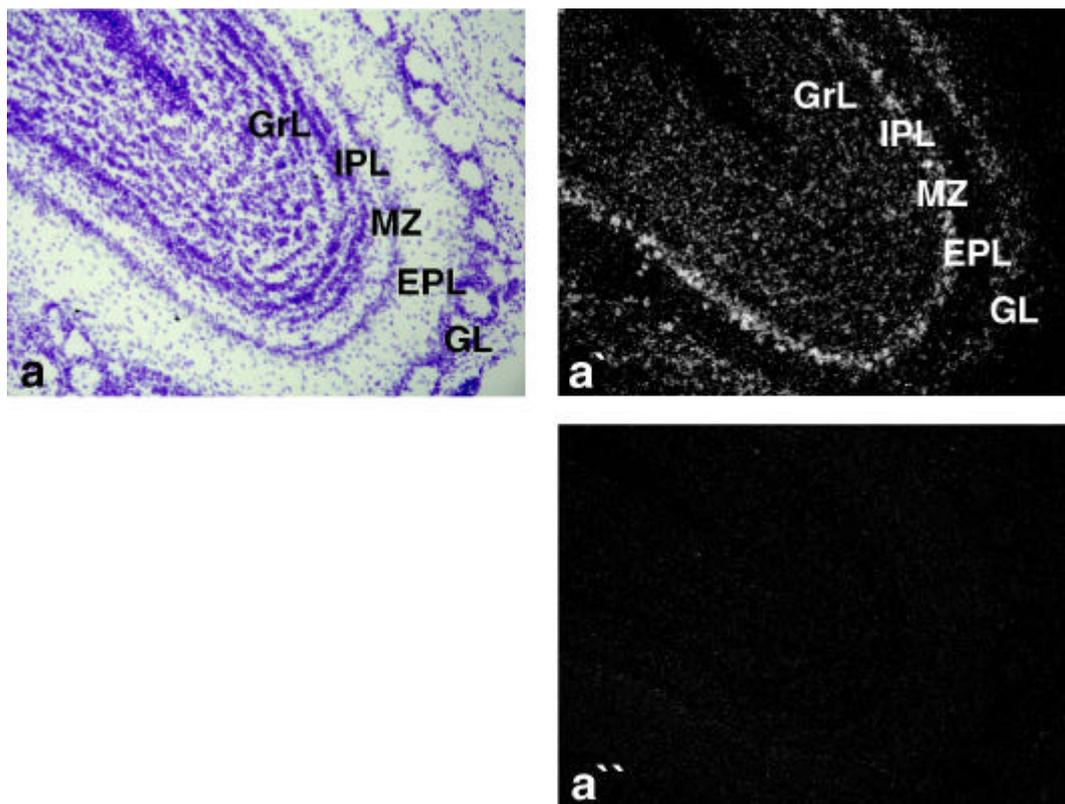
auch in der externen plexiformen Schicht exprimieren einzelne Pinsel-Zellen in der Schicht und die externen Pinsel-Zellen am Übergang zur glomerulären Schicht mbFZb (siehe Abb. 34b, b', Stern). Die sense-Kontrolle zeigt dort keine Expression (Abb. 34a'').

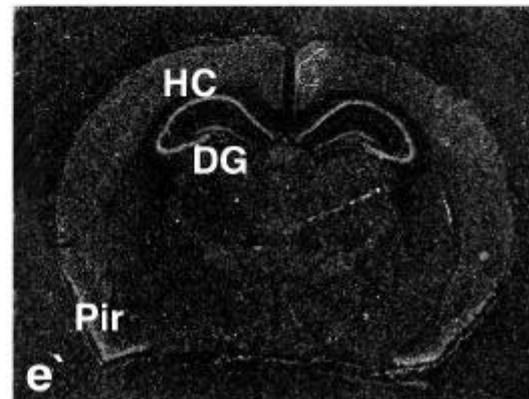
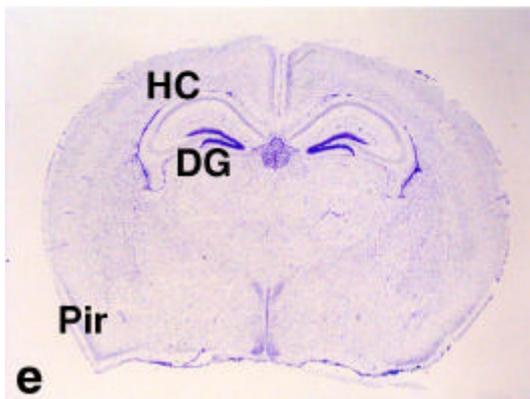
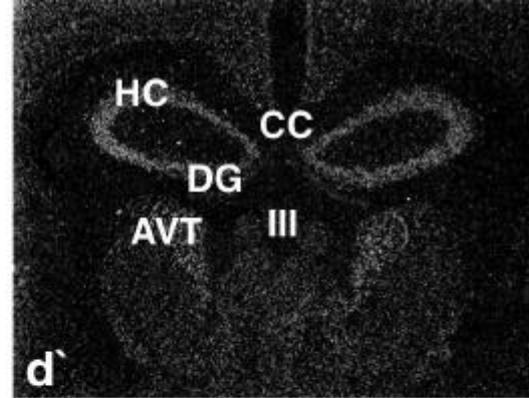
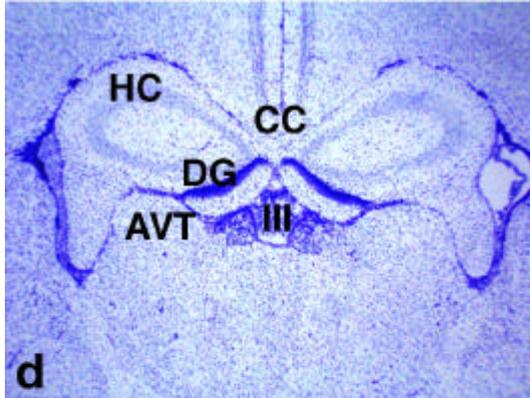
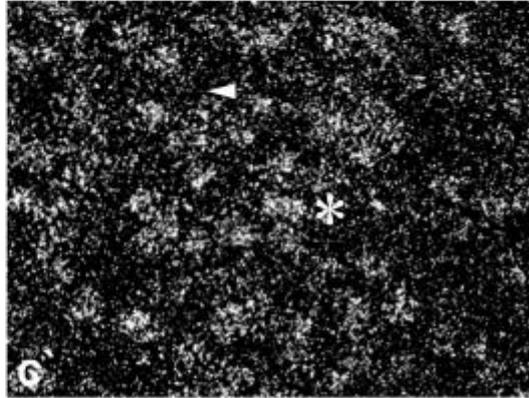
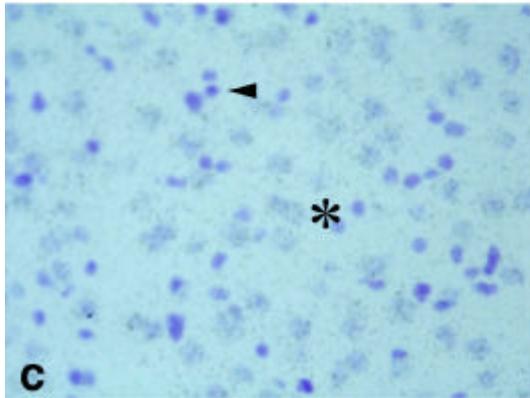
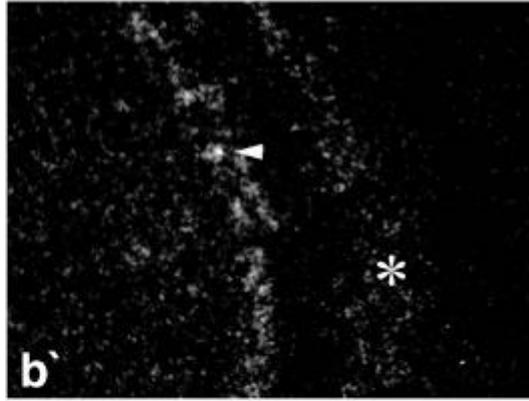
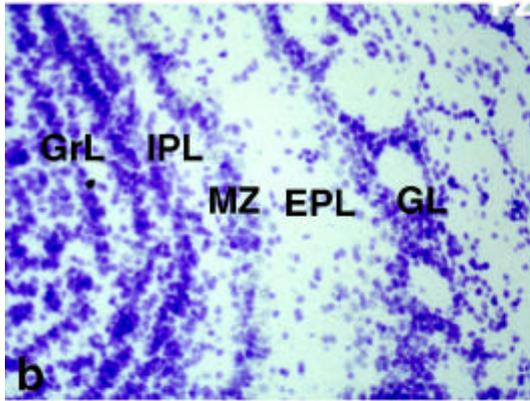
Die Expression im Thalamus ist besonders stark in den Zellen des Hippocampus und des anteroventralen, thalamischen Nukleus. Abb.34e und e' zeigen neben diesen Domänen der spezifischen Expression auch, dass die weiße Substanz (Corpus Callosum), welche keine Nervenzellkörper enthält frei von mbFZb-Transkript ist.

Die Expression im Cortex (siehe Abb. 34d, d', e, e', c, c') ist im rostralen Bereich des Gehirns wesentlich stärker als im caudalen Bereich, d.h. vor allem der motorische, der cinguläre und der limbische Cortex zeigen die Expression; der sensorische Cortex zeigt, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache Expression. Die größte Anhäufung von Transkripten im Cortex findet sich im piriformen Cortex (siehe Abb. 34e, e').

Im Hinterhirn fallen als Ort der stärksten Expression von mbFZb die Purkinje-Zellen des Cerebellums besonders auf (Die Pfeilspitzen in Abb. 34f und f' deuten auf die Purkinje-Zellen).

Die antisense-Kontrolle zeigt neben der Hintergrundexpression in der granulären Schicht kein Signal.





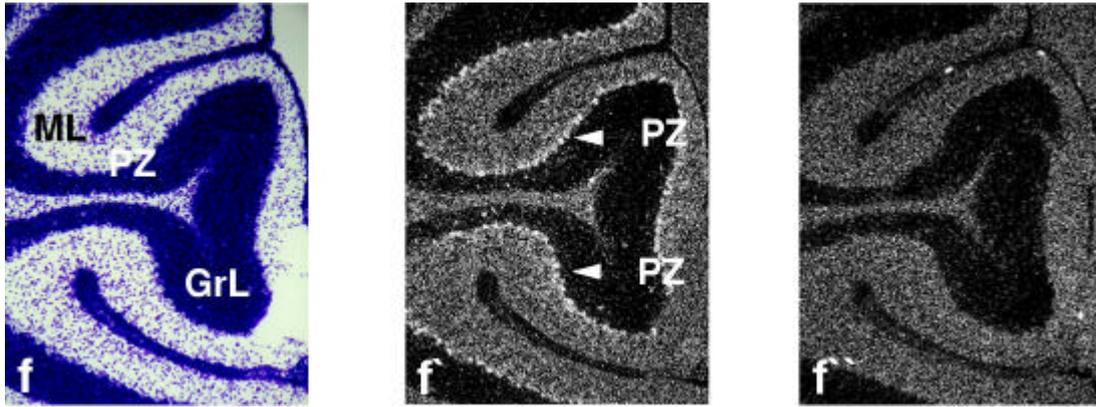


Abbildung 34 zeigt die in-situ-Hybridisierung von coronalen Gehirnschnitten adulter Mäuse mit der Probe P7B. Die Abbildungen a-f zeigen Aufnahmen im Hellfeld, Abb. 34a` bis f` die entsprechenden Aufnahmen im Dunkelfeld. Abb. 34a`` und c`` wurde mit der antisense-Probe hybridisiert. Der Pfeil in b` deutet auf die Mitralzellen, der Stern auf die externen Pinsel-Zellen. Der Pfeil in c und c` markiert eine Gliazelle, der Stern eine Nervenzelle.

AVT: anteroventraler thalamischer Nukleus; CC: corpus callosum; DG: Gyrus dentatus; EPL: externe plexiforme Schicht; GL: glomeruläre Schicht; GrL: granuläre Schicht; HC: Hippocampus; IPL: interne plexiforme Schicht; MZ: Mitralzellen; Pir: piriformer Cortex; PZ: Purkinje Zellen; III: dritter Ventrikel.

4.2.6 Analyse des Phänotyps der $mbFZb^{+/lacZ}$ - und $mbFZb^{lacZ/lacZ}$ -Tiere

Weder die $mbFZb^{+/lacZ}$ - noch die $mbFZb^{lacZ/lacZ}$ -Tiere weisen einen offensichtlichen Phänotyp auf.

Da die Vektorintegration in der Mitte des Transkatierten Bereichs des Gens $mbFZb$ passiert ist (siehe Abb. 23c), würde man jedoch zumindest in den homozygoten Tieren einen Phänotyp erwarten.

Deshalb wurden die homozygoten Tiere mit Hilfe einer Northern-Hybridisierung auf ein mögliches Splicen um den Genfallenvektor hin untersucht. Dieser Vorgang kann in den homozygoten Tieren zum Erhalt geringer Mengen des Wildtyptranskripts des mutierten Gens $mbFZb$ führen, so dass die homozygoten Tiere keinen Phänotyp zeigen.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Northern Hybridisierung mit Proben gegen den 5` Bereich bzw. den 3` Bereich des Gens an RNA von Wildtyp-, $mbFZb^{+/lacZ}$ - und $mbFZb^{lacZ/lacZ}$ -Tieren durchgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass es in den homozygoten Tieren zu einer starken Reduktion des Wildtyp-Transkripts kommt; allerdings scheint ein geringer Teil desselben aufgrund eines Splicens um den Genfallenvektor erhalten zu bleiben (5` Probe, Abb. 35a). Auch die Hybridisierung mit der Probe gegen den 3` Bereich des Gens zeigt noch ein schwaches Wildtyp-Signal in den homozygoten Tieren (Abb. 35b).

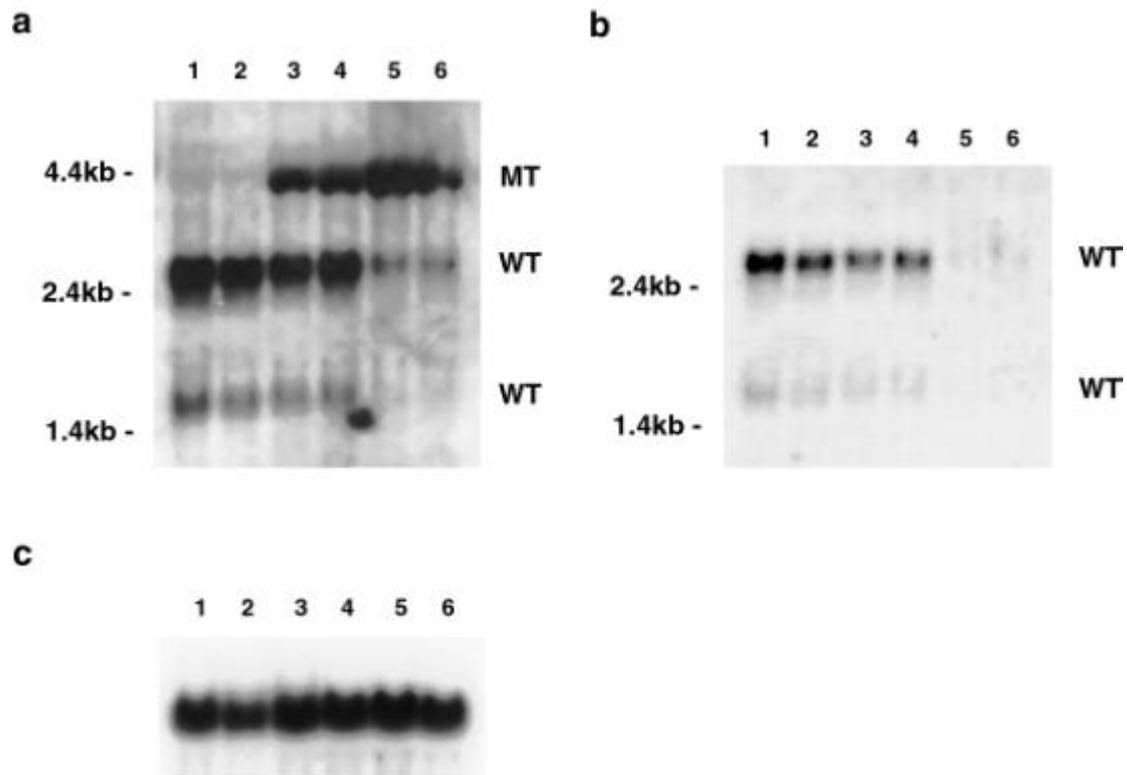


Abbildung 35 zeigt die Northern Hybridisierung mit RNA von Wildtyp- $mbFZb^{+/lacZ}$ - und $mbFZb^{lacZ/lacZ}$ - Tieren. In Abbildung 35a wurde die Probe gegen den 5' Bereich des Gens (N210), in Abb. 35b diejenige gegen den 3' Bereich des Gens (P4b) verwendet. Abb. 35c zeigt die RNA-Ladekontrolle, hybridisiert mit β -Aktin. In Spur 1,2 wurde Wildtyp-RNA, in Spur 3 und 4 RNA von $mbFZb^{+/lacZ}$ - Tieren und in Spur 5 und 6 RNA von $mbFZb^{lacZ/lacZ}$ - Tieren geladen. Die Wildtyp-Banden (WT) sind mit den Sonden N210 und P4B bei allen drei Genotypen zu erkennen, die Mutanten-Bande (MT) ist nur bei den heterozygoten und homozygoten Tieren unter Verwendung der Sonde N210 zu detektieren.

5 Diskussion

5.1 **Kein Phänotyp der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus - trotz Expression und Translation des dominant negativen FGF-Rezeptors 2**

Bei der Herstellung der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus war das Ziel zu klären, welche Funktion FGF8 während der Entwicklung der MH-Region (Isthmus) in der Maus spielt. Das Signalmolekül FGF8 ist ab dem 12 Somiten Stadium in einem schmalen dorso-ventralen Streifen im Isthmus der Maus exprimiert. Der Transkriptionsfaktor Engrailed1 (En1) ist ab dem 1 Somiten Stadium und somit etwas früher als FGF8 (12 Somiten) im Isthmus zu finden. Zudem deckt die Expression von En1 dort in einem breiteren Bereich als FGF8 ab (McMahon et al., 1992; Heikinheimo et al., 1994; Mahmood et al., 1995; Wassef and Joyner, 1997; Shamim et al., 1999).

Aus diesem Grund wurde der En1-Promotor gewählt um die cDNA des dominant negativen FGF-Rezeptors 2 ektopisch zu exprimieren.

Die Idee dieses Projekts war es, durch die Überexpression der cDNA dieses verkürzten FGF-Rezeptor 2 unter dem En1-Promotor die FGF8-Signalkaskade in der En1-Expressionsdomäne zu unterbrechen.

Die FGF-Rezeptor 1-4 müssen zu ihrer Aktivierung Dimere ausbilden, welche zur Phosphorylierung des intrazellulären Bereiches führen (Bellot et al., 1991). Diese Dimere können zwischen Molekülen derselben Art von Rezeptoren (Homodimere) und solchen verschiedener Arten (Heterodimere) entstehen. Das überexprimierte dnFGF-Rezeptor 2-Protein führt zu Bildung von inaktiven Dimeren, da der intrazelluläre Bereich dieses Rezeptors fehlt (siehe Abb. 4) und somit keine Phosphorylierung mit anschließender Signaltransduktion passieren kann.

Daß diese Unterbrechung der Signalkaskade tatsächlich stattfindet, konnte für den FGF-Rezeptor 1 in Zellkultur gezeigt werden (Ueno et al., 1992).

Die $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus, welche den dominant negativen FGF-Rezeptor 2 unter dem Engrailed 1-Promotor exprimiert zeigt keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Transkription des dnR2/IRESlacZ-Konstrukts in der Mittelhirn/Hinterhirn (MH) -Region findet zur richtigen Zeit statt, ebenso die Translation der β -Galaktosidase. Allerdings wurde auch die ektopische Expression der antisense-RNA des Konstrukts beobachtet. Die Analyse der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse in Bezug auf die Expression der Musterbildungsgene in der MH-Region am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung zeigte keine Veränderung derselben bei den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren. Auch die makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Gehirne adulter $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse brachte keinen Phänotyp der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere hervor.

Eine Ursache für den fehlenden Phänotyp der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere kann in der Höhe des Expressionslevels des dnFGF-Rezeptors 2 in dieser Gehirnregion liegen, möglicherweise bedingt durch die Expression des sense-Transkripts. Bei einer zu geringen Zahl an dnFGF-Rezeptor 2-Molekülen könnte die FGF-Signalkette weiterhin aufrecht erhalten werden. Zum anderen wäre es denkbar, dass in der Isthmusregion andere Signalkaskaden für die FGF-Signaltransduktion vorhanden sind, als jene über die FGF-Rezeptoren 1-4. Komplexer wird die Situation durch die Tatsache, dass neben FGF8 auch andere FGF-Moleküle zum gleichen Zeitpunkt im Isthmus zu finden sind (FGF17, FGF18) und diese Signalstoffe entweder alleine oder im Konzert mit FGF8 funktionieren könnten.

Die verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten für den fehlenden Phänotyp der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Mäuse werden im nachfolgenden Teil genauer analysiert.

5.1.1 Expressionslevel des dnFGF-Rezeptors 2 in der Mittelhirn/Hinterhirnregion

Eine Erklärung für den Erhalt der Mittelhirn/Hinterhirngrenze in den $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tieren mag im zu niedrigen Expressionslevel der dnFGF-Rezeptor 2-cDNA liegen. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen.

Zum einen kann die Stärke des $En1$ -Promotors in den heterozygoten Tieren nicht ausreichen, um die benötigte Überexpression des dnFGF-Rezeptors 2 zu bewirken. Das Konstrukt für den trunkierten Rezeptor ist so gestaltet, dass die Transmembrandomäne intakt bleibt und nur der intrazelluläre, aktivierbare Teil des Proteins fehlt. Das bedeutet, dass der verkürzte Rezeptor weiterhin in die Zellmembran interagiert ist und nur mit den direkt benachbarten, endogenen FGF-Rezeptor-Molekülen interagieren und diese inaktivieren kann.

Deshalb wäre es durchaus möglich, dass der Expressionslevel des dnFGF-Rezeptors 2 nicht hoch genug ist, um die Zelloberfläche der FGF-sensiblen Zellen so abzudecken, dass keine Bindung eines FGF8-Moleküls an einen FGF-Rezeptor mehr zur Aktivierung der Signalkaskade führt.

Der Expressionslevel des dnFGF-Rezeptor 2-Transkripts müßte laut in-vitro-Expressions-Experimenten mindestens 10 mal so hoch sein wie der des Wildtyp-Transkripts, um eine effiziente Inhibierung der Signalkaskade zu bewirken (Ueno et al., 1992).

Daß membrangebundene, dominant negative Konstrukte in vivo funktionieren, wurde in *Xenopus* (Amaya et al., 1991; Launay et al., 1996), in der Ratte und in der Maus gezeigt (Peters et al., 1992; Osterhout et al., 1997; Saffell et al., 1997). Allerdings gibt es auch einen Fall, in dem Mäuse, welche den transmembrangebundenen, dominant negativen Rezeptor unter dem Metallothionin-Promotor exprimieren nur eine leichte Veränderung der Haut zeigen. Tiere, welche den entsprechenden Rezeptor ohne die Transmembrandomäne exprimieren, zeigen hingegen starke Mißbildungen verschiedener Organe, des Gehirns und der Extremitäten (Celli et al., 1998).

Die oben genannten Experimente weisen darauf hin, dass der für die Überexpression verwendete Promotor und die dadurch bestimmte Stärke der Überexpression des dominant negativen Rezeptors die Inhibierung der FGF-Signalkette mitbestimmen.

Eine Züchtung der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere zur Homozygotität kann keinen spezifischen Phänotyp erbringen. Die Expression der cDNA des dnFGF-Rezeptors 2 im $En1$ -Lokus führt zur Deletion des $En1$ -Gens, da durch die Integration der dnFGF-Rezeptor 2-cDNA das erste Exon des $En1$ -Gens zerstört und das Protein so inaktiviert wird (siehe 4.1.1, (Hanks et al., 1995)). $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Tiere zeigen den $En1^{-/-}$ -Phänotyp, welcher zunächst zu starken Modifikationen in der Mittelhirn/Hinterhirnregion und als Folge davon zu Defekten im inferioren Collikulum und Cerebellum führt (siehe Abb. 6a, (Wurst et al., 1994)). Mögliche Veränderungen der $En1^{dnR2lacZ/dnR2lacZ}$ -Tiere würden durch den sehr frühen und gravierenden Phänotyp der Inaktivierung des $En1$ -Gens vermutlich gar nicht erst zu Tage treten bzw.

durch diesen maskiert werden. Als Konsequenz daraus wurden im Rahmen dieses Projekts auch nur die heterozygoten Tiere analysiert.

Eine andere Erklärung für den zu geringen Transkriptionslevel des dnFGF-Rezeptors 2 kommt der Tatsache zu, dass neben der sense- auch die antisense-RNA des Rezeptors ektopisch in der En1-Region exprimiert wird. Dieses geschieht offensichtlich in einem stärkeren Maß als bei der sense-RNA. Somit wäre es durchaus denkbar, dass die antisense- an die sense-RNA bindet und so die erfolgreiche Translation des dnFGF-Rezeptors 2 stark beeinträchtigt.

Ein entsprechender posttranskriptionaler Regulationsmechanismus wurde z.B. für FGF2 postuliert. Hier wird in vivo antisense-RNA transkribiert, welche in unterschiedlichen Organen des Tiers in gegensätzlichen Konzentrationsverhältnissen zu finden ist und eine prätranslationale Regulation der FGF2-Transkripte suggeriert (Volk et al., 1989; Zuniga Mejia Borja et al., 1993; Murphy et al., 1994a; Knee et al., 1997).

Bei der Betrachtung der Translationsprodukte des dnR2/IRESlacZ-Fusionstranskripts fällt auf, dass die β -Galaktosidase in den En1^{+/dnR2lacZ}-Mäusen gut zu detektieren ist. Das spricht dafür, dass auf jeden Fall ein Teil der sense-RNA zur Translation bereitsteht. Jedoch ist die Menge des β -Galaktosidase-Translationsprodukts im Vergleich zu der Menge in den En1^{+/lacZ}-Reporter-mäusen stark reduziert, was auch durch die Blockierung der sense- durch die antisense-RNA zu erklären wäre.

Ähnliches gilt vermutlich auch für die Translation des dnFGF-Rezeptors 2. Das Protein selber konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da die bestehenden Antikörper spezifisch den intrazellulären Bereich des Rezeptors 2 erkennen. Dieser fehlt in dem dominant negativen Rezeptor.

Einen möglicherweise positiven Nebeneffekt könnte die Transkription der antisense-RNA des dominant negativen FGF-Rezeptors 2 jedoch haben. Denn diese antisense-RNA des dnR2/IRESlacZ-Transkripts bindet vermutlich nicht nur die sense-RNA des ektopisch exprimierten Rezeptors, sondern auch homologe Bereiche der sense-RNA des endogen exprimierten FGF-Rezeptors 2 (oder auch 1 und 3). Diese Bindung zwischen antisense- und sense-RNA sollte in der Konsequenz zu einer Verringerung der translatierbaren Rezeptortranskripte und so zu einer Inhibierung der FGF-Rezeptor-Signaltransduktion führen. Wie es zu dieser ektopischen Expression der antisense-RNA kommt, bleibt noch zu klären. Möglicherweise führt die Integration der dnFGF-Rezeptor 2-cDNA zu einer strukturellen Veränderung der DNA, so dass Verstärker-Elemente, welche im 3' Bereich des En1-Gens liegen Promotorfunktionen übernehmen könnten. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass der Mittelhirn/Kleinhirn-Enhancer im En1-Gen bisher nicht im Promotor identifiziert werden konnte. Er liegt vermutlich im 3' Bereich des Gens, wie es z.B. auch für Wnt1 gezeigt wurde (Rowitch et al., 1998).

Die oben aufgeführten möglichen Erklärungen für den fehlenden Phänotyp der En1^{+/dnR2lacZ}-Mäuse zeigen, dass nicht eindeutig geklärt werden kann, ob und in welchem Umfang dnFGF-Rezeptor 2 sense-Transkripte für die Translation zur Verfügung stehen. Auch eine wahrscheinliche Interaktion der antisense-Transkripte mit endogenen Rezeptortranskripten kann nicht im Detail geklärt werden. Allerdings fällt bei der Betrachtung der Expressionsmuster der FGF-Rezeptoren auf, dass die Rezeptoren 1-3 gerade im Bereich des Isthmus, dem Ort der dominanten FGF8 Expression kaum zu detektieren sind (Peters et al., 1992; Wilke et al., 1997; Walshe und Mason, 2000). Der FGF-Rezeptor 4 ist im Nervensystem nicht exprimiert (Marcelle et al., 1994).

Der Vergleich des sehr geringen Expressionslevels des endogenen FGF-Rezeptor 2-Transkripts mit dem Expressionslevel des dominant negativen sense-Transkripts und erst recht des antisense-Transkripts in der in-situ-Hybridisierung, läßt auf eine starke Inhibierung der FGF-Rezeptor Signaltransduktion in der MH-Region in den heterozygoten Tieren schließen. Der FGF-Rezeptor 2 ist vermutlich völlig inaktiviert. Dieser scheint daher nicht für die Signaltransduktion von FGF8 in der MH-Region verantwortlich zu sein. Aus diesem Grund werden im nachfolgenden Diskussionsteil weitere Hypothesen vorgestellt, die unter der Voraussetzung eines dominant negativen Effekts der ektopischen FGF-Rezeptor 2-Transkripte den fehlenden Phänotyp der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus erklären könnten.

5.1.2 Gibt es unbekannte FGF-Rezeptoren im Isthmus ?

Da die Menge des translatierten dnFGF -Rezeptor 2 Proteins, bzw. der dominant negative Effekt der antisense-Transkripte des Rezeptors vermutlich ausreichen, um eine Inhibierung der FGF-Rezeptoren in der MH-Region zu bewirken, werden weitere Erklärungsmöglichkeiten für den fehlenden Phänotyp der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus diskutiert. Das etablierte Schema der Signaltransduktion der FGF-Moleküle besagt, dass eine spezifische Interaktion der FGFs nur mit den FGF-Rezeptoren 1-4 erfolgt und nur diese Bindung zu einer Aktivierung der Rezeptoren und der nachfolgenden Signalkaskade führt (Ornitz et al., 1996; Szebenyi und Fallon, 1999). Die Bindungsstudien (FGF-FGF-Rezeptor-Interaktion) stammen aus Versuchen in Zellkultur, auch die Inhibierung der Signaltransduktion durch die Bindung von verkürzten FGF-Rezeptoren wurde so bestätigt (Osterhout et al., 1997; Saffell et al., 1997; Yayon et al., 1997). Nachfolgende Experimente im Tier zeigen, dass solche dominant negativen Rezeptoren die Funktion von FGFs erheblich beeinträchtigen können (Amaya et al., 1991; Ueno et al., 1992; Peters et al., 1994; Launay et al., 1996).

Da die $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Tiere jedoch keinen Phänotyp zeigen, stellt sich die Frage, ob in der Mittelhirn/Hinterhirnregion möglicherweise noch andere, bislang unbekannte FGF-Rezeptoren vorkommen, welche gezielt mit FGF8 interagieren. Die Bindung von FGF8-Signalmolekülen an diese Rezeptoren würde so auf anderem Wege zu einer Aktivierung der FGF8-Signalkette führen. Hierbei müßte es sich um eine andere Klasse von Rezeptoren handeln, die durch den dnFGF-Rezeptor 2 nicht inhibierbar sind.

Möglicherweise interagieren mit diesen Rezeptoren auch die beiden Wachstumsfaktoren FGF17 und FGF18, welche zum gleichen Zeitpunkt, im gleichen Bereich wie FGF8 in der MH-Region exprimiert sind (Maruoka et al., 1998; Ohbayashi et al., 1998; Xu et al., 1999a). Zwischen diesen drei Wachstumsfaktoren besteht vermutlich eine Redundanz in Bezug auf die Etablierung der MH-Grenze. Die Inhibierung der Signalkaskade eines FGFs müßte dann nicht zwingend zu einer Veränderung der MH-Region führen. Ob dieses Zusammenspiel tatsächlich existiert, muss in Tierexperimenten erst noch gezeigt werden.

5.1.3 Die Funktion von FGF8 in der MH-Region

Durch die Herstellung der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus konnten einige interessante Einblicke zum einen in Bezug auf die Transkriptions- und Translationsregulation und zum anderen in Bezug auf die FGF-Signaltransduktion gewonnen werden.

Durch das Einfügen von cDNA ($dnR2/IRESlacZ$) in den Lokus des Engrailed 1-Gen kommt es offensichtlich zu einem Ablesen des antisense-Strangs des Gens. Möglicherweise werden im 3' Bereich gelegene Verstärker-Elemente zu Promotor-Elementen umfunktioniert. Für eine genaue Analyse dieses Vorgangs, welcher möglicherweise auch einen generellen Mechanismus der posttranskriptionalen Regulation darstellt, müßte in nachfolgenden Studien der 3' Bereich und der 5' Bereich des $En1$ -Gens auf transkriptionsinduzierende Faktoren und potentielle Promotorelemente hin untersucht werden. In dieser Hinsicht stellt die $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus ein interessantes Modell für diese mögliche Art der Translationskontrolle dar.

Die spezifische Funktion von FGF8 im Rahmen der Entwicklung der Mittelhirn/Hinterhirnregion der Maus konnte mit der Expression des transmembrangebundenen, dominant negativen FGF-Rezeptors 2 unter dem $En1$ -Promoter in der $En1^{+/dnR2lacZ}$ -Maus nicht gezeigt werden. Die heterozygoten Tiere zeigen keinen Phänotyp. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung schließt viele Faktoren mit ein. Angefangen von der Höhe des Transkriptionslevels über die Translationsregulation bis hin zur Hinterfragung der FGF-FGF-Rezeptor Interaktion in der MH-Region.

Trotz einer Vielzahl von in-vitro- und in-vivo-Experimenten mit FGF8 ist immer noch nicht klar, wie dieses Signalmolekül in der Mittelhirn/Hinterhirnregion der Maus tatsächlich agiert. Verschiedenste Transplantationsexperimente vor allem im Huhn zeigten, dass das FGF8-Protein (FGF8b) in der Lage ist, im Mittelhirn und Teilen des Hinterhirns die Expression von $En1$ und 2, $Pax2$ und 5 und $Wnt1$ zu induzieren. Die tatsächliche Funktion von FGF8 in vivo ist aufgrund der zeitlichen Expressionsfolge dieser Gene vermutlich der Erhalt der Expression derselben (Bally-Cuif und Wassef, 1994; Martinez et al., 1995; Sheik und Mason, 1996; Crossley et al., 1996a; Crossley et al., 1996b; Lee et al., 1997; Grapin-Botton et al., 1999; Liu et al., 1999; Martinez et al., 1999; Shamim et al., 1999; Irving und Mason, 2000). Doch neben dieser "späteren" Funktion spielt FGF8 nach neuesten Erkenntnissen auch eine wichtige Rolle bei der Etablierung der MH-Grenze selber. FGF8 kann die Expression des Transkriptionsfaktors $Gbx2$ im dorsalen Hinterhirn induzieren und bildet mit $Otx2$ einen negativen Regulationsmechanismus. So stimuliert $Otx2$ in der MH-Region die Expression von FGF8, FGF8 seinerseits begrenzt die Expression von $Otx2$ auf Bereiche rostral des Isthmus (Liu et al., 1999; Martinez et al., 1999). Die Konfrontation der $Otx2$ -Expressionsdomäne (anteriores Neuralrohr) mit der $Gbx2$ -Expressionsdomäne (posteriores Neuralrohr) scheint den ersten Anstoß für die Etablierung des Isthmus zu geben (Wassermann et al., 1997; Acampora und Simeone, 1999; Broccoli et al., 1999; Millet, K., 1999; Hidalgo-Sanchez et al., 1999b; Katahira et al., 2000), doch FGF8 spielt über den Regulationsmechanismus mit $Otx2$ eine nicht unwesentliche Rolle bei der örtlichen Plazierung desselben.

Auch die Determinierung von Teilen des Hinterhirns geschieht zum Teil mit Hilfe von FGF8. Das Hinterhirn ist in Rhombomere segmentiert, deren Identität durch die Kombination der Expression verschiedener Hox-Gene (Homeobox-Transkriptionsfaktoren) bestimmt wird. Das erste Rhombomer ist dabei frei von Hox-Genen, das Rhombomer zwei exprimiert $Hox2a$. Durch die anterior-posteriore Implantation von FGF8 sezernierenden Trägerkugeln konnte gezeigt werden, dass FGF8 (vermutlich im Zusammenspiel mit posterioren Faktoren)

die Fähigkeit besitzt, die Grenze der Hox2a Expression im Hinterhirn zu verschieben. Auch die Expression von Wnt1 welches im ersten Rhombomer nicht exprimiert ist, wird durch FGF8 in der Deckenplatte inhibiert (Irving und Mason, 1999; Irving und Mason, 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass FGF8 neben der Aufrechterhaltung der MH-Grenze auch eine Funktion bei der Segmentierung des Hinterhirns zukommt (zumindest des ersten Rhombomers). Über welche Art von Signaltransduktionskaskade diese verschiedenen Vorgänge im Einzelnen ablaufen und inwieweit andere Moleküle, wie z.B. die Mitglieder der Klasse der FGF-Inhibitoren Sprouty 1-4 (Minowada et al., 1999), eine Rolle spielen, bleibt noch zu klären.

Neue Experimente, unter der Verwendung gewebspezifischer Promotoren und membrangebundener, als auch frei beweglicher dominant negativer FGF-Rezeptoren könnten weitere Hinweise auf die spezifische Funktion von FGF8, 17 und 18 in der Mittelhirn/Hinterhirnregion geben. Denn der Einsatz von dominant negativen Rezeptoren ermöglicht bei starker Präsenz derselben die Inaktivierung der ganzen FGF-Signalkaskade in dem durch den Promotor vorgegebenen Bereich. Eine mögliche funktionelle Redundanz der FGF-Proteine hätte somit keinen Einfluß auf den Phänotyp der mutierten Tiere.

5.2 Das neue Maus Gen mbFZb

Im Rahmen eines FGF2-Genfallen-Experiments in embryonalen Stammzellen wurde ein neues Maus-Gen identifiziert. Die cDNA des Gens mbFZb (Maus bFGF-reprimiertes, mögliches Zic3 bindendes Protein) wurde isoliert und analysiert. Dabei konnten zwei Spliceformen isoliert werden, die einen gemeinsamen 5' Bereich beinhalten und einen unterschiedlich langen 3' Bereich. Der translatierbare Bereich, der beiden gemeinsam ist führt zu einem Protein von 200aa Länge. Dieses Protein läßt sich in keiner bekannten Klasse von Proteinen zuordnen. Das Expressionsmuster dieses neuen Gens wurde im Rahmen der Embryonalentwicklung und in der adulten Maus studiert. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Analyse der Expression im Nervensystem. MbFZb wird im Genfallen-Experiment durch FGF2 reguliert, daher wird nachfolgend die Koexpression von mbFZb und FGF2 diskutiert. Diese gibt zusammen mit der Regulation von mbFZb im Genfallen-Experiment einen ersten Hinweis auf eine mögliches Zusammenspiel der beiden Faktoren in vivo. Die Homologie von mbFZb zu dem Xenopus-Gen XZ3BP (mögliches Zic3 bindendes Protein in Xenopus) deutet außerdem auf die Möglichkeit einer Involvierung der Zic-Gene in die Funktion von mbFZb hin; diese wird ebenfalls diskutiert.

Die Herstellung der mbFZb^{lacZ/lacZ}-Mäuse erbrachte keine weiteren Erklärungen in Bezug auf mögliche Regulationsmechanismen zwischen FGF2, mbFZb und Zic. Die mbFZb^{lacZ/lacZ}-Mäuse zeigten keinen Phänotyp, im Rahmen der Transkription wurde um den Genfallenvektor herumgesplitt, so dass ein Rest Wildtyp-Transkript erhalten blieb.

5.2.1 In-vivo-Kolokalisation von mbFZb und FGF2

Bei der Transkriptionsregulation eines Gens durch ein Protein ist zu erwarten, dass das Protein im gleichen Gewebe im Tier vorkommt, in dem die mRNA des Gens exprimiert wird. Die Expression von mbFZb wird aufgrund der Ergebnisse des Genfallen-Experiments vermutlich durch FGF2 reguliert. Aus diesem Grund werden nachfolgend einige

Expressionsdomänen von mbFZb im Nervensystem und im Auge diskutiert, in welchen die Expression der FGF2-mRNA, bzw. des FGF2-Protein beschrieben wurde. Für nahezu alle Expressionsdomänen von mbFZb sind in der Literatur Expressionsdaten für FGF2 zu finden (Bikfalvi et al., 1997).

Das Nervensystem der Maus zeigt zu Beginn seiner Entwicklung eine ubiquitäre Expression von mbFZb, welche verstärkt im postmitotischen Neuroepithel des Gehirns und des Neuralrohr und in den Spinalganglien zu finden ist. Mit zunehmender Differenzierung der Gehirnregionen in die verschiedenen Bereiche, kommt es dann zu einer Anhäufung des mbFZb-Transkripts. Vor allem die Ganglien der cranialen Nerven V (N. Trigeminus), VII (N. Facialis), VIII (N. Vestibulo-Cochlearis), IX (N. Glossopharynx) und X (N. Vagus) fallen durch ein hohes Expressionsniveau auf. Auch der sich entwickelnde Cortex und olfaktorische Bulbus zeigen einen zunehmenden Level an mbFZb-Transkript mit fortschreitender Entwicklung.

FGF2 ist wie mbFZb zu Beginn der Entwicklung des Nervensystems ubiquitär im Neuroepithel exprimiert (Kalcheim und Neufeld, 1990; Nurcombe et al., 1993). Später in der Entwicklung ist in einigen Bereichen des Nervensystems ein erhöhtes Maß an FGF2-Transkript zu detektieren, wie zum Beispiel im Rückenmark und den spinalen Ganglien (Kalcheim und Neufeld, 1990; Kato et al., 1992; Funakoshi et al., 1993; Weise et al., 1993; Dono und Zeller, 1994; Murphy et al., 1994a). Auch die Ganglien cranialer Nerven wie des Trigemini zeigen eine erhöhte Expression von FGF2 (Okada et al., 1993)

Im Gehirn adulter Mäuse ist mbFZb neben der ubiquitären Expression auch in distinkten Domänen lokalisiert. Im Hippocampus ist mbFZb in den Regionen CA1-3 (Ammons Horn 1-3) zu finden. Auch FGF2 ist im Hippocampus in allen Regionen vorhanden.

Der piriforme Cortex, der primäre olfaktorische Cortex, zeigt ebenfalls einen hohen Level sowohl an mbFZb- als auch an FGF2-mRNA. Auch die Purkinjezellen des Cerebellums exprimieren mbFZb und FGF2 (Ernfors et al., 1990; Gonzalez et al., 1990; Gomez-Pinilla et al., 1992; Matsuyama et al., 1992; Gomez-Pinilla et al., 1994).

Neben der Expression im Nervensystem sind mbFZb und FGF2 auch im sich entwickelnden Auge (Ausstülpung des Zwischenhirns) exprimiert. MbFZb und FGF2 kolokalisieren hier mit zwei Gruppen von Zellen. Die eine Gruppe sind die Epithelzellen in der Linse, die andere Gruppe die Zellen der inneren neuronalen Retina.

MbFZb ist zusammen mit FGF2 in den Epithelzellen am Linsenäquator exprimiert, an welchem die Epithelzellen von der Proliferation in die Differenzierung übergehen um die kristallinreichen Faserzellen der Linse zu bilden (Lovicu et al., 1997). In Kultur gehaltene Linsen-Epithelzellen verhalten sich ähnlich. Sie differenzieren bei hoher FGF2-Konzentration (McAvoy und Chamberlain, 1989).

In der Retina zeigt mbFZb eine starke Expression in der inneren Schicht, d.h. in der neuronalen Retina, welche später Photorezeptoren, bipolare Schaltzellen und Glia beinhaltet. FGF2 ist ebenfalls in dieser Schicht exprimiert und besitzt in Zellkultur das Potential Zellen der äußeren Schicht der Retina (Pigmentzellen) zu neuronalen Zellen differenzieren zu lassen (de Jongh und McAvoy, 1992; Pittack et al., 1997).

Vor allem in Regionen des Nervensystems in welchen postmitotische Zellen während der Entwicklung und auch im adulten Stadium differenzieren (kortikale Platte, Hippocampus, olfaktorischer Bulbus), ist eine erhöhte Expression von mbFZb zu detektieren. Auch FGF2 ist in diesen Bereichen exprimiert. Das deutet darauf hin, dass mbFZb möglicherweise zusammen mit FGF2 eine Rolle beim Differenzierungsprozeß von Neuronen spielt.

5.2.2 Das mögliche Zusammenspiel von mbFZb und FGF2

Im Genfallen-Experiment konnte wiederholt gezeigt werden, dass mbFZb durch FGF2 reprimiert wird. Die Expression von mbFZb wird in diesem Genfallen-Experiment durch die Aktivität des lacZ-Reportergens wiedergespiegelt. Die Verringerung der Transkripte des Reportergens findet allerdings nur in den Regionen auf der Platte statt, in welchen die Zellen sehr dicht wachsen und differenzieren. In ES-Zellen führt die Zugabe von FGF2 in das Kulturmedium zur neuronalen Differenzierung der Zellen (Hancock et al., 2000). Deshalb wäre es möglich, dass mbFZb in den Prozeß der Proliferation und Differenzierung der ES-Zellen involviert ist.

Das Ergebnis der Genfallen-Experimente und der Vergleich der Expressionsdomänen von mbFZb und FGF2 legen nahe, dass mbFZb in der Maus durch FGF2 reguliert werden könnte. MbFZb ist möglicherweise ein Protein, welches im Konzert mit FGF2 bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen (Nervenzellen im Gehirn und Neuralrohr, Linsenfaserzellen im Auge etc.) exprimiert, und so bei der geregelten Vermehrung und gerichteten Spezifizierung desselben eine Rolle spielt.

Die tatsächliche Regulation von mbFZb durch FGF2 kann jedoch nur durch ein genaues Studium der FGF2-Signaltransduktion analysiert werden. Einen ersten Hinweis auf eine Inhibierung von mbFZb durch FGF2 in-vivo könnten Elektroporations- bzw. Transplantationsexperimente erbringen.

5.2.3 MbFZb und die Familie der Zic-Transkriptionsfaktoren als potentielle interagierende Faktoren

Aufgrund von überlappenden Expressionsdomänen von mbFZb und FGF2 und den Ergebnissen im Genfallen-Experiment ist ein Zusammenspiel der beiden Faktoren denkbar.

Des weiteren wurde bei der Homologiesuche mit der Sequenz des neuen Gens mbFZb ein Gen in *Xenopus* identifiziert, welches eine sehr hohe Homologie zu mbFZB aufweist (Accession-Nr. AF12913). Die Ähnlichkeit beträgt 72% auf bp-Ebene und 76% auf aa-Ebene (siehe 4.2.2.3). Beide Sequenzen umschließen einen identischen translitierbaren Bereich, welcher auch von dem humanen Homolog geteilt wird, welches ebenfalls identifiziert werden konnte. Die *Xenopus*-Sequenz wurde bisher nur als solche publiziert, genaue Daten über die Funktion des Gens stehen noch aus. Allerdings wird dieses Gen als mögliches Zic3-bindendes Protein beschrieben. Daher wird dieses Gen hier als XZ3BP (mögliches Zic3-bindendes Protein aus Xenopus) bezeichnet. Inwieweit diese beschriebene Interaktion auf Zic3 beschränkt ist, oder auch für die anderen Zic-Gene 1, 2 und 4 gilt ist unklar. Deshalb wird allgemein über die Interaktion von mbFZb und die Familie der Zic-Gene spekuliert. Die Zic-Gene (Zink finger in cerebellum) sind Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren, die homolog zu dem Segmentpolaritätsgen odd-paired in *Drosophila* sind. Dieses bestimmt die zeitliche Aktivierung von Engrailed und Wingless und

definiert so die einzelnen Segmente während der Entwicklung der Fliege (Benedyk et al., 1994; Aruga et al., 1996a).

Einen ersten Anhaltspunkt in Bezug auf eine mögliche Interaktion von mbFZb und den Zic-Genen kann ein Vergleich der Expressionsdomänen während der Entwicklung und in der adulten Maus erbringen. Die Expression von mbFZb und den Zic-Genen überlappt während der Embryonalentwicklung zunächst im Neuroepithel der verschiedenen Gehirnregionen und im Neuralrohr. Später (E 14-16) ist mbFZb dann im olfaktorischen Bulbus und zu finden. Zic1 und Zic3 sind auch dort exprimiert. Auch im sich entwickelnden Cerebellum und der sich entwickelnden Retina sind alle Zic-Gene anzutreffen (Aruga et al., 1996b; Nagai et al., 1997). Im Gehirn der adulten Maus sind mbFZb und Zic1 (für dieses existiert eine Beschreibung der Expressionsdomänen, (Aruga et al., 1994)) im olfaktorischen Bulbus exprimiert.

Der Vergleich der Expressionsmuster von mbFZb und den Zic-Genen läßt vermuten, dass die Bindung von mbFZb und eine nachfolgende Modifikation der Funktion des gebundenen Zic-Gens sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Tier denkbar wäre.

5.2.4 mbFZb als Vermittler zwischen der FGF2-Signaltransduktion und den Zic-Transkriptionsfaktoren

Die in-vitro-Regulation von mbFZb durch FGF2 und der Expressionsvergleich der beiden Gene ist ein guter Hinweis auf eine Regulation von mbFZb durch FGF2 in vivo. Daneben interagiert mbFZb möglicherweise mit den Zic-Transkriptionsfaktoren. Diese beiden Feststellungen würden mbFZb in der Signalkette zwischen die FGF-Signalmoleküle und die Zic-Transkriptionsfaktoren stellen.

Um einen genauen Einblick in diesen möglichen Regulationsmechanismus zu erhalten, sind noch eine Vielzahl von in-vitro- und in-vivo-Experimenten durchzuführen.

So muss zum einen geklärt werden, ob FGF2 mbFZb tatsächlich reprimieren kann. Hier wären Transplantations- bzw. Elektroporationsexperimente von Nutzen, bei welchen die Applikation von FGF2 zu einer Reduktion des mbFZb-Expressionslevels im Embryo führen sollte. Um die Interaktion von mbFZb und Zic3 eindeutig zu zeigen, könnten z.B. Experimente in Hefe durchgeführt werden, welche über die Aktivierung eines Reporter-Gens zeigen, ob es zu einer tatsächlichen Interaktion der beiden Proteine in der Zelle kommt.

Aus den mutierten ES-Zellen des Genfallen-Experiments wurden auch Mäuse hergestellt. Die mbFZb^{lacZ/lacZ}-Mäuse erbrachten keinen Phänotyp, da es in den Tieren zu einem Splicen um den Genfallenvektor herum kommt, und ein Teil des Wildtyp-transkripts erhalten bleibt. Deshalb wäre es auch interessant, eine Maus zu generieren, bei welcher ein orts- und zeitabhängige Inaktivierung des Gens mbFZb möglich wäre. So könnten spezifische Funktionen des Gens z.B. im olfaktorische Bulbus oder im Hippocampus studiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, J. A., Mergia, A., Whang, J. L., et al., 1986. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* **233**, pp. 545-548
- Acampora, D. and Simeone, A., 1999. Understanding the roles of Otx1 and Otx2 in the control of brain morphogenesis. *Trends Neurosci.* **22**, pp. 116-122
- Amaya, E., Musci, T. J. and Kirschner, M. W., 1991. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **26**, pp. 257-270
- Arman, E., Haffner-Krausz, R., Chen, Y., et al., 1998. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, pp. 5082-5087
- Aruga, J., Nagai, T., Tokuyama, T., et al., 1996b. The mouse *Zic* gene family. *J Biol. Chem.* **271(2)**, pp. 1043-1047
- Aruga, J., Yokota, N., Hashimoto, M., et al., 1994. A novel zinc finger protein, *Zic*, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **63(5)**, pp. 1880-1890
- Aruga, J., Yozu, A., Hayashizaki, Y., et al., 1996a. Identification and characterization of *Zic4*, a new member of the mouse *Zic* gene family. *Gene* **172**, pp. 291-294
- Asano, M. and Gruss, P., 1992. Pax-5 is expressed at the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. *Mech. Dev.* **39**, pp. 29-39
- Bally-Cuif, L. and Wassef, M., 1994. Ectopic induction and reorganisation of Wnt-1 expression in quail/chick chimeras. *Development* **120**, pp. 3379-3394
- Basilico, C. and Moscatelli, D., 1992. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* **59**, pp. 115-65
- Bellot, F., Crumley, G., Kaplow, J. M., et al., 1991. Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J.* **10**, pp. 2849-2854
- Benedyk, M. J., Mullen, J. R. and DiNardo, S., 1994. odd-paired: a zinc finger pair-rule protein required for the timely activation of engrailed and wingless in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* **8**, pp. 105-117
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., et al., 1995. Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J. Cell Biol.* **129(1)**, pp. 233-43
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., et al., 1997. Biological role of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.* **18**, pp. 26-45

- Blunt, A. G., Lawshe, A., Cunningham, M. L., et al., 1997. Overlapping expression and redundant activation of mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) receptors by alternatively spliced FGF-8 ligands. *J. Biol. Chem.* **272**, pp. 3733-3738
- Boettger, T., Wittler, L. and Kessel, M., 1999. FGF8 functions in the specification of the right body side of the chick. *Curr. Biol.* **9**, pp. 277-80
- Bohlen, P., Baird, A., Esch, F., et al., 1984. Isolation and partial molecular characterisation of pituitary fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, pp. 5364-5368
- Broccoli, V., Boncinelli, E. and Wurst, W., 1999. The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer. *Nature* **401**, pp. 164-168
- Bugler, B., Amalric, F. and Prats, H., 1991. Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localisation of basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell Biol.* **11**, pp. 573-7
- Burgess, W. H. and Maciag, T., 1989. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, pp. 575-606
- Burrus, L. W., Zuber, M. E., Lueddecke, B. A., et al., 1992. Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol.* 5600-5609
- Carl, M. and Wittbrodt, J., 1999. Graded interference with FGF signalling reveals its dorsoventral asymmetry at the mid-hindbrain boundary. *Development* **126**, pp. 5659-67
- Celli, G., LaRochelle, W. J., Mackem, S., et al., 1998. Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning. *EMBO* **17**, pp. 1642-1655
- Chaudhuri, M. M., Moscatelli, D. and Basilico, C., 1993. Involvement of the conserved acidic amino acid domain of FGF receptor 1 in ligand-receptor interactions. *J. Cell Physiol.* **157**, pp. 209-216
- Cheon, H.-G., LaRochelle, W. J., Bottaro, D. P., et al., 1994. High-affinity binding sites for related fibroblast growth factor ligands reside within different receptor immunoglobulin-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, pp. 989-993
- Christen, B. and Slack, J. M., 1997. FGF-8 is associated with anteroposterior patterning and limb regeneration in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **192**, pp. 455-66
- Coffin, J. D., Florkiewicz, R. Z., Neumann, J., et al., 1995. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol. Biol. Cell* **6(12)**, pp. 1861-73
- Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte, J. C., Abud, H., et al., 1995. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chicken embryos. *Cell* **80**, pp. 739-746

Colvin, J. S., Bohne, B. A., Harding, G. W., et al., 1996. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Gen.* **12**, pp. 390-397

Condrón, B., 1999. Spatially discrete FGF-mediated signalling directs glial morphogenesis. *Development* **126**, pp. 4635-41

Cornell, R. A. and Kimelman, D., 1994. Activin-mediated mesoderm induction requires FGF. *Development* **120**, pp. 453-462

Crossley, P. H. and Martin, G. R., 1995. The mouse FGF8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* **121**, pp. 439-451

Crossley, P. H., Martínez, S. and Martin, G. R., 1996a. Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**, pp. 66-68

Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A., et al., 1996b. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**, pp. 127-36

Danielian, P. S. and McMahon, A. P., 1996. Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* **383**, pp. 330-334

Davis, C. A. and Joyner, A. L., 1988. Expression patterns of the homeobox containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene int-1 diverge during mouse development. *Gen. Dev.* **2**, pp. 1736-1744

de Jongh, R. and McAvoy, J. W., 1992. Distribution of acidic and basic fibroblast growth factors (FGF) in the foetal rat eye: implication for lens development. *Growth Factors* **6**, pp. 159-177

De Moerlooze, L., Spencer-Dene, B., Revest, J.-M., et al., 2000. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* **127**, pp. 483-492

Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., et al., 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* **84**, pp. 911-921

Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M., et al., 1994. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.* **8**, pp. 3045-3057

DiGabriele, A. D., Lax, I., Chen, D. I., et al., 1998. Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. *Nature* **393**, pp. 812-817

Dionne, C. A., Crumley, G., Bellot, F., et al., 1990. Cloning an expression of two distinct high affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factor. *EMBO J.* **9**, pp. 2685-2692

Doherty, P. and Walsh, F. S., 1994. Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, pp. 49-55

Dono, R., Texido, G., Dussel, R., et al., 1998. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO* **17**, pp. 4213-4225

Dono, R. and Zeller, R., 1994. Cell-type specific nuclear translocation of fibroblast growth factor-2 isoform during chick kidney and limb morphogenesis. *Dev. Biol.* **163(2)**, pp. 316-330

Ernfors, P., Lonnerberg, P., Ayer-LeLievre, C., et al., 1990. Developmental and regional expression of basic fibroblast growth factor mRNA in the rat central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **27**, pp. 10-15

Esko, J. D., 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, pp. 805-16

Faham, S., Hileman, R. E., Fromm, J. R., et al., 1996. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* **271**, pp. 1116-20

Fallon, J. F., Lopez, A., Ros, M. A., et al., 1994. FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, pp. 104-7

Favor, J., Sandulache, R., Neuhauser-Klaus, A., et al., 1996. The mouse Pax2 (1Neu) mutation is identical to a human PAX2 mutation in a family with renal-coloboma syndrome and results in developmental defects of the brain, ear, eye, and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, pp. 13870-13875

Feldman, B., Poueymirou, W., Papaioannou, V. E., et al., 1995. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* **267**, pp. 246-249

Fernig, D. G. and Gallagher, J. T., 1994. Fibroblast growth factor and their receptors: an information network controlling tissue growth morphogenesis and repair. *Prog. growth factor res.* **5**, pp. 353-77

Florkiewicz, R. Z., Majack, R. A., Buechler, R. D., et al., 1995. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol.* **162**, pp. 388-99

Florkiewicz, R. Z. and Sommer, A., 1989. Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86(11)**, pp. 3978-81

Floss, T., Arnold, H. H. and Braun, T., 1997. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes Dev.* **11**, pp. 2040-2051

Fulgham, D. L., Widhalm, S. R., Martin, S., et al., 1999. FGF-2 dependent angiogenesis is a latent phenotype in basic fibroblast growth factor transgenic mice. *Endothelium* **6**, pp. 185-95

Funakoshi, Y., Matsuda, S., Uryu, K., et al., 1993. An immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor in the developing chick. *Anat. Embryol.* **187**, pp. 415-423

Fürthauer, M., Thisse, C. and Thisse, B., 1997. A role for FGF-8 in the dorso-ventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development* **124**, pp. 4253-4264

Gatoh, Y., Masuyama, N., Suzuki, A., et al., 1995. Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *EMBO J.* **14**, pp. 2491-2498

Ghosh, A. and Greenberg, M. E., 1995. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* **15**, pp. 89-103

Gillespie, J. L., Paterno, G. P., Mahadewan, L. C., et al., 1992. Intracellular signalling pathways involved in mesoderm induction by FGF. *Mech. Dev.* **38**, pp. 99-107

Gomez-Pinilla, F., Lee, J. W. and Cotman, C. W., 1992. Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J. Neurosci.* **12**, pp. 345-355

Gomez-Pinilla, F., Lee, J. W. and Cotman, C. W., 1994. Distribution of basic fibroblast growth factor in the developing rat brain. *Neuroscience* **61**, pp. 911-923

Gonzalez, A. M., Buscaglia, M., Ong, M., et al., 1990. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localisation in the basement membranes of diverse tissues. *J. Cell Biol.* **110**, pp. 753-65

Gospodarowicz, D., Weseman, J. and Moran, J., 1975. Presence in brain of a mitogenic agent promoting proliferation of myoblasts in low density culture. *Nature* **256**, pp. 216-9

Grapin-Botton, A., Cambronero, F., Weiner, H. L., et al., 1999. Patterning signals acting in the spinal cord override the organizing activity of the isthmus. *Mech. Dev.* **84**, pp. 41-53

Guo, L., Degenstein, L. and Fuchs, E., 1996. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev.* **10**, pp. 165-175

Hancock, C. R., Wetherington, J. P., Lambert, N. A., et al., 2000. Neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitors from mouse embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, pp. 418-421

Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., et al., 1995. Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* **269**, pp. 679-682

Hebert, J. M., Rosenquist, T., Gotz, J., et al., 1994. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* **78**, pp. 1017-1025

Heikinheimo, M., Lawshe, A., Shackleford, G. M., et al., 1994. FGF-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech. Dev.* **48**, pp. 129-138

- Heldin, C.-H., 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* **80**, pp. 213-223
- Hidalgo-Sanchez, M., Simeone, A. and Alvarado-Mallart, R. M., 1999b. Fgf8 and Gbx2 induction concomitant with Otx2 repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development* **126**, pp. 3191-203
- Hill, D. P. and Wurst, W., 1993. Screening for novel pattern formation genes using gene trap approaches. *Methods Enzymol.* **225**, pp. 664-681
- Hynes, M. and Rosenthal, A., 1999. Specification of dopaminergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr. Opinion in Neurobiol.* **9**, pp. 26-36
- Irving, C. and Mason, I., 1999. Regeneration of isthmic tissue is the result of a specific and direct interaction between rhombomere 1 and midbrain. *Development* **126**, pp. 3981-3989
- Irving, C. and Mason, I., 2000. Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development* **127**, pp. 177-186
- Itoh, K. and Sokol, S. Y., 1994. Heparan sulfate proteoglycans are required for mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* **120**, pp. 2703-11
- Johnson, D. E., Lee, P. L., Lu, J., et al., 1990. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **10**, pp. 4728-4736
- Johnson, D. E. and Lewis, T. W., 1993. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* **60**, pp. 1-41
- Johnson, D. E. W., L.T., 1993. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* **60**, pp. 1-41
- Joyner, A. and Martin, G. R., 1987. En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene: expression during embryogenesis. *Genes Dev.* **1(1)**, pp. 29-38
- Joyner, A. L., 1996. Engrailed, Wnt and pax genes regulate midbrain-hindbrain development. *Trends Genet.* **12**, pp. 15-20
- Kalcheim, C. and Neufeld, G., 1990. Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryo. *Development* **109**, pp. 203-215
- Katahira, T., Sato, T., Sugiyama, S., et al., 2000. Interaction between Otx2 and Gbx2 defines the organizing center for the optic tectum. *Mech. Dev.* **91**, pp. 43-52
- Kato, H., Wanaka, A. and Tohyama, M., 1992. Co-localization of basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity and its receptor mRNA in the rat spinal cord and the dorsal root ganglion. *Brain Res.* **576**, pp. 351-354

- Kimelman, D. and Maas, A., 1992. Induction of dorsal and ventral mesoderm by ectopically expressed Xenopus basic fibroblast growth factor. *Development* **114**, pp. 261-269
- Klint, P. and Claesson-Welsh, L., 1999. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front. Biosc.* **4**, pp. 165-177
- Knee, R., Li, A. W. and Murphy, P. R., 1997. Characterization and tissue-specific expression of the rat basic fibroblast growth factor antisense mRNA and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, pp. 4943-4947
- Labonne, C. and Whitman, M., 1994. Mesoderm induction by activin requires FGF-mediated intracellular signals. *Development* **122**, pp. 463-472
- Launay, C., Fromentoux, V., Shi, D.-L., et al., 1996. A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous Xenopus inducers. *Development* **122**, pp. 869-880
- Lee, S. M. K., Dnielian, P. S., Fritsch, B., et al., 1997. Evidence that FGF8 from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development* **124**, pp. 959-969
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N., et al., 1999. Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during drosophila embryonic development. *Development* **126**, pp. 3715-3723
- Liu, A., Losos, K. and Joyner, A. L., 1999. FGF8 can activate Gbx2 and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development* **126**, pp. 4827-4838
- Lizarraga, G., Ferrari, D., Kalinowski, M., et al., 1999. FGFR2 signaling in normal and *limbless* chick limb buds. *Dev. Gen.* **25**, pp. 331-338
- Lovicu, F. J., de Jongh, R. U. and McAvoy, J. W., 1997. expression of FGF-1 and FGF-2 mRNA during lens morphogenesis, differentiation and growth. *Curr. Eye Res.* **16**, pp. 222-230
- Lumsden, A. and Krumlauf, R., 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, pp. 1109-15
- MacArthur, C. A., Lawshe, A., Xu, J., et al., 1995a. FGF-8 isoforms activate splice forms that are expressed in the mesenchymal regions of mouse development. *Development* **121**, pp. 3603-3613
- Maciag, T., Cerundolo, j., Iisley, S., et al., 1979. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterisation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, pp. 5674-8
- Mahmood, R., Bresnick, J., Hornbruch, A., et al., 1995. A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of the vertebrate limb bud outgrowth. *Cur. Biol.* **5**, pp. 797-806

Mansour, S. L., Goddard, J. M. and Capecchi, M. R., 1993. Mice homozygote for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and inner ear. *Development* **117**, pp. 13-28

Mansukhani, A., Dell'Era, P., Moscatelli, D., et al., 1992. Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: Activation by three members of the FGF family and requirement of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, pp. 3305-3309

Marcelle, C., Eichmann, A., Halevy, O., et al., 1994. Distinct developmental expression of a new avian fibroblast growth factor receptor. *Development* **120**, pp. 683-694

Martinez, S., Crossley, P. H., Cobos, I., et al., 1999. FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmo-cerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* **126**, pp. 1189-1200

Martinez, S., Marin, F., Nieto, M. A., et al., 1995. Induction of ectopic engrailed expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental boundaries as barriers. *Mech. Dev.* **51**, pp. 289-303

Maruoka, Y., Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., et al., 1998. Comparison of the expression of three highly related genes, FGF8, FGF17 and FGF18, in the mouse embryo. *Mech. Dev.* **74**, pp. 175-177

Matsuyama, A., Iwata, H., Okumura, N., et al., 1992. Localization of basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* **587**, pp. 49-65

McAvoy, J. W. and Chamberlain, C. G., 1989. Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development* **107**, pp. 221-228

McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., et al., 1992. The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt1-/Wnt1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**, pp. 581-595

McMahon, A. P., Joyner, A. L., Bradley, A., et al., 1992. The midbrain/hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1-mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**, pp. 581-95

Meyers, E. N., Lewnadoski, M. and Martin, G. R., 1998. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* **18**, pp. 136-141

Meyers, E. N. and Martin, G. R., 1999. Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science* **285**, pp. 403-6

Mignatti, P., Morimoto, T. and Rifkin, D. B., 1992. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J. Cell. Physiol.* **151**, pp. 81-93

- Millet, S., Bloch-Gallego, E., Simeone, A., et al., 1996. The caudal limit of Otx2 gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in-situ-hybridisation and chick quail homotopic grafts. *Development* **122**, pp. 3785-3797
- Millet, S., K., C., Epstein, D. J., et al., 1999. A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* **401**, pp. 161-164
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., et al., 1998. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to drosophila branchless. *Genes Dev.* **12**, pp. 3156-3161
- Minowada, G., Jarvis, L. A., Chi, C. L., et al., 1999. Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* **126**, pp. 4465-4475
- Mohammadi, M., Dikic, I., Sorokin, A., et al., 1996. Identification of six new novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **16**, pp. 977-989
- Muenke, M. and Schell, U., 1995. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Gen.* **11**, pp. 308-313
- Murphy, M., Reid, K., Ford, M., et al., 1994a. FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* **120**, pp. 3519-3528
- Murzin, A. G., Lesk, A. M. and Chothia, C., 1992. Beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. *J. Mol. Biol.* **223**, pp. 531-543
- Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., et al., 1997. The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation. *Dev. Biol.* **182**, pp. 299-313
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., et al., 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **18**, pp. 8424-8428
- Noji, S., Koyama, E., Myokai, F., et al., 1993. Differential expression of three chick FGF receptor genes, FGFR1, FGFR2 and FGFR3, in limb and feather development. *Limb Dev. Regen.* 645-654
- Nurcombe, V., Ford, M., JA, W., et al., 1993. Developmental regulation of neuronal response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science* **260**, pp. 103-6
- Ohbayashi, N., Hoshikawa, M., Kimura, S., et al., 1998. Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF18. *J. Biol. Chem.* **273**, pp. 18161-18164

- Ohuchi, H., Yoshioka, H., Tanaka, A., et al., 1994. Involvement of androgen-induced growth factor (FGF-8) gene in mouse embryogenesis and morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, pp. 882-888
- Okada, K., Matsuda, S., Ii, Y., et al., 1993. Basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in the rat trigeminal sensory system and peri-oral skin with vibrissae. *Cell Tissue Res* **272**, pp. 417-427
- Ornitz, D. M., Herr, A. B., Nilsson, M., et al., 1995. FGF binding and FGF receptor activation by synthetic heparan-derived di- and trisaccharides. *Science* **268**, pp. 432-6
- Ornitz, D. M., Xu, J., Colvin, J. S., et al., 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* **271**, pp. 15292-15297
- Orr-Urtreger, A., Bedford, M. T., Burakova, T., et al., 1993. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev. Biol.* **158**, pp. 475-486
- Orr-Urtreger, A., Givol, D., Yayon, A., et al., 1991. Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* **113**, pp. 1419-1434
- Ortega, S., Ittmann, M., Tsang, S. H., et al., 1998. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, pp. 5672-5677
- Osterhout, D. J., Ebner, S., Xu, J., et al., 1997. Transplanted oligodendrocyte progenitor cells expressing a dominant-negative FGF receptor transgene fail to migrate in vivo. *J. Neurosci.* **17**, pp. 9122-9132
- Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., et al., 1999. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neuronal stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* **19**, pp. 8487-97
- Peters, K., Werner, S., Liao, X., et al., 1994. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO* **13**, pp. 3296-3301
- Peters, K. G., Werner, S., Chen, G., et al., 1992. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* **114**, pp. 233-243
- Petroski, R. E., Grierson, J. P., Choi-Kwon, S., et al., 1991. Basic fibroblast growth factor regulates the ability of astrocytes to support hypothalamic neuronal survival in vitro. *Dev. Biol.* **147**, pp. 1-13
- Pittack, C., Grunwald, G. B. and Reh, T. A., 1997. Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in the chick embryos. *Development* **124**, pp. 805-816

- Plotnikov, A. N., Schlessinger, J., Hubbard, S. R., et al., 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* **98**, pp. 641-650
- Prats, H., Kaghad, H., Prats, A. C., et al., 1989. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, pp. 3978-3981
- Qiang, X., Davis, A. A., Goderie, S. K., et al., 1997. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent neuronal stem cells. *Neuron* **18**, pp. 81-93
- Quarto, N. and Amalric, F., 1994. Heparan sulfate proteoglycans as transducers of FGF2 signaling. *J. Cell Sci.* 3201-3212
- Reifers, F., Bohli, H., Walsh, E. C., et al., 1998. Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, pp. 2381-95
- Reifers, F., Walsh, E. C., Leger, S., et al., 2000. Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development* **127**, pp. 225-235
- Riese, J., Zeller, R. and Dono, R., 1995. Nucleo-cytoplasmatic translocation and secretion of fibroblast growth factor-2 during avian gastrulation. *Mech. Dev.* **49**, pp. 13-22
- Roghani, M., Mansukhani, A., Dell'Era, P., et al., 1994. Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J. Biol. Chem.* **269**, pp. 22156-22162
- Rowitch, D. H., Echelard, Y., Danielian, P. S., et al., 1998. Identification of an evolutionarily conserved 110 base-pair cis-acting regulatory sequence that governs Wnt-1 expression in the murine neural plate. *Development* **125**, pp.
- Rowitch, D. H. and McMahon, A. P., 1995. Pax-2 expression in the murine neural plate precedes and encompasses the expression domains of Wnt-1 and En-1. *Mech. Dev.* **52**, pp. 3-8
- Rubenstein, J. L. R., Martinez, S., Shimamura, K., et al., 1994. The embryonic vertebrate forebrain: The prosomeric model. *Science* **266**, pp. 578-580
- Rubenstein, J. L. R., Shimamura, K., Martinez, S., et al., 1998. Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**, pp. 445-477
- Saffell, J. L., Williams, E. J., Mason, I. J., et al., 1997. Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* **18**, pp. 231-242
- Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M., 1995. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptor? *Cell* **83**, pp. 357-360

- Shamim, H., Mahmood, R., Logan, C., et al., 1999. Sequential roles for Fgf4, En1 and Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain. *Development* **126**, pp. 945-959
- Shamim, H. and Mason, I., 1998. Expression of Gbx-2 during early development of the chick embryo. *Mech. Dev.* **76**, pp. 157-159
- Sheik, H. and Mason, I., 1996. Polarising activity of FGF-8 in the avian midbrain. *Int. J. Dev. Biol. Suppl.* 117-118
- Shi, E., Kan, M., Xu, J., et al., 1993. Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerisation of combinatorial splice variants. *Mol. Cell. Biol.* **13**, pp. 3907-18
- Simeone, A., Acampora, D., Massino, G., et al., 1992. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**, pp. 687-690
- Slack, J. M., Darlington, B. G., Heath, J. K., et al., 1987. Mesoderm induction in early *Xenopus* embryo by heparin-binding growth factor. *Nature* **326**, pp. 197-200
- Slack, J. M. W., Isaacs, H. V., Johnson, G. E., et al., 1992. Specification of the body plan during *Xenopus* gastrulation: dorsoventral and antero-posterior patterning of the mesoderm. *Development* **82**, pp. 143-149
- Sun, X., Meyers, E. N., Lewandoski, M., et al., 1999. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev.* **13**, pp. 1834-46
- Szebenyi, G. and Fallon, J. F., 1999. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int. Rev. Cytol.* **185**, pp. 45-106
- Tanaka, A., Miyamoto, K., Minamino, N., et al., 1992. Cloning and characterization of an androgen induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, pp. 8928-8932
- Temple, S. and Qiang, X., 1995. bFGF, neurotrophins, and the control of cortical neurogenesis. *Neuron* **15**, pp. 249-52
- Thomas, K. R. and Capecchi, M. R., 1990. Targeted disruption of the int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* **346**, pp. 847-850
- Ueno, H., Gunn, M., Dell, K., et al., 1992. A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, pp. 1470-1476
- Urbanek, P., Wang, Z.-Q., Fetka, I., et al., 1994. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* **79**, pp. 901-912

- van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R. A., 1994. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, pp. 251-337
- Venkataraman, G., Sasisekharan, V., Herr, A. B., et al., 1996. Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, pp. 845-850
- Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., Frase, D. D., et al., 1993. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* **11**, pp. 951-66
- Vicario-Abejon, C., Johe, K. K., Hazel, T. G., et al., 1995. Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. *Neuron* **15(1)**, pp. 105-14
- Vogel, A., Rodriguez, C. and Izpisua-Belmonte, J.-C., 1996. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* **122**, pp. 1737-1750
- Volk, R., Koster, M., Poting, A., et al., 1989. An antisense transcript from the *Xenopus laevis* bFGF gene coding for an evolutionary conserved 24kd protein. *EMBO* **8**, pp. 2983-2988
- Walshe, J. and Mason, I., 2000. Expression of FGFR1, FGFR2, and FGFR3 during early neural development in the chick embryo. *Mech. Dev.* **90**, pp. 103-110
- Walz, A., McFarlane, S., Brickman, Y. G., et al., 1997. Essential role of heparan sulfate in axon navigation and targeting in the developing visual system. *Development* **124**, pp. 2421-30
- Wang, F., Kan, M., Xu, J., et al., 1995b. Ligand-specific structural domains in the fibroblast growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, pp. 10222-10230
- Wang, F., Kan, M., Yan, G., et al., 1995a. Alternately spliced NH₂ terminal immunoglobulin-like loop I in the ectodomain of fibroblast growth factor (FGF) receptor 1 lowers affinity for both heparin and FGF-1. *J. Biol. Chem.* **270**, pp. 10231-10235
- Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., et al., 1997. Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 function. *Development* **124**, pp. 2923-34
- Wassef, M. and Joyner, A. L., 1997. Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum. *Perspect Dev Neurobiol* **5(1)**, pp. 3-16
- Webster, M. K. and Donoghue, D. J., 1997. FGFR activation in skeletal disorder: too much of a good thing. *TIG* **13**, pp. 178-182

- Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K., et al., 1998. Fibroblast growth factor receptor-3 and receptor-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development (in press)*
- Weise, B., Janet, T. and Grothe, C., 1993. Localization of bFGF and FGF-receptor in the developing nervous system of the embryonic and newborn rat. *J. Neurosci. Res.* **34**, pp. 442-53
- Wilke, T., Gubbels, S., Schwartz, J., et al., 1997. Expression of fibroblast growth factor receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3) in the developing head and face. *Dev. Dyn.* **210**, pp. 41-52
- Wilkie, A. O. M., 1997. Craniosynostosis: genes and mechanisms. *Hum. Mol. Gen.* **6**, pp. 1647-1656
- Wilkinson, D. G., Bailes, J. A. and McMahon, A. P., 1987. Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo. *Cell* **50**, pp. 79-88
- Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S., et al., 1994a. Activation of the fibroblast growth factor receptor underlies neurite outgrowth by L1, N-CAM and N-cadherin. *Neuron* **13**, pp. 583-594
- Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S., et al., 1994b. Characterization of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF. *Development* **120**, pp. 1685-1693
- Wurst, W., Auerbach, A. B. and Joyner, A. L., 1994. Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* **120**, pp. 2065-2075
- Xu, J., Lawshé, A., MacArthur, C. A., et al., 1999a. Genomic structure, mapping, activity and expression of fibroblast growth factor 17. *Mech. Dev.* **83**, pp. 165-178
- Xu, X., Takahashi, K., Slavkin, H. C., et al., 1999c. Murine fibroblast growth factor receptor 1 alpha (FGFR1a) isoforms mediate node regression and are essential for posterior mesoderm development. *Developmental Biology (in press)*
- Xu, X., Weinstein, M., Cuiling, L., et al., 1999b. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and their roles in limb development. *Cell Ti. Res.* **296**, pp. 33-43
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., et al., 1998. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, pp. 753-65
- Yamaguchi, T. P., Harpal, K., Henkemeyer, M., et al., 1994. Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* **8**, pp. 3032-3044

Yamaguchi, T. P. and Rossant, J., 1995. Fibroblast growth factors in mammalian development. *Development* **5**, pp. 485-491

Yayon, A., Ma, Y. S., Safran, M., et al., 1997. Suppression of autocrine cell proliferation and tumorigenesis of human melanoma cells and fibroblast growth factor transformed fibroblasts by kinase-deficient FGF receptor1: evidence for the involvement of Src-family kinases. *Oncogene* **1997**, pp. 2999-3009

Zhou, Z., Zuber, M. E., Burrus, L. W., et al., 1997. Identification and characterization of fibroblast growth factor (FGF) binding domain in the cysteine-rich FGF receptor. *J. Biol. Chem.* **272**, pp. 5167-5174

Zimmer, Y., Givol, D. and Yayon, A., 1993. Multiple structural elements determine ligand binding of fibroblast growth factor receptors. Evidence that both Ig domain 2 and 3 define receptor specificity. *J. Biol. Chem.* **268**, pp. 7899-7903

Zuber, M. E., Zhou, Z., Burrus, L. W., et al., 1997. Cysteine-rich FGF receptor regulates intracellular FGF-1 and FGF-2 levels. *J. Cell. Physiol.* **170**, pp. 217-227

Zuniga Mejia Borja, A., Meijers, C. and Zeller, R., 1993. Expression of alternatively spliced bFGF first coding exons and antisense mRNAs during chicken embryogenesis. *Dev. Biol.* **157**, pp. 110-118

Zuniga Mejia Borja, A., Murphy, C. and Zeller, R., 1996. AltFGF-2, a novel ER-associated FGF-2 protein isoform: its embryonic distribution and functional analysis during neural tube development. *Dev. Biol.* **180**, pp. 680-92

7 Anhang

Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. Wolfgang Wurst bedanken, der mir die beiden Projekte dieser Arbeit überlassen hat. Seine ständige Diskussionsbereitschaft, sein Ideenreichtum und seine Begeisterungsfähigkeit haben einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Rudi Balling danke ich für die Betreuung dieser Arbeit. Seine Freundlichkeit und Zuvorkommenheit haben das Anfertigen dieser Arbeit sehr erleichtert.

Bei Dr. Veronique Blanquet möchte ich mich für die umfassende Hilfe und Unterstützung in den ersten zwei Jahren meiner Arbeit bedanken. Beate Klädke und Petra BenHadi danke ich für die ES-Zell-Injektionen und die Blastozysten transfers.

Dr. Daniela Vogt-Weisenhorn danke ich für die reichhaltige Hilfe bei der phänotypischen Analyse der Mäuse und für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit. Dr. Alexander von Holst und Dr. Jordi Guimera möchte ich für die beratende Unterstützung bei der Analyse des Gens mbFZb danken, Dr. Alexander von Holst außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich allen anderen Mitgliedern unseres Labors für ihre Hilfe und die sehr diskussionsfreudige Atmosphäre.

Zuletzt möchte ich mich noch bei Norbert Seitner und meiner Familie bedanken, die mich während meines Studiums und im Verlauf dieser Arbeit uneingeschränkt unterstützt und bestärkt haben diesen Weg zu gehen.

Lebenslauf

Persönliche Daten	<p>Katja Vetter, geboren am 14.8.1971 in Starnberg als Tochter von Karin Vetter (geborene Krieg) und Dr.Hellmuth Vetter</p> <p>deutsche Staatsangehörigkeit ledig</p>
Schulbildung	<p>Grundschule 1977-1981 in Tutzing Gymnasium 1981-1990 in Tutzing Abitur 6/1990 mit den Leistungskursen Biologie und Französisch Abiturnote: 1,6</p>
Studium	<p>11/1990-3/1996 Biologie mit Hauptfach Zoologie an der Technischen Universität München Studiendauer: 11 Semester Abschlußnote: 1,4</p> <p>Diplomarbeit am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit am Institut für Säugetiergenetik in der Arbeitsgruppe von PD DR. Jochen Graw</p> <p><u>Thema:</u> Funktionsanalyse von αA-Kristallin bei der Bindung an γ-Kristallin in der Säugerlinse Note: 1,0</p>
Promotion	<p>seit 4/1996 am MPI für Psychiatrie und am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit im Institut für Säugetiergenetik ; Arbeitsgruppe klinische Neurogenetik von Dr. Wolfgang Wurst</p> <p><u>Thema:</u> Die Funktion von FGF2 und FGF8 während der Entwicklung des Nervensystems in der Maus</p>